



DGG-Proceedings, Vol. 6, 2016

Short Communications of the WeGa Network 2010-2015

Peer Reviewed

Editorial Board

Dirksmeyer, Walter *Braunschweig*
Flachowsky, Henryk *Dresden*
Förster, Nadja *Berlin*
Geyer, Martin *Potsdam*
Hardeweg, Bernd *Hannover*
Mibus-Schoppe, Heiko *Geisenheim*
Michaelis, Gerlinde *Bad-Zwischenahn*
Rath, Thomas (Editor in Chief) *Osnabrück*
Richter, Ellen *Braunschweig*
Thomas, Jens *Osnabrück*
Winkelmann, Traud *Hannover*
Zinkernagel, Jana *Geisenheim*

Andreas Peil*, Erik Szentgyörgyi, Isabelle Vogt, Detlef Ulrich, Magda-Viola Hanke,
Werner Dierend

Markergestützte Selektion von Rvi6-Schorfresistenz in Apfel (*Malus × domestica*)
und Analyse von Qualitätsparametern

*Corresponding Author:

Andreas Peil
Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Züchtungsforschung an Obst
Pillnitzer Platz 3a
01326 Dresden

Email: andreas.peil@julius-kuehn.de

Markergestützte Selektion von *Rvi6*-Schorfresistenz in Apfel (*Malus × domestica*) und Analyse von Qualitätsparametern

Andreas Peil¹, Erik Szentgyörgyi¹, Isabelle Vogt¹, Detlef Ulrich², Magda-Viola Hanke¹,
Werner Dierend³

¹Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,
Institut für Züchtungsforschung an Obst, Dresden

²Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Quedlinburg

³Hochschule Osnabrück, Fakultät Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur,
Osnabrück

1. Einleitung, Stand des Wissens, Zielsetzung

Schorf gehört neben Mehltau, *Podosphaera leucotricha*, zu den wichtigsten pilzlichen Krankheitserregern im Apfelanbau. Das Schorfresistenzgen *Rvi6* (*Vf* nach alter Nomenklatur) wird aus *Malus floribunda* 821 (Mf821) monogen vererbt (Gessler et al. 2006), die Ausprägung der Resistenz jedoch von zwei „Modifying Loci“ beeinflusst wird (Gessler 1989). Ein zweites Schorfresistenzgen *Rvi7* aus Mf821 wiesen Bénaouf and Parisi (2000) mit zwei Isolaten von Rasse 1 nach. Zurzeit sind 17 Schorfresistenzgene bekannt, von deren Donoren ein Testersortiment zur Identifizierung von Schorffrassen bzw. der Wirt-Pathogen-Interaktionen entwickelt wird (Bus et al. 2011). Mittlerweile haben sich Rassen von *V. inaequalis* verbreitet, die Schorfresistenzgene überwinden. Rasse 6 durchbricht die *Rvi6*-Resistenz in einigen Nachkommen von Mf821 (Parisi et al. 1993). Untersuchungen von Parisi et al. (2004) zur Verbreitung der Rassen 6 und 7, die beide *Rvi6* überwinden können, zeigen deren Verbreitung vor allem in Norden Europas.

Vinatzer et al. (2004) entwickelten zwei eng gekoppelte SSR-Marker für *Rvi6*, CH-Vf1 und CH-Vf2. Nach Gessler et al. (2006) eignet sich aufgrund der engen Kopplung zu *Rvi6* vor allem CH-Vf1 (0,0 cM) für eine markergestützte Selektion. Inzwischen wurde der *Rvi6*-Lokus isoliert (Patocchi et al. 1999, Xu and Korban 2002) und ein Cluster von mindestens vier Genen, die für „receptor-like proteins“ kodieren, konnte identifiziert werden. Entsprechend ihrer hohen Homologie zu Genen aus der Resistenzgenfamilie Cf (*Cladosporium fulvum*) wurden diese Gene als *HcrVf1-4* bezeichnet (Vinatzer et al. 2001). Transformationsexperimente mit *HcrVf2* wiesen nach, dass dieses Gen Schorfresistenz induziert (Belfanti et al. 2004) und auch rassenspezifisch reagiert (Silfverberg-Dilworth et al. 2005). Vanblaere et al. (2011) entwickelten durch Transformation von ‘Gala’ mit *HcrVf2* den ersten cisgenen Apfel, der schorfresistent ist.

Obwohl die *Rvi6*-vermittelte Resistenz durchbrochen ist, haben *Rvi6*-Apfelsorten ihre Berechtigung im Apfelanbau, da bei geeigneten Kultivierungsmaßnahmen der Fungizideinsatz deutlich verringert werden kann, und die Resistenz überwindende Schorffrasse nicht auf allen Standorten verbreitet ist. Ziele dieser Arbeit waren die markergestützte Selektion von *Rvi6*-Zuchtklonen und die Verifizierung der Resistenz an ausgewählten Genotypen durch künstliche Inokulation mit Schorf unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus. Durch die Widerstandsfähigkeit gegenüber Schorf dürfen jedoch die qualitätsbestimmenden Parameter des Apfels nicht negativ beeinflusst werden.

Aus diesem Grund wurden Nachkommen aus Kreuzungen mit resistenten Elternsorten auf Parameter der Fruchtqualität und auf Aromaprofile untersucht.

2. Material und Methoden

Für die Phänotypisierung von Schorf wurden die Rassen 104 (kann *Rvi6* nicht überwinden) und D42 (kann die *Rvi6*-Resistenz brechen) benutzt. Das Pflanzenmaterial bestand aus Nachkommen von elf Kreuzungen (s. Tabelle 1) mit *Rvi6*-resistenten Eltern. Für die künstlichen Inokulationen wurden Nachkommen und Kontrollpflanzen auf die Unterlage M.9 veredelt und im Gewächshaus inokuliert. Nach ca. 28 Tagen wurde der Befall nach Chevalier et al. (1991) bonitiert.

DNA wurde nach Protokoll mit dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Qiagen, Hilden) isoliert. Für die molekulare Detektion von *Rvi6* wurde der SSR-Marker CH-Vf1 benutzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem LiCOR IR2 DNA Sequenzer, LI-COR Biotechnology – GmbH Bad Homburg).

Die Früchte von Nachkommen und Elternsorten wurden analytisch (Brix, Säuregehalt, Festigkeit, Gewicht, Saftgehalt) mit der Pimprenelle (UP GmbH, Ibbenbüren) evaluiert. Aromakomponenten des Apfels wurden mittels HS-SPME (head-space solid phase micro-extraction method) gaschromatographisch bestimmt.

3. Ergebnisse

Die künstliche Inokulation der *Rvi6*-Nachkommen mit der inkompatiblen Rasse 104 ergab an 47 von 48 keinen Befall mit Schorf. Die mitgeführten kompatiblen Kontrollsorten ‘Gala’ (Schorfresstester für *Rvi0*) und ‘Golden Delicious’ (Schorfresstester für *Rvi1*) zeigten erwartungsgemäß Schorfbefall.

Sieben der 48 mit D42 inokulierten Zuchtklone zeigten keinen Befall mit Schorf. Die Kontrollsorten ‘Retina’, ‘Dalinbel’ (beide *Rvi6*), ‘Gala’, ‘Golden Delicious’ und der Rasetester für *Rvi6*, ‘Priscilla’, wiesen im Gegensatz zu Mf821 Schorfbefall auf. Tabelle 1 zeigt die untersuchten Populationen und die Ergebnisse der markergestützten Selektion.

Tabelle 1: Ergebnisse der markergestützten Selektion auf *Rvi6* an elf ausgewählten Populationen (r - *Rvi6* resistent)

| Kreuzungen | nicht resistent | | resistent | | Kreuzungen | nicht resistent | | resistent | |
|----------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>rvi6</i> | <i>rvi6</i> | <i>rvi6</i> | <i>Rvi6</i> | | <i>rvi6</i> | <i>rvi6</i> | <i>rvi6</i> | <i>Rvi6</i> |
| Braeburn x Topaz (r) | 4 | | 2 | - | Pinova x Topaz (r) | 1 | | - | - |
| Dalinbel (r) x Gala | 53 | | 41 | - | Topaz (r) x Dalinbel (r) | 8 | | 8 | 1 |
| Dalinbel (r) x Retina (r) | 8 | | 32 | 4 | Topaz (r) x Gala | 2 | | 2 | - |
| Dalinbel (r) x Santana (r) | - | | 4 | 3 | Topaz (r) x Golden Delicious | 9 | | 7 | - |
| Dalinbel (r) x Topaz (r) | 4 | | 12 | - | Topaz (r) x Pinova | 5 | | 6 | - |
| Kanzi x Topaz (r) | 23 | | 35 | - | | | | | |

Von 274 untersuchten Nachkommen wiesen 157 Nachkommen das *Rvi6*-Gen auf, in insgesamt acht Nachkommen von drei Kreuzungen (*Rvi6* × *Rvi6*) liegt es homozygot vor. Erwartet wurden 154 Nachkommen mit und 120 Nachkommen ohne *Rvi6*.

Die analytische Qualität von Nachkommen zehn ausgewählter Populationen wurde mit der Pimprenelle bestimmt. Der durchschnittliche Brix-Wert war bei allen zehn Populationen relativ gleich hoch. Der durchschnittliche Säuregehalt war bei den Populationen 'Braeburn' × 'Topaz', 'Dalinbel' × 'Topaz' und 'Topaz' × 'Dalinbel' höher als 12 g/l, was bei einem durchschnittlichen Brix von 12 bis 14° einen sehr säurebetonten Geschmack ergibt. Für die Kreuzung 'Pinova' × 'Topaz' wurde der geringste, für die reziproke Kreuzung der höchste Saftgehalt festgestellt. Die schwersten Äpfel produzierten die Nachkommen der Kreuzung 'Dalinbel' × 'Topaz' und die leichtesten Äpfel gingen aus der Kreuzung 'Dalinbel' × 'Gala' hervor. Die durchschnittliche Festigkeit war mit mehr als 8 kg/cm² 'Braeburn' × 'Topaz' und 'Dalinbel' × 'Gala' am höchsten und bei den Äpfeln der Population 'Pinova' × 'Topaz' mit knapp über 5 kg/cm² am geringsten. Mittels GC-Analyse wurden 21 Aromakomponenten des Apfels bestimmt. (1: Propylacetat, 2: Ethyl-2-methylbutanoat, 3: Butylacetat, 4: 2-Methyl-1-butylacetat, 5: 1-Butanol, 6: Pentylacetat, 7: 2-Methyl-1-butanol, 8: Butyl-butanoate/(E)-2-Hexenal, 9: Butyl-2-methylbutanoat, 10: 1-Pentanol, 11: Propylhexanoat, 12: Hexanol, 13: 3-Oktanol, 14: Butyl hexanoat, 15: Hexyl-2-methylbutanoat/Hexylbutanoat, 16: 1-Heptanol, 17: Hexylhexanat, 18: p-Allylanisol/Estragolexanoat, 19: a-Farnesen, 20: b-Damascenon, 21: Hexylacetate, S: Interner Standard).

In Abbildung 1 sind die durchschnittlichen Verteilungen der 21 Aromakomponenten in neun untersuchten Populationen zu sehen.

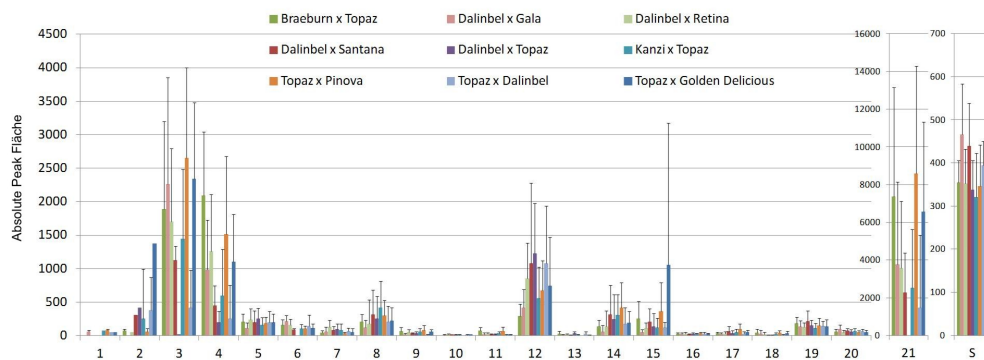


Abbildung 1: Analyse von relevanten Stoffen des Apfelaromas von neun Populationen mittels Gaschromatographie

Alle Aromakomponenten wurden im Vergleich zum internen Standard (2,6-Dimethyl-6-hepten-5-ol-2) bestimmt. Die unterschiedliche Ausprägung einzelner Aromakomponenten je nach Population wird in Abbildung 1 deutlich. Besonders ins Auge fällt die relativ hohe Konzentration von Ethyl-2-methylbutanoat und Hexyl-2-methylbutanoat/Hexylbutanoat in der Kreuzung 'Topaz' × 'Golden Delicious' und das Fehlen von Butylacetat in der Kreuzung 'Dalinbel' × 'Topaz'.

Die Konzentration jeder Aromakomponente wurde nach Vorhandensein von *Rvi6* bzw.

dessen Fehlen über alle Populationen gemittelt und auf signifikante Unterschiede untersucht. Eine signifikant unterschiedliche Expression zeigten Hexanol (46,8 % höher in *Rvi6*-Nachkommen), Butylacetat (39,0 % niedriger in *Rvi6*-Nachkommen) und p-Allylanisol (41,3% niedriger in *Rvi6*-Nachkommen).

4. Diskussion

Die phänotypischen Bonituren von *Rvi6*-Nachkommen auf Schorfbefall nach künstlicher Inokulation mit Rasse 104 bestätigen die Wirksamkeit des *Rvi6*-Schorfresistenzgens. Ein Zuchtklon, für den *Rvi6* molekular bestimmt worden war, zeigte jedoch Befall nach Inokulation mit Rasse 104. Dies kann auf eine Verwechslung bei der Markeranalyse oder der Reiser für die Veredelung zurückzuführen sein. Nach Inokulation mit der *Rvi6*-brechenden Rasse D42 zeigten sieben der 48 untersuchten Proben keinen Schorfbefall. Der Grund können ungünstige Bedingungen bei der Inokulation (zu alte Blätter) sein. Ein Vorhandensein zusätzlicher Resistenzfaktoren kann ausgeschlossen werden, da die Eltern anfällig für *Rvi6* waren. Die Segregation von *Rvi6* in den untersuchten Populationen entspricht einer 1 : 1 Verteilung in Populationen mit einem *Rvi6*-Elter und 3 : 1, wenn beide Eltern *Rvi6*-resistent sind. Insgesamt konnten 157 Nachkommen mittels markergestützter Selektion mit dem SSR-Marker CH-Vf1 selektiert werden.

Die Untersuchungen auf die qualitativen Fruchtparameter Säure-, Saftgehalt, Brix, Festigkeit und Gewicht wiesen für die unterschiedlichen Populationen keine großen Unterschiede auf. Ein Einfluss eines Elters auf die Ausprägung eines Merkmals ließ sich nicht nachweisen. Die Varianzen waren jeweils sehr hoch, so dass für eine Selektion auf Fruchtqualität natürlich jeweils die Daten eines Zuchtklons angeschaut werden müssen. Dunemann et al. (2009) beschrieben die genetische Kartierung von 50 Aroma-QTL für 27 verschiedene Aromastoffe. Die Verteilung von 21 Schlüsselstoffen für die Ausbildung des Apfelaromas wurde in dieser Arbeit untersucht. Es ergaben sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Aromas für die untersuchten Populationen, jedoch konnte auch hier die Ausprägung des Aromas nicht auf die Eltern zurückgeführt werden.

Eine Analyse der Unterschiede in der Konzentration von Aromasubstanzen in *Rvi6*-Nachkommen und Nachkommen ohne *Rvi6* ergab für drei Aromastoffe signifikante Unterschiede, die jedoch in den einzelnen Populationen nicht wiedergefunden werden konnten.

5. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, *Rvi6*-resistente Apfelklone zu selektieren und die Genotypen hinsichtlich ihrer analytischen Fruchtqualitätsparameter und der Zusammensetzung der 21 Schlüsselkomponenten des Apfelaromas zu beschreiben. Damit wird dem Züchter Material an die Hand gegeben, um geeignetes Material für weitere Kreuzungen zu selektieren.

6. Literatur

- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B. A., Gianfranceschi, L., Gessler, C. and Sansavini, S., 2004: The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 886-890.
- Bénaouf, G. and Parisi, L., 2000: Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology* 90, 236-242.
- Bus, V.G.M., Rikkerink, E.H.A., Caffier, V., Durel, C.-E. and Plummer K.M., 2011: Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of Phytopathology* 49, 391-413.
- Chevalier, M., Lespinasse, Y. and Renaudin, S., 1991: A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* 40, 249-256.
- Dunemann, F., Ulrich, D., Boudichevskaia, A., Grafe, C. and Weber, W.E., 2009: QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' × 'Prima'. *Molecular Breeding* 23, 501-521.
- Gessler, C., 1989: Genetics of the interaction *Venturia inaequalis*-*Malus*: the conflict between theory and reality. *IOBC-WPRS-Bulletin* 12, 168–190.
- Gessler, C., Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S. and Gianfranceschi, L., 2006: *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 473-503.
- Parisi, L., Fouillet, V., Schouten, H. J., Groenwold, R., Laurens, F., Didelot, F., Evans, K., Fischer, C., Gennari, F., Kemp, H., Lateur, M., Patocchi, A., Thissen, J., and Tsipouridis, C., 2004: Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* 663, 107–114.
- Patocchi, A., Vinatzer, B. A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H. B., Sansavini, S. and Gessler, C., 1999: Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene Vf. *Molecular and General Genetics* 262, 884-891.
- Silfverberg-Dilworth, E., Besse, S., Paris, R., Belfanti, E., Tartarini, S., Sansavini, S., Patocchi, A. and Gessler, C., 2005: Identification of functional apple scab resistance gene promoters. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 1119-1126.
- Vanblaere, T., Szankowski, I., Schaart, J., Schouten, H., Flachowsky, H., Broggini, G.A.L. and Gessler, C., 2011: The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology* 154, 304-311.
- Vinatzer, B. A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H. B., Gessler, C. and Sansavini, S., 2001: Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 508-515.
- Vinatzer, B. A., Patocchi, A., Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S. and Gessler, C., 2004: Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding* 123, 321-326.