

DISS. ETH NO. 22827

**QTL MAPPING OF IMPORTANT AGRICULTURAL AND LIFE HISTORY TRAITS  
IN THE PLANT PATHOGENIC FUNGUS *ZYMOSEPTORIA TRITICI***

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**MARK HENRY LENDENMANN**

MSc ETH Agr, ETH Zurich

Born May 17<sup>th</sup> 1980

Citizen of Zurich (ZH)

accepted on the recommendation of

Prof. Bruce A. McDonald, examiner

Dr. Daniel Croll, co-examiner

Prof. Edward J. Louis, co-examiner

2015

## SUMMARY

The aim of this PhD study was the identification of novel genes as well as natural genetic variance and its effect on phenotypic variance in quantitative traits in the fungus *Zymoseptoria tritici*. *Z. tritici* is a wheat pathogen found worldwide, able to cause serious yield losses. Establishing the connection between genetic variance and phenotypic variance in natural populations is of great importance within the field evolutionary biology, allowing for better understanding of the potential of a population to adapt to changing environments. To decipher the genetic architecture of the traits of interest we used quantitative trait locus (QTL) mapping. This technique had never been applied to *Z. tritici* previously. QTL mapping was carried out upon progeny of two crosses obtained from four parental strains. Parental strains had been collected in naturally infected wheat fields in 1999 in Switzerland. Each of the two crosses provided ~260 progeny, which were genotyped and phenotyped for all the traits. We focused on five important, yet genetically poorly understood agricultural and life history traits: colony melanization, growth rate at two different temperatures (15°C and 22°C), fungicide sensitivity, temperature sensitivity and yeast/hyphae dimorphism.

To genotype the progeny we used restriction site associated DNA sequencing (RADseq). Through the usage of RADseq, a high-throughput next generation sequencing (NGS) technique, progeny sequences could be collected at a relative low cost, spanning the majority of the IPO323 reference genome (~90%). RADseq had never been applied to *Z. tritici* previously. This technique allowed the construction of two highly dense, high quality genetic maps. Parental strain sequences were obtained through full genome sequencing. To phenotype all progeny and parental strains we developed a novel Petri dish assay based on digital image analysis. Digital images were analyzed by applying a novel batch macro, which had been designed during this PhD. The macro allowed high-throughput yet very precise measurement of size and grey value composition of single spore colonies growing on axenic cultures.

For three out of the five traits (growth rate, fungicide and temperature sensitivity) their quantitative nature had been established previously to this study, however their genetic architecture had either not been investigated so far (growth rate, temperature sensitivity) or was still poorly understood (fungicides sensitivity). For the traits of melanization and the yeast/hyphae dimorphism neither their quantitative nature nor their genetic architecture had been studied previously. Our results confirmed the quantitative nature of the traits of growth rate, fungicide and temperature sensitivity. We newly showed that also melanization as well as the yeast/hyphae

dimorphism are of a quantitative nature in *Z. tritici*. We could resolve the genetic architecture of all the quantitative traits as well as elucidate their complexity through the mapping of multiple QTLs for each trait. On average ~32% of total phenotypic variance was explained by an average of 2.7 significant QTLs per trait. For the trait of melanization we identified a total of 12 unique QTLs over both crosses, eight containing novel melanization genes. The high marker density of our genetic maps provided very narrow confidence intervals for four QTLs, with as little as only one candidate gene in one particular case. The QTL with the highest LOD score (~32) contained the *PKS1* gene beside three other candidate genes. *PKS1*, a polyketide synthase gene, is known to play a role in the synthesis of dihydroxynaphthalene (DHN) melanin. We consider this finding as a confirmation of the functionality of our methods applied. We could show that melanization has a highly complex genetic architecture in *Z. tritici*. For fungicide sensitivity we mapped a total of three QTLs. The three QTLs were positioned on chromosomes that differed from the chromosome containing the target gene of azole fungicides. Our findings imply that other genes apart from the fungicide target site are of importance in contributing to fungicide sensitivity in *Z. tritici*. Additionally our results suggest the usage of a novel fungicide mixture due to evidence for pleiotropy among melanization and fungicide sensitivity. QTL mapping of temperature sensitivity provided evidence of the high osmolarity glycerol (HOG) pathway being important in *Z. tritici* for thermal adaptation.

Overall we mapped novel genes not previously associated with the studied traits as well as novel genes not previously associated with natural phenotypic variance for the trait of fungicide sensitivity. We conclude, that *Z. tritici* has a high evolutionary potential and thus is able to adapt rapidly to changing environments through selection acting upon standing genetic variation. We believe that this work and the findings made during this PhD are of importance for future control strategies of *Z. tritici* but also of other fungal plant, as well as animal and human pathogens.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptthema dieser Doktorarbeit war die Identifikation neuer Gene, sowie natürlicher genetischer Varianz und ihr Effekt auf phänotypische Varianz in quantitativen Merkmalen des Pilzes *Zymoseptoria tritici*. Bei *Z. tritici* handelt es sich um ein global verbreitetes Weizenpathogen, welches zu erheblichen Ertragsausfällen führen kann. Die Verknüpfung zwischen genetischer Varianz und phänotypischer Varianz in natürlichen Populationen ist von grosser Bedeutung auf dem Gebiet der Evolutionsbiologie, da sie zu einem besserem Verständnis des Adaptionspotentials einer Population innerhalb wechselnder Umweltbedingungen beiträgt. Wir verwendeten Quantitative Trait Locus (QTL) Mapping, um die genetischen Architektur der Merkmale von Interesse zu entschlüsseln. Diese Technik wurde noch nie an *Z. tritici* angewendet. QTL Mapping wurde auf die Nachkommen zweier Kreuzungen von vier Elternstämmen, welche im Jahr 1999 in natürlich infizierten Weizenfeldern in der Schweiz gesammelt wurden, angewendet. Für beide Kreuzungen wurden rund 260 Nachkommen gesammelt, welche genotypisiert, sowie auch bezüglich allen Merkmalen phänotypisiert wurden. Insgesamt wurden fünf wichtige, aber bis anhin genetisch schlecht verstandene landwirtschaftliche und Life-History Merkmale untersucht: Koloniemelanisierung, Wachstumsrate unter zwei verschiedenen Temperaturen (15°C und 22°C), Fungizidsensitivität, Temperatursensitivität und die Hefe/Hyphe Dimorphie.

Restriction Site Associated DNA Sequencing (RADseq) wurde verwendet um die Nachkommen zu genotypisieren. Mittels RADseq, ein Hochdurchsatzverfahren von Sequenzierung der nächsten Generation (NGS), konnten Sequenzdaten der Nachkommen zu tiefen Kosten gesammelt werden, wobei die Sequenzen den Grossteil (~90%) des Referenzgenoms von IPO323 abdeckten. RADseq wurde nie zuvor auf *Z. tritici* angewendet. Die Methode erlaubte die Konstruktion von zwei dichten, genetischen Karten von hoher Qualität. Sequenzdaten der Elternstämmen wurde durch das Sequenzieren ihres kompletten Genoms erworben. Für das Phänotypisieren aller Nachkommen sowie der Eltern wurde eine neue Petrischalenmethode entwickelt, basierend auf der Analyse digitaler Bilder. Die digitalen Bilder wurden analysiert mittels eines Makros, welches mehrere Bilder durch Stapelverarbeitung analysiert und speziell im Rahmen dieses Doktorates kreiert wurde. Das Makro erlaubte, trotz Hochdurchsatzverfahrens, eine sehr genaue Messung in Bezug auf Grösse und Grauwerten von Einzelsporkolonien, welche in einem keimfreien Umfeld wuchsen.

Die quantitative Eigenschaft von drei der fünf Merkmale (Wachstumsrate, Fungizid- und Temperatursensitivität) wurde bereits in vorangehenden Studien aufgezeigt, jedoch wurde ihre genetische Architektur entweder bis anhin nicht erforscht (Wachstumsrate, Temperatursensitivität) oder sie war nur teilweise entschlüsselt (Fungizidsensitivität). Weder die quantitative Eigenschaft noch die genetische Architektur von Melanisierung sowie der Hefe/Hyphe Dimorphie wurde zuvor untersucht. Unsere Resultate bestätigten die quantitative Eigenschaft der Merkmale Wachstumsrate, Fungizid- und Temperatursensitivität. Wir konnten zudem aufzeigen, dass sowohl Melanisierung wie auch die Hefe/Hyphe Dimorphie Merkmale von quantitativer Natur in *Z. tritici* sind. Mittels der Kartierung mehrerer QTLs war es uns möglich die genetische Architektur aller quantitativen Merkmale zu entschlüsseln sowie ihre Komplexität aufzuzeigen. Im Durchschnitt erklärten 2.7 QTLs pro Merkmal ein Mittel von ~32% der gesamten phenotypischen Varianz. Für das Merkmal Melanisierung identifizierten wir über beide Kreuzungen insgesamt 12 QTLs, acht davon enthielten neue Melanisierungsgene. Für vier QTLs ergab die hohe Markerdichte unserer genetischen Karten sehr schmale Vertrauensintervalle mit nur einem Kandidatengen in einem der vier QTLs. Das QTL mit dem höchsten LOD Wert (~32) enthielt das Gen *PKS1* nebst drei anderen Kandidatengenen. *PKS1*, eine Polyketid-Synthase, spielt eine wichtige Rolle in der Synthese von Dihydroxynaphthalene (DHN) Melanin. Wir betrachteten dieses Ergebnis als Bestätigung der Funktionalität unserer angewendeten Methoden. Wir vermochten zudem aufzuzeigen, dass dem Merkmal Melanisierung eine komplexe genetische Architektur in *Z. tritici* unterliegt. Für das Merkmal Fungizidsensitivität wurden drei QTLs identifiziert. Die drei QTLs befanden sich auf Chromosomen, welche sich vom Chromosom mit dem Zielgen der Azolefungizide unterschieden. Unsere Ergebnisse zeigen auf, dass auch andere Gene als das Fungizidzielgen einen substantziellen Beitrag zur Fungizidsensitivität in *Z. tritici* beisteuern. Aufgrund eines Pleiotropienachweises zwischen Melanisierung und Fungizidsensitivität empfehlen wir die Anwendung einer neuartigen Fungizidmischung. QTL Mapping von Temperatursensitivität ergab den Hinweis der Involvierung des high osmolarity glycerol (HOG) Signalweges in *Z. tritici* bezüglich thermaler Adaptation.

Insgesamt kartierten wir neue Gene, welche nie zuvor mit dem untersuchten Merkmal assoziiert wurden, sowie neue Gene, welche nicht zuvor mit natürlicher phänotypischer Varianz von Fungizidsensitivität in Verbindung gebracht wurden. Daraus schlussfolgern wir, dass *Z. tritici* ein hohes Evolutionspotential hat und somit in der Lage ist sich schnell an eine verändernde Umwelt anzupassen, indem Selektion auf bestehende genetische Variation wirkt. Wir glauben, dass diese

Arbeit und die erzielten Ergebnisse dieses Doktorates wichtig für künftige Kontrollstrategien von *Z. tritici*, aber auch von anderen pilzlichen Pflanzen-, sowie auch Tier- und Humanpathogenen sind.