

The use of different PCR-based technologies to analyse the genetics of apple scab resistance conferred by the resistance genes Vbj and Vf

Doctoral Thesis

Author(s):

Gygax, Michel

Publication date:

2003

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004717054>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 15384

**The use of different PCR-based technologies to analyse the
genetics of apple scab resistance conferred by the
resistance genes *Vbj* and *Vf***

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology, Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Michel Gygax
Dipl. Ing. Agr. ETH

Born April 14th 1962
Citizen of Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruce McDonald, examiner
Dr. Cesare Gessler, co-examiner
Dr. Luca Gianfranceschi, co-examiner

2003

Abstract

Apple scab caused by the fungus *Venturia inaequalis* is the most important disease of apples world-wide. To control this disease in the orchard, up to 20 fungicide applications per growing season are necessary. From an environmental point of view and with respect to the consumers' health, the use of such chemicals is questionable and should be reduced. Although prediction and disease warning models have contribute to optimize the number of fungicides treatments, further progress for their reduction, or even their suppression, can only be performed by the use of apple cultivars carrying a durable apple scab resistance. One promising way to achieve this goal is to select and to breed for apple varieties carrying more than one resistance genes, i.e. to combine or pyramid several resistances in the same genetic background. One prerequisite for such a disease management strategy is the identification of both major or minor resistance genes and molecular markers linked to those genes. To improve breeding efficiency, molecular markers closely linked to the genes of interest are also required, so that each gene can be tracked during the breeding process. Moreover, the availability of molecular markers can be essential for the comprehension of the underlying genetics. Therefore, the aim of this work was to identify genetic markers linked to major scab resistant genes and to provide a better understanding of genetics of the apple scab resistance.

A total of seven molecular markers, including one RAPD, three SCAR and three SSR markers, linked to the resistance gene *Vbj* were identified in a progeny population of A722-7 x Golden Delicious (A x GD). The three SSRs and one SCAR were identified by comparing homologous linkage groups of existing genetic maps. A first linkage map of the genomic region was constructed where *Vbj* was placed 15 cM away from the closest markers. Discarding progeny plants showing genotype-phenotype incongruence (GPI plants), a second map was then constructed. On this second map, *Vbj* mapped at the same position as the marker allele of SSR CH05e03 and flanked from two further markers at 2.4 cM and 4.2 cM, respectively. So, it appears that the identification of GPI plants can be essential for accurate mapping of the gene: only markers closely linked to the gene of interest can be used in breeding program and are suitable for marker assisted breeding (MAS).

Besides GPI plants, precise mapping of resistance genes also depend on accurate phenotyping of the resistance in progeny from controlled crosses. Since it is known that the level of scab resistance given by a major resistance gene can be influenced by minor resistance genes, the homologous region to *Vbj* in Golden Delicious were scanned for modifiers. Owing to the availability of multi-allelic markers of the type *ab x cd*, the haplotype

of each 172 A x GD progeny plants could be determined in the *Vbj* region and in its homologous in Golden Delicious. A significant association between specific marker phenotypes and resistance level of the plants (i.e. phenotype) could be detected by Kruskal-Wallis test statistics and ANOVA under controlled conditions as well as under natural infections. Furthermore, specific marker alleles of Golden Delicious were identified to be associated with a higher resistance level in resistant progenies carrying the resistance gene *Vbj*. This result demonstrated the two parents of a cross can contribute to the level of the resistance. To improve the durability of the resistance, it could be worth full to identify apple selections with major and their corresponding modifier genes.

Breeding efficiency depends also on developing new technologies. Therefore, a new method based on subtractive hybridization technology and called representational difference analysis (RDA) was applied for the first time to the apple genome in order to generate molecular markers closely linked to the apple scab resistance gene *Vf*. Although RDA has previously shown its great potential by targeting three polymorphisms to an interval of less than 1 cM in the mouse genome, none of the DNA fragments identified showed to be closely linked to *Vf*. Only 3 DNA fragments were isolated that identified polymorphisms between the cultivated apple *Malus x domestica* and *Malus floribunda* 821 and among some apple cultivars. One clone however showed to be low-copy and revealed a polymorphism between *Vf*-resistant and susceptible plants, but with loose linkage to *Vf*. The failure of RDA to find specific DNA fragments linked to *Vf* was explained by the complex genome organization of the apple, with the presence of repetitive DNA sequences and the fact that differences between resistance and susceptible loci are probably not very large so that these loci may be similar.

This thesis is a contribution for the development of durable apple scab resistance. Several works were performed to understand the genetic of apple scab resistance and to provide breeders with valuable tools to improve this type of resistance. It could be shown that the resistance to apple scab and to plant diseases in general, is complex. Although DNA technologies are powerful tools to understand the genetic of the resistance and to improve the durability for disease resistance, durable resistance in not easy to achieve. Reduction of pesticide treatments and production of save food will need combined efforts in several research fields like conventional breeding, molecular biology, epidemiology and cultural practices.

Résumé

La tavelure du pommier, provoquée par l'agent pathogène *Venturia inaequalis*, est la maladie la plus importante de cette plante. En général, 10 à 20 traitements fongicides par année sont nécessaires pour contrôler cette maladie. Pour des questions de sécurité alimentaire et de charges environnementales, l'utilisation des produits de traitements des plantes devrait être réduite. Le développement des systèmes de prévision de la maladie a déjà permis une amélioration dans ce sens. Toutefois, une réduction subséquente, voire même la suppression de tels produits, ne peut être obtenue que par la sélection de pommier pourvu d'une résistance durable à la tavelure. Pour atteindre cet objectif, la combinaison de plusieurs gènes de résistance dans le même génotype, c'est-à-dire la formation d'une pyramide de gènes, est une possibilité très prometteuse. Avant de se lancer dans une telle stratégie, il est tout d'abord nécessaire d'identifier les gènes de résistance ainsi que les marqueurs moléculaires associés à ceux-ci. En effet, grâce aux marqueurs moléculaires, les gènes de résistance en question peuvent être suivis durant tout le processus de sélection et l'identification de variétés à plusieurs gènes de résistance devient possible. De plus, les marqueurs génétiques sont déterminants pour une meilleure compréhension génétique de la résistance. Ainsi, l'objectif de ce travail est l'identification de tels marqueurs moléculaires associés aux gènes principaux de résistance à la tavelure et une meilleure compréhension de la génétique de ce type de résistance.

Un total de sept marqueurs moléculaires, dont un RAPD, trois SCAR et trois SSR, liés au gène de résistance *Vbj* ont été identifiés dans la descendance issue du croisement A722-7 x Golden Delicious (A x GD). Les trois SSR et un des SCAR ont été identifiés en comparant les régions homologues présentes sur d'autres cartes de liaisons génétiques. Une première carte de la région autour de *Vbj* fut alors construite. *Vbj* fut placé à 15 cM du marqueur le plus proche. Suite à l'élimination des plantes montrant une incongruité entre leur génotype et leur phénotype (IGP), une seconde carte génétique a pu être établie. Selon cette nouvelle carte, *Vbj* fut placé à la même position que le marqueur SSR CH05e03 et flanqué de deux autres marqueurs situés à 2.4 cM et 4.2 cM. Ainsi, pour une cartographie précise des marqueurs génétiques l'identification de plantes IGP est essentielle. En effet, seul les marqueurs proches d'un gène peuvent être utilisés en sélection assistée par marqueurs (SAM).

La localisation précise d'un gène dépend également de l'évaluation correcte du phénotype des plantes résistantes. Il est en effet connu que le niveau de résistance peut être influencé par des gènes secondaires. Par conséquent, la région homologue de *Vbj* sur Golden Delicious a

été scannée en vue d'identifier l'influence de gènes secondaires. Grâce aux marqueurs multi-alléliques de type *ab x cd*, l'haplotype de chacun des 172 descendants du croisement A x GD a pu être déterminé pour la région homologue à *Vbj* dans Golden Delicious. Une association significative entre marqueurs génétiques et niveau de résistance a été ainsi vérifiée par le test de Kruskal-Wallis et par analyse de variance, aussi bien sous conditions d'infections contrôlées que dans le verger. De plus, des allèles marqueurs spécifiques à Golden Delicious et associés à un niveau de résistance plus élevé ont été identifiés. Ceci montre que les deux parents d'un croisement peuvent contribuer au niveau de la résistance. Ainsi, la durabilité de la résistance pourrait être améliorée en tenant compte de ces aspects.

L'efficacité du travail de sélection peut finalement être améliorée par l'emploi de nouvelles technologies. C'est pourquoi une nouvelle méthode basée sur l'hybridation soustractive de deux ADN différents et appelée « representational difference analysis » (RDA) a été appliquée pour la première fois au génome du pommier. Le but étant la détection de marqueurs moléculaires associés au gène de résistance *Vf*. Bien que la technique du RDA ait montré son efficacité sur le génome de la souris, aucun fragment d'ADN isolé à l'aide de cette technique s'est révélé être proche de *Vf*. Seul trois fragments d'ADN ont décelé un polymorphisme entre le genre *Malus x domestica* et *Malus floribunda* 821, ainsi qu'entre certaines variétés du genre *Malus x domestica*. Un seul clone a pu finalement être identifié comme peu répétitif et faiblement associé à *Vf*. Dans le cas du pommier, l'échec de la technique RDA a été attribuée à la complexité du génome, au nombre élevé de séquences répétitives et au fait que la différence entre les loci de résistance et de susceptibilité est probablement moindre que prévu, si bien que ces loci pourraient être similaires.

Cette thèse représente une contribution au développement d'une résistance durable à la tavelure. Plusieurs travaux ont été entrepris pour mieux comprendre la génétique de la résistance du pommier à la tavelure et pour fournir des outils de sélection plus performants. Il en ressort que ce type de résistance est complexe. Même si les techniques de biologie moléculaires fournissent des outils puissants permettant une sélection plus efficace, le développement de variété à résistance durable nécessitera des efforts conjugués dans différents domaines de recherche, tels que la sélection conventionnelle, la biologie moléculaire, l'épidémiologie et l'amélioration des techniques culturales.