

Andreas Peil¹, Ofere Emeriewen^{1,2}, Klaus Richter³, Thomas Wöhner¹,
Mickael Malnoy², Magda-Viola Hanke¹, Henryk Flachowsky¹

Vergleichende genetische Kartierung der Feuerbrandresistenz bei *Malus* sp.

Comparative genetic mapping of resistance to fire blight in *Malus* sp.

409

Zusammenfassung

Für die vergleichende Kartierung von Feuerbrandresistenz bei *Malus* wurden vier Populationen bearbeitet, die als einen Elter einen Donor für Feuerbrandresistenz und als zweiten Elter die anfällige Sorte 'Idared' hatten. Als Donoren für Widerstandsfähigkeit wurden definierte Abstammungen der Wildarten *M. baccata*, *M. fusca*, *M. ×robusta* und die widerstandsfähige Pillnitzer Apfelsorte 'Rewena' genutzt.

Die Phänotypisierung der Populationen erfolgte in unterschiedlichen Jahren durch Inokulation von vegetativen Trieben mit dem *Erwinia amylovora*-Isolat Ea222 und anderen definierten Isolaten unter Gewächshausbedingungen. Der Befall der Triebe wurde als Befallsrate, dem Verhältnis der befallenen Trieblänge zur Gesamtrieblänge, ermittelt. Je nach Isolat und Population variierte die durchschnittliche Befallsrate zwischen 10 bis 82%. Die Genotypisierung der Nachkommen zur Erstellung genetischer Karten erfolgte mit Mikrosatelliten-, SNP- und DArT-Markern. Die genetischen Kopplungskarten wurden mittels Joinmap 4.0 und die Resistenz gegenüber Feuerbrand mit MapQTL5.0 kartiert.

Major-QTLs konnten für *M. ×robusta* auf Kopplungsgruppe 3, für *M. baccata* auf Kopplungsgruppe 12 und für *M. fusca* auf Kopplungsgruppe 10 detektiert werden. Während die Feuerbrand-QTLs von *M. ×robusta* 5 und *M. fusca* je nach Jahr bis zu ca. 87% der phänotypischen Varianz erklären können, erklärt der QTL von *M. baccata* nur ca. 45%, was die Existenz eines zweiten QTL nahe legt. Für die resistente Sorte 'Rewena' konnte kein QTL detektiert werden.

Mit den Markern, die im Bereich der detektierten QTLs liegen, kann auf Resistenz gegenüber Feuerbrand selektiert werden. Damit ist eine Kombination unterschiedlicher Feuerbrandresistenz-QTLs möglich. Auf dieser Basis können zukünftig Sorten gezüchtet werden, die dauerhaft widerstandsfähig gegenüber Feuerbrand sind, um diese dann dem deutschen Obstbau zur Verfügung stellen zu können.

Stichwörter: Feuerbrand, Kartierung, *Malus*, Resistenz

Abstract

Four segregating populations were analyzed for comparative mapping of resistance to fire blight in apple. As donors for resistance the Re-cultivar® 'Rewena' from the Pillnitz breeding program, *M. ×robusta* 5 and the accessions of *M. baccata* and *M. fusca* were crossed by the susceptible cultivar 'Idared'.

Phenotyping of resistance in the progeny was done by shoot inoculation using the *Erwinia amylovora* isolate Ea222 and other defined isolates in greenhouse. The shoot infection was characterized as necrosis rate, the ratio between necrosis length and shoot length. The average necrosis rate varied between 10 to 82% depending on isolate and population. Genotyping was performed with microsatellite-, SNP- and DArT-markers. For the establishment of genetic linkage maps Joinmap 4.0 and for mapping of resistance MapQTL5.0 were used.

Major-QTLs were detected on linkage groups 3, 10 and 12 for *M. ×robusta* 5, *M. fusca* and *M. baccata*, respective-

Institut

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an Obst, Dresden¹
Istituto Agrario di San Michele all'Adige – IASMA, San Michele all'Adige (TN), Italien²

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg³

Kontaktanschrift

Dr. Andreas Peil, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an Obst, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, E-Mail: andreas.peil@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

15. September 2014

ly. Whereas the determined major QTLs of *M. ×robusta* 5 und *M. fusca* explained up to 87% of the phenotypic variance, depending on year and isolate, the major QTL detected for *M. baccata* explained only around 45%, which hypothesizes the presence of additional QTLs. No QTL was detected for the resistant cultivar 'Rewena'.

Based on markers surrounding the detected QTLs a marker assisted selection (MAS) for resistance to fire blight became feasible as well as pyramiding of different QTLs. Pyramiding of differently acting fire blight QTLs shall improve the breeding of durable resistant cultivars in future which will be available for growers.

Key words: Fire blight, *Malus*, mapping, resistance

1 Einleitung

Feuerbrand ist eine Krankheit an Kernobst, die schon 1794 von DENNING beschrieben wurde und zuerst im Hudson Valley im Staat New York, USA auftrat (DENNING, 1794). Neben den Kernobstarten befällt der Erreger des Feuerbrands, das Bakterium *Erwinia amylovora*, auch Zierpflanzenarten der Rosaceae, wie Cotoneaster oder *Crategus*. Von den USA ausgehend hat sich das Bakterium mittlerweile in mehr als 40 Ländern ausgebreitet, darunter in den meisten Ländern Europas, Nord-, Mittel- und Südamerikas, in Ägypten, der Türkei und auch in Neuseeland (PEIL et al., 2009). Die Primärinfektion mit Feuerbrand findet während der Blüte statt. Das Bakterium wird von kontaminierten Insekten zu den Blüten gebracht. Auf den Narben kann es sich unter günstigen Bedingungen schnell vermehren, von dort aus über die Nektarien in die Blüten eindringen und sich dann in der Pflanze ausbreiten. Die sekundäre Infektion geschieht über Wunden an jungen Trieben. Typische Symptome von Feuerbrand sind bischofsstabförmige Welkeerscheinungen, die Braun- bis Schwarzfärbung von Trieben, Rindenbrandstellen an verholztem Gewebe und auch das Auftreten von Exsudat, das vom Polysaccharid Amylovoran gebildet wird. Das Exsudat, in dem auch *Erwinia*-Bakterien vorhanden sind, dient dann wiederum als Inokulumquelle. Neben Insekten stellen Hagelverletzungen einen bedeutenden Weg für die Verbreitung des Bakteriums dar. Der Befall mit *E. amylovora* kann bis zum Absterben infizierter Bäume führen. Eine effektive und verlässliche Bekämpfung der Krankheit ist bislang nur mit Antibiotika möglich. Der Einsatz von Antibiotika ist aber aus der Sicht des vorbeugenden Verbraucherschutzes und eines nachhaltigen Anbaus unerwünscht und zudem in Europa stark reglementiert oder ganz untersagt. Alternative Mittel sind Kupferpräparate, die auch aus ökologischer Sicht bedenklich sind, bakterielle Antagonisten, Hefepräparate und die Chemikalie LMA, deren Wirksamkeit in der Regel aber begrenzt sind. In den meisten Ländern Europas ist Feuerbrand eine Quarantänekrankheit und ein Befall ist meldepflichtig.

Eine Alternative zu den oben genannten Bekämpfungsmöglichkeiten ist der Anbau widerstandsfähiger Sorten. Die im Einzelhandel vertretenen Apfelsorten sind allerdings

alle mehr oder weniger stark anfällig für Feuerbrand. Hier kann die Züchtung mit der Bereitstellung Feuerbrand-resistenter Sorten einen wichtigen Beitrag für einen nachhaltigen Apfelanbau liefern. Da eine effektive Züchtung Kenntnisse über die Vererbung gewünschter Merkmale und deren Lokalisation im Genom benötigt, wurde mit einer vergleichenden Kartierung von Widerstandsfähigkeit gegenüber Feuerbrand begonnen. Durch die Kartierung der Feuerbrandresistenz in verschiedenen Donoren sollten unterschiedliche Mechanismen detektiert werden, die dann kombiniert werden könnten, um dauerhafte Widerstandsfähigkeit zu erzeugen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für die Kartierung der Resistenz gegenüber Feuerbrand wurden folgende Populationen benutzt: 'Idared' × *Malus baccata* (MAL0004) – Populationsnummer 07240; *M. fusca* (MAL0045) × 'Idared' – Populationsnummer 05210; 'Idared' × *M. ×robusta* 5 (MAL0991) – Populationsnummer 04208; 'Idared' × 'Rewena' – Populationsnummer 04207.

Inokulation der Pflanzen mit *Erwinia amylovora*:

Die Inokulation der Nachkommen erfolgte an Handveredelungen. Dazu wurden im Winter Reiser der betreffenden Nachkommen geschnitten und je nach Verfügbarkeit an Reisermaterial auf jeweils ca. 10 Unterlagen M9 veredelt. Nach Verwachsung der Kambien wurden die Pflanzen im Gewächshaus in Quedlinburg angetrieben. Ab einer Mindestlänge des Neuaustriebs von 25 cm begann die Inokulation mit dem Pathogen. Dazu wurde eine Schere in eine Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 10^9 cfu (colony forming units)/ml getaucht und mit der Schere anschließend die Spitzen der zwei jüngsten Blätter des Neuaustriebs abgeschnitten (Abb. 1). Das Inokulum bestand in jedem Jahr für jede Population aus einem definierten *E. amylovora*-Stamm (Tab. 1). Die Klimabedingungen im Gewächshaus wurden wie folgt eingestellt: Tag 25–27°C und Nacht 20°C bei einer Luftfeuchte von 85%.

2.2 Bonitur der Triebinokulationen

Vier Wochen nach der Inokulation wurde der Befall mit dem Pathogen bonitiert. Dazu wurden die Länge des neu ausgetriebenen Triebes und die Länge der Nekrose, die sich an diesem Trieb gebildet hatte und typische Feuerbrandsymptome aufwies, mit dem Lineal gemessen. Die Widerstandsfähigkeit wurde als Befallsrate, d.h. Prozent befallener Trieb, angegeben:

Befallsrate (%) = befallener Trieb/Länge Gesamtneutrieb * 100

Das gesamte inokulierte Pflanzenmaterial wurde durch Autoklavieren vernichtet, da es sich bei Feuerbrand um einen Quarantäneschaderreger handelt.



Abb. 1. Inokulation von Neutrieben durch Abschneiden der Spitzen der zwei jüngsten Blätter mit einer Schere nach Eintauchen in eine Bakteriensuspension.

Tab. 1. Durchschnittliche Befallsrate (%) für die untersuchten Populationen nach Inokulation mit ausgewählten *E. amylovora*-Isolaten in unterschiedlichen Jahren

| Populationsnr./ Jahr | 04207 | | 04208 | | 05210 | | 07240 | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|------|--------|------|-------|------|
| | Ea ¹ | Br ² | Ea | Br | Ea | Br | Ea | Br |
| 2005 | Ea 222 | 65,5 | Ea222 | 34,7 | | | | |
| 2006 | | | Ea222 | 32,2 | Ea222 | 23,1 | | |
| 2007 | | | | | Ea222 | 9,6 | | |
| 2008 | | | Ea3049 | 81,6 | | | Ea222 | 31,9 |
| 2009 | | | ZYRKD3-1 | 67,7 | Ea3049 | 62,4 | Ea222 | 33,6 |
| | | | Ea1189 | 28,1 | | | | |
| 2011 | | | ZYRKD3-1 | 75,0 | | | | |
| | | | ZYRKD3-1k ³ | 80,1 | | | | |
| | | | Ea1189 | 33,2 | | | | |
| 2012 | | | | | Ea222 | 9,0 | | |

¹ Ea: *Erwinia amylovora*-Isolat

² Br: Befallsrate (%) = Länge befallener Trieb im Verhältnis zum Gesamtneutrieb

³ ZYRKD3-1 komplementiert mit dem S-Allel des *avrPPT2_{Ea}*-Gens

2.3 Molekulare Marker

Für die Erstellung genetischer Karten wurden folgende Markersysteme benutzt: Mikrosatelliten (SSRs), Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Sequence Characterized Amplified Regions und die Diversity Array Technology (DArTs). Die DArT-Marker wurden von Andrzej Kilian, Diversity Array Technology Pty Ltd., Australien, entwickelt, angewandt und die Ergebnisse von ihm ausgewertet.

DArT-Marker wurden für jeweils 92 Nachkommen der Populationen 04207 ('Idared' × 'Rewena') und 05210 (*M. fusca* × 'Idared') benutzt. Die SNP-Analysen fanden am Fondazione Edmund Mach (FEM) in San Michele statt. Ein 384 SNP-Chip wurde für die Detektion polymorpher SNPs für die Populationen 05210 (*M. fusca* × Idared) und 07240 ('Idared' × *Malus baccata*) benutzt. SSR-Marker wurden für alle Populationen am Julius Kühn-Institut (JKI) in Dresden angewandt und durch SSR-Analysen am FEM in San-Michele ergänzt. Am JKI erfolgte die SSR-Analyse in Multiplex-Ansätzen. Die Trennung der PCR-Fragmente wurde mittels Kapillarelektro-

phorese (Beckman-Sequencer) oder vertikaler Plattengelelektrophorese (LiCOR-Sequencer) durchgeführt.

2.4 Kartierung

Für die Erstellung genetischer Karten wurden das Programm Joinmap 4.0 (VAN OOLJEN, 2006) und für die Untersuchung der Marker-Phänotyp Assoziation (Kruskal-Wallis Test) und der QTL-Kartierung das Programm MapQTL 5.0 (VAN OOLJEN, 2004) benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung der Populationen

Tab. 1 zeigt die Ergebnisse der Phänotypisierungen als durchschnittliche Befallsrate der Populationen, die in den jeweiligen Jahren mit unterschiedlichen *E. amylovora*-Isolaten erzielt worden sind. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurde für die Phänotypisierung aller Populationen das *E. amylovora*-

Isolat Ea222 zur ersten QTL Kartierung genutzt. Die Populationen 04208 ('Idared' × *M. ×robusta* 5), 05210 (*M. fusca* × 'Idared') und 07240 ('Idared' × *Malus baccata*) wurden jeweils mindestens in zwei unabhängigen Jahren inokuliert, die Population 04207 ('Idared' × 'Rewena') nur einmal. Der Grund hierfür war die hohe durchschnittliche Befallsrate dieser Population von 65,5%. Während die Inokulation der Populationen 04208 und 07240 über beide Versuchsjahre einheitliche Ergebnisse zeigten, 32,2 und 34,7% für 04208 und 31,9% und 33,6% für 07240, war die Befallsrate für die Population 05210 in den ersten beiden Jahren mit 23,1 und 9,6% deutlich unterschiedlich. Die dritte Phänotypisierung von 05210 in 2012 mit Ea222 ergab mit einer Befallsrate von 9,0% ein ähnliches Ergebnis wie die Inokulation in 2007 (Tab. 1).

Im Gegensatz zum Kartierungsisolat Ea222 erzeugte das *Erwinia*-Isolat Ea3049 sowohl bei Population 04208 (PEIL et al., 2011) als auch bei Population 05210 bedeutend höhere durchschnittliche Befallsraten (Tab. 1). Während der Feuerbrandresistenzdonor *M. fusca* (MAL0045) jedoch nur einen prozentualen Befall von 9,0% nach Inokulation mit Ea3049 aufwies, brach das Isolat Ea3049 die Resistenz von *M. ×robusta* 5 vollständig (Nekroserate: 96,5%). Die *avrRpt2_{EA}*-Deletionsmutante ZYRKD3-1 (ZHAO et al., 2006) war ebenfalls in der Lage, die Resistenz von *M. ×robusta* 5 zu brechen und in den Nachkommen mit 67,7 bis 75,0% ein sehr hohe durchschnittliche Befallsrate zu erzielen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem Stamm ZYRKD3-1k erzielt. Bei diesem Stamm handelt es sich um die *avrRPT2_{EA}*-Deletionsmutante ZYRKD3-1, welche mit dem *avrRpt2_{EA}* Gen aus dem *E. amylovora* Isolat Ea3049 komplementiert wurde. Da das *avrRPT2_{EA}*-Effektorprotein offensichtlich eine zentrale Rolle bei der Resistenz von *M. ×robusta* 5 zu haben scheint, wurde das *avrRpt2_{EA}* Gen von verschiedenen *Erwinia*-Stämmen sequenziert. Dabei konnten zwei Allele des Gens identifiziert werden, S- und C-Allel, die sich in nur einem einzigen SNP unterscheiden (VOGT et al., 2013). Zur Einordnung des Befalls der Population 04208 nach Inokulation mit ZYRKD3-1 wurden die Nachkommen auch mit dem Wildtyp der Deletionsmutante, dem Isolat Ea1189 inokuliert. Die Ergebnisse (Tab. 1) entsprechen denen der Inokulation mit Ea222.

3.2 Genotypisierung und Kartierung der Populationen

Die Genotypisierung und die Erstellung genetischer Karten für die einzelnen Feuerbrandresistenzdonoren wurden für 'Rewena' von LE ROUX (2011), für *M. ×robusta* 5 von PEIL et al. (2007), GARCIA-LIBEROS (2012) und WÖHNER et al. (2014) und für *M. fusca* von EMERIEWEN et al. (2014) durchgeführt und beschrieben. Zur Auffindung von Feuerbrandresistenz-QTLs in *M. baccata* wurde die Population vornehmlich mit Mikrosatellitenmarkern der Kopplungsgruppen gescreent, auf denen bereits Feuerbrandresistenzloci gefunden worden waren. Zusammen mit SNP-Markern konnten so insgesamt acht Kopplungsgruppen mit insgesamt 60 Markern, die eine Gesamtlänge von 390 cm umspannen, bestimmt werden. Der durchschnittliche Markerabstand beträgt 6,5 cM.

3.3 QTL-Kartierung

Die Kartierung der Feuerbrand-QTLs wurde im Wesentlichen für die Bonituren der Jahre 2005 bis 2008 durchgeführt. Für die Population 'Idared' × *M. baccata* wurden die 2009 erhobenen Boniturdaten als Wiederholung für die Bonitur 2008 mit ausgewertet.

3.3.1 Population 04208 – 'Idared' × *M. ×robusta* 5. Für diese Population wurde auf Kopplungsgruppe 3 (LG 3) ein Major-QTL kartiert (PEIL et al., 2007). Der QTL wurde durch die Inokulationen im Jahr 2006 (PEIL et al., 2008). In Abb. 2 sind die Ergebnisse der QTL-Kartierung der Inokulationen der Jahre 2005 bis 2008 zu sehen. Deutlich wird der Zusammenbruch des Resistenz-QTL auf LG 3 nach Inokulation mit dem Isolat Ea3049, welches die Resistenz von *M. ×robusta* 5 brechen kann (Abb. 2), dafür konnte aber ein Minor-QTL auf LG 5 mit einem LOD ≥ 3 detektiert werden, der für das Isolate Ea222 nicht vorhanden war (Abb. 3).

3.3.2 Population 05210 – *M. fusca* × 'Idared'. Für *M. fusca* konnte ein Major-QTL auf Kopplungsgruppe 10 detektiert werden. Da die genetische Karte für *M. fusca* hauptsächlich aus DaRT-Markern bestand, die stark clustern, wurden in den Abb. 4 und 5 einige Marker nicht aufgeführt, da es sonst zu Überlagerungen der Markerbezeichnungen gekommen wäre. Aus diesem Grund gibt Tab. 2 die

Tab. 2. Genetische Karte der Kopplungsgruppe 10 (LG 10) von *M. fusca*

| Marker-Nr. | Position (cM) | Locus |
|------------|---------------|-------------|
| 1 | 0 | GD_SNP00604 |
| 2 | 11.462 | 184374 |
| 3 | 12.909 | 972352 |
| 4 | 12.944 | 970891 |
| 5 | 12.944 | 443272 |
| 6 | 12.944 | 442947 |
| 7 | 20.510 | 898994 |
| 8 | 21.981 | 460883 |
| 9 | 21.981 | 525997 |
| 10 | 22.013 | 553933 |
| 11 | 23.616 | 971449 |
| 12 | 23.643 | 970425 |
| 13 | 23.643 | 970518 |
| 14 | 23.791 | 971614 |
| 15 | 23.791 | 969611 |
| 16 | 23.940 | 971227 |
| 17 | 25.421 | 969555 |
| 18 | 34.741 | 971000 |
| 19 | 35.660 | 970840 |
| 20 | 59.756 | 970048 |
| 21 | 59.769 | 969599 |
| 22 | 75.941 | 971659 |

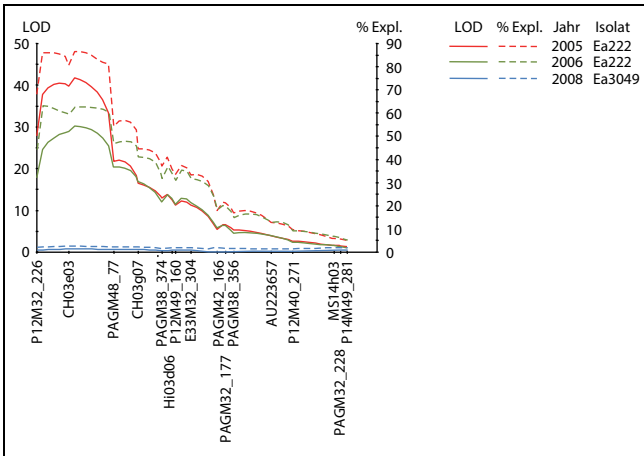


Abb. 2. LOD und % Erklärung der phänotypischen Varianz (% Expl.) nach Inokulation der Population 'Idared' × *M. robusta* 5 in unterschiedlichen Jahren und mit unterschiedlichen *Erwinia amylovora*-Stämmen für Kopplungsgruppe 3 (nach Peil et al., 2011, geändert).

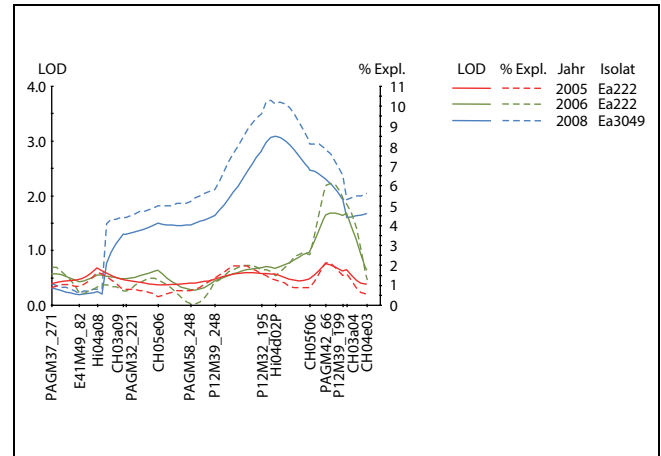


Abb. 3. LOD und % Erklärung der phänotypischen Varianz (% Expl.) nach Inokulation der Population 'Idared' × *M. robusta* 5 in unterschiedlichen Jahren und mit unterschiedlichen *Erwinia amylovora*-Stämmen für Kopplungsgruppe 5 (nach Peil et al., 2011, geändert).

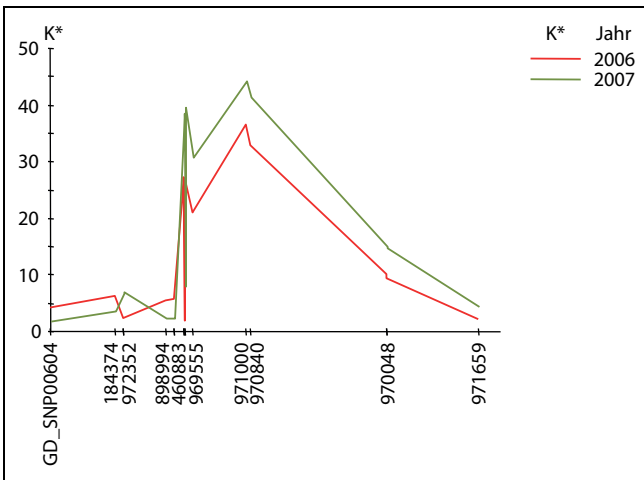


Abb. 4. Kruskal-Wallis Analyse nach Inokulation der Population *M. fusca* × 'Idared' in den Jahren 2006 und 2007 mit dem *Erwinia*-Isolat Ea222 für Kopplungsgruppe 10.

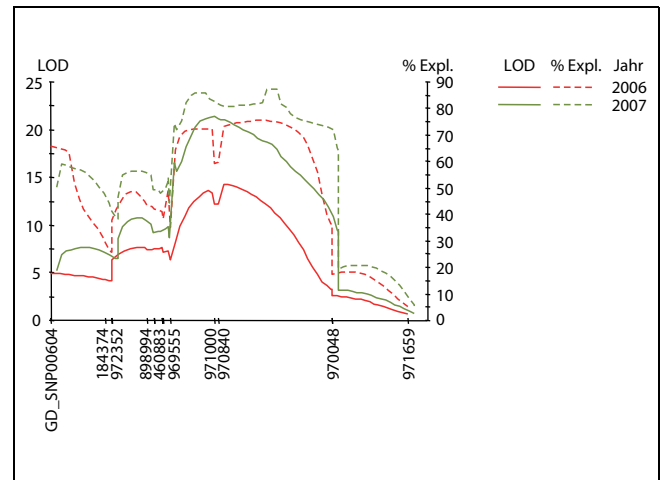


Abb. 5. LOD (logarithm of the odd) und % Erklärung der phänotypischen Varianz (% Expl.) nach Inokulation der Population *M. fusca* × 'Idared' in den Jahren 2006 und 2007 mit dem *Erwinia*-Isolat Ea222 für Kopplungsgruppe 10.

Reihenfolge und die genetischen Abstände der Marker auf Kopplungsgruppe 10 vollständig wieder. Abb. 4 zeigt die Ergebnisse der Kruskal-Wallis Analyse für Kopplungsgruppe 10. Die höchste Assoziation zwischen Marker und Ausprägung des Phänotyps sind in beiden betrachteten Jahren 2006 und 2007, trotz großer Unterschiede in der durchschnittlichen prozentualen Nekroserate, für die beiden DARt-Marker 971000 und 970840 zu beobachten. Die Marker haben eine Distanz von ca. 0,9 cM und der Peak der Kurve liegt über Marker 971000.

Die Ergebnisse des QTL-Mappings sind für die Jahre 2006 und 2007 in Abb. 5 dargestellt. Die maximalen LOD-Werte liegen wiederum bei den beiden DARt-Markern 971000 und 970840, mit ca. 14 für 2006 und 22 für 2007. Damit wurde der QTL in beiden Jahren bestätigt und erklärt im Jahr 2007 bis zu 87% der phänotypischen Varianz.

3.3.3 Population 07240 – 'Idared' × *M. baccata*. Es konnte für beide Phänotypisierungsjahre mit Ea222 jeweils ein

Major-QTL auf Kopplungsgruppe 12 lokalisiert werden. Abb. 6 zeigt die Phänotyp-Marker Assoziation. In beiden Jahren wies der Mikrosatellit Hi07f02 die höchste Korrelation zu den phänotypischen Daten auf.

Die QTL-Kartierung mit Map-QTL ergab die höchste statistische Sicherheit für einen Zusammenhang zwischen Marker und Merkmal ebenfalls für Hi07f02, weswegen ein Multiples QTL Mapping (MQM) mit dem Marker Hi07f02 als Co-Faktor durchgeführt wurde (Abb. 7). Etwa 45% der phänotypischen Varianz werden durch den QTL im Jahr 2009 erklärt (Abb. 7).

3.3.4 Population 04207 – 'Idared' × 'Rewena'. Für die Population 04207 wurde eine genetische Karte mit DARt- und SSR-Markern für die Identifizierung der Kopplungsgruppen erstellt. Die phänotypischen Daten stammen aus der Inokulation der veredelten Nachkommen mit dem *Erwinia*-Isolat Ea222 im Jahr 2005. Es konnte kein QTL mit einer ausreichend hohen statistischen Sicherheit für

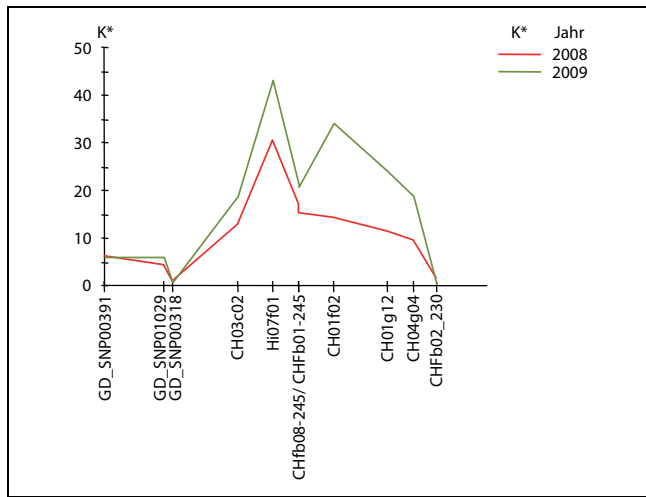


Abb. 6. Kruskal-Wallis Analyse nach Inokulation der Population 'Idared' x *M. baccata* in den Jahren 2008 und 2009 mit dem *Erwinia*-Isolat Ea222 für Kopplungsgruppe 12.

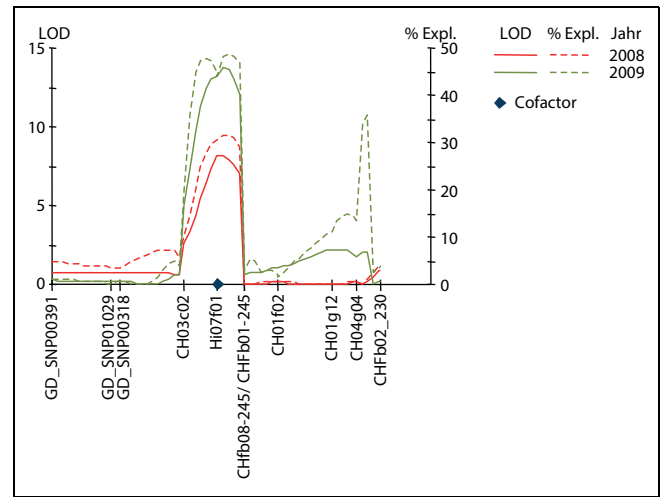


Abb. 7. LOD (logarithm of the odd) und % Erklärung der phänotypischen Varianz (% Expl.) nach Inokulation der Population 'Idared' x *M. baccata* in den Jahren 2008 und 2009 mit dem *Erwinia*-Isolat Ea 222 für Kopplungsgruppe 12.

die Feuerbrandresistenz von 'Rewena' detektiert werden (LE ROUX, 2011).

3.4 Vergleich der Positionen der Feuerbrand-QTLs

Eine Übersicht über die identifizierten QTLs gibt Tab. 3. Daneben werden die entsprechenden Kopplungsgruppen, das für die Phänotypisierung benutzte *Erwinia*-Isolat, das Maß der statistischen Absicherung des QTL (LOD) und der Anteil der phänotypischen Varianz, die der QTL erklären kann, wiedergegeben. Deutlich wird, dass insbesondere die Lokalisierung der Feuerbrandresistenz auf den Kopplungsgruppen 3 bzw. 10 der Donoren *M. ×robusta* 5 und *M. fusca* sehr sicher ist und dass die Wirksamkeit dieser QTLs in einem sehr hohen Maß vererbt wird. Dagegen ist die statistische Sicherheit für den Minor-QTL auf Kopplungsgruppe 5 von *M. ×robusta* 5 nach Inokulation mit dem Resistenz-brechenden Isolat Ea3049 mit einem LOD-Wert von 3 relativ gering (Tab. 3). Der Feuerbrand-QTL auf Kopplungsgruppe 12 von *M. baccata* wird für beide Phänotypisierungsjahre bestätigt, fällt aber in seiner Wirkung deutlich gegenüber den QTLs von *M. fusca* und *M. ×robusta* 5 ab.

Abb. 8 zeigt eine Einordnung und Lokalisation der hier beschriebenen QTLs für Resistenz gegenüber Feuerbrand

mit bereits bekannten Feuerbrand-QTLs auf den entsprechenden Kopplungsgruppen der genetischen Konsensus-Karte für Apfel (SILVERBERG-DILWORTH et al., 2006). Insgesamt stehen jetzt fünf Major-QTLs verteilt auf vier Kopplungsgruppen zur Verfügung, die in der Züchtung kombiniert werden können.

4 Diskussion

Ein großes Problem bei der Kartierung von Feuerbrandresistenz ist die Bestimmung der Anfälligkeit bzw. Resistenz von *Malus*-Genotypen. Der natürliche Befall durch Blüteninokulation im Versuchsfeld scheint ein realistischeres Bild der Resistenz als die künstliche Triebinokulation im Gewächshaus zu geben. Durch die ungleichen Inokulationsbedingungen im Freiland wird in der Regel aber die Resistenz überschätzt (PEIL et al., 2009), während im Gewächshaus in der Regel die Anfälligkeit überschätzt wird. Für die Kartierung müssen vergleichbare Inokulationsbedingungen für eine Population gegeben sein, weswegen sich für diesen Zweck die Inokulation im Gewächshaus durchgesetzt hat. Diese wird am JKI ähnlich der cut-leaf-Methode (MAAS GEESTERANUS et al., 1981)

Tab. 3. Auflistung von QTLs für Feuerbrandresistenz, der jeweiligen Kopplungsgruppe, der LOD-Werte (logarithm of the odd) und des Anteils der phänotypischen Varianz (% Expl.) der durch den QTL nach Inokulation mit dem angegebenen *Erwinia*-Stamm erklärt werden kann

| | <i>Erwinia</i> -Isolat | Kopplungsgruppe | LOD | % Expl. |
|----------------------|------------------------|-----------------|-------|---------|
| <i>M. baccata</i> | Ea 222 | 12 | 8–14 | 30–45 |
| <i>M. fusca</i> | Ea 222 | 10 | 14–23 | 75–87 |
| <i>M. ×robusta</i> 5 | Ea 222 | 3 | 30–42 | 64–87 |
| | Ea 3049 | 5 | 3 | 10 |
| Rewena | Ea 222 | – | – | – |

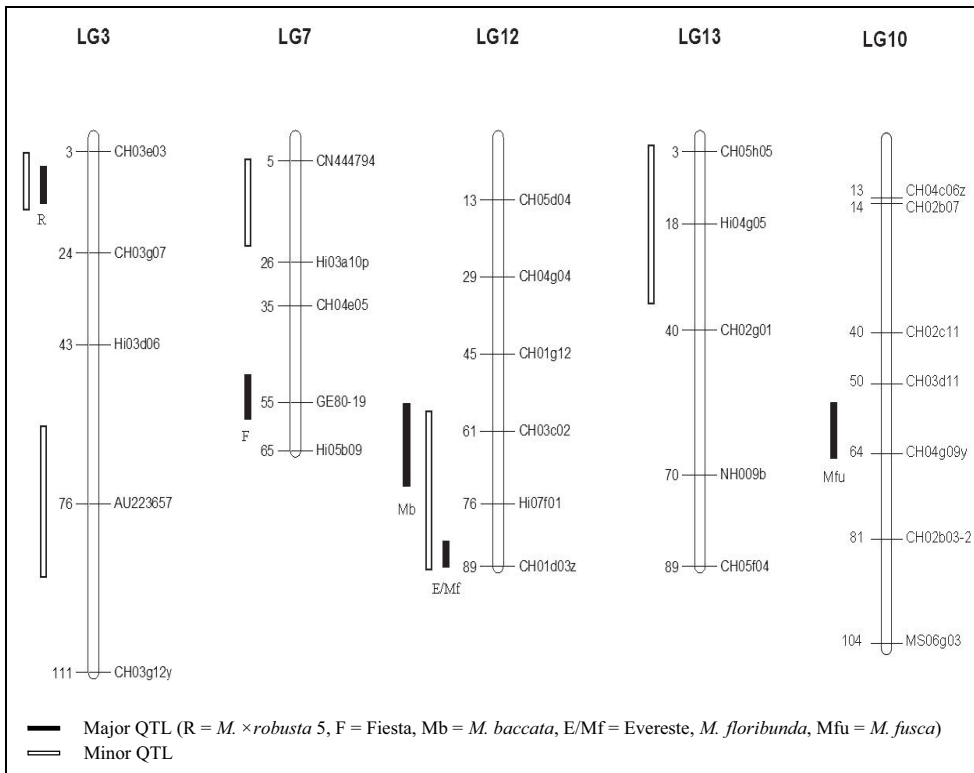


Abb. 8. Position von Quantitative Trait Loci (QTL) für Resistenz gegenüber Feuerbrand, basierend auf der Rumpfkarte, die von SILVERBERG-DILWORTH et al. (2006) entwickelt wurde (nach PEIL et al., 2009, verändert).

durchgeführt. Da auch Wirt-Pathogen-Interaktionen beschrieben sind (NORELLI et al., 1984), wurden alle vier Kartierungspopulationen mit dem Kartierungsisolat Ea222 inokuliert. Bei der Phänotypisierung von Wiederholungen eines Genotyps kann eine große Varianz auftreten, weswegen eine ausreichende Anzahl an Wiederholungen getestet werden muss. Aus diesem Grund wurden am JKI die drei Populationen 'Idared' × *M. baccata*, *M. fusca* × 'Idared' und 'Idared' × *M. xrobusta* 5 wenigstens zwei Jahre mit Ea222 inokuliert. Während für die Populationen 'Idared' × *M. baccata* und 'Idared' × *M. xrobusta* 5 die durchschnittlichen Nekroserate beider Jahre sehr eng zusammenliegen (34,7% bzw. 32,2% für *M. xrobusta* 5 und 31,9% bzw. 33,6% für *M. baccata*), sank bei der zweiten Inokulation der *M. fusca* × 'Idared' Nachkommenschaft mit Ea222 die durchschnittliche Nekroserate von 23,1% auf 9,6%; eine dritte Inokulation mit Ea222 im Jahr 2012 ergab nur 9,0%. Ein Grund für diesen Unterschied ist bislang nicht erkennbar.

Für *M. xrobusta* 5 war bekannt, dass es *Erwinia*-Isolate gibt, die die Resistenz brechen können (NORELLI et al., 1984). Aus diesem Grund wurde die *M. xrobusta* 5 Population mit dem Isolat Ea3049 inokuliert, was zu einer durchschnittlichen Nekroserate von 81,6% führte. Dieser hoch virulente Stamm, der *M. fusca* kaum befallen konnte (9,0% Nekroserate), wurde auch für die Phänotypisierung der *M. fusca*-Nachkommenschaft benutzt und erzeugte dort eine durchschnittliche Befallsrate von 62,4%. Die hohen Befallsraten von *M. xrobusta* 5 und der daraus entstandenen Nachkommenschaft nach Inokulation mit Ea3049 weisen auf ein einzelnes Major-Resistenzgen für diesen Donor hin. Die gute Widerstandsfähigkeit von *M. fusca* und die hohe Anfälligkeit der Population lassen

vermuten, dass dieser Donor mindestens zwei Major-Resistenzgene hat oder zwei Faktoren, die zusammen an die Nachkommen vererbt werden müssen, um auch Widerstandsfähigkeit gegenüber diesem Isolat zu erzielen. Die Nachkommen von 'Idared' × 'Rewena' zeigten diesen hohen Grad an Anfälligkeit (65,5%) schon mit dem weniger virulenten Kartierungsisolat Ea222.

In der Literatur sind bislang vier Major-QTLs beschrieben: auf Kopplungsgruppe 3 für *M. xrobusta* 5 (PEIL et al., 2007, 2008), auf Kopplungsgruppe 7 für 'Fiesta' (KHAN et al., 2006) und auf Kopplungsgruppe 12 für die Zierapfelsorte 'Evereste' und den *Rvi6* Schorfresistenz-Donor *M. floribunda* 821 (DUREL et al., 2009). Die beiden Major-QTLs auf Kopplungsgruppe 12 kartieren im selben Intervall und könnten allelisch sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für *M. baccata* ebenfalls ein Major-QTL auf Kopplungsgruppe 12 lokalisiert, der jedoch einige cM entfernt von den QTLs im Genom von 'Evereste' und *M. floribunda* 821 zu liegen scheint. Inwieweit die QTLs auf Kopplungsgruppe 12 doch übereinander liegen und allelisch sind, muss in weiteren Analysen geklärt werden. Der geringe Anteil der phänotypischen Varianz, der durch den Locus auf Kopplungsgruppe 12 von *M. baccata* erklärt werden kann, deutet daraufhin, dass in *M. baccata* mindestens ein weiterer QTL-für Resistenz gegenüber Feuerbrand existiert. Die Strategie zuerst nur Kopplungsgruppen zu kartieren, auf den bereits Feuerbrand-QTLs identifiziert worden sind, war zwar erfolgreich, aber nicht ausreichend. Ergänzende Kartierungsarbeiten sind erforderlich, um nach weiteren QTLs zu suchen. Für *M. fusca* ergab die Kartierung mit DArT Markern eine starke Assoziation zweier Marker mit der Widerstandsfähigkeit gegenüber Feuerbrand. Diese Marker konnten anhand der veröffentlichten

ten Genomsequenz von 'Golden Delicious' (VELASCO et al., 2010) Kopplungsgruppe 10 zugeordnet werden. Im Rahmen einer Dissertation in Kooperation mit Mickael MALNOY vom Instituto Agrario di San Michele all'Adige (IASMA), San Michele all'Adige (TN), Italien, konnte mittlerweile eine genetische Karte von *M. fusca* entwickelt und der Feuerbrand-QTL mit SSR-Markern kartiert werden (EMERIEWEN et al., 2014). In der Zwischenzeit konnte das dem Major-QTL auf Kopplungsgruppe 3 von *M. ×robusta* 5 zugrunde liegende Gen isoliert und erfolgreich in die Apfelsorte 'Gala' transformiert werden (FAHRENTTRAPP et al., 2013; BROGGINI et al., 2014).

Die QTL-Kartierung nach Inokulation der *M. ×robusta* 5-Population mit dem *M. ×robusta* 5-Resistenz brechenden Isolat Ea3049 führte zum völligen Zusammenbruch des Major-QTLs auf Kopplungsgruppe 3 und zur Detektion eines Minor-QTL auf Kopplungsgruppe 5 (PEIL et al., 2011), der jedoch nur ca. 10% der phänotypischen Varianz erklären kann. GARDINER et al. (2012) beschreiben einen Minor-QTL auf Kopplungsgruppe 7 von *M. ×robusta* 5, der nach Abdeckung der genetischen Kopplungskarte mit Markern, insbesondere für die Kopplungsgruppen 6 und 7 von *M. ×robusta* 5, für die Inokulation mit dem Resistenz-brechenden Isolat Ea3049 bestätigt werden konnte (WÖHNER et al., 2014).

Die spezifische Wirt-Pathogen-Interaktion von *M. ×robusta* 5 mit verschiedenen *Erwinia*-Isolaten zeigt, dass ein einziger SNP in einem Avirulenzgen zur Überwindung der Resistenz gegenüber Feuerbrand führen kann (VOGT et al., 2013). Die Überwindung dieser Resistenz demonstriert die Notwendigkeit der Züchtung dauerhaft widerstandsfähiger Sorten. Dies kann durch eine Pyramidisierung unterschiedlicher Resistenzmechanismen geschehen. Die Tatsache, dass in verschiedenen Wildarten jeweils Major-QTLs auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen gefunden wurden, weist eindeutig auf unterschiedliche Mechanismen hin. Die Züchtung arbeitet jetzt an der Kombination unterschiedlicher QTLs. Die Nachkommen solcher Kreuzungen können dann mit molekularen Markern auf die Pyramidisierung der Resistenz-QTLs gescreent werden. In einem zweiten Schritt müssen dann die Genotypen mit pyramidierten QTLs und Genotypen mit nur einem einzelnen QTL als Vergleich mit hoch virulenten Erregerstämmen inokuliert werden, um Aussagen über die Wirksamkeit der Pyramidisierung treffen zu können.

Literatur

- BROGGINI, G.A.L., T. WÖHNER, J. FAHRENTTRAPP, T.D. KOST, H. FLACHOWSKY, A. PEIL, M.-V. HANKE, K. RICHTER, A. PATOCCHI, C. GESSLER, 2014: Engineering fire blight resistance into the apple cultivar 'Gala' using the *FB_MR5* CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus ×robusta* 5. *Plant Biotechnology* **12**, 728-733.
- DENNING, W., 1794: On the decay of apple trees. *New York Society for the Promotion of Agricultural Arts and Manufacturers Transaction* **2**, 219-222.
- DUREL, C.-E., C. DENANCE, M.-N. BRISSET, 2009: Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes Evereste and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* **52**, 139-147.
- GARDINER, S.E., J.L. NORELLI, N. DE SILVA, G. FAZIO, A. PEIL, M. MALNOY, M. HORNER, D. BOWATTE, C. CARLISLE, C. WIEDOW, Y. WAN, C.L. BASSETT, A.M. BALDO, J.-M. CELTON, K. RICHTER, H.S. ALDWINCKLE, V.G.M. BUS, 2012: Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus 'Robusta 5'* accessions. *BMC Genetics* **13**, 25.
- KHAN, M.A., B. DUFFY, C. GESSLER, A. PATOCCHI, 2006: QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Molecular Breeding* **17**, 299-306.
- EMERIEWEN, O., K. RICHTER, A. KILIAN, E. ZINI, M.-V. HANKE, M. MALNOY, A. PEIL, 2014: Identification of a major quantitative trait locus for resistance to fire blight in the wild apple species *Malus fusca*. *Molecular Breeding* **34**, 407-419.
- FAHRENTTRAPP, J., G.A.L. BROGGINI, M. KELLERHALS, A. PEIL, K. RICHTER, E. ZINI, C. GESSLER, 2013: A candidate gene for fire blight resistance in *Malus ×robusta* 5 is coding for a CC-NBSLRR. *Tree Genetics & Genomes* **9**, 237-251.
- GARCIA-LIBEROS, T., 2012: Genetic mapping and characterization of the resistance factors in apple *Malus* sp. against fire blight. Dissertation, Universität Wien.
- LE ROUX, P.M., 2011: Molecular breeding for fire blight resistance in apple (*Malus* spp.). Dissertation, ETH-Zürich.
- MAAS GEESTERANUS, H.P., J. HEYTING, 1981: The value of top leaf inoculation to demonstrate genetic resistance in *Pomoidae* species to *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. *Acta Horticulturae* **117**, 75-82.
- NORELLI, J., H.S. ALDWINCKLE, S.V. BEER, 1984: Differential host × pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **74**, 136-139.
- PEIL, A., T. GARCIA-LIBEROS, K. RICHTER, B. TROGNITZ, H. FLACHOWSKY, M.-V. HANKE, 2007: Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus ×robusta* located on linkage group 3 detected by rapid genome scanning. *Plant Breeding* **126**, 470-475.
- PEIL, A., M.-V. HANKE, H. FLACHOWSKY, K. RICHTER, T. GARCIA-LIBEROS, J.-M. CELTON, S. GARDINER, M. HORNER, V. BUS, 2008: Confirmation of the fire blight QTL of *Malus ×robusta* 5 on linkage group 3. *Acta Horticulturae* **793**, 297-303.
- PEIL, A., V.G.M. BUS, K. GEIDER, K. RICHTER, H. FLACHOWSKY, M.-V. HANKE, 2009: Improvement of fire blight resistance in apple and pear. *International Journal of Plant Breeding* **3**, 1-27.
- PEIL, A., H. FLACHOWSKY, M.-V. HANKE, K. RICHTER, J. RODE, 2011: Inoculation of *Malus ×robusta* 5 progeny with a strain breaking resistance to fire blight reveals a minor QTL on LG5. *Acta Horticulturae* **896**, 357-362.
- SILVERBERG-DILWORTH, E., C.L. MATASCI, W.E. VAN DE WEG, M.P.W. VAN KAAUWEN, M. WALSER, L.P. KODDE, V. SOGLIO, L. GIANFRANCESCHI, C.E. DUREL, F. COSTA, T. YAMAMOTO, B. KOLLER, C. GESSLER, A. PATOCCHI, 2006: Microsatellite markers spanning the apple (*Malus ×domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* **2**, 202-224.
- VAN OOLJEN, J.W., 2006: JoinMap[®] 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- VAN OOLJEN, J.W., 2004: MapQTL[®] 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- VELASCO, R., A. ZHARKIKH, J. AFFOURTIT, A. DHINGRA, A. CESTARO, A. KALYANARAMAN, P. FONTANA, S.K. BHATNAGAR, M. TROGGIO, D. PRUSS, S. SALVI, M. PINDO, P. BALDI, S. CASTELLETTI, M. CAVAIUOLO, G. COPPOLA, F. COSTA, V. COVA, A. DAL RI, V. GOREMYKIN, M. KOMJANC, S. LONGHI, P. MAGNAGO, G. MALACARNE, M. MALNOY, D. MICHELETTI, M. MORETTO, M. PERAZZOLLI, A. SI-AMMOUR, S. VEZZULLI, E. ZINI, G. ELDRIDGE, L.M. FITZGERALD, N. GUTIN, J. LANCHBURY, T. MACALMA, J.T. MITCHELL, J. REID, B. WARDELL, C. KODIRA, Z. CHEN, B. DESANY, F. NIAZI, M. PALMER, T. KOEPKE, D. JIWAN, S. SCHAEFFER, V. KRISHNAN, C. WU, V.T. CHU, S.T. KING, J. VICK, Q. TAO, A. MRAZ, A. STORMO, K. STORMO, R. BOGDEN, D. EDERLE, A. STELLA, A. VECCHIETTI, M.M. KATER, S. MASIERO, P. LASSERRE, Y. LESPINASSE, A.C. ALLAN, V. BUS, D. CHAGNE, R.N. CROWHURST, A.P. GLEAVE, E. LAVEZZO, J.A. FAWCETT, S. PROOST, P. ROUZE, L. STERCK, S. TOPPO, B. LAZZARI, R.P. HELLENS, C.-E. DUREL, A. GUTIN, R.E. BUMGARNER, S.E. GARDINER, M. SKOLNICK, M. EGHOLM, Y. VAN DE PEER, F. SALAMINI, R. VIOLA, 2010: The genome of the domesticated apple (*Malus ×domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**, 833-839.
- VOGT, I., T. WÖHNER, K. RICHTER, H. FLACHOWSKY, G.W. SUNDIN, A. WENSING, E.A. SAVORY, K. GEIDER, B. DAY, M.-V. HANKE, A. PEIL, 2013: Evidence for a gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus ×robusta* 5 - *Erwinia amylovora*. *New Phytologist* **197**, 1262-1275.
- WÖHNER, T., H. FLACHOWSKY, K. RICHTER, T. GARCIA-LIBEROS, F. TROGNITZ, M.-V. HANKE, A. PEIL, 2014: QTL mapping of fire blight resistance in *Malus ×robusta* 5 after inoculation with different strains of *Erwinia amylovora*. *Molecular Breeding* **34**, 217-230.
- ZHAO, Y., S.Y. HE, G.W. SUNDIN, 2006: The *Erwinia amylovora* avrRpt2EA Gene Contributes to Virulence on Pear and AvrRpt2EA Is Recognized by Arabidopsis RPS2 When Expressed in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 644-654.