

Diss. ETH No. 15385

REDEFINING *PLASMOPARA VITICOLA* EPIDEMIOLOGICAL CYCLE
BY MOLECULAR GENETICS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by

DAVIDE GOBBIN

Dipl. sc. Nat. ETHZ

born October 22th, 1973, citizen of Bidogno TI, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruce McDonald, referent

Dr. Cesare Gessler, co-referent

Dr. Michel Clerjeau, co-referent

2004

ABSTRACT

The Oomycete *Plasmopara viticola* is the causal organism of downy mildew on grapevine (*Vitis* spp.). A set of four polymorphic microsatellite markers for *P. viticola*, amplifying the loci ISA, GOB, CES and BER, were developed. A semiautomatic high throughput DNA extraction method and sequencer-based microsatellite genotyping protocol were established.

In a survey of European grapevine downy mildew populations from 2000 to 2002, 10158 *P. viticola* samples were collected 1-22 times from 39 vineyards (41 populations). Using a first data subset (4685 lesions collected in central Europe from 18 plots), microsatellite markers revealed a new picture of the downy mildew epidemiological cycle. First, we discovered that numerous primary infections occur during a prolonged period from May to August. Genotypes identified once throughout the surveying period always constituted the dominant class (71% of all genotypes) independently from the collection date. Only seven genotypes were identified more than 50 times throughout the epidemic. Only one or two genotypes per epidemic underwent secondary cycles and generated a high number of progeny. A detailed epidemiological survey in a newly established Italian mountain vineyard confirmed that genotypes participating in the epidemic showed a highly variable and strain-specific aptitude in generating secondary lesions.

In order to examine the levels of genetic differentiation within and among *P. viticola* populations, we used a second subset of 9229 lesions from 34 downy mildew populations (France, Germany, Switzerland, Italy and Greece). 4328 site-specific genotypes were identified. The most polymorphic SSR marker GOB showed 101 alleles in Europe. We highlighted mainly significant differences between European population pairs, as well as a clearly differentiated genetic and phylogenetical population substructuring.

Knowledge furnished after genetic analysis challenges the actual unverified historical assumptions by providing solid bases targeted to redefining the role of primary and secondary cycles in disease dynamic and by downgrading the role of secondary sporangia for disease propagation.

RIASSUNTO

L'oomicete *Plasmopara viticola* è l'agente causale della peronospora della vite (*Vitis* spp.). Un set di quattro marcatori molecolari (microsatelliti), amplificanti i rispettivi loci ISA, GOB, CES e BER sono stati sviluppati per uno studio di popolazione. Sono state sviluppate un'estrazione di DNA semiautomatica altamente performante e un sistema di analisi del genoma basata sulla *fragment analysis* al sequenziatore.

Nel corso degli anni 2000-2002 sono stati raccolti 10158 campioni di *P. viticola* da 39 vigneti selezionati in cinque paesi europei produttori di vino (Francia, Germania, Grecia; Italia e Svizzera). Usando un subset di dati (4685 lesioni raccolte in Europa centrale da 18 vigneti), l'analisi ai microsatelliti ha rivelato un quadro rivoluzionario del ciclo epidemiologico della malattia. Dapprima è stata evidenziata una continua emissione di lesioni primarie dal mese di maggio a quello di agosto. I genotipi identificati una volta soltanto nel corso dell'epidemia si sono rivelati i più frequenti (71% di tutti i genotipi trovati), indipendentemente dalla data di raccolta dei campioni. Solamente sette genotipi sono stati identificati più di 50 volte nel corso dell'epidemia. Solo uno o due genotipi per epidemia hanno mostrato di riprodursi sessualmente in modo significativo rispetto alla moltitudine di altri genotipi. Un'analisi epidemiologica in un vigneto appena impiantato nella Val di Fiemme (Italia, 1005 m s.l.m.) ha mostrato quanto ogni genotipo abbia un diverso successo riproduttivo.

Al fine di analizzare la differenza genetica tra popolazioni del patogeno su vasta scala, è stato selezionato un secondo data set comprendente 9229 lesioni raccolte da 34 popolazioni europee. Sono stati identificati la bellezza di 4328 genotipi specifici per ogni parcella. Il marcatore microsatellite più polimorfo si è rivelato GOB (101 alleli). A livello europeo, le popolazioni si sono rivelate per la maggior parte significativamente diverse dal profilo genetico, dal quale è risultata una filogenia piuttosto differenziata.

La nuova conoscenza fornita da questo studio ci permette di ridiscutere le speculazioni fatte in passato sul ciclo epidemiologico e sull'importanza delle infezioni primarie e secondarie nella conduzione di un'epidemia. Mentre le infezioni primarie sono più numerose del previsto, le progenie secondarie sono poco frequenti e poco persistenti nel tempo. La migrazione di sporangi secondari si è mostrata ridotta persino scala locale (vigneto).