

DISS. ETH NO.

17668

**Determination of the relative role of evolutionary
forces in the development of epidemics of the
plant pathogenic fungus *Phaeosphaeria nodorum***

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

presented by

RUBIK JAFFAROU SOMMERHALDER

Dipl. Ing. Agr. ETH

Born May 21, 1977

Citizen of Carona (TI)

Switzerland

Accepted on recommendation of

Prof. Dr. B. A. McDonald, examiner

Dr. Jiasui Zhan, co-examiner

2008

SUMMARY

The world's population is constantly growing and so is the demand for food and renewable energy. This mounting demand has forced agriculture to increase its productivity without increasing agricultural surfaces. Because pest-derived (e.g. insects, viruses, bacteria and fungal pathogens) agricultural losses may reach one third of the potential production, a sound way of achieving this goal is reducing crop losses through efficient crop protection. Because populations of plant pathogens are continuously evolving, control strategies can some times be difficult to implement. To effectively control pathogen damage, and manage the control strategies in a sustainable way, it is therefore important to understand how populations will evolve allowing them to escape the control strategies. Different factors contribute to the pathogen's evolution. These factors include selection, mutation, gene flow, mating system and random genetic drift. Determining the relative contribution of these forces to a pathogen populations' structure and epidemiology can contribute to our understanding of its evolutionary potential and improve disease control.

Among the world's most important agricultural crops (and source of food and energy) is wheat (*Triticum aestivum*). Wheat is the leading cereal traded in the world today, and provides food for nearly 35% of its population. Because of its multiple uses and because of the rapid population growth, demand for wheat will probably grow faster than any other crop in the near future. In the past new and better performing wheat varieties were introduced to satisfy the growing demand. However the narrowed genetic diversity of these high yielding varieties rendered them extremely susceptible to pathogens such as the fungal pathogen *Phaeosphaeria nodorum*.

Phaeosphaeria nodorum (one of the major wheat pathogens) is a fungal pathogen with a mixed mating system, which is able to infect all above-ground plant parts during the parasitic phase. While the importance of the asexual stage is undisputed, it is not clear what role sexual reproduction plays in the population genetic structure and in the epidemiology of the disease. To shed light on the evolutionary potential and the relative contribution of sexual and asexual reproduction to the population structure and epidemics of *P. nodorum*, we conducted a two year mark-release-recapture field experiment in which we released ten

SUMMARY

genetically marked isolates on four cultivars (with different levels of resistance) and a 1:1 mixture. The experimental part was complemented by an empirical part in which global populations of the pathogen were analyzed.

To investigate the relevance of the sexual and asexual cycle to the epidemics of *P. nodorum* we complemented our two year mark-release-recapture experiment by investigating the frequency and distribution of its mating types. The mating type study revealed that both mating types were found at equal frequencies and at the smallest spatial scales tested; while our two year experiment revealed a within season increase in diversity and the absence of linkage disequilibrium in the populations. Additional isolate assignment tests indicated that most novel isolates recovered in the experimental plots were derived from recombination. The mating type analysis and the mark-release-recapture experiment corroborated the idea that recombination plays an important role in the epidemic development even during the same year as the initial infection. These results also substantiate that the sexually generated and windblown ascospores can serve as primary inoculum and initiate new primary infection in pathogen-free fields at considerable distance.

The same two year mark-release-recapture experiment was used to investigate the evolution of the pathogen in the agricultural environment and to study the effect of host diversity on populations of *P. nodorum*. The findings indicated that genetic diversity and different levels of resistance in the host populations may affect evolutionary rates in pathogen populations. In fact the genetic structure of *P. nodorum* populations sampled from a cultivar mixture did not change over two years and exhibited the lowest variation in selection coefficients among the inoculated isolates, while partially resistant hosts had pathogen populations that evolved more slowly than susceptible hosts. We also found evidence for differential selection on *P. nodorum* during the parasitic and saprophytic phases of its life cycle. These findings support the hypothesis that increasing genetic heterogeneity in host populations will retard the rate of evolution in pathogen populations and that tillage is an effective disease control mechanism.

The findings were complemented by a comparative mitochondrial-nuclear genome analysis aimed at investigating the effects of selection, gene flow, and sexual reproduction on the population genetic structure and evolutionary history of the wheat

SUMMARY

pathogen *P. nodorum*. In this study we compared patterns of mitochondrial diversity with patterns of nuclear diversity of fungal isolates from Texas, Oregon, and Switzerland. The results revealed unexpectedly high levels of mitochondrial diversity and the presence of two dominant mtDNA haplotypes present in every region. The comparative analysis revealed high levels of gene flow, low levels of population subdivision, and the absence of host specificity and cyto-nuclear disequilibrium. The concordance in estimates of population genetic parameters from both genomes suggested that both genomes underwent similar evolutionary processes indicating that either of them could be used to

RIASSUNTO

Il recente aumento della popolazione a livello mondiale ha generato un aumento della domanda di cibo e fonti di energie alternative. Questo incremento della domanda impone all'agricoltura di aumentare la produzione, possibilmente senza incrementare la superficie coltivabile. Dato che fino ad un terzo della produzione agricola totale è distrutto dai parassiti, quali i funghi patogeni, un modo efficiente per raggiungere questo obiettivo è ridurre le perdite dovute a quest'ultimi. I metodi di controllo possono però essere difficili da implementare poiché i parassiti fungini possono evolvere rapidamente annullandone l'efficacia. Per migliorare l'efficacia dei rimedi fitosanitari è quindi necessario conoscere il potenziale evolutivo di questi patogeni. Potenziale evolutivo che è influenzato da cinque fattori quali la pressione di selezione, il grado di mutazione, l'immigrazione, la deriva genetica e il modo di riproduzione. Determinare il contributo di queste forze al potenziale evolutivo e all'epidemiologia della malattia contribuirà a migliorare i metodi di controllo.

Il fungo *Phaeosphaeria nodorum* è uno dei maggiori patogeni del frumento a livello mondiale. Questo patogeno con sistema riproduttivo misto può infettare tutte le parti aeree della pianta. Mentre l'importanza e il contributo della fase asessuata alla struttura della popolazione e all'epidemiologia di questo patogeno è ben conosciuta, non lo è alquanto quella della fase sessuata, conoscenza che è di fondamentale per determinarne il potenziale evolutivo e quindi migliorare i metodi di prevenzione. Per chiarire il ruolo della fase sessuata, al potenziale evolutivo e all'epidemiologia di *P. nodorum*, abbiamo condotto un esperimento di due anni (biennale) nel quale abbiamo rilasciato dieci isolati marcati geneticamente su quattro varietà di frumento con diversi livelli di resistenza. I risultati dell'esperimento sono stati completati da analisi di popolazione a livello globale.

Per studiare l'importanza relativa del ciclo sessuato e di quello asessuato alle epidemie di *P. nodorum* abbiamo analizzato la frequenza e la distribuzione dei loro "mating types" (ideomorfi) a livello globale oltre al esperimento biennale "in situ" sopra citato. Il nostro studio sulla frequenza e distribuzione dei mating type hanno rivelato che ambo due gli ideomorfi erano presenti in frequenze simili per fino sulla stessa foglia; mentre l'esperimento biennale ha rivelato che la diversità genetica aumenta durante la stagione.

RIASSUNTO

I test hanno pure rivelato un equilibrio gametico ed assegnato la maggior parte degli isolati con un background genetico diverso da quelli rilasciati alla categoria dei ricombinanti. I risultati dei due studi sostengono l'idea che il ciclo sessuato ha avuto un ruolo importante anche durante la stagione di crescita del frumento. I risultati evidenziano pure l'importanza della ascospore nell'iniziare nuove epidemie.

Lo stesso esperimento biennale è stato usato per studiare l'evoluzione del patogeno in un ambiente agricolo e di come questo sia influenzato dalla diversità genetica dell'oste. I risultati indicano che la diversità genetica e i livelli di resistenza presenti nell'oste influenzano la popolazione del patogeno. In effetti, la struttura genetica delle popolazioni di *P. nodorum* campionata dalle varietà più resistenti e dall'assemblaggio di varietà indica che la velocità di evoluzione si rallenta con l'aumentare della complessità genetica dell'oste. I risultati hanno pure rivelato che ci sono delle diverse pressioni di selezione durante la fase parassitica e quella saprofitica.

Questi risultati sono stati completati da uno studio comparativo condotto tra la diversità genetica presente nel DNA mitocondriale e in quello nucleare incentrato sul scoprire gli effetti che hanno avuto (e che avranno) sulle popolazioni di *P. nodorum*, la migrazione, la riproduzione sessuata, e la selezione. I risultati dello studio, nel quale sono stati paragonati i livelli di variazione dei due genomi, di popolazioni provenienti dal Texas, dal Oregon e dalla Svizzera, hanno rivelato dei livelli di diversità mitocondriale inaspettatamente alti. I risultati indicano che ci sono state delle importanti migrazioni in passato, che le popolazioni sono molto simili globalmente e che vi è un'assenza d'adattamento ad una varietà specifica. I risultati di equilibrio cyto-nucleare indicano, ancora una volta, che la riproduzione sessuata gioca un ruolo importante nel creare nuova diversità e quindi nell'epidemiologia della malattia, dato che le ascospore prodotte sessualmente sono capaci di volare a lunghe distanze e di iniziare un nuovo ciclo infettivo.