



Doctoral Thesis

## **Molecular breeding for fire blight resistance in apple (*Malus* spp.)**

**Author(s):**

Le Roux, Pierre-Marie F.

**Publication Date:**

2011

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007303852> →

**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 Nr. 20055

**MOLECULAR BREEDING FOR FIRE BLIGHT RESISTANCE IN  
APPLE (*MALUS* SPP.)**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

For the degree of  
Doctor of Sciences

Presented by  
PIERRE-MARIE F. LE ROUX  
Dipl. Ing. Agr. ENSAR, Rennes, France

Born October 11<sup>th</sup>, 1982

Citizen of France

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Cesare Gessler, examiner  
Prof. Dr. Bruce McDonald, co-examiner  
Prof. Dr. Magda-Viola Hanke, co-examiner  
Dr. Andrea Patocchi, co-examiner

2011

# Abstract

Fire blight is a bacterial disease caused by *Erwinia amylovora* that affects a wide variety of Rosaceae, and primarily Spiraeoideae. Its damage to the production of the cultivated apple (*Malus × domestica* Borkhausen) is a major concern since no existing control option has proven to be completely effective and durable. Selecting pre-breeding genotypes and subsequently apple cultivars resistant to fire blight by phenotypic evaluation is feasible but it is expensive, labor-intensive and time-consuming. Selection efficiency may be improved by the application of molecular markers. For this, a good understanding of the genetic basis of fire blight resistance in *Malus* spp., and especially in apple cultivars, is necessary.

**Chapter 1** gives an overview of classical breeding, quantitative trait locus (QTL) and gene mapping, and marker-assisted breeding in apple for diseases resistance, with a focus on fire blight resistance. The disease, its causative agent *E. amylovora* and the various control options are also presented.

**Chapter 2** describes a QTL analysis conducted on a F1 progeny of 118 individuals derived from the cross ‘Florina’ × ‘Nova Easygro’ using two parental linkage maps based on simple sequence repeats (SSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Both parental cultivars are considered resistant to fire blight. Two significant QTLs for resistance to *E. amylovora* strain CFBP 1430 were detected in ‘Florina’; one QTL on linkage group (LG) 10 explained 15.3 % of the phenotypic variation, and a second QTL on LG 5 explained 10.1 % of the phenotypic variation. Genotyping the plants of ‘Florina’ pedigree with the SSR markers flanking the QTLs showed that the QTLs on LGs 10 and 5 were inherited from ‘Jonathan’ and ‘Starking’ (a ‘Red Delicious’ sport mutation), respectively. Only putative QTLs were detected in ‘Nova Easygro’, on LGs 5 and 9.

**Chapter 3** reports a QTL analysis performed on a F1 progeny of 92 individuals derived from a cross between the cultivars ‘Idared’ (fire blight susceptible) and ‘Rewena’ (fire blight resistant). Two framework parental linkage maps were constructed with diversity arrays technology (DArT) and SSR markers, covering 44.2 % and 37.1 % of ‘Idared’ and ‘Rewena’ genomes, respectively. One putative QTL for resistance to *E. amylovora* strain Ea 222 was detected on the LG 7 of ‘Idared’. Improving genome coverage as well as marker density and distribution on the linkage maps of ‘Rewena’ and ‘Idared’ may allow to detect additional QTLs. Together, Chapters 2 and 3 suggest that the resistance to fire blight of the cultivars

‘Florina’, ‘Nova Easygro’ and ‘Rewena’ is quantitative and has an oligo- or polygenic basis, involving mostly minor-effect additive QTLs and possibly epistatic QTLs.

Quantitative trait loci conferring high levels of fire blight resistance have been identified in wild and ornamental apple genotypes, such as *Malus × robusta* ‘Robusta 5’, ‘Evereste’ and *Malus × floribunda* clone 821. However, no advanced selections or even pre-breeding genotypes carrying these QTLs and displaying satisfactory fruit quality and agronomic performance are yet available. Recently, a breeding technology based on the early flowering *BpMADS4*-transgenic line T1190 was developed to accelerate the introgression of genes or QTLs from wild or ornamental apples into the domesticated apple. **Chapter 4** reports the genetic mapping on LG 4 of the T-DNA integration site in the *BpMADS4*-transgenic apple line T1190.

**Chapter 5** describes the use of the *BpMADS4*-transgenic line T1190 to accelerate the introgression of the highly efficacious fire blight resistance locus Fb\_E identified on LG 12 of the ornamental apple cultivar ‘Evereste’ into a domesticated apple background. The strong phenotypic effect of the Fb\_E locus was confirmed by artificially inoculating a F1 progeny T1190 × ‘Evereste’ with *E. amylovora* strain CFBP 1430. Twenty four BC’1 seedlings carrying the *BpMADS4* transgene and the Fb\_E locus could be retrieved owing to the independent segregation of the T-DNA and the locus Fb\_E. Among them, two early flowering BC’1 seedlings estimated to carry less than 15 % of the genome of ‘Evereste’ were identified using a background selection based on SSR markers regularly distributed over the apple genome. These two early flowering BC’1 seedlings will be used to further introgress the fire blight resistance locus Fb\_E in pre-breeding genotypes carrying as little as possible genome from the resistance donor ‘Evereste’.

Finally, **Chapter 6** gives a general discussion. Results of QTL analysis in the F1 progenies ‘Florina’ × ‘Nova Easygro’ and ‘Idared’ × ‘Rewena’ are discussed in the context of apple breeding for fire blight resistance. Alternative QTL mapping strategies in the breeder’s plant material are examined. Moreover, the potential of the high-speed breeding technology based on the early flowering *BpMADS4*-transgenic line T1190 is discussed in a perspective of introgression of disease resistance genes and QTLs into the domesticated apple.

# Zusammenfassung

Feuerbrand ist eine durch *Erwinia amylovora* verursachte bakterielle Krankheit, die viele Arten der Rosaceae und besonders der Spiraeoideae befällt. Der durch die Krankheit verursachte Ernteverlust im Apfelanbau (*Malus × domestica* Borkhausen) ist ein wesentliches Problem der Apfelproduktion, da die Krankheit nicht dauerhaft und sicher kontrolliert werden kann. Die phänotypische Selektion von feuerbrandresistenten Genotypen und Apfelsorten ist möglich aber teuer sowie arbeits- und zeitaufwändig. Der Aufwand der Selektion könnte mittels molekularer Marker reduziert werden. Dafür sind Kenntnisse über die genetischen Grundlagen der Feuerbrandresistenz in *Malus* spp. und besonders in Apfelmultisorten wichtig.

**Kapitel 1** gibt einen Überblick über die klassische Züchtung, ‘quantitative trait loci’ (QTL) und die Genkartierung sowie die marker-gestützte Selektion in der Apfelmultiszüchtung für Krankheitsresistenzen mit einem Schwerpunkt auf der Feuerbrandresistenz. *Erwinia amylovora*, der Erreger des Feuerbrands, und verschiedene Möglichkeiten seiner Bekämpfung werden ebenfalls präsentiert.

Im **Kapitel 2** wird die QTL-Analyse mit einer F1 Nachkommenschaft von 118 Individuen der Kreuzung ‘Florina’ × ‘Nova Easygro’ anhand zweier bereits vorhandener parentaler genotypischer Karten beschrieben, die auf ‘simple sequence repeats’ (SSRs) und ‘amplified fragment length polymorphism’-Markern (AFLP) basieren. Beide Eltern waren feuerbrandresistent. Zwei signifikante QTLs für Resistenz gegen *E. amylovora* Stamm CFBP 1430 wurden in ‘Florina’ entdeckt; ein QTL lag auf Kopplungsgruppe (LG) 10, der 15.3 % der phänotypischen Variation erklärt, und ein zweiter QTL auf LG 5, der 10.1 % der phänotypischen Variation erklärt. Die Genotypisierung der Pflanzen aus dem Stammbaum von ‘Florina’ mit SSR-Markern, die neben den QTLs lagen, zeigte, dass die QTLs auf LG 10 und 5 von ‘Jonathan’ bzw. ‘Starking’ (eine Mutation von ‘Red Delicious’) vererbt wurden. In ‘Nova Easygro’ konnten nur nicht-signifikante QTLs auf LG 5 und 9 entdeckt werden.

Im **Kapitel 3** wird eine QTL-Analyse über eine F1-Nachkommenschaft mit 92 Individuen einer Kreuzung der Apfelsorten ‘Idared’ (feuerbrandanfällig) und ‘Rewena’ (feuerbrandresistent) beschrieben. Zwei genotypische, minimale Karten wurden mit ‘diversity arrays technology’ (DArT) und SSR-Markern angefertigt, die 44.2 % bzw. 37.1 % des Genoms von ‘Idared’ bzw. ‘Rewena’ abdecken. Ein möglicher QTL für Resistenz gegen *E. amylovora* Stamm Ea 222 wurde auf LG 7 von ‘Idared’ gefunden. Durch Erhöhung der

Deckung des Genoms mit Markern sowie der Markerdichte und -verteilung auf den Kopplungsgruppen von 'Rewena' und 'Idared' könnten weitere QTLs entdeckt werden. Zusammenfassend beschreiben Kapitel 2 und 3, dass die Resistenz gegen Feuerbrand von 'Florina', 'Nova Easygro' und 'Rewena' quantitativ und mit einer oligo- oder polygenischen Grundlage ist, was meistens zu schwachen oder möglicherweise epistatischen QTLs führt.

QTLs, die starke Feuerbrandresistenzen beschreiben, wurden in Wild- und Zierapfelgenotypen wie *Malus × robusta* 'Robusta 5', 'Evereste' und *Malus × floribunda* Klon 821 gefunden. Dennoch ist weder eine fortgeschrittene Zuchtnummer und noch eine Zwischenstufe in der Züchtung vorhanden, welcher diese QTLs trägt und gleichzeitig hohe Frucht- und Anbauqualität zeigt. Vor kurzem wurde basierend auf der transgenen Linie *BpMADS4* T1190 ('Frühe Blüte') eine Züchtungstechnik entwickelt, um die erwähnten QTLs in den domestizierten Apfel einzuführen. **Kapitel 4** behandelt die genetische Kartierung der T-DNA-Integrationsstelle von *BpMADS4* in Apfel auf LG 4.

**Kapitel 5** beschreibt die Nutzung der *BpMADS4*-transgenen Linie T1190 für die Einführung des hoch wirksamen Feuerbrandresistenzlokus Fb\_E, der auf LG 12 des Zierapfels 'Evereste' gefunden wurde, in den domestizierten Apfel. Der starke phänotypische Effekt des Fb\_E-Lokus wurde an einer F1 Nachkommenschaft von T1190 × 'Evereste' mittels künstlicher Inokulation mit *E. amylovora* Stamm CFBP 1430 bestätigt. Vierundzwanzig BC'1 Sämlinge, die infolge der unabhängigen Segregation beider Loci das *BpMDAS4*-Transgen sowie den Fb\_E-Lokus enthielten, konnten zurückgewonnen werden. Mittels SSR-Markern, die gleichmässig über das Apfelgenom verteilt waren, konnten zwei frühblühende BC'1 Sämlinge identifiziert werden, die weniger als 15 % des Genoms von 'Evereste' trugen. Diese beiden frühblühenden BC'1 Sämlinge werden in Folge weiter für die Einführung des Feuerbrandresistenzlokus Fb\_E in 'pre-breeding genotypes' verwendet, die so wenig wie möglich von dem Genom der Resistenz-Donors 'Evereste' enthalten sollen.

Schlussendlich gibt es in **Kapitel 6** eine generelle Diskussion. Die Resultate der QTL-Analyse in den F1-Nachkommenschaften von 'Florina' × 'Nova Easygro' und 'Idared' × 'Rewena' werden im Zusammenhang mit der Züchtung für Feuerbrandresistenz diskutiert. Alternative QTL-Kartierungsstrategien im Pflanzenmaterial des Züchters werden behandelt. Zusätzlich wird das Potential der Hochgeschwindigkeitszüchtung mittels der frühblühenden transgenen Linie *BpMADS4* T1190 im Hinblick auf die Einführung von Resistenzgenen und QTLs in den domestizierten Apfel besprochen.