

Received: 07.06.2023 / Accepted: 12.07.2023

ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

Postępy w hodowli odpornościowej jabłoni na zarazę ogniową

Progress in apple breeding for resistance to fire blight

Sylwia Keller-Przybytkowicz¹, Mariusz Lewandowski², Piotr Sobiczewski*³

Streszczenie

W pracy przedstawiono najważniejsze zagadnienia dotyczące hodowli odpornościowej jabłoni na zarazę ogniową stwarzającej ogromne możliwości zwiększenia efektywności produkcji jabłek bez użycia innych metod ochrony, w tym metody chemicznej. Fenotypową ocenę podatności genotypów jabłoni na chorobę prowadzi się w oparciu o obserwacje występowania objawów w warunkach polowych i/lub obiektach zamkniętych np. w szklarni. Narzędziem przyspieszającym proces hodowli są metody biologii molekularnej, w tym identyfikacja markerów odporności oraz biotechnologia. W programach hodowlanych prowadzonych w różnych ośrodkach na świecie wykorzystuje się dzięki gatunki rodzaju *Malus* oraz uprawiane odmiany jabłoni. Wyhodowano już podkładki jabłoni z bardzo wysoką odpornością na zarazę ogniową (USA) oraz szereg odmian parchoodpornych wykazujących również wysoką odporność na chorobę (Niemcy, Szwajcaria). W Polsce w ostatnich latach wyhodowano dwa genotypy jabłoni, odmianę Early Szampion i klon nr 69 (J-2003-05), charakteryzujące się bardzo wysoką odpornością oraz wytwarzające atrakcyjne i smaczne owoce. Oba genotypy mają perspektywę wykorzystania w programach hodowlanych i nasadzeniach produkcyjnych.

Słowa kluczowe: *Erwinia amylovora*, ocena fenotypowa, źródła odporności, molekularne markery odporności, biotechnologia

Abstract

The paper presents the most important issues concerning the breeding of apple trees resistant to fire blight, which creates great opportunities to increase the efficiency of apple fruit production without the use of other protection methods, including the chemical treatment. The phenotypic assessment of susceptibility of apple genotypes to the disease is based on observations on the occurrence of symptoms in field and/or closed facilities, e.g. in the greenhouse. Molecular biology methods, including identification of resistance markers, and biotechnology are valuable tools to accelerate the breeding process. Breeding programs conducted in various research centers around the world use wild species of the genus *Malus* and commercial cultivars of apple. Apple rootstocks with very high resistance to fire blight (USA) and a number of scab-resistant cultivars, also showing high resistance to the disease (Germany, Switzerland) have already been bred. In recent years cultivar Early Szampion and clone No. 69 (J-2003-05) have been bred in Poland. Both genotypes are characterized by a very high resistance, and produce attractive tasty fruit. They have the prospect of being used in breeding programs and commercial plantings.

Key words: *Erwinia amylovora*, phenotypic evaluation, resistance sources, molecular markers, biotechnology

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
*corresponding author: piotr.sobiczewski@inhort.pl

Wstęp / Introduction

Zaraza ogniowa powodowana przez bakterię *Erwinia amylovora*, była pierwszą wykrytą bakteryjną chorobą roślin. Pod koniec XVIII wieku zaobserwowano w pobliżu Nowego Jorku masowe zamieranie drzew jabłoni, gruszy i pigwy, głównie odmian sprowadzanych przez emigrantów z Europy. W tym czasie nie znano jeszcze bakterii jako patogenów roślin, a zauważone objawy przypisywano różnym czynnikom, w tym szkodliwym owadom, wylądowaniu atmosferycznym, złemu sokowi, uszkodzeniom mrozowym czy karze boskiej. Dopiero w 1878 roku Amerykanin Thomas Burrill pracujący na Uniwersytecie stanu Illinois stwierdził, że w śluzowatym wycieku towarzyszącym nekrozom i zgorzelom na gruszach, występują żywe bakterie. Dwa lata później wykazał, że wprowadzenie tego wycieku do zdrowych drzew jabłoni i gruszy powodowało typowe objawy zarazy ogniowej. Jej sprawcę nazwał *Micrococcus amylovorus*. Thomas Burrill nie wyizolował jednak bakterii na sztuczną pożywkę w czystej kulturze. Uczynił to dopiero kilka lat później Joseph Arthur, który wykonał na Uniwersytecie Cornella w Ithaca w stanie Nowy Jork, pierwszą w historii pracę doktorską na temat zarazy ogniowej (van der Zwet i wsp. 2012).

Zaraza ogniowa należy do najbardziej szkodliwych chorób jabłoni, gruszy i ponad 130 gatunków roślin z rodziny różowatych (Rosaceae Juss.) (Vanneste 2000; van der Zwet i wsp. 2012). Występuje w co najmniej 65 krajach powodując straty o znaczeniu gospodarczym (EPPO data base 2020). Atakuje wszystkie organy nadziemnej części roślin, a najbardziej podatne są kwiaty i młode pędy. Powstające nekrozy i zgorzele nierzadko prowadzą do zamierania całych roślin. Występowanie choroby jest nieregularne i zależy głównie od współdziałania takich czynników, jak: wielkość źródła infekcji, podatność rośliny oraz warunki środowiska, zwłaszcza przebieg pogody w sezonie wegetacyjnym. W niektóre lata szkodliwość zarazy ogniowej jest bardzo duża, w inne występuje na ograniczonym obszarze i w niewielkim nasileniu.

Ochrona roślin przed chorobą obejmuje integrację różnych metod, w tym chemicznej, agrotechnicznej i biologicznej. Jest ukierunkowana na eliminację źródła infekcji, zapobieganie infekcji oraz obniżenie podatności roślin na chorobę (Psallidas i Tsiantos 2000; Steiner 2000; Norelli i wsp. 2003; Sobiczewski 2011; Aćimović i wsp. 2015). Asortyment chemicznych środków ochrony roślin jest jednak bardzo mały i głównie oparty na związkach miedzi działających prawie wyłącznie powierzchniowo i zapobiegawczo. Ponadto preparaty miedziowe mogą być fitotoksyczne powodując ordzawienia owoców i liści. Istnieją również obawy przed akumulacją miedzi w glebie i jej szkodliwym wpływem na zasiedlające glebę organizmy. Na forum Unii Europejskiej rozważa się ograniczenie stosowania miedzi w ochronie roślin (Lamichhane i wsp. 2018).

W niektórych krajach do walki z chorobą zarejestrowane są antybiotyki i fungicydy oparte na fosetylu glinu (Psallidas i Tsiantos 2000; Stockwell i Duffy 2012; Schoofs i wsp. 2014). Stosowanie streptomycyny, środka który jest bardzo skuteczny przeciwko zarazie ogniowej, stwarza jednak zagrożenia, m.in. indukcji oporności na ten antybiotyk bakterii *E. amylovora* oraz innych bakterii np. patogenów ludzkich i zwierzęcych, a także ma negatywny wpływ na środowisko (Aćimović i wsp. 2015). Dlatego prawodawstwo Unii Europejskiej zabrania stosowania antybiotyków w ochronie roślin (Dyrektywa 2004/129/EC). Godne rozważenia jest użycie induktorów odporności roślin na chorobę np. opartych na proheksadonie wapnia (Regalis, Apogee), a także biopreparatów na bazie bakterii czy drożdży np. Blossom Protect (Norelli i wsp. 2003; Sobiczewski i Bubán 2004; McGrath i wsp. 2009; van der Zwet i wsp. 2012).

Ze względu na to, że żadna z wymienionych metod nie jest w pełni skuteczna, duże perspektywy upatruje się w hodowli odpornościowej jabłoni. Zapoczątkowano ją w drugiej połowie XIX wieku w Stanach Zjednoczonych. Obok obserwacji podatności uprawianych odmian jabłoni, organizowane są wyprawy naukowe do Europy, Azji i na Bliski Wschód, w celu poszukiwania źródeł odporności i zebrania genotypów charakteryzujących się wyższą odpornością na zarazę ogniową (Norelli i wsp. 2003; Peil i wsp. 2009, 2020; Kellerhals i wsp. 2011, 2017; van der Zwet i wsp. 2012).

Fenotypowa ocena podatności genotypów jabłoni / Phenotypic assessment of susceptibility of apple genotypes

Celem hodowli nowych odmian jabłoni, podobnie jak innych gatunków roślin sadowniczych, jest wytworzenie genotypów bardziej wartościowych pod względem użytkowym w stosunku do istniejących. Odbywa się ono poprzez kontrolowane krzyżowanie form rodzicielskich o uprzednio rozpoznanych cechach. W programach hodowlanych realizowanych w różnych ośrodkach naukowych na świecie znaczące miejsce zajmuje hodowla odpornościowa na choroby infekcyjne. W przypadku zarazy ogniowej fenotypową ocenę podatności genotypów jabłoni na chorobę prowadzi się w oparciu o obserwacje występowania objawów powstających w wyniku infekcji naturalnych i/lub sztucznych inokulacji (Peil i wsp. 2009). W zależności od tego czy choroba występuje endemicznie czy sporadycznie, a także od prawnego statusu jej sprawcy, ocena taka jest prowadzona w warunkach polowych i/lub kontrolowanych np. w szklarni. W tym kontekście należy przypomnieć, że Polska była jednym z pierwszych krajów Europy kontynentalnej, w którym wykryto zarazę (Sobiczewski i Suski 1988). W roku 1966 jej ogniska stwierdzono także w Holandii.

Przez wiele lat bakteria *E. amylovora* miała status organizmu kwarantannowego, co m.in. wiązało się z wymogiem eradykacji choroby oraz różnymi ograniczeniami w uprawie i produkcji roślin-gospodarzy. Z czasem zaraza rozprzestrzeniła się do nowych rejonów zarówno w naszym kraju, jak i na świecie, a prowadzone badania umożliwiły poznanie wielu istotnych aspektów jej epidemiologii i opracowanie bardziej skutecznych strategii zwalczania (Vanneste 2000; van der Zwet i wsp. 2012). Obecnie, w krajach Unii Europejskiej *E. amylovora* jest zaliczana do regulowanych organizmów niekwarantannowych (Sobiczewski i Bielicki 2022).

W ocenie podatności jabłoni na zarazę ogniową prowadzonej w warunkach polowych najczęstszym obiektem obserwacji są objawy na kwiatach i młodych pędach (przyrostach). Stosowane są przy tym różne skale porażenia wyrażane w stopniach, w zależności od wielkości uszkodzeń. W przypadku pędów wskaźnikiem może być długość porażonej części w stosunku do całkowitej długości pędu, a kwiatach – porażenie poszczególnych części kwiatu. W określeniu stopnia porażenia pomocne jest także oszacowanie nasilenia choroby, często wyrażane w procentach oraz podanie liczby porażonych organów w stosunku do wszystkich występujących na roślinie, niezależnie od stopnia ich porażenia (Lespinasse i Aldwinckle 2000; Dougherty i wsp. 2021). Zaletą oceny polowej, prowadzonej zwłaszcza przez kilka lat, jest uwzględnianie wpływu warunków środowiskowych na występowanie i rozwój zarazy ogniowej.

W celu wyeliminowania zmienności związanej z różną wielkością inokulum występującego w środowisku stosuje się inokulacje, najczęściej młodych pędów. Generalnie mniej uwagi zwraca się na podatność kwiatach, chociaż – co należy podkreślić – kwiaty są najbardziej podatnym i najczęściej zakażanym przez *E. amylovora* organem jabłoni. Na podstawie wyników badań odmiany Gala, Thibault i Le Lezec (1990) wykazali słabą korelację między podatnością pędów i kwiatach ($0,25 < r < 0,44$) (pędy – mało podatne, kwiaty – wysoce podatne). Natomiast Kellerhals i wsp. (2014) udowodnili na podstawie testów z zastosowaniem inokulacji pędów jabłoni w szklarni oraz inokulacji kwiatach jabłoni w warunkach naturalnych, podobną podatność tych organów u 9 genotypów jabłoni. Także Peil i wsp. (2019) wykazali, że mechanizm odporności pędów i kwiatach jabłoni na zarazę ogniową jest taki sam, przynajmniej w przypadku klonu jabłoni Mr5.

W programach hodowlanych wielu krajów, w tym w Polsce, ocenę podatności genotypów jabłoni wykonuje się w obiektach zamkniętych, w których panują warunki sprzyjające rozwojowi choroby. Pozwala to na wyselekcjonowanie z dużym prawdopodobieństwem osobników wysoce podatnych oraz wysoce odpornych, co potwierdzono również obserwacjami w warunkach naturalnych. Do oceny fenotypowej wybiera się młode, wyrównane pędy w fazie

ich aktywnego wzrostu. Podatność pędów maleje bowiem z ustaniem aktywności miazgi (Sobiczewski i wsp. 2015; Harshman i wsp. 2017). Oznacza to, że pędy kończące wzrost są mało podatne lub nawet w ogóle niepodatne na chorobę. W przeprowadzanych badaniach do oceny podatności genotypów jabłoni stosowana jest skala opracowana we Francji (Le Lezec i wsp. 1997), która jest także używana w innych krajach. W testach z użyciem inokulacji bardzo ważny jest również wybór szczepu patogena. Poszczególne szczepy mogą różnić się wirulencją (Sobiczewski i wsp. 2008; Puławska i Sobiczewski 2012). Istnieje także możliwość różnej interakcji między szczepami a genotypem jabłoni (Norelli i wsp. 1984; Peil i wsp. 2011; Emeriewen i wsp. 2019). Najczęściej do inokulacji stosuje się jeden wyselekcjonowany szczep, ale niektórzy badacze stosują mieszkankę kilku szczepów. Stwierdzono jednak, że taki sposób nie zawsze daje oczekiwany efekt (Paulin i Lespinasse 1990). Wirulencja szczepów wybranych do inokulacji decyduje o rozwoju choroby. Lee i wsp. (2010) badając 6 szczepów *E. amylovora* wykazali, że takie czynniki wirulencji, jak produkcja amyloworanu, tworzenie biofilmu oraz poziom rozmnażania bakterii na niedojrzałych jabłkach determinowały w ponad 70% zmienność nasilenia choroby na drzewkach jabłoni odmiany Gala. Norelli i wsp. (1984) udowodnili różną wirulencję szczepów w zależności od inokulowanego genotypu. Wyniki uzyskane przez różnych autorów mogą dostarczać różnych informacji. Harshman i wsp. (2017) stwierdzili, że niska korelacja między podatnością pędów *Malus sieversii* w warunkach szklarniowych i polowych mogła być związana z zastosowaniem różnych szczepów do inokulacji, zmieniającymi się warunkami środowiskowymi oraz zbyt małą liczbą porażonych pędów, które były niejednorodne. Autorzy podkreślają również znaczenie wpływu warunków środowiskowych na skuteczność inokulacji. Na uwagę zasługują wyniki badań prowadzonych w ramach projektu COST 864. Zarówno w Instytucie Ogrodnictwa – Państwowym Instytucie Badawczym (IO – PIB) w Skierniewicach, jak i w Julius Kühn-Institut (JKI) w Dreźnie – Pillnitz (Niemcy) oceniano podatność pędów młodych drzewek jabłoni na zarazę ogniową w warunkach szklarniowych. Spośród wybranych 25 odmian i klonów pochodzących z sześciu krajów Unii Europejskiej (Belgia, Niemcy, Polska, Szwajcaria, Szwecja i Węgry), 17 wykazało taką samą lub podobną podatność w obu lokalizacjach, pomimo że inokulowano różne organy (IO – PIB – pędy, JKI – liście), a także stosowano różne inokulum (IO – PIB – jeden szczep, JKI – mieszkanka trzech szczepów). Również porównawcza analiza znaczenia rodzaju inokulum testowanego na pędach odmian o różnej podatności (niskiej – Enterprise i Free Redstar oraz wysokiej – Idared i Spartan) z użyciem powyższych metod inokulacji wykazała brak istotnych różnic w podatności poszczególnych odmian na chorobę (Sobiczewski i wsp. 2015).

Podatność odmian i podkładek jabłoni z hodowli klasycznej / Susceptibility of apple cultivars and rootstocks from classical breeding

W ramach programu hodowlanego prowadzonego w Niemczech, parchoodporne odmiany oznaczone symbolem Re (Realka, Reanda, Rebella, Regia, Regine, Remo, Rene, Resi, Rewena) wykazały także wysoką odporność na zarazę ogniową, a cechę tą potwierdzono wieloletnimi badaniami (Richter i Fischer 2002; Fischer i Richter 2004; Peil i wsp. 2009).

We wstępnych badaniach prowadzonych w Szwajcarii wśród 13 ocenianych odmian jabłoni, sześć było bardziej podatnych niż użyta dla porównania odmiana Gala, natomiast odmiana Schneiderapfel okazała się najbardziej odporna (Szaltnay i wsp. 2009). Na podkreślenie zasługuje także odmiana Alant, charakteryzująca się bardzo wysoką odpornością, porównywalną, a nawet wyższą niż odmiana Enterprise. Jest wykorzystywana w krzyżowaniach w celu uzyskania nowych odmian o podwyższonej odporności na zarazę ogniową i wysokiej jakości owoców (Kellerhals i wsp. 2012). Program zaowocował wyhodowaniem nowej odmiany Ladina, wykazującej odporność na parcha, tolerancję na zarazę ogniową i wartościowe cechy produkcyjne, w tym wysoką jakość owoców (Baumgartner i wsp. 2012; Kellerhals i wsp. 2017). Odmiana ta pochodzi ze skrzyżowania form rodzicielskich Topaz i Fuji, podatnych na zarazę ogniową.

Spośród 69 odmian jabłoni ocenianych w USA, niektóre okazały się wysoce odporne na parcha jabłoni i zarazę ogniową, np. Florina, Liberty i MacFree (Aldwinckle i wsp. 1999). Odmiany Liberty i Enterprise wykazały najniższy procent zamierania pędów spośród 14 sztucznie zainokulowanych odmian, testowanych w warunkach polowych (Mohan i wsp. 2002). Jednak odmiany te nie są uprawiane na skalę produkcyjną. Z drugiej strony na rynku jest wiele znaczących odmian jabłoni charakteryzujących się niską lub średnią podatnością, np. Starkrimson, Boskoop, Golden Spur, ale także odmian wysoce podatnych na chorobę, np. Braeburn, Gala, czy Jonagold (Lespinnasse i Aldwinckle 2000; Kellerhals i wsp. 2012; Sobiczewski i wsp. 2015). W badaniach przeprowadzonych we Francji, odporne na parcha odmiany Priscilla, Perpetu-Evereste, Golden Gem i Nova Easygro charakteryzowały się również wysoką odpornością zarówno pędów, jak i kwiatów (Le Lezec i wsp. 1987).

Na uwagę zasługuje opracowanie van der Zweta i Keila (1979), którzy na podstawie dostępnej literatury zestawili dane dotyczące podatności odmian jabłoni (*Malus × domestica*). I tak spośród 193 odmian wprowadzonych do uprawy przed rokiem 1920, około 28% wykazywało wysoką odporność na chorobę, a spośród 197 odmian uzyskanych w latach 1920–1978, 41% było również wysoce odpornych. Należy dodać, że wysoką podatność na zara-

zę ogniową stwierdzono u kilku podkładek jabłoni (Cummins i Aldwinckle 1983). Natomiast spośród 28 badanych klonów podkładek (serie Malling i Malling-Merion) tylko dziewięć było mało podatnych, a podkładka M.9 okazała się bardzo wysoce podatna. Z programu Stacji Geneva uzyskano cztery podkładki wegetatywne (G65, G16, G11, G30) charakteryzujące się różną siłą wzrostu, a jednocześnie bardzo wysoką odpornością na zarazę ogniową (Norelli i wsp. 2002).

W latach 2007–2009, w ramach projektu COST Action 864, oceniano podatność łącznie 38 odmian i klonów jabłoni i wykazano, że klony Pi-As 12.53 i Pi-As 50.74 (pochodzące z Niemiec) oraz MR-10 (z Węgier) wykazały bardzo wysoką odporność na chorobę (Sobiczewski i wsp. 2015). Stosując metodę inokulacji liści, Kostick i wsp. (2019) oceniając 94 odmiany jabłoni, w tym formy rodzicielskie używane w hodowli, wykazali że 16 z nich, m.in. Aurora Golden Gala, Dolgo, Empire, Fireside, Frostbite, było średnio do bardzo wysoce odpornych na zarazę ogniową.

Ponadto w Czechach, na Węgrzech i w Polsce prowadzi się ocenę podatności rodzimych genotypów. Badania przeprowadzone w Czechach wykazały, że odmiana Selena (BriteMac × Prima), charakteryzująca się umiarkowanym wzrostem, jest wysoce odporna na zarazę ogniową i przewyższa odpornością wszystkie uprawiane w tym kraju odmiany jabłoni (Sillerova i wsp. 2014). Wśród 11 lokalnych genotypów ocenianych na Węgrzech, odmiany Ponyik alma, Sikulai i Szemes alma wykazały bardzo wysoką odporność, która była nawet wyższa niż użytych dla porównania odmian Liberty i Remo. Natomiast odmiany Batul, Alexander i Simonffy piros oceniono jako średnio odporne (Kása i wsp. 2004).

Wśród rodzimych genotypów jabłoni ocenianych w Polsce na szczególną uwagę zasługuje odmiana Free Redstar (Sobiczewski i wsp. 2004, 2006). Wcześniejsze badania cytowanych autorów pozwoliły na zaklasyfikowanie tej odmiany do grupy mało podatnych (Sobiczewski i wsp. 2004). Również ocena przeprowadzona w JKI wykazała, że jest to genotyp mało podatny (Sobiczewski i wsp. 2015). W innych badaniach odmiana ta została oceniona jako bardzo mało podatna (Sobiczewski i wsp. 2006, 2015). Natomiast w testach wykonanych w 2017 roku, ze względu na stosunkowo duży odsetek pędów porażonych (32,1% w klasie 5) oraz znaczący odsetek pędów niewykazujących objawów chorobowych (42,9%) stwierdzono, że cecha odporności/podatności tej odmiany może być niestabilna. Wniosek ten potwierdzają wyniki testów wykonanych w 2018 roku, które ujawniły odporność aż 84,4% pędów (brak objawów). Nie było także pędów silnie i bardzo silnie porażonych (Sobiczewski i wsp. 2021). W latach 2016–2018 oceniono podatność na zarazę ogniową siedmiu genotypów jabłoni, w tym czterech nowo wyhodowanych w IO – PIB. Stwierdzono, że dwa z nich (odmiana Early Szampion i klon nr 69 (J-2003-05) są wysoce odporne na chorobę. Analiza poraże-

nia poszczególnych pędów obu genotypów wykazała brak objawów odpowiednio na 92 i 100% pędów zainokulowanych w 2016 r., na 83,8 i 77,0% pędów zainokulowanych w 2017 r. oraz na 87,8 i 77,3% pędów zainokulowanych w 2018 r. Ponadto, badania z wykorzystaniem 16 markerów genetycznych wykazały, że klon nr 69 ma 10 alleli genów odporności zlokalizowanych w pięciu grupach sprzężeń (ang. linkage groups) LG 3, 5, 7, 10 i 12 genomu *Malus*. Genotyp ten pochodzi ze skrzyżowania odmian Melfree i Sawa i wytwarza bardzo duże, ciemnoczerwone, smaczne owoce. Podobnie odmiana Early Szampion będąca wyselekcjonowanym mieszańcem odmian Gold Milenium i Šampion o dużych, jaskrawoczerwonych, atrakcyjnych owocach, również posiada 10 alleli odporności (zlokalizowanych w LG 3, 7, 10 i 12). Należy podkreślić, że oba genotypy mają perspektywę wykorzystania w programach hodowlanych i nasadzeniach komercyjnych (Sobiczewski i wsp. 2021).

Źródła odporności jabłoni na zarazę ogniową / Sources of apple fire blight resistance

Jednym z głównych przodków *M. × domestica* jest gatunek *M. sieversii*, pochodzący z Azji Centralnej. W celu poszukiwania źródeł odporności na chorobę, Ministerstwo Rolnictwa USA zorganizowało w latach 1989–1996, 4 ekspedycje do 12 klimatycznie różnych miejsc zlokalizowanych w Kazachstanie, Kirgistanie, Tadżykistanie i Uzbekistanie. Łącznie zebrano około 130 000 nasion z ponad 900 drzew, które następnie rozproszono do różnych ośrodków hodowlanych w USA i w innych krajach (Luby i wsp. 2000). Przeprowadzona w warunkach polowych i kontrolowanych fenotypowa ocena podatności siewek uzyskanych z tych nasion umożliwiła wyselekcjonowanie najbardziej odpornych (Luby i wsp. 2002; Fazio i wsp. 2009). Badania Harshmana i wsp. (2017) około 200 wybranych osobników *M. sieversii* wykazały, że 12 z nich było podobnie wysoce odpornych lub odpornych jak użyte dla porównania standardy. U kilku osobników zaobserwowano unikalną reakcję odpornościową niestwierdzoną dotychczas u *M. × domestica*, charakteryzującą się ogólnie niewielką liczbą porażonych pędów, ale wysokim nasileniem choroby na tych pędach po zajęciu infekcji. Wybrano kilka osobników *M. sieversii* do programu hodowlanego jabłoni.

Na uwagę zasługują także badania prowadzone w Niemczech. Inokulacje pędów siewek gatunków dzikich oraz mieszańców uzyskanych w wyniku ich krzyżowań wykazały wysoką zmienność odporności osobników wewnątrz gatunków, wskutek czego nie można było wytypować gatunków wyłącznie odpornych czy wyłącznie podatnych. Najwyższą proporcję odporności testowanych osobników stwierdzono u gatunków *M. baccata*, *M. fusca*, *M. sieboldii*, *M. × atrosanguinea*, *M. × floribunda*, *M. prunifolia* i *M. × zumi* (Peil i wsp. 2009).

Badania Dougherty i wsp. (2021) przeprowadzone na puli 667 genotypów *Malus*, potwierdziły że największy stopień uszkodzeń wywołanych porażeniem przez *E. amylovora* odnotowano w puli krzyżowanych odmian *M. × domestica*, a najmniejszy w przypadku gatunków dzikich.

Odporność jabłoni (*M. × domestica*) na porażenie przez *E. amylovora* jest regulowana wielogenowo, m.in. dominującymi genami addytywnymi w postaci heterozygotycznej (Malnoy i wsp. 2012; Khan i wsp. 2018). W poszukiwaniu nowych źródeł odporności narzędziem przyspieszającym proces hodowli są metody biologii molekularnej, w tym markery odporności oraz biotechnologia. W cyklu wieloletnich badań w genomie rodzaju *Malus* zidentyfikowano główne i drugorzędowe loci cech ilościowych (QTL – ang. Quantitative Trait Loci), związane z odpornością na chorobę oraz z wirulencją określonych szczepów *E. amylovora* (Vogt i wsp. 2013). Khan i wsp. (2006) zmapowali QTL odporności w obrębie 7 chromosomu genomu odmiany Fiesta, ale ich występowanie potwierdzono również u gatunków dzikich (Dougherty i wsp. 2021). Regiony QTL, definiujące 40–70% zmienności cechy odporności na zarazę ogniową, zidentyfikowano także w grupie sprzężeń LG 12 genomu odmiany Evereste (jabłoń ozdobna) oraz w genomach *M. floribunda* i *M. arnoldiana* 821 (Emeriewen i wsp. 2020, 2021). Dodatkowe QTL, odpowiedzialne za 50% i 85% zmienności fenotypowej jabłoni, zidentyfikowano odpowiednio w 10 grupie sprzężeń genomu *M. baccata* i w LG 12 genomu *M. fusca* (Emeriewen i wsp. 2014). Za perspektywiczne źródła odporności uznaje się zatem osobniki, u których rozpoznano i zmapowano grupy sprzężeń LG 3, 5, 7, 10 i 12, zawierające allele genów występujące u gatunków dzikich: *M. × robusta* 5, *M. fusca*, *M. floribunda* 821, *M. × arnoldiana* i odmiany Evereste, a także u niektórych odmian, jak Fiesta, Discovery, Florina i Honeycrisp (Calenge i wsp. 2005; Khan i wsp. 2006, 2007, 2013; Peil i wsp. 2007; Durel i wsp. 2009; Emeriewen i wsp. 2013, 2021; Kostick i wsp. 2021). Mogą być one przydatne w doborze form rodzicielskich w bieżących i nowych programach hodowlanych.

Badania roślin mieszańcowych z populacji segregującej (GMAL 4593), uzyskanej w wyniku krzyżowania odmiany Royal Gala i gatunku *M. sieversii*, umożliwiły zidentyfikowanie nowych regionów QTL, zlokalizowanych w LG 8 (Desnoues i wsp. 2018). Również Emeriewen i wsp. (2019, 2021) wykazali, że duża zmienność odporności jabłoni na zarazę ogniową wywodzi się od gatunków dzikich lub odmian powszechnie uprawianych, ale wykazujących wysoką odporność na chorobę. Bazując na ocenie populacji mieszańcowych, pochodzących z krzyżowania *M. floribunda* 821, Evereste i *M. × arnoldiana* MAL0004, zidentyfikowano gen odporności FB_Mar12 w grupie sprzężeń LG 12 genomu wysoce odpornego na zarazę ogniową gatunku *M. × arnoldiana* (Emeriewen i wsp. 2021).

Warto podkreślić, że mało podatne genotypy jabłoni, w tym gatunki dzikie, wykorzystano również do selekcji serii podkładek dla jabłoni wykazujących bardzo wysoką odporność na zarazę (Forsline i Aldwinckle 2002; Norelli i wsp. 2002; Bonasera i wsp. 2006; Peil i wsp. 2020; Tegtmeier i wsp. 2020). We wstępnych badaniach gatunków dzikich i podkładek dla jabłoni, w grupach sprzężeń LG 3 i 7 genomu *M. robusta* 5, wyodrębniono geny NBS-LRR oraz FB_MR5 (Fahrenttrapp i wsp. 2012; Gardiner i wsp. 2012; Broggin i wsp. 2014; Kost i wsp. 2015). Inne badania przeprowadzone przez Jensen i wsp. (2003, 2012) potwierdziły wpływ podkładki na podatność zaszczepionej na niej odmiany szlachetnej, wskazując na złożone mechanizmy związane z globalną ekspresją genów.

Molekularne podstawy regulacji odporności jabłoni na zarazę ogniową / Molecular basis of regulation of apple resistance to fire blight

Jednym z priorytetów hodowli odpornościowej jabłoni, ukierunkowanej na uzyskanie genotypów o wysokiej odporności na zarazę ogniową, jest piramidyzacja czyli kumulacja alleli genów odporności na tę chorobę (Kellerhals i wsp. 2013). Określenie możliwości ich segregacji w nowych programach krzyżowań jest naturalną konsekwencją postępu w badaniach na rzecz praktyki sadowniczej. W prowadzonych w IO – PIB badaniach oceniono podatność na chorobę dziewięciu genotypów jabłoni (Enterprise, Rebella, Melfree, Spartan Swiss type, MR 03, Pi-A 18,24, Free Redstar, Idared, Blauachauer Wädenswil) oraz określono liczbę alleli markerów molekularnych: CHO3e03, CHO3g12, AE10, GE-8019, CH-F7-Fb1, zlokalizowanych w głównych regionach odporności (LG 3 i LG 7) genomu *Malus* (Keller-Przybyłkiewicz i wsp. 2009). Markery użyte w powyższych badaniach zostały opracowane przez zespoły badawcze m.in. z Nowej Zelandii (Gardiner i wsp. 2012), Francji (Durel i wsp. 2009), Niemiec (Peil i wsp. 2009) oraz USA (Khan i wsp. 2012). W badanej puli roślin, zależnie od genotypu, obserwowano od 1 do 5 wariantów ich sekwencji. Największą liczbę alleli odporności (3–5) zidentyfikowano w genomach klonu PiA 18,24 i odmiany Rebella (pochodzą z Niemiec) oraz w genomach odmiany Enterprise (wyhodowanej w USA) i odmiany Free Redstar (selekcji IO – PIB, z nasion otrzymanych z USA). Najmniej, tj. 1–2 allele odporności wykryto natomiast w genomach odmian Spartan Swiss type i Blauachauer Wädenswil, podatnych na chorobę.

W genomach klonu nr 69 (J-2003-05) i odmiany Early Szampion pochodzących ze skrzyżowania odpowiednio odmian Melfree i Sawa oraz Gold Milenium i Šampion zidentyfikowano różną liczbę (od 5 do 13) alleli genów związanych z regulacją cechy odporności na chorobę. U ich form rodzicielskich, o wysokiej i średniej podatności na zarazę, tj. Gold Millenium, Šampion i Melfree, zidentyfikowano

od 5 do 7 alleli wyżej wymienionych markerów molekularnych. Natomiast w genomach genotypów mało podatnych, tj. klonu nr 69 i odmiany Early Szampion, a także formy rodzicielskiej Sawa wykryto od 10 do 13 alleli związanych z odpornością na zarazę ogniową (Sobiczewski i wsp. 2021).

W badaniach nad poznaniem mechanizmu odporności na chorobę ważne jest zbadanie odpowiedzi transkrypcyjnej testowanych roślin na porażenie przez *E. amylovora*. Obecnie w tego typu pracach wykorzystuje się metodę opartą na określeniu profili ekspresji genów w tkankach porażonych roślin. Zastosowano ją do analizy zainokulowanych wegetatywnych podkładek dla jabłoni (G.41 i M.26). Zgodnie z metodyką przedstawioną przez Baldo i wsp. (2010), z liści roślin porażonych oraz roślin kontrolnych (nieinokulowanych, ale poddanych stresowi uszkodzenia tkanki – mock challenger control) izoluje się całkowity RNA. Duża czułość metody umożliwiła wykrycie, oprócz sekwencji typowych dla odporności na zarazę ogniową, także wielu innych, oznaczanych jako EST (ang. Expressed Sequence Tags – fragmenty genów ulegające ekspresji, znaczniki ekspresyjne). Sekwencje te, różnicują genotypy odporne i podatne, a wiele z nich przypisano do kategorii genów – regulatorów, m.in. odpowiedzi na czynniki stresu. Badając ich profile ekspresyjne Norelli i wsp. (2009) zdefiniowali aktywność genów m.in. kodujących chitynazę, β -1,3-glukanazę i liazę fenyloalaninowo-amoniakalną, a także genów kodujących białka związane z patogenezą (ang. pathogenesis related proteins – PR-2, PR-5, PR-8 i PR-1a) (Bonasera i wsp. 2006; Norelli i wsp. 2009).

Wysoki poziom ekspresji genów regulujących konkretne szlaki metaboliczne jest wskaźnikiem wpływu infekcji *E. amylovora* na wzrost rośliny. Wynika to z faktu, że procesy regulowane przez geny odpowiedzialne za reakcje obronne na stresy są silnie indukowane (Khan i wsp. 2018). Ponadto, w badaniach odmian Empire i Gala stwierdzono, że zróżnicowane profile ekspresji genów odporności mogą być także związane z ich odrębnością rodowodową oraz lokalizacją uprawy. Empire, słodko-cierpka odmiana jabłek, została bowiem wyhodowana w stacji doświadczalnej w Genevie (USA) w latach czterdziestych XX wieku w programie krzyżowań z udziałem odmian McIntosh i Red Delicious, podczas gdy odmianę Gala, o łagodnym smaku, jasnożółto-czerwonym kolorze skórki, wyhodowano w Nowej Zelandii w wyniku skrzyżowania odmian Kidd's Orange Red i Golden Delicious (Evans i wsp. 2011).

Transgeniczne genotypy jabłoni z wyższą odpornością na zarazę ogniową / Transgenic apple genotypes with improved resistance to fire blight

Zastosowanie metod inżynierii genetycznej, po raz pierwszy w USA, pozwoliło na uzyskanie roślin transgenicznych

charakteryzujących się podwyższoną odpornością na porażenie przez *E. amylovora* (Vogt i wsp. 2013; Peil i wsp. 2020). Podkładka dla jabłoni M.26 zawierająca gen atacyiny E (białko wytwarzane przez poczwarki jedwabnika morwowego) okazała się bardziej odporna na chorobę w porównaniu z genotypem nietransgenicznym, zaliczanym do bardzo podatnych (Norelli i wsp. 1994). W warunkach polowych, pierwsze testowania transgenicznych jabłoni w kierunku odporności na zarazę ogniową przeprowadzono w 1998 roku na jabłoniach odmiany Royal Gala, których genom wzbogacono o sekwencje genów kodujących atacynę lub białka lityczne, takie jak cekropina czy lizozym bakteriofaga T4. Wykazano wówczas, że kilka roślin transgenicznych miało znacznie podwyższoną odporność na porażenie przez *E. amylovora*, ale najwyższy jej poziom zaobserwowano u roślin zawierających gen białka atacyiny (Aldwinckle i wsp. 2000).

W badaniach przeprowadzonych przez Borejsza-Wysocką i wsp. (2007) w celu uzyskania odpornych na chorobę linii transgenicznych odmiany Galaktyka zastosowano metodę kumulacji cząsteczek RNAi (RNA interfeferencyjny), odpowiedzialnych za wyciszenie ekspresji interesujących genów. Konstrukcje genowe zastosowane w pracy zawierały sekwencje zbliżone do czterech genów z grupy DIPM (odpowiedzialnych za regulację podatności jabłoni na porażenie przez *E. amylovora*). Ich wybór jest zgodny z rozpoznanym mechanizmem relacji patogen–gospodarz, w którym bakteria *E. amylovora* produkuje białko DspA/E, wchodzące w interakcje z białkami jabłoni DspA/E (Interacting-Protein-Molecules – kodowane przez geny DIPM). W wyniku tych oddziaływań obserwuje się zmiany w nasileniu objawów choroby. Wyciszenie dwóch lub więcej genów z grupy DIPM w genomie odmiany Galaktyka skutkowało wzrostem jej odporności na zarazę ogniową (Borejsza-Wysocka i wsp. 2004, 2007).

Inną metodą zwiększania odporności roślin jabłoni na zarazę ogniową jest cisgenезa, pozwalająca na poprawienie wartości hodowlanych odmian poprzez genetyczną modyfikację roślin za pomocą genów o rozpoznanej funkcji, pochodzących z tego samego gatunku (Schouten i wsp. 2006; Gessler i Patocchi 2007). Zgodnie z definicją Schoutena i wsp. (2006) rośliny cisgeniczne opisywane są jako organizmy, które nie zawierają genów, pochodzących z innych gatunków. W innych badaniach, przeprowadzonych przez Broggin i wsp. (2014) podatną na zarazę ogniową odmianę Gala transformowano rozpoznanym wcześniej genem odporności *FB_MR5*, pochodzącym z dzikiego gatunku *M. robusta* 5 (Mr5). Wyniki tych badań wskazały, że wprowadzenie pojedynczego genu, wyizolowanego z puli odpornych genotypów jabłoni, powodowało zwiększenie odporności podatnych odmian (Broggin i wsp. 2014). Cisgeniczną linię jabłoni odmiany Gala Galaxy zawierającą ten sam gen odporności, uzyskano również poprzez jego wprowadzenie do genomu tej odmiany, stosując metodykę z udziałem

specyficznego wektora (nośnika genu) i potwierdzono jej zmniejszoną podatność (Würdig i wsp. 2015). Linia jabłoni C44.4.146, opracowana przez Kost i wsp. (2015), u której potwierdzono wysoką odporność na zarazę, zawiera gen *FB_MR5* kontrolowany przez sekwencje promotora i terminatora [zgodnie z definicją roślin cisgenicznych Schoutena i wsp. (2006)]. Pomimo, że zbadano tylko jedną tak uzyskaną linię cisgeniczną, a odporność regulowana pojedynczym genem *FB_MR5* ma ograniczoną trwałość, to pełna ocena polowa uzyskanych roślin potwierdziła przydatność cisgenезy jako narzędzia do uzyskania nowych odmian o lepszych cechach użytkowych (Schlathölter i wsp. 2023).

Wprowadzanie czynników edycyjnych do komórek roślinnych i edycja genomów, w której pośredniczy kompleks CRISPR (fragment kwasu nukleinowego oraz endonukleazy DNA CAS9), mogą odbywać się przez transfekcję protoplastów [transfer DNA (T-DNA)], za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* lub wstrzeliwanie (ang. bombardment) wyżej wymienionych cząsteczek. Transfekcja protoplastów jest zwykle stosowana do przejściowej oceny ekspresji wprowadzanych genów, podczas gdy transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium* i wstrzeliwanie cząsteczek to dwie główne metody uzyskiwania roślin zawierających edytowany genom (Chen i wsp. 2019). Edycja za pomocą systemu CRISPR/Cas9 jest technologią coraz powszechniej stosowaną w badaniach naukowych, a także w programach hodowlanych w celu nadania nowej lub ulepszonej cechy u odmian/genotypów nowo wytworzonych (Nishitani i wsp. 2016). Pomimo wysokiej złożoności oraz heterozygotyczności genomu jabłoni, utrudniających jego edycję, dotychczasowym sukcesem było edytowanie genów regulujących ważne cechy, jak wczesne kwitnienie i obniżona podatność na zarazę ogniową u odmian Gala i Golden Delicious. W genomach obu odmian, aktywność genu DSP – kodującego białko DspE 4 oraz genu podatności DIPM4, wyedytowano za pomocą systemu CRISPR/Cas9. Wszystkie rośliny homozygotyczne wykazały znaczną redukcję, średnio o 50%, podatności na zarazę ogniową, w porównaniu z roślinami kontrolnymi obu odmian (Pompili i wsp. 2020).

Podsumowanie / Concluding remarks

Ocena podatności odmian i klonów jabłoni na zarazę ogniową jest przydatna nie tylko z punktu widzenia doboru form rodzicielskich do prac hodowlanych, ale przede wszystkim doboru odmian do zakładania sadów, zwłaszcza na terenach endemicznego występowania choroby. Prowadzenie tej oceny w warunkach naturalnych jest utrudnione ze względu na ograniczenia związane z możliwością występowania różnego poziomu źródła inokulum w poszczególnych latach oraz zmiennych warunków środowiskowych.

Dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej, w tym nowoczesnych metod opartych na transgenезie,

cisgenezie i edycji genomów roślinnych, genetyczna odpowiedź jabłoni na zarazę ogniową została szeroko rozpoznana. Uzyskane dane są obecnie wykorzystywane do weryfikacji hipotez dotyczących mechanizmów odporności lub podatności gatunków rodzaju *Malus* na porażenie przez *E. amylovora*. Wstępnie skategoryzowano także geny, które biorą udział m.in. w rozpoznawaniu infekcji, wczesnej sygnalizacji odpowiedzi i ostatecznie w kształtowaniu odporności roślin na chorobę. Dane te dostarczają również potencjalnych genów kandydatów do szybkiej oceny uzyskanych genotypów jabłoni odpornych na chorobę, poprzez selekcję wspomaganą markerami (Marker Assisted Selection – MAS). Przyszłe badania określą, czy geny te współdziałają

z zidentyfikowanymi loci odporności i korelują z wartością cechy fenotypowej.

Finansowanie / Funding

Badania zrealizowano w ramach dotacji celowej Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi – Hodowla i nasiennictwo roślin uprawnych – Zadanie 3.13: „Wytworzenie materiałów wyjściowych jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) o jednolitej barwie skórki, owocujących corocznie oraz odpornych na parcha jabłoni”.

Literatura / References

- Acímović S.G., Zeng Q., McGhee G.C., Sundin G.W., Wise J.C. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science* 6: 16. DOI: 10.3389/fpls.2015.00016
- Aldwinckle H.S., Gustafson H.L., Forsline P.L. 1999. Evaluation of the core subset of the USDA apple germplasm collection for resistance to fire blight. *Acta Horticulturae* 489: 269–272. DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.489.46
- Aldwinckle H., Norelli J., Brown S., Borejsza-Wysocka E., Gustafson H., Reynoird J.-P., Reddy M.V.B. 2000. Genetic engineering of apple for resistance to fire blight. *New York Fruit Quarterly* 8 (1): 17–19.
- Baldo A., Norelli J.L., Farrell Jr R.E., Bassett C.L., Aldwinckle H.S., Malnoy M. 2010. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus × domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 10: 1. DOI: 10.1186/1471-2229-10-1
- Baumgartner I.O., Leumann L.R., Frey J.E., Joos M., Voegele R.T., Kellerhals M. 2012. Breeding apples to withstand infection pressure by fire blight and other diseases. s. 14–21. W: *Proceedings of the 15th International Conference on Organic Fruit-Growing*. Hohenheim, Germany, 20–22 February 2012, 427 ss.
- Bonasera J.M., Kim J.F., Beer S.V. 2006. PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 6: 23. DOI: 10.1186/1471-2229-6-23
- Borejsza-Wysocka E.E., Malnoy M., Meng X., Bonasera J.M., Nissinen R.M., Kim J.F., Beer S.V., Aldwinckle H.S. 2004. Silencing of apple proteins that interact with *DspE*, a pathogenicity effector from *Erwinia amylovora*, as a strategy to increase resistance to fire blight. *Acta Horticulturae* 663: 469–474. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.663.81
- Borejsza-Wysocka E.E., Malnoy M., Norelli J.L., Beer S.V., He S.H. 2007. Strategies for obtaining fire blight resistance in apple by rDNA technology. *Acta Horticulturae* 738: 283–285. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.738.30
- Broggini G.A.L., Wöhner T., Fahrenttrapp J., Kost T.D., Flachowsky H., Peil A., Hanke M.-V., Richter K., Patocchi A., Gessler C. 2014. Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the *FB_MR5* CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus × robusta* 5. *Plant Biotechnology Journal* 12 (6): 728–733. DOI: 10.1111/pbi.12177
- Calenge F., Drouet D., Denancé C., van de Weg W.E., Brisset M.-N., Paulin J.-P., Durel C.-E. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 128–135. DOI: 10.1007/s00122-005-2002-z
- Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70: 667–697. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049
- Cummins J.N., Aldwinckle H.S. 1983. Breeding apple rootstocks. Chapter 10. s. 294–394. DOI: 10.1002/9781118060988.ch10. W: *Plant Breeding Reviews*. Volume 1 (J. Janick, red.). Wiley, 411 ss. Print ISBN 9781118064399. Online ISBN 9781118060988. DOI: 10.1002/9781118060988
- Desnoues E., Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Wisniewski M.E., Evans K.M., Malnoy M., Khan A. 2018. Identification of novel strain-specific and environment-dependent minor QTLs linked to fire blight resistance in apples. *Plant Molecular Biology Reporter* 36: 247–256. DOI: 10.1007/s11105-018-1076-0
- Dougherty L., Wallis A., Cox K., Zhong G.-Y., Gutierrez B. 2021. Phenotypic evaluation of fire blight outbreak in the USDA *Malus* collection. *Agronomy* 11 (1): 144. DOI: 10.3390/agronomy11010144
- Durel C.-E., Denancé C., Brisset M.-N. 2009. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes ‘Evereste’ and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* 52 (2): 139–147. DOI: 10.1139/G08-111
- Emeriewen O.F., Malnoy M., Richter K., Kilian A., Hanke M.-V., Peil A. 2013. Evidence of a major QTL for fire blight resistance in the apple wild species *Malus fusca*. *Acta Horticulturae* 1056: 289–293. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.49
- Emeriewen O.F., Richter K., Berner T., Keilwagen J., Schnable P.S., Malnoy M., Peil A. 2020. Construction of a dense genetic map of the *Malus fusca* fire blight resistant accession MAL0045 using tunable genotyping-by-sequencing SNPs and microsatellites. *Scientific Reports* 10 (1): 16358. DOI: 10.1038/s41598-020-73393-6
- Emeriewen O.F., Richter K., Flachowsky H., Malnoy M., Peil A. 2021. Genetic analysis and fine mapping of the fire blight resistance locus of *Malus × arnoldiana* on linkage group 12 reveal first candidate genes. *Frontiers in Plant Science* 12: 667133. DOI: 10.3389/fpls.2021.667133

- Emeriewen O.F., Richter K., Kilian A., Zini E., Hanke M.-V., Malnoy M., Peil A. 2014. Identification of a major quantitative trait locus for resistance to fire blight in the wild apple species *Malus fusca*. *Molecular Breeding* 34: 407–419. DOI: 10.1007/s11032-014-0043-1
- Emeriewen O.F., Wöhener T., Flachowsky H., Peil A. 2019. *Malus* hosts – *Erwinia amylovora* interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 10: 551. DOI: 10.3389/fpls.2019.00551
- Eppo data base 2020. <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/datasheet> [last updated: 22.04.2020].
- Evans K.M., Patocchi A., Rezzonico F.F., Mathis F., Durel C.E., Fernández-Fernández F., Boudichevskaia A., Dunemann F., Stankiewicz-Kosyl M., Gianfranceschi L., Komjanc M., Lateur M., Madduri M., Noordijk Y., van de Weg W.E. 2011. Genotyping of pedigreed apple breeding material with a genome-covering set of SSRs: trueness-to-type of cultivars and their parentages. *Molecular Breeding* 28: 535–547. DOI: 10.1007/s11032-010-9502-5
- Fahrentrapp J., Broggin G.A.L., Kellerhals M., Peil A., Richter K., Zini E., Gessler C. 2012. A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC–NBS–LRR. *Tree Genetics and Genomes* 9: 237–251. DOI: 10.1007/s11295-012-0550-3
- Fazio G., Aldwinckle H.S., Volk G.M., Richards C.M., Janisiewicz W.J., Forsline P.L. 2009. Progress in evaluating *Malus sieversii* for disease resistance and horticultural traits. *Acta Horticulturae* 814: 59–66. DOI: 10.17660/ActaHortic2009.814.2
- Fischer C., Richter K. 2004. Fire blight resistance apple cultivars produced by conventional breeding. *Acta Horticulturae* 663: 721–724. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.663.129
- Forsline P.L., Aldwinckle H.S. 2002. Natural occurrence of fire blight in USDA apple germplasm collection after 10 years of observation. *Acta Horticulturae* 590: 351–357. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.52
- Gardiner S.E., Norelli J.L., Silva N.D., Fazio G., Peil A., Malnoy M., Horner M., Bowatte D., Carlisle C., Wiedow C., Wan Y., Bassett C.L., Baldo A.M., Celton J.-M., Richter K., Aldwinckle H.S., Bus V.G.M. 2012. Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus* ‘Robusta 5’ accessions. *BMC Genetics* 13: 25. DOI: 10.1186/1471-2156-13-25
- Gessler C., Patocchi A. 2007. *Recombinant DNA Technology in Apple*. s. 113–132. W: Green Gene Technology. *Advanced Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 107 (A. Fiechter, C. Sautter, red.). Springer, Berlin, Heidelberg. Print ISBN 978-3-540-71321-0. Online ISBN 978-3-540-71323-4. DOI: 10.1007/10_2007_053
- Harshman J.M., Evans K.M., Allen H., Potts R., Flamenco J., Aldwinckle H.S., Wisniewski M.E., Norelli J.L. 2017. Fire blight resistance in wild accessions of *Malus sieversii*. *Plant Disease* 101 (10): 1738–1745. DOI: 10.1094/PDIS-01-17-0077-RE
- Jensen P.J., Halbrendt N., Fazio G., Makalowska I., Altman N., Praul C., Maximova S.N., Ngugi H.K., Crassweller R.M., Travis J.W., McNellis T.W. 2012. Rootstock-regulated gene expression patterns associated with fire blight resistance in apple. *BMC Genomics* 13: 9. DOI: 10.1186/1471-2164-13-9
- Jensen P.J., Rytter J., Detwiler E.A., Travis J.W., McNellis T.W. 2003. Rootstock effects on gene expression patterns in apple tree scions. *Plant Molecular Biology* 53: 493–511. DOI: 10.1023/B:PLAN.0000019122.90956.3b
- Kása K., Hevesi M., Tóth M.G. 2004. Evaluation of traditional Hungarian apple cultivars as sources of resistance to fire blight. *Acta Horticulture* 663: 225–228. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.663.35
- Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Korbin M. 2009. Molecular screening of apple (*Malus domestica*) cultivars and breeding clones for their resistance to fire blight. [Ocena przydatności wybranych markerów molekularnych QTL do szybkiej oceny odmian i klonów hodowlanych jabłoni (*Malus domestica*) jako donorów odporności na zarazę ogniową w programach hodowli]. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17 (2): 31–43.
- Kellerhals M., Baumgartner I.O., Leumann L., Frey J.E., Patocchi A. 2013. Progress in pyramiding disease resistances in apple breeding. *Acta Horticulturae* 976: 487–491. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.976.68
- Kellerhals M., Baumgartner I.O., Leumann L., Lussi L., Schütz S., Patocchi A. 2014. Breeding high quality apples with fire blight resistance. *Acta Horticulturae* 1056: 225–230. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.36
- Kellerhals M., Franck L., Baumgartner I.O., Patocchi A., Frey J.E. 2011. Breeding for fire blight resistance in apple. *Acta Horticulturae* 896: 385–389. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.55
- Kellerhals M., Schütz S., Patocchi A. 2017. Breeding for host resistance to fire blight. *Journal of Plant Pathology* 99 (Special issue): 37–43.
- Kellerhals M., Szalatnay D., Hunziker K., Duffy B., Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Höfer M., Richter K., Lateur M. 2012. European pome fruit genetic resources evaluated for disease resistance. *Trees* 26: 179–189. DOI: 10.1007/s00468-011-0660-9
- Khan A., Desnoues E., Clark M. 2018. Bacterial strain affects cultivar response to fire blight in apples. *Fruit Quarterly* 26 (2): 15–20.
- Khan M.A., Duffy B., Gessler C., Patocchi A. 2006. QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Molecular Breeding* 17: 299–306. DOI: 10.1007/s11032-006-9000-y
- Khan M.A., Durel C.E., Duffy B., Drouet D., Kellerhals M., Gessler C., Patocchi A. 2007. Development of molecular markers linked to the ‘Fiesta’ linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome* 50 (6): 568–577. DOI: 10.1139/g07-033
- Khan M.A., Zhao Y., Korban S.S. 2012. Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 247–260. DOI: 10.1007/s11105-011-0334-1
- Khan M.A., Zhao Y., Korban S.S. 2013. Identification of genetic loci associated with fire blight resistance in *Malus* through combined use of QTL and association mapping. *Physiologia Plantarum* 148 (3): 344–353. DOI: 10.1111/pp.12068
- Kost T.D., Gessler C., Jänsch M., Flachowsky H., Patocchi A., Broggin G.A.L. 2015. Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLOS ONE* 10 (12): e0143980. DOI: 10.1371/journal.pone.0143980
- Kostick S.A., Norelli J.L., Evans K.M. 2019. Novel metrics to classify fire blight resistance of 94 apple cultivars. *Plant Pathology* 68 (5): 985–996. DOI: 10.1111/ppa.13012
- Kostick S.A., Teh S.L., Norelli J.L., Vanderzande S., Peace C., Evans K.M. 2021. Fire blight QTL analysis in a multi-family apple population identifies a reduced-susceptibility allele in ‘Honeycrisp’. *Horticulture Research* 8: 28. DOI: 10.1038/s41438-021-00466-6

- Lamichhane J.R., Osdaghi E., Behlau F., Köhl J., Jones J.B., Aubertot J.-N. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 38: 28. DOI: 10.1007/s13593-018-0503-9
- Le Lezec M., Lecomte P., Laurens F., Michelesi J.C. 1997. Sensibilité variétale au feu bactérien (1^{re} partie). *L'Arboriculture Fruitière* 503: 57–62.
- Le Lezec M., Paulin J.P., Lecomte P. 1987. Shoot and blossom susceptibility to fire blight of apple cultivars. *Acta Horticulturae* 217: 311–315. DOI: 10.17660/ActaHortic.1987.217.54
- Lee S.A., Ngugi H.K., Halbrendt N.O., O'Keefe G., Lehman B., Travis J.W., Sinn J.P., McNellis T.W. 2010. Virulence characteristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. *Phytopathology* 100 (6): 539–550. DOI: 10.1094/PHYTO-100-6-0539
- Lespinasse Y., Aldwinckle H.S. 2000. Breeding for resistance to fire blight. s. 253–273. W: Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora* (J.L. Vanneste, red.). CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 370 ss. ISBN 0-85199-294-3.
- Luby J.J., Alspach P.A., Bus V.G.M., Oraguzie N.C. 2002. Field resistance to fire blight in a diverse apple (*Malus* sp.) germplasm collection. *Journal of American Society for Horticultural Science* 127 (2): 245–253. DOI: 10.21273/jashs.127.2.245
- Luby J., Forsline P., Aldwinckle H., Bus V., Geibel M. 2000. Silk road apples—collection, evaluation, and utilization of *Malus sieversii* from Central Asia. *HortScience* 36 (2): 225–231. DOI: 10.21273/HORTSCI.36.2.225
- Malnoy M., Martens S., Norelli J.L., Barny M.-A., Sundin G.W., Smits T.H.M., Duffy B. 2012. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annual Review of Phytopathology* 50 (1): 475–494. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172931
- McGrath M.J., Koczan J.M., Kennelly M.M., Sundin G.W. 2009. Evidence that prohexadione-calcium induces structural resistance to fire blight infection. *Phytopathology* 99 (5): 591–596. DOI: 10.1094/PHYTO-99-5-0591
- Mohan S.K., Fallahi E., Bijman V.P. 2002. Evaluation of apple varieties for susceptibility to *Erwinia amylovora* by artificial inoculation under field conditions. *Acta Horticulturae* 590: 373–375. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.56
- Nishitani C., Hirai N., Komori S., Wada M., Okada K., Osakabe K., Yamamoto T., Osakabe Y. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6: 31481. DOI: 10.1038/srep31481
- Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Beer S.V. 1984. Differential host × pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 74 (2): 136–139.
- Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Destéfano-Beltrán L., Jaynes J.M. 1994. Transgenic 'Mailing 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77: 123–128. DOI: 10.1007/BF02551474
- Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Holleran H.T., Robinson T.L., Johnson W.C. 2002. Resistance of 'Geneva' apple rootstocks to *Erwinia amylovora* when grown as potted plants and orchard trees. *Acta Horticulturae* 590: 359–362. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.53
- Norelli J.L., Farrell Jr. R.E., Bassett C.L., Baldo A.M., Lalli D.A., Aldwinckle H.S., Wisniewski M.E. 2009. Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis. *Tree Genetics and Genomes* 5: 27–40. DOI: 10.1007/s11295-008-0164-y
- Norelli J.L., Jones A.L., Aldwinckle H.S. 2003. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease* 87 (7): 756–765. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.7.756
- Paulin J.P., Lespinasse Y. 1990. Pathogenicity of strains of *Erwinia amylovora* to some apple cultivars in the greenhouse. *Acta Horticulturae* 273: 319–326.
- Peil A., Bus V.G.M., Geider K., Richter K., Flachowsky H., Hanke M.-V. 2009. Improvement of fire blight resistance in apple and pear. *International Journal of Plant Breeding* 3 (1): 1–27.
- Peil A., Emeriewen O.F., Khan A., Kostick S., Malnoy M. 2020. Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology* 103 (Suppl 1): 3–12. DOI: 10.1007/s42161-020-00581-8
- Peil A., Flachowsky H., Hanke M.V., Richter K., Rode J. 2011. Inoculations of *Malus × robusta* 5 progeny with a strain breaking resistance to fire blight reveals a minor QTL on LG5. *Acta Horticulturae* 896: 357–362. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.49
- Peil A., Garcia-Libreros T., Ritcher K., Trognitz F.C., Trognitz B., Hanke M.-V., Flachowsky H. 2007. Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breeding* 126 (5): 470–475. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01408.x
- Peil A., Hübert C., Wensing A., Horner M., Emeriewen O.F., Richter K., Wöhner T., Chagné D., Orellana-Torrejon C., Saeed M., Troggio M., Stefani E., Gardiner S.E., Hanke M.-V., Flachowsky H., Bus V.G.M. 2019. Mapping of fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 flowers following artificial inoculation. *BMC Plant Biology* 19: 532. DOI: 10.1186/s12870-019-2154-7
- Pompili V., Dalla Costa L., Piazza S., Pindo M., Malnoy M. 2020. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnology Journal* 18 (3): 845–858. DOI: 10.1111/pbi.13253
- Psallidas P.G., Tsiantos J. 2000. Chemical control of fire blight. s. 199–234. W: Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora* (J.L. Vanneste, red.). CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 370 ss. ISBN 0-85199-294-3.
- Puławska J., Sobiczewski P. 2012. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. *Trees* 26: 3–12. DOI: 10.1007/s00468-011-0643-x
- Richter K., Fischer C. 2002. Stability of fire blight resistance in apple. *Acta Horticulturae* 590: 381–384. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.58
- Schlathölder I., Broggin G.A.L., Streb S., Studer B., Patocchi A. 2023. Field study of the fire-blight-resistant cisgenic apple line C44.4.146. *The Plant Journal* 113 (6): 1160–1175. DOI: 10.1111/tj.16083
- Schoofs H., Deckers T., Verjans W., Bylemans D. 2014. Fire blight control strategy in Belgium. *Acta Horticulturae* 1056: 57–64. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.6
- Schouten H.J., Krens F.A., Jacobsen E. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports* 7 (8): 750–753. DOI: 10.1038/sj.embor.7400769
- Sillerova J., Korba J., Paprstein F., Sedlak J. 2014. Testing of susceptibility level of Czech apple cultivars to fire blight (*Erwinia amylovora*) in field conditions. *Acta Horticulturae* 1056: 267–270. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.45

- Sobiczewski P. 2011. Integrated management of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple and pear. *Rastenių dīi Nauki* (Plant science) 48 (1): 6–13.
- Sobiczewski P., Bielicki P. 2022. Nowy status sprawcy zarazy ogniowej. *Miesięcznik Praktycznego Sadownictwa SAD* 4/2022: 40–47.
- Sobiczewski P., Bubán T. 2004. The effect of Regalis® (prohexadione calcium) on the reduction of fire blight (*Erwinia amylovora*) severity in apple trees. *International Journal of Horticultural Science* 10 (2): 61–66. DOI: 10.31421/IJHS/10/2/462
- Sobiczewski P., Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Mikiciński A., Maciorowski R. 2021. Phenotypic and marker-assisted characterization of new apple genotypes with high resistance to fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 161: 49–61. DOI: 10.1007/s10658-021-02303-x
- Sobiczewski P., Peil A., Mikiciński A., Richter K., Lewandowski M., Żurawicz E., Kellerhals M. 2015. Susceptibility of apple genotypes from European genetic resources to fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology* 141: 51–62. DOI: 10.1007/s10658-014-0521-7
- Sobiczewski P., Suski Z.W. 1988. Fireblight in Poland. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18 (3): 375–379.
- Sobiczewski P., Żurawicz E., Berczyński S., Lewandowski M. 2004. Terminal shoot susceptibility of new Polish apple cultivars to fire blight (*Erwinia amylovora*). [Ocena podatności nowych polskich odmian i klonów jabłoni na zarazę ogniową]. *Folia Horticulturae* 16 (2): 149–157.
- Sobiczewski P., Żurawicz E., Berczyński S., Lewandowski M. 2006. Fire blight susceptibility of new apple cultivars and clones from Poland. *Acta Horticulturae* 704: 551–556. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.704.88
- Sobiczewski P., Żurawicz E., Berczyński S., Mikiciński A., Lewandowski M. 2008. The importance of the type of *Erwinia amylovora* inoculum in screening of apple genotypes susceptibility to fire blight. [Znaczenie rodzaju inokulum *Erwinia amylovora* w badaniach nad oceną podatności genotypów jabłoni na zarazę ogniową]. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16: 305–313.
- Steiner P. 2000. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. s. 339–358. W: *Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (J.L. Vanneste, red.). CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 370 ss. ISBN 0-85199-294-3.
- Stockwell V.O., Duffy B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE - Office International des Epizooties* 31 (1): 199–210. DOI: 10.20506/rst.31.1.2104
- Szalatnay D., Eder-Bauermeister R., Duffy B., Kellerhals M. 2009. Characterization of fruit genetic resources in Switzerland. *Acta Horticulturae* 814: 143–148. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.814.17
- Tegmeier R., Pompili V., Singh J., Micheletti D., Silva K.J.P., Malnoy M., Khan A. 2020. Candidate gene mapping identifies genomic variations in the fire blight susceptibility genes *HIPM* and *DIPM* across the *Malus* germplasm. *Scientific Reports* 10: 16317. DOI: 10.1038/s41598-020-73284-w
- Thibault B., Le Lezec M. 1990. Sensibilité au feu bactérien des principales variétés de pommier et de poirier utilisées en Europe. s. 96–109. W: *Fire Blight of Pomoideae (Erwinia amylovora, Burrill, Winslow et al.)*. Applied Research in Europe (1978–1988). EUR 12601, ECSC-EEC-EAEC, Brussels-Luxembourg.
- van der Zwet T., Keil H.L. 1979. *Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous Plants*. Agriculture Handbook Number 510. United States Department of Agriculture, Washington, D.C., 200 ss.
- van der Zwet T., Orolaza-Halbrecht N., Zeller W. 2012. *Fire Blight: History, Biology and Management*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA. ISBN 978-0-89054-483-9. DOI: 10.1094/9780890544839
- Vanneste J.L. 2000. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? s. 1–6. W: *Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (J.L. Vanneste, red.). CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 370 ss. ISBN 0-85199-294-3.
- Vogt I., Wöhner T., Richter K., Flachowsky H., Sundin G.W., Wensing A., Savory E.A., Geider K., Day B., Hanke V.-M., Peil A. 2013. Gene-for-gene relationship in the host–pathogen system *Malus × robusta* 5–*Erwinia amylovora*. *New Phytologist* 197 (4): 1262–1275. DOI: 10.1111/nph.12094
- Würdig J., Flachowsky H., Saß A., Peil A., Hanke M.V. 2015. Improving resistance of different apple cultivars using the *Rvi6* scab resistance gene in a cisgenic approach based on the *Flp/FRT* recombinase system. *Molecular Breeding* 35: 95. DOI: 10.1007/s11032-015-0291-8