

DISS. ETH NO. 26521

**FUNCTIONAL ANALYSES OF CANDIDATE QTL GENES
INVOLVED IN FUNGAL VIRULENCE**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

LUKAS MEILE

MSc ETH Biology, ETH Zurich

born on 25.05.1989

citizen of Mosnang (SG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruce McDonald,
Prof. Dr. Olivier Voinnet,
Prof. Dr. Antonio Di Pietro

2019

Summary

Plant pathogenic fungi impose a major threat to agricultural food production. The control of fungal crop diseases is challenging because many pathogens can rapidly evolve virulence on resistant crop varieties. Despite the great threat, little is known about the molecular components involved in the interaction between plants and pathogens. This is especially true for non-model pathogens. The aim of this doctoral thesis was to improve our understanding of the genetic basis of virulence and host adaptation, which will be required to generate new innovations for disease control and to increase the spectrum and durability of genetic resistance.

The ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici* is the causal agent of septoria tritici blotch (STB), the most damaging disease of wheat in Europe. *Z. tritici* populations exhibit high levels of genetic and phenotypic diversity and a high degree of strain-host specificity. To understand the genetic basis of quantitative strain-specific virulence in *Z. tritici*, functional validation of candidate genes present in a previously identified quantitative trait locus (QTL) was undertaken. By performing gene deletion and allelic replacement experiments, a small secreted protein was identified as key determinant of the quantitative virulence difference between two *Z. tritici* strains. This protein, Avr3D1, fulfilled the hallmarks of a classic effector, including a high cysteine content and *in planta*-specific expression, and was found to act as an avirulence factor involved in a minor gene-for-gene interaction. The corresponding wheat resistance gene, possibly *Stb7* or *Stb12*, was present in four out of 17 wheat lines.

Avr3D1 was present in all the genomes of 135 investigated strains, was highly diverse and showed signs of diversifying selection, indicating an important role in pathogen fitness in susceptible hosts; however, such a role remains to be identified.

The characterization of several protein isoforms of Avr3D1 revealed a continuous range of avirulence activity and several candidate residues that additively contributed to escape from recognition. A homologue of Avr3D1 identified in a sister species of *Z. tritici*, which does not infect wheat, triggered a strong immune response in wheat, raising the possibility that this avirulence factor also contributes to nonhost resistance.

Avr3D1 is located in a highly plastic region of the genome, featuring a lack of synteny caused by presence/absence polymorphisms of various transposable elements (TEs) but also of genes adjacent to *Avr3D1*. This observation is in line with the two-speed-genome model, which suggests that effector genes located in these dynamic regions benefit from an accelerated evolution, which is a driver of host adaptation. We investigated whether the location of effector genes in genomic regions rich in TEs might also have functional consequences mediated by the heterochromatic nature of these regions. The genomic environment of *Avr3D1* and additional effector genes was indeed found to influence their high transcriptional inducibility. Several histone modifications contributed to effector gene silencing in the absence of the host. Host colonization led to effector gene de-repression, which was associated with a decrease in histone H3 lysine 9 and lysine 27 trimethylation levels. Engineering the *Z. tritici* genome with fluorescent reporter genes revealed that effector gene de-repression is regulated at the single-cell level and likely requires gene-specific transcription factors.

Our results indicate that the high virulence diversity observed in pathogen populations could be largely based on avirulence factor diversity. We further highlight the high complexity of effector gene regulation, which features host-triggered

chromatin remodeling and cell-specific expression profiles. Hence, we provide new insights into the regulation and diversity of virulence in fungal plant pathogens.

Zusammenfassung

Pflanzenpathogene Pilze stellen ein grosses Problem für die Landwirtschaft dar, da sie immense Ernteausfälle verursachen können. Gegenmassnahmen sind häufig nur bedingt wirksam, unter anderem weil verfügbare resistente Sorten wegen der hohen Anpassungsfähigkeit vieler Krankheitserreger schnell anfällig werden können. Angesichts der Gefahr für die Landwirtschaft und Ernährungssicherheit, die von Pflanzenkrankheiten ausgeht, ist ein besseres Verständnis der molekularen Interaktionen zwischen Pflanzen und ihren Krankheitserregern von grossem Interesse, weil dieses Wissen ein Grundstein für die Entwicklung neuer Konzepte und Technologien für die Krankheitsbekämpfung darstellen kann. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Doktorarbeit, zu verstehen, welche Gene von pflanzenpathogenen Pilzen Schlüsselfunktionen für die Infektion haben und wie sich solche Pilze an resistente Sorten anpassen können.

Zymoseptoria tritici ist ein Pilz, der die Septoria-Blattdürre des Weizens verursacht. Verschiedene Stämme dieses Pilzes können extrem vielfältig sein, sowohl in Bezug auf ihre Genetik als auch auf ihren Phänotyp. In der Regel kann ein bestimmter Stamm nur bestimmte Weizensorten befallen, im Gegenzug ist selbst eine resistente Sorte üblicherweise nicht gegen alle Pilzstämme resistent. Ausserdem gibt es, je nach Stamm, zahlreiche Abstufungen zwischen Resistenz und Anfälligkeit. Um diese Spezifität zwischen Pilzstämmen und Weizensorten besser zu verstehen, habe ich im Zuge dieser Doktorarbeit in *Z. tritici* nach Genen gesucht, die einen sortenspezifischen Einfluss auf die Virulenz haben. Dazu habe ich die Funktion von verschiedenen Genen in einem bereits bekannten quantitativen «Trait Locus» für Virulenz validiert. Dabei hat sich gezeigt, dass ein kleines Protein, welches als

potentielles Effektor-Protein identifiziert wurde, grösstenteils verantwortlich war für den Unterschied in der Virulenz zwischen zwei *Z. tritici*-Stämmen. Dieses Cysteinreiche Protein, bezeichnet als Avr3D1, ist ein Avirulenzfaktor, der in bestimmten Weizensorten eine partielle Resistenzreaktion hervorruft. Das entsprechende (und bisher noch nicht isolierte) Resistenzgen war in vier von 17 Weizensorten vorhanden und es handelt sich dabei womöglich um *Stb7* oder *Stb12*.

Avr3D1 konnte in sämtlichen 135 untersuchten *Z. tritici*-Stämmen identifiziert werden. Die kodierende DNA-Sequenz dieses Gens ist sehr variabel und stand offenbar unter diversifizierender Selektion, was darauf hindeutet, dass Avr3D1 wahrscheinlich eine wichtige Funktion für *Z. tritici* besitzt. Bei der Charakterisierung von verschiedenen Avr3D1-Isoformen zeigte sich ein kontinuierliches Spektrum von Avirulenz-Aktivität. Es konnten auch verschiedene Protein-Reste identifiziert werden, die kumulativ dazu beitragen, dass Avr3D1 nicht (vollständig) vom entsprechenden Resistenz-Protein erkannt werden kann. Ein homologes Protein, das in einer verwandten Spezies, welche auf Weizen nicht virulent ist, identifiziert wurde, löste in Weizen eine starke Resistenzreaktion aus, woraus sich schliessen lässt, dass Avr3D1 möglicherweise auch an Nichtwirtsresistenz beteiligt ist. Das Gen *Avr3D1* befindet sich in einer instabilen Genom-Region, welche von einem hohen Grad an Transposon-An-/Abwesenheitspolymorphismus geprägt ist. Solche Regionen sind oft mit Effektor-Genen assoziiert, womöglich weil sie deren Evolutionsrate günstig beeinflussen für eine optimierte Anpassung an verschiedene Wirtspflanzen. Wir haben untersucht, ob diese Transposon-assoziierten Regionen mit Blick auf ihre typische Heterochromatin-Struktur auch einen Einfluss auf die Transkriptionsregulierung von Effektor-Genen haben. Abhängig von der genomischen Umgebung trugen mehrere post-translationale Histon-Modifikationen dazu bei, dass die Transkription verschiedener

Effektor-Gene in axenischer Kultur epigenetisch unterdrückt wurde. Während einer Infektion hingegen wurden die Effektor-Gene aktiviert, was mit einer Änderung des Ausmasses dieser Histon-Modifikationen einherging.

Zusammenfassend legen diese Resultate nahe, dass die hohe Virulenz-Diversität, die typischerweise mit Pflanzenpathogenen assoziiert ist, möglicherweise grösstenteils auf der Sequenz-Diversität von Avirulenzfaktoren basiert. Es hat sich auch gezeigt, dass die Regulation von Effektor-Genen ein hohes Mass an Komplexität aufweist und unter dem Einfluss von Wirtspflanzen-induzierten Chromatin-Neukonfigurationen steht. Diese Arbeit erlaubt somit neue Einblicke in die Regulation und die Diversität der Virulenz von pflanzenpathogenen Pilzen.