



Doctoral Thesis

Evolution of plant pathogens in agro-ecosystems

Author(s):

Holtgrewe-Stukenbrock, Eva

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005411655> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH NO. 17065

Evolution of plant pathogens in agro-ecosystems

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

EVA HOLTGREWE-STUKENBROCK
MSc, University of Copenhagen
Born 14.09.1976
Citizen of Denmark

Accepted on recommendation of

Prof. Bruce A. McDonald, examiner
Prof. Linda Kohn, co-examiner
Prof. Ian Sanders, co-examiner

2007

Summary

Evolutionary processes in populations of the three wheat-infecting pathogens *Mycosphaerella graminicola*, *Phaeosphaeria nodorum* and *Pyrenophora tritici-repentis* were studied. The three patho-systems were used to address questions about speciation and domestication of pathogens, population dynamics in agro-ecosystems and finally the evolution of a specific virulence factor.

M. graminicola is known to be specialized to its wheat host. However, we identified a sister population of the pathogen on wild grasses in the Middle East. As *M. graminicola* is believed to have co-evolved with its host during the Neolithic revolution in the Fertile Crescent we hypothesized that the wild grass pathogen represented an ancestral species of the wheat pathogen. We tested our hypothesis using six DNA loci and coalescence analyses. Our results showed that *M. graminicola* and one wild grass population had indeed diverged approximately 10,000 BC coinciding with the domestication and cultivation of wheat. We were also able to show that *M. graminicola* has extensively increased its population size consistent with the intensification of wheat cultivation and the spread of agriculture. The successful and rapid adaptation of *M. graminicola* to an agro-ecosystem was facilitated by the population genetic structure of the pathogen.

To characterize the population genetic structure of *P. nodorum* on a global scale we developed a set of twelve microsatellite markers from an EST (Expressed Sequence Tags) library. The use of an EST library proved highly valuable to identify polymorphic repetitive sequences in a pathogen genome. This method may be useful for marker development in organisms where genomes sequences are not available.

We used the twelve microsatellite markers to characterize nine geographical populations of *P. nodorum*. The data confirmed previous results showing that recombination occurs frequently although pseudothecia are rarely observed in nature. Additionally, high levels of migration contributed to the successful spread of *P. nodorum* and a lack of subdivision between populations. We estimated the relative time of divergence of pathogen populations and found that populations have diverged recently. This finding is consistent with the recent spread of wheat into the New World by European immigrants during the last 500 years.

A host specific toxin was characterized in *P. nodorum* populations. This toxin named *ToxA* was already described in a third wheat pathogen *P. tritici-repentis*. *ToxA* is involved in a gene-for-gene interaction with the host gene *Tsn1*. A surprisingly high homology between the two pathogens was

shown in a region spanning 11kb including the *ToxA* gene and a transposase-like sequence. However, no other closely related species of the two pathogens contained any *ToxA*-like sequences. As *ToxA* gene diversity is considerably higher in *P. nodorum* than in *P. tritici-repentis* it was suggested that the *ToxA* gene had been moved from *P. nodorum* into *P. tritici-repentis* through a horizontal gene transfer event. Due to the lack of variation in the *P. tritici-repentis* *ToxA* sequences the horizontal gene transfer probably occurred recently and may even be responsible for the emergence of tan spot disease caused by the pathogen. Tan spot disease was first described in the 1940's and has since spread to all wheat growing areas.

We further analyzed the evolutionary pattern of the *ToxA* gene by comparing gene and haplotype diversity in a large geographical collection of *P. nodorum*. We found evidence of positive diversifying selection acting on the gene consistent with a co-evolutionary arms-race model between host and pathogen. Interestingly, both the deletion frequency of the *ToxA* gene and the haplotype diversity were highly variable between populations. This pattern may reflect the distribution of compatible *Tsn1* alleles as the host gene is essential for the activity of the ToxA protein.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die evolutionären Prozesse der drei weizeninfizierenden Pilze *Mycosphaerella graminicola*, *Phaeosphaeria nodorum* und *Pyrenophora tritici-repentis* zu untersuchen. Ich erforschte die drei Pathogen-Systeme auf Fragen der Artbildung, der Domestizierung und der Evolution eines spezifischen Virulenzfaktors.

Bisher war bekannt, dass *M. graminicola* sich auf seinen Wirt, den Weizen, spezialisiert hatte. Uns gelang es jedoch, eine Schwesterpopulation des pathogenen Pilzes auf wildem Gras im Nahen Osten zu identifizieren. Da *M. graminicola* sich vermutlich mit seinem Wirt während der Neolithischen Revolution im Fruchtbaren Halbmond im Nahen Osten entwickelt hat, ist es unsere Annahme, dass der pathogene Pilz auf dem wilden Gras ein Vorfahre des pathogenen Weizenpilzes darstellt. Zur Überprüfung unserer Hypothese wurden sechs DNA loci und Coalescence-Analysen verwendet. Unsere Resultate bestätigten, dass die Aufspaltung zwischen *M. graminicola* und Schwesterpopulationen auf wilden Gräsern ungefähr 10.000 Jahre v.Chr. zurückliegt und mit der Domestizierung des Weizens zusammenfällt. Unsere Untersuchungen zeigten auch ein extensiver Zuwachs der *M. graminicola* Population während der zunehmenden Kultivierung des Weizens und der Verbreitung der Landwirtschaft. Die erfolgreiche und schnelle Anpassung von *M. graminicola* an ein Agrar-Ökosystem wurde durch die genetische Populationsstruktur des pathogenen Pilzes erleichtert.

Zur Untersuchung der globalen genetischen Populationsstruktur von *P. nodorum* wurden zwölf Mikrosatelliten aus einer EST (Expressed Sequence Tags) Bibliothek entwickelt. Die Anwendung einer solchen Bibliothek hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen, um repetitive polymorphe Sequenzen in einem pathogenen Genom zu identifizieren. Diese Methode der Entwicklung von molekularen Markern eignet sich besonders in Organismen, für die keine Genomsequenzen zur Verfügung stehen. Mittels der zwölf Mikrosatelliten wurden neun geographische Populationen von *P. nodorum* untersucht. Die Daten bestätigten die früheren Resultate und zeigten auf, dass die Fortpflanzung oft sexuell ist, obwohl Pseudothecia in der Natur selten beobachtet werden. Zusätzlich hat ein hohes Migrationniveau zur erfolgreichen Verbreitung von *P. nodorum* und zur fehlenden Aufteilung der Populationen beigetragen. Wir schätzten die

relative Zeit der Divergenz des pathogenen Pilzes ein und fanden, dass die Aufspaltung neulich stattgefunden hatte. Diese Entdeckung stimmt mit der Verbreitung des Weizens während der letzten 500 Jahre durch die europäischen Immigranten überein.

Wir untersuchten ein wirtsspezifisches Toxin der *P. nodorum*-Population. Dieses Toxin namens *ToxA* war schon für einen dritten pathogenen Weizenpilz, *P. tritici-repentis*, beschrieben. *ToxA* ist an einer Gen-Gen-Wechselwirkung mit dem Wirtsgen *Tsn1* beteiligt. Eine erstaunlich hohe Homologie zwischen den beiden pathogenen Pilzen wurde in einem 11kb großen Bereich um das *ToxA*-Gen und einer transposase-ähnlichen Sequenz festgestellt. Keine andere verwandte Art der beiden pathogenen Pilze enthält jedoch eine *ToxA*-ähnliche Sequenz. Die Gendiversität von *ToxA* ist in *P. nodorum* erheblich höher als in *P. tritici-repentis*, was auf eine Übertragung des *ToxA* von *P. nodorum* auf *P. tritici-repentis* durch eine horizontale Genübertragung schließen lässt. Die fehlende Variation in der Sequenz von *P. tritici-repentis* deutet darauf hin, dass die horizontale Genübertragung wahrscheinlich vor kurzem stattgefunden hat. Vielleicht ist sie auch der Ursprung der von dem pathogenen Pilz verursachten Weizenblattdürre. Weizenblattdürre wurde zum ersten Mal in den 1940er Jahren beschrieben und hat sich später über sämtliche Weizenanbaugebiete der Welt verbreitet.

Außerdem haben wir das evolutionäre Muster von *ToxA* untersucht, indem wir einen Vergleich zwischen dem Gen und der Haplotyp-diversität in einer großen geographischen Sammlung von *P. nodorum* anstellten. Unsere Untersuchungen lieferten Hinweise für eine aktive positive Diversitätsselektion auf das *ToxA*-Gen, übereinstimmend mit einem Modell Koevolutionären Wettrennens zwischen Wirt und pathogenem Pilz. Interessanterweise waren sowohl die Deletionsfrequenz des *ToxA*-Gens als auch die Haplotypdiversität sehr unterschiedlich von einer Population zu anderen. Dieses Muster könnte die Verbreitung von kompatiblen *Tsn1* Allelen widerspiegeln, da das Wirtsgen für die Aktivität des ToxA Protein erforderlich ist.