

DISS. ETH Nr.: 18568

**MAP-BASED CLONING OF THE *Rvi15 (Vr2)* APPLE  
SCAB RESISTANCE GENE**

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH**

For the degree of  
**Doctor of science ETH Zürich**

Presented by

**Paolo Galli**

Dipl. Bot. Universität Zürich  
Born February 16th, 1979  
Citizen of Switzerland, Ticino

Accepted on the recommendation of

Prof. Ph.D. Cesare Gessler, examiner  
Prof. Ph.D. Bruce McDonald, co-examiner  
Dr. Ir. Henk J. Schouten, co-examiner  
Ph.D. Andrea Patocchi, co-examiner

2009

## ABSTRACT

Apple scab caused by the fungal pathogen *Venturia inaequalis*, is one of the most common diseases in cultivated apple (*Malus x domestica* Borkh.). Scab is controlled with many applications of fungicides which generate ecological and agronomical concerns and high economical costs to the growers. Many apple scab resistances have been found in wild *Malus* species. Sixteen major resistance genes against apple scab were recently described and mapped. One of these is found in GMAL 2473 and was named *Rvi15 (Vr2)*. This major resistance gene elicits a hypersensitive reaction (pinpoint pits) visible on young leaves, 7 to 9 days after pathogen inoculation and under optimal conditions. Polymorphic molecular markers, linked to the *Rvi15 (Vr2)* resistance, have been developed and mapped at first in a 150 individuals population, which derived from a cross between the susceptible 'Idared' and the resistant GMAL 2473. Further, the same markers were mapped in a 989 individuals population, progeny of a cross 'Golden Delicious' x GMAL 2473 in order to provide a detailed genetic map of the *Rvi15 (Vr2)* region. The *Rvi15 (Vr2)* resistance resulted located on the linkage group 2 and elicited by a single or closely linked genes. The ARGH17 marker, derived from a resistance gene homolog (RGH) sequence, was found to be the closest molecular marker to the *Rvi15 (Vr2)* gene (0.3 cM). Starting from this marker, a first chromosome walking took place using the BAC library of 'Florina' (not carrying the *Rvi15 (Vr2)* resistance gene). A single BAC clone, 36I17, was found to span completely the *Rvi15 (Vr2)* homolog region. This clone was completely sequenced to develop additional polymorphic markers tightly linked with the resistance and to saturate the *Vr2* region. Ten markers were developed and mapped. The two closest markers, ARGH17 and TNL1 (also a RGH sequence derived marker), were found to bracket the *Rvi15 (Vr2)* in 0.5 cM. Therefore, these markers were used as starting point for the construction of a BAC contig spanning the *Rvi15 (Vr2)* resistance locus. For this purpose, three BAC libraries were constructed using DNA of GMAL 2473. Together, the three BAC libraries provided 11.3 equivalents of the apple haploid genome (769 Mbp/1C *Malus x domestica*). The libraries were screened with TNL1 and ARGH17 markers. The positive BAC clones were assembled in a single contig spanning the *Rvi15 (Vr2)* resistance locus. Two additional screenings of the libraries were carried out with internal markers to the BAC contig constructed. This allowed the isolation of additional BACs to enrich the contig and provided other polymorphic markers

developed on the BAC-insert ends of the new BACs. The ARGH17 and the new developed 77G20RP were found to be the closest markers to the *Rvi15* (*Vr2*) on the physical map. In addition, two markers, 43M10RP and 41A24T7, were found to co-segregate with the resistance. The BAC clone 32A4, carrying both ARGH17 and 77G20RP markers, was found to span alone the *Rvi15* (*Vr2*) resistance locus. Therefore, this BAC clone was completely sequenced allowing identifying the sequence of 48.6 kb going from ARGH17 to 77G20RP. This sequence was analyzed for the presence of open reading frames (ORF) that shared homology to characterized proteins. Three putative genes within the TIR-NBS-LRR structure – typical of the greatest class of defined resistance genes - were found and called: *Vr2-A*, *Vr2-B* and *Vr2-C*. *Vr2-A* was found exactly on the ARGH17 extremity of the sequence, while *Vr2-B* and *Vr2-C* are internal to the region. RT-PCR analysis was performed on part of the ORFs and proved the transcription for all the three genes. Therefore, the homology to resistance genes previously characterized, the genetic map position and the demonstrated transcription of the genes suggests that one out of the three genes could be the *Rvi15* (*Vr2*) resistance gene.

## RIASSUNTO

La ticchiolatura è la più importante malattia fungina del melo (*Malus x domestica* Borkh.) ed è causata dal patogeno *Venturia inaequalis*. Questa malattia viene controllata principalmente con numerose applicazioni di fungicidi che sono causa di elevati costi economici nella produzione e di preoccupazioni di carattere ambientale e agronomico. Alcune specie selvatiche di melo si sono rivelate ottime fonti di resistenze alla ticchiolatura. Dodici resistenze, con posizione genomica conosciuta, sembrano essere regolate da un singolo gene e sono state caratterizzate secondo il fenotipo che conferiscono al melo dopo l'inoculazione col patogeno. Una di esse, chiamata *Rvi15* (*Vr2*), è stata trovata in GMAL 2473. La resistenza *Rvi15* (*Vr2*) è identificabile dopo 7-9 giorni d'incubazione sottoforma di una piccola depressione sulla superficie della foglia (reazione ipersensibile). Una mappa genetica della regione di *Rvi15* (*Vr2*) è stata dapprima sviluppata usando una popolazione di 150 individui ottenuti da un incrocio tra la varietà suscettibile 'Idared' e GMAL 2473 usando marcatori strettamente associati al gene. Una nuova popolazione di 989 individui, derivanti dall'incrocio tra 'Gloden Delicious' e GMAL 2473, è stata analizzata con gli stessi marcatori per migliorare la precisione della mappa genetica. ARGH17, un marcatore sviluppato da una sequenza omologa a geni di resistenza, è risultato il marcatore più vicino al gene (a 0.3 cM da *Rvi15* (*Vr2*)). Da questo marcatore è stato dapprima effettuato un "chromosome walking" usando una genoteca BAC di melo costruita con DNA di 'Florina' (non contenente il gene di resistenza *Rvi15*). Un singolo clone BAC (36I17) è stato sufficiente per coprire completamente la regione omologa di *Rvi15* (*Vr2*) in 'Florina'. Il BAC 36I17 è stato sequenziato completamente al fine di sviluppare marcatori polimorfici strettamente associati alla resistenza e saturare la regione di *Rvi15* (*Vr2*). Dieci nuovi marcatori sono stati mappati su entrambe i lati di *Rvi15* (*Vr2*). ARGH17 e TNL1 (altro marcatore con omologia a geni di resistenza conosciuti) sono risultati i più vicini al gene, racchiudendolo in 0.5 cM. Questi due marcatori sono stati i punti di partenza per il "chromosome walking" con cloni BAC di GMAL 2473 utilizzati al fine di costruire una mappa fisica della regione genomica che conferisce la resistenza *Rvi15* (*Vr2*). A questo scopo, si sono costruite tre genoteche BAC di GMAL 2473 per una copertura equivalente a 11.3 volte il genoma aploide del melo (769 Mbp/1C *Malus x domestica*). Le tre genoteche sono state analizzate per trovare i cloni BAC contenenti i marcatori ARGH17 e TNL1. I cloni BAC isolati si sono rivelati sufficienti per la costruzione della mappa fisica completa della regione di *Rvi15* (*Vr2*). Due altre analisi delle

genoteche BAC sono state effettuate con marcatori interni alla mappa fisica costruita per isolare altri cloni BAC. Questo ha permesso di trovare altri cloni BAC della regione e sviluppare nuovi marcatori polimorfici. I marcatori ARGH17 e 77G20RP racchiudono *Rvi15* (*Vr2*) in 0.5 cM, mentre i marcatori 43M10RP e 41A24T7 co-segregavano con il gene. ARGH17 e 77G20RP sono entrambi presenti nel clone BAC 32A4 che copre completamente la regione *Rvi15* (*Vr2*). Per questo motivo, il clone BAC 32A4 è stato sequenziato totalmente permettendo l'identificazione della sequenza di 48.6 kb delimitata da ARGH17 e 77G20RP. In questa sequenza si è poi cercato degli open reading frames (ORF) aventi omologia con proteine conosciute. Tre geni putativi (*Vr2-A*, *Vr2-B* e *Vr2-C*) sono stati individuati. *Vr2-B* e *Vr2-C* sono situati all'interno dei 48.6 kb, mentre *Vr2-A* è posizionato esattamente su un'estremità della regione. *Vr2-A*, *Vr2-B* e *Vr2-C* hanno una struttura omologa a geni di resistenza con la struttura TIR-NBS-LRR (Toll/Interleukin-1 receptor, nucleotide binding site, leucine rich repeat). Tramite RT-PCR si è potuto stabilire che tutti e tre gli ORF sono trascritti. L'omologia della struttura dei tre candidati, la loro posizione nella mappa genetica e il fatto che i tre geni sono trascritti rende molto probabile che uno dei geni candidati sia *Rvi15* (*Vr2*).