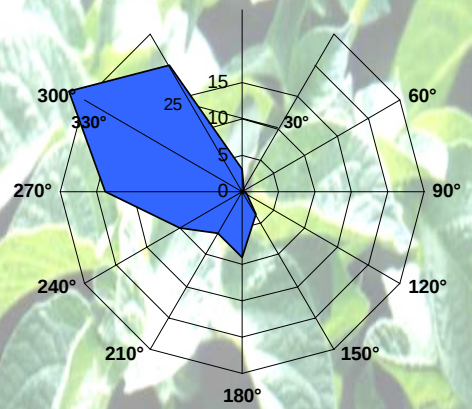
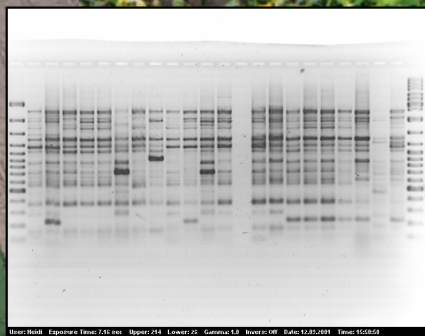


Heidi Bouws-Beuermann



Effects of strip intercropping on late blight severity,
yields of potatoes (*Solanum tuberosum* Lindl.)
and on population structure of *P. infestans*



Cuvillier Verlag Göttingen

*Das Glück besteht darin, zu leben wie alle Welt
und doch wie kein anderer zu sein.*

(Simone de Beauvoir)

Department of Ecological Plant Protection
University of Kassel
Germany

**Effects of strip intercropping on late blight severity,
yields of potatoes (*Solanum tuberosum* Lindl.)
and on population structure of *P. infestans***

Doctoral Dissertation

Submitted for the degree of Doctor of Agricultural Sciences (Dr. agr.)
of the Faculty of Organic Agricultural Sciences
University of Kassel

Presented by

Heidi Bouws-Beuermann

Witzenhausen, March 2005

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2005

Zugl.: Kassel, Univ., Diss., 2005

ISBN 3-86537-541-3

Tag der Disputation: 15. März 2005

Mitglieder der Prüfungskommission

1. Gutachter: Prof. Dr. Maria Renate Finckh (Universität Kassel)

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas von Tiedemann (Universität Göttingen)

Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Hess (Universität Kassel)

Prüfer: Prof. Dr. Petr Karlovsky (Universität Göttingen)

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2005

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2005

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-541-3

Contents

Summary.....	1
Zusammenfassung.....	4
1 General introduction.....	7
Potato late blight and its causal agent <i>Phytophthora infestans</i>.....	7
<i>The "new" P. infestans populations.....</i>	<i>8</i>
Late blight management in organic farming.....	11
<i>Possible effects of late blight management strategies on P. infestans.....</i>	<i>12</i>
Objectives and thesis outline.....	14
2 Effects of strip intercropping on late blight severity and potato tuber yields in field experiments, 2000-2002.....	15
3 Effects of cropping history and origin of seed potatoes on population structure of <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary	40
4 Cultivar-specific adaptation of <i>P. infestans</i> isolates to different potato hosts as revealed by tests of aggressiveness.....	66
5 Summarising discussion.....	82
<i>Effects of strip cropping on disease and yield.....</i>	<i>82</i>
<i>Phenotypic variation among and within P. infestans populations as affected by cropping strategy and seed source.....</i>	<i>85</i>
<i>Practical considerations.....</i>	<i>87</i>
<i>General conclusions.....</i>	<i>88</i>
List of references.....	89
Anhang.....	104
<i>Feldversuchspläne 2000-2002.....</i>	<i>104</i>
<i>Beispiele angewandter Statistikprogramme / Outputs (SAS, POPGENE, TFPGA).....</i>	<i>107</i>
List of conference papers.....	129
Danksagung	131
Curriculum vitae	133

Summary

Large-scale field experiments on the effects of **strip intercropping of potatoes** with neighbour spring cereals or grass-clover on late blight severity and yield in organic farming were conducted from 2000 to 2002. Two varieties, moderately resistant and susceptible were planted in wind direction and perpendicular. Plot sizes were 3 x 10 m in 2000 and 6 x 18 and 6 x 36 m in 2001 and 2002. Percent diseased leaf area was assessed twice weekly in 12 to 18 sections of each plot and separate yield samples from the same sections were taken.

The effects of this cropping strategy on the **population dynamics and structure of *Phytophthora infestans*** were also investigated. In addition, the effects of origin of the seed potatoes and the cropping history of fields (with or without previous potato cropping) was taken into consideration. A total of 639 *P. infestans* isolates were collected from experimental plots and commercial fields in the 10 km surrounding area. Subsamples of the collection were assessed for mating type (n=639), pathotype (n=272), and PCR-fingerprints (n=281). **Variety specific adaptation** was determined for a total of 90 isolates collected from the varieties Agria and Linda in the field. All isolates were tested on detached leaves of Agria and Linda in two laboratory tests. Aggressiveness parameters were Infection efficiency (IE), area under the lesion expansion curve (AUEC), maximum growth rate based on the Gompertz model (MGR), and sporulation capacity (SC) of the isolates.

1. Depending on the **year** epidemics were either strong, moderate or intermediate (2000-2002, respectively). Also, potato yields were strongly affected by year with yields in 2002 of only 50 % of the yields in 2000 or 2001.
2. In 2000, there were no significant effects of the cropping strategy on late blight severity. However, there were clear spatial trends in the field that suggested that there was strong intercrop interference between plots and also between blocks indicating that plots of 3 x 10m were too small. The increase in plot size and distance between plots and blocks in 2001 and 2002 led to clear differences in treatments. Strip cropping reduced the area under the disease progress curve (AUDPC) significantly in 2001 and 2002. The reductions ranged from 9-20 % in 2001 and 4-12 % in 2002. Reductions were highest in plots planted perpendicular to the wind neighboured by grass-clover.

The most important mechanism leading to disease reduction is **loss of inoculum** outside of the plots due to the distances between strips and the barrier function of the intercrops.

3. In plots neighboured by cereals and planted perpendicular to the wind, disease severity was significantly higher in the upwind rows that were protected from the wind by the cereals than in the downwind rows. The gradients in plots neighboured by grass-clover were reversed. The differences were most likely due to **microclimatic differences** in the edge rows and possibly turbulences next to the tall cereals.

4. Disease severity was significantly affected by **potato variety**. The effects of the cropping strategy did not interact with variety, however.
5. Yields in the potato rows directly neighboured by cereals were significantly reduced in all three years suggesting strong competition by the cereals.
6. A maximum of 20 % of the variation in yield could be explained by AUDPC depending on variety and year. In 2000, the yield of the more resistant variety Simone was affected three times stronger than the yield of the susceptible variety Secura (slopes of -0.19 versus -0.06, respectively). Apparently, the **early bulking** Secura had already accumulated most of its yield by the time late blight started but not Simone, however. The lack of correlation between AUDPC and yield in 2002 can be explained by the very dry spring which impeded the mineralization of organic matter in the soil resulting in much reduced nutrient supply to the crop. Thus, nutrient limitation rather than disease were responsible for the reduced yields.
7. There were no effects of competition by cereals on the yield loss relationship.
8. Both **mating types** occurred in the populations with 46, 13, and 31 % A2 in 2000-2002, respectively. Both types co-existed in 65, 69 and 92 % of the 31 populations studied.
9. Among 79, 114, and 79 isolates tested from 2000-2002, respectively, 26, 36, and 22 different **pathotypes** (53 in total) were identified. The most common pathotypes were 1.3.4.7.10.11 and 1.3.4.7.8.10.11 (n=74 and 48, respectively). The mean number of virulences per isolate was 6.2, 5.4, and 5.9, in the three years, respectively. While v2, v5, and v6 were rarest they occurred significantly more often among A2 isolates.
10. There was no effect of potato variety on pathotype composition in a population. Isolates from “new fields” (introduced seed potatoes from breeders, no history of potato growing) possessed significantly more often virulences v1, v2, v3, v6, and v7 than isolates from “old fields” (fields with a history of potato growing, mostly self produced seed potatoes) in the surroundings of the experimental farm.
11. With Rep- (repetitive extragenic palindromic) PCR analysis 24 reproducible DNA bands were detected of which 15 were polymorphic. A total of 36 different **rep-PCR fingerprints** were identified with 22 unique types. Four rep-PCR fingerprints dominated the populations in all three years with two representing 30 and 32% of all isolates tested. Fourteen of the 22 unique types originated from “old fields”.
12. The genetic distance (Nei, 1972) between the three populations 2000-2002 was 0.05. The normalized Shannon index H' (Sheldon, 1969) of the respective populations was 0.40, 0.27, and 0.33. In contrast, the Shannon index in the “old fields” was considerably higher with 0.91, 0.60, and 0.65 in the three years, respectively.
13. Comparison with representatives of US lineages US-1, US-6, US-7 and US-8 revealed nearest Nei's genetic standard distances to the US-1 isolate (0.24), followed by the US-7 (0.24), US-8 (0.32) and at last the US-6 isolate (0.47).

14. Populations originating from fields grown with **seed potatoes** brought from breeders were significantly different among each other and from populations originating from own seed potatoes. While populations from the commercial fields of varieties Agria and Linda in 2001 (originating from two different breeders) were significantly different, there were no differences between the two varieties when they were grown in the following year from the seed potatoes harvested on the experimental farm.
15. Storage in the laboratory significantly reduced the infection efficiency and growth rates of almost all isolates. In contrast, only the sporulation capacity of A2 isolates was reduced by 50%. Therefore, sporulation capacity of A2 isolates was lower than that of A1 isolates in test 2 but not in test 1.
16. Isolates originating from the moderately resistant Agria had a higher AULEC on Agria than on Linda indicating **variety specific adaptation** to the variety of origin.
17. A2 isolates caused larger lesions and had higher growth rates in test 1 and higher infection efficiency in test 2 than A1 isolates.
18. A2 isolates originating from Agria had a significantly higher infection efficiency than A1 isolates or isolates from Linda. The AULEC of A2 isolates from Agria was the highest in both tests, the differences were significant in test 1. The results indicate that A2 isolates originating from the more resistant variety were more aggressive than the other isolates.
19. Overall, infection pressure could be reduced in the growing system by growing potatoes in narrow strips with neighbour grass-clover perpendicular to the main wind direction with sufficient distance between strips. By using varieties of different resistances, cultivar-specific adaptation within strip might reduce the chances for simultaneous adaptation of the pathogen to different varieties within the system.

Zusammenfassung

In den Jahren 2000 bis 2002 wurden großflächig angelegte Feldversuche zur Auswirkung des **Streifenanbaus von Kartoffeln** mit Nachbarkulturen Sommergetreide, Klee gras oder Kartoffeln auf den Befall mit *Phytophthora infestans* und Ertrag im ökologischen Anbau durchgeführt. Dazu wurden zwei Kartoffelsorten (anfällig und mäßig resistent) in und gegen die Windrichtung in 3 x 10 m (2000) oder 6 x 18 und 18 x 36 m (2001 und 2002) Parzellen gepflanzt. Es wurden regelmäßige Krautfäulebonituren (% befallene Blattfläche) in 12 – 18 Sektionen pro Parzelle durchgeführt und dieselben Sektionen getrennt beerntet.

Die Auswirkungen dieser Anbaustrategie auf die **Populationsdynamik und Struktur von *P. infestans*** wurde untersucht. Auch wurde der Einfluss der Sorte, der Herkunft des Pflanzgutes, sowie der Feldgeschichte (mit oder ohne vorherigem Kartoffelanbau) auf die Populationsstruktur bewertet. Es wurden 639 *P. infestans* Isolate aus den Experimenten und aus kommerziellen Feldern in einer Umgebung von 10 km gesammelt und anhand der Parameter Kreuzungstyp (n=639), Pathotyp (n=272) und rep-PCR Fingerabdruck (n=281) untersucht. Die sorten-spezifische Anpassung von 90 Isolaten wurde in zwei Labortests untersucht. Als Aggressivitätsparameter wurden die Infektions-effizienz, akkumulierte Läsionsgröße (Fläche unter der Befallskurve, d.h. FUDBK), maximale Wachstumsrate (Gompertz Modell) und Sporulationskapazität von *P. infestans* Feldisolaten der Sorten Agria und Linda auf Blättern beider Testsorten bestimmt.

1. Das **Jahr** beeinflusste sowohl die Krautfäuleepidemien (hoch, gering und mittel in 2000-2002) als auch den Kartoffelertrag deutlich. Insbesondere in 2002 wurden sehr geringe Kartoffelerträge erzielt (ca. 50 % der vorangegangenen Jahre).
2. Im Jahr 2000 wurden keine signifikanten Effekte der Anbaustrategie auf den Krautfäulebefall festgestellt. Allerdings wiesen Trends im Feld auf starke Parzelleninterferenz hin und dass die Einzelparzellen mit 3 x 10 m zu klein waren. Durch Vergrößerung der Parzellen und größere Abstände zwischen den Blöcken in den Jahren 2001 und 2002 wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Anbaumuster deutlicher: Der Streifenanbau von Kartoffeln reduzierte den Krautfäulebefall (gemessen in FUDBK) signifikant zwischen 9-20 % (2001) und 4-12 % (2002). Die Befallsreduktionen waren am deutlichsten bei quer zur Windrichtung gepflanzten Kartoffeln mit Nachbar Klee gras. Als wesentlicher Mechanismus hierbei wird der Inokulumverlust infolge der **Barrieren und Distanzen** im System betrachtet.
3. Bei Nachbar Getreide in quer gepflanzten Parzellen war der Krautfäulebefall in der windzugewandten Reihe im Windschatten des Getreides deutlich stärker als in der windabgewandten Reihe. In Parzellen mit Klee grasnachbar waren die Krankheitsgradienten gegenläufig. Diese Effekte sind auf **mikroklimatische Veränderungen** und möglicherweise auf Turbulenzen zurückzuführen.

4. Die **Kartoffelsorte** beeinflusste den Krautfäulebefall signifikant. Der Einfluss der Anbaustrategie auf den Befall war jedoch sortenunabhängig.
5. Es gab Konkurrenzeffekte zwischen Kartoffeln und Nachbarkultur Getreide, das in den direkt benachbarten Randreihen in allen drei Jahren zu signifikanten Ertragsreduktionen führte.
6. Maximal 20 % der Ertragsvariation konnten durch die FUDBK erklärt werden, abhängig von Sorte und Jahr. Im Jahr 2000 wurde der Ertrag der deutlich resistenteren Sorte Simone dreimal so stark durch FUDBK reduziert als bei der anfälligen Secura (Steigungen = $-0,19$ bzw. $-0,06$). Durch einen **früheren Knollenansatzzeitpunkt** war bei der anfälligeren Secura offensichtlich schon vor Einsetzen des Befalles bereits ein guter Teil der Ertragsbildung abgeschlossen. Der fehlende Zusammenhang zwischen Befall und Ertrag 2002 kann durch schlechte klimatische Bedingungen für die Mineralisation und damit mit einer generellen Ertragslimitierung durch mangelnde Nährstoffversorgung in diesem Jahr erklärt werden.
7. Die Konkurrenz des Getreides hatte keinen Einfluss auf die Befalls-Verlust Relation.
8. Der A2 Kreuzungstyp kam zu 46, 13 bzw. 31 % in den Populationen der Jahre 2000 bis 2002 vor. Beide **Kreuzungstypen** A1 und A2 co-existierten in 65, 60 und 92 % der insgesamt 31 untersuchten Populationen.
9. Unter 79, 114 und 79 in den Jahren 2000 bis 2002 jeweils getesteten Isolaten waren 26, 36 und 22 verschiedene (insgesamt 53) **Pathotypen** vertreten. Am häufigsten vertretene Pathotypen waren 1.3.4.7.10.11 und 1.3.4.7.8.10.11 ($n=74$ bzw. 48). Die mittlere Virulenzkomplexität betrug 6,2; 5,4 und 5,9. Die Virulenzen v2, v5 und v6 waren am seltensten, aber signifikant häufiger bei den A2 Isolaten.
10. Die Kartoffelsorte hatte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Pathotypen. Isolate von „neuen Feldern“ (zugekauft Pflanzgut) besaßen signifikant häufiger die Virulenzen v1, v2, v3, v6 und v7 als Isolate von „alten Feldern“ (langjähriger Kartoffelanbau) in der Umgebung des Versuchsbetriebes.
11. Mittels rep-PCR (repetitive extragene palindrome Sequenzen) wurden insgesamt 24 DNA-Banden, davon 15 polymorph identifiziert. Es wurden 36 verschiedene **rep-PCR-Typen** gefunden, darunter waren 22 einmalig in den drei Jahren. Vier rep-PCR-Typen (zwei zu je 30 und 32 %) dominierten die *P. infestans* Populationen über alle Jahre. Vierzehn der 22 einmalig vorkommenden rep-PCR-Typen stammten von „alten Feldern“.
12. Die genetische Distanz (Nei, 1972) zwischen den drei Populationen 2000, 2001 und 2002 betrug 0,05. Der normalisierte Shannonindex H' (Sheldon, 1969) der gesamten Populationen 2000-2002 war 0,40; 0,27 und 0,33. Im Gegensatz dazu waren die Diversitätsindices in den alten Feldern mit 0,91; 0,60 und 0,65 je Jahr deutlich höher.
13. Die genetische Distanz zwischen den nordhessischen Isolaten und Isolaten von US-Linien war beim Isolat US-1 am geringsten ($Nei=0,24$), gefolgt von den Isolaten US-7 (0,24), US-8 (0,32) und US-6 (0,47).

14. Populationen von Feldern mit **zugekauftem Pflanzgut** unterschieden sich signifikant und auch zwischen den verschiedenen Herkunft von Populationen von Feldern aus **eigener Pflanzgutproduktion**. Während sich die Populationen, die 2001 in der kommerziellen Pflanzgutproduktion der Sorte Agria und Linda (Herkunft von zwei Züchtern) untersucht wurden signifikant unterschieden, waren nach Vermehrung am selben Standort im darauffolgenden Jahr jedoch keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Sorten erkennbar.
15. Lagerungszeit im Labor zwischen den beiden Aggressivitätstests reduzierte die Infektionseffizienz und Wachstumsrate von fast allen Isolaten signifikant. Im Gegensatz dazu wurde nur die Sporulationskapazität von A2 Isolaten signifikant um 50 % reduziert. Diese war deshalb in Test 2 geringer als von A1 Isolaten, aber nicht in Test 1.
16. Die Isolate mit Feldherkunft Agria (moderat resistent) resultierten in höherer FUDBK auf der Testsorte Agria. Dies deutet auf **sorten-spezifische Anpassung** an die eigene Kartoffelsorte hin.
17. Die Isolate des A2 Kreuzungstyps verursachten größere Läsionen und hatten eine höhere Wachstumsrate (Test1) und Infektionseffizienz (Test2) als die A1 Isolate.
18. A2 Isolate mit Herkunft Agria hatten eine signifikant höhere Infektionseffizienz als A1 Isolate und Isolate von Linda. Die FUDBK der A2 Isolate von Agria war in beiden Tests am höchsten. Die Differenz war in Test 1 signifikant. D.h. A2 Kreuzungstypen, die von der resistenteren Kartoffelsorte Agria stammten, waren aggressiver als die anderen Isolate.
19. Insgesamt könnte durch den Anbau von Kartoffeln in schmalen Streifen mit Nachbar Klee gras quer zur Windrichtung mit genügend Abstand zwischen den Streifen und durch den Einsatz von Sorten verschiedener Resistenzen der Infektionsdruck im Anbausystem reduziert werden und eine gleichzeitige Anpassung von Isolaten an verschiedene Sorten verlangsamt werden.

Chapter 1 – General introduction

Potato late blight and its causal agent *Phytophthora infestans*

Late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary is considered to be the most devastating pathogen of both, conventionally and organically grown potatoes (*Solanum tuberosum* Lindl.) worldwide. When it first appeared in the Netherlands in the summer of 1845, within a few months potatoes as far away as Ireland, Poland, Switzerland and France were severely infested (Bourke, 1964; Fry et al., 1993), resulting in wide spread starvation especially the so-called Irish potato famine (Woodham-Smith, 1962).

The fungus not only attacks potatoes but also several other solanaceous species such as tomatoes (*Lycopersicon spec.*) eggplants (*Solanum melongena*) (Adler et al., 2002) and weeds, e.g. hairy nightshade or bittersweet *S. nigrum* and *S. dulcamara*, respectively (Dorrance et al., 1999; Goodwin et al., 1998; Peters et al., 1999). On potatoes and tomatoes all plant parts except the roots are affected.

P. infestans can reproduce asexually and sexually. During the **asexual cycle**, numerous zoosporangia are produced within lesions on leaves and stems and in storage on tubers (Agrios, 1997). Those sporangia are dispersed by **wind and rainsplash** (Harrison and Lowe, 1989; Johannes, 1953) and zoospores released from sporangia germinate on new host tissue (Schöber and Ullrich, 1985). At around 15 °C and a relative humidity >90 % (Croxall and Smith, 1976; Harrison, 1992; Harrison et al., 1994; Minogue and Fry, 1981; Mizubuti and Fry, 1998) *P. infestans* can produce up to two generations within one week (Schöber, 1981). Forecasting systems as e.g. the negative prognose of Ullrich and Schrödter (1966) and SIMPHYT among several newly developed modelling systems (Kluge and Gutsche, 1990) make use of the fungus' climatic preferences for the prediction of the optimal start of fungicide application. When zoospores are washed into the soil they may also infect the tubers and usually the fungus survives in **latent infected tubers** (as hibernating mycelium) in storage or in the field until the next growing season.

As *P. infestans* is heterothallic, **sexual reproduction** can only take place if the two opposite mating types A1 and A2 occur together within host tissue (Gallegly and Galindo, 1958). The resulting oospores are thick-walled, persistent propagules which can survive in

the ground for more than three years (Drenth et al., 1995) and thus present an often unpredictable inoculum source.

The "new" P. infestans populations

Prior to the 1980s, only the A1 mating type occurred throughout the world, whereas both mating types co-existed in central Mexico, the centre of origin of the fungus (Niederhauser, 1956). In the early 1980s, however, a **world-wide migration** of *P. infestans* populations consisting of both mating types occurred replacing the old relatively homogeneous population (Fry and Goodwin, 1997). Sexual reproduction in the new *P. infestans* populations is considered the main reason for high phenotypic and genotypic diversity of the pathogen in the USA and Canada (Chycoski and Punja, 1996; Dorrance et al., 1999; Fraser et al., 1999; Gavino et al., 2000; Goodwin et al., 1998) and several European countries.

Depending on the region **in Europe**, sexual reproduction may or may not play a role. Oospores have been found in Scandinavia (Andersson et al., 1998; Brurberg et al., 1999), the Netherlands (Drenth et al., 1993; Fry et al., 1991; Turkensteen et al., 2002; Zwankhuizen et al., 1998), former East Germany (Daggett et al., 1993), Poland (Therrien et al., 1993; Sujkowski et al., 1994) and Russia (Elansky et al., 2001). In contrast, asexual reproduction appears to predominate in France (Andrivon et al., 1993; Lebreton and Andrivon, 1998), Switzerland (Knapova and Gisi, 2002), the United Kingdom (Carlisle et al., 2001; Day and Shattock, 1997; Day et al., 2004) and likely also in western Germany, (Rullich and Schöber-Butin, 2000; Rullich et al., 2002; Schöber, 1983).

In contrast to the old A1 populations, the new populations consist of more and complexer pathotypes (Drenth et al., 1994; Elansky et al., 2001; Goodwin et al., 1995; Peters et al., 1999; Rullich et al., 2002) and the overall resistance level against the systemic fungicide Metalaxyl has increased (Cooke et al., 2003; Daayf et al., 2000; Davidse et al., 1989; Fry et al., 1991; Holmes and Shannon, 1984; Jaime-Garcia et al., 2000; Marshall-Farrar et al., 1998).

The newly introduced *P. infestans* populations have also been reported to be **fitter** than the old pre-1980 clonal lineage (Tooley et al., 1986) with higher growth rates and lesion expansion, and shorter latent periods compared to isolates belonging to the old US-1 lineage (Medina et al., 1999; Miller et al., 1998; Peters et al., 1999). As a result, late blight