

Zadanie 70. Indukowanie zmienności genetycznej jabłoni na drodze poliploidyzacji *in vitro* oraz ocena fenotypowa i genetyczna uzyskanych poliploidów w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych

Celem badań było uzyskanie tetraploidów o nowych cechach użytkowych, w tym zwiększonej odporności na porażenie przez groźne patogeny jabłoni - *Erwinia amylovora* (sprawcy zarazy ogniowej) oraz *Venturia inaequalis* (sprawcy parcha jabłoniowego). W poprzednich latach badań, dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro*, uzyskano liczne tetraploidy sześciu odmian jabłoni 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', Co-op 32, 'Redchief' i 'Sander'. W roku 2020 celem badań była ocena uzyskanych autotetraploidów po względem cech morfologicznych, parametrów fizjologicznych oraz podatności na ww. patogeny, a także poznanie mechanizmu molekularnego zwiększonej odporności na parcha jabłoni tetraploidów 'Free Redstar'. Prace prowadzono w ramach 5 tematów badawczych.

Temat badawczy 1. Ocena *in vitro* podatności na porażenie przez *Erwinia amylovora* uzyskanych tetraploidów wytypowanym testem w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych.

Wykorzystano wyizolowany z jabłoni szczep *E. amylovora* nr 659 o średniej wirulencji. Pędy inokulowano bakteriami poprzez usunięcie wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w inokulum (10^5 jtk/ml), następnie inkubowano je przez 6 tyg. na pożywce do namnażania, wykonując cotygodniowe obserwacje stopnia porażenia. Testowano 24 genotypy tetraploidalne wykazujące w poprzednich testach mniejszy stopień porażenia patogenem, wyselekcjonowane dla 5 odmian ('Redchief', 'Gala Must', 'Free Redstar', 'Pinova' i Co-op 32 - 'Pristine'), w porównaniu do diploidalnych genotypów wyjściowych, a także odmiany referencyjnej 'Idared' o wysokiej podatności na zarazę ogniową. U dwóch odmian 'Gala Must' i 'Pinova', obserwowano po 2 klony tetraploidalne, które wykazywały istotnie mniejszy stopień porażenia pędów przez *E. amylovora* w porównaniu do odmiany wyjściowej i/lub odmiany referencyjnej. Natomiast u 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Co-op 32' niemal wszystkie obserwowane klony wykazały istotnie niższy stopień porażenia pędów; w sumie w bieżącym roku potwierdzono istotnie mniejszy stopień porażenia dla 13 genotypów 5 odmian.

Temat badawczy 2. Ocena efektywności ukorzeniania i aklimatyzacji w warunkach *ex vitro* roślin klonów tetraploidalnych

Mikrosadzonki 7 genotypów tetraploidalnych odmian 'Free Redstar' i Co-op 32 oraz 2 diploidalnych odm. wyjściowych i referencyjnych ukorzeniano stosując metodę bezpośredniego ukorzeniania *ex vitro*. U klonów tetraploidalnych ukorzeniło się *ex vitro* średnio 77,7% pędów. Jednakże w okresie dalszych 6 tyg. (po 12 tyg. od posadzenia) część roślin zamarała i w rezultacie uzyskano od 4 do 7 roślin dla klonów tetraploidalnych, średnio 29,9% aktywnie rosnących roślin. Zapewniło to jednak wystarczającą liczbę roślin do dalszych badań. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, średnia efektywność ukorzeniania i aklimatyzacji tetraploidów – 29,9% była niższa niż diploidów – 38,1%. Wszystkie ukorzenione rośliny przeznaczono do testowania podatności na parcha i do analiz molekularnych.

Temat badawczy 3. Ocena zmian genetycznych/epigenetycznych uzyskanych tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych

Badano molekularny mechanizm zwiększonej odporności na parcha jabłoni u tetraploidów 'Free Redstar'. W badaniach wykorzystano neotetraploidy ww. odmiany jabłoni wykazujące wysoki stopień odporności na parcha jabłoni (*V. inaequalis*) oraz ich diploidalny genotyp wyjściowy - odmianę względnie odporną na tę chorobę. Badania realizowano w ramach 2 zadań.

W zadaniu 1. wykonano analizę obecności czterech genów odporności na parcha: *Rvi7*, *Rvi8*, *Rvi14* oraz *Rvi17* u trzech tetraploidów 'Free Redstar' (FR4x-1, FR4x-2, FR4x-3) wykazujących całkowitą odporność na parcha w testach szklarniowych, w porównaniu z genotypem diploidalnym 'Free Redstar' oraz genotypem wrażliwym 'Idared'. Wyniki badań potwierdziły obecność trzech genów *Rvi8*, *Rvi14* oraz *Rvi17*, zarówno u diploida, jak i u

wszystkich tetraploidów. Przy czym u tetraploidów wykryto znacznie większe ilości produktów amplifikacji DNA w porównaniu do diploida dla ww. genów.

W zadaniu 3. przeprowadzono analizę ekspresji trzech genów *PR1*, *CDPK* oraz *MPK4* podczas infekcji *V. inaequalis* u jednego genotypu tetraploidalnego 'Free Redstar' i diploida metodą real-time PCR. W porównaniu do diploidalnej odmiany wyjściowej, u tetraploida wykazano znaczne zwiększenie poziomu ekspresji genów odporności 2-12-krotne w 2 lub 7 dniu po inokulacji *V. inaequalis* w zależności od genu.

Temat badawczy 4. Ocena morfologiczna oraz parametrów fizjologicznych wytypowanych tetraploidów w odniesieniu do genotypów wyjściowych

Obserwacjom poddano drzewka 6 odmian ('Free Redstar', 'Gala Must', 'Redchief', 'Pinova', 'Sander' i Co-op 32), diploidy i tetraploidy, własnokorzeniowe i szczepione. Poliploidyzacja jabłoni spowodowała wyraźną zmianę fenotypu szczególnie widoczną u roślin własnokorzeniowych: tetraploidy były znacznie niższe, miały mniejsze liście i w kilku przypadkach niższą aktywność fotosyntetyczną niż diploidy. Tetraploidy jabłoni szczepione na podkładce M9 charakteryzowały się większym wigorem niż własnokorzeniowe - wskazywały na to wyraźnie mniejsze różnice lub brak różnic pomiędzy tetraploidami i diploidami w wysokości pędów, wielkości liści i aktywności fotosyntetycznej. W przeciwieństwie do obserwowanego w pierwszym sezonie uprawy u młodych własnokorzeniowych tetraploidów wyższego niż u diploidów natężenia transpiracji, w dwóch następnych latach uprawy u tetraploidów szczepionych na podkładce M.9 obserwowano porównywalne lub niższe natężenie transpiracji. Wskazuje to na bardziej oszczędną gospodarkę wodną tetraploidów w porównaniu do diploidów.

Temat badawczy 5. Ocena podatności uzyskanych poliploidów na porażenie przez *Venturia inaequalis* w warunkach szklarniowych.

Rośliny 28 genotypów tetraploidalnych 6 odmian inokulowano zawiesiną zarodników *V. inaequalis* o koncentracji ok. 10^5 zarodników/ml, umieszczono na 48 godzin w warunkach wysokiej wilgotności powietrza, następnie przenoszono do standardowych warunków szklarniowych. Ocenę porażenia liści tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych oraz wrażliwej odmiany referencyjnej 'Lobo' przeprowadzono po 4 tyg. od inokulacji przy użyciu 5-stopniowej skali. Podobnie jak w 2017, 2018 i 2019 r., w 2020 r. żadna z roślin tetraploidalnych 'Free Redstar' nie wykazywała objawów porażenia, podczas gdy stopień porażenia dla odmiany wyjściowej oceniono na 2,67. Z kolei u odmiany 'Pinova', spośród 3 badanych znaleziono 1 klon tetraploidalny, wykazujący istotnie mniejsze porażenie przez patogen. Spośród 5 klonów tetraploidalnych odmiany 'Sander', 2 klony nie wykazały oznak porażenia, odmiana wyjściowa była porażona w minimalnym stopniu – genotypy te istotnie różniły się od wrażliwej na parcha odmiany 'Idared'. U odmiany 'Redchief', u której badano 9 klonów tetraploidalnych, u 5 z nich w ogóle nie stwierdzono porażenia liści, u pozostałych stopień porażenia liści był podobny do obserwowanego u diploida jednak istotnie mniejszy w stosunku do 'Idared'.

Wnioski

1. Mikrosadzonki tetraploidów jabłoni mają słabsze zdolności do ukorzeniania i aklimatyzacji w porównaniu do ich diploidalnych odpowiedników.
2. Podobnie jak w poprzednim roku, tetraploidy jabłoni szczepione na podkładce M.9 charakteryzują się większym wigorem niż własnokorzeniowe. Wskazują na to wyraźnie mniejsze różnice lub brak różnic pomiędzy tetraploidami i diploidami szczepionymi w wysokości pędów, wielkości liści i w większości przypadków - aktywności fotosyntetycznej. Natomiast u roślin własnokorzeniowych, tetraploidy są znacznie niższe i w kilku przypadkach charakteryzują się niższą aktywnością fotosyntetyczną niż diploidy.

3. W przeciwieństwie do obserwowanego w pierwszym sezonie uprawy u młodych własnokorzeniowych tetraploidów wyższego niż u diploidów natężenia transpiracji, w dwóch następnych latach uprawy u tetraploidów szczepionych na podkładce M.9 obserwowano porównywalne lub niższe natężenie transpiracji. Wskazuje to na bardziej oszczędną gospodarkę wodną tetraploidów w porównaniu do diploidów.
4. Na podstawie opracowanych w poprzednich latach testów *in vitro* podatności na porażenie przez *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej, w bieżącym roku u 14 klonów tetraploidalnych 5 odmian stwierdzono istotnie niższy stopień porażenia bakteriozą w porównaniu do odmian macierzystych. Są to wszystkie tetraploidy 'Free Redstar', 6 spośród 7 badanych tetraploidów 'Redchief' oraz po 1 lub 2 tetraploidy 'Gala Must', 'Pinova' i Co-op 32.
5. U odmian mało podatnych na parcha, takich jak 'Free Redstar' i Co-op 32 ('Pristine') - tetraploidy nie są w ogóle porażane, a u 'Pinova' – w mniejszym stopniu. W przypadku odmiany o dużej i średniej podatności na parcha - 'Redchief', 5 spośród 9 badanych tetraploidów charakteryzuje się istotnie niższą podatnością na patogen w porównaniu do odmiany macierzystej. U odmiany 'Sander, 2 tetraploidy nie wykazują objawów porażenia, a 3 są porażane znacznie silniej niż diploid i odmiana referencyjna 'Idared'.
6. Analiza molekularna genotypów odmiany 'Free Redstar', uznawanej za względnie odporną na parcha jabłoni, potwierdziła obecność 6 genów odporności na tę chorobę: 3 genów zidentyfikowanych w 2019 r. – *Rvi5*, *Rvi6* i *Rvi11* oraz genów *Rvi8*, *Rvi14* oraz *Rvi17*, co należy podkreślić, zidentyfikowanych po raz pierwszy w bieżącym roku zarówno u diploidalnej odmiany wyjściowej, jak i u wszystkich tetraploidów. Przy czym znacznie większe ilości produktów amplifikacji tych genów wykryto u tetraploidów. Świadczy to o tym, że w wyniku podwojenia liczby chromosomów nastąpiło podwojenie liczby kopii tych genów i nie uległy one mutacji. Wpłynęło to na znaczne zwiększenie u tetraploidów poziomu odporności na parcha, czego dowodem są wyniki oceny fenotypu – tetraploidy 'Free Redstar' nie były porażane przez patogen.
7. Dalszym potwierdzeniem podwyższonej odporności tetraploidów na parcha jabłoni jest znaczne zwiększenie poziomu ekspresji kolejnych badanych w tym roku genów związanych z odpornością: *PR1*, *CDPK* i *MPK3*.
8. Na skutek poliploidyzacji można uzyskać tetraploidy wykazujące mniejszy stopień podatności na porażenie zarazą ogniową lub parchem jabłoni. Wyniki te wymagają weryfikacji poprzez ocenę odporności roślin w warunkach polowych w kolejnych latach badań (2021-2027).

Osiągnięcia projektu badań realizowanych w latach 2014-2020

- ✓ Opracowano wydajny system regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* z eksplantatów liściowych oraz efektywną metodę wytwarzania tetraploidów jabłoni.
- ✓ Opracowano efektywną metodę ukorzeniania mikrosadzonek tetraploidów.
- ✓ Uzyskano tetraploidy jabłoni o mniejszej podatności na zarazę ogniową i parcha jabłoni, które będą wykorzystane do dalszych badań oraz w hodowli odpornościowej jabłoni.
- ✓ Potwierdzono, że zmienność fenotypowa pomiędzy diploidami i tetraploidami oraz pomiędzy siostrzanymi tetraploidami jest m.in. wynikiem zmian genetycznych i epigenetycznych.
- ✓ Wyjaśniono, że mechanizm molekularny wysokiej odporności tetraploidów 'Free Redstar' na parcha jabłoni, polega m.in. na zwiększeniu poziomu ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe na choroby.
- ✓ Na podstawie analizy transkryptomu zidentyfikowano geny *Rvi* oraz inne geny, które mogą być związane z ww. zwiększoną odpornością na porażenie przez *V. inaequalis*.

Publikacja wyników uzyskanych w ramach zadania nr 70 w roku 2019 i 2020:

- 1) Publikacja: Podwyszyńska, M., Sowik, I. and Puławska, J. 2020. In vitro testing of apple tetraploids for resistance to fire blight. Acta Hortic. 1282, 343-350, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1282.51>
- 2) Podwyszyńska, M.; Markiewicz, M.; Klamkowski, K.; Broniarek, A.; Wojtania, A. 2020. The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids. Acta Hortic. (zaakceptowana do druku).
- 3) Podwyszyńska M., Markiewicz M., Broniarek-Niemiec A., Matysiak B., Marasek-Ciołakowska A. 2021. Apple autotetraploids with enhanced resistance to apple scab (*Venturia inaequalis*) due to genome duplication - phenotypic and genetic evaluation. International Journal of Molecular Sciences. 22, 527: 1-26, <https://doi.org/10.3390/ijms22020527>

In vitro testing of apple tetraploids for resistance to fire blight

M. Podwyszyńska*, I. Sowik and J. Puławska

Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland.

Abstract

The most severe bacterial disease of apple tree is the fire blight caused by *Erwinia amylovora*. Due to the lack of effective disease control methods, it is extremely important to introduce into cultivation apple cultivars with reduced susceptibility to this disease. In our previous studies, several neotetraploids for 6 apple cultivars ('Free Redstar', 'Gala Must', 'Co-op 32', 'Pinova', 'Redchief' and 'Sander') have been obtained using in vitro method. Most of the cultivars used for polyploidisation exhibited high or moderate resistance level to *E. amylovora*. We suppose that due to the resistance gene duplication, some tetraploids with enhanced resistance to *E. amylovora* could be achieved. The aim of the study was to evaluate the level of *E. amylovora* resistance in the apple tetraploids compared to their diploid counterparts using in vitro assay. In the first stage of research, an in vitro method for apple resistance to fire blight assessment was developed. Eight apple cultivars including those used for polyploidisation and the reference cultivars highly susceptible to *E. amylovora* ('Idared' and 'Lobo') were used for experiments. Shoots from in vitro cultures were inoculated with pathogen (isolate 659) inoculum at various concentrations with different inoculation methods. The best correlation of in vitro test with the assessments performed in natural conditions were obtained using the pathogen inoculation on the cut surface of shoot apex with a scalpel immersed in a bacterial inoculum of 10^4 cfu mL⁻¹. This method was selected for evaluation of resistance level to *E. amylovora* of the neotetraploids compared to their diploid counterparts. Two to five tetraploid clones of four cultivars were tested. The individual tetraploid clones within the cultivar differed in the resistance level. Most of the tetraploid clones showed similar resistance level to their diploid counterparts and some of tetraploids revealed a significantly greater or lower resistance to the pathogen.

Keywords: fire blight, *Malus × hybrida*, susceptibility, in vitro assay, inoculation

INTRODUCTION

The most serious bacterial disease of apple tree is fire blight, caused by *Erwinia amylovora* (having the status of a quarantine organism in propagation material) (Nybom et al., 2012). One of the ways to reduce the occurrence of diseases is, inter alia, selection of apple cultivars with lower susceptibility to diseases (Sobiczewski et al., 2015). The legal regulations as well as information about breaking the genetically determined resistance to fire blight tend to search for new methods of obtaining apple varieties with more stable immunity and, at the same time, high production values.

Due to the use of in vitro testing and selection techniques, a number of interesting genotypes were obtained with increased resistance to the diseases caused by e.g., *Phytophthora cactorum* and *Verticillium dahliae* (strawberry and apple), and *Rhizoctonia fragariae* and *Botrytis cinera* (strawberry) (Sowik et al., 2001, 2008; Rai et al., 2011). There have also been several attempts to develop testing methods for *E. amylovora* susceptibility using in vitro shoot cultures of pear and apple genotypes (Duron et al., 1987; Chevreau et al., 1998; Abdollahi et al., 2004; Paprstein et al., 2011; Sedlak et al., 2015).

In our previous studies, several neotetraploids for six apple cultivars ('Free Redstar', 'Gala Must', 'Co-op 32', 'Pinova', 'Redchief' and 'Sander') have been obtained using in vitro

*E-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl



The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids

Małgorzata Podwyszyńska, Monika Markiewicz, Krzysztof Klamkowski, Agata Broniarek, Agnieszka Marasek-Ciołakowska
Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland

Abstract

The aim of the research is to obtain tetraploids with new functional traits, including increased resistance to infection by dangerous apple pathogens. In the previous studies, numerous tetraploid versions were obtained for five apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars: 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', 'Redchief' and 'Sander', using the *in vitro* technique. Polyploidization caused a marked change of the phenotype. In comparison with diploids, the autotetraploids had shorter shoots and smaller leaves of altered shape; the chlorophyll content of the tetraploids was higher. Transpiration rate and stomatal conductivity were generally higher in tetraploids. But, the photosynthetic activity and maximum PSII quantum yield (Fv/Fm) in tetraploids were comparable to those observed in diploids. Several tetraploid genotypes were much less susceptible to *Venturia inaequalis* infection than their diploid counterparts. Molecular analysis confirmed that the differences within tetraploids of a given cultivar are associated with genetic and epigenetic changes as indicated by the variation in DNA structure and methylation degree, detected using AFLP and MSAP analysis, respectively. The mean degree of genetic differentiation of the tetraploids tested in three cultivars analyzed with the AFLP markers was 2.4% compared to the diploid counterparts. Using MSAP analysis, higher DNA methylation level was detected in tetraploid clones compared to their diploid counterpart. Moreover, the tetraploid clone with tendency to premature dormancy (most of the plants of such clone manifested growth inhibition) was characterized by the highest DNA methylation rate (22.95%), which was twice as high as in diploid.

Keywords: *Malus × domestica*, polyploidization, apple scab, *Venturia inaequalis*, susceptibility, MSAP, AFLP

INTRODUCTION

One of the important sources of genetic variation is the polyploidization process. Polyploids - genotypes with the multiplied chromosome sets - are characterized by a lush growth and often greater resistance to biotic or abiotic stress factors and thus are widely used in breeding many crop plants. The most serious fungal disease of apple tree is apple scab caused by *Venturia inaequalis* (Meszka and Bielenin, 2006). Protection against this disease is based mainly on chemical treatments and accounts for approximately half of the total costs of protection against pests and diseases. The obligatory implementation of Integrated Pest Management limits the use of chemicals in plant protection and encourages using alternative methods. One of the ways to limit the spread of disease is selection of cultivars with lower susceptibility to infection by the pathogen (Sobiczewski et al., 2011). Significant progress in apple breeding has led to the creation of many genetically resistant genotypes (Gessler and Pertot, 2012). However, reports on breaking genetically conferred scab resistance encourages searching for new sources of genetic resistance, enabling obtaining apple cultivars with more stable resistance and at the same time high production qualities (Sobiczewski et al., 2011).

In our previous studies, we have found that tetraploid clones obtained from the same cultivar differed from each other phenotypically. Some of the tetraploid clones obtained from



Article

Apple Autotetraploids with Enhanced Resistance to Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Due to Genome Duplication-Phenotypic and Genetic EvaluationMałgorzata Podwyszyńska^{1,*}, Monika Markiewicz¹, Agata Broniarek-Niemiec², Bożena Matysiak¹ and Agnieszka Marasek-Ciolakowska¹¹ Department of Applied Biology, Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3 Street, 96-100 Skierniewice, Poland; monika.markiewicz@inhort.pl (M.M.); bożena.matysiak@inhort.pl (B.M.); agnieszka.marasek@inhort.pl (A.M.-C.)² Department of Phytopathology, Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3 Street, 96-100 Skierniewice, Poland; agata.broniarek@inhort.pl

* Correspondence: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl

Abstract: Among the fungal diseases of apple trees, serious yield losses are due to an apple scab caused by *Venturia inaequalis*. Protection against this disease is based mainly on chemical treatments, which are currently very limited. Therefore, it is extremely important to introduce cultivars with reduced susceptibility to this pathogen. One of the important sources of variability for breeding is the process of polyploidization. Newly obtained polyploids may acquire new features, including increased resistance to diseases. In our earlier studies, numerous tetraploids have been obtained for several apple cultivars with 'Free Redstar' tetraploids manifesting enhanced resistance to apple scab. In the present study, tetraploids of 'Free Redstar' were assessed in terms of phenotype and genotype with particular emphasis on the genetic background of their increased resistance to apple scab. Compared to diploid plants, tetraploids (own-rooted plants) were characterized with poor growth, especially during first growing season. They had considerably shorter shoots, fewer branches, smaller stem diameter, and reshaped leaves. In contrast to own-rooted plants, in M9-grafted three-year old trees, no significant differences between diplo- and tetraploids were observed, either in morphological or physiological parameters, with the exceptions of the increased leaf thickness and chlorophyll content recorded in tetraploids. Significant differences between sibling tetraploid clones were recorded, particularly in leaf shape and some physiological parameters. The amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis confirmed genetic polymorphism of tetraploid clones. Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis showed that the level of DNA methylation was twice as high in young tetraploid plants as in a diploid donor tree, which may explain the weaker vigour of neotetraploids in the early period of their growth in the juvenile phase. Molecular analysis showed that 'Free Redstar' cultivar and their tetraploids bear six *Rvi* genes (*Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi8*, *Rvi11*, *Rvi14* and *Rvi17*). Transcriptome analysis confirmed enhanced resistance to apple scab of 'Free Redstar' tetraploids since the expression levels of genes related to resistance were strongly enhanced in tetraploids compared to their diploid counterparts.

Keywords: polyploidization; DNA methylation; disease-resistance related genes; *Rvi* genes; *Venturia inaequalis*; *Malus × domestica*



Citation: Podwyszyńska, M.; Markiewicz, M.; Broniarek-Niemiec, A.; Matysiak, B.; Marasek-Ciolakowska, A. Apple Autotetraploids with Enhanced Resistance to Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Due to Genome Duplication-Phenotypic and Genetic Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 527. <https://doi.org/10.3390/ijms22020527>

Received: 16 November 2020

Accepted: 5 January 2021

Published: 7 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The most important fruit species in the temperate climate zone is the apple tree (*Malus × domestica* Borkh.). Bacterial and fungal diseases are the greatest threats to apple cultivation in regions with a humid and cool climate. Among the fungal diseases of apple trees, serious yield losses are caused by apple scab, of which the causal agent is the ascomycete fungus *Venturia inaequalis* [1]. Protection against this disease is based