

Print: ISSN 1867-0911
Internet: ISSN 1867-0938
Band 74 | Nr. 11-12
2022



Journal für Kulturpflanzen

Journal of Cultivated Plants



Von Mendel zur Genomeditierung

Online Version: <https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal/index>

Journal für Kulturpflanzen vereint mit Pflanzenbauwissenschaften

Print: ISSN 1867-0911, Internet: ISSN 1867-0938

Website: <https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal>

Charakteristik

Bei uns steht die Kulturpflanze mit all ihren Facetten im Mittelpunkt. Alle publizierten Beiträge haben einen starken Bezug zur angewandten Forschung und unterstreichen die Bedeutung und Chancen der gewonnenen Erkenntnisse für die land- und gartenbauliche Praxis. Im Bereich der Forschung an Kulturpflanzen nehmen wir Beiträge aus allen einschlägigen Fachgebieten entgegen, z. B. Bodenkunde, Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft, Garten-, Obst- und Weinbau, Pflanzengenetik und Pflanzenzüchtung, Pflanzenschutz und Pflanzengesundheit sowie Agrartechnik.

Wir publizieren deutsch- und englischsprachige Original- und Übersichtsarbeiten sowie Kurzmitteilungen. Im redaktionellen Teil der Zeitschrift erscheinen außerdem Nachrichten, Personalien und Buchbesprechungen sowie Mitteilungen einschlägiger Fachgesellschaften.

Verantwortlicher Herausgeber / Editor-in-Chief

Prof. Dr. Frank Ordon, Präsident und Professor des Julius Kühn-Instituts – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Schriftleitung / Managing Editor

Dr. Anja Hühnlein, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Tel.: 03946/47-2206, E-Mail: journal-kulturpflanzen@julius-kuehn.de

Co-Schriftleitung

Dr. Heike Riegler (JKI Quedlinburg)

Co-Schriftleitung Pflanzenbauwissenschaften

Prof. Dr. Hans-Peter Kaul (Universität für Bodenkultur Wien)

Redaktionsbeirat / Editorial Board

Prof. Dr. Henryk Flachowsky (JKI Dresden)

Prof. Dr. Simone Graeff-Hönniger (Universität Hohenheim)

Prof. Dr. Jörg Michael Greef (JKI Braunschweig)

Prof. Dr. Johannes Hallmann (JKI Braunschweig)

Dr. Olaf Hering (JKI Berlin)

Prof. Dr. Johannes Jehle (JKI Darmstadt)

Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann (JKI Dossenheim)

Dr. Hella Kehlenbeck (JKI Kleinmachnow)

Dr. Heinz-Josef Koch (Institut für Zuckerrübenforschung Göttingen)

Dr. Andrea Krähmer (JKI Berlin)

Prof. Dr. Carola Pekrun (Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen)

Dr. Jens Pistorius (JKI Braunschweig)

Dr. Bernhard Carl Schäfer (JKI Braunschweig)

Prof. Dr. Frank Marthe (JKI Quedlinburg)

Prof. Dr. Hartmut Stützel (Leibniz Universität Hannover)

Prof. Dr. Friedhelm Taube (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)

Prof. Dr. Reinhard Töpfer (JKI Siebeldingen)

Dr. Ute Katharina Vogler (JKI Braunschweig)

Prof. Dr. Jens Karl Wegener (JKI Braunschweig)

Dr. Peter Wehling (JKI Groß Lüsewitz)

Dr. Ralf Wilhelm (JKI Quedlinburg)

Prof. Dr. Peter Zwerger (JKI Braunschweig)

Wissenschaftlicher Beirat

Prof. Dr.-Ing. Frank Beneke (Georg-August-Universität Göttingen)

Prof. Dr. Klaus Dittert (Georg-August-Universität Göttingen)

Prof. Dr. Wolfgang Friedt (Justus-Liebig-Universität Gießen)

Prof. Dr. Bernward Märländer (Institut für Zuckerrübenforschung Göttingen)

Elmar Pfülb (Bundessortenamt Hannover)

Mag. Astrid Plenk (AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH)

Dr. Ellen Richter (Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen)

Prof. Dr. Joseph-Alexander Verreet (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)

Manuskripteinreichung

Bitte reichen Sie Original- und Übersichtsarbeiten sowie Kurzmitteilungen und Nachrichten über das elektronische Zeitschriftenverwaltungssystem ein:

<https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal>.

Um die Einreichung zu beginnen, registrieren Sie sich als Nutzer der Zeitschrift über einen Klick auf „Registrieren“ im oberen rechten Bildschirmrand. Nach erfolgreicher Manuskripteinreichung erhalten Sie eine Bestätigung per E-Mail. Indem Sie sich mit Ihrem Benutzernamen und Passwort im System anmelden, können Sie jederzeit den Status Ihrer Einreichung einsehen.

Bei Fragen zur Manuskripteinreichung kontaktieren Sie gern die Schriftleiterin Dr. Anja Hühnlein (Tel.: 03946 47-2206, E-Mail: journal-kulturpflanzen@julius-kuehn.de).

Verlag

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Realisierung

Layout-Design: Anja Wolck (JKI Berlin)

Technische Implementierung und Produktion: mediaTEXT Jena GmbH, Richard-Sorge-Straße 6 a/b, 07747 Jena.

Druck

ROCO Druck GmbH, Neuer Weg 48 A, 38302 Wolfenbüttel.

Copyright

Seit Januar 2019 werden alle Beiträge im Journal für Kulturpflanzen als Open-Access-Artikel unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Frank Ordon¹, Wolf von Rhade²

Gregor Mendel – ein genialer Forscher

Affiliationen

¹Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg.

²Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e. V. (GFPi), Bonn.

Kontaktanschrift

Präsident und Professor Prof. Dr. Frank Ordon, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, email: praesident@julius-kuehn.de

Gregor Mendel hat die Welt verändert. Ihm ist es zu verdanken, dass wir basierend auf seinen Erkenntnissen zur Vererbung heute in der Lage sind, effizient und gezielt Sorten zu züchten, die einen Beitrag zur Welternährung, zur Anpassung an den Klimawandel und zum Erreichen der Ziele der „Farm to Fork“-Strategie leisten.

Am 20. Juli 2022 hätte Mendel seinen 200. Geburtstag gefeiert. Gregor Mendel war vielseitig interessiert. Denn er war Biologe, Physiker und Mathematiker, Philosoph, und er interessierte sich für Meteorologie und Bienenzucht. Seine bedeutendste Studie bleibt aber die über Pflanzenhybriden. Dieses einzigartige Werk des Vaters der Genetik wirkt noch heute in die Pflanzenwissenschaften und Pflanzenforschung und bildet die Grundlage systematischer Pflanzenzüchtung.

Als Gregor Mendel in Heinzendorf (bei Odrau – Österreichisch Schlesien) zur Welt kam, war Europa weit entfernt von stabilen Lebensverhältnissen. Hungersnöte und politische Unterdrückung prägten das Leben vieler Menschen. Die Kindheit des hochbegabten Jungen und seiner Schwestern war geprägt von Arbeit und Entbehrung in der kleinbäuerlichen Landwirtschaft der Eltern. Der einzige Sohn konnte den ihm eigentlich vorgezeichneten Weg dennoch verlassen und studieren, musste aber sein Studium der Philosophie aus „bitteren Nahrungssorgen“ abbrechen und trat dem Kloster in Brünn bei. Dort fand Mendel beste Voraussetzungen für seine Experimente und die wohlhabenden Bürger in diesem mährischen Ort investierten auch in Forschung, um den Ertrag auf ihren landwirtschaftlichen Gütern zu erhöhen. Über 30.000 Kreuzungen führte Mendel im Klostergarten durch, untersuchte jeweils 7 verschiedene Merkmale und hielt akribisch alles fest. Die Erkenntnis, dass Vererbung logischen Mustern folgt und es so etwas wie Elemente (heute Gene) gibt, stellte er 1865 vor. Er erfuhr aber keinen Zuspruch. Zu revolutionär war dieser Ansatz und entgegen gängiger Meinung. Mendel blieb von seinen Arbeiten überzeugt – wie der Satz „Meine Zeit wird schon noch kommen“, belegt. Im Jahr 1866 veröffentlichte er seine Erkenntnisse noch einmal schriftlich unter dem Titel „Versuche über Pflanzen-Hybriden“. Mendel konnte nicht mehr erleben, zu welchem Ruhm seine Erkenntnisse zur Vererbung (Mendelsche Regeln) gelangen sollten. Am 6. Januar 1884

verstarb der angesehene Bürger Brünns. Die Gesellschaft zur Förderung des Ackerbaues, der Natur- und Landeskunde veröffentlichte in einem Nachruf: „**Seine Experimente mit Pflanzenhybriden eröffneten eine neue Ära**“.

Diese Ära wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts eröffnet, als Wissenschaftler unabhängig voneinander seine Erkenntnisse wiederentdeckten und erneut diskutierten. Vor allem die praktische Züchtung profitierte, denn sie begann, Pflanzen mit klar definierten Zuchtzielen systematisch zu kreuzen und anschließend die spaltenden Populationen gezielt zu selektieren. Die Mendelschen Regeln und weitergehende Erkenntnisse zur quantitativen Genetik versetzten die Pflanzenzüchter in die Lage, die Erträge ihrer Kulturpflanzen durch gezielte Kreuzungen zu steigern – bei Weizen und Raps konnten sie im Lauf des letzten Jahrhunderts annähernd vervierfacht, die von Zuckerrüben und Kartoffeln mehr als verdoppelt werden.

Neben der direkten Anwendung in der praktischen Pflanzenzüchtung sind Mendels Erkenntnisse auch in der aktuellen Züchtungsforschung nach wie vor von Bedeutung. So konnten beispielsweise durch Vererbungsstudien zunächst verschiedene Resistenzgene gegen bedeutende Pathogene identifiziert und unter Einbeziehung der Erkenntnisse von Thomas Hunt Morgan (Kopplung) molekulare Marker für diese entwickelt werden, welche heute eine effektive markergestützte Selektion ermöglichen. Diese Marker waren gleichzeitig auch Ausgangspunkt für die Isolation entsprechender Gene mittels kartengestützter Klonierung. Isolierte Gene sind die Grundlage für die Nutzung neuer Züchtungstechnologien, z. B. CRISPR/Cas, welche die Züchtung neuer Sorten im Hinblick auf entsprechende Merkmale deutlich verkürzt.

Viele landwirtschaftlich bedeutende Eigenschaften, z. B. Toleranz gegenüber abiotischem Stress – wie Hitze und Trockenheit – werden in der Regel nicht von einem oder wenigen Genen kontrolliert; sie sind vielmehr polygenisch vererbt und zeigen daher eine typische quantitative Merkmalsausprägung. Für die Züchtung und Verbesserung solch komplexer Merkmale wurden Ansätze entwickelt, so z. B. die QTL Analyse, in der komplexe Merkmale in einzelne (mendelnde) Loci zerlegt werden, die einen Teil der beobachteten Varianz erklären. Auf Basis der



(c) Die Autoren 2022

Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Mendelschen Regeln und weiteren Entwicklungen im biotechnologischen und molekularen Bereich findet die Pflanzenzüchtung heute nicht mehr empirisch, sondern wissenschaftsbasiert statt und leistet einen erheblichen Beitrag, um den Herausforderun-

gen der Zukunft (s. o.) zu begegnen. Damals wie heute gilt jedoch: auch ein unermüdlicher Forscher braucht Förderer und: Innovation braucht wissenschaftliche und gesellschaftliche Akzeptanz, um die Welt zu verändern.



| Prof. Dr. Frank Ordon



| Wolf von Rhade

Wolfgang Friedt¹, Frank Ordon²

Mendel's Laws and their impact on plant breeding

Zur Bedeutung der Mendel'schen Regeln für die Pflanzenzüchtung

Affiliations

¹Justus Liebig University Giessen, Institute for Agronomy and Plant Breeding, Giessen, Germany.²Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany.

Correspondence

Prof. Dr. Wolfgang Friedt, Institute for Agronomy and Plant Breeding, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany, email: wolfgang.friedt@agr.uni-giessen.de

Abstract

Cereals like wheat, rice, maize, barley and millets, feed the world. Therefore, global breeding activities, which had been very successful during the last decades, aim at an increase of cereal yields. This, as expected continued success story is the result of the extensive observations and formulation of the fundamental genetic rules that bear his name as *Mendel's law of inheritance* (T.H. Morgan 1911). *Mendel's* thinking in "heritable characters" resembling structural "genes", was the basis for a better understanding of the genetic principles of inheritance; The application of these principles in systematic plant breeding has then allowed the continuous development of improved cultivars.

Plant characteristics controlled by a few or only one gene were the first candidates for improvement since they allowed the direct application of Mendel's rules. Typical examples are resistances against diseases, e.g. due to fungal pathogens or viruses. Today, most of the wheat and barley cultivars grown in Europe are resistant to many diseases. The discovery of resistance of barley against soil-borne barley yellow mosaic virus disease and the clarification of its genetic control is an impressive example for the direct application of Mendel's law. The respective extensive research was the basis for developing a multitude of resistant barley varieties during recent decades. Numerous further examples for resistance of crop plants against pathogens could be mentioned, here. Such "Mendel genes" can be genetically marked and localized, which subsequently enables marker-assisted selection. They were also among the first to be isolated. Isolated genes are the basis to apply new breeding technologies, e.g. CRISPR/Cas, and to transfer the respective genes to other varieties, species or taxa with the help of biotechnological tools.

Due to the obviously increasing effects of climate change, it will be necessary in the future to breed new varieties with higher tolerance to abiotic stress – such as heat and drought. Such traits are usually not controlled by one or a few genes; rather, they are polygenically inherited and therefore show a typical quantitative distribution of respective traits. This also applies

to crop yield and relevant quality traits. New approaches have been developed for breeding and improving such complex traits e.g. QTL analyses separating complex traits into several *Mendelian* loci explaining part of the variance observed and „genomic selection" are widely applied today. In this process, suitable genotypes are examined for genetic variation that indicates a desired trait expression (phenotype). In this way, a continuous optimisation of methodology takes place in today's knowledge-based plant breeding on the basis of Mendel's rules via empirical ("classical") methodology. This will be the cornerstone to improve the yield potential, yield stability and quality of plants in the future.

Keywords

genetics, genotype, haploids, inheritance, Mendel's law, monogenic traits, phenotype, plant breeding, polygenic traits, polyploidy, quantitative traits

Zusammenfassung

Die landwirtschaftliche Pflanzenproduktion wurde im Laufe des letzten Jahrhunderts erheblich gesteigert; so konnte die weltweite Weizenproduktion seit den 1970er Jahren durch Züchtung und effektivere Produktionstechnik fast verdoppelt werden. Auch die Getreidearten Reis, Mais, Gerste und Hirse haben heute eine große globale Bedeutung als Grundlage für Nahrungs- und Futtermittel.

Diese Erfolgsgeschichte wäre ohne die Erkenntnisse von Gregor Mendel so nicht möglich gewesen. Mendel hat Vererbungsmuster erkannt und beschrieben, die er als „vererbare Eigenschaften" bezeichnete. Das Denken in Faktoren (d. h. „Genen") war die Grundlage für ein besseres Verständnis der Vererbung von Eigenschaften; Die Anwendung der Mendel'schen Regeln in der systematischen Pflanzenzüchtung ermöglichte die kontinuierliche Entwicklung neuer Sorten mit verbesserter Resistenz gegen Krankheiten und Schädlinge sowie besserer Produktqualität. Dies war möglich, weil diese Merkmale häufig von wenigen oder auch einzelnen Genen – monogenisch – ge-



(c) The authors 2022

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

steuert werden. Ein Beispiel für solche „Mendel’schen Gene“ ist die Resistenz der Gerste gegen die bodenbürtige Gelbmosaikvirose. Eine Vielzahl weiterer Beispiele, z. B. Resistenzen gegen Mehltau und Rostkrankheiten, sind bekannt. Diese Gene können mittels molekularer Methoden markiert und lokalisiert und somit in markergestützten Selektionsverfahren genutzt werden. Auch gehörten sie zu den ersten, die physisch isoliert werden konnten. Isolierte Gene sind die Grundlage für die Nutzung neuer Züchtungstechnologien, z. B. CRISPR/Cas, und sie können mithilfe biotechnologischer Verfahren auch auf andere Sorten, Arten oder Taxa übertragen werden.

Aufgrund der offensichtlich zunehmenden Auswirkungen des Klimawandels wird es in Zukunft notwendig sein, neue Sorten mit einer besseren Toleranz gegenüber abiotischem Stress – wie Hitze und Trockenheit – zu züchten. Solche Eigenschaften werden in der Regel nicht von einem oder wenigen Genen kontrolliert; sie sind vielmehr polygenisch vererbt und zeigen daher eine typische quantitative Merkmalsausprägung. Dies gilt auch für die Höhe des Ernteertrags und maßgebliche Qualitätsmerkmale. Für die Züchtung und Verbesserung solcher komplexer Merkmale wurden in jüngerer Zeit neue Ansätze entwickelt, so z. B. die QTL Analyse, in der komplexe Merkmale in einzelne Loci zerlegt werden, die einen Teil der beobachteten Varianz erklären; in jüngster Zeit kommen sogenannte genomische Selektionsverfahren hinzu. Auf diese Weise findet in der heutigen wissenschaftsbasierten Pflanzenzüchtung auf der Grundlage der Mendel’schen Regeln über die empirische („klassische“) Methodik hinaus eine kontinuierliche Erweiterung und Optimierung des Methodenspektrums statt. Damit wird auch künftig eine Verbesserung des Ertragspotentials, der Ertragsstabilität und der Qualität von pflanzlichen Produkten möglich sein.

Stichwörter

Genetik, Genotyp, Haploide, Mendel’sche Regeln, monogenische Merkmale, Phänotyp, Pflanzenzüchtung, poly-

genische Merkmale, Polyploidie, quantitative Merkmale, Vererbung

Introduction

Agricultural plant production has increased considerably during the last century. Wheat, rice, maize, barley and millets, have an enormous global importance as the basis of food and feed. For example, wheat yield in central Europe increased from 2 to 8 t/ha in the last century and since the 1970s, world production of wheat has been duplicated and risen in Germany by a factor of 2.3-2.4 (Table 1). This is primarily due to the enhancement of yield by breeding and improved agricultural technology and the interaction between both, e.g. shorter cultivars facilitated higher nitrogen fertilization resulting in higher yields.

This success story would have been impossible without the findings of Gregor Mendel, who detected and reported patterns of inheritance, which he defined as “heritable characters”. Thinking in factors, resembling structural “genes”, was the basis for a better understanding of the genetic principles of inheritance, and the application of the so-called “Mendel’s Law” in plant breeding has allowed the continuous development of improved cultivars.

Applying these principles, essential traits of crop plants have been continuously improved, e.g. resistance against diseases, pests and product quality. This was possible because these traits are often controlled by relatively few or even single genes. Many of such genes have already been identified decades ago by classical segregation analyses and tests for allelism. For that reason, most of current crop varieties are resistant against major diseases, e.g. wheat and barley against powdery mildew or different rusts. Such “Mendelian genes” were amongst the first to be investigated by molecular methods and finally isolated combining Mendelian segregation analyses with the findings of Thomas Hunt Morgan (1911 and

Table 1. Acreage, grain yield and total production of bread wheat in the world, in Europe and in Germany; comparison of the years 1971-73, 1991-1993, 2011-2013, and 2018-2020 (3 year means each, FAOSTAT 06/2022)

	Period	Harvest area 1,000 ha	Grain yield dt/ha	Production 1,000 t	Production increase vs. 1971-1973
World	2018-2020	216,282	34.80	752,682	2.13x
	2011-2013	218.659	31.77	694.690	1.97x
	1991-1993	222.926	25.07	558.888	1.58x
	1971-1973	215.687	16.38	353.287	
Europe	2018-2020	61,548	41.33	254,447	1.46x
	2011-2013	57.129	37.63	215.135	1.24x
	1991-1993	62.493	30.74	190.645	1.10x
	1971-1973	89.158	19.51	173.997	
Germany	2018-2020	2,997	72.97	21.833	2.26x
	2011-2013	3.146	74.48	23.417	2.42x
	1991-1993	2.482	64.45	15.974	1.65x
	1971-1973	2.264	42.70	9.660	

later) on linkage of genes in genetic mapping and map-based cloning. Molecular markers today facilitate efficient marker-based selection procedures and pyramiding of resistance genes. Furthermore, isolated genes can also be efficiently modified today by genome editing tools such as CRISPR/Cas.

Due to obviously increasing effects of climate change, it will be necessary in the future to develop new varieties with a better tolerance against abiotic stress, e.g. heat, and drought. Traits like yield or yield components are usually not controlled by one or a few genes but several or even many genes. They are determined polygenically, and in addition, these traits are influenced by the interaction of the genotype by the environment. Therefore, no Mendelian classes may be detectable but they show a typical mode of quantitative trait expression i.e. a Gaussian distribution. However, by applying QTL-analyses these traits can be separated into Mendelian factors, so called quantitative trait loci (QTL), i.e. genomic regions explaining a certain amount of the phenotypic variance. This is also true for yield and a number of major quality traits. For breeding and improvement of such complex traits, new approaches – “genomic prediction and selection” – have been developed recently. Here, genotypes are screened for genetic variation giving hint to a specific, wishful trait expression (phenotype). This way, starting from Mendel's laws via the empirical development and application of breeding schemes, a continuous extension and optimization of methodology takes place in today's knowledge-based plant breeding. This will enable the further elevation of yield potential, of yield stability and the quality of crop plant products in the future.

The Mendel findings and their preconditions

- Why did Mendel choose the pea as the experimental plant?
- Pea was a common model plant at the time, because keeping of and caring for peas is relatively easy, the plants grow quickly and the generation time is short.
- There are easily recognisable characteristics such as plant size, flower colour, pod shape and pod colour, seed shape or cotyledon colour.
- The plants are relatively small, so they require little greenhouse or field space.
- Peas reproduce by self-fertilisation, so that clear segregation ratios occur in cross progeny.
- The plants have a high propagation coefficient, so that large populations are available for genetic analyses.

In this context, it was a fundamental advantage for the experimental results and their genetic interpretation that peas are diploid ($2n=2x=14$), so that each gene primarily occurs in only two variants (alleles). Therefore, in a cross of homozygous parental lines the typical Mendel segregation ratios can be observed as a result of the mode of action (dominant, intermediate) and re-combination. If Mendel's experimental plants had been polyploid, the derivation of the genetic rules would undoubtedly have been much more difficult due to the multiple alleles. The same holds true if he had chosen an out-breeding species or an apomictic species, as used in that time by many botanists.

Furthermore, it was an enormous advantage that the traits he analysed were monogenic, i.e. inherited by a single gene. Mendel did not yet use the term "gene" – he used the term "hereditary character". Other terms that were coined in the following periods are: cistron, operon, ORF (open reading frame), and others. Today we know not only the location in the genome and the DNA structure of many genes, but also their function; for example, the A gene for flower colour of pea intervenes in anthocyanin biosynthesis: White flowering peas are natural base exchange mutants (Guanin- \rightarrow Adenin) (Fig. 1). It was not until decades after Mendel that such gene mutations were experimentally triggered, with the help of ionising radiation or mutagenic chemicals and used in plant breeding. More recently, Hellens et al. (2010) have identified the pea gene A as the factor determining anthocyanin pigmentation in pea. The A gene encodes a bHLH transcription factor. The white flowered mutant allele most likely used by Mendel is a simple G to A transition in a splice site that leads to a mis-spliced mRNA with a premature stop codon. Hellens et al. (2010) have identified a second rare mutant allele: The A2 gene encodes a WD40 protein that is part of an evolutionarily conserved regulatory complex and two premature stop codons were identified in white flowering genotypes.

Mendel's rules as the key and scientific basis of classical plant breeding

In view of the many demands made on our crops in cultivation, processing and use, they must combine a large number of favorable characteristics: starting with tolerance to environmental stress and resistance to pathogens and pests (i.e. yield stability), via yield to product quality, e.g. wheat flour, barley malt, rapeseed cooking oil, plant protein e.g. from legumes.

Knowledge of Mendel's rules has subsequently proved to be extraordinarily fruitful for plant genetics and extremely useful for breeding; in concrete terms, this has resulted in the following consequences, among others: The 1st Mendel rule describes the uniformity of the F₁ generation when crossing

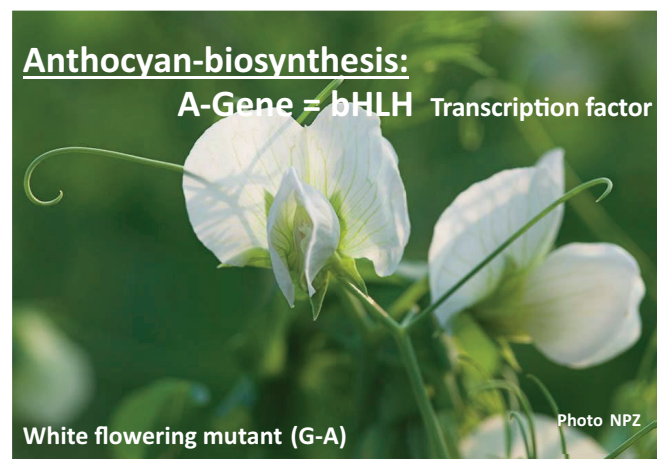


Fig. 1. White-flowered pea plant (*Pisum sativum*) due to a natural recessive point mutation (Guanin \rightarrow Adenin) of the original dominant red wild type. The A-gene represents the transcription factor bHLH intervening in anthocyanin biosynthesis.

homozygous parents and is a basis for today's widespread hybrid breeding. The 2nd Mendel rule (segregation rule) states that genetic segregation is to be expected for the first time in the F₂ generation, so that the earliest selection possibility exists here and may be conducted for simply inherited traits in line breeding schemes of self-pollinating species. The 3rd Mendel rule (independence rule) states that different traits in the F₂ basically split independently of each other; this is the basis for combining favorable genes or alleles for different target traits ("combination or cross-breeding"). However, this holds only true to a limited extent, i.e. when genes are not linked. Linkage between genes was detected by Thomas Hunt Morgan in the 1920s (different references), and is the basis for high density molecular marker maps today available in many crop species (Fig. 2).

Thus, it was a fortunate circumstance for the further development of genetics that in the case of Mendel's experiments such linkage did not play a role in the traits he described since the causal genes are located on different chromosomes and therefore were independent. Further exceptions to the genetic laws are, for example, parental effects (lack of reciprocity), epistasis (non-allelic gene interaction), polygeny, haploidy or environmental effects (GxE interaction).

If genes are unlinked, relevant alleles, for example a cross between a virus-resistant (see below) but mildew-susceptible parent plant (vvMM) and a virus-susceptible but mildew-resistant parent (VVmm), can result in a double-recessive mildew- and equally virus-resistant progeny (mmvv). So called "combination breeding" has created considerable improvements in crops over many decades, especially in self-pollina-

tors such as barley and wheat. The crossing of two parents P1 and P2 (sometimes extended by crossing the F₁ with a third parent) for the purpose of combining favourable characteristics in each case results in an offspring that becomes increasingly homozygous due to selfing in the subsequent generations. Multi-stage selection is basically possible from F₂ onwards. Special methods have been developed for breeding practice, which are conducted to a greater or lesser extent even today depending on the conditions of the material and the preference of the breeder; these include the pedigree method, bulk method, the use of single-seed descents, or the direct production of homozygous offspring via *in vitro* culture of haploid gametes, preferably immature pollen ("haploid method"). In this respect, it has to be noticed that these doubled haploids in case of a dominant/recessive inheritance do not segregate in a 3:1 manner but a 1:1 frequency as there are no heterozygous genotypes, i.e. homozygous recessive genotypes are more frequent.

Multi-stage line selection based on individual plants or plant progenies (bulks) over several generations is always followed by yield tests, initially at the breeding site, then also multi-locational and finally multi-annual. In principle, self-pollinated varieties are still bred in this way today, for example wheat, barley, oats, pea, etc. Of course, the breeding methodology has been further developed and refined over the decades. Cell and tissue culture techniques are now an integral part of the "tool box" of a modern breeding company: Whether for the efficient multiplication of a genotype by cloning, the rapid and pathogen-free propagation by meristem culture, the acceleration of backcrossing steps by embryo culture, the effective production of species or genus hybrids via sexual crossing and embryo rescue or via asexual crossing by cell fusion, the creation of homozygous plants via the "haploid method", i.e. *in vitro* culture of gametes, especially microspores (immature pollen), and others. In recent times, molecular genetics has also increasingly found its way into breeding procedures. This has been made possible by the enormous development of -omics technologies such as genomics, transcriptomics, metabolomics, proteomics, etc. The genomes of practically all agriculturally and horticulturally relevant plant species have now been completely sequenced and are available for plant breeders.

Examples of monogenic traits and their importance for breeding progress

Quite a few relevant traits are monogenically controlled, including many disease resistances. For example, powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) causes serious yield losses in bread wheat (*T. aestivum*) production. In the course of time numerous genes (*Pm* genes) and quantitative trait loci (QTL) have been identified distributed over the entire wheat genome mediating resistance against powdery mildew; recently, Kang et al. (2020) have provided a summary of over 200 powdery mildew genes and QTL across all 21 chromosomes of bread wheat.

These monogenic resistances are known for many pathogens in wheat, e.g. stripe rust (*Yr*-genes), leaf rust (*Lr*-genes), stem rust (*Sr*-genes), soil-borne cereal virus (*Sbm1*) or even

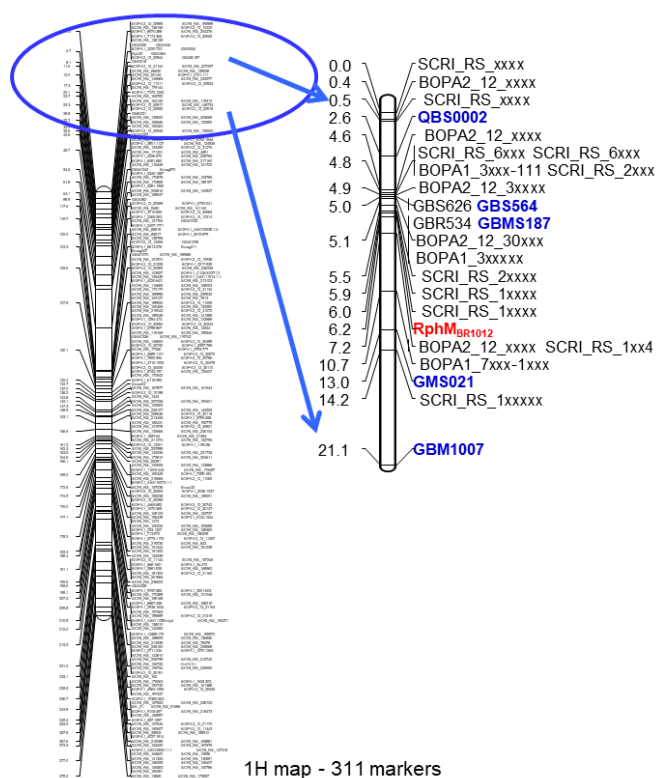


Fig. 2. Dense marker map of barley chromosome 1H comprising the rust resistance locus RphMBR1012 (Figure was taken from Perovic et al., unpublished)

against the orange wheat blossom midge (*Sm1*). However, the introduction of disease resistance in elite winter wheat cultivars is a lengthy process as shown here for the pedigree of wheat varieties combining resistance against powdery mildew i.e. *Pm17* (1A/1R translocation) and leaf rust (*Lr24*) plus *Pseudocercospora herpotrichoides* (Table 2, H. Kempf, pers. comm. 2022), which can be abridged today by molecular markers.

Another example are the so-called “green revolution genes”. These genes have a major effect on plant height as they cause – depending on the respective allele – dwarf or semi-dwarf growth. An example is shown in Figure 3, which illustrates the effect of different *Rht-B1* and *Rht-D1* alleles, i.e. genes causing gibberellic (GA)-insensitivity derived from the Japanese wheat variety Norin10. These semi dwarf genotypes are much lesser sensitive to lodging facilitating higher nitrogen fertilization resulting in higher yield.

Besides, quality characteristics are also controlled by single genes. An illustrative example is oil quality of rapeseed (*B.*

napus) and other oil crops. Unsaturated fatty acids – derived from stearic acid (C18:0), via oleic (C18:1) and linoleic acid (C18:2) to linolenic acid (C18:3) are formed in several steps by desaturase enzymes encoded by structural genes. In addition, long-chain fatty acids are formed by elongation in crucifers (= *Brassicaceae*) incl. oilseed rape, *Brassica napus*): C18:1 → C20:1 (eicosenic) → C22:1 (erucic acid). The combination of functional alleles and their additive effects enable maximum erucic acid content of so-called High Erucic Acid Rapeseed (HEAR). For details see Figure 4 (Bates et al., 2013).

Barley yellow mosaic disease: From Mendelian segregation to gene editing

Barley yellow mosaic virus disease was first detected in Japan in 1940 (Ikata & Kawai, 1940) and is now present in many East Asian countries and especially in Europe (Kühne, 2009). There, barley yellow mosaic virus has become one of the most important diseases of winter barley since its first detection in Germany in 1978 (Kühne, 2009) leading to severe damage and yield losses of up to 50% (see Fig. 5).

Both, *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) from which different strains are known (Habekuss et al., 2008) are bymoviruses, which are transmitted by the soil-borne plasmodiophorid *Polymyxa graminis* (Adams & Swaby, 1988). Resistance to BaMMV/BaYMV has been detected in Germany soon after the discovery of these viruses within the set of released cultivars, and it was shown by classical segregation analysis using BaMMV, which in contrast to BaYMV is easily mechanical transmissible (Friedt, 1983), that resistance is due to a single recessive gene, later on called *rym4* (Friedt & Foroughi-Wehr, 1985; Friedt et al., 1989). Extensive screening programs explained that resistance to *Barley yellow mosaic virus* is quite frequent within the barley primary gene pool (e.g. Ordon & Friedt, 1993; Habekuss et al., 2008). Mendelian segregation analyses

Table 2. Partial pedigree of elite wheat varieties derived from “wide crosses” using unadapted resistance sources of wheat (*T. aestivum*) (Dr. Hubert Kempf, Secobra)

1984	Kronjuwel × AMIGO (Pm17 + Lr24)
1985	Kronjuwel/(Pm17 + Lr24) × Kronjuwel
1993	[Kronjuwel/(Pm17 + Lr24) × Kronjuwel] × Piko
1999	(Atlantis/Cardos × [Kronjuwel/(Pm17 + Lr24) × Kronjuwel] × Piko) → MEMORY
2008	“Memory“ (Pm17 + Lr24) × JB Asano → ASORY
2013	Registration MEMORY (Pm17 + Lr24)
2018	Registration ASORY (Pm17 + Lr24)
2019	Registration CAMPESINO (Pm17 + Lr24 + Pch1)

Pm = powdery mildew, Lr = leaf rust, Pch = *Pseudocercospora*



Fig. 3. Phenotypes of near-isogenic lines (NIL) derived from wheat cv. Mercia, differing in *Rht-B1* and *Rht-D1* alleles; *Rht-1* represents the original variety (Photo: John Innes Centre, Norwich/UK, Tony Worland, see also Li et al., 2006)

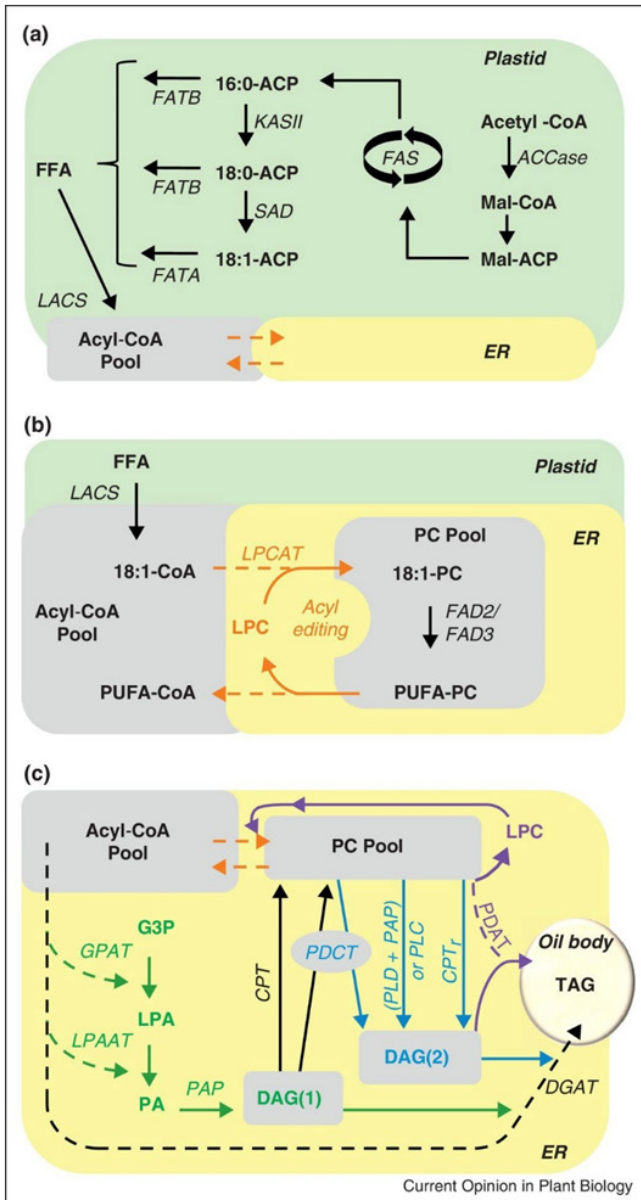


Fig. 4. (a) Plastid fatty acid biosynthesis, (b) Acyl editing and (c) Triacylglyceride (TAG) synthesis. Acyl transfer reactions are dashed lines. Green lines are de novo TAG synthesis, blue lines are PC-derived DAG synthesis, orange lines are acyl editing, and purple represents phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT). DAG(1) is de novo synthesized DAG and DAG(2) is PC-derived DAG. *Abbreviations*: substrates are in bold: ACP, acyl carrier protein; DAG, diacylglycerol; FFA, free fatty acid; G3P, glycerol-3-phosphate; LPA, lyso-phosphatidic acid; LPC, lyso-phosphatidylcholine; Mal, malonate; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TAG, triacylglycerol. Enzymatic reactions are in italics: *ACCase*, acetyl-CoA carboxylase; *CPT*, CDP-choline:DAG cholinephosphotransferase; *DGAT*, acyl-CoA:DAG acyltransferase; *FAD*, fatty acid desaturase; *FAS*, fatty acid synthase; *FATA*, acyl-ACP thioesterase A; *FATB*, acyl-ACP thioesterase B; *GPAT*, acyl-CoA:G3P acyltransferase; *KASII*, ketoacyl-ACP synthase II; *LACS*, long chain acyl-CoA synthetase; *LPAAT*, acyl-CoA:LPA acyltransferase; *LPCAT*, acyl-CoA:LPC acyltransferase; *PAP*, PA phosphatase; *PDCT*, PC:DAG cholinephosphotransferase; *PLC*, phospholipase C; *PLD*, phospholipase D; *SAD*, Stearoyl-ACP desaturase. (Figure was taken from Bates et al., 2013, CC BY-NC-ND 3.0 license)



Fig. 5. Field-grown winter barley plants: barley yellow mosaic virus resistant variety (right) in comparison to a virus-sensitive variety (Northern Germany).

of crosses of these resistant genotypes to carriers of *rym4*, it turned out that recessive resistance genes different from *rym4* are present demonstrated by a good fit to a segregation ratio of 7r:9s indicative for two independent recessive resistance genes causing resistance each (Götz & Friedt, 1993). In a next step, by intercrossing donors of resistance carrying genes different from *rym4* it was shown that these carry different recessive resistance genes (Ordon & Friedt, 1993). In addition, two dominant resistance genes have been identified in the secondary gene pool, i.e. *Hordeum bulbosum* (Ruge et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006), and a first dominant resistance gene has been identified meanwhile also in cultivated barley (Kai et al., 2012).

These classical Mendelian segregation analyses together with the knowledge of linkage of genes developed by Thomas Hunt Morgan has been the basis for developing molecular markers (Graner & Bauer, 1993) mainly based on the analyses of DH-lines allowing a replicated test for virus resistance in contrast to F_2 -plants (for overview see Tuvevsson et al., 2021).

Based on these markers, different marker-based selection procedures have been developed. Together with doubled haploid techniques, which are routinely used in barley breeding today, respective markers facilitate a reliable and fast selection for virus resistance, e.g. doubled haploid populations may be screened directly in vitro and only those plantlets carrying the resistance encoding allele have to be transferred to the greenhouse. In general, donors of new BaMMV/BaYMV resistance genes are rather un-adapted to productive growing systems (e.g. Ordon & Friedt, 1994). To combine virus resistance with superior agronomic performance, time-consuming backcrossing procedures are needed. This holds especially true when recessive resistance genes have to be incorporated like in the case of BaMMV/BaYMV, just as a selfing generation is needed after each backcross to identify homozygous recessive genotypes on the phenotypic level (3s:1r). In contrast to

this, in marker-based procedures, the recessive resistance encoding allele can be directly followed by a co-dominant marker or a dominant one showing an additional fragment linked to the resistance encoding allele (Ordon et al., 2003; 2009), thus saving one generation per backcrossing cycle. Furthermore, molecular markers facilitate efficient pyramiding of resistance genes especially in combination with doubled haploids (Werner et al., 2005; 2007), thereby prolonging the use of partly overcome resistance genes.

Besides the direct use in breeding, Mendelian segregation and knowledge on linkage has also been the basis for isolating resistance genes *rym4/5* and *rym11* via a map based cloning approach (Stein et al., 2005; Yang et al., 2014) which is based on constructing a high resolution mapping population followed by marker saturation, i.e. segregation and linkage. It turned out that the *rym4/5* locus comprises the translation initiation factor 4e gene Hv-eIF4E (Stein et al., 2005; Kanyuka et al., 2005) and *rym11* a protein disulfide isomerase (HvP-

DIL5-1). Meanwhile both of these genes have been edited using CRISPR/Cas9 (Hoffie et al., 2021, cf. Fig. 6) and the isolation of different resistance genes e.g. *rym15* using recent genomic tools is underway (Wang et al., 2022).

The story of resistance to BaYMV/BaMMV clearly elucidates the importance of Mendel's law and its useful application in plant breeding and research. Genome editing has also been applied to many further plant species, e.g. for improving mildew resistance in bread wheat (Li et al., 2022).

Polygenic inheritance and quantitative traits

Oligo- or polygenic inheritance plays a major role concerning traits of agronomic importance, i.e. quantitative traits. Such traits are not accessible to a classical genetic analysis according to Mendel. Here, however, combined quantitative-genetic

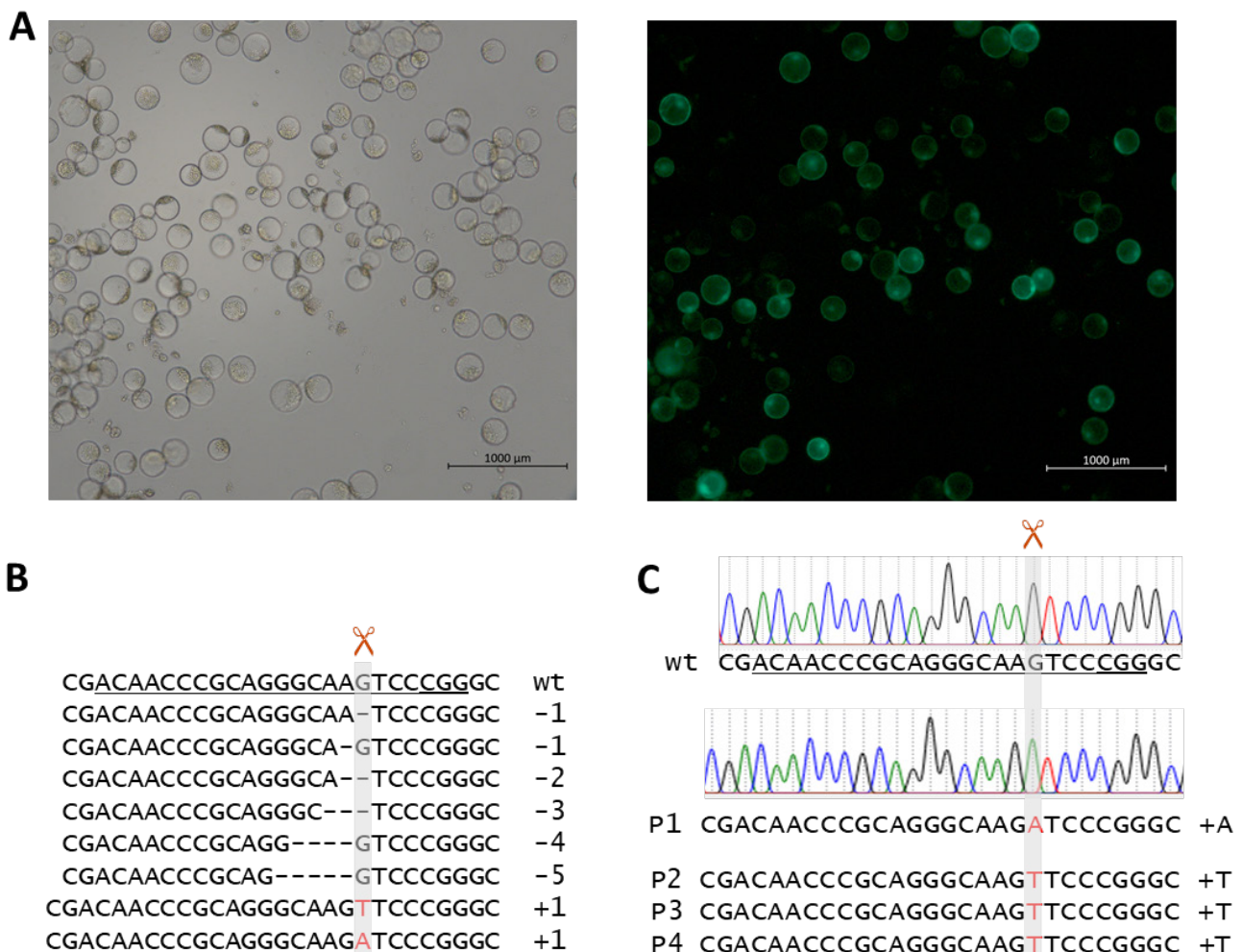


Fig. 6: (A) Mesophyll protoplasts of winter barley cv. "Igrí" after PEG-mediated transformation with a GFP-carrying vector, after 60 h of incubation at 21°C. These protoplasts serving as positive control for viability and genetic transformation, respectively, were recorded using bright field (left) and epifluorescence (right) microscopy. (B) Deep-sequencing of amplicons of target region 1 after transformation of barley protoplasts using vectors carrying cas9 and target motif 1-specific gRNA expression units. (C) Chromatograms of Sanger sequencing target region 1 of wild-type "Igrí" as compared with primary mutant plants. The unambiguous DNA sequence indicates homozygosity of the inserted A nucleotide. Grey vertical bars: cleavage positions, horizontal lines: deletions, red letters: insertions, wt: wild-type sequence, target motifs underlined with PAMs being double underlined, +A: 1-bp insertion of adenine nucleobase, +T: 1-bp insertion of thymine nucleobase. Results of PEG-mediated transformation of protoplast transformation of barley cv. 'Igrí' using GFP-carrying vector (Figure was taken from Hoffie et al., 2021, CC-BY 4.0 license)

and molecular-genetic approaches made it possible to depict associations of special genome regions with respective traits (QTL mapping in biparental populations or via genome wide association studies (GWAS)). For example, *Zymoseptoria tritici* causing Septoria tritici leaf blotch, is a difficult fungus to control because of its extremely high genetic variability making it one of the most important wheat pathogens today. Recently, Karlstedt et al. (2019) have detected 4 QTL in wheat explaining between 8.5–17.5% of the phenotypic variance. (Fig. 7). Thus, like Mendel genes, they can now be made accessible for targeted selection with the help of associated genetic markers.

The same applies to the plant response to abiotic stress, such as cold, heat or drought. Resistance or tolerance to such stressors is at best partial and is inherited quantitatively. Here, too, however, it may help to break down the quantitative trait complexes into "Mendelian" units to gain access to individual synthesis steps or metabolic pathways and the genes underlying these (Wehner et al., 2015). Typically, signal transduction chains are effective here: for example, sensor enzymes can activate phytohormones (e.g. abscisic acid, ABA), which in turn activate genetic switches (transcription factors) such as CAMTA, DREB, MYB or bZIP to set defence or repair mechanisms in motion. This brief description shows that numerous genes must be functionally involved and that, due to the complex genetics, the breeding of such traits is difficult and therefore inevitably lengthy, but can be conducted today in a directed manner, by employing molecular markers.

Conclusions

We owe Gregor Mendel a basic understanding of the inheritance of plant characteristics:

- Hereditary "factors" (genes) determine the appearance of organisms (phenotype), but can be modified by "environmental effects".
- In diploid individuals, the factors basically occur in two forms (alleles), they can be recombined by crossing and thus lead to new phenotypes with novel trait combinations.
- These findings were the basis for the development of breeding methods from line to hybrid breeding, combined with the invention of improved breeding schemes.
- Their systematic use in classical plant breeding has led to enormous improvements in crops: today's varieties are generally superior to older varieties in terms of disease resistance, stress tolerance, yield and product quality (flour, edible oil, protein, animal feed, etc.).
- The useful addition of biotechnological approaches in the form of cellular and molecular biological work steps is increasingly turning empirical plant breeding into knowledge-based plant breeding.

Conflicts of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

References

- Adams, M.J., A.G. Swaby, 1988:** Confirmation of the transmission of barley yellow mosaic virus (BaYMV) by the fungus *Polymyxa graminis*. *Annals of Applied Biology*, **112** (1), 133–141, DOI: 10.1111/j.1744-7348.1988.tb02048.x.
- Bates P.D., S. Stymne, J. Ohlrogge, 2013:** Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **16** (3), 358–364, DOI: 10.1016/j.pbi.2013.02.015.
- Friedt, W., 1983:** Mechanical transmission of soil-borne barley yellow mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, **106**, 16–22, DOI: 10.1111/j.1439-0434.1983.tb00023.x.
- Friedt, W., B. Foroughi-Wehr, 1985:** Genetics of resistance to barley yellow mosaic virus. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* (Germany).
- Friedt, W., R. Götz, R. Kaiser, B. Foroughi-Wehr, 1989:** Present state and prospects of breeding for resistance or immunity to barley yellow mosaic virus 1. *EPPO Bulletin*, **19** (3), 563–571, DOI: 10.1111/j.1365-2338.1989.tb00433.x.
- Graner A., E. Bauer, 1993:** RFLP mapping of the ym4 virus resistance gene in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **86**, 689–693, DOI: 10.1007/BF00222657.
- Götz, R., W. Friedt, 1993:** Resistance to the barley yellow mosaic virus complex – differential genotypic reactions and genetics of BaMMV-resistance of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*, **111** (2), 125–131, DOI: 10.1111/j.1439-0523.1993.tb00618.x.
- Habekuss, A., T. Kühne, I. Krämer, F. Rabenstein, F. Ehrig, B. Ruge-Wehling, F. Ordon, 2008:** Identification of Barley mild mosaic virus isolates in Germany breaking rym5 resistance. *Journal of Phytopathology*, **156** (1E), 36–41, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01324.x.
- Hellens, R.P., C. Moreau, K. Lin-Wang, K.E. Schwinn, S.J. Thomson, M.W.E.J. Fiers, T.J. Frew, S.R. Murray, J.M.I. Hofer, J.M. E. Jacobs, K.M. Davies, A.C. Allan, A. Bendahmane, C.J. Coyne, G.M. Timmerman-Vaughan, T.H.N. Ellis, 2010:** Identification of Mendel's white flower character. *PLoS ONE* **5** (10): e13230, DOI: 10.1371/journal.pone.0013230.
- Hoffie, R.E., I. Otto, D. Perovic, N. Budhagatapalli, A. Habekuß, F. Ordon, J. Kumlehn, 2021:** Targeted knockout of eukaryotic translation initiation factor 4E confers Bymovirus resistance in winter barley. *Frontiers in Genome Editing*, **3**, 784233, DOI: 10.3389/fgeed.2021.784233.
- Ikata, S., I. Kawai, 1940:** Studies on wheat yellow mosaic disease, No. 154, 1–123. Ministry of Agriculture and Forestry (Japan), URL: [https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20057005319?q=\(do%3a%22Noji-kairyo-shiryo%2c+Ministry+of+Agriculture+and+Forestry.%22\)](https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20057005319?q=(do%3a%22Noji-kairyo-shiryo%2c+Ministry+of+Agriculture+and+Forestry.%22)).
- Kai, H., K. Takata, M. Tsukazaki, M. Furusho, T. Baba, 2012:** Molecular mapping of Rym17, a dominant and rym18 a recessive barley yellow mosaic virus (BaYMV) resistance genes derived from *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **124** (3), 577–583, DOI: 10.1007/s00122-011-1730-5.

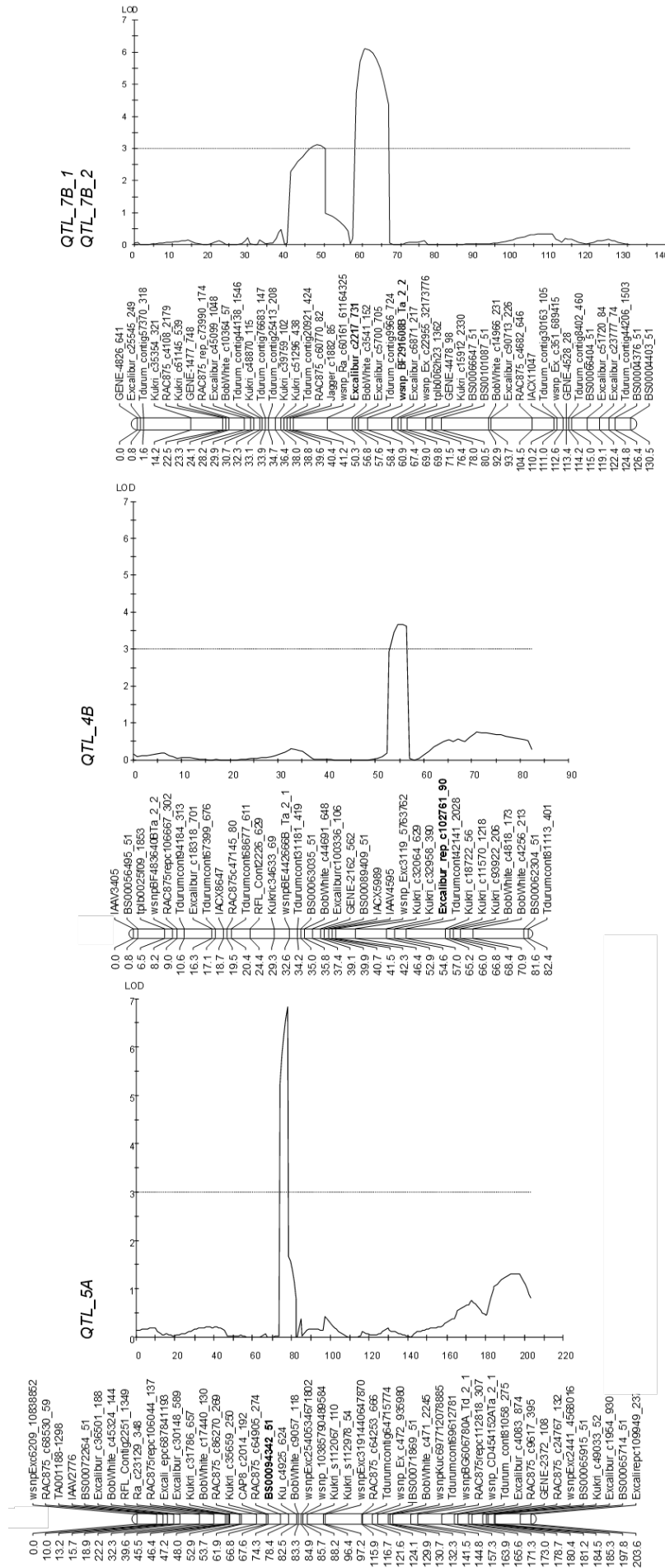


Fig. 7: Results of QTL analyses for *Zymoseptoria tritici* resistance in the DH population HTRI1410 x susceptible parental lines (Reprinted by permission from Springer Nature: Euphytica: “Mapping of quantitative trait loci (QTL) for resistance against *Zymoseptoria tritici* in the winter spelt wheat accession HTRI1410 (*Triticum aestivum* subsp. *spelta*)”, Karlstedt et al., 2019).

- Kang Y., M. Zhou, A. Merry, K. Barry, 2020:** Mechanisms of powdery mildew resistance of wheat – a review of molecular breeding. *Plant Pathology* **69** (4), 601-617, DOI: 10.1111/ppa.13166.
- Kanyuka K., A. Druka, D.G. Caldwell, A. Tymon, M. McCallum, R. Waugh, M.J. Adams, 2005:** Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Molecular Plant Pathology* **6** (4), 449–458, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2005.00294.x.
- Karlstedt, F., D. Kopahnke, D. Perovic, A. Jacobi, K. Pillen, F. Ordon, 2019:** Mapping of quantitative trait loci (QTL) for resistance against *Zymoseptoria tritici* in the winter spelt wheat accession HTRI1410 (*Triticum aestivum* subsp. *spelta*). *Euphytica* **215**, 108, DOI: 10.1007/s10681-019-2432-3.
- Kühne, T., 2009:** Soil-borne viruses affecting cereals – Known for long but still a threat. *Virus Research*, **141** (2), 174-183, DOI: 10.1016/j.virusres.2008.05.019.
- Li, S., D. Lin, Y. Zhang, M. Deng, Y. Chen, B. Lv, B. Li, Y. Lei, Y. Wang, L. Zhao, Y. Liang, J. Liu, K. Chen, Z. Liu, J. Xiao, Z. Liu, J.-L. Qiu, C. Gao, 2022:** Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature* **602**, 455–460, DOI: 10.1038/s41586-022-04395-9.
- Li, X.P., S.Q. Lan, Y.P. Liu, M.D. Gale, T.J. Worland, 2006:** Effects of different Rht-B1b, Rht-D1b and Rht-B1c dwarfing genes on agronomic characteristics in wheat. *Cereal Research Communications* **34**, 919–992, DOI: 10.1556/CRC.34.2006.2-3.220.
- Morgan, T.H., 1911:** Random Segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science* **34**, 873 p. 384, DOI: 10.1126/science.34.873.384.
- Ordon, F., W. Friedt, 1994:** Agronomic traits of exotic barley germplasms resistant to soil-borne mosaic-inducing viruses. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **41** (1), 43-46, DOI: 10.1007/BF00051422.
- Ordon, F., W. Friedt, 1993:** Mode of inheritance and genetic diversity of BaMMV resistance of exotic barley germplasms carrying genes different from ‘ym4’. *Theoretical and Applied Genetics*, **86** (2), 229-233, DOI: 10.1007/BF00222083.
- Ordon, F., K. Werner, B. Pelliö, A. Schiemann, W. Friedt, A. Graner, 2003:** Molecular breeding for resistance to soil-borne viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, **110** (3), 287-295.
- Ordon, F., A. Habekuss, U. Kastirr, F. Rabenstein, T. Kühne, 2009:** Virus resistance in cereals: sources of resistance, genetics and breeding. *Journal of Phytopathology*, **157** (9), 535-545, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01540.x.
- Ruge, B., A. Linz, R. Pickering, G. Proeseler, P. Greif, P. Wehling, 2003:** Mapping of Rym14 Hb, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, **107** (6), 965-971, DOI: 10.1007/s00122-003-1339-4.
- Ruge-Wehling, B., A. Linz, A. Habekuß, P. Wehling, 2006:** Mapping of Rym16 Hb, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theoretical and Applied Genetics*, **113** (5), 867-873, DOI: 10.1007/s00122-006-0345-8.
- Stein, N., D. Perovic, J. Kumlehn, B. Pelliö, S. Stracke, S. Streng, F. Ordon, A. Graner, 2005:** The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant Journal* **42**, 912-922, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02424.x.
- Turesson, S.D., C.T. Larsson, F. Ordon, 2021:** Use of Molecular Markers for Doubled Haploid Technology: From Academia to Plant Breeding Companies. In: Segui-Simarro, J.M. (Eds.) *Doubled Haploid Technology*, pp. 49-72, DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1_3.
- Wang, Y., A. Habekuss, M. Jayakodi, M. Mascher, R.J. Snowden, A. Stahl, J. Fuss, F. Ordon, D. Perovic, 2022:** High-Resolution mapping of barley mild mosaic virus resistance gene *rym15*. *Frontiers in Plant Science*, 1740, DOI: 10.3389/flps.2022.908170.
- Werner, K., W. Friedt, F. Ordon, F., 2005:** Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Molecular Breeding*, **16** (1), 45-55, DOI: 10.1007/s11032-005-3445-2.
- Werner K, W. Friedt, F. Ordon, 2007:** Localisation and combination of resistance genes against soil-borne viruses of barley (BaMMV, BaYMV) using doubled haploids and molecular markers. *Euphytica* **158**, 323–329, DOI: 10.1007/s10681-006-9206-4.
- Yang, P., A. Habekuß, F. Ordon, N. Stein, 2014:** Analysis of bymovirus resistance genes on proximal barley chromosome 4HL provides the basis for precision breeding for BaMMV/BaYMV resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, **127** (7), 1625-1634, DOI: 10.1007/s00122-014-2324-9.

Ralf Uptmoor, Julian Kirchgesser

Mendel und der Beginn der modernen Genetik: zu gut um wahr zu sein?

Mendel and the onset of modern genetics: too good to be true?

Affiliation

Universität Rostock, Professur für Pflanzenbau, Rostock.

Kontaktanschrift

Prof. Dr. Ralf Uptmoor, Universität Rostock, Professur für Pflanzenbau, Justus-von-Liebig-Weg 6 18055 Rostock, E-Mail: ralf.uptmoor@uni-rostock.de

Zusammenfassung

Im 18. und 19. Jahrhundert wurden sowohl in Europa als auch in den USA Kreuzungsexperimente an Mais und Zierpflanzen, aber auch an der Erbse durchgeführt. Mendel kannte zumindest einen Teil der Literatur, als er seine „Versuche über Pflanzenhybriden“ 1866 veröffentlichte. Im Gegensatz zu seinen Vorgängern fielen Mendel die konstanten Zahlenverhältnisse auf, die in den Nachkommen seiner Kreuzungsexperimente zu beobachten waren. Nachdem die Arbeiten Mendels über mehrere Jahrzehnte weitgehend unbeachtet blieben, wurden seine Theorien zur Vererbungslehre 1900 von de Vries, Correns und Tschermak wiederentdeckt und experimentell bestätigt. Kurz darauf kamen erste Zweifel auf, da die Ergebnisse Mendels fast durchweg sehr nahe an seinen Erwartungswerten lagen. Ronald A. Fisher publizierte 1936 einen Artikel, der schlussfolgerte, dass ein Großteil von Mendels Ergebnissen zugunsten der theoretischen Spaltungsverhältnisse gefälscht worden sein müsste. Damit war die Mendel-Fisher-Kontroverse geboren. Zum Jubiläum der Veröffentlichung der Grundlagen der Vererbungslehre von Gregor Mendel brachten Stern & Sherwood 1966 ein Buch heraus, welches sowohl Mendels Texte auch die der Wiederentdeckung seiner Lehren sowie den kritischen Text von Fisher enthielten. Damit nahm die Mendel-Fisher-Kontroverse an Fahrt auf und sorgte für zahlreiche weitere Publikationen. Ob Mendel einfach Glück hatte, ob er wissentlich Pflanzen aussortierte, die nicht seinen Erwartungen entsprachen oder ob er einen Assistenten hatte, der zu gut wusste, was Mendel erwartete – wie Fisher vermutete – werden wir nicht mit letzter Sicherheit herausfinden können. Gesichert ist, dass die Mendelschen Vererbungsregeln bis heute ihre Gültigkeit haben und in Zukunft behalten werden.

Stichwörter

Gregor Mendel, Ronald A. Fisher, Vererbungsregeln, Spaltungsverhältnisse, Erbse

Abstract

In the 18th and 19th century crossing experiments using maize, ornamentals and peas were carried out in Europe and in the USA. Mendel knew at least a part of the literature when he published his famous paper "Experiments on Plant Hybridisation" with the original German title "Versuche über Pflanzenhybriden" in 1866. In contrast to his predecessors, Mendel recognised the constant segregation ratios appearing in the progenies of the crossings. After being unnoticed for decades, his fundamental theory of heredity was rediscovered and experimentally verified by de Vries, Correns and Tschermak in 1900. Shortly after the English translation of Mendel's work became available in 1901, Raphael Weldon, one of the founders of biometry, published his doubts on Mendel's data since all observed segregation ratios were extremely close to the expected ones. Ronald A. Fisher concluded in a paper from 1936 that a large part of Mendel's results must have been falsified to agree closely with the postulated segregation ratios. The Mendel-Fisher controversy was born. In 1966, 100 years after Mendel's original paper was released, Stern & Sherwood published a book comprising translations of Mendel's laws of inheritance, the rediscovery by de Vries and Correns and Fisher's paper. Subsequently, this led to the publication of numerous articles from different scientific disciplines on the Mendel-Fisher controversy. It may never be revealed, if it was simple luck, if Mendel sorted out plants, which did not represent the theory, or if he had an assistant "who knew too well what was expected", as Fisher speculated in 1936. Nonetheless, Mendel's work doubtlessly culminated in one of the most important breakthrough discoveries of the 19th century and is the starting point of modern genetics and plant breeding.

Keywords

Gregor Mendel, Ronald A. Fisher, laws of inheritance, segregation ratios, pea



(c) Die Autoren 2022

Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Zur Veröffentlichung eingereicht/angenommen: 29. Juli 2022/4. November 2022

Erste Kreuzungsexperimente mit Erbsen und frühe Züchtungsarbeiten

Mendel war nicht der erste, der mit Erbsen experimentierte und Kreuzungen durchführte. Thomas Andrew Knight bestäubte 1799 Erbsen mit weißen Samen mit dem Pollen von solchen mit grauen Samen und entdeckte, dass alle Nachkommen nur graue Samen hervorbrachten. Er machte Rückkreuzungen, bei denen er feststellte, dass wieder weißsamige Erbsen auftraten (Knight, 1799). Alexander Seton (1824, nach Zirkle, 1951) kreuzte grünsamige mit weißsamigen Erbsen und stellte ebenfalls fest, dass alle Nachkommen eine identisch grüne Samenfarbe hatten. Nachdem er die grünen Samen wieder ausgesät hatte, konnte er Erbsensamen beider Farben ernten und bemerkte, dass keiner der Samen farblich intermediär war. Im selben Jahr fand John Goss (1824, nach Zirkle, 1951), dass in einer Kreuzung von Erbsenpflanzen mit blauen und weißen Erbsen in der ersten Generation nur weiße Samen auftraten, in der zweiten Generation fand er Nachkommen die nur weiße, nur blaue oder sowohl weiße als auch blaue Samen in denselben Hülsen hatten. In der dritten Generation produzierten die blausamigen Erbsen nur blausamige Nachkommen, während die weißsamigen Pflanzen entweder nur weiße, nur blaue oder wieder beide Samenfarben in ihren Hülsen trugen. Knight (1824) kommentierte die Arbeiten und machte die richtigen Aussagen über Dominanz und Rezessivität, aber er zählte die jeweiligen Anteile nicht und konnte deshalb keine eindeutigen Regeln ableiten (Zirkle, 1951).

Erbsen erfreuten sich in der jüngeren Neuzeit großer Beliebtheit als Gemüsekultur. So schrieb Marie de Rabutin-Chantal vom Hof Louis XIV, in dessen Küchengarten in Versailles Erbsen kultiviert wurden: „Das Erbsenkapitel dauert an: die Ungeduld, sie zu essen, das Vergnügen, sie gegessen zu haben, und die Freude, sie wieder zu essen – das sind die drei Themen, über die man seit vier Tagen redet.“ Der spätere US-Präsident Thomas Jefferson baute Erbsen in seinem Garten in Virginia an und notierte am 26. Februar 1778 in sein Gartenbuch „sowed a patch of Hotspur peas“. *Hotspurs* sind besonders schnellwüchsige Sorten (Woolridge, 1677). Thomas Andrew Knight erstellte im frühen 19. Jahrhundert die ersten gezielten Erbsenzüchtungen. Aus den Sorten ‘Knight’s Tall Green Marrow’ und ‘Knight’s Dwarf Green Marrow’ sind im Laufe des 19. Jahrhunderts viele weitere Sorten entstanden. Ziel der damaligen Züchter war es, die Erträge zu steigern sowie hochwachsende Sorten, die Rankhilfen benötigen und kleine, runde Samen hatten, durch solche mit niedrigem Wuchs und großen runzligen Samen zu ersetzen (Hedrick et al., 1928). Es gab zwar bereits vorher Landsorten mit niedrigem Wuchs sowie *Marrowfats* mit großen, runzligen Samen (Townsend, 1725), allerdings dürften die meisten Sorten hochwachsend und rundsamig gewesen sein. John Woolridge schrieb 1677, dass die Erbse schon lange in England angebaut werde, die süßen und delikaten Sorten aber erst spät eingeführt worden seien. Im Gegensatz zu den rundsamigen Palerbsen entsprechen *Marrowfats* den heutigen Markerbsen. Der Zuckergehalt von Markerbsen ist mit maximal 7 bis 9 % höher als der von Palerbsen (4 bis 5 %), woraus ein deutlich süßerer Geschmack resultiert. Der höhere Zuckergehalt der Markerbse geht zunächst mit einem höheren Wassergehalt

einher. Das führt nach dem Wasserentzug zum typisch runzligen Erscheinungsbild reifer Samen (*wrinkled seeded peas*). Tracy listet bereits 1903 für das U.S. Department of Agriculture ca. 500 Sorten, darunter normalwüchsige, Halbzwerge und Zwerge mit sehr niedrigem Wuchs, *Marrowfats* mit runzligen Samen, Sorten mit runden Samen für die Konservenindustrie und Zuckererbsen auf.

Die Entdeckung der Vererbungsregeln durch Gregor Mendel

Obwohl Mendel (1866) z. B. die unten genannte Publikation zur Hybridisierung bei Pflanzen von Gärtner (1849) zitierte, ist nicht überliefert, ob er mit den früheren Arbeiten speziell an Erbsen vertraut war. Mit der Erbse stand ihm allerdings eine Modellpflanze zur Verfügung, die eine große Variation in vielen einfach zu bonitierenden Eigenschaften wie Farbe der Samenschale und Kotyledonen, Samenform, Farbe und Form der Hülsen, Wuchshöhe und Blütenfarbe aufwies. Die Erbse ist ein Selbstbefruchter mit $2n=14$ Chromosomen und einem ausgesprochen großen Genom von 4,45 Gb (Kreplak et al., 2019). Obwohl sowohl bei den Wildformen als auch bei der Kulturerbse eine Bestäubung über Insekten möglich ist, herrscht bei den im Anbau befindlichen Sorten Kleistogamie vor. Die Selbstbestäubung findet demnach in der geschlossenen Blüte statt. Mendel entschied sich auch aufgrund der Kleistogamie für die Erbse als Modellpflanze, da Selbstungen, also Inzucht durch Selbstbestäubungen, leicht und sicher vorzustattgehen. Mendel schreibt 1866: „Versuche (...) führten zu dem Resultate, dass das Genus *Pisum* den gestellten Anforderungen hinreichend entspreche.“ Die künstliche Befruchtung, bei der er die Knospe zum Entfernen der noch unreifen Staubfäden mit der Pinzette öffnete, um die Narbe später mit fremdem Pollen zu bestäuben, beschreibt er zwar als umständlich aber zumeist gelingend (Mendel, 1866). Schon in seinen einleitenden Bemerkungen erwähnt Mendel (1866) die Regelmäßigkeit, die bei Hybriden zu beobachten ist, wenn Zierpflanzen zur Erzeugung neuer Farbvarianten künstlich befruchtet werden. Auch zitiert er die Arbeiten von Gärtner (1849) über die Erzeugung von Hybriden bei Pflanzen. Gärtner wiederum zitierte die Kreuzungsexperimente, die Knight (1799) an Erbsen durchgeführt hatte (Zirkle, 1951). Damit ist also sicher, dass Gregor Mendel Studien zur Hybridisierung kannte und nicht völlig unvoreingenommen seine Experimente begann.

Von den vielen Merkmalen, die Mendel untersuchte, sind Form und Farbe der Samen bzw. Kotyledonen die wohl bekanntesten (Mendel, 1866; Miko, 2008). Zunächst arbeitete er mit reinerbigen Pflanzen, die er über mehrere Generationen geselbstet hatte. Danach kreuzte er Elternlinien mit verschiedenen Eigenschaften untereinander. Obwohl bereits vorher gegenteiliges beobachtet wurde (Knight, 1799; 1824; Gärtner, 1849), ging man weitestgehend davon aus, dass Nachkommen immer einer Mischung aus ihren Eltern entsprechen, was einem intermediären Erbgang gleichkommt. Die Nachkommen von Elternlinien mit runden und eckigen Samen konnten diese Annahmen aber nicht stützen, denn alle waren rund und folgten einem dominanten Erbgang. Da alle Nachkommen in der ersten Filialgeneration (F1) gleich

aussahen, formulierte Mendel daraus die Uniformitätsregel, das 1. Mendelsche Gesetz.

Als Mendel in einem weiteren Schritt die F1-Pflanzen, die genetisch alle identisch waren, mit sich selbst kreuzte, traten sowohl runde als auch eckige Samen im Verhältnis 3:1 auf. Mendel stellte fest, dass Eigenschaften, die in der F1 nicht mehr auftauchten, weiterhin rezessiv vorhanden waren und an spätere Generationen vererbt werden konnten. Er nutzte dabei die Denomination *AA* für den Elter mit runden Samen und *aa* für den Elter mit eckigen Samen. In der F1 kamen nur *Aa* Genotypen mit der dominanten Eigenschaft der runden Samenform vor. In der F2 glich ein Viertel der Genotypen wieder dem dominanten Elter *AA*, ein weiteres Viertel dem rezessiven Elter *aa*, die Hälfte blieb genotypisch identisch mit der F1-Generation (*Aa*). Da letztere phänotypisch nicht vom reinerbigen Genotyp *AA* unterschieden werden konnten, kam das Spaltungsverhältnis 3:1 zustande. Heute wissen wir, dass *A* und *a* den zwei Allelen eines Gens entsprechen. Mendel (1866) formulierte aus seinen Ergebnissen die Spaltungsregel. Er sah in seinen Ergebnissen, Gärtner (1849) bestätigt, demzufolge „Hybriden die Neigung besitzen, zu den Stammarten zurückzukehren“ (Mendel 1866), also bei Selbstung oder Kreuzung untereinander aufspalten.

Um herauszufinden, was passiert, wenn man Eltern miteinander kreuzt, die sich in zwei Eigenschaften voneinander unterscheiden, kreuzte Mendel Pflanzen mit rund-gelben Samen (*AABB*) mit solchen mit kantig-grünen Samen (*aabb*). Der Begriff „kantig“ ist hierbei mit dem oben genannten Begriff „runzelig“ für Markerbsen gleichzusetzen. Mendel (1866) benutzte beide Begriffe. In der F1-Generation waren alle Nachkommen rund und gelb (*AaBb*), da das die dominanten Eigenschaften waren. In der F2-Generation traten alle möglichen Kombinationen der Merkmale auf: rund-gelbe (*AABB*, *AABb*, *AaBB*, *AaBb*), kantig-gelbe (*aaBB*, *aaBb*), rund-grüne (*AAbb*, *Aabb*) und kantig-grüne (*aabb*) Erbsensamen. Für sich genommen traten die Eigenschaften wieder im Verhältnis 3:1 auf, in oben genannter Kombination allerdings im Verhältnis 9:3:3:1. Mendel (1866) erwähnte dieses Spaltungsverhältnis nicht. Er baute die Samen der F2 Generation wieder an und stellte fest, dass die Pflanzen aus kantig-grünen Samen in der Folgegeneration konstant blieben. Die Pflanzen, die aus rund-gelben Samen gezogen wurden, erzeugten im Verhältnis 1:2:2:4 nur rund-gelbe Samen, rund-gelbe und -grüne Samen, rund- und kantig-grüne Samen sowie alle vier Varianten der F2. Es gab also auch hier wieder die rund-gelbe homozygote Ausgangsform, während ein Teil homozygot für das jeweils dominante Merkmal geworden war und ein weiterer Teil sich äquivalent zur F1-Hybride verhielt. Mendel (1866) bewies mit diesen Versuchen, dass die Merkmale unabhängig voneinander vererbt wurden, woraus sich die Unabhängigkeitsregel ableitet.

Mendel hat bei seinen Arbeiten nicht nur die richtigen Eigenschaften gewählt, nämlich solche, die über einzelne Gene vererbt werden, er hatte auch Glück, denn die Gene für die beiden oben genannten Eigenschaften liegen tatsächlich auf unterschiedlichen Chromosomen. Dazu kommt, dass die bekanntesten Merkmale die er untersuchte – Samenform und -farbe – schon auf der Mutterpflanze beobachtet werden konnten. Sein größter Verdienst war es – im Gegensatz zu sei-

nen Vorgängern – exakt zu zählen und mit großen Zahlen zu arbeiten, klare Hypothesen zu formulieren und diese anhand seiner Erwartungen zu überprüfen. So untersuchte er in seinem Experiment zur Ableitung der Spaltungsregel mehr als 8.023 Samen von 258 Pflanzen. Davon waren 6022 gelb und 2001 grün. Gelb trat also zu grün im Verhältnis 3,01:1 auf, was dem theoretischen Spaltungsverhältnis von 3:1 schon sehr nahekam. Mit ähnlich hohen Zahlen arbeitete er, als er die Samenform untersuchte (Abb.). Das Spaltungsverhältnis 9:3:3:1 zur Unabhängigkeitsregel basiert auf 556 Samen von 15 Pflanzen, die er im Folgejahr alle zur Aussaat brachte und von denen er abzüglich der Verluste 529 wieder untersuchte (Mendel, 1866).

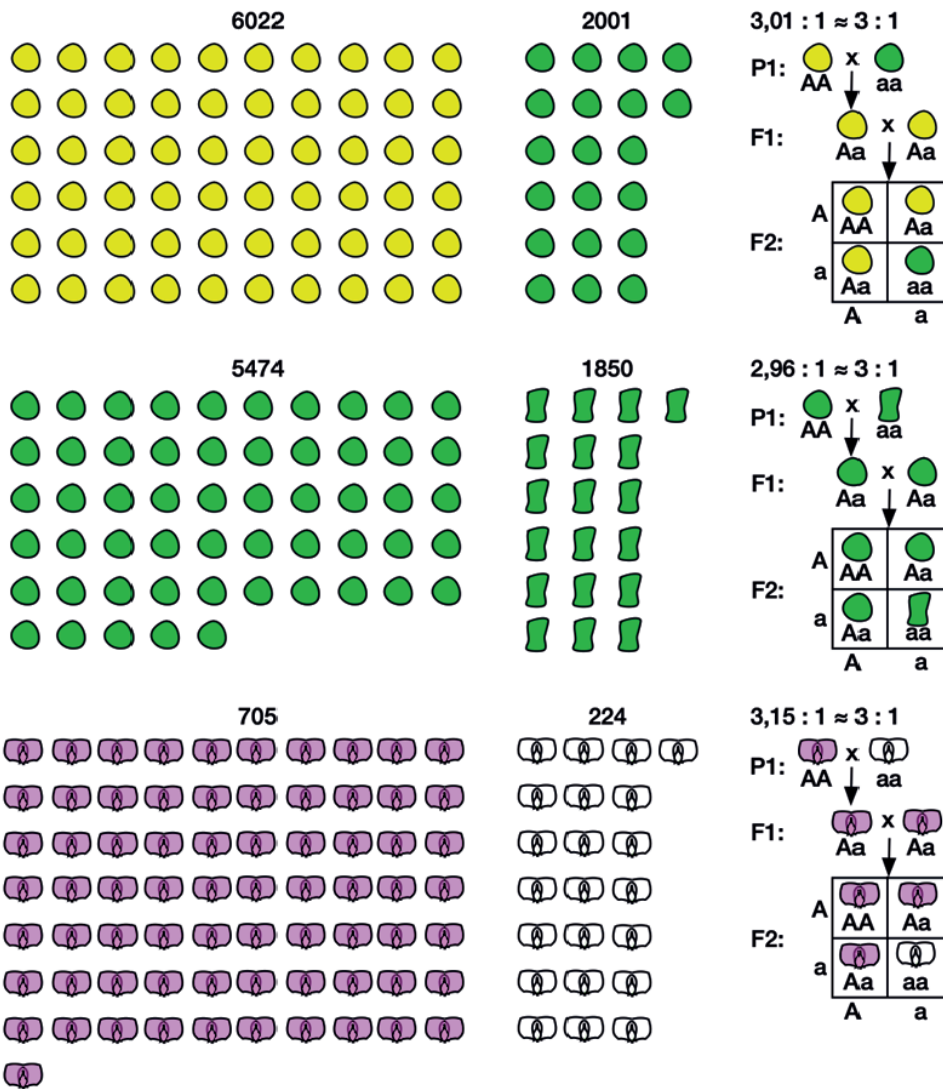
Eine bahnbrechende Theorie bleibt 34 Jahre unbeachtet

Mendel generalisierte seine Ergebnisse mit dem mathematischen Modell $A + 2Aa + a$ (Mendel, 1866; Teicher, 2014). Heute würden wir mit der Erkenntnis, dass es sich bei *A* und *a* um zwei Allele desselben Gens handelt, die Schreibweise $AA + 2Aa + aa$ wählen. Unabhängig davon beschrieb er damit, dass die Nachkommen der Kreuzung $A \times a$, also *Aa*, bei Selbstung „die Neigung besitzen, zu den Stammeltern zurückzukehren“ (Mendel, 1866). Die Beobachtung war nicht neu: Mendel schrieb, dass die „von Gärtner, Költreuter und anderen gemachte Wahrnehmung“ durch seine Versuche bestätigt wurde. Im Gegensatz zu seinen Vorgängern beließ Mendel es aber nicht bei einer „Wahrnehmung“. Er postulierte, dass in jeder Selbstungsgeneration (*n*) das Verhältnis $A:Aa:a = 2^{n-1}:2:2^{n-1}$ ist. Das heißt, aus dem Verhältnis 1:2:1 in der ersten Filialgeneration der Hybride *Aa* wird das Verhältnis 1023:2:1023 in der zehnten Filialgeneration.

Vorhersagen dieser Art waren 1866 Standard in der Physik, aber neu in der Biologie, denn zur Zeit Mendels steckte die Anwendung von Mathematik in der Biologie noch in den Anfängen und wurde mehrheitlich eher skeptisch betrachtet (Keller, 2002; Deichmann, 2019). Zwar gab es bereits Bestrebungen Quantifizierung und Korrelation für den Bereich der Biogeografie und Pflanzenmorphologie anzuwenden, allerdings erlangte die Bedeutung der Statistik für die Biologie erst mit den Veröffentlichungen von Francis Galton (1884) und Karl Pearson (1900) ihren Durchbruch. Mendel war in dem Punkt den meisten Biologen seiner Zeit also einige Jahre voraus. Der Chi²-Test zum Beispiel, mit dem bis heute eine signifikante Abweichung von erwarteten Spaltungsverhältnissen statistisch abgesichert wird, wurde erst 34 Jahre nach Mendels Veröffentlichung von Pearson (1900) publiziert.

Mendel war kein etabliertes Mitglied der damaligen Wissenschaftsgemeinde und konnte seine experimentellen Ergebnisse und bahnbrechende Theorie zunächst nur im Rahmen von zwei öffentlichen Vorträgen in Brno vorstellen. Zwar verschickte er seine 1866 erschienene Publikation in einem Sonderdruck von 40 Exemplaren an verschiedene europäische Wissenschaftler, doch blieb dies weitestgehend ohne Resonanz (Orel, 1971). Bis 1900 wurde der Artikel von Gregor Mendel kaum beachtet und wahrscheinlich nur zweimal zitiert, ohne dass die Bedeutung seiner Arbeit dabei erkannt wurde (Zirkle, 1951).

Spaltungsregel



Unabhängigkeitsregel

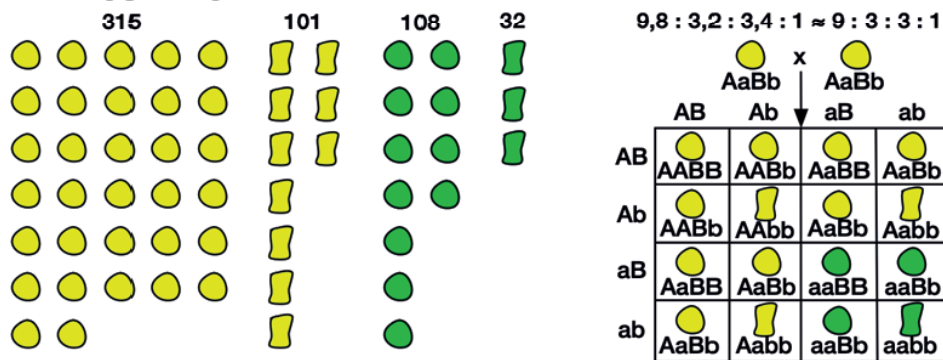


Abb. Anzahl der untersuchten Individuen und Spaltungsverhältnisse bei einigen der bekanntesten Experimente von Gregor Mendel (1866). Die Spaltungsregel konnte Mendel an Pflanzen mit gelben und grünen (oben), runden und eckigen Samen (Mitte) sowie rosa und weißblühenden Pflanzen (unten) bestätigen. Für die Unabhängigkeitsregel wählte er Samenfarbe (gelb und grün) sowie Samenform (rund und eckig). Oberhalb der Samen und Blüten stehen die Zahlenverhältnisse aus Mendels Versuchen, oberhalb der Kreuzungstabellen sind die beobachteten und die theoretischen Spaltungsverhältnisse dargestellt.

Obwohl bereits vor Mendel mehrere Wissenschaftler Kreuzungsexperimente mit dem Fokus auf einzelne Merkmale durchführten, war seine Herangehensweise im Vergleich zu den meisten seiner Zeitgenossen in der Biologie eher unorthodox. Es war verbreitet, Spezies und Kreuzungen in ihrer Gesamtheit zu beschreiben, statt sich auf die Vererbung spezifischer Merkmale zu konzentrieren (Gasking, 1959). Ein weiteres Problem für die zunächst fehlende Beachtung der Theorie Mendels kann Darwins 1859 erschienenes Buch "On

the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life" gewesen sein. Das Buch führte zu großer Aufmerksamkeit und zu Kontroversen innerhalb der Wissenschaftsgemeinde und legte den Fokus auf die Beschreibung der natürlichen Selektion, die zunächst ohne gezielte Experimente zum Nachweis von Hypothesen auszukommen schien (Stubbe, 1963). Ohne komplett überzeugt zu sein, vertrat Darwin zudem die damals populäre *blending inheritance*-Hypothese, nach der sich die

Merkmale beider Eltern in den Nachkommen mischen (Vorzimmer, 1963). Mendel selbst legte mit seinen Erbsenversuchen den Grundstein für die bis heute gültige *particulate inheritance*-Theorie, nach der sich die Merkmale beider Eltern nicht mischen, sondern neu kombinieren, (Mendel, 1866; Poczai & Santiago-Blay 2021). Dass Mendels Theorie die Evolutionstheorie Darwins stützte, wurde erst ab 1900 z. B. von Erich Tschermak (1900a) erkannt.

Zwar wies Rudolf Jacob Camerer schon 1694 anhand von Kreuzungsexperimenten die sexuelle Vererbung bei Pflanzen nach, allerdings konnte erst der Italiener Amici (1846) am Beispiel von Orchideen das Eindringen des Pollenschlauchs in den Embryosack und die Entwicklung des Embryos aus einem bereits dort vorhandenen ‚Bläschen‘, der Eizelle beobachten. Es sollte noch bis zum Jahr 1884 dauern, bis Eduard Strasburger die tatsächliche Verschmelzung des Spermazellkerns mit der Eizelle nachwies (Strasburger, 1884), aber spätestens mit Amici (1846) war Matthias Jacob Schleidens Theorie des Embryosacks als „Amme“ bereits vor Mendels Versuchen widerlegt (Lorenzano, 2011). Ausgerechnet Eduard Fenzl, Botaniker an der Universität Wien, war weiterhin ein Anhänger der Ammentheorie und ließ Mendel 1856 zum zweiten Mal durch die Lehramtsprüfung fallen (Lorenzano, 2011).

Wiederentdeckung der Vererbungsregeln und erste Zweifel an Mendels Zahlen

Bis zur „Wiederentdeckung“ der Vererbungsregeln durch Carl Correns (1900), Hugo de Vries (1900) und Erich Tschermak (1900a) sollten 34 Jahre vergehen. Während de Vries seine Gesetze zur Vererbung von Merkmalen zuerst publizierte, erkannte Correns, der zu ähnlichen Ergebnissen wie de Vries gekommen war, Mendel als wahren Erstautor der Vererbungsregeln an. Angeblich geschah das, nachdem er einen Sonderdruck von de Vries Forschungsarbeiten erhalten hatte (Wolpert, 2004). Laut Müller-Wille (2018) schrieb de Vries Mendel nur zu, die Vererbungsregeln für einen speziellen Fall dargestellt zu haben und nahm für sich selbst in Anspruch, die generelle Gültigkeit der Vererbungsregeln postuliert zu haben. Im Gegensatz dazu soll Correns in seinem in derselben Zeitschrift publizierten Artikel sarkastisch bemerkt haben, ihm käme es nicht auf die Erstveröffentlichung einer „Nachentdeckung“ an (Müller-Wille, 2018). Tschermak schreibt in der Nachschrift einer gekürzten Fassung seines Artikels (Tschermak, 1900b), ihn freue die "gleichzeitige Entdeckung Mendel's durch Correns, de Vries und mich". Er wird in der Literatur allerdings nicht durchgehend als "Wiederentdecker" der Mendelschen Regeln, gesehen (Simunek et al., 2012). Zweifelsfrei besonders bedeutend sind seine Arbeiten für die Entwicklung der Pflanzenzüchtung. Tschermak begründete 1909 an der Universität für Bodenkultur in Wien den ersten Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung in Europa (Riedl-Dorn, 2016). Weitere internationale Aufmerksamkeit erhielten die Arbeiten von Gregor Mendel nachdem Wiliam Bateson im Jahr 1901 die Übersetzung des Artikels für die *Royal Horticultural Society of London* organisiert hatte (Fairbanks & Abbott, 2016).

Einigen Statistikern kamen die von Mendel erhobenen Spaltungsverhältnisse allerdings zu gut vor, um wahr zu sein. Be-

reits ein Jahr nach der englischsprachigen Veröffentlichung 1901 schrieb der Biometriker Raphael Weldon dem Mathematiker Karl Pearson, bezugnehmend darauf, dass die Beobachtungen des Augustinerabtes Gregor Mendel seinen postulierten theoretischen Spaltungsverhältnissen fast durchweg sehr nahe kamen: „*Remembering his shaven crown I cannot help wondering if they were not too good.*“ Obwohl er etwas später schrieb, Mendel „*cooked his figures, but (...) was substantially right*“, hatte er weiterhin Bedenken gegenüber der Allgemeingültigkeit von Mendels Aussagen (Franklin, 2008), wobei er unter anderem Erich Tschermak-Seysenegg zitierte, der ebenfalls an dem Untersuchungsobjekt Erbse forschte, aber zumindest bei einigen der von Mendel untersuchten Merkmale weniger eindeutige Ergebnisse erzielte (Weldon, 1902; Tschermak, 1900a).

Weldon berechnete die Intervalle, innerhalb derer 50 % der Beobachtungen für die jeweils dominanten Eigenschaften in Abhängigkeit der Gesamtzahl der Observationen liegen müsste ($0,75n \pm 0,67449 \times \sqrt{n} \times 0,75 \times 0,25$). Bei den insgesamt sieben Versuchen mit unterschiedlichen Merkmalen, die Mendel (1866) zur Ableitung der Spaltungsregel durchführte, lagen seine Ergebnisse fünfmal innerhalb des Intervalls, einmal lag der Wert genau auf der Grenze und ein weiteres Mal lag er leicht oberhalb der Intervallgrenze. Weldon (1902) schlussfolgerte, die Chancen stünden 16:1, dass im Falle einer Wiederholung der Versuche schlechtere Ergebnisse erzielt würden. Mit seinen folgenden Versuchen hatte Mendel (1866) bestätigt, dass ein Drittel der Genotypen, die in der F2 das dominante Merkmal aufwies, bereits reinerbig sein muss. Basierend auf diesen Beobachtungen, berechnete Weldon (1902), dass die Werte von Mendel (1866) nur dreimal innerhalb des Intervalls lagen, einmal genau auf der Grenze und dreimal außerhalb der Grenze für den wahrscheinlichen Fehler. Er blieb skeptisch und bemerkte, Mendel habe nie Daten erhoben, deren Abweichungen von den theoretischen Spaltungsverhältnissen zweimal so groß wie der wahrscheinliche Fehler seien. Bezugnehmend auf die Versuche, in denen Mendel drei Merkmale untersuchte, kam Weldon (1902) zu dem Schluss, in 95 von 100 Fällen müssten bei wiederholten Versuchen schlechtere Ergebnisse erzielt werden. Bezugnehmend auf die zunehmende Popularität von Mendels Arbeiten schrieb Weldon (1902): „*Some writers have been led to overlook the wonderfully consistent way in which Mendel's results agree with his theory.*“

Der später bekannt gewordene Statistiker und Genetiker Ronald A. Fisher soll 1911 im Alter von 21 Jahren ebenfalls berechnet haben, dass die Chancen bei einer Wiederholung der Experimente 16:1 gegen Mendel stünden, nochmals so gute Ergebnisse zu erzielen (Franklin, 2008). Er schrieb laut Franklin (2008): „*It may just have been luck; or it may be that the worthy German abbot, in his ignorance of probable error, unconsciously placed doubtful plants on the side which favoured his hypothesis.*“ Als glühender Verfechter der Arbeiten von Gregor Mendel veröffentlichte Bateson zur selben Zeit gleich mehrere Bücher, die wiederum die Übersetzungen der Texte von Mendel, aber auch umfassende Abhandlungen zur Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln und zur Allgemeingültigkeit der Vererbung von Merkmalen enthielten (Bateson, 1902; Bateson, 1913).

Fishers Artikel und die Mendel-Fisher-Kontroverse

In einem 1936 publizierten Artikel kam Fisher zu dem Schluss, dass die meisten Daten Mendels verfälscht sein müssten, weil sie der Theorie zu gut entsprächen und größere Abweichungen zu erwarten wären. Bei seinen Untersuchungen der zweiten „Generation der Hybriden“ wählte Mendel (1866) jeweils 100 Pflanzen, die das dominante Merkmal zeigten und selbstete diese. Von jeder dieser Pflanzen nahm er zehn Samen, um die Spaltungsregel zu überprüfen. Insgesamt untersuchte er fünf Merkmale. Nur bei der Farbe der Hülsen stellte er eine größere Abweichung von der 2:1 Spaltungsregel fest: 60 der 100 ausgewählten Pflanzen bekamen sowohl Nachkommen mit gelben als auch solche mit grünen Hülsen. Sie waren demnach heterozygot. 40 bekamen ausschließlich Nachkommen mit grünen Hülsen und konnten als homozygot klassifiziert werden. Bei einer Wiederholung des Versuchs kam er zu einem Spaltungsverhältnis von 65:35, welches 2:1 wieder sehr nahekommt. Nimmt man jedoch die Nachkommen aller untersuchten 600 Pflanzen zusammen, waren 399 heterozygot und 201 homozygot für das untersuchte Merkmal. Die 2:1 Spaltungsregel war damit nahezu perfekt erklärt und könnte rein zufällig so gut abgebildet worden sein. Fisher (1936) ging allerdings davon aus, dass 5,63 % der heterozygoten Eltern des Selbstungsexperiments fälschlicherweise als homozygot klassifiziert werden müssten. Demzufolge sei das zu erwartende Spaltungsverhältnis nicht 2:1 sondern 1,7:1. Fisher (1936) schrieb, eine so glückliche Abweichung von den von ihm errechneten Spaltungsverhältnissen hin zu denen, die Mendel selbst postulierte sei nur in einem von 29 Experimenten zu erwarten.

Hartl & Fairbanks (2004) halten die Annahme Fishers allerdings für falsch, sobald ein kleiner Prozentsatz an heterozygoten Genotypen mit Merkmalen des rezessiven Phänotyps auftritt. Das würde für unvollständige Dominanzen zutreffen, die Mendel allerdings nicht beobachtet hat. Weiterhin argumentieren Sie, dass das Spaltungsverhältnis für die Hülsenfarbe dem erwarteten Verhältnis von Fisher sehr nahekommt, wenn man beide Versuche (Original und Wiederholung) zusammenfasst. Darüber hinaus gehen sie davon aus, dass Mendel als begnadeter Gärtner sicherlich mehr Pflanzen ausgesät hat, als er für seine Untersuchungen benötigte, um auf exakt zehn Nachkommen von den o.g. 100 Pflanzen zu kommen. Zudem sind einige der von Mendel untersuchten Merkmale aufgrund pleiotroper Geneffekte schon im Sämlingsstadium zu erkennen, sodass die Autoren hier von einer eher unbewussten Vorauswahl ausgehen. Weil keines der Ergebnisse von Mendel (1866) signifikant von dem erwarteten Spaltungsverhältnissen von 1,7:1 von Fisher (1936) abweicht, sehen Hartl und Fairbanks (2004) keinen weiteren Grund zur Beschuldigung Mendels, seine Daten bewusst gefälscht zu haben. Sind die Verdächtigungen also grundlos, wie Radick (2015) konstatierte? Es bleibt die Frage, warum außer $60:40 = 1,5:1$ alle Abweichungen von dem von Fisher berechneten Spaltungsverhältnis von 1,7:1, welches die fälschlicherweise als homozygot klassifizierten heterozygoten Genotypen mit einbezieht, in dieselbe Richtung gehen. Sie sind also größer als 1,7:1 und nahe um das von Mendel postulierte Spaltungsverhältnis von 2:1 gestreut.

Für die in 1863 durchgeführten zwei- und dreifaktoriellen Experimente sowie für weitere Tests desselben Jahres gibt Fisher die erwarteten und beobachteten Abweichungen als χ^2 -Werte an. Pearson (1900) beschrieb den χ^2 -Test, der z. B. durch Harris (1912) propagiert wurde, um signifikante Abweichungen von Spaltungsverhältnissen nach den Mendelschen Regeln zu verifizieren. Fisher (1936) kommt zu dem Schluss, dass die Diskrepanz hochsignifikant ist und nur einmal in 2.000 Experimenten vorkommen könne. Alle Experimente zusammengefasst, kommt Fisher (1936) auf eine Wahrscheinlichkeit von 0,99993, mit der die erwarteten Abweichungen größer sind als die beobachteten. Das heißt, in nur sieben von 100.000 Fällen sind ebenso gute oder bessere Ergebnisse zu erwarten als die von Gregor Mendel. Nach der Durchführung von Monte-Carlo-Simulationen kommen Pires und Branco (2010) zu dem Schluss, dass die Ergebnisse von Fisher (1936) plausibel sind und gehen von zwei von 100.000 Fällen aus, in denen die Beobachtungen ebenso gut oder besser sein müssten als die von Mendel. Parallel analysierten sie die p -Werte anstelle der χ^2 -Tests und berechneten, dass basierend darauf in vier von 1.000 Fällen einer Wiederholung der Experimente die Ergebnisse gleich gut oder besser zu den Erwartungswerten passen, als die von Mendel (1866). Die Conclusio von Pires & Branco (2010) ist, dass die Ergebnisse von Mendel „*to good to be true*“ seien, um alle Daten, die Mendel real in Versuchen erhoben hat, beinhalten zu können oder auf einer zufälligen Selektion der Datengrundlage zu basieren. Aufgrund seiner eigenen Äußerungen zu wiederholten Versuchen und der gelegentlichen Darstellung von extremen Abweichungen von der Regel, gehen Pires & Branco (2010) von einem „*hidden bias*“ aus, der zu den extrem positiven Ergebnissen von Mendel (1866) geführt hat.

Ganz im Gegensatz dazu nennen Montgomery & Birkhead (2005) Mendel den „*father of scientific misconduct*“ und spekulieren – wie bereits vorher vermutet, er könne viele Experimente durchgeführt, aber nur die veröffentlicht haben, in denen die Spaltungsverhältnisse nahe an seinen Erwartungen lagen. Zumindest in einem Fall benennt Mendel (1866) – wie oben beschreiben – konkret die Wiederholung eines Experimentes, weil die Ergebnisse zunächst nicht zu seinen Erwartungen passten. Bei Kreuzungsversuchen innerhalb der Gattung *Phaseolus* gibt Mendel nur an, „ein ganz übereinstimmendes Resultat“ beobachtet zu haben, ohne dieses im Detail zu dokumentieren. Als weitere Möglichkeit ziehen Montgomery & Birkhead (2005) in Betracht, Mendel könne aufgehört haben zu zählen, sobald die Zahlenverhältnisse seinen Erwartungen nahekommen, obwohl er selbst schrieb, nicht so vorgegangen zu sein. Auch könnten Pflanzen aussortiert worden sein, die zu sehr von den Vererbungsregeln abweichen. Bereits Fisher (1936) spekulierte, ein anonymes Assistent, der zu gut gewusst habe, was Mendel erwarte, könne Pflanzen beiseite genommen haben. Mendel selbst bemerkt an verschiedenen Stellen, dass bei den Nachkommen einzelner Pflanzen durchaus große Abweichungen von theoretischen Spaltungsverhältnissen zu beobachten sind. Dass diese nicht in die Analysen eingegangen sein könnten, geht aus seiner Schrift von 1866 allerdings nicht hervor. Auch Montgomery & Birkhead (2005) schließen die unbewusste Verfälschung der Daten, indem Mendel nicht eindeutig den Merkmalsausprägungen zuzuordnende Exemplare so ein-

ordnete, dass die theoretischen Spaltungsverhältnisse wieder stimmten, nicht aus.

Sollte Mendel seine Versuche unbewusst voreingenommen durchgeführt haben, hätte er schon vorab wissen müssen, welche Ergebnisse bzw. Spaltungsverhältnisse zu erwarten sind (Pilpel, 2007). Mit anderen Worten: Er hat seine Theorie über die Vererbungslehre nicht von den Ergebnissen abgeleitet, sondern die Ergebnisse – bewusst oder unbewusst – seiner Theorie angepasst. In der Wissenschaft ist es eher gewöhnlich, dass die Hypothese vor Beginn der Untersuchungen steht. Dass die objektive Herangehensweise oder der Versuch, die eigene Hypothese zu widerlegen, der korrekteste aber gleichzeitig emotional schwierigste Weg ist, dürfte jedem Wissenschaftler bewusst sein. Genau deshalb führen Pires & Branco (2010) die Notwendigkeit von Doppelblindstudien in einigen wissenschaftlichen Disziplinen an. Mit anderen Worten: Wenn Mendel wusste, dass ein weiterer runder Same zu erwarten war, hat er einen nicht ganz runden Samen eventuell als rund klassifiziert, der von einem komplett objektiven Beobachter als kantig bezeichnet oder als undefinierbar aussortiert worden wäre.

Ähnliches vermutet Weeden (2016), der davon ausgeht, Mendel habe ein brillantes Modell entwickelt und war deshalb versucht, dieses einem wenig enthusiastischen Publikum zu vermitteln. Weeden verglich die χ^2 -Werte, die sich aus Mendels Daten ergeben mit denen, die später an denselben Merkmalen bei Erbsen beobachtet wurden. Er geht davon aus, dass zumindest bei einigen der untersuchten Merkmale deutlich stärkere Abweichungen von den theoretischen Spaltungsverhältnissen zu erwarten sind. Dabei beruft Weeden sich auf seine Metastudie, in der die Ergebnisse von 45 Publikationen eingingen (Tabelle). Zwar liegen die Ergebnisse von Gregor Mendel innerhalb der Grenzen der von Weeden zitierten Studien, allerdings ist auffällig, dass sie durchweg sehr gute bzw. den theoretischen Spaltungsverhältnissen von 1:1, 2:1 oder 3:1 nahekommende Ergebnisse zeigen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, warum Mendel keine Kopplung von Merkmalen beobachtete, obwohl die Gene, die Wuchshöhe

und Hülsenform kontrollieren, nur 5 cM entfernt auf demselben Chromosom liegen (Weeden, 2016). Dem Autor zufolge hätte Mendel diese Beobachtung machen müssen, die in seinem Artikel von 1866 unerwähnt bleibt. Allerdings berichtet Mendel von der Co-Segregation beider Merkmale in seinen Briefen an Carl Nägeli, die von Correns (1905) veröffentlicht wurden. Weeden schlussfolgert, wir sollten anerkennen, dass es keine unvoreingenommenen Beobachter gibt und dass Wissenschaft nur als Gemeinschaft selbstkorrigierend funktioniert.

Letztlich bleiben also Zweifel an der korrekten Zählweise Mendels (1866) zur Erhebung seiner Daten bestehen. Ob er nun weitere Experimente durchgeführt und nur seine besten Ergebnisse veröffentlicht hat, ob einzelne Pflanzen durch ihn oder einen an keiner Stelle erwähnten Assistenten aussortiert wurden oder ob allein die fehlende Unvoreingenommenheit und Objektivität zu den vielen nahezu perfekten Ergebnissen geführt hat, wird wohl ungewiss bleiben und zu weiteren Spekulationen führen. Zu bedenken ist, dass Gregor Mendel im Gegensatz z. B. zu Charles Darwin kein bekannter Wissenschaftler war sondern – zum Zeitpunkt der Erhebung seiner Daten – ein einfacher Mönch, der seine Lehramtsprüfung nicht bestanden hatte. Trotzdem war seine quantitative Datenerfassung eher neu in seinem Forschungsgebiet und im Gegensatz zu seinen Vorgängern erkannte er die Gesetzmäßigkeiten bei der Vererbung von Merkmalen. Die von Mendel (1866) entdeckten theoretischen Spaltungsverhältnisse bleiben unangefochten und weisen gerade vor dem Hintergrund der Möglichkeiten, die Mendel für seine Forschungsaktivitäten hatte, auf seine Genialität hin. Mendel war der erste, der die Gesetzmäßigkeiten der Vererbung eindeutig beschreiben konnte und er hat damit die Grundlagen sowohl für die Genetik als Wissenschaft als auch für die moderne Pflanzenzüchtung gelegt.

Erklärung zu Interessenskonflikten

Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.

Tabelle. Anzahl der von Mendel und anderen Autoren durchgeführten Versuche zu den Spaltungsverhältnissen verschiedener Merkmale bei der Erbse sowie durchschnittliche, minimale und maximale χ^2 - und p-Werte. Bei der Tabelle handelt es sich um eine Zusammenfassung der Metastudie von Weeden (2016). Die 45 Publikationen, auf der die Studie beruht, sind im Originalartikel von Weeden (2016) zitiert. Ein χ^2 -Wert $> 3,84$ bei einer Anzahl von Freiheitsgraden = 1 zeigt eine signifikante Abweichung von den theoretischen Spaltungsverhältnis 3:1 und 1:1. Dasselbe gilt für kleine p-Werte.

Merkmal	Mendel			andere Autoren (nach Weeden 2016)		
	Anzahl der Versuche	χ^2	p	Anzahl der Versuche	χ^2	p
Samenfarbe	3	0.27 (0.10-0.39)	0.62 (0.53-0.76)	30	1.18 (0.00-5.00)	0.44 (0.02-1.00)
Wuchshöhe	2	0.50 (0.39-0.61)	0.49 (0.44-0.53)	24	0.60 (0.00-2.11)	0.57 (0.15-1.00)
Hülsenfarbe	1	0.45 (0.45-0.45)	0.50 (0.50-0.50)	33	1.50 (0.00-6.73)	0.44 (0.01-1.00)
Samenform	8	0.14 (0.00-0.35)	0.76 (0.56-1.00)	28	2.18 (0.00-13.7)	0.40 (0.00-0.98)
Farbe der Kotyledonen	8	0.31 (0.00-0.80)	0.66 (0.37-1.00)	15	1.60 (0.03-13.6)	0.50 (0.02-0.86)
Sitz der Blüten	1	0.35 (0.35-0.35)	0.55 (0.55-0.55)	6	5.01 (0.00-7.68)	0.33 (0.00-0.98)
Hülsenform	1	0.06 (0.06-0.06)	0.80 (0.80-0.80)	6	2.85 (0.20-11.4)	0.35 (0.00-0.66)

Literatur

- Amici, G.B., 1846:** Sulla fecondazione delle orchidee. *Giornale Botanico Italiano* **2**, 237–248.
- Bateson, W., 1902:** Mendel's principles of heredity. A Defence, with a Translation of Mendel's Original Papers on Hybridisation. Cambridge University Press.
- Bateson, W., 1913:** Mendel's principles of heredity. 1. Mendel's law 2. Evolution 3. Heredity 4. Hybridization. Cambridge University Press.
- Correns, C., 1900:** G. Mendels Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **18**, 158–169.
- Correns, C., 1905:** Gregor Mendels Briefe an Carl Nägeli, 1866–1873. Ein Nachtrag zu den veröffentlichten Bastardierungsversuchen Mendels. Teubner, Leipzig.
- Deichmann, U., 2019:** From Gregor Mendel to Eric Davidson: Mathematical models and basic principles in biology. *Journal of Computational Biology* **26**, 637–652, DOI: 10.1089/cmb.2019.0087.
- de Rabutin-Chantal, M., 0000:** "Potager du roi", URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Potager_du_roi.
- de Vries, H., 1900:** Das Spaltungsgesetz der Bastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **18**, 83–90.
- Fairbanks, D.J., S. Abbott, 2016:** Darwin's influence on Mendel: Evidence from a new translation of Mendel's paper. *Genetics* **204**, 401–405, DOI: 10.1534/genetics.116.194613.
- Fisher, R.A., 1936:** Has Mendel's work been rediscovered? *Annals of Science* **1**, 115–137, DOI: 10.1080/00033793600200111.
- Franklin, A., 2008:** The Mendel-Fisher Controversy. In: Franklin, A., A.W.F. Edwards, D.J. Fairbanks, D.L. Hartl, T. Seidenfeld (eds): *Ending the Mendel-Fisher controversy*. University of Pittsburg Press.
- Galton, F., 1884:** Regression towards mediocrity in hereditary stature. *The Journal of the Anthropological Institute of Great Britain and Ireland* **15**, 246–263.
- Gärtner, C.F., 1849:** Versuche und Beobachtungen über die Bastarderzeugung im Pflanzenreich. KF Hering & Comp. Stuttgart.
- Gasking, E.B., 1959:** Why was Mendel's work ignored? *Journal of the History of Ideas* **20**, 60–84, DOI: 10.2307/2707967.
- Goss, J., 1824:** On the variation in the colour of peas, occasioned by cross-impregnation. *Transactions of the Horticultural Society of London* **5**, 234–235.
- Hartl, D.L., D.J. Fairbanks, 2004:** Mud sticks: on the alleged falsification of Mendel's data. *Genetics* **175** (3), 975–979, DOI: 10.1093/genetics/175.3.975.
- Harris, J.A., 1912:** A simple test of the goodness of fit of Mendelian ratios. *The American Naturalist* **46**, 741–745.
- Hedrick, U.P., F.H. Hall, L.R. Hawthorn, L. Berger, 1928:** Peas of New York. Part 1 Vol. 1 of *Vegetables of New York*. Report of the New York State Agricultural Experiment Station. Albany JB Lion Company Printers.
- Jefferson, T., 1766-1824:** Garden Book. Original manuscript from the Coolidge Collection of Thomas Jefferson Manuscripts, Massachusetts Historical Society.
- Keller, E.F., 2002:** Making sense of life: Explaining biological development with models, metaphors, and machines. Harvard University Press.
- Knight, T.A., 1799:** Experiments on the fecundation of vegetables. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **89**, 195–204.
- Knight, T.A., 1824:** Some remarks on the supposed influence of the pollen in cross breeding. *Transactions of the Horticultural Society of London* **5**, 377–380.
- Kreplak, J., M.A. Madoui, J. Burstin, 2019:** A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nature Genetics* **51**, 1411–1422, DOI: 10.1038/s41588-019-0480-1.
- Lorenzano, E., 2011:** What would have happened if Darwin had known Mendel (or Mendel's work)? *History and Philosophy of the Life Sciences* **33**, 3–49.
- Mendel, G., 1866:** Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn* **4**, 3–47.
- Miko, I., 2008:** Gregor Mendel and the principles of inheritance. *Nature Education* **1**, 134.
- Montgomery, B., T. Birkhead, 2005:** A beginner's guide to scientific misconduct. *ISBE Newsletter* **17**, 16–21.
- Müller-Wille, S., 2018:** Gregor Mendel and the history of heredity. In: Dietrich, M., M. Borrello, O. Harman (eds.) *Handbook of the Historiography of Biology*. 1–22, DOI: 10.1007/978-3-319-74456-8_8-1.
- Orel, V., 1971:** A reconstruction of Mendel's *Pisum* experiments and an attempt at an explanation of Mendel's way of presentation. *Folia Mendeliana* **6**, 105–112.
- Pearson, K., 1900:** On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine* **50**, 157–175.
- Pilpel, A., 2007:** Statistics is not enough: revisiting Ronald A. Fisher's critique (1936) of Mendel's experimental results (1866). *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* **38**, 618–626.
- Pires, A.M., J.A. Branco, 2010:** A statistical model to explain the Mendel-Fisher controversy. *Statistical Science* **25**, 545–565, DOI: 10.1214/10-STS342.
- Pocza, P., J.A. Santiago-Blay, 2021:** Principles and biological concepts of heredity before Mendel. *Biology direct* **16**, 1–17, DOI: 10.1186/s13062-021-00308-4.
- Radick, G., 2015:** Beyond the „Mendel-Fisher controversy“. *Science* **350**, 159–160, DOI: 10.1126/science.aab3846.

- Riedl-Dorn, C., 2016:** "Tschermak von Seysenegg, Erich" Neue Deutsche Biographie **26**, 475-476.
- Seton, A., 1824:** On the variation in the colour of peas from cross-impregnation. Transactions of the Horticultural Society of London **5**, 236.
- Simunek, M., U. Hoßfeld, O. Breidbach, 2012:** 'Further Development' of Mendel's legacy? Erich von Tschermak-Seysenegg in the context of Mendelian-biometry controversy, 1901-1906. Theory in Biosciences **131**, 243-252, DOI: 10.1007/s12064-012-0158-z.
- Stern, C., E.R. Sherwood, 1966:** The origin of genetics: a Mendel source book. WH Freeman San Francisco.
- Strasburger, E., 1884:** Neue Untersuchungen über den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen als Grundlage für eine Theorie der Zeugung. Fischer, Jena.
- Stubbe, H., 1963:** Kurze Geschichte der Genetik bis zur Wiederentdeckung der Vererbungsregeln Gregor Mendels. Fischer, Jena.
- Teicher, A., 2014:** Mendel's use of mathematical modelling: ratios, predictions and the appeal to tradition. History and Philosophy of the Life Sciences **36**, 187-208, DOI: 10.1007/s40656-014-0019-9.
- Townsend, B., 1725:** The complete seedsman: Shewing the best and easiest method for raising and cultivating every sort of seed. London.
- Tracy, W.W., 1903:** American varieties of vegetables for the years 1901 and 1902. U.S. Department of Agriculture. Government Printing Office. New York.
- Tschermak, E., 1900a:** Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft **18**, 232-39 (gekürzte Fassung).
- Tschermak, E., 1900b:** Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. Zeitschrift für die landwirtschaftlichen Versuchswesen in Österreich **3**, 465-555.
- Vorzimmer, P., 1963:** Charles Darwin and blending inheritance. Isis **54**, 371–390.
- Weeden, N.F., 2016:** Are Mendel's data reliable? The perspective of a pea geneticist. Journal of Heredity **107**, 635-646, DOI: 10.1093/jhered/esw058.
- Weldon, W.F.R., 1902:** Mendel's laws of alternative inheritance in peas. Biometrika **1**, 228-254.
- Wolpert, L., 2004:** Unglaubliche Wissenschaft. Eichborn Verlag, Frankfurt am Main.
- Woolridge, J., 1677:** Systema horticultrae or the Art of Gardening. W. Freeman. London.
- Zirkle, C., 1951:** Gregor Mendel and his precursors. Isis: A Journal of the History of Science Society **42**, 97-104.

Henryk Flachowsky, Ofere Francis Emeriewen, Mirko Schuster, Andreas Peil, Janne Lempe, Thomas Wöhner

Der Einfluss der Mendelgenetik auf die Sortenzüchtung bei Apfel und Süßkirsche

The impact of Mendelian genetics on the breeding of apple and sweet cherry

Affiliation

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

Kontaktanschrift

Prof. Dr. Henryk Flachowsky, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an Obst, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, E-Mail: henryk.flachowsky@julius-kuehn.de

Zusammenfassung

Mendels Einfluss auf die moderne Obstzüchtung ist unverkennbar. Die von ihm aufgestellten Vererbungsregeln haben es Züchtern ermöglicht, Kreuzungsprogramme gezielt zu designen, Vorhersagen über den möglichen Erfolg zu treffen und die Selektion von Nachkommen mit verbesserten Merkmalskombinationen mithilfe molekulargenetischer Marker kostengünstig und effizient zu gestalten. Am Beispiel des Apfels und der Süßkirsche als Vertreter für Kern- und Steinobst werden ausgewählte mendelnde Merkmale vorgestellt, die von besonderer Bedeutung für die Züchtung sind. Darüber hinaus wird der derzeitige Stand an molekularen Markern und genetischen Karten bei diesen Kulturen präsentiert. Sie beeinflussen die Effizienz in der Obstzüchtung enorm. Ihre Entwicklung wäre jedoch ohne Mendels Erkenntnisse nicht möglich gewesen. Beim Apfel, der bedeutendsten einheimischen Obstart, gibt es eine Vielzahl von wirtschaftlich interessanten mendelnden Merkmalen. Einige von ihnen, wie der Säulenwuchs, die rote Fruchtfleischfarbe, das Kältebedürfnis zum Brechen der Winterknospenruhe, die Samenlosigkeit der Früchte sowie gefüllte Blüten für den Anbau als Ziergehölz und die Resistenz gegenüber Schorf und Mehltau sind phänotypisch einfach zu erfassen. Eine Selektion auf der Basis des Phänotyps ist bei diesen Merkmalen meist problemlos möglich, wenngleich sie mithilfe molekularer Marker noch effektiver gestaltet werden kann. Andere Merkmale, wie die Resistenz gegenüber Insekten, verschiedenen Lagerkrankheiten oder der bakteriellen Feuerbrandkrankheit sind nicht so einfach anhand des Phänotyps zu bestimmen. Hier sind für eine erfolgreiche Züchtung molekulare Marker unabdingbar. Das gilt auch für die rote Färbung der Fruchtschale. Bei Süßkirschen ist die Situation sehr ähnlich. Zu den mendelnden Merkmalen mit ökonomischer Bedeutung gehören hier neben der Selbstfertilität auch die Mehltairesistenz und die Farbe der Fruchtschale.

Stichwörter

Mendel, Obstzüchtung, *Malus domestica*, *Prunus avium*, monogen, Marker

Abstract

The influence of Mendel on modern fruit breeding is undeniable. The inheritance rules he established have enabled breeders to design breeding programmes in a targeted manner to make predictions about possible success and to select offspring with improved trait combinations using molecular genetic markers in a cost-effective and efficient way. Using the example of the apple and the sweet cherry as representatives of pome and stone fruit, we highlight selected Mendelian traits that are of particular importance for breeding. In addition, the current status of molecular markers and genetic maps and their enormous influence in efficient fruit breeding are presented. However, molecular marker progress would not have been possible without Mendel's insights. In apples, the most important native fruit species, there is a large number of economically interesting Mendelian traits some of which are easy to phenotype. For example, columnar growth, red flesh colour, cold requirement for breaking winter bud dormancy, seedlessness of the fruits and double flowers for cultivation as an ornamental tree and resistance to scab and powdery mildew. Other traits, such as resistance to insects, and the bacterial disease fire blight and various storage diseases are not as straightforward to phenotype. This also applies to red colouration of the fruit skin. Nevertheless, in both situations, molecular markers are indispensable for successful breeding. This also applies to sweet cherries. In addition to self-fertility, powdery mildew resistance and fruit skin colour are among the Mendelian traits with economic significance in sweet cherry breeding.



(c) Die Autoren/Die Autorinnen 2022

Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

Zur Veröffentlichung eingereicht/angenommen: 27. Juli 2022/7. November 2022

Keywords

Mendel, fruit breeding, *Malus domestica*, *Prunus avium*, monogenic, marker

Einleitung

Kaum ein anderer Naturwissenschaftler hat die Entwicklungen in der Pflanzenzüchtung in den letzten 100 Jahren so stark beeinflusst wie Gregor Johann Mendel. In Hynčice geboren und später als Priester des Augustinerordens und Abt in Brünn (Tschechische Republik) tätig, war Mendel ein vielseitig interessierter Naturforscher, der mit unterschiedlichsten Pflanzenarten experimentierte. So studierte er beispielsweise bei Obstgehölzen die Ausprägung von Fruchtmerkmalen und stellte dafür umfassende Kreuzungsprogramme auf (Tab. 1). Für die dabei erzeugten Neuzüchtungen wurde er im September 1883 auf der Nationalen Obstausstellung in Brünn vom k. k. Österreichischen Pomologenverein mit einer Medaille der k. k. Wiener Gartenbau-Gesellschaft ausgezeichnet (Orel & Vavra, 1968; Vavra & Orel, 1971).

Von wesentlich größerer Bedeutung sind jedoch seine 1866 veröffentlichten Ergebnisse aus Kreuzungsversuchen an Erbsen (Mendel, 1866). Diese führten nach ihrer Wiederentdeckung im Jahr 1900 zu einem Wendepunkt in der modernen Wissenschaft der Genetik (Hossfeld et al., 2017). Mithilfe von Mendels Erkenntnissen war es Wissenschaftlern zu dieser Zeit erstmals möglich, die Vererbung von Eigenschaften mathematisch zu beschreiben und die Anzahl der an der Merkmalsausprägung beteiligten Gene zu ermitteln. Die von Mendel entdeckten Regeln, die eine unabhängige Vererbung (freie Rekombination) voraussetzen, wurden in den Jahren nach ihrer Wiederentdeckung in zahlreichen experimentellen Ansätzen überprüft. Die dabei erzielten Ergebnisse führten letztendlich zu unserem heutigen Verständnis über den Aufbau des Genoms eukaryotischer Lebewesen sowie die Rolle von Chromosomen und Genen bei der Vererbung von Merkmalen.

Einer der Wissenschaftler, welcher die Regeln Mendels zu Beginn des 20. Jahrhunderts auf Allgemeingültigkeit prüfte, war Thomas Hunt Morgan. Bei seinen Experimenten an Fruchtfliegen (*Drosophila*) kam Morgan zu dem Schluss, dass im Gegensatz zu Mendels Annahme nicht alle Merkmale unabhängig voneinander vererbt werden. Morgan konnte zeigen, dass die Augenfarbe von Fliegen von einem Faktor beeinflusst wird, der auf dem X-Chromosom lokalisiert sein muss, welches das weibliche Geschlecht vererbt (Morgan, 1910). Dieses als genetische Kopplung bezeichnete Phänomen beruht auf der Annahme das Gene, die sich in räumlicher Nähe auf einem Chromosom befinden, wesentlich häufiger gemeinsam an Nachkommen vererbt werden als solche, die sich in einem größeren Abstand zueinander oder sogar auf unterschiedlichen Chromosomen befinden. Crossing over-Ereignisse, die zur Trennung (Rekombination) solcher Gene führen, finden wesentlich seltener statt, je kleiner der räumliche Abstand zwischen zwei Genen ist. Diese Erkenntnis ermöglichte in der Folge die räumliche Anordnung von Merkmalen (Genen) auf einzelnen Chromosomen sowie die Erstellung erster genetischer Karten. Die genetische Kartierung erwies sich

in den Anfangsjahren jedoch noch als sehr schwierig, da es bei den meisten Organismen an einer ausreichenden Anzahl einfach zu erfassender Merkmale mangelte, die nur von einem oder wenigen Genen bedingt sind. Um diesen Mangel zu beheben, wurden große Anstrengungen unternommen. Das dabei verfolgte Ziel lag vorrangig in der Identifizierung von Hilfsmerkmalen (Markern), die an ein Zielmerkmal gekoppelt, einfach nachzuweisen, im Zuchtmaterial variabel und in ausreichender Anzahl vorhanden sind. Erst mit der Entdeckung der DNA als Träger der Erbinformation (Watson & Crick, 1953; Nirenberg & Matthaei, 1961), den Restriktionsenzymen (Ar-

Tab. 1. Beispiel für ein von Mendel durchgeführtes Kreuzungsprogramm bei Apfel. Die Aufzeichnungen zu diesem Kreuzungsprogramm hat Gregor Mendel handschriftlich in die 1859 erschienene Ausgabe des „Illustrierten Handbuches der Obstkunde“ von F. Jahn, E. Lucas und J.G.G. Oberdiek notiert (Orel & Vavra 1968).

Kombination	Muttersorte	Vatersorte
1	Weißer Astrachan	Sommengewürzappel
2	Weißer Astrachan	Der Köstlichste (Bozen)
3	Burchardt's Carolin	Weißer Astrachan
4	Alantapfel	Weißer Winterkalvill
5	Willy*	Weißer Winterkalvill
6	Schneekalvill	Garibaldis Kalvill
7	Winterpostoph	Weißer Winterkalvill
8	Kanada Renette	Weißer Winterkalvill
9	Graue Französische Renette	Süßer Holaart
10	Graue Französische Renette	Roter Stettiner
11	Graue Französische Renette	Kasseler Renette
12	Graue Französische Renette	Der Köstlichste (Bozen)
13	Graue Französische Renette	Weißer Winterkalvill
14	Graue Französische Renette	Edelborsdorfer
15	Graue Französische Renette	Roter Wintertaubenapfel
16	Graue Französische Renette	Alantapfel
17	Süßer Holaart	Champagner Renette
18	Süßer Holaart	Kasseler Renette
19	Süßer Holaart	Roter Stettiner
20	Süßer Holaart	Weißer Wintertaffetapfel
21	Süßer Holaart	Edelborsdorfer
22	Süßer Holaart	Weißer Winterkalvill
23	Süßer Holaart	Roter Osterkalvill
24	Champagner Renette	Sommengewürzappel
25	Champagner Renette	Süßfranke
26	Dietzer Goldrenette	Orleans Renette
27	Muskatrenette	Weißer Astrachan
28	Muskatrenette	Oberdiecks Renette
29	Muskatrenette	Edelborsdorfer
30	Schneekalvill	Weißer Wintertaffetapfel

* Bei dieser Sorte scheint es sich vermutlich um die Sorte 'Willy's Renette' zu handeln

ber & Linn, 1969) sowie der Entwicklung von Methoden zur DNA-Sequenzierung (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977) und der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986) wurde dieses Problem hinreichend behoben. Vor allem die rasanten Fortschritte bei der Entwicklung molekularbiologischer Methoden zu Beginn des 21. Jahrhunderts haben dazu geführt, dass molekulare Marker und genetische Karten heute zum Standardrepertoire vieler Züchter gehören. Das ist auch bei heimischen Obstarten, wie dem Apfel oder der Süßkirsche, der Fall. Hier wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Merkmale genetisch kartiert, die dafür verantwortlichen Gene identifiziert, in Einzelfällen isoliert und mithilfe einer markergestützten Selektion in hochwertiges Zuchtmaterial überführt. Im Folgenden sind einige ausgewählte Merkmale bei Apfel und Süßkirsche beschrieben, die nach den Mendelschen Regeln vererbt werden und zum Teil eine enorme ökonomische Bedeutung im heutigen Obstbau erlangt haben.

Apfelzüchtung

Obwohl beim Apfel, der bedeutendsten einheimischen Obstart in Zentraleuropa, die meisten ökonomisch bedeutenden Merkmale (z. B. Ertrag, Fruchtqualität) von einem Zusammenspiel zahlreicher Gene abhängen (oligo- bzw. polygene Eigenschaften), gibt es dennoch einige, die den klassischen Vererbungsregeln Gregor Mendels folgen. Von diesen besitzen einzelne eine enorme ökonomische Bedeutung. Dazu gehören neben zahlreichen Resistenzen gegenüber biotischen Schaderregern (z. B. Pilze, Bakterien, Insekten) auch solche Merkmale, wie die Rotfärbung von Blättern und Fruchtfleisch, der Säulenwuchs und die Samenlosigkeit oder das Kältebedürfnis zum Überwinden der Winterknospenruhe. Nicht alle dieser mendelnden Merkmale sind jedoch phänotypisch leicht zu erfassen. Das hat in der Vergangenheit oft zur fälschlichen Annahme eines polygenen Vererbungsmusters geführt. Ein gutes Beispiel dafür ist die Resistenz gegenüber dem Feuerbrandbakterium. Im Folgenden sind einige ausgewählte Beispiele für mendelnde Merkmale aufgeführt.

Ökonomisch bedeutende Merkmale mit einfach erfassbarem Phänotyp

Die Zuverlässigkeit der genetischen Kartierung von Merkmalen hängt im Wesentlichen von der Qualität der zur Verfügung stehenden phänotypischen Daten ab. Nicht alle Merkmale sind in jedem Fall so ausgeprägt, dass sie phänotypisch einfach zu erfassen sind. Ihre Ausprägung hängt sowohl von den beteiligten Genen und Allelen, deren Expression und den sie beeinflussenden Umweltbedingungen ab. In vielen Fällen wird die Ausprägung monogener Merkmale noch von weiteren (z. B. unterstützenden) Faktoren beeinflusst. Dieser Einfluss macht es schwierig Spaltungsverhältnisse zweifelsfrei zuzuordnen. Bei anderen Merkmalen wirken selektive Einflüsse, die sich störend auf das Spaltungsverhältnis auswirken. Das trifft z. B. für die Vererbung des Schorfresistenzgens *Rvi6* zu und ist auch für die rote Laubfärbung des Apfels beschrieben. So ist die Schorfresistenz *Rvi6* z. B. mit sub-letalen Faktoren gekoppelt, welche als Grund für die gestörte Spaltung vermutet werden (Gao & van de Weg, 2006). Die rote

Laubfärbung resultiert aus einer Überfunktion der Flavonoidbiosynthese. Von einzelnen Metaboliten dieses Biosyntheseweges (z. B. Flavonole) ist bekannt, dass sie die Fertilität von Pollen beeinflussen und sich auf die Befruchtung und/oder Samenbildung auswirken (Chagne et al., 2007). Im Folgenden werden Beispiele für mendelnde Merkmale erläutert, bei denen die Erfassung des Phänotyps noch verhältnismäßig zuverlässig möglich ist.

Säulenwuchsform

Ein monogenes Merkmal mit einem einfach zu erfassenden Phänotyp, bei dem eine phänotypische Vorselektion des Zuchtmaterials bereits einige Wochen nach der Aussaat möglich ist, ist der Säulenwuchs (Abb. 1). Diese als Columnar bezeichnete Wuchsform wurde zuerst bei 'Wijcik' einer Mutan-



Abb. 1. Der Säulenapfel 'PiCol1' aus dem Züchtungsprogramm des JKI wird für den Anbau im Hobbybereich empfohlen. Ursache für das Auftreten dieser Säulenwuchsform ist die Insertion eines 8,2 kbp großen Ty3/Gypsy-Retrotransposons in eine nicht-kodierende Region im Bereich 18.8 Mb auf Kopplungsgruppe 10 des Apfels (Otto et al., 2014). Dieses Retrotransposon führt zur Überexpression des Gens *MdCo31* in den Achselknospen säulenförmiger Apfelbäume, welches für eine 2-Oxoglutarat-unabhängige Eisen(II)-Oxygenase kodiert (Wolters et al., 2013).

te der Sorte 'McIntosh' entdeckt. Verkürzte Internodien, eine reduzierte Verzweigung und die verstärkte Ausbildung von Kurztrieben an Seitenästen sind für solche Typen charakteristisch. Der dominante Genort (*Co*) für dieses Merkmal wurde auf Kopplungsgruppe 10 des Apfels kartiert. Die Mutation in 'Wijcik' beruht nach heutigem Kenntnisstand auf einer Insertion eines Ty3/Gypsy-Retrotransposons in den *Co*-Lokus (Wang et al., 2021). Säulenäpfel spielen heute vor allem bei der Saftproduktion sowie im Hobbyanbau eine Rolle. Die Vorteile dieser Wuchsform werden vor allem in einem geringeren Schnitt- und Pflückaufwand und einer höheren Baumdichte je Flächeneinheit gesehen. Besonderes Interesse hat das Züchtungsprogramm der Hochschule Geisenheim Universität dem Säulenwuchs gewidmet. Die Sorten der „Cats“-Serie, die aus diesem Programm stammen, sind heute im Obstbau weit verbreitet.

Rote Fruchtfleischfarbe

Eine rote Farbe des Fruchtfleisches ist ein interessantes und lukratives Zuchtziel bei verschiedenen Obstarten (z. B. Apfel, Birne, Kiwi, Zitrusarten). Sie wird vielfach mit einem höheren Gehalt an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen in Verbindung gebracht. Für den Apfel sind bislang zwei Genorte bekannt, die rote (Typ1) bzw. rosa (Typ2) Fruchtfleischfarbe induzieren können (Abb. 2A und B). Bei Genotypen vom Typ1 wird die rote Fruchtfleischfarbe induziert, wenn die regulatorische Region des Transkriptionsfaktorgens *MdMYB10* eine sechsfache Wiederholung eines 23 bp (R6) Sequenzmotivs

enthält (Espley et al., 2009). Dieses R6-Allel ist autoregulatorisch und fördert die Anthocyan-Synthese. Es wird nach den Mendelschen Regeln vererbt und induziert eine rote Blattfärbung, die besonders in der frühen Wachstumsphase sichtbar ist, sowie eine rote Färbung des Kernhauses. Das Fruchtfleisch kann dabei mehr oder weniger rot gefärbt sein (Volz et al., 2014). Die Selektion auf die rote Laubfärbung (Abb. 2C) erlaubt somit bereits am jungen Sämling eine indirekte Selektion auf rotes Fruchtfleisch. Es gibt inzwischen viele rotfleischige Sorten. Die meisten wie z. B. 'Weirouge' sind für die Vermarktung geschmacklich unzureichend. Mit dem roten Fruchtfleisch wird auch eine bittere Geschmacksnote mitvererbt. Bei neueren Sorten wie 'Baya Marisa', 'Rosette', 'RedLove' und 'Kissabel' ist der Geschmack schon besser. Ob und wie sich diese Sorten am Markt durchsetzen, wird die Zukunft zeigen.

Kältebedürfnis zum Überwinden der Winterknospenruhe

Viele Pflanzen der gemäßigten Klimazonen haben sich an tiefe Wintertemperaturen angepasst. Um diese schadlos zu überstehen, treten sie in eine Phase der Winterruhe (Dormanz) ein, die sich in die drei Teilphasen Para-, Endo- und Ökodormanz untergliedern lässt. Bei der Endodormanz handelt es sich um die tiefe (echte) Winterruhe. In dieser Phase ist das vegetative Wachstum fast vollständig eingestellt und die Knospe auch bei günstigsten Wachstumsbedingungen nicht in der Lage auszutreiben. Um die Endodormanz zu beenden, muss eine

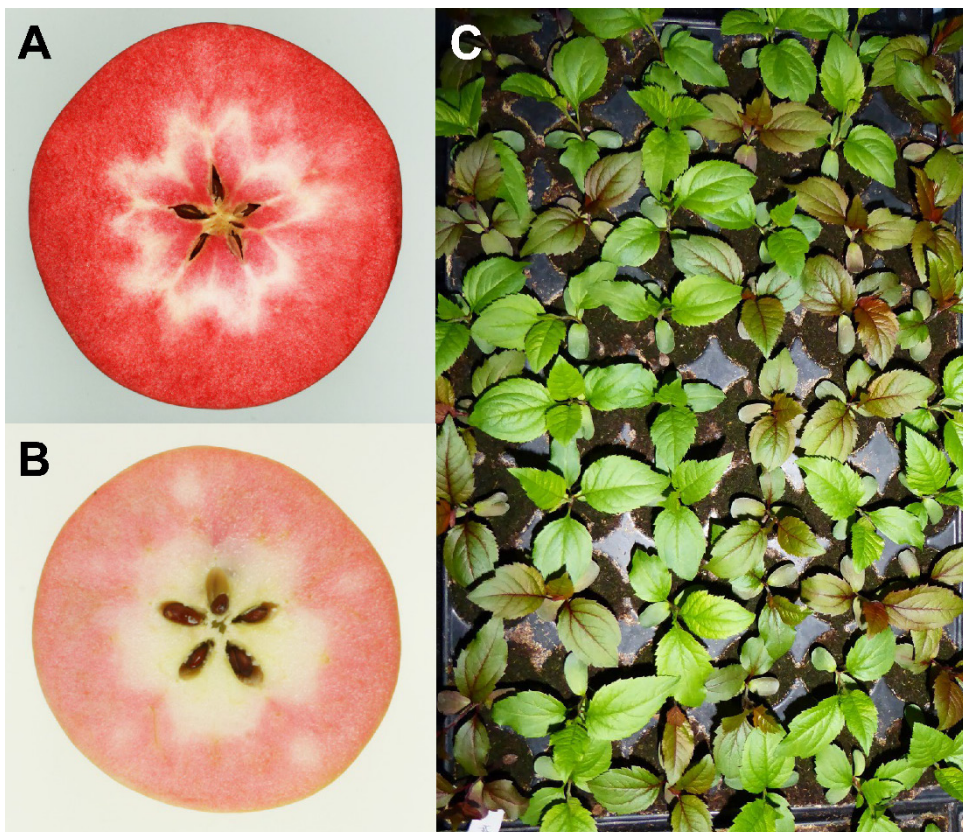


Abb. 2. Unterschiedlich Typen für rote Fruchtfleischfarbe beim Apfel und Möglichkeiten der phänotypischen Frühselektion für rotfleischige Äpfel vom Typ 1. A) Der rotfleischige Zuchtklon PiRo1 aus dem Züchtungsprogramm des JKI ist vom Typ1. Bei den Typ1-rotfleischigen Genotypen ist die rote Färbung von Laub und Fruchtfleisch eine Folge der Insertion eines Minisatellitenmotivs in den Promoterbereich des *MdMYB10* Gens des Apfels. B) Der rotfleischige Zuchtklon PiRo3 aus dem Züchtungsprogramm des JKI ist vom Typ2. Bei Typ2-rotfleischigen Äpfeln ist die rote Fleischfarbe eine Folge der Überexpression des Gens *MdMYB110a*. Die Ursache für diese Überexpression ist unbekannt (Hanke et al., 2020). Im Gegensatz zu Typ1 ist bei den Typ2-Genotypen nur das Fruchtfleisch rot. Fruchtschale und Laub können eine andere Färbung aufweisen. C) Aufgrund der Kopplung zwischen rotem Fruchtfleisch und roter Laubfärbung lassen sich rotfleischige Äpfel vom Typ1 bereits anhand der Laubfärbung der Sämlinge selektieren.

sortenspezifische Summe an Kältestunden auf die Knospe wirken. Erst danach tritt sie in die Ökodormanz über. Hier ruht die Knospe noch bis eine sortentypische Summe an Wärmestunden erreicht ist und beginnt dann mit dem Knospenaufbruch.

Äpfel werden unter sehr verschiedenen klimatischen Bedingungen angebaut. Dafür werden angepasste Sorten benötigt. Erfolgt der Anbau in Regionen mit besonders milden Wintern (z. B. Israel), sind Sorten wie 'Anna' geeignet, die ein geringes Kältebedürfnis (~ 300 Kältestunden) haben (Hauagge & Cummins, 1991). Im gemäßigten Klima (z. B. Deutschland) blüht 'Anna' durch das geringere Kältebedürfnis jedoch viel früher als andere Sorten (Abb. 3). Das ist nachteilig, da die zeitige Entwicklung im Frühjahr regelmäßig zu Blütenfrostschäden durch Spätfröste führt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Kältebedürfnis des Apfels von einem dominanten Locus vererbt wird (Hauagge & Cummins, 1991). An diesem Locus gibt es Gene, die zur Familie der Dormanz-assoziierten MADS-box (*DAM*)-Gene gehören. Für das Kältebedürfnis scheint vor allem das Gen *MdDAM1* von Bedeutung zu sein (Moser et al., 2020; Lempe et al., 2022). In Sorten mit geringem Kältebedürfnis ist *MdDAM1* viel schwächer exprimiert als beispielsweise in der Sorte 'Golden Delicious', die ein mittleres Kältestundenbedürfnis besitzt (Moser et al., 2020).

Gefüllte Apfelblüten

Die Blüten der Rosengewächse sind fünfzählig und so hat auch die Apfelblüte im Normalfall fünf Blütenblätter. Es gibt allerdings auch Genotypen, deren Blüten gefüllt sind und deren Anzahl an Blütenblättern ein Vielfaches von fünf ergibt (Abb. 4). Solche Genotypen sind als Zierpflanzen beliebt. Das liegt an ihrem attraktiven Aussehen und daran, dass ihre Blüten meist keine Früchte ausbilden, die im urbanen Raum als störend empfunden werden. Auch bei anderen Rosengewächsen, wie dem Pfirsich gibt es solche Blüten. Hier gibt es zwei Genorte, die diesen Typ bedingen, ein rezessiver Locus

auf Chromosom 2 (Dirlewanger et al., 2004) und ein dominanter Locus auf Chromosom 6 (Pascal et al., 2017). Solche Arbeiten sind bei Apfel bisher nicht bekannt. Die Entwicklung der Blütenorgane kann mit dem ABC-Modell erklärt werden (Abb. 4E). Um eine Vervielfältigung in der Anzahl an Blütenblättern zu erreichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Wird zum Beispiel die Aktivität der B-Gene erhöht, vergrößert sich der Bereich, in dem Blütenblätter entstehen und es können mehrere Blütenblattkreise ausgebildet werden. Das ist zum Beispiel beim Pfirsich 'Beijing 2-7' der Fall (Cai et al., 2021). Eine andere Möglichkeit besteht in der Verringerung der Expression eines C-Gens. Dass eine reduzierte Genaktivität der C-Gene *AGAMOUS* (*MdMADS15* und *MdMADS22*) bei Apfel zu gefüllten Blüten führen kann, wurde bereits gezeigt (Klocko et al., 2016). B- und C-Gene oder solche, die deren Aktivität verändern, sind gute Kandidatengene für die Ausbildung gefüllter Blüten in Apfel.

Samenlosigkeit der Früchte

Die Samenlosigkeit (Parthenokarpie) ist ein Zuchtziel bei vielen Obstarten. Bei Apfel gibt es Sorten, die vorwiegend parthenokarpe Früchte produzieren. Diese Sorten haben Blüten, die weder Blüten- noch Staubblätter besitzen. Anstatt dessen besitzen sie oft zwei Kreise Kelchblätter und zwei bis drei Kreise Fruchtblätter (Abb. 5), (Tobutt, 1994). Durch das Fehlen der Blütenblätter werden keine Insekten zur Bestäubung angelockt. Interessanterweise werden trotz fehlender Befruchtung Früchte ausgebildet. Diese besitzen keine Samen (Abb. 5). Blütenblattlose Apfelblüten wurden schon Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben (Dochnahl, 1855; Ritter Beck von Mannagetta & Abel, 1894). Sorten, die solche Blüten besitzen sind *M. pumila* 'apetala', *M. domestica* 'Spencer Seedless', 'Wellington Bloomless' und 'Rae Ime'. In Kreuzungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Merkmal monogen rezessiv vererbt wird (Tobutt, 1994). Bei dem Gen, welches dieses Merkmal



Abb. 3. Die Sorte 'Anna' (A) hat ein geringes Kältebedürfnis und ist in ihrer Blüten- und Blattentwicklung im Frühjahr deutlich früher als beispielsweise die Sorte 'Pinova' (B). Beide Aufnahmen sind am 19. April 2022 auf den Versuchsflächen des Instituts für Züchtungsforschung an Obst in Dresden-Pillnitz entstanden.

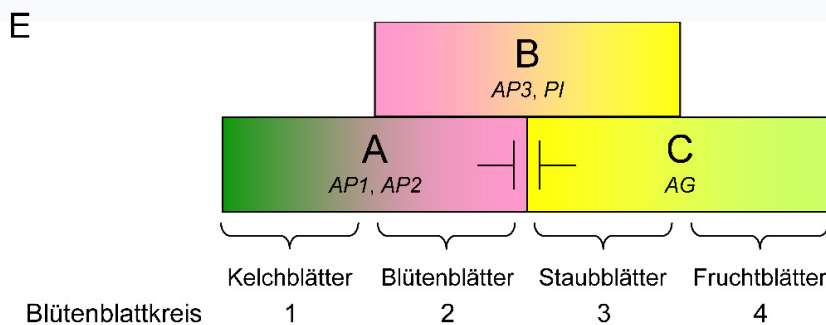
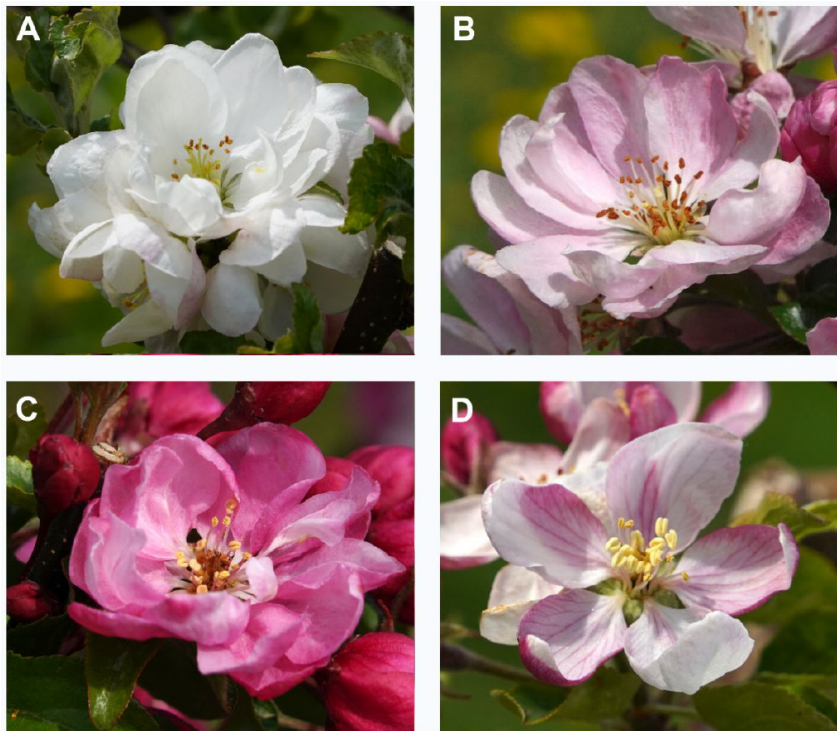


Abb. 4. Apfelblüten mit mehrfachem Perianth. A) Blüte von *Malus pumila* MAL003. B) Blüte von *Malus spectabilis* MAL0544. C) Blüte von *Malus hybrida van Esetline* MAL0720. D) Normale Apfelblüte mit einfachem Perianth mit fünf Blütenblättern von *Malus domestica* 'Pinova'. E) Das ABC-Modell der Blütenbildung. Die Entwicklung der Blütenorgane kann mit dem ABC-Modell erklärt werden. Die zeitlich und örtlich beschränkte Aktivität von Genen mit unterschiedlichen Funktionen (A-, B- und C-Funktion) bestimmt, welche Blütenorgane entstehen. Sind nur Gene mit A-Funktion aktiv, entstehen Kelchblätter. Sind gleichzeitig Gene mit A- und B-Funktion aktiv, entstehen Blütenblätter. Sind Gene mit B- und C-Funktion aktiv, entstehen Staubblätter und Fruchtblätter entstehen, wenn nur Gene mit C-Funktion aktiv sind (Irish, 2017; Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994). Gene mit A- und C-Funktion beeinflussen sich aber auch gegenseitig, A-Gene hemmen die Aktivität der C-Gene und umgekehrt.

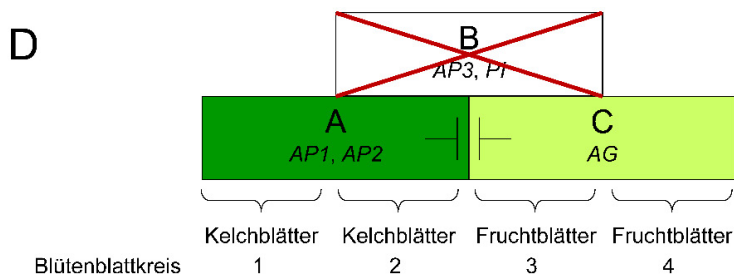


Abb. 5. Samenlosigkeit bei Apfel. A) Blüten von *M. pumila* 'apetala' bilden keine Blütenblätter aus. B) Dadurch sind sie nicht attraktiv für Bienen und werden nicht bestäubt. Trotz fehlender Befruchtung werden Früchte ausgebildet, sogenannte parthenokarpe Früchte. C) Diese haben jedoch keine Samen. D) Modell einer Blüte mit einer Mutation in einem B-Funktionsgen, die zum Verlust der Genfunktion führt. In den Sorten 'Spencer Seedless', 'Wellington Bloomless' und 'Rae Ime' ist das B-Funktionsgen *PISTILLATA* des Apfels (*MdPI*) durch Insertion eines Retrotransposons zerstört worden. Damit sind in den Blütenblattkreisen 2 und 3 ausschließlich A- bzw. C-Funktionsgene aktiv. Folglich werden in diesen Blütenblattkreisen ebenfalls Kelch- bzw. Fruchtblätter gebildet.

bedingt, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das *PISTILLATA* (*MdPI*) Gen des Apfels. Dieses Blütenorganidentitätsgen ist weder in 'Spencer Seedless' noch in 'Wellington Bloomless' oder 'Rae Ime' aktiv. In diesen Sorten ist es durch die Insertion eines Transposons im 4. ('Rae Ime') bzw. 6. Intron ('Spencer Seedless' und 'Wellington Bloomless') zerstört worden (Yao et al., 2001). In funktionellen Studien konnte das Fehlen von *MdPI* als mögliche Ursache der Parthenokarpie bestätigt werden (Tanaka et al., 2007).

Resistenz gegenüber Apfelschorf

Von großer ökonomischer Bedeutung ist die Resistenz gegenüber Apfelschorf. Sie ist schon seit Beginn der wissenschaftlich basierten Obstzüchtung in den 1920er-Jahren ein bedeutendes Zuchtziel. In der Vergangenheit wurde zur Verbesserung der Resistenz vielfach das Resistenzgen *Rvi6* aus dem Wildapfel *Malus floribunda* (*Mf821*) benutzt. Die von *Rvi6* vermittelte Schorffresistenz ist heute in mehr als 100 neu gezüchteten Apfelsorten zu finden. Die Introgression von *Rvi6* in den Kulturapfel geht auf eine Kreuzung eines Klons *Mf821* mit der Sorte 'Morgenduft' aus den 1910er Jahren zurück (Crandall, 1926). Später in den 1940er-Jahren entdeckte Hough, dass eine Population aus einer Kreuzung von zwei F'1-Nachkommen dieser Kreuzung nahezu 1:1 für Resistenz und Anfälligkeit spaltete. Weitere Kreuzungen bestätigten die Annahme, dass die Resistenz auf einem dominanten Gen beruht. Dieses Gen wurde zuerst *Vf* (*Venturia floribunda*) und später *Rvi6* (Resistenz to *Venturia inaequalis*) genannt (Hough et al., 1953; Bus et al., 2011). Aus der Kreuzung von Hough wurden zwei schorffresistente F'2-Nachkommen ausgewählt und an Züchter weltweit abgegeben. 1975 erhielt die Apfelsorte 'Prima', als erste schorffresistente Apfelsorte mit *Vf*, Sortenschutz. Auch in Deutschland (Müncheberg) begann Erwin Baur in den 1920er-Jahren mit der Schorffresistenzzüchtung. Als Resistenzdonor nutzte er die Sorte 'Antonovka', die jedoch eine komplexere Vererbung der Schorffresistenz aufweist. Mittlerweile sind ca. 20 Schorffresistenzgene bekannt (Tab. 2), die in der Züchtung genutzt werden können. Für die Resistenzgene wurde ein Rassetestersortiment von Hosts (h) entwickelt, welches in vielen Ländern der Welt angebaut wird, um die Wirksamkeit der Resistenz in unterschiedlichen Umwelten zu testen. Einige der Resistenzen sind monogen, andere beruhen auf zwei oder mehreren Genen. So beruht z. B. die Schorffresistenz von Hansens baccata#2 auf zwei Genen. Die Resistenz von 'Geneva' scheint von vier Genen bedingt zu sein, die des 'Dülmener Rosenapfel' von einem Majorgen und drei Resistenz-QTL, und die von *Mf821* von zwei rasse-spezifischen Resistenzgenen. Einige dieser Schorffresistenzen sind bereits durchbrochen. Deshalb versuchen Züchter heute durch die Kombination (Pyramidisierung) mehrerer Resistenzen eine dauerhafte Widerstandsfähigkeit zu erreichen.

Merkmale, deren Erfassung phänotypisch schwierig ist

Feuerbrandresistenz

Im Gegensatz zu anderen mendelnden Merkmalen, ist die Resistenz gegenüber dem bakteriellen Feuerbrand phänoty-

Tab. 2. Aufgeführt sind 20 dominante Schorffresistenzgene mit alter und neuer Bezeichnung und die entsprechenden Hosts (h) im Schorffresistenztestersortiment.

Host	Genotyp	Name Resistenzgen	
		neu	alt
h0	Gala		
h1	Golden Delicious	<i>Rvi1</i>	<i>Vg</i>
h2	TSR34T15	<i>Rvi2</i>	<i>Vh2</i>
h3	Geneva	<i>Rvi3</i>	<i>Vh3</i>
h4	TSR33T239	<i>Rvi4</i>	<i>Vh4, Vx, Vr1</i>
h5	9-AR2T196	<i>Rvi5</i>	<i>Vm</i>
h6	Priscilla	<i>Rvi6</i>	<i>Vf</i>
h7	<i>Malus floribunda</i> 821*	<i>Rvi7</i>	<i>Vfh</i>
h8	B45	<i>Rvi8</i>	<i>Vh8</i>
h9	J34	<i>Rvi9</i>	<i>Vdg</i>
h10	A723-6	<i>Rvi10</i>	<i>Va</i>
h11	A722-7	<i>Rvi11</i>	<i>Vbj</i>
h12	Hansen's Baccata #2	<i>Rvi12</i>	<i>Vb</i>
h13	Durello di Forli	<i>Rvi13</i>	<i>Vd</i>
h14	Dülmener Rosenapfel	<i>Rvi14</i>	<i>Vdr1</i>
h15	GMAL 2473	<i>Rvi15</i>	<i>Vr2</i>
h16	MIS op.93.051 G07-098b	<i>Rvi16</i>	<i>Vmis</i>
h17	Antonovka APF22	<i>Rvi17</i>	<i>Va1</i>
h18	1980-015-025	<i>Rvi18</i>	<i>V25</i>
	Honeycrisp	<i>Vhc1**</i>	
	Honeycrisp	<i>Vhc15**</i>	

* ersetzt bislang eine F1 von *Mf821*, die nur *Rvi7* enthält

** vorläufige Bezeichnung der Resistenzgene

pisch nur schwer zu erfassen. Das Spektrum an Symptomen reicht in spaltenden Populationen oft von vollständig resistent (keine sichtbaren Symptome) bis hin zu vollständiger Anfälligkeit. Diese kann im Extremfall zum Absterben der Pflanze führen.

Die Feuerbrandkrankheit wird durch das Bakterium *Erwinia amylovora* verursacht und ist die bedeutendste Bakterienerkrankung des Kernobstes (Peil et al., 2020). Ihr Erreger gehört in der EU zu den regulierten Nicht-Quarantäneschaderegern (Picard et al., 2018). Für nachweislich infizierte Pflanzen wird meist eine Rodung empfohlen. Künstliche Tests auf Resistenz erfolgen deshalb durch Inokulation frisch veredelter Pflanzen, die ausschließlich zum Zweck der Testung hergestellt und anschließend entsorgt werden. Diese Pflanzen sind juvenil und bilden in den ersten Jahren nach der Veredelung noch keine Blüten (Hanke et al., 2007). Für die künstliche Inokulation werden deshalb meistens junge Triebe genutzt (Peil et al., 2014), obwohl die natürliche Infektion über die Blüten erfolgt. Das Ausmaß der Infektion (Anfälligkeit) wird dann anhand des Verhältnisses zwischen der Gesamtlänge des Triebes und der Länge der sich bildenden Läsion als „Prozentuale Läsionslänge“ (PLL) bestimmt. Dabei steht ein Wert von PLL = 0 für vollständige Resistenz. Pflanzen mit einem Wert von PLL = 10 gelten ebenfalls als resistent, wäh-

rend Werte von PLL > 15 auf Anfälligkeit schließen lassen (Peil et al., 2007; Emeriewen et al., 2021). Für Individuen, die sich phänotypisch an den beiden extremen Enden der Population befinden, ist die Zuordnung einfach. Diese Pflanzen besitzen bei der genetischen Kartierung meist die Markerallele, die mit Resistenz bzw. Anfälligkeit gekoppelt sind, zu beiden Seiten des Resistenzlokus. Für die genaue Bestimmung der Position des Resistenzgens sind jedoch solche Pflanzen entscheidend, bei denen es innerhalb des Lokus zu einer Rekombination gekommen ist (Emeriewen et al., 2018). Diese Pflanzen besitzen auf der einen Seite des Lokus Markerallele, die mit Resistenz gekoppelt sind. Auf der anderen Seite besitzen sie Allele, die mit Anfälligkeit assoziiert sind. Phänotypisch können diese Pflanzen resistent oder anfällig sein (Emeriewen et al., 2018; Fahrentrapp et al., 2013). Für die Zuordnung der entsprechenden Genotypen zum Phänotyp resistent oder anfällig ist der Median einer Population ein geeignetes Kriterium, aber auch nicht immer sicher. Eine genaue Bestimmung des Genortes für das Resistenzgen ist dadurch sehr schwierig. Trotz dieser Schwierigkeiten wurden Kandidatengene für Feuerbrandresistenz in Wildapfelgenotypen, wie *M. ×robusta* 5 (Fahrentrapp et al., 2013), *M. fusca* MAL0045 (Emeriewen et al., 2018), *M. ×arnoldiana* (Emeriewen et al., 2017; Emeriewen et al., 2021) und der Zierapfelsorte 'Evereste' (Parravicini et al., 2011) identifiziert. Diese befinden sich auf den Chromosomen 3, 10 und 12. Molekulare Marker, die mit diesen Resistenzen gekoppelt sind, werden heute für die markergestützte Selektion (MAS) in verschiedenen Züchtungsprogrammen weltweit verwendet.

Insektenresistenz

Neben der Resistenz gegenüber Pilzen und Bakterien ist auch die Widerstandsfähigkeit gegenüber Insekten von großer ökonomischer Bedeutung. Vor allem Apfelblutläuse (*Eriosoma lanigerum*) zählen neben der Mehligen Apfelblattlaus (*Dysaphis plantaginea*) und der Rosigen Apfelfaltenlaus (*Dysaphis devecta*) zu den bedeutendsten Schadinsekten im Kernobstanbau. Die Bekämpfung von Blutläusen ist besonders schwierig, da diese im oberen Wurzelbereich und in Rindenritzen überdauern. Deshalb wurde schon sehr frühzeitig in East Malling (England) mit der Züchtung resistenter Apfelunterlagen begonnen (Crane et al., 1936). In Deutschland lag das Ziel in der Züchtung resistenter Edelsorten. Hier wurden bereits 1919 erste Züchtungsarbeiten in der neu gegründeten Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Naumburg/Saale unter der Leitung von Carl Börner initiiert (Jancke, 1937). Im Rahmen seiner Arbeiten konnte Bramstedt (1938) drei Reaktionstypen nach Blutlausbefall identifizieren. Pflanzen mit Blutlausbefall und anschließender Bildung von Gallengewebe wurden als anfällig eingestuft. Befallsfreie Pflanzen wurden als immun/resistent eingestuft. An diesen konnte Bramstedt (1938) als erster histologisch die Bildung von nekrotischem Gewebe an Trieben und Wurzeln nachweisen. Zusätzlich beobachtete er eine intermediäre Gruppe, die im Freiland nur sehr selten auftrat. Pflanzen dieser Gruppe wurden aufgrund der Bildung von nekrotischem Gewebe ebenfalls als resistent eingestuft. Mithilfe dieser Klassifizierung war es möglich geworden, die genetischen Mechanismen der Resistenz in spaltenden Populationen mit

resistenten Sorten (z. B. 'Northern Spy', 'Ontario', 'Harberts Renette') und Apfelwildartenakzessionen von *M. baccata*, *M. micomalus*, *M. coronaria*, *M. orthocarpa* und *M. pumila*) aufzuklären (Börner & Gollmick, 1943). Gleichzeitig wurden umfangreiche Evaluierungsarbeiten in vorhandenen Sortimenten durchgeführt (Speyer, 1924; Jancke, 1937; Shay, 1962). Bei den Apfelsorten erwies sich vor allem die Resistenz von 'Northern Spy' als besonders stabil. Diese Resistenz wird von dem dominanten Resistenzgen Er_1 hervorgerufen (Knight et al., 1962). Später wurden mit Er_2 und Er_3 weitere monogene Blutlausresistenzen in *M. robusta* (King et al., 1991; Alston et al., 2000; Bus et al., 2008) und *M. sieboldii* 'Aotea 1' (Bus et al., 2002) identifiziert. Die Resistenzgene Er_1 und Er_3 sind bereits von einzelnen Biotypen der Blutlaus überwunden worden (Giliomee et al., 1968; Rock & Zeiger, 1974; Sen Gupta & Miles, 1975). Ob Er_2 auch schon gebrochen ist, ist bislang unbekannt (Cummins & Aldwinckle, 1983).

Für die Mehliges Apfelblattlaus konnte in *M. robusta* mit S_{mh} ebenfalls eine monogene Resistenz identifiziert werden (Alston & Briggs, 1970) und für die Rosige Apfelfaltenlaus wurden mit Sd_1 , Sd_2 und Sd_3 drei monogene Resistenzen in 'Coxs Orange Pippin', 'Northern Spy' und *Malus × robusta* nachgewiesen, welche jeweils gegen unterschiedliche Biotypen des Erregers wirksam sind (Brady, 1991). Für die MAS wurden bereits Marker für die Gene Er_1 , Er_2 und Er_3 sowie Sd_1 und Sd_2 entwickelt (Bus et al., 2008; Cevik & King, 2002; Gardiner et al., 2001; Gardiner et al., 2007). Diese finden heute Anwendung in verschiedenen Züchtungsprogrammen.

Süßkirschenzüchtung

Zu den für die Kirschenzüchtung wichtigen Merkmalen gehören u. a. die Fruchtfarbe, die Fruchtgröße, die Fruchtfleisfestigkeit sowie die Resistenz gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren (Pijut, 2020). Obwohl die Züchtungsforschung bei Süßkirschen im Vergleich zum Apfel weniger intensiv entwickelt ist, gibt es auch hier inzwischen eine Vielzahl an genetischen Karten sowie erste molekulare Marker. Gerade die Entwicklung von PCR-basierten Methoden und Verfahren der DNA-Sequenzanalyse haben in den letzten Jahrzehnten zur Identifizierung von zahlreichen Selbstinkompatibilitätsallelen sowie zur gezielten Selektion selbstfertiler Genotypen geführt (Dirlewanger et al., 2009; Pijut, 2020). In der Genomdatenbank der Rosengewächse (<https://www.rosaceae.org>) sind bislang 51 genetische Karten für die Süßkirsche gelistet. Diese wurden mit unterschiedlichen Markertypen (RFPL, SSR und SNP) erzeugt (Pijut, 2020). Blüten- und Fruchteigenschaften, wie die Fruchtgröße und Selbstinkompatibilität, sind klassische Beispiele für mendelnde Merkmale, die sowohl phänotypisch als auch molekulargenetisch mithilfe segregierender Populationen untersucht wurden (Zhang et al., 2010).

Fruchtgröße

Für die Vererbung der Fruchtgröße wurde ein Locus auf Kopplungsgruppe 2 der Süßkirsche identifiziert (Zhang et al., 2010; Olmstead et al., 2008). Weitere Loci, die mit Fruchtgröße assoziiert sind, wurden auf anderen Kopplungsgruppen gefun-

den (Rosyara et al., 2013). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass die Markerallele, die mit dem Locus auf Kopplungsgruppe 2 assoziiert sind, den größten Einfluss auf das Merkmal Fruchtgröße haben (Zhang et al., 2010). Mithilfe dieser Marker lassen sich die Sorten nach Haplotypen unterteilen, die mit großen und kleinen Früchten assoziiert sind. Damit können für Züchtungsprogramme gezielt Elternsorten ausgewählt werden, die eine hohe Fruchtgröße an ihre Nachkommen vererben. Gleichzeitig ermöglichen diese Marker auch die Selektion von Nachkommen, die das genetische Potenzial haben, große Früchte auszubilden. Heute finden diese Marker in verschiedenen Züchtungsprogrammen Anwendung.

Selbstinkompatibilität

Das Vorkommen von Selbst- und Kreuzungsinkompatibilität bei Pflanzen hat Biologen schon sehr lange interessiert. Ausgehend von den Erkenntnissen von Correns, East, Lehmann und Sirks sowie den Ergebnissen eigener Studien konnten Crane & Lawrence (1929) erstmals die genetischen und zytologischen Ursachen der gametophytischen Selbstinkompatibilität bei Obst beschreiben. Dabei konnten sie zeigen, dass die Inkompatibilität von genetischen Faktoren bestimmt wird, die den von Mendel beschriebenen Vererbungsregeln für einen monogenen Erbgang folgen.

Ursache für die Selbstinkompatibilität bei Süßkirschen ist ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem, welches von einem Selbstinkompatibilitätslocus, dem *S*-Locus kontrolliert wird (de Nettancourt, 1977; Tehrani & Brown, 1992). Dabei wird die Inkompatibilitätsreaktion durch zwei eng gekoppelte Gene bestimmt, die sich am *S*-Locus befinden. Das eine Gen kodiert für eine griffelspezifische Ribonuklease, die sogenannte *S*-RNase. Das andere Gen kodiert ein pollenspezifisches F-Box-Protein, das *SFB*-Protein (Yamane et al., 2003). Von beiden Genen gibt es zahlreiche Allele, die als S_1 , S_2 , S_3 -Allele usw. bekannt sind. Da die Süßkirsche diploid ist, besitzt sie jeweils zwei Allele der *S*-RNase und des *SFB*-Proteins.

Bei der Bestäubung keimen die haploiden Pollen auf der Narbe aus und wachsen in das diploide Griffelgewebe ein. Dabei nehmen sie die beiden im Griffel exprimierten *S*-RNasen auf. Diese werden normalerweise in der Folge abgebaut. Stimmt jedoch das Allel des *SFB*-Proteins im Pollen mit dem Allel einer der beiden *S*-RNasen überein, wird diese *S*-RNase vor dem Abbau geschützt. Sie bleibt funktional und hemmt das Pollenschlauchwachstum im Griffel. Dadurch wird die Befruchtung der Eizelle im Fruchtknoten verhindert. Eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle kann nur erfolgen, wenn sich das *S*-Allel im Pollen von den beiden *S*-Allelen im Griffelgewebe unterscheidet. Für das gametophytische Selbstinkompatibilitätssystem der Süßkirsche sind drei verschiedene Pollen-Griffel-Interaktionen möglich (Abb. 6).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts erfolgte die Bestimmung der Bestäubungseignung mithilfe umfangreicher Bestäubungsversuche (Kobel, 1927; Kobel et al., 1938; Crane & Lawrence, 1929; Crane & Brown, 1937; Brown, 1955; de Vries, 1968; Branscheidt, 1931; Vahl, 1965; Mihatsch & Schumann, 1971; Schmidt et al., 1999). Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurden bereits erste Inkompatibilitätsgruppen beschrieben. Eine genaue Identifizierung dieser Gruppen war jedoch nicht möglich, da hauptsächlich mit lokalen bzw. regionalen Sortensortimenten gearbeitet wurde. Zusätzlich erschwerten Synonyme und Falschbezeichnungen einzelner Sorten die exakte Zuordnung. Auf der Grundlage der im John Innes Centre in England begründeten Nomenklatur für die Inkompatibilitätsgruppen bei Süßkirsche beschrieb Knight (1969) bereits 15 Inkompatibilitätsgruppen bei 176 untersuchten Süßkirschen. In der Mitte der 1990er-Jahre identifizierten Bošković & Tobutt (1996) mithilfe von Isoenzymanalysen *S*-RNase-Allele im Griffelgewebe. Mit dieser Methode war es erstmals möglich, die *S*-Allele von Süßkirschen im Labor unabhängig vom Baum zu bestimmen. Im Ergebnis dieser Isoenzymanalysen wurden die *S*-Allel-spezifischen Bandenmuster für die Allele S_1 – S_{11} sowie S_{12} – S_{14} beschrieben (Bošković & Tobutt, 1996; 2001; Bošković et al., 1997).

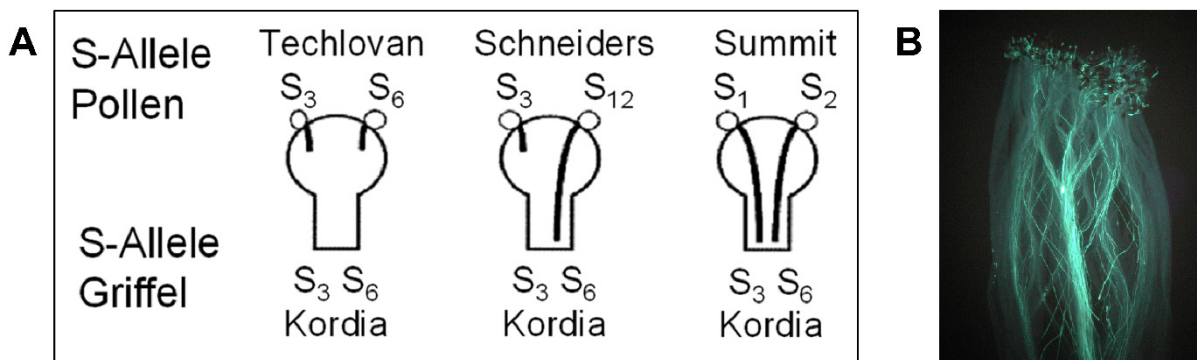


Abb. 6. Möglichkeiten für Pollen-Griffel-Interaktionen bei Süßkirsche, die durch das gametophytische Selbstinkompatibilität bedingt werden. A) Bei der Kombination 'Kordia' × 'Techlovan' kann der Pollen von 'Techlovan' mit den Allelen S_3 und S_6 die Sorte 'Kordia' (ebenfalls S_3 und S_6) nicht befruchten, da beide Sorten die gleichen *S*-Allele besitzen und somit inkompatibel sind. Bei der Kombination 'Kordia' × 'Schneiders' unterscheidet sich das S_{12} -Allel in den Pollen von 'Schneiders' von den beiden *S*-Allelen im Griffel von 'Kordia'. Im Pollenschlauch des S_{12} -Alleles werden beide *S*-RNasen von 'Kordia' abgebaut. Damit kann der Pollenschlauch weiterwachsen und zu einer erfolgreichen Befruchtung führen. In den Nachkommen dieser Kreuzung sind die beiden *S*-Genotypen S_3S_{12} und S_6S_{12} zu erwarten. In der Kombination 'Kordia' × 'Summit' unterscheiden sich beide *S*-Allele der Vatersorte (S_1S_2) von denen der Muttersorte (S_3S_6). Beide Pollen-*S*-Genotypen von 'Summit' können 'Kordia' erfolgreich befruchten. In den Nachkommen sind die vier *S*-Genotypen S_1S_3 , S_2S_3 , S_1S_6 und S_2S_6 zu erwarten. B) Narbe mit Pollen der Sorte 'Pierasz'. Die Situation entspricht dem Fall 'Kordia' × 'Schneiders'. Einige Pollenschläuche können tief in den Griffel einwachsen, während andere bereits nach kurzer Zeit gestoppt werden.

Mit der fortschreitenden Entwicklung der Molekularbiologie wurde die PCR-Technik für die Bestimmung der *S*-Allele eingesetzt. Voraussetzung dafür war die Aufklärung der Struktur des *S*-RNase-Gens (Ushijima et al., 1998). Die kodierende DNA-Sequenz dieses Gens wird von zwei Introns unterbrochen, deren Größe bei den einzelnen *S*-Allelen variiert. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden consensus- und *S*-Allel-spezifische Primerpaare entwickelt, deren Amplifikationsprodukte diese Introns einschließen (Tao et al., 1999; Wiersma et al., 2001; Sonneveld et al., 2001; 2003; 2006). Diese Entwicklung führte zu einem gewaltigen Fortschritt bei der Identifizierung der *S*-Genotypen. Eine zusammenfassende Übersicht über Sorten und deren *S*-Allele ist bei Schuster (2020) zu finden.

Die Kenntnisse über die *S*-Genotypen einzelner Sorten ermöglichen dem Obstbau die gezielte Auswahl von Süßkirschsor-ten, die sich gegenseitig befruchten können und eine hohe Ertragsleistung von Neuanlagen gewährleisten. Große Bedeutung haben diese Informationen auch für die Züchtung. Hier kann die Fertilität von Kreuzungskombinationen bereits im Vorfeld bestimmt werden.

Die Entwicklung selbstfertiler Süßkirschen

Verbunden mit dem Wunsch, die Selbstinkompatibilität von Süßkirschen zu überwinden, wurden ab dem Jahr 1946 am John Innes Centre in Norwich (England) umfangreiche Untersuchungen durchgeführt. Im Ergebnis konnten drei selbstfertile Süßkirschensämlinge selektiert werden (Lewis & Crown, 1954). Zwei dieser Sämlinge (JI 2420 und JI 2434) entstanden durch Bestrahlung des Pollens der Vatersorte mit Röntgenstrahlung. Ein dritter Sämling (JI 2538) ist auf eine spontane Mutation zurückzuführen (Lewis & Crowe, 1954). Mit dem Klon JI 2420 bei dem die Pollenfunktion des S_4 -Allels (S_4) mutiert ist, wurde von Lapins 1956 an der Agriculture Canada Research Station in Summerland (Kanada) ein Zuchtprogramm zur Erzeugung selbstfertiler Süßkirschen begonnen. Im Rahmen dieses Programms wurde 1970 mit 'Stella' die weltweit erste selbstfertile Sorte selektiert (Lapins, 1971). Diese Sorte wurde fortan in vielen Züchtungsprogrammen verwendet. Die beiden 1971 von Lane und Schmid in Summerland (Kanada) selektierten Süßkirschensorten 'Lapins' und 'Sunburst' waren die ersten selbstfertilen Sorten die im Erwerbsobstbau genutzt wurden (Lane & Schmid, 1984). Weltweit wurden bis zum Jahr 2020 91 selbstfertile Süßkirschensorten beschrieben (Schuster, 2020). Im Zuchtprozess lassen sich durch die monogene Vererbung der S_4 -Pollenmutation Kreuzungspopulationen mit 100 % bzw. 50 % selbstfertilen Nachkommen planen (Tab. 3).

Diskussion

Die von Gregor Mendel aufgestellten Regeln zur Vererbung von Merkmalen haben die Obstzüchtung im vergangenen Jahrhundert stark beeinflusst. Bei unterschiedlichen Obstar-ten konnten Werteigenschaften identifiziert werden, deren Vererbung sich mit Mendels Regeln erklären lässt. Für solche Merkmale ist der Erfolg einer Kreuzung vorhersagbar geworden. Einige dieser Merkmale, wie z. B. Schorfresistenz, Rotfleischigkeit und Säulenwuchs bei Apfel, sowie Frucht-

größe und Selbstfertilität bei Süßkirschen, haben ein großes Marktpotenzial erlangt. Neue Sorten, die aus gezielten Kreuzungsprogrammen unter Anwendung der Mendelschen Vererbungsregeln entstanden sind, erobern zunehmend den Markt und verdrängen nach und nach Topsorten wie 'Golden Delicious' und 'Jonagold' (Schröpfer et al., 2022), die einst als Zufallssämlinge entstanden sind, oder aus den frühen Anfängen der Kreuzungszüchtung stammen. Allein mit der Schorfresistenz *Rvi6* aus *Malus floribunda* 821 sind weltweit mehr als 100 neue Apfelsorten entstanden. Von diesen hat vor allem die Sorte 'Topaz' den Sprung unter die Topsorten in Europa geschafft. Andere *Rvi6*-resistente Apfelsorten, wie 'Rustica', 'Natyra', 'Ariane' und 'Bonita' werden derzeit für den Anbau in der biologischen Produktion empfohlen (Friedli et al., 2021). Zunehmend entstehen in den Züchtungsprogrammen aber auch schorfresistente Apfelsorten, deren Resistenz auf einem anderen Resistenzmechanismus beruht (Flachowsky & Töpfer, 2021). Ein gutes Beispiel dafür ist die Sorte 'Pia 41' aus der Züchtung des JKI. Diese Sorte, deren Resistenz aus der Sorte 'Honey Crisp' stammt, findet derzeit einen wachsenden Zuspruch in der Direktvermarktung. Sorten mit Kombinationen von zwei und mehr Resistenzgenen, wie 'Rea Bellina' (*Rvi2* und *Rvi4*) stoßen bereits jetzt auf Interesse in einigen Ländern Osteuropas. Auch bei Süßkirschen ist ein solcher Sortenwechsel zu verzeichnen. Hier ist das Interesse an neuen großfrüchtigen Sorten mit festem Fruchtfleisch und hervorragendem Geschmack in den letzten Jahren stark gestiegen. Sorten wie 'Areko' stehen heute in vielen Ländern weltweit in der Testung bzw. schon im Anbau. Andere Zuchtklone bahnen sich aufgrund ihrer Selbstfertilität und der hervorragenden Fruchteigenschaften ihren Weg (Abb. 7).

Neben der Wiederentdeckung der Mendelschen Vererbungsregeln hat die Züchtung von Kern- und Steinobst auch von vielen anderen Entwicklungen in der Genetik profitiert. Vor allem durch die neuen Methoden im Bereich der Genomanalyse hat der Erkenntnisgewinn noch einmal drastisch zugenommen. So wurden in den vergangenen drei Jahrzehnten zahlreiche genetische Karten für biparentale Populationen erstellt, die für unterschiedlichste Merkmale segregieren.

Tab. 3. Prozentualer Anteil an selbstfertilen Nachkommen (SF) bei Kreuzungen mit selbstfertilen Elternsorten mit dem mutiertem S_4 -Allel S_4 . Bei Kreuzungskombinationen mit einem selbstfertilen Elternpartner erhält man 100 % selbstfertile Nachkommen, wenn beide Elternsorten ein gleiches *S*-Allel besitzen. Alle Nachkommen einer solchen Kreuzung haben den gleichen *S*-Genotyp. Unterscheiden sich die *S*-Allele von Mutter- und Vatersorte, so ist mit 50 % selbstfertilen Nachkommen zu rechnen. Die Nachkommen spalten in vier unterschiedlich *S*-Genotypen auf.

S-Genotyp Mutter	S-Genotyp Vater	S-Genotyp F_1-Nachkommen	SF Nachkommen %
S_3S_{12}	S_3S_4	S_4S_{12}	100
S_1S_4	S_1S_2	S_2S_4	100
S_1S_2	S_3S_4	S_1S_3/S_2S_3 S_1S_4/S_2S_4	50
S_1S_4	S_4S_9	S_1S_4/S_1S_9 S_4S_4/S_4S_9	75

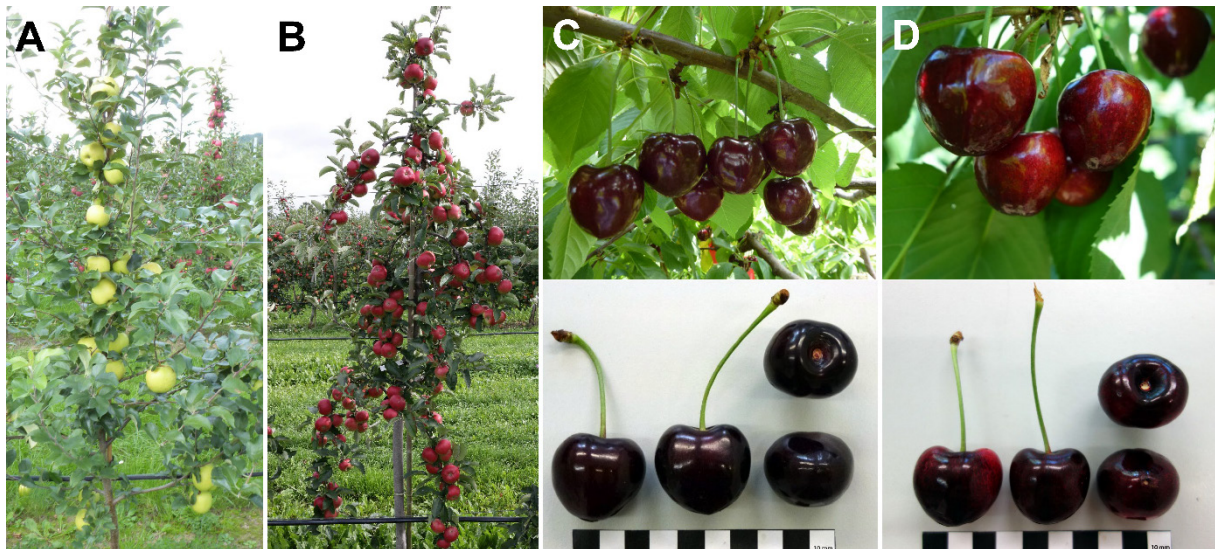


Abb. 7. Neue Sorten aus dem Züchtungsprogramm des JKI. A) Die neue Apfelsorte 'Pia 41' aus dem Züchtungsprogramm des JKI trägt eine Schorfresistenz aus der Sorte 'Honey Crisp'. B) Die Sorte 'Rea Bellina' des JKI besitzt eine Kombination der beiden Schorfresistenzen *Rvi2* und *Rvi4*. C) Die Süßkirschensorte 'Areko' des JKI zeichnet sich aus durch eine überdurchschnittliche Fruchtgröße, einen hervorragenden Geschmack und eine hohe Fruchtfestigkeit. D) Selbstfertiger Zuchtklon bei Süßkirsche mit vielversprechenden Frucht- und Lagereigenschaften.

Die dabei identifizierten Marker, die eng an Werteeigenschaften gekoppelt sind, werden heute in Züchtungsprogrammen zur markergestützten Selektion genutzt (Hanke et al., 2020). Ein Ziel der markergestützten Selektion bei Apfel ist die Pyramidisierung von Resistenzgenen gegenüber Apfelschorf, Mehltau, Feuerbrand und verschiedenen Schadinsekten (Flachowsky & Töpfer, 2021). Am Institut für Züchtungsforschung an Obst des JKI in Dresden-Pillnitz werden dazu Marker für acht Schorf-, vier Mehltau- und vier Feuerbrandresistenzen genutzt, um unterschiedliche Pyramiden und Kombinationen von Resistenzgenen anhand des Genotyps zu selektieren. Eine solche zielgerichtete Kombination von Resistenzen, die gegen den gleichen Erreger gerichtet sind, ist alleine auf der Grundlage phänotypischer Verfahren nicht zu leisten.

Für den Kulturapfel sind weltweit bislang 51 mendelnde Merkmale kartiert und gelistet worden. In der Datenbank der Rosengewächse (<https://www.rosaceae.org>) sind insgesamt 121 genetische Karten mit Tausenden von molekularen Markern für den Kulturapfel und nahverwandte Wildarten der Gattung *Malus* gelistet. Darüber hinaus stehen den Züchtern und Züchtungsforschern verschiedene SNP-Marker-Arrays zur Verfügung, die in der Anzahl ihrer Marker von rund 8.000 (8k) bis 480.000 (480k) variieren. Solche Tools bieten enorme Möglichkeiten in der Genotypisierung, die von der Validierung einer Sortenechtheit, über die Erstellung bislang unbekannter Pedigrees, bis hin zu Genomweiten Assoziationsstudien und einer Genomweiten Selektion reichen. Erste Arbeiten dazu wurden bereits durchgeführt und die erzielten Ergebnisse sind vielversprechend (Jung et al., 2022).

Mehr als 200 genetische Karten existieren inzwischen auch für die unterschiedlichsten *Prunus*-Arten. Allein 51 davon sind für die Süßkirsche gelistet. Hier wurden bislang nur wenige Merkmale identifiziert, die den Vererbungsregeln Gregor Mendels folgen. Unter diesen ist vor allem die Fruchtgröße zu nennen, die für die Süßkirsche eines der wirtschaftlich bedeutendsten

Merkmale darstellt. Für dieses Merkmal gibt es erste molekulare Marker, mit denen eine gezielte Auswahl von Kreuzungseltern möglich ist. Ein anderes bedeutendes mendelndes Merkmal der Süßkirsche ist die Selbstinkompatibilität. Die Erforschung der genetischen Ursachen für dieses Merkmal hat zur Entwicklung molekularer Marker und zur Identifizierung von mutierten (nicht funktionsfähigen) *S*-Allelen geführt, mit deren Hilfe es in den letzten Jahren gelungen ist, qualitativ hochwertige und selbstfertile Süßkirschensorten zu züchten.

Auch für Kirschen gibt es einen ersten SNP-Marker-Chip mit rund 15.000 (15k) SNP-Markern. Dieser ist für die Genotypisierung von Süßkirschen gut geeignet. Für andere *Prunus*-Arten, wie die Sauerkirsche ist dieser Array nicht optimal. Das liegt vor allem an der Komplexität des auto-allotetraploiden Genoms der Sauerkirsche und dem Fehlen hochwertiger Genomsequenzinformationen.

Solche hochwertigen Genomsequenzen, welche künftig die Identifikation von Kandidatengenen erleichtern werden, gibt es inzwischen für ausgewählte und ökonomisch bedeutende Apfelsorten, wie 'Golden Delicious' und 'Gala', aber auch für Wildarten wie *M. baccata*, *M. prunifolia*, *M. sieversii* und *M. sylvestris*, die eng mit der Evolution des Kulturapfels verbunden sind. Bei der Süßkirsche gibt es inzwischen auch eine erste Genomsequenz der Sorte 'Tieton'.

Rückblickend lässt sich feststellen, dass die meisten dieser Entwicklungen nicht, oder nicht so einfach, ohne die grundlegenden Erkenntnisse von Gregor Mendel möglich gewesen wären. Diese Erkenntnisse haben die Genetik der Kulturpflanzen auf eine höhere Stufe gestellt und ihr zahlreiche und bahnbrechende Möglichkeiten eröffnet.

Erklärung zu Interessenskonflikten

Die Autorinnen und Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.

Literatur

- Alston, F.H., K.L. Phillips, K.M. Evans, 2000:** A *Malus* gene list. *Acta Horticulturae* **538**, 561-570, DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.538.98.
- Alston, F.H., J.B. Briggs, 1970:** Inheritance of hypersensitivity to rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* in apple. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **12** (2), 257-258, DOI: 10.1139/g70-037.
- Arber, W., S. Linn, 1969:** DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry* **38**, 467-500, DOI: 10.1146/annurev.bi.38.070169.002343.
- Börner, C., F. Gollmick, 1943:** Blutlausimmune Naumburger Edelapfelzüchtungen. *Angewandte Botanik* **25** (10), 144.
- Bošković, R., K. Russell, K.R. Tobutt, 1997:** Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphytica* **95**, 221-228, DOI: 10.1023/A:1002945529157.
- Bošković, R., K.R. Tobutt, 1996:** Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* **90**, 245-250, DOI: 10.1007/BF00023865.
- Bošković, R., K.R. Tobutt, 2001:** Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 475-485, DOI: 10.1007/PL00002906.
- Brady, N.C., 1991:** *Advances in agronomy*. Academic Press.
- Bramstedt, F., 1938:** Der Nachweis der Blutlausunanfälligkeit der Apfelsorten auf histologischer Grundlage. (Aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Zweigstelle Naumburg/Saale). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz* **48** (9/11), 480-488.
- Branscheidt, P., 1931:** Weitere Mitteilungen über die Befruchtungsverhältnisse bei Obst, insbesondere bei Kirschen. *Gartenbauwissenschaft* **4**, 387-427.
- Brown, A.G., 1955:** Incompatibility. John Innes Inst. Annu. Rpt. for 1954, 7-8.
- Bus, V., A. White, S. Gardiner, R. Weskett, C. Ranatunga, A. Samy, M. Cook, E. Rikkerink, 2002:** An update on apple scab resistance breeding in New Zealand. *Acta Horticulturae* **595**, 43-47, DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.595.5.
- Bus, V.G. M.D. Chagné, H.C.M. Bassett, D. Bowatte, F. Calenge, J.M. Celton, C.E. Durel, M.T. Malone, A. Patocchi, A.C. Ranatunga, E.H.A. Rikkerink, D.S. Tustin, J. Zhou, S.E. Gardiner, 2008:** Genome mapping of three major resistance genes to woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum* Hausm.). *Tree Genetics and Genomes* **4** (2), 223-236, DOI: 10.1007/s11295-007-0103-3.
- Bus, V., E.H.A. Rikkerink, V. Caffier, C.E. Durel, M. Plummerts, 2011:** Revision of nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 391-413, DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095339.
- Cai, Y., L. Wang, C.O. Ogotu, Q. Yang, B. Luo, L. Liao, B. Zheng, R. Zhang, Y. Han, 2021:** The MADS-box gene *PpPI* is a key regulator of the double-flower trait in peach. *Physiologia Plantarum* **173** (4), 2119-2129, DOI: 10.1111/pp1.13561.
- Cevik, V., G.J. King, 2002:** High-resolution genetic analysis of the Sd-1 aphid resistance locus in *Malus* spp. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 346-354, DOI: 10.1007/s00122-002-0904-6.
- Chagne, D., C.M. Carlisle, C. Blond, R.K. Volz, C.J. Whitworth, N.C. Oraguzie, R.N. Crowhurst, A.C. Allan, R.V. Espley, R.P. Hellens, S.E. Gardiner, 2007:** Mapping a candidate gene (*MdMYB10*) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC Genomics* **8**, 212, DOI: 10.1186/1471-2164-8-212.
- Coen, E., E. Meyerowitz, 1991:** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37, DOI: 10.1038/353031a0.
- Crandall, C.S., 1926:** Apple breeding at the University of Illinois. *Illinois Agricultural Experiment Station Bulletin* **275**, 341-600.
- Crane, M.B., A.G. Brown, 1937:** Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *Journal of Pomology and Horticultural Science* **15**, 86-116, DOI: 10.1080/03683621.1938.11513493.
- Crane, M.B., J.C. Lawrence, 1929:** Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology and Horticultural Science* **7**, 276-301, DOI: 10.1080/03683621.1928.11513345.
- Crane, M.B., R.M. Greenslade, A.M. Masee, H.M. Tybeman, 1936:** Studies on the resistance and immunity of apples to the woolly aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausm.). *Journal of Pomology and Horticultural Science* **14** (2), 137-163, DOI: 10.1080/03683621.1937.11513467.
- Cummins, J.N., H.S. Aldwinckle, 1983:** Breeding apple rootstocks. *Plant Breeding Reviews* **1**, 294-394, DOI: 10.1002/9781118060988.ch10.
- de Nettancourt, D., 1977:** *Incompatibility in Angiosperms*. Springer, Berlin.
- de Vries, D.P., 1968:** Compatibility of cherries in the Netherlands. *Euphytica* **17**, 207-215, DOI: 10.1007/BF00021212.
- Dirlewanger, E., E. Graziano, T. Joobeur, F. Garriga-Calderé, P. Cosson, W. Howad, P. Arús, 2004:** Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**, 9891-9896, DOI: 10.1073/pnas.0307937101.
- Dirlewanger, E., J. Claverie, A.F. Iezzoni, A. Wünsch, 2009:** Sweet and sour cherries: linkage maps, QTL detection and marker assisted selection. In *Genetics and genomics of Rosaceae*, Springer, New York, NY, pp. 291-313.
- Dochstuhl, F.J., 1855:** *Der sichere Führer in der Obstkunde*. Band 1: Aepfel. Wilhelm Schmid's Buch- und Kunsthandlung, Nürnberg.
- Emeriewen, O.F., K. Richter, S. Piazza, D. Micheletti, G.A.L. Broggin, T. Berner, J. Keilwagen, M.-V. Hanke, M. Malnoy, A. Peil, 2018:** Towards map-based cloning of *FB_Mfu10*: identification of a receptor-like kinase candidate gene underlying

- the *Malus fusca* fire blight resistance locus on linkage group 10. *Molecular Breeding* **38**, 106, DOI: 10.1007/s11032-018-0863-5.
- Emeriewen, O.F., A. Peil, K. Richter, E. Zini, M.-V. Hanke, M. Malnoy, 2017:** Fire blight resistance of *Malus xarnoldiana* is controlled by a quantitative trait locus located at the distal end of linkage group 12. *European Journal of Plant Pathology* **148** (4), 1011-1018, DOI: 10.1007/s10658-017-1152-6.
- Emeriewen, O.F., K. Richter, H. Flachowsky, M. Malnoy, A. Peil, 2021:** Genetic analysis and fine mapping of the fire blight resistance locus of *Malus xarnoldiana* on linkage group 12 reveal first candidate genes. *Frontiers in Plant Science* **12**, 667133, DOI: 10.3389/fpls.2021.667133.
- Espley, R.V., C. Brendolise, D. Chagne, S. Kutty-Amma, S. Green, R. Volz, J. Putterill, H.J. Schouten, S.E. Gardiner, R.P. Hellens, 2009:** Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *The Plant Cell* **21** (1), 168-183, DOI: 10.1105/tpc.108.059329.
- Fahrentrapp, J., G.A.L. Broggin, M. Kellerhals, A. Peil, K. Richter, E. Zini, C. Gessler, 2013:** A candidate gene for fire blight resistance in *Malus x robusta* 5 is coding for a CC-NBS-LRR. *Tree Genetics and Genomes* **9** (1), 237-251, DOI: 10.1007/s11295-012-0550-3.
- Flachowsky, H., R. Töpfer, 2021:** Obst- und Rebenzüchtung im Zeitraffer. *Journal für Kulturpflanzen*. **73** (7-8), 197-203, DOI: 10.5073/JfK.2021.07-08.03.
- Friedli, M., A. Häseli, P. Stefani, 2021:** Biokernobst, Sortenliste 2021, Nr. 1451, URL: <https://www.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1451-biokernobst.pdf>.
- Gao, Z.S., W.E. van de Weg, 2006:** The V-f gene for scab resistance in apple is linked to sub-lethal genes. *Euphytica* **151** (1), 123-133, DOI: 10.1007/s10681-005-9082-3.
- Gardiner, S., H. Bassett, J. Murdoch, S. Meech, M. Cook, V. Bus, C. Ranatunga, E. Rikkerink, 2001:** Major pest and disease resistance loci in apple available to breeders. In: *Plant and Animal Genome*, IX Conf., San Diego, CA, USA. URL: http://www.intl-pag.org/pag/9/abstracts/P5h_13.html.
- Gardiner, S.E., V.G.M. Bus, R.L. Rusholme, D. Chagné, E.H.A. Rikkerink, 2007:** Apple. In: *Fruits and Nuts* (Volume 4), Genome Mapping and Molecular Breeding, 1-62, Springer-Verlag, DOI: 10.1007/978-3-540-34533-6_1.
- Giliomee, J.H., D.K. Strydom, H.J. Van Zyl, 1968:** Northern Spy, Merton and Malling-Merton rootstocks susceptible to woolly aphid, *Eriosoma lanigerum*, in the Western Cape. *South African Journal of Agricultural Science* **11**, 183-186.
- Hanke, M.-V., H. Flachowsky, A. Peil, O.F. Emeriewen, 2020:** *Malus x domestica* apple. In *Biotechnology of fruit and nut crops*. 2nd Edition. Litz, R., F. Pliego-Alfaro, J.I. Hormaza (Hrsg), Cambridge: CAB International), 440-473.
- Hanke, M.-V., H. Flachowsky, A. Peil, C. Hättasch, 2007:** No flower no fruit: genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *Genes, Genomes and Genomics* **1** (1), 1-20.
- Hauagge, R., J.N. Cummins, 1991:** Genetics of length of dormancy period in *Malus* vegetative buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116** (1), 121-126, DOI: 10.21273/JASHS.116.1.121.
- Hossfeld, U., M.V. Simunek, M. Mielewczik, 2017:** Die „Wiederentdeckung“ der Mendelschen Gesetze im Kontext neuer Forschungen. *Nova Acta Leopoldina NF* **413**, 135-153.
- Hough, L.F., J.R. Shay, D.F. Dayton, 1953:** Apple scab resistance from *Malus floribunda* Sieb. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **62**, 341-347.
- Irish, V., 2017:** The ABC model of floral development. *Current Biology* **27** (17), R887-R890, DOI: 10.1016/j.cub.2017.03.045.
- Jancke, O., 1937:** Über die Blutlausanfälligkeit von Apfelsorten, wilden Malusarten und -bastarden sowie die Züchtung blutlausfester Edeläpfel und Unterlagen. *Phytopathologische Zeitschrift* **10**, 185.
- Jung, M., M. Roth, M. José Aranzana, A. Auwerkerken, M. Bink, C. Denancé, C. Dujak, C.-E. Durel, C. Font i Forcada, C. Cantin, W. Guerra, N.P. Howard, B. Keller, M. Lewandowski, M. Ordidge, M. Rymenants, N. Sanin, B. Studer, E. Zurawicz, F. Laurens, A. Patocchi, H. Muranty, 2022:** The apple REFPOP – a reference population for genomics-assisted breeding in apple. *Horticulture Research* **7**, 189, DOI: 10.1038/s41438-020-00408-8.
- King, G.J., F.H. Alston, I. Battle, E. Chevreau, C. Gessler, J. Janse, P. Lindhout, A.G. Manganaris, S. Sansavini, H. Schmidt, K.R. Tobutt, 1991:** The ‘European apple genome mapping project’ – developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica* **56**, 89-94, DOI: 10.1007/BF00041748.
- Klocko, A.L., E. Borejsza-Wysocka, A.M. Brunner, O. Shevchenko, H. Aldwinckle, S.H. Strauss, 2016:** Transgenic suppression of *AGAMOUS* genes in apple reduces fertility and increases floral attractiveness. *PLoSOne* **11** (8), e0159421, DOI: 1371/journal.pone.0159421.
- Knight, R.L., 1969:** Abstract bibliography of plant breeding and genetics to 1965, Prunus. Eastern Press Ltd., London, 540-544.
- Knight, R.L., J.B. Briggs, A.M. Masee, H.N. Tydeman, 1962:** The inheritance of resistance to woolly aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausm.), in the apple. *Journal of Horticultural Science* **37**, 207-218.
- Kobel, F., 1927:** Untersuchungen über die Blüh- und Fruchtbarkeitsverhältnisse bei Obstbäumen. *Die Gartenwelt* **31**, 649-651.
- Kobel, F., P. Steinegger, J. Anliker, 1938:** Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Kirscharten. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **52**, 564-895.
- Lane, D., H. Schmid, 1984:** Lapins and Sunburst sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science* **64**, 211-214, DOI: 10.4141/cjps84-029.
- Lapins, K.O., 1971:** Stella, a self-fruitful sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science* **51**, 252-253, DOI: 10.4141/cjps71-051.

- Lempe, J., A. Peil, H. Flachowsky, 2022:** Time-resolved analysis of candidate gene expression and ambient temperature during bud dormancy in apple. *Frontiers in Plant Science* **12**, 803341, DOI: 10.3389/fpls.2021.803341.
- Lewis, D., L.K. Crowe, 1954:** Structure of the Incompatibility Gene. IV. Types of Mutation in *Prunus avium* L. *Heredity* **8**, 357-363.
- Maxam, A.M., W. Gilbert, 1977:** A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **74** (2), 560-564, DOI: 10.1073/pnas.74.2.560.
- Mendel, G., 1866:** Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV, 3-47.
- Mihatsch, H., G. Schumann, 1971:** Untersuchungen über Befruchtungsverhältnisse bei Süßkirsche (*Prunus avium* L.). *Archiv für Gartenbau* **19**, 373-378.
- Morgan, T.H., 1910:** Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, 120-122, DOI: 10.1126/science.32.812.120.
- Moser, M., E. Asquini, G.V. Miolli, K. Weigl, M.-V. Hanke, H. Flachowsky, A. Si-Ammour, 2020:** The MADS-box gene *MdDAM1* controls growth cessation and bud dormancy in apple. *Frontiers in Plant Science* **11**, 1003, DOI: 10.3389/fpls.2020.01003.
- Mullis, K.B., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, 1986:** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **51** (1), 263-273.
- Nirenberg, M.W., H.J. Matthaei, 1961:** The Dependence of cell- free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **47**(10), 1588-1602, DOI: 10.1073/pnas.47.10.1588.
- Olmstead, J.W., A.M. Sebolt, A. Cabrera, S.S. Sooriyapathirana, S. Hammar, G. Iriarte, D. Wang, C.Y. Chen, E. van der Knaap, A.F. Iezzoni, 2008:** Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map. *Trees Genetics and Genomes* **4**, 897-910, DOI: 10.1007/s11295-008-0161-1.
- Orel, V., M. Vavra, 1968:** Mendel's program for the hybridization of apple trees. *Journal of the History of Biology* **1** (2), 219-224, DOI: 10.1007/BF00351921.
- Otto, D., R. Petersen, B. Brauksiepe, P. Braun, E.R. Schmidt, 2014:** The columnar mutation ("Co gene") of apple (*Malus × domestica*) is associated with an integration of a Gypsy-like retrotransposon. *Molecular Breeding* **33**, 863-880, DOI: 10.1007/s11032-013-0001-3.
- Parravicini, G., C. Gessler, C. Denancé, P. Lasserre-Zuber, E. Vergne, M.-N. Brisset, A. Patocchi, C.-E. Durel, G.A.L. Brogini, 2011:** Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'. *Molecular Plant Pathology* **12**, 493-505, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00690.x.
- Pascal, T., R. Aberlenc, C. Confolent, M. Hoerter, E. Lecerf, C. Tuéro, P. Lambert, 2017:** Mapping of new resistance (*Vr2*, *Rm1*) and ornamental (*Di2*, *pl*) Mendelian trait loci in peach. *Euphytica* **213**, 1-12, DOI: 10.1007/s10681-017-1921-5.
- Peil, A., O.F. Emeriewen, A. Khan, S. Kostick, M. Malnoy, 2020:** Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology* **103**, 3-12, DOI: 10.1007/s42161-020-00581-8.
- Peil, A., O.F. Emeriewen, K. Richter, T. Wöhner, M., Malnoy, M.-V. Hanke, H. Flachowsky, 2014:** Vergleichende genetische Kartierung der Feuerbrandresistenz bei *Malus* sp.. *Journal für Kulturpflanzen* **66** (12), 409-416, DOI: 10.5073/JfK.2014.12.02.
- Peil, A., T. Garcia-Libreros, K. Richter, F.C. Trognitz, B. Trognitz, M.-V. Hanke, H. Flachowsky, 2007:** Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breeding* **126**, 270-475, DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01408.x.
- Picard, C., T. Afonso, A. Benko-Beloglavec, O. Karadjova, S. Matthews-Berry, S.A. Paunovic, M. Pietsch, P. Reed, D.J. Van Der Gaag, M. Ward, 2018:** Recommended regulated non-quarantine pests (RNQPs), associated thresholds and risk management measures in the European and Mediterranean region. *EPP Bulletin* **48** (3), 552-568, DOI: 10.1111/epp.12500.
- Pijut, P.M., 2020:** *Prunus* Spp. Cherry. In: *Biotechnology of fruit and nut crops*. Litz, R., F. Pliego-Alfaro, J.I. Hormaza (Hrsg) 2nd Edition. Cambridge: CAB International, 440-473.
- Ritter Beck von Mannagetta, G., F. Abel, 1894:** Sprechabend über das Gesamtgebiet der Horticultur in Wien. *Wiener illustrierte Garten-Zeitung*, Jahrgang **19**, 227-228.
- Rock, G., D. Zeiger, 1974:** Woolly apple aphid infests Malling and Malling–Merton rootstocks in propagation beds in North Carolina. *Journal of Economic Entomology* **67**, 137-138, DOI: 10.1093/jee/67.1.137a.
- Rosyara, U.R., M.C. Bink, E. van de Weg, G. Zhang, D. Wang, A. Sebolt, E. Dirlwanger, J. Quero-Garcia, M. Schuster, A.F. Iezzoni, 2013:** Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry. *Molecular Breeding*, **32** (4), 875-887, DOI: 10.1007/s11032-013-9916-y.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson, 1977:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5467.
- Schmidt, H., B. Wolfram, R. Boškovc, 1999:** Befruchtungsverhältnisse bei Süßkirschen. *Erwerbsobstbau* **41**, 42-45.
- Schröpfer, S., J. Lempe, O.F. Emeriewen, H. Flachowsky, 2022:** Recent Developments and Strategies for the Application of Agrobacterium-mediated transformation of apple *Malus × domestica* Borkh. *Frontiers in Plant Science* **13**, 928292, DOI: 10.3389/fpls.2022.928292.
- Schuster, M., 2020:** Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview update 2020. Data from OpenAgrar Repository, DOI: 10.5073/20201016-141600.
- Sen Gupta, G.C., P.W. Miles, 1975:** Studies on the susceptibility of varieties of apple to the feeding of two strains of woolly

- aphis (Homoptera) in relation to the chemical content of the tissues of the host. *Austin Journal of Agricultural Research* **26**, 157-168.
- Shay, R., 1962:** Apple. Resistance to diseases and insects. *Handbuch der Pflanzenzüchtung* **6**, 668-671.
- Sonneveld, T., T.P. Robbins, R. Bošković, K.R. Tobutt, 2001:** Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 1046-1055, DOI: 10.1007/s001220000525.
- Sonneveld, T., K.R. Tobutt, T.P. Robbins, 2003:** Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1059-1070, DOI: 10.1007/s00122-003-1274-4.
- Sonneveld, T., T.P. Robbins, K.R. Tobutt, 2006:** Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding* **125**, 305-307, DOI: 10.1111/j.1439-0523.2006.01205.x.
- Speyer, W., 1924:** Über die Blutlausanfälligkeit von Apfelsorten. *Angewandte Botanik* **6**, 168-171.
- Tanaka, N., M. Wada, S. Komori, H. Bessho, A. Suzuki, 2007:** Functional analysis of *MdPI*, the *PISTILLATA* gene homologue of apple, in Arabidopsis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **76**, 125-132, DOI: 10.2503/jjshs.76.125.
- Tao, R., H. Yamane, A. Sugiura, H. Murayama, H. Sassa, H. Mori, 1999:** Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **124**, 224-233, DOI: 10.21273/JASHS.124.3.224.
- Tehrani, G., S.K. Brown, 1992:** Pollen-incompatibility and self-fertility in sweet cherry. In: *Plant Breeding Reviews*. Janick, J. (Hrsg), **9**, 367-388, DOI: 10.1002/9780470650363.ch10.
- Tobutt, K.R., 1994:** Combining apetalous parthenocarpy with columnar growth habit in apple. *Euphytica* **77**, 51-54, DOI: 10.1007/BF02551460.
- Ushijima, K., H. Sassa, R. Tao, H. Yamane, A.M. Dandekar, T.M. Gradziel, H. Hirano, 1998:** Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Molecular and General Genetics* **260**, 261-268, DOI: 10.1007/s004380050894.
- Vahl v., E., 1965:** Prüfung der Befruchtungsverhältnisse bei Süßkirschkreuzungen. *Erwerbsobstbau* **7**, 126-129.
- Vavra, M., V. Orel, 1971:** Hybridization of pear varieties by Gregor Mendel. *Euphytica* **20**, 60-67, DOI: 10.1007/BF00146775.
- Volz, R.K., T.K. McGhie, S. Kumar, 2014:** Variation and genetic parameters of fruit colour and polyphenol composition in an apple seedling population segregating for red leaf. *Tree Genetics and Genomes* **10** (4), 953-964, DOI: 10.1007/s11295-014-0734-0.
- Wang, L., B. Yu, Y. Zhao, Y. Li, J. Guo, Y. Zhu, 2021:** A putative 2OG-Fe (II) oxygenase's response to gibberellin deficiency is related to the internodal growth of columnar apples. *Acta Physiologiae Plantarum* **43** (5), 1-11, DOI: 10.1007/s11738-021-03243-z.
- Watson, J., F. Crick, 1953:** Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738, DOI: 10.1038/171737a0.
- Weigel, D., E.M. Meyerowitz, 1994:** The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78** (2), 203-209, DOI: 10.1016/0092-8674(94)90291-7.
- Wiersma, P.A., Z. Wu, L. Zhou, C. Hampson, F. Kappel, 2001:** Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 700-708, DOI: 10.1007/s001220051700.
- Wolters, P.J., H.J. Schouten, R. Velasco, A. Si-Ammour, P. Baldi, 2013:** Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase. *New Phytologist* **200**, 993-999, DOI: 10.1111/nph.12580.
- Yamane, H.R., H.M. Tao, A. Sugiura, 2003:** Identification of a non-S RNase, a possible ancestral form of S-RNases, in *Prunus*. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 90-100, DOI: 10.1007/s00438-003-0815-5.
- Yao, J.-L., Y.-H. Dong, B.A. Morris, 2001:** Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 1306-1311, DOI: 10.1073/pnas.98.3.1306.
- Zhang, G., A.M. Sebolt, S.S. Sooriyapathirana, D. Wang, M.C.A.M. Bink, J.W. Olmstead, A. Iezzoni, 2010:** Fruit size QTL analysis of an F1 population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry. *Tree Genetics and Genomes* **6**, 25-36, DOI: 10.1007/s11295-009-0225-x.

Reinhard Töpfer , Oliver Trapp 

200 years Mendel: the grapevine breeding perspective

200 Jahre Mendel: die Perspektive der Rebenzüchtung

Affiliation

Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof, Siebeldingen, Germany.

Correspondence

Prof. Dr. Reinhard Töpfer, Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, email: reinhard.toepfer@julius-kuehn.de

Abstract

Mendelian rules in grapevine breeding remained hidden for a long time in the complexity of traits and difficulties of handling the crop. A few traits with minor relevance for breeders had been genetically dissected like berry color or autumn leaf color. Mildew resistance and wine quality have been and are still the most relevant traits. Resistant cultivars developed during the first half of the 20th century failed to convince the quality demand of the market. Since the turn of the millennium, a new generation of fungus-resistant new breeds in Germany gives hope to viticulture in times of climate change and a rising debate on sustainability. It took the breeding effort and continuity of generations of breeders, finally far more than 120 years, to provide the market with cultivars convincing with wine quality, the most complex and debated trait in viticulture. Due to a lack of genetic knowledge, selection in grapevine breeding was done mostly without Mendelian genetics schemes. However, the logistic restrictions (field and greenhouse space, labor, and time) in grapevine breeding require efficient selection schemes based on Mendelian traits. In the recent past, marker-assisted selection (MAS) opened a new chapter in grapevine breeding. For many powdery and downy mildew resistance loci MAS is possible today. Using these tools, stacking of resistance loci according to Mendelian rules can be achieved. The concept of developing and using – for resistances – locus-specific homozygous lines (LSH-lines) permits a new attempt to create large progenies and to select the offspring for all traits other than resistance. New markers and selection concepts for more complex traits (e.g. moderate yield, phenology, *Botrytis* resilience, quality parameters) are urgently needed in practical breeding. Only such tools allow the acceleration of selection at the stage of young seedlings (MAS) and the resulting plants. To that end, newly emerging phenotyping tools are required.

Keywords

Vitis, grapevine breeding, quality, resistance, phenotyping

Zusammenfassung

Die Mendelschen Regeln blieben in der Rebenzüchtung lange in der Komplexität der Merkmale und Schwierigkeiten im Umgang mit dieser Kulturpflanze verborgen. Für einige wenige Merkmale, die für Züchter größtenteils nicht wirklich relevant sind, wurde die Genetik geklärt, wie die Beerenfarbe oder die Herbstfarbe der Blätter. Für die Züchtung waren und sind Mehltaresistenz und Weinqualität die wichtigsten Merkmale. Resistente Sorten, die in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelt wurden, konnten den Qualitätsansprüchen des Marktes nicht genügen. Seit der Jahrtausendwende existiert eine neue Generation pilzwiderstandsfähiger Neuzüchtungen in Deutschland, die dem Weinbau in Zeiten des Klimawandels und einer aufkommenden Nachhaltigkeitsdebatte Hoffnung gibt. Es bedurfte der züchterischen Anstrengung und Kontinuität von Generationen von Züchtern, schließlich weit mehr als 120 Jahre, um den Markt mit Sorten zu versorgen, die hinsichtlich ihrer Weinqualität, dem komplexesten und umstrittensten Merkmal im Weinbau, überzeugen. Aufgrund fehlender genetischer Kenntnisse erfolgte die Selektion meist ohne die systematische Anwendung der Mendelschen Regeln. Die logistischen Beschränkungen (Feld- und Gewächshausfläche, Arbeit und Zeit) in der Rebenzüchtung erfordern jedoch effiziente Selektionsschemata auf der Grundlage der Mendelschen Erkenntnisse. In der jüngeren Vergangenheit schlägt die markergestützte Selektion (MAS) ein neues Kapitel für die Rebenzüchtung auf. Für viele Resistenzloci gegen Echten und Falschen Mehltau ist heute MAS möglich. Mit diesen Werkzeugen ist eine Kombination von Resistenzgenorten gemäß den Mendelschen Regeln möglich. Das Konzept, Locus-spezifische homozygote Linien (LSH-Linien) für Resistenzen zu entwickeln und zu verwenden, erlaubt einen neuen Versuch, große Nachkommenschaften zu schaffen und diese Nachkommen auf alle anderen relevante Merkmale zu selektieren. Daher werden neue Marker und Selektionskonzepte für komplexere Merkmale (z. B. moderater Ertrag, Phänologie, *Botrytis*-Widerstandsfähigkeit, Qualitätsparameter) dringend benötigt. Nur solche Werkzeuge erlauben die akut notwendige Beschleunigung der Selektion im Stadium junger Sämlinge (MAS) und der daraus resultie-



(c) The authors 2022

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

renden Pflanzen. Zu diesem Zweck sind neu zu entwickelnde Phänotypisierungsverfahren erforderlich.

Stichwörter

Vitis, Rebenzüchtung, Qualität, Resistenz, Phänotypisierung

Introduction

The accidental introduction of powdery mildew (PM, *Erysiphe necator*, 1845), phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, 1863) and downy mildew (DM, *Plasmopara viticola*, 1878) to Europe in the second half of the 19th century posed the existence of multi-thousand-year-old viticulture into question. Plant protection with sulfur and copper ensured the survival of viticulture controlling the mildews. But more happened: the pathogens triggered intense private breeding activities in particular in France but also Hungary. It finally resulted in a solution for viticulture by developing rootstocks (American *Vitis* species or interspecific hybrids thereof) tolerant against phylloxera and adapted to the European soils (Manty, 2006). However, quality deficits of scion varieties caused a deep disappointment and led to prejudices still persisting today.

The important French breeders Albert Seibel (1844-1936), Georges Couderc (1850-1928), Eugene Kuhlmann (1858-1932), Bertille Seyve (father, 1864-1939), Francois Baco (1865-1947), Bertille Seyve (son, 1895-1959), Joannes Seyve (1900-1966), and many others (Reynolds, 2015) developed numerous varieties and breeding lines largely by mass selection. When most of these breeders had active breeding programmes, Gregor Mendel's (1822-1884) publication "Versuche über Pflanzen-Hybriden" (Experiments on plant hybrids) (Mendel, 1866) was unknown. This cornerstone on genetics was lost for decades until Hugo de Vries (1848-1935), Carl Correns (1864-1933), and Erich Tschermak (1871-1962) independently rediscovered and published their experimental results. This new information remained unknown for most grapevine breeders. However, their observations were assimilated quickly by geneticists such as Erwin Baur (1875-1933). Thus, he proposed in 1914 to make use of F2 plants instead of a grapevine F1 offspring to select new cultivars (Baur, 1922). From crosses of *Vitis vinifera* cultivars with downy mildew and phylloxera-resistant American *Vitis* species, he suggested to start selection at the F2 generation. At that time 5-7 million F2 plants annually were placed under downy mildew selection in the greenhouse at Müncheberg (close to Berlin) (Baur, 1933). A further selection was done in a cold frame to verify downy mildew resistance. Some 25,000 seedlings remained. Baur finally claimed that one out of 5,000 plants would be acceptable for its wine quality (Baur, 1933). His description is indicative for the low selection efficiency and slow progress in grapevine breeding in order to identify genotypes, that give sufficient yield, show resistance against powdery and downy mildew as well as suitable phenological adaptation, and most important a good wine quality. Accepting the success of rootstock breeding in Hungary, Austria, and France, Erwin Baur split the breeding goals – instead of direct producers being

phylloxera and mildew-resistant – to select for mildew-resistant scions and phylloxera-resistant rootstocks (Baur, 1933). Bernhard Husfeld (1900-1970), Baur's coworker, stated a few years later that F2 plants or backcrosses are most promising for successful selection of wine grape cultivars (Husfeld, 1939).

Mendelian inheritance in grapevine

The first trials to make use of the Mendelian rules go back to researchers and breeders that often made interspecific crosses. It is well known that *Vitis* species are interfertile and the intention to combine quality and resistances resulted in both intraspecific crosses within the species *Vitis vinifera* but also many crosses between *Vitis* species so called ICs (interspecific crosses). One of the first reports on a genetic dissection of traits is the report of Hedrick & Anthony (1915). The authors described the method of crossing as follows: „The female blossoms are emasculated before the calyx cap splits off and are then bagged; the male blossoms are also bagged before the calyx splits. When the pollen is ripe, the bagged male cluster is usually cut from the vine and all or part of it brushed over the emasculated female.“ Today the protocol is quite the same but the knowledge about the genetics has improved. Hedrick and Anthony reported already in 1915 about their results in the light of Mendel's laws and surely were one of the first who gave clear cut evidence of Mendelian inheritance of certain traits. On their retrospective view on 25 years of breeding they pointed towards several problems in dissecting the genetics of grapevine arising from

- low number of seedlings,
- seedlings with low vigor (inbreeding depression),
- complexity of numerous traits in grapevine breeding,
- self-fertilization that might have had occurred in some cases though emasculation was performed.

A major finding concerns inbreeding depression, which was indicated by Hedrick & Anthony (1915) resuming on the analysis of nearly 3000 selfed varieties by stating: "These seedlings have thrown much light upon the inheritance of various factors, but they have been so uniformly lacking in vigor as to lead to the belief that only through crossbreeding can we hope to produce improved varieties". Hedrick & Anthony (1915) studied various traits such as self-sterility (unclear results), flower sex (unclear results), berry size (no clear tendency), berry form (eventually intermediate), season of ripening (impact of many factors).

Years later, in his review on genetics and grapevine breeding, Husfeld (1939) summarized the knowledge of Mendelian traits. Only a very few traits had been elucidated. Often these traits are of minor relevance for application in viticulture: the inheritance of some color traits (berry color or autumn leaf color) and leaf traits (petiole sinus or hairs on the shoot tip) as monogenic traits or shoot tip traits as digenic traits in the F2 of interspecific crosses. Nevertheless, at that early stage of genetic dissection of traits, in some cases the genetic architecture became clear.

Berry skin color

The genetic analyses of berry color gave clear-cut evidence of a dominant (black) and recessive (white) inheritance of color formation (Hedrick & Anthony 1915). The trait is even more complex, as varieties exist with various colors distinguished by using OIV descriptor 225 as green yellow (white) – rose – red – grey – dark red violet – blue black. Today we know that different transposon-induced mutants of the *myb* gene (e.g. Kobayashi et al., 2004, Walker et al., 2007, Röckel et al., 2020, Röckel et al., 2022), but also different enzymes of the anthocyanin pathway, cause the various berry color types in complex ways.

Flower sex

Inheritance of flower sex in grapevine is somewhat complex. *Vitis* wild species are dioecious showing either female or male flowers. In contrast, most traditional as well as newly selected cultivars (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) produce hermaphroditic flowers, which are the fundamental characteristic for yield stability and surely an early and an important trait during domestication. Already prior to Mendel's work, different flower types had been identified within the genus *Vitis* (Walter, 1788; Michaux, 1803; De Candolle, 1824 as cited by Negru, 1936). Negru (1936) summarized the knowledge of the genetic structure of the flower sex locus: Hedrick & Anthony (1915) observed a 1:1 (male: hermaphrodite) segregation. Valleeu (1916) first proposed three alleles. Today female (ff), hermaphrodite (HH, Hf) and male (MH, Mf) haplotypes at one locus and dominance of MH or Mf > HH or Hf > ff are distinguished. The flower sex trait is of particular interest for breeders as Hf or HH haplotypes show a higher yield stability compared to female (ff) genotypes. Technically, crosses with female genotypes (ff) as mother plants are easy to perform, as there is no need for laborious emasculations.

Analysing the inheritance of flower sex locus, which is located on chromosome two, Fechter et al. (2012) identified a closely linked SSR-marker. By using this or similar markers, the majority of cultivars and genotypes can be differentiated for their haplotypes at the locus. This information is very useful as the flower sex can be genetically analysed 3 years prior to first phenotypic expression of the trait. For some applications in practical breeding such as the development and use of locus-specific homozygous lines (LSH-Lines), the selection for flower sex could be very important. Recently, Töpfer & Trapp (2022) proposed to create LSH-lines that carry multiple resistance loci against one pathogen in a homozygous manner but remain heterozygous for most of the genome to avoid inbreeding depression. If these lines were female (ff), emasculation in a later step becomes obsolete and production of seeds will be simplified enormously. Crosses with homozygous hermaphroditic (HH) breeding lines (e.g. other LSH-Lines) or cultivars (e.g. Riesling) will result in a uniform (Hf) hermaphroditic F1 offspring. In other crossing schemes, the removal of female flowering plants would be possible as they are usually lower in yield, thus avoiding labor and costs of cultivation of undesired (ff) seedlings in the vineyard. Analysis of the flower sex locus in *Vitis* is progressing. Recently a candidate gene, VviPLATZ1 transcription factor, was identified

as a key factor for female flower morphology formation (Locco-Corena et al., 2021).

Resistance traits

Mendelian inheritance of disease resistance was difficult to understand for a long time. In the beginning, grapevine breeders combined breeding lines of diverse genetic origin, i.e. they created and made use of interspecific hybrids of North American *Vitis* species and crossed them among each other or with *V. vinifera* cultivars. In such complex pedigrees, the origin of a resistance remained unknown for quite some time. Crosses were made and resulting seedlings were phenotyped for powdery mildew (PM) and downy mildew (DM) resistance. Exceptional was the work of Alain Bouquet giving the first example of a consequent introgression of a resistance locus from *Muscadinia rotundifolia* into *V. vinifera* (Pauquet et al., 2001). The authors developed introgression lines up to pBC4 (pseudo-backcross 4) by crossing lines selected for PM and DM resistance as well as other desired characters with different *V. vinifera* cultivars to stepwise replace parts of the wild species genome and simultaneously avoiding inbreeding depression (compare Fig., pedigree of VRH3082-1-42).

A major breakthrough towards application of Mendelian genetics was achieved in grapevine breeding when genetic maps based on SSR markers (e.g. Merdinoglu et al., 2002) and the sequence of the reference genome of PN40024 (Jaillon et al., 2007) became available. Although not PM and DM-resistant, PN40024 proved to be an excellent tool for fine-mapping studies as it permits deriving of SSR marker sequences within genomic regions of interest and a subsequent testing in a different genetic background. These advances in grapevine genetics allowed detailed characterization of the resistances and their candidate genes. By mapping resistances, a paradigm shift was initiated (Thomas et al., 1993; Dalbo et al., 2001, Doligez et al., 2002), followed by the application of marker-assisted selection (MAS) in grapevine breeding (Eibach et al., 2007). Some resistance genes have been identified by gene transfer, converting regenerated transgenic plants from susceptible to resistant. The first resistance genes were described in 2013 as TIR-NB-LRR genes underlying the resistance of the *Run1* and *Rpv1* loci (Feechan et al., 2013) after detailed investigation of the genome and the individual resistance loci.

Today, numerous dominantly inherited loci for resistance against powdery mildew (e.g. *Run1*, *Run2* etc. = resistance *Uncinula necator* and *Ren1*, *Ren2*, *Ren3* etc. = resistance *Erysiphe necator*, respectively) and against downy mildew (e.g. *Rpv1*, *Rpv3.1* etc. = resistance *Plasmopara viticola*) (see: Hausmann und Töpfer → “data on breeding and genetics” at www.vivc.de/loci) are known. Few of them are characterized in more detail and markers have been identified to be routinely used in MAS: e.g. for *Run1*, *Ren1*, *Ren3*, *Ren4*, *Ren9* and *Rpv1*, *Rpv3.1*, *Rpv3.2*, *Rpv3.3*, *Rpv10*, *Rpv12*. These markers permit monitoring of the inheritance of loci as single Mendelian traits. The markers even permit the combination (stacking) of loci, thus building complex resistances consisting of e.g. 3 Ren and 3 Rpv loci (3 + 3) in order to increase durability of resistance. Currently the first cultivars carrying 2 + 2 are

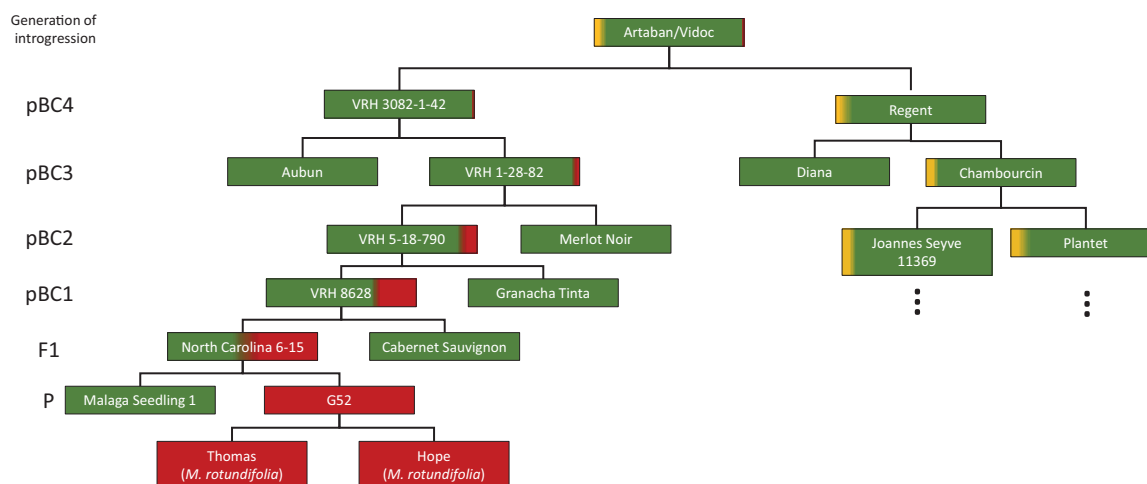


Fig. Pedigree of the new cultivars Artaban and Vidoc, which carry stacked resistance loci from *Muscadinia rotundifolia* (Pauquet et al., 2001) and American *Vitis* species coming from Chambourcin. The breeding line VRH3082-1-42 is derived from a systematic introgression into *Vitis vinifera* over 4 generations. The introgressed resistance locus confers a resistance against both powdery mildew (*Run1*) and downy mildew (*Rpv1*) and is inherited as single Mendelian trait. The development of the pBC4 (pseudo backcross) took about three to four decades. The pedigree of Chambourcin which contributes *Ren3/Ren9* and *Rpv3.1* (Di Gaspero et al., 2012) is going back to the 19th century and was recently updated by Röckel et al. (2021). Colors symbolize the following genomes: green = *V. vinifera*; red = *M. rotundifolia*, and yellow = American *Vitis* species. Red and yellow indicate introgressed parts of genomes.

available for viticulturists e.g. Cabernet Cortis (*Ren3*, *Ren9*, *Rpv3.3*, *Rvp10*), Calardis Blanc (*Ren3*, *Ren9*, *Rpv3.1*, *Rvp3.2*), Sauvignac (*Ren3*, *Ren9*, *Rpv3.1*, *Rvp12*) (see www.vivc.de). In addition Artaban and Vidoc show 3 + 2 (*Run1*, *Ren3*, *Ren9*, *Rvp1*, *Rpv3.1*) resistance loci in combination (Fig.).

Beyond mildew resistances, other traits have been analysed such as resistance against black rot (*Guignardia bidwellii*) or Pierce Disease (*Xylella fastidiosa*). However, in many cases markers closely linked with the respective locus and useful for MAS remain to be developed. Generally speaking, markers have made many resistance loci accessible as Mendelian traits but the genetics of many other traits, e.g. yield, *Botrytis* resilience, and the all dominating trait of wine quality, remain to be elucidated. For further elucidation of the genetics of these important grapevine traits, the development of high-throughput phenotyping methods is needed. Two principal approaches can be distinguished: (1) phenotyping in lab or greenhouse and (2) field phenotyping. Several examples have been reported for each case and a few of them are advanced to be used routinely (e.g. Herzog et al., 2015; Mack et al., 2020; Zandler et al., 2021). Using such phenotypic data combined with genetic approaches like GWAS (genome wide association studies), it should be possible to find QTLs (quantitative trait loci) and markers for MAS for many traits (Flutre et al., 2022).

Conclusion

The simple application of Mendelian rules was not successful due to complexity of the traits that need to be combined in grapevine breeding. Geneticist Erwin Baur's conclusion to have faster breeding success separating phylloxera-resistance from mildew resistance by proceeding with the concept of breeding for rootstocks and scions separately remained the successful way. Baur also suggested to focus on both mildews

instead of other diseases. Husfeld proved that the combination of resistance and quality traits is possible. His cultivars 'Aris' and 'Siegfriedrebe' were milestones in grapevine breeding history but could not convince the winegrowers due to low yield and virus susceptibility. Husfeld's successor, Gerhard Alleweldt (1927-2005) and his team, selected the first cultivar (cv. 'Regent') from resistance breeding that is grown on a large area in Germany (up to 2,200 ha). Due to increased molecular knowledge in the last few decades, tremendous breeding progress has been achieved. Some of the complex traits in grapevine, in particular resistance traits, have been genetically dissected to such an extent that they can be treated as Mendelian traits by application of MAS. Modern molecular tools and techniques permit further analysis of other complex traits and help to reduce their complexity and with their consequent application, new breeding goals can be addressed. Facing a rapid climate change and the EU GREEN DEAL debate, viticulture will urgently need better performing cultivars.

Conflicts of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

References

- Baur, E., 1922: Einige Aufgaben der Rebenzüchtung im Lichte der Vererbungswissenschaft. Beitr. Pflanzenzucht 5, 104-11, Vortrag, gehalten 1914.
- Baur, E., 1933: Der heutige Stand der Rebenzüchtung in Deutschland. Der Züchter. Zeitschrift für theoretische und angewandte Genetik: 5 73-77, DOI: 10.1007/BF01812478.
- Dalbo, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, W.F. Wilcox, B.I. Reisch, 2001: Marker-assisted selection for powdery mildew resist-

- ance in grapes. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **126** (1), 83-89, DOI: 10.21273/JASHS.126.1.83.
- Di Gaspero, G., D. Copetti, C. Coleman, S.D. Castellarin, R. Eibach, P. Kozma, T. Lacombe, G. Gambetta, A. Zvyagin, P. Cindric, L. Kovacs, M. Morgante, R. Testolin, 2012:** Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 277–286, DOI: 10.1007/s00122-011-1703-8.
- Doligez, A., A. Bouquet, Y. Danglot, F. Lahogue, S. Riaz, C.P. Meredith, K.J. Edwards, P. This, 2002:** Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 780-795, DOI: 10.1007/s00122-002-0951-z.
- Eibach, R., E. Zyprian, L. Welter, R. Töpfer, 2007:** The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* **46**, 120-124, DOI: 10.5073/vitis.2007.46.120-124.
- Fechter, I., L. Hausmann, M. Daum, T. Rosleff Sörensen, P. Viehöver, B. Weisshaar, R. Töpfer, 2012:** Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*. *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 247-259, DOI: 10.1007/s00438-012-0674-z.
- Feechan, A., C. Anderson, L. Torregrosa, A. Jermakow, P. Mestre, S. Wiedemann-Merdinoglu, D. Merdinoglu, A.R. Walker, L. Cadle-Davidson, B. Reisch, S. Aubourg, N. Bentahar, B. Shrestha, A. Bouquet, A.F. Adam-Blondon, M.R. Thomas, I.B. Dry, 2013:** Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *The Plant Journal* **76**, 661-674, DOI: 10.1111/tj.12327.
- Flutre, T., L. Le Cunff, A. Fodor, A. Launay, C. Romieu, G. Berger, Y. Bertrand, N. Terrier, I. Beccavin, V. Bouckenoghe, M. Roques, L. Pinasseau, A. Verbaere, N. Sommerer, V. Cheynier, R. Bacilieri, J.-M. Boursiquot, T. Lacombe, V. Laucou, P. This, J.-P. Péros, A. Doligez, 2022:** A genome-wide association and prediction study in grapevine deciphers the genetic architecture of multiple traits and identifies genes under many new QTLs. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **12** (7), DOI: 10.1093/g3journal/jkac103.
- Hedrick, U.P., R.D. Anthony, 1915:** Inheritance of certain characters of grapes. *New York Agricultural Experiment Station Bulletin*, Geneva NY **45**, 3-19.
- Herzog, K., R. Wind, R. Töpfer, 2015:** Impedance of the grape berry cuticle as a novel phenotypic trait to estimate resistance to *Botrytis cinerea*. *Sensors* **15**, 12498-12512, DOI: 10.3390/s150612498.
- Husfeld, B., 1939:** Genetik und Rebenzüchtung. *Agronomia Lusitana* **1**, 200-235.
- Iocco-Corena, P., J. Chaïb, L. Torregrosa, D. Mackenzie, M.R. Thomas, H.M. Smith, 2021:** VviPLATZ1 is a major factor that controls female flower morphology determination in grapevine. *Nature Communications* **12** (Art. 6995), DOI: 10.1038/s41467-021-27259-8.
- Jaillon, O., J.M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Huguency, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyere, A. Billault, et al., 2007:** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449** (7161), 463-468, DOI: 10.1038/nature06148.
- Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto, H. Hirochika, 2004:** Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science* **304**, 982, DOI: 10.1126/science.109501.
- Mack, J., F. Rist, K. Herzog, R. Töpfer, V. Steinhage, 2020:** Constraint-based automated reconstruction of grape bunches from 3D range data for high-throughput phenotyping. *Biosystems Engineering* **197**, 285-305, DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2020.07.004.
- Manty, F., 2006:** Hintergründe zur Entstehung der Bezeichnung der Unterlagenselektionen von Sigmund Teleki und Franz Kober. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **57**, 159-164.
- Mendel, G., 1866:** Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn* **4**, 3-47.
- Merdinoglu, D., S. Wiedemann-Merdinoglu, P. Coste, V. Dumas, S. Haetty, G. Butterlin, C. Greif, 2002:** Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. In: Hajdu, E., E. Borbas (eds) *Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding*. Kecskemet, Hungary, 26-31 August 2002, 603/1 edn. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven; Belgium, pp 451-456.
- Negrul, A.M., 1936:** Variabilität und Vererbung des Geschlechts bei der Rebe. *Gartenbauwissenschaft* **10**, 215-231.
- Pauquet, J. A. Bouquet, P. This, A.F. Adam-Blondon, 2001:** Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1201-1210, DOI: 10.1007/s001220100664.
- Reynolds, A., 2015:** Grapevine breeding in France a historical perspective. In: Reynolds, A.G. (ed) *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry*. Woodhead Publishing, 65-76.
- Röckel, F., C. Moock, U. Braun, F. Schwander, P. Cousins, E. Maul, R. Töpfer, L. Hausmann, 2020:** Color intensity of the red-fleshed berry phenotype of *Vitis vinifera* Teinturier grapes varies due to a 408 bp duplication in the promoter of *VvmybA1*. *Genes* **11** (8), 891, DOI: 10.3390/genes11080891.
- Röckel, F., O. Trapp, E. Zyprian, L. Hausmann, D. Migliaro, S. Vezzulli, R. Töpfer, E. Maul, 2021:** A 'Regent' pedigree update: ancestors, offspring and their confirmed resistance loci. *Vitis* **60**, 189-193, DOI: 10.5073/vitis.2021.60.189-193.
- Röckel, F., C. Moock, F. Schwander, E. Maul, R. Töpfer, L. Hausmann, 2022:** A 69 kbp Deletion at the Berry Color Locus Is Responsible for Berry Color Recovery in *Vitis vinifera* L. Cultivar 'Riesling Rot'. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 3708, DOI: 10.3390/ijms23073708.

Thomas, M.R., P. Cain, S. Matsumoto, N. Steele Scott, 1993: Microsatellite sequences in grapevine for mapping and fingerprinting. Proceedings of the Australian-Japan Workshop on 'Techniques of Gene Diagnosis and Breeding in Fruit Trees', November 24-27, 1992, Tsukuba; Japan 7-13.

Töpfer, R., O. Trapp, 2022: A cool climate perspective on grapevine breeding: climate change and sustainability are driving forces for changing varieties in a traditional market. *Theoretical and Applied Genetics*, DOI: 10.1007/s00122-022-04077-0.

Valleau, W.D., 1916: Inheritance of sex in the grape. *The American Naturalist* **50**, 554-564.

Walker, A.R., E. Lee, L. Bogs, D.A.J. McDavid, M.R. Thomas, S. Robinson, 2007: White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal* **49**, 772–785, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02997.x.

Zendler, D., N. Malagol, A. Schwandner, R. Töpfer, L. Hausmann, E. Zyprian, 2021: High-throughput phenotyping of leaf discs infected with grapevine downy mildew using shallow convolutional neural networks. *Agronomy* **11** (9), 1768, DOI: 10.3390/agronomy11091768.

Daniel von Maydell¹, Jens Keilwagen², Heike Lehnert², Thomas Berner², Frank Marthe¹

On the search for the vernalization locus in caraway (*Carum carvi*) using genotyping by sequencing data

Auf der Suche nach dem Vernalisations-Locus in Kümmel (*Carum carvi*) mittels Genotyping by Sequencing

Affiliations

¹Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural Crops, Quedlinburg, Germany.

²Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Biosafety in Plant Biotechnology, Quedlinburg, Germany.

Correspondence

Daniel von Maydell, Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural Crops, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany, email: daniel.maydell@julius-kuehn.de

Abstract

Caraway (*Carum carvi*) can be divided into biennial and annual flowering types. Biennials require a cold stimulus for initiation of flowering, whereas annuals lack any vernalization requirement. Cultivation of annuals is considered advantageous due to better integration into crop rotation and reduced production costs. However, available annual varieties lack a sufficient yield potential and essential oil content. Valuable genetic diversity exists within the biennial genepool, which can be transferred to the annual genepool by crossbreeding. According to literature, F_1 plants from crosses between annual and biennial flowering types uniformly show annual flowering. Resulting F_2 populations show a Mendelian 3:1 ratio between annual and biennial flowering types. This indicates a monogenic inheritance of vernalization requirement in caraway with dominant annual flowering.

After crossbreeding of annual and biennial flowering types, the recessive allele for biennial flowering can remain within the breeding material over multiple generations. Thus, a genetic marker associated with the vernalization locus would be beneficial to detect the recessive allele in one selection step. To identify markers associated with vernalization requirement, we used genotyping by sequencing (GBS) data of 70 biennial and 67 annual flowering types. We conducted case-control studies and population differentiation-based tests. In total, 60 common single nucleotide polymorphism (SNP) markers were found that were significantly associated with vernalization requirement. Out of these, we developed 19 diagnostic markers. In future, these diagnostic markers might be tested in segregating populations.

Keywords

Horticultural plant, Apiaceae, Umbelliferae, marker-assisted selection (MAS), reproductive trait, Mendel

Zusammenfassung

Kümmel (*Carum carvi*) kann in zweijährige und einjährige Blühtypen unterteilt werden. Zweijährige benötigen einen Kältereiz für die Blühinduktion, während Einjährige keinen Vernalisationsbedarf haben. Aufgrund der besseren Integration in die Fruchtfolge und der geringeren Produktionskosten wird der Anbau Einjähriger als vorteilhaft angesehen. Die verfügbaren einjährigen Sorten weisen jedoch ein unzureichendes Ertragspotential und einen zu geringen Gehalt an ätherischem Öl auf. Der zweijährige Genpool enthält wertvolle genetische Diversität, die durch Kreuzungen auf den einjährigen Genpool übertragen werden kann. Laut Literatur zeigen F_1 -Pflanzen aus Kreuzungen zwischen ein- und zweijährigen Blühtypen ein uniform einjähriges Blühverhalten. Resultierende F_2 -Populationen zeigen ein Mendel'sches 3:1-Spaltungsverhältnis zwischen einjährigen und zweijährigen Blühtypen. Dies deutet auf eine monogene Vererbung des Vernalisationsbedarfs bei Kümmel mit dominant einjährigem Blühverhalten hin.

Nach Kreuzungen zwischen ein- und zweijährigen Blühtypen kann das rezessive Allel für die zweijährige Blüte über mehrere Generationen im Zuchtmaterial verbleiben. Daher wäre ein genetischer Marker, der mit dem Vernalisations-Locus assoziiert ist, vorteilhaft, um das rezessive Allel in einem Selektionsschritt zu erkennen. Um Marker zu identifizieren, die mit dem Vernalisations-Locus assoziiert sind, wurden Genotyping by Sequencing (GBS)-Daten zu 70 zweijährigen und 67 einjährigen Blühtypen genutzt. Case-Control-Studien und populationsgenetische Studien wurden durchgeführt. Insgesamt wurden 60 gemeinsame Einzelnukleotid-Polymorphismus-Marker (SNPs) gefunden, die signifikant mit dem Vernalisationsbedarf assoziiert waren. Für 19 Marker wurden diagnostische Marker entwickelt. Diese könnten in Zukunft in segregierenden Populationen getestet werden.



(c) The authors 2022

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

Stichwörter

Gartenbauliche Kultur, Apiaceae, Umbelliferae, Marker-gestützte Selektion (MAS), reproduktives Merkmal, Mendel

Introduction

Caraway (*Carum carvi* L., $2n = 2x = 20$, Apiaceae) is an important aromatic plant in European and North-American countries. The species can be divided into biennial and annual flowering types. Biennials require a cold stimulus (vernalization) during winter for initiation of flowering. In order to be receptive for this cold stimulus, biennials have to reach a certain size before winter (Németh, 1998b). Consequently, biennial caraway is sown in spring and harvested in summer of the second year. In contrast, annuals can complete their life cycle within one growing season. Annuals are sown in early spring and harvested in autumn. Annual material, which is sufficiently winter-hardy, can also be grown as winter-annual, i.e., sowing in autumn and harvest in summer of the next year. To our best knowledge, only one variety (Aprim, Agritec Ltd.) exists, which combines annual behavior with a sufficient degree of winter-hardiness.

In nature, biennials are widespread across Europe and Asia, whereas annuals are restricted to North Africa and the Near East (Pank, 2012). Biennials have been cultivated in European countries since medieval times, whereas annual varieties were introduced at first in the 1990s. For these annual varieties, an Egyptian origin is assumed (Németh, 1998a). Annual cultivation allows better integration into crop rotation and can potentially reduce production costs. However, grain yield and essential oil content of annuals (the most important quality trait) have to be improved by breeding. For winter-annual growing, improvement in winter-hardiness would be beneficial. Unfortunately, the genetic diversity of annual material is limited. The majority of available caraway germplasm of commercial varieties and genebank accessions consists of biennial flowering types. In future breeding programs, the genetic diversity of the biennial gene pool could be used to enrich the annual gene pool.

Crossbreeding between annuals and biennials is possible, if synchronization of flowering by artificial vernalization can be achieved. Thus, introgression of genetic material from the biennial to the annual gene pool is rather easy. However, resulting progenies have to be selected for annual flowering. Németh (1998b) found nearly complete annual flowering in F_1 -generation after crossbreeding of annual and biennial flowering types. She discovered a Mendelian ratio of 3:1 in an F_2 -generation. This indicates a monogenic inheritance of vernalization requirement with dominant annual flowering. During the breeding process, the recessive allele for biennial flowering, i.e. vernalization requirement, can remain over several generations within the breeding material. If a genetic marker for vernalization requirement was found, the recessive allele for biennial flowering could be removed already in the F_2 -generation.

So far, no diagnostic markers for vernalization requirement or any other traits are available in caraway. For a long period,

genetic analysis of caraway was restricted to randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers (Laribi et al., 2011; Bocianowski & Seidler-Lozykowska, 2012; Seidler-Lozykowska et al., 2014). However, RAPD markers provided only a low marker density and showed a low reproducibility (Grover & Sharma, 2016; Garrido-Cardenas et al., 2018). Due to reduced sequencing costs, next generation sequencing (NGS) methods like genotyping by sequencing (GBS) can be implemented for minor crops. Even if a reference genome is not available as for caraway, a high marker density for genome wide association studies (GWAS) can be achieved. Recently, a GBS was conducted to investigate genetic diversity and population structure in a set of 67 annual and 70 biennial flowering types (von Maydell et al., 2021). In this study, we intend to use these data to identify marker loci, which are associated with vernalization requirement of caraway and to develop diagnostic markers. Therefore, this study will foster the development of diagnostic markers in caraway and will pave the path to the establishment of marker-assisted selection (MAS) approaches in caraway.

Material and methods

Plant material

The material used in this study was previously described in von Maydell et al. (2021). Briefly, a set of 137 caraway accessions was assembled consisting of 67 annual and 70 biennial flowering types. Annual material mainly consists of inbred lines provided by the JKI (Quedlinburg, Germany) and just a few commercial varieties and genebank accessions. Those annual inbred lines predominately originates from crosses between biennial and annual material. Progenies from these crosses were selected for annual flowering and high essential oil content. In contrast, biennial material mainly consisted of wild material, commercial varieties and genetic resources from genebanks.

Phenotyping

Accessions were assigned to a flowering type based on data assessed in a field trial (von Maydell et al., 2021). Accessions that uniformly flowered in the year of sowing were defined as annual flowering types and accessions that uniformly flowered in the year after sowing were defined as biennial flowering types.

Genotyping and genetic analyses

Genotyping of the caraway accessions under investigation was previously described in von Maydell et al. (2021). Briefly, GBS was conducted using the method published by Elshire et al. (2011). Lacking a reference genome, a so-called 'mock reference' composed of consensus GBS fragments was constructed (Melo & Hale, 2019). Reads were mapped and a SNP calling was carried out. Finally, SNPs were filtered for quality, $\leq 10\%$ missing values, $\leq 5\%$ minor allele frequency (MAF) and $\leq 90\%$ maximum heterozygosity. This resulted in a marker set of 13,155 SNPs.

To identify loci associated with vernalization requirement, case-control studies based on a Fisher's exact test were conducted using the software SNPsift (Cingolani et al., 2012). SNPsift allows to test whether the alternative allele is associated with the trait of interest in a dominant or recessive way. However, the alternative allele could predominantly be found either in the annuals or in the biennials. Hence, both, the dominant and the recessive model, are computed for the collection of 137 accessions with 67 annuals (=cases) and 70 biennials (=controls).

Furthermore, population differentiation-based statistics were used to identify genome regions, which indicate shifts in allele frequencies between the group of annuals (67) and biennials (70). For this purpose, F_{st} -outlier detection tests based on the FDIST algorithm (Beaumont & Nichols, 1996) were conducted by using the software packages Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Two different approaches were implemented, i.e., the non-hierarchical finite island model (Arlequin) and the hierarchical island model (Arlequin settings: 20,000 simulations, 100 demes, 10 groups). For the hierarchical island model, a hierarchical structure has to be defined. Therefore, the group of annuals and biennials was randomly divided in two subgroups of 33 and 34 accessions or 35 and 35 accessions, respectively (Liu et al., 2017).

P-values of SNPsift and Arlequin models were adjusted for multiple testing (FDR, Benjamini & Hochberg, 1995) by using

the function `p.adjust` (setting: `method = "fdr"`) implemented in the software package R (R Core Team, 2019). Markers with FDR adjusted p-values < 0.001 were considered as significant SNPs. Significant markers, which were detected by all four fitted models, were defined as candidate markers to be associated with the vernalization locus.

Design and test of diagnostic markers

It was tested whether promising markers detected by SNPsift and Arlequin can be transferred to the PACE marker system (3cr Bioscience). The technique was recently implemented for caraway in von Maydell et al. (2020). Briefly, a PCR with allele specific primers for the SNP and an endpoint fluorescent measurement was performed. Developed markers were tested for functionality by using six biennial samples, eight annual samples and two negative controls. As biennial samples, two plants each of the cultivars Niederdeutscher, Prochan and Rekord were randomly selected. As annual samples, two plants each of the cultivars Aprim, Karzo, Sprinter and SZK-1 were used. DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). DNA quantity was estimated using the Qubit 2.0 Fluorimeter (Life Technologies). DNA concentration was set to 10 ng/ μ l. PCR was carried out as described in von Maydell et al. (2020). The primers of functional PACE markers are listed in Table 1. The corresponding SNP flanking sequences can be extracted from supplementary Table S.

Table 1. List of developed PACE markers for loci significantly associated with vernalization requirement detected by SNPsift and Arlequin models. The locus ID consists of the ID of the contig and the SNP position on the contig. ASP1/ASP2 = allele specific primers, CP = common primer. FAM = oligo sequence GAAGGTGACCAAGTTCATGCT; HEX = oligo sequence GAAGGTCGGAGTCAACGGATT.

Marker ID	Locus ID	Primer type	Oligo sequence
Cc2021M064	18965_39	ASP1	FAM-AAGAACAAAGTGATCACTTCTCAG
		ASP2	HEX-ACAYAAGAACAAAGTGATCACTTCTCAA
		CP	GCTATAGGAATTTTGTRTTATTGACGCTTT
Cc2021M067	207597_145	ASP1	FAM-TTTAAGCCGTAGTCTTGAATCATCG
		ASP2	HEX-GTTTTAAGCCGTAGTCTTGAATCATCA
		CP	GCTGGTAGCWGAAGGGACAAGTTTT
Cc2021M068	9780_153	ASP1	FAM-AATGGCTTCCTCCTCTTTGAGA
		ASP2	HEX-ATGGCTTCCTCCTCTTTGAGG
		CP	AGAGATTGCCCCCTGTTTTCTAGATATA
Cc2021M070	478799_86	ASP1	FAM-ATTTGTTAGACATTACAGCAACTCTTT
		ASP2	HEX-GTTAGACATTACAGCAACTCTTG
		CP	TGGGCTCATGACCAGCTCAAACATA
Cc2021M077	245881_125	ASP1	FAM-GAAGTGTGCTAACTTTGCTCTGC
		ASP2	HEX-GTGAAGTGTGCTAACTTTGCTCTGT
		CP	CCAGTGACCAACAGTATAAAGTAGAACAT
Cc2022M113	25780_45	ASP1	FAM-CACTTCACTAGTCACAAGACACG
		ASP2	HEX-GCACTTCACTAGTCACAAGACACA
		CP	GATTTGTGTAATGGCAGACAAAGACAGAA
Cc2022M117	6155_88	ASP1	FAM-GAATACTTTAACGACCAACTTAACGAT
		ASP2	HEX-GAATACTTTAACGACCAACTTAACGAG
		CP	CTTTTAACCCATTACGGACGTTTACTTTA

Table 1. Continued

Marker ID	Locus ID	Primer type	Oligo sequence
Cc2022M118	7652_114	ASP1	FAM-AGAAGCACAGAGCGTGACCAAC
		ASP2	HEX-GAGAAGCACAGAGCGTGACCAAT
		CP	TTGAGAATAGTTGATCAGGAATAAAGTTCA
Cc2022M120	7652_69	ASP1	FAM-TCTCACCTTATGACTTGTATTATAT
		ASP2	HEX-GCTTCTCACCTTATGACTTGTATTATAA
		CP	GGTTCACACAAGGAGTCTTTAAACAACCT
Cc2022M121	7652_151	ASP1	FAM-TATTCTGATCAACTATTCTCAAAAACAG
		ASP2	HEX-CTTTATTCTGATCAACTATTCTCAAAAACAT
		CP	CACACATCATAATTACTAAATTGCTCTTAT
Cc2022M123	10122_133	ASP1	FAM-CTACCTAAGTATCGAAAAAGTAACAG
		ASP2	HEX-CCTCTACCTAAGTATCGAAAAAGTAACAA
		CP	GGCAATGATAGGAGTTTTCAAGCTGATTT
Cc2022M124	11783_102	ASP1	FAM-CGTATCAATCTTCTCTTATATTCAGGAA
		ASP2	HEX-GTATCAATCTTCTCTTATATTCAGGAG
		CP	CTTACTACATCAGCACATGCTAAACTGAT
Cc2022M125	11783_133	ASP1	FAM-GTCATCAGTATTTAGCACGTCAGG
		ASP2	HEX-GTCATCAGTATTTAGCACGTCAGC
		CP	ARATCAGTTTAGCATGTGCTGATGTAGTAA
Cc2022M126	124119_175	ASP1	FAM-AATCGTCTCCGGCACTATCCG
		ASP2	HEX-CAATCGTCTCCGGCACTATCCA
		CP	GTCGAAAGATTTACGAACATCGTCATAA
Cc2022M128	207597_172	ASP1	FAM-GCATCCATAATGCTCAACCTTCA
		ASP2	HEX-GCATCCATAATGCTCAACCTTCG
		CP	TAAGAYGATGATTCAAGACTACGGCTTAAA
Cc2022M129	214096_140	ASP1	FAM-CCTGAATTCTGCTATATGTTTATGCC
		ASP2	HEX-CCTGAATTCTGCTATATGTTTATGCG
		CP	CTAACATTGCAAATAACCAAAGAAACATT
Cc2022M132	255309_191	ASP1	FAM-ACCTTATAAGGCATTTATCAAATCATATTA
		ASP2	HEX-CTACCTTATAAGGCATTTATCAAATCATATTT
		CP	CGAGTATTAGCTGTGATATATTGCATCAAT
Cc2022M133	261365_69	ASP1	FAM-AAGAGCCTTRTAAGGCCACTCAG
		ASP2	HEX-CAAGAGCCTTRTAAGGCCACTCAT
		CP	AACAACCTTGATCAYAAGAAAGCTCAACAT
Cc2022M136	5784_204	ASP1	FAM-CAGGTCATATATTAGACCGCACTC
		ASP2	HEX-CTCAGGTCATATATTAGACCGCACTA
		CP	GTATTGTGGGTTGAAATCATTGGAGGTTT

Results

Associations with vernalization requirement

We evaluated the dominant and recessive model used in the case-control study (SNPsift). The dominant and the recessive model revealed 3,411 and 436 markers significantly associated with vernalization requirement, respectively (p value < 0.001). The markers with the lowest p value were locus 7652_114 (dominant model) and locus 9780_153 (recessive model).

In total, 108 and 75 markers were detected as significant SNPs (p value < 0.001) by using the non-hierarchical finite island model or the hierarchical island model in Arlequin, respectively. Identical to the dominant SNPsift model, both models detected locus 7652_114 as peak marker.

In total, 60 significantly associated markers were detected by both Arlequin models and both SNPsift models. This includes the peak markers from all models. These common 60 loci were defined as putative candidates associated with vernalization requirement in caraway. Further information of these

loci, including SNP sequences and p values, can be retrieved from supplementary Table S. For several loci, the development of diagnostic markers was tested.

Development of diagnostic markers

Out of these 60 markers, 19 markers were transferred to the PACE marker system. In a test for functionality with a small set of annual and biennial ecotypes, these markers showed a sufficient allelic discrimination, i.e., at least two distinct clusters could be visually discriminated (three clusters if heterozygous genotypes were present). Exemplarily, an allelic discrimination with three distinct clusters (genotypes) is presented in Figure 1. The primer sequences of these markers are listed in Table 1. Fortunately, marker design was successful for the peak markers of all models. In few cases, allelic discrimination might be further improved by optimizing PCR settings (for instance annealing temperature).

For all 19 loci with successful design of diagnostic markers, the allelic distribution based on GBS data within the investigated 67 annuals and 70 biennials is presented in Table 2. All loci showed a distinct but incomplete allelic discrimination between flowering types, including peak markers (Table 2).

Discussion

According to literature, vernalization requirement shows a monogenic inheritance with dominant annual flowering (Németh, 1998b). Thus, vernalization requirement in caraway can be regarded as a “simple” Mendelian trait. Since the discovery of the rules of inheritance by Gregor Mendel (Mendel, 1866), further scientific innovations led to the mapping and cloning of many loci encoding the expression of Mendelian

Table 2. Allelic distribution of 19 selected SNP markers significantly associated with vernalization requirement detected by SNPsift and Arlequin models. The allelic distribution within the 67 annual accessions and 70 biennial accessions is presented as follows: REF = homozygous reference (first allele in brackets, supplementary Table S) genotypes. ALT = homozygous alternative (second allele in brackets) genotypes. HET = heterozygous genotypes. Missing values are not presented.

Locus ID	Annuals			Biennials		
	REF	ALT	HET	REF	ALT	HET
7652_114	4	48	13	65	0	1
9780_153	2	50	14	54	0	12
11783_102	6	43	12	66	0	1
11783_133	6	43	12	66	0	1
5784_204	5	37	17	64	0	2
245881_125	5	42	20	68	0	2
214096_140	7	41	16	60	0	5
255309_191	12	43	9	59	0	7
10122_133	7	38	14	62	0	3
207597_145	7	43	14	64	0	5
207597_172	7	43	14	64	0	5
7652_69	4	48	13	63	0	4
7652_151	4	48	13	64	0	2
261365_69	8	33	23	61	0	2
124119_175	4	46	16	52	0	14
478799_86	51	1	14	4	43	14
18965_39	54	1	12	0	47	21
6155_88	61	0	6	3	14	51
25780_45	8	36	23	64	0	3

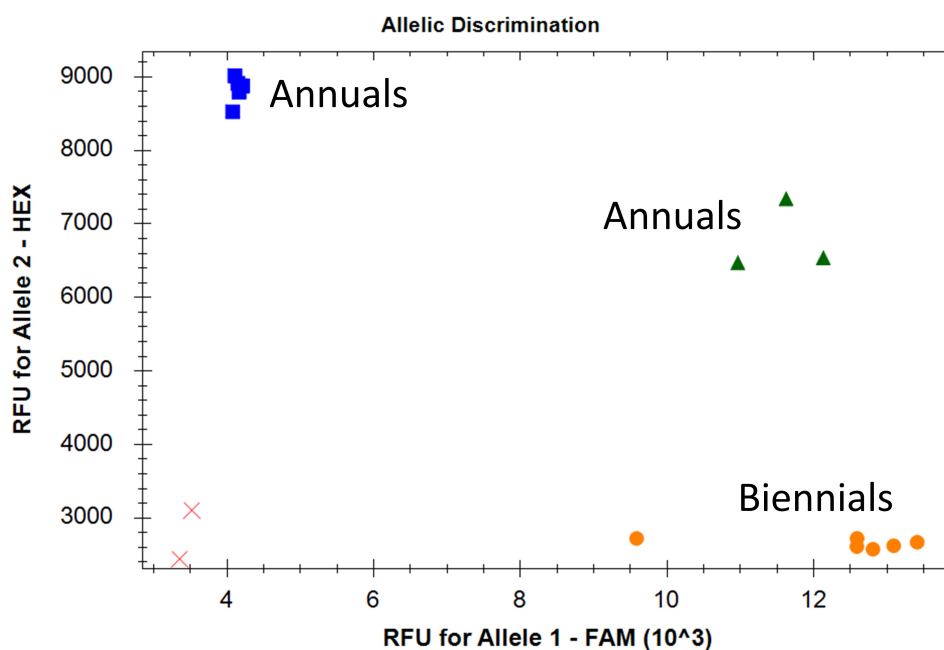


Fig. 1. Exemplary result (allelic discrimination) of the PACE marker Cc2022M132 designed for the SNP locus 255309_191. Red crosses = negative control, blue squares = homozygous allele 2, green triangles = heterozygous genotypes, orange dots = homozygous allele 1. In this case, all biennial samples showed a homozygous allele 1 genotype and annual samples either a homozygous allele 2 genotype or a heterozygous genotype.

traits. However, so far, it was not possible to map a trait-associated locus or to identify a corresponding gene in caraway. Genetic mapping of the vernalization requirement and the development of diagnostic markers could be a good starting point for genetic analysis of traits in caraway.

In a previous study, it could be shown that the vernalization requirement is the main factor that causes population differentiation in caraway (von Maydell et al., 2021). Therefore, it can be assumed that markers associated with the vernalization locus have the strongest effect on population differentiation. Other factors, which are known to affect population differentiation, i.e., breeding history or geographical origin, cause only minor effects in the caraway population under investigation. Furthermore, it can be assumed that markers associated with the vernalization requirement cause the strongest shifts in allele frequencies between the group of annual and biennial caraway accessions. Based on these assumptions, SNPsift and Arlequin models were fitted. These models commonly identified 60 putative candidate loci associated with vernalization requirement in caraway.

Nevertheless, loci associated with vernalization requirement might not necessarily be physically linked with the vernalization locus. However, above 67% of the examined annual accessions originate from crossbreeding between annual and biennial material, which progeny were selected for annual flowering in breeding programs. Due to these rather recent recombination events, we expected that at least markers strongly associated with vernalization requirement should indeed be physically linked to the putative vernalization locus.

Assuming a monogenic inheritance of vernalization requirement in caraway, all candidate markers should be located within the same genomic region. Unfortunately, the position of the markers on the genome is unknown, as a reference genome of caraway is not yet available. Hence, without a reference genome or any genetic map, the location of the candidate markers cannot be determined. Consequently, these markers should be tested in a mapping population to estimate the actual genetic linkage of the markers with the putative vernalization locus. Moreover, this mapping population should be used to design a first genetic map for caraway across all chromosomes. For this purpose, again GBS might be the method of choice to genotype the mapping population. The designed PACE markers can be additionally used for genotyping.

These markers might not yet be in very strong linkage with the vernalization locus, because the detected markers did not perfectly distinguish between annuals and biennials. All markers showed some degree of heterozygosity within one or both groups of flowering types (Table 2). Due to the dominant inheritance of annual flowering, heterozygous plants within annual accessions would be possible. However, in field trials, we evaluated up to 75 plants per accession and did not observe segregating accessions regarding vernalization requirement (von Maydell et al., 2021). Thus, we would not expect heterozygous genotypes for loci closely linked to the vernalization locus even for annual flowering types. Never-

theless, the marker closest to the putative vernalization locus combined with at least one flanking marker on the other side of the vernalization locus could be a good starting point for MAS. Furthermore, the PACE markers could be useful to evaluate if crossbreeding between annual and biennial flowering material was successful. In the future, marker saturation in the genomic region of interest could be conducted to get additional markers closer linked to the vernalization locus (fine mapping).

Finally, it should be of interest to identify the gene that controls vernalization requirement in caraway. In *Arabidopsis thaliana*, the flowering locus C (FLC) was identified to control vernalization requirement (Michaels & Amasino, 1999). Since then, several other players acting within the vernalization pathway or network have been identified. Several of these players encode MADS-box transcription factors (Whittaker & Dean, 2017). Henceforth, *Arabidopsis* sequences were used to detect homologs in other species. In carrot, as distant relative of caraway, two different vernalization loci are assumed (Wohlfeiler et al., 2019) and one putative locus has been mapped (Alessandro et al., 2013). In addition, several homologs of players in the vernalization pathway were found (Ou et al., 2017). Due to genome reduction and due to the short contigs of the ‘mock reference’, available GBS data are scarcely suitable to search for homologs. The generation of a reference genome of caraway would considerably simplify such analyses.

Conclusions

Several promising markers putatively associated with vernalization requirement in caraway were identified and transferred to a diagnostic marker system. The applicability of these markers for MAS has to be tested in mapping populations. In general, genetic analysis in caraway is hampered by the lack of a genetic map and a reference genome. Thus, the design of a first genetic map and implementation of MAS would be a milestone for caraway breeding, which should be endeavored in the near future.

Acknowledgements

We thank Jenny Knibbiche for establishing and phenotyping the field trials and Beate Kamm for the laborious marker tests. We thank all germplasm providers, which enabled the assembly of a diverse caraway collection: The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK, Gatersleben, Germany); the United States Department of Agriculture (USDA, Ames, USA) the Crop Research Institute (CRI, Prague, Czech Republic); the Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN, Wageningen, Netherlands); the Nordic Genetic Resource Center (NordGen, Alnarp, Sweden); the Julius Kühn-Institute (JKI, Quedlinburg, Germany); the Dr. Junghanns GmbH (Ascherleben, Germany); the Agritec Ltd. (Šumperk, Czech Republic); the National Research Council Canada (NRC, Ottawa, Canada); the Chrestensen GmbH (Erfurt, Germany); the Pharmasaat GmbH (Artern, Germany).

Funding

This project was funded by the "Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe" (FNR) on behalf of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) (Funding ID: 22023215).

Conflicts of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

Supplementary information

Table S. List of 60 loci significantly associated with vernalization requirement detected by SNPsift and Arlequin models. Contains following information: SNP flanking sequences, reference and alternative allele, minor allele frequency, p values of SNPsift and Arlequin models and rank of p values per model.

The supplementary information (Table S) for this article can be found online at <https://doi.org/10.5073/JfK.2022.11-12.xx>.

References

- Alessandro, M.S., C.R. Galmarini, M. Iorizzo, P.W. Simon, 2013:** Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* **126** (2), 415-423, DOI: 10.1007/s00122-012-1989-1.
- Beaumont, M.A., R. Nichols, 1996:** Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **263**, 1619-1626, DOI: 10.1098/rspb.1996.0237.
- Benjamini, Y., Y. Hochberg, 1995:** Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **57** (1), 289-300, DOI: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
- Bocianowski, J., K. Seidler-Lozykowska, 2012:** The relationship between RAPD markers and quantitative traits of caraway (*Carum carvi* L.). *Ind Crops Prod* **36** (1), 135-139, DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.08.019.
- Cingolani, P., V.M. Patel, M. Coon, T. Nguyen, S.J. Land, D.M. Ruden, X. Lu, 2012:** Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet* **3**, 35, DOI: 10.3389/fgene.2012.00035.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler, S.E. Mitchell, 2011:** A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *Plos One* **6** (5), e19379, 10, DOI: 10.1371/journal.pone.0019379.
- Excoffier, L., H.E. Lischer, 2010:** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* **10** (3), 564-567, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Garrido-Cardenas, J.A., C. Mesa-Valle, F. Manzano-Agugliaro, 2018:** Trends in plant research using molecular markers. *Planta* **247** (3), 543-557, DOI: 10.1007/s00425-017-2829-y.
- Grover, A., P.C. Sharma, 2016:** Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology* **36** (2), 290-302, DOI: 10.3109/07388551.2014.959891.
- Laribi, B., N. Zoghalmi, M. Lamine, K. Kouki, A. Ghorbel, A. Mougou, 2011:** RAPD-based assessment of genetic diversity among annual caraway (*Carum carvi*) populations. *Eurasian J Biosci* **5** (1), 37-47.
- Liu, L., K.P. Ang, J.A. Elliott, M.P. Kent, S. Lien, D. MacDonald, E.G. Boulding, 2017:** A genome scan for selection signatures comparing farmed Atlantic salmon with two wild populations: Testing colocalization among outlier markers, candidate genes, and quantitative trait loci for production traits. *Evol Appl* **10** (3), 276-296, DOI: 10.1111/eva.12450.
- Melo, A.T.O., I. Hale, 2019:** Expanded functionality, increased accuracy, and enhanced speed in the de novo genotyping-by-sequencing pipeline GBS-SNP-CROP. *Bioinformatics* **35** (10), 1783-1785, DOI: 10.1093/bioinformatics/bty873.
- Mendel, G., 1866:** Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn*. Brünn, Naturforschender Verein, 4, 3-47.
- Michaels, S.D., R.M. Amasino, 1999:** FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *The Plant Cell* **11** (5), 949-956, DOI: 10.1105/tpc.11.5.949.
- Németh, É., 1998a:** Introduction. In: Nemeth, E. (Ed.), *Caraway The Genus Carum*. Amsterdam, harwood academic publishers, 7, 1-8.
- Németh, É., 1998b:** Questions of the generative development. In: Nemeth, E. (Ed.), *Caraway The Genus Carum*. Amsterdam, harwood academic publishers, 7, 69-81.
- Ou, C.G., J.H. Mao, L.J. Liu, C.J. Li, H.F. Ren, Z.W. Zhao, F.Y. Zhuang, 2017:** Characterising genes associated with flowering time in carrot (*Daucus carota* L.) using transcriptome analysis. *Plant Biology* **19** (2), 286-297, DOI: 10.1111/plb.12519.
- Pank, F., 2012:** Kümmel (*Carum carvi* L.). In: Hoppe, B. (Ed.), *Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus*. Bernburg, Verein für Arznei- und Gewürzpflanzen SALUPLANTA e. V., 4, 728-762.
- R Core Team, 2019:** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Seidler-Lozykowska, K., A. Kuczynska, K. Mikolajczyk, J. Nowakowska, J. Bocianowski, 2014:** Estimation of genetic distance among genotypes of caraway (*Carum carvi* L.) using RAPD-PCR. *Acta Sci Agron* **36** (2), 183-188, DOI: 10.4025/actasciagron.v36i2.18197.
- von Maydell, D., J. Brandes, H. Lehnert, W. Junghanns, F. Marthe, 2020:** Breeding synthetic varieties in annual caraway: observations on the outcrossing rate in a polycross using a high-throughput genotyping system. *Euphytica* **217** (1), 1, DOI: 10.1007/s10681-020-02732-5.

von Maydell, D., H. Lehnert, T. Berner, E. Klocke, W. Junghanns, J. Keilwagen, F. Marthe, 2021: On genetic diversity in caraway: Genotyping of a large germplasm collection. *PLoS One* **15** (12), e0244666, DOI: 10.1371/journal.pone.0244666.

Whittaker, C., C. Dean, 2017: The FLC Locus: A Platform for Discoveries in Epigenetics and Adaptation. *Annual Review*

of Cell and Developmental Biology **33** (1), 555-575, DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060546.

Wohlfeiler, J., M.S. Alessandro, P.F. Cavagnaro, C.R. Galmarini, 2019: Multiallelic digenic control of vernalization requirement in carrot (*Daucus carota* L.). *Euphytica* **215** (2), 37, DOI: 10.1007/s10681-019-2360-2.

Aleksandra Varekhina¹, Victor Guerra², Andreas Stahl³, Albrecht Serfling³

Identification of seedling resistance against leaf rust using innovative phenotyping methods

Nachweis von Keimpflanzenresistenzen gegenüber Braunrost mit Hilfe innovativer Phänotypisierungsmethoden

Affiliations

¹International Graduate School “Determinants of Plant Performance (DPP), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Halle, Germany.

²Georg-August-Universität Göttingen, Department of Crop Sciences, Plant Pathology and Crop Protection section, Göttingen, Germany.

³Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Quedlinburg, Germany.

Correspondence

Dr. Albrecht Serfling, Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany, email: albrecht.serfling@julius-kuehn.de

Abstract

Puccinia triticina, as the causal agent of leaf rust, is one of the most important fungal diseases of wheat. Effective resistance can prevent yield losses and reduced quality. More than 80 leaf rust resistance (*Lr* genes) genes are known, most of which are vertical resistance genes vulnerable to breakdown by virulent races of leaf rust. Therefore, breeding activities are focused on quantitative resistance genes, e.g., *Lr34* and *Lr46*. In an F_2 population derived from the partially resistant cultivar Pavon F76, carrying *Lr46* at the adult plant stage, and the susceptible spring wheat variety Thatcher, seedling resistance QTLs could be detected, independent of the expected chromosomal regions for already known *Lr* genes. Using innovative phenotyping methods, e.g., microscopic evaluation and counting of uredospore pustules, three QTLs were detected on chromosomes 2B, 4D and 7D. These resistance QTLs explained more than 11% of the phenotypic variance. KASP markers can be derived from markers within the QTL peaks and are available for marker-assisted selection. The study proves again that Mendelian rules do not only describe the inheritance of phenotype. They also apply to the inheritance of the marker alleles and are therefore essential for marker selection and marker-assisted breeding.

Keywords

Leaf rust resistance, wheat cultivars, QTL mapping, seedling resistance, markers

Zusammenfassung

Puccinia triticina als Auslöser des Braunrosts, ist eines der wichtigsten pilzlichen Pathogene des Weizens. Effektive Resistenzen können vor Ertragsverlusten und verringerter Qualität schützen. Mehr als 80 Braunrostresistenzgene (*Lr*-Gene)

sind bekannt, die meisten sind vertikale Resistenzgene und sind infolge des Auftretens virulenter Braunroststrassen gefährdet, ihre Wirksamkeit zu verlieren. Daher fokussieren sich Züchtungsaktivitäten auf quantitative Resistenzgene wie z. B. *Lr34* und *Lr46*. In einer F_2 Population, die aus dem resistenten Elter Pavon F76, der *Lr46* im Adultpflanzenstadium ausprägt, und der anfälligen Linie Thatcher entstanden ist, wurden bereits im Keimpflanzenstadium wirksame Resistenz-QTLs in Regionen, in denen keine bekannten Resistenzgene zu erwarten sind, nachgewiesen. Mit Hilfe innovativer Phänotypisierungsmethoden, z. B. mikroskopischen Beobachtungen und der Zählung der Uredosporen, konnten drei QTL auf den Chromosomen 2B, 4D und 7D nachgewiesen werden. Diese Resistenz-QTL erklären mehr als 11 % der phänotypischen Varianz. Von Markern innerhalb der QTL können nun KASP Marker abgeleitet werden, die für eine markergestützte Züchtung geeignet sind. Die Ergebnisse der Studie zeigen erneut, dass die Mendelschen Gesetze nicht nur auf phänotypische Merkmale anwendbar sind. Sie gelten ebenso für die Vererbung der unterschiedlichen Allele, die durch Marker nachweisbar sind und sind somit essentiell für die Markerselektion und die markergestützte Züchtung.

Stichwörter

Braunrostresistenz, Weizensorten, QTL Kartierung, Keimpflanzenresistenz, Marker

Introduction

Resistance against fungal pathogens has been shown several times to be a cost-effective and environmentally safe control strategy (Figlan et al., 2020). However, rusts, especially leaf rust (*Puccinia triticina*), frequently generate aggressive races showing different virulence/avirulence patterns. Such races overcome existing race-specific (vertical) leaf rust resistance



(c) The authors 2022

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

(*Lr*) genes (Figlan et al., 2020). More than 80 *Lr* genes have been reported and identified in wheat cultivars and several other genetic resources (Qureshi et al., 2018). The timewise limited effectivity of race-specific *Lr* genes based on a gene-for-gene interaction was hypothesized by Flor & Comstock (1971). Most often, an incompatibility between the rust and host plant results in a hypersensitive reaction causing cell death around infection sites (Wang & Chen, 2017). Typically, race-specific *Lr* genes code for proteins with a nucleotide binding (NB) site and leucine-rich repeat (LRR) domains. Most of these genes are seedling resistance genes; however, adult plant resistance (APR) genes have also been described, are more durable, and are usually race-independent resistance genes. Currently, 8 APR *Lr* genes have been identified (Pinto da Silva et al., 2018). These *Lr* genes include quantitative resistance genes, e.g., *Lr34* and *Lr46*, of which *Lr46* confers resistance not only in typical wheat genotypes but also in durum wheat (Singh et al., 1998). *Lr46* was originally detected at the adult plant stage in the cultivar Pavon F76, which has maintained its slow rusting characteristic since its release in 1976 (Singh et al., 1998). *Lr46* results in partial immunity, in contrast to race-specific genes that confer full resistance to the host (Lowe et al., 2011). Partial immunity produces a resistance that slows the growth of leaf rust by several mechanisms, such as a reduction in haustoria formation at later plant developmental stages, a reduction in hyphal growth in intercellular spaces, a higher latent period of *P. triticina* and smaller uredospore pustules with a lower number of uredinia (Martinez et al., 2001; Herrera-Foessel et al., 2008; Lagudah, 2009; Lowe et al., 2011). *Lr46* was located on chromosome 1B of the cultivar Pavon F76 (Singh et al. 1998). The *Lr34/Yr18* slow rusting complex has been mapped previously by Suenaga et al. (2003) and Lillemo et al. (2008), and the genes involved have been cloned (Krattinger et al., 2009). Some genes have been annotated into the region of *Lr46*, e.g., a receptor-like kinase (RLK), and a transcription factor with the WRKY domain (Cobo et al., 2018). Despite the high level of similarity and comparable effects, such as quantitatively reduced infection level, leaf tip necrosis and reduced yield, between the APR genes *Lr46/Yr29* and *Lr34/Yr18* (Rosewarne et al., 2006; Lillemo et al., 2008), a similar genetic background containing these genes was not found. Furthermore, it remains unclear whether the resistance mechanism is based on an ABC transporter, as in the case of *Lr34/Yr18* (Krattinger et al., 2009). Many cultivars carry more than one leaf rust resistance gene, which was summarized by McIntosh et al. (1995) for Pavon F76 among other varieties and accessions. Based on the pedigree, Pavon F76 also carries *Lr1*, *Lr10* and *Lr13* (Singh et al., 1998). However, these *Lr* genes are broken down by most German rust populations (Serfling et al., 2011; Goyeau et al., 2006; Hanzalová et al., 2021), and an increased level of seedling resistance was not observed in those studies, so another or several other genes may be expressed in Pavon F76. The aim of this study was to apply innovative phenotyping methods to map quantitative seedling resistance in an F_2 population of a cross between the susceptible cultivar Thatcher and Pavon F76 to identify loci independent from *Lr46* and other known *Lr*-genes carried by Pavon F76. Quantitative resistance genes cannot be detected with nominal rating scales; therefore, phenotyping using fluorescence microscopy, counting of

haustorial mother cells, counting of the uredospore numbers, visual ratings of macroscopic symptoms and/or resistance reactions and quantification of uredospores were performed and compared via a converted rating scale. On the basis of the segregation predicted by Mendel, which applies to both the phenotype and the genotype data, markers were selected and resistance QTL determined. For mapping, a 25K SNP array and consensus maps from Wang et al. (2014) and Wen et al. (2017) together with phenotypic data were used.

Materials and Methods

Plant and fungal material

Cultivar Pavon F76 and the leaf rust-susceptible cultivar Thatcher were originally and kindly provided by GRIN-Global (Agricultural Research Service (ARS), Washington, USA; Pavon F76 deposited as PI519847, Thatcher as PI168659). Pavon F76 carries *Lr46* and is partially resistant against leaf rust at the adult plant stage. From each variety, five plants were crossed, and 27 F_1 plants were generated. After selfing F_1 plants, 154 F_2 plants were used for the study. For inoculation, *P. triticina* single spore isolate 4136, showing virulence against the resistance genes *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr23*, *Lr32*, *Lr35*, *Lr37*, and *LrB*, was collected from the cultivar Thatcher in a field trial at Quedlinburg in 2013.

Growing conditions and multiplication of spores

Seeds were sown in potting soil (Archut Fruhstorfer Type P, HAWITA, Lauterbach, Germany) in plastic trays containing 77 pots, each with a size of 5 cm × 5 cm. After sowing, the trays were placed in the greenhouse with a 16 h day and 8 h night cycle, an average temperature of 18°C to 22°C, humidity of >80% and daily manual irrigation. *P. triticina* single spore isolate 4136 was replicated on seedlings of the cultivar Thatcher, and 2 mg per investigated parent and F_2 plant were applied. Plants in the three-leaf stage were sprayed with a Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) water solution (1 ml Tween 20 l⁻¹) and inoculated with uredospores mixed with talcum powder (1:20 w/w) using a powder blower. Immediately after inoculation, the plants were covered for 24 h using a plastic sheet chamber.

Rating of seedlings

Ten days after inoculation with leaf rust isolate 4136, genotypes were scored using the rating scale from McIntosh et al. (1995). This scale classified plant-leaf rust interactions as “immune” (rated as “0”), “very resistant” (rated as “;”), “resistant” (rated as “1”), “moderately resistant” (rated as “2”) “moderately resistant to moderately susceptible” (rated as “3”) and “susceptible” (rated as “4”) to leaf rust. Within the segregating F_2 population, 0, 1, and 2 were assigned as resistant, and 3 and 4 were assigned as susceptible. The resulting data were converted into a 1 to 10 scale according to Rollar et al. (2021). To improve the assessment of disease reactions

(infection type, IT) and better observe minor pustules on the leaf surface, a stereomicroscope was used.

Staining of leaves and fungal structures and microscopic analysis

To determine the disease reaction at the seedling stage, two leaf segments of approximately 1.5 cm in length from each inoculated plant from the F₂ population and the parental lines were cut 72 h after inoculation (hai) and 7 d after inoculation (dai). Samples were incubated in 2 ml reaction tubes with a mixture of ethanol, chloroform (2:1 v/v) and 10 ml of trichloroacetic acid (20% in water, v/v) overnight at room temperature. After decolorization of the leaves, the mixture was removed, and 1.5 ml of a lactophenol/ethanol (1:2 v/v) mixture was added and incubated for 2 h. Thereafter, the reaction tubes were boiled for 5 minutes. The solution was removed, 1.5 ml of an ethanol/H₂O (33.3% ethanol, 66.6% deionized water v/v) solution was added, and the reaction tubes were shaken for 15 min. The ethanol/H₂O solution was removed, and 1.5 ml of 0.05 M sodium hydroxide (NaOH) solution was added to the tubes and shaken for 15 minutes. The solution was discarded, and 1.5 ml of sterile water was added followed by 15 min of shaking to reduce the background fluorescence of the samples. After removing the water, 1.5 ml of 0.1 M Tris-HCl solution was poured into the tubes and incubated for 2 h at room temperature. The solution was removed, and Calcofluor white M2R (0.2% in sterile water, w/v) staining solution was added with an incubation time of 5 min followed by removal of the staining solution and washing of the tubes with sterile water four times at intervals of 5 min between each wash step. Leaf samples were then transferred to microscope slides and embedded in a glycerol/water solution (1:1 v/v). Haustorial mother cells (hmc) and the number of uredospores from 10 infection sites per leaf were studied using fluorescence microscopy (Axioskop 50, Carl Zeiss, Jena, Germany). Leaf cells and fungal structures were analysed using the Axiocam MRC camera system connected to the software package Axiovision 4 (Carl Zeiss AG, Jena). Stained fungal structures were visualized using filter set 02 (excitation filter G 365, beam splitter FT 395, and barrier filter LP 420). Autofluorescence within plant tissue was recorded using filter set 05 (excitation filter BP 400-440, beam splitter FT 460, barrier filter LP 470). The number of hmc was counted at 72 hai, and the number of mature uredospores was counted at 7 dai. In total, infection sites from two leaf segments from each of the 154 genotypes and the parental lines were analysed. Uredospore pustules and necrosis/hypersensitive reactions were further assessed using a stereomicroscope (Stemi2000, Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled with an Axiocam 305 digital camera used for microscopy. The average number of uredospore pustules per mm² leaf area was calculated. Hmc were taken from 10 infection sites from three leaves, and the average was used as the phenotype for the QTL analysis.

DNA genotyping

Genomic DNA from 154 genotypes of the F₂ population and the parental lines was extracted from leaves of four-week-

old seedlings according to Stein et al. (2001). Extracted DNA was dissolved in TE buffer (pH 8.0), and its concentration was measured using a Nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Dreieich, Germany). DNA was diluted in deionized sterile water to a concentration of 50 ng µl⁻¹. Genotyping was performed with a wheat 25K Infinium iSelect array (Traitgenetics, Seeland, Gatersleben, Germany). Genotyping data were filtered for markers showing polymorphisms between the parental lines and a call rate of 90%, resulting in 8666 markers. Chromosomal positions of markers were extracted from a consensus map based on the 90K SNP array (Wang et al., 2014; Wen et al., 2017). The annotation provides the physical position in base pairs (bp) and genetic position in centimorgans (cM). Only markers with reported physical and genetic positions on the consensus map and the reference genome, respectively (4990 markers), were used to construct the linkage map. Genotyping failed for 2 genotypes, which were thus excluded, resulting in a total of 152 genotypes.

Map construction

A genetic linkage map was constructed using JoinMap4.0 (Kyazma, Wageningen, Netherlands). SNP data were rewritten as a (maternal allele, Pavon F46), b (paternal allele, Thatcher), and h (heterozygote) in a matrix to prepare the data file. The dataset was checked for errors (missing alleles, nonusable marker designation, and wrong allele designation). The predicted Mendelian segregation of 1:2:1 was validated using the chi-squared test at a level of $\alpha = 0.05$ and a significance for segregation distortion of >3.84 . Markers were positioned on linkage groups based on independent LOD threshold values of 2.0–3.0 based on the chromosome assignment of Wang et al. (2014) and/or Wen et al. (2017). Linkage analysis and marker order assignment were carried out using the regression-mapping algorithm. The genetic map was constructed using the Kosambi function (Kosambi, 1944).

QTL analysis

MapQTL 5.0 (Kyazma, Wageningen, Netherlands) was used to perform interval mapping. For the identification and selection of a significant QTL on a linkage group, a significance threshold (LOD) was calculated using a permutation test at a p-level of 0.05. The rating scale based on McIntosh et al. (1995) was nominally scaled, and to obtain a decimal scale, the rating scale was converted following Rollar et al. (2021). Traits for QTL analysis were the converted rating scale, average of number of hmc at 72 hai from 10 infection sites of each genotype, and the average number of uredospores from 10 infection sites of each genotype at 7 dai.

Potential candidate genes were identified by physical mapping of flanking markers in the reference genome of Chinese Spring (IWGSC RefSeq assembly v1.0) available on the web page https://urgi.versailles.inrae.fr/blast/?dbgroup=wheat_iwgsc_refseq_v2_chromosomes&program=blastn (Alaux et al., 2018).

Identification of candidate genes

The sequence between flanking markers was then uploaded to <https://megante.dna.affrc.go.jp/home> (Numa & Itoh, 2014) and blasted to the UniProtKb web page <https://www.uniprot.org/blast> to find genes exclusive to wheat (taxon ID 4565) (Wang et al., 2021). Possible candidate genes were defined based on their specificity to wheat and based on the lowest E value.

Results

Phenotypic results

Differences in the traits hmc and uredospore generation could be detected by microscopic analysis. Differences could also be demonstrated by the rating results using the converted scale from McIntosh et al. (1995, Fig. 1 as a third trait). The partially resistant parent Pavon F76, which had a converted rating scale value 2 at the seedling stage, was defined as moderately resistant compared to the susceptible line Thatcher, which showed a value of 10 (completely susceptible, supplementary Table S1). A chi-squared test for segregation ratios of 3:1 (resistant:susceptible), as expected for single major

resistance genes, was not significant. A nearly normal distribution from resistant to more susceptible genotypes could be detected in the case of the traits hmc and uredospore generation, whereas the data recorded with the rating scale showed no continuous distribution due to the conversion from a non-continuous scale into a decimal scale (Fig. 2).

A significant difference between parental lines was found for both hmc and uredospore generation, which was not surprising given the high susceptibility of Thatcher. In contrast, the resistant line showed an average of 8.16 uredospores compared to 14.24 hmc per infection site (Table 1).

Genotype means of the F₂ population for the traits hmc, the converted rating scale and the number of uredospores were determined to be between the means of the parent lines. More than 30% of the genotypes were within hmc classes 8 to 10, whereas hmc class ranges between 0 and 2 and between 16 and 18 each comprised approximately 5% of the F₂ population. The uredospore spore generation trait showed a peak between 30 and 40 uredospores (30%) (hmc and uredospores, Fig. 2). Only 2% of the genotypes shared a susceptibility phenotype at the level of the susceptible parent or higher (53.27 uredospores). The converted rating scale showed gaps because not all resistance reactions or pustule generation levels could be observed (Fig. 2C).

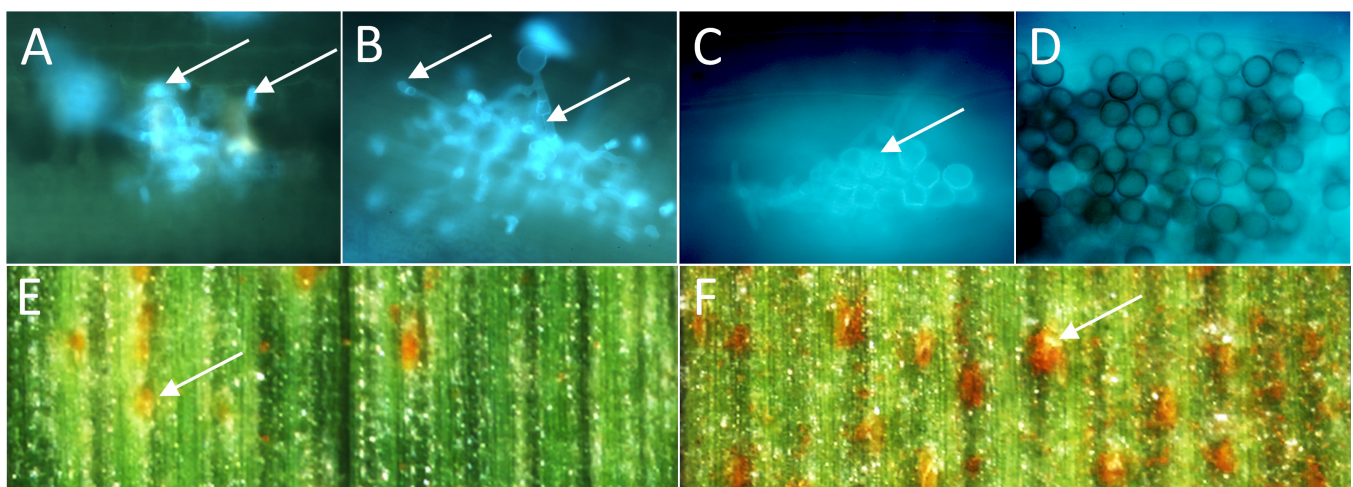


Fig. 1. Different amounts of haustorial mother cells (arrows in A and B) in the resistant parent Pavon 76 (A) and sensitive parent Thatcher (B) indicate different levels of resistance at a microscopic level 72 hours after inoculation with leaf rust. After 7 d, only a few uredospores were produced on leaves of Pavon 76 (C, arrow), whereas the entire leaf area was covered by spores in Thatcher (D). After 10 d, quantitative differences in uredospore pustules were visible on a macroscopic level (arrows E, F).

Table 1. Data for the traits number of hmc and uredospores per infection site (10 infection sites per leaf) for the F₂ population Pavon 76 × Thatcher at the seedling stage.

Generation of haustorial mother cells at 72 hai				Uredospore generation at 7 dai			
Parents		F ₂ population		Parents		F ₂ population	
Pavon F76	Thatcher	Mean	Max/min	Pavon F76	Thatcher	Mean	Max/min
4.16±1.82	16.02±5.71	9.48	16.24/1.81	14.24±5.86	53.27±9.40	27.18	52.05/0.75

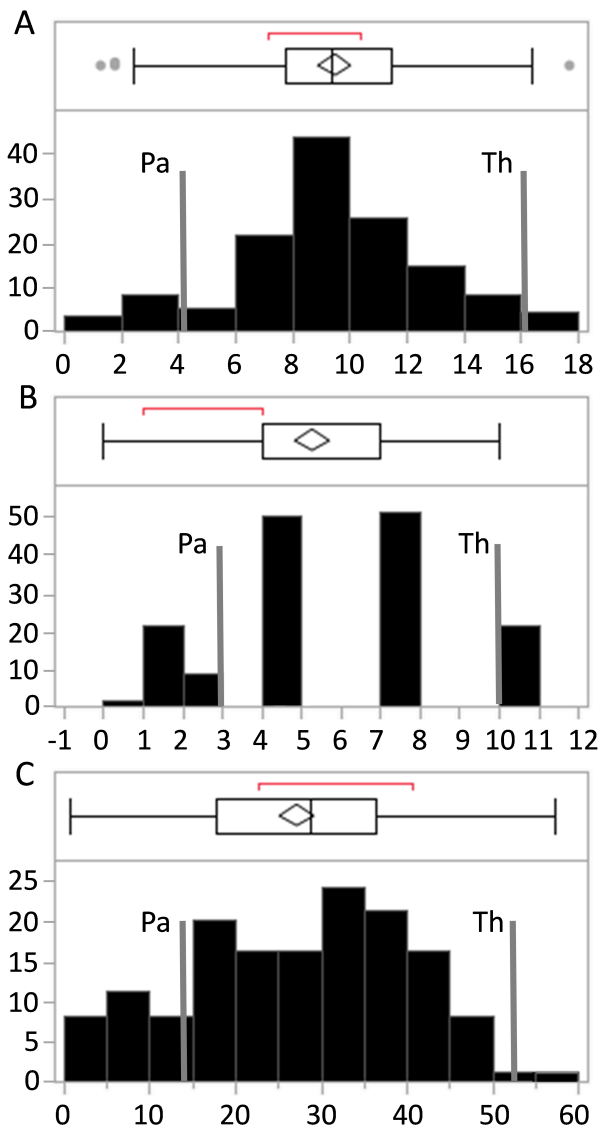


Fig. 2. Distribution of hmc (A), converted rating scale (B) and uredospore generation per infection site (C) within the F_2 population. Observations of the resistant parental line Pavon 76 (Pa) and susceptible line Thatcher (Th) are shown as grey lines

Mapping and QTL analysis

The final linkage map comprised 3063 markers and had a total length of 2563.43 cM. Each chromosome had between 20 (chromosome 7D) and 421 (chromosome 5B) markers and a length of 42 to 202 cM (Table 2). The D-genome of wheat showed the lowest recombination frequency and lowest number of markers per chromosome. Surprisingly, on chromosome 5DL, 1AS and 2BS. On chromosome 2B, reduced uredospore pustule generation (LOD = 2.75, threshold = 2.4, and explained variance = 8.1; Fig. 3B) could be detected in a physical region between 763 and 767 Mbp (now named QTL_2B). On chromosome 5D, no region was associated with any resistance reaction (Fig. 3C). The leaf rust isolate 4326 was virulent against *Lr10* and *Lr13*. In addition to the QTL on chromosome 2B, two other QTLs could be detected on chromosomes 4D (now named QTL_4D, Fig. 3C) and 7D (now named QTL_7D, Fig. 3D). The QTL on chromosome 4D showed a peak at 24.19 cM, where 7 markers were physically located in a 95 Mbp segment between 455 Mbp and 455 Mbp. A single QTL for hmc

Neither QTL analysis based on either trait resulted in any QTL on chromosome 1B, which is where *Lr46* is located in Pavon 76 (Fig. 3A). A maximum LOD of 2.39, explaining 7.8% of the

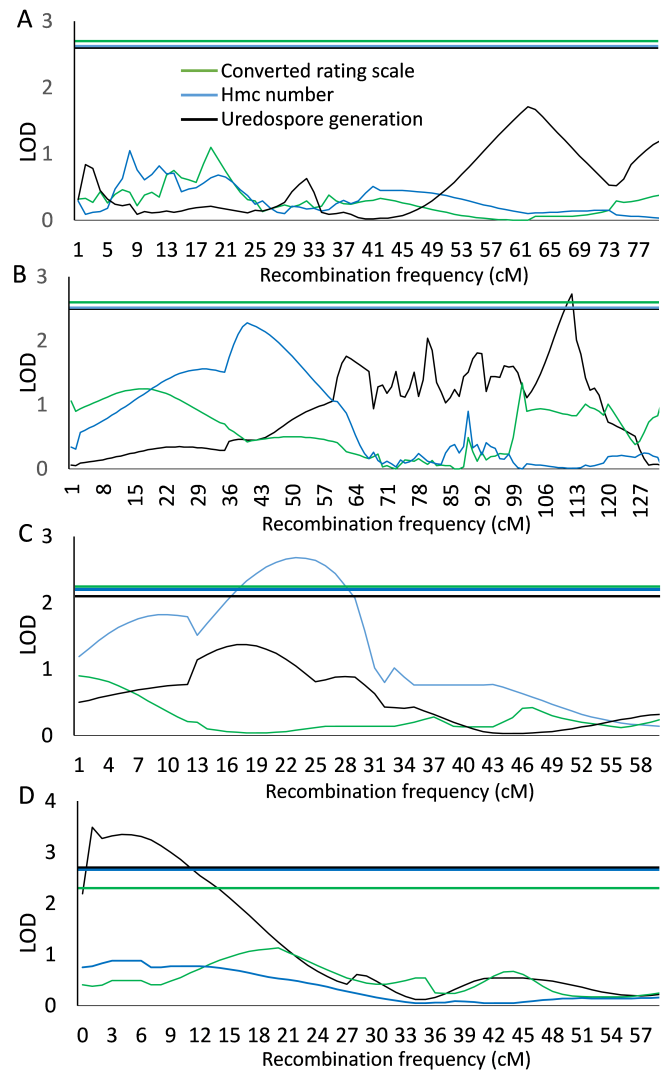


Fig. 3. Logarithm of the odds (LOD) for association of the converted rating scale (coloured in green), hmc number (coloured in blue), and uredospore number (coloured in black) traits on chromosomes 1B (A), known for Apr *Lr46*; 2B (B); 4D (C); and 7D (D). Horizontal lines display global significance thresholds for each trait (coloured as mentioned above).

phenotypic variance, at 83.49 cM was slightly but not significantly associated with the reduced hmc number at 72 hai (threshold using permutation procedure = 2.5). However, no association with the converted rating scale or uredospore generation could be observed (Fig. 3A). Other possible resistance genes, such as *Lr1*, *Lr10* and *Lr13*, which are known in the resistant parent Pavon F76, are located on chromosomes 5DL, 1AS and 2BS. On chromosome 2B, reduced uredospore pustule generation (LOD = 2.75, threshold = 2.4, and explained variance = 8.1; Fig. 3B) could be detected in a physical region between 763 and 767 Mbp (now named QTL_2B). On chromosome 5D, no region was associated with any resistance reaction (Fig. 3C). The leaf rust isolate 4326 was virulent against *Lr10* and *Lr13*. In addition to the QTL on chromosome 2B, two other QTLs could be detected on chromosomes 4D (now named QTL_4D, Fig. 3C) and 7D (now named QTL_7D, Fig. 3D). The QTL on chromosome 4D showed a peak at 24.19 cM, where 7 markers were physically located in a 95 Mbp segment between 455 Mbp and 455 Mbp. A single QTL for hmc

Table 2. Average genetic distance between markers, the maximum distance within each chromosome, and the number of markers per chromosome

Chromosome	Number of markers	Average distance (cM)	Maximum distance (cM)	Length (cM)
1A	141	1.32	33.17	184.13
1B	185	0.49	20.31	83.16
1D	93 + 45 ^a	0.86	30.34	79.24
2A	237	0.59	30.94	138.59
2B	148	0.92	32.63	135.32
2D	13 + 18 ^a	7.08	19.75	73.12
3A	221	1.47	20.68	164.86
3B	177	0.73	29.30	126.50
3D	25 + 3 ^a	1.77	41.83	42.25
4A	215	1.27	17.80	147.00
4B	155	0.65	10.24	100.40
4D	14 + 6 ^a	3.17	16.54	60.19
5A	223	1.55	29.30	201.67
5B	421	0.97	20.70	161.99
5D	18 + 10 ^a	4.656	24.58	98.49
6A	169	0.66	14.66	109.62
6B	31 + 14 ^a	0.50	25.03	123.19
6D	43 + 37 ^a	0.43	25.54	190.64
7A	121	2.77	17.74	168.15
7B	271	2.06	20.55	113.06
7D	16	3.87	20.48	61.86
Sum/Average	2937/3070 ^a	1.799	23.910	2563.43

^a Unmapped on consensus maps but successfully added by linkage mapping

number could be identified on chromosome 7D, and QTLs on chromosomes 2B and 7D were found for reduced generation of uredospores. QTL_7D showed the highest LOD of 3.62, was located between 58 Mbp and 59 Mbp, included 7 associated SNP markers, and explained up to 11.5% of phenotypic variance (Fig. 3D). Detailed information about markers and QTLs are available in supplementary Table S2 and Fig. S.

Identification of candidate genes

For the identified QTLs, markers could be physically mapped according to the genetic map in the peak region of each QTL. The identification of candidate genes using BLAST exclusive to wheat was very helpful for excluding already sequenced *Lr* genes, e.g., *Lr34* and *Lr67*. Within QTL_2B, a protein kinase and mRNA coding for a transporter gene (GO term transmembrane transporter activity) was identified (Table 3). Within QTL_4D, a calcineurin B-like protein kinase-like gene, which is involved in ATP binding protein phosphorylation, was identified. On chromosome 7D, within QTL_7D, an mRNA coding for an uncharacterized protein from which the largest domain belongs to the protein kinase-like domain superfamily was identified (Table 3).

Discussion

Leaf rust infections reduce the yield and grain quality of wheat worldwide. Resistant cultivars are essential for the control of leaf rust and help to reduce the use of fungicides. A prerequi-

site for breeding resistant varieties is the genetic characterization of resistance, and the identification and use of closely linked or gene-specific molecular markers can speed up the breeding process (Gil et al., 2019).

More than 80 *Lr* genes have been described, but only a few resistance genes are quantitative, non-race-specific and effective at adult plant development stages. One of these quantitative resistance genes, *Lr46*, which can be found in cv. Pavon F76 was first detected by Singh et al. (1998) on chromosome 1B and described as slow rusting resistance. This position was confirmed in several studies, such as Martinez et al. (2001) and William et al. (2003). However, cv. Pavon F76 also carries the *Lr* genes *Lr1*, *Lr10* and *Lr13*, which can be detected by virulence/avirulence studies (McIntosh et al., 1995). These *Lr* genes are broken down by virulent races, including isolate 4136. Using this isolate at the seedling stage, no QTL was detected on chromosome 1B. Since *Lr46* is considered an APR gene, effective differentiation and recognition of APR at the seedling stage is impossible. However, the parental lines of our population were highly differentiated at the seedling stage, and a nearly normal distribution of infection levels could be observed. Thus, leaf rust resistance, independent of *Lr1*, *Lr10*, *Lr13* and *Lr46*, must have caused reduced leaf rust symptoms. Due to the seedling stage approach established in the present study, the QTLs identified here correspond to early expression, and there are *Lr* genes, which are quantitatively expressed at the seedling stage (Zetzsche et al., 2019; Kthiri et al., 2018). Quantitative expression of the resistance genes was detected in this

Table 3. Potential candidate genes in respective QTLs

QTL	Description (hit to <i>T. aestivum</i>)	Largest domain hit	E-value	GO term	GO code	Start*	End*	Peak markers
QTL_2B	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120 (LOC123042568)	Bulb-type lectin domain superfamily	0	Protein kinase activity ATP binding	GO:0004672 GO:0005524	1221953	1228220	Lr46_F2_7882/ BS00080318_51
	Protein DETOXIFICATION 31-like (LOC123042573)	Multi anti-microbial extrusion protein	0	Drug transmembrane transporter activity Drug transmembrane transport Transmembrane transport	GO:0015238 GO:0006855 GO:0055085	1612641	1617572	
	CBL-interacting protein kinase 22-like (LOC123047257)	Calcium/calmodulin-dependent/calcium-dependent protein kinase	0	Protein kinase activity ATP binding signal transduction	GO:0004672 GO:0005524 GO:0007165	2949832	2951133	
QTL_4D	Cysteine-rich receptor-like protein kinase (<i>Stb16q</i>) genes	Cysteine-rich receptor kinase	0	Protein kinase activity ATP binding protein phosphorylation	GO:0004672 GO:0005524 GO:0006468	52798	54702	Lr46_F2_6718/ D_GDS7LZN02FO W89_230
QTL_7D	Uncharacterized protein slr1919-like (LOC123165622)	Protein kinase-like domain superfamily	0	No GO term	No GO code	51405	58488	Lr46_F2_7165/ RAC875_ c29314_291

study for the traits hmc number and uredospore generation. Our study showed that these phenotyping methods were suitable for detecting quantitative resistance genes at the seedling stage. Phenotyping based on countable infection structures of the pathogen has been shown to be suitable to predict resistance genes that are effective at later plant development stages, including APR (Beukert et al., 2021). Surprisingly, the conversion of a nominal rating scale (Rollar et al., 2021) resulted in no detection of QTLs in our study. QTLs for a reduced generation of uredospores could be identified on chromosomes 2B (QTL_2B) and 7D (QTL_7D). On chromosome 2B, QTL_2B was detected in a physical region that is not known as the genetic background for the *Lr* genes *Lr13*, *Lr16* and *Lr35*. *Lr13* was mentioned by McIntosh et al. (1995) as race-specific and derived originally from the Exchange and Frontana varieties; *Lr16* was derived from the Selkirk variety; and *Lr35* was introgressed from *Triticum speltoides* (Seyfarth et al., 1999). These varieties or genetic resources are not part of the Pavon F76 pedigree (Vicam-71//Ciano-67/Siete-Cerros-66/3/Kalyasona/Bluebird, Zeven, 1976). Seedling resistance traits and QTLs independent of known *Lr* genes were found on chromosomes 1A, 2B, and 7D. To identify possible candidate genes involved in defence reactions, the QTLs obtained in our study were compared to similar QTLs found in previous studies based on chromosome location, genetic position and physical position (Table 4). The region of QTL_2B is more than 600 Mbp from known *Lr* genes, and resistance gene *Lr35* is located on chromosome 4DS. On chromosome 4D, *Lr67* has been described and sequenced, and it is located at 412.7 Mbp. Further QTLs identified in a MAGIC

population from elite cultivars were found at 455.8 Mbp (Rollar et al., 2021). These QTLs overlap with the QTLs from our study (Table 4). The *Lr* genes *Lr19* and *Lr34* are reported to be located on chromosome 7D. QTL_7d is located approximately 1 Mbp away from the resistance gene *Lr34* but more than 500 Mbp away from the probable position of *Lr19* (Table 4). Due to the genetic map and the closely linked markers within each QTL, a search using the physical reference genome could narrow down the physical regions to <100000 bp (QTL_4D) and <1 Mbp (QTL_7D) or <4 Mbp (QTL_2B).

Within QTL regions, mRNAs coding for two protein kinases and transporter proteins could be identified. Protein kinase 22 is a CBL-interacting protein kinase that is involved in calcium signalling as part of the response to stresses and oxidative bursts or hypersensitive reactions (Xiao et al., 2013; Du et al., 2009). Lectin-receptor-kinases are also emerging as potential components and regulators of PRR (pattern recognition receptors), are known as the first level of defence that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and are differentially expressed in leaf rust interactions with host plants carrying *Lr57* (Yadav et al., 2016). One QTL signal was identified exclusively for hmc on chromosome 4D and could be physically narrowed down to approximately 0.5 Mbp. This QTL showed a direct hit to a hypothetical protein that is also known as cysteine-rich receptor-like protein kinase (*Stb16q*) and in barley as a seronin/threonine kinase. This gene has been mentioned in several studies as conferring broad spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch (Saintenac et al., 2021); it blocks fungal development at the level of infectious hyphae resulting from few successful

Table 4. Overview of known *Lr* genes or QTLs in proximity to the detected QTLs.

Chr.	QTL and <i>Lr</i> genes on chr.	Traits	References	Physical position (Mbp)*	Genetic position (cM)	LOD (peak explained variance %)
2B	QTL_2B	Uredospores 7 dai	Qiu et al., 2020	763.84 to 767.02	109.93 to 111.06	2.75
	QTL peak		Kassa et al., 2017	763.84	110.49	8.10
	<i>Lr13</i>		Pinto da Silva, 2018	153.00 to 159.00		
	<i>Lr16</i>			6.26		
	<i>Lr35</i>			2B5		
4D	QTL_4D	Hmc number 72 hai	Rollar et al., 2021	455.25 to 455.34	23.86 to 24.19	2.68
	QTL peak		Rollar et al., 2021	455.34	24.19	10.30
	QTL			455.80		
	<i>Lr67</i>			412.70		
7D	QTL_7D	Uredospores 7 dai	Fatima et al., 2020	58.50 to 59.09	0.24 to 0.73	3.62
	QTL peak		Krattinger et al., 2009	58.86	0.72	11.50
	<i>Lr19</i>			605.88 to 608.09		
	<i>Lr34</i>			48.90 to 51.00		

*Blasted to the reference genome (Chinese Spring)

penetration events in the substomatal cavity of primary-infected stomata (Battache et al., 2022). This is also a crucial stage of rust fungus infection. An effective defence reaction at this infection stage would inhibit the generation of hmc and haustoria (for a review of the infection process, see Bolton et al., 2008). On chromosome 4D, Rollar et al. (2021) found several QTLs and *Lr67* in crosses with Chinese genotypes. However, the sequence of this resistance gene was more than 12 Mbp away from the QTL found in our study. The most significant reliable QTL showed a LOD of more than 3.6 on chromosome 7D and explained more than 11% of the phenotypic variance. Genotypes with the resistance allele showed reduced uredospore production. Several resistance genes are located on chromosome 7D, including the quantitative resistance *Lr34*, which codes for an ABC transporter (Krattinger et al., 2009). The mRNA coding for an uncharacterized protein slr1919 has also been functionally characterized as an ABC transporter (Dadshani, 2018), but it shows a weak relationship with the sequence of *Lr34* (86% identity in a range of 29 bp from >100000 bp).

In conclusion, in this study, three leaf rust resistance QTL regions were found on 3 chromosomes. We found QTLs on chromosomes where other seedling resistance genes have been found, such as *Lr13*, *Lr16*, and *Lr35* on chromosome 2B; *Lr67* on chromosome 4D; and *Lr19* and *Lr34* on chromosome 7D. We were able to rule these genes out and detect previously unknown resistance alleles. Through the use of innovative phenotyping methodology, we show that already described and analysed genotypes can carry unknown resistance genes with minor effects that could be used for breeding to increase the resistance level. The SNP markers identified in our study can be integrated into the breeding process for quantitative resistance in the future.

Conflicts of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

Supplementary information

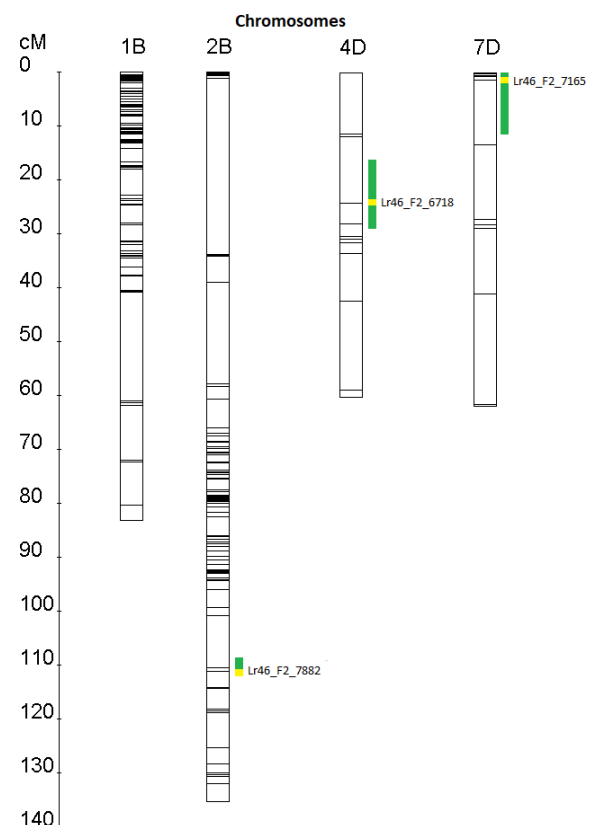


Fig. S. Linkage map of the chromosomes 1B (known for *Apr Lr46*) and 2B, 4D and 7D. QTL regions are indicated by green areas to the right of the chromosomes. The region with the highest LOD is highlighted in yellow, the marker within is shown.

The supplementary Tables S1 and S2 for this article can be found online at <https://doi.org/10.5073/JfK.2022.11-12-07>.

Table S1. Phenotypic data which have been used as traits for the calculation of QTL. Haustorial mother cells are abbreviated as hmc, hours after inoculation as hai. Missing data are represented by asterisks

Table S2. Analysis shown for the chromosomes and traits with significant QTL. QTL regions are marked in green, peaks are marked in yellow. Logarithm of the odds is abbreviated by "LOD", the variance in phenotype explained is abbreviated by "% Expl.", genotypic information coefficient is abbreviated by "GIC", number of iterations needed to reach the tolerance criterium by "# Iter", estimated value of the distribution of the quantitative trait associated with the A, H or B genotype by " μ_A ", " μ_H ", " μ_B ".

References

- Alaux, M., J. Rogers, T. Letellier, R. Flores, F. Alfama, C. Pomier, N. Mohellibi, S. Durand, E. Kimmel, C. Michotey, C. Guerche, M. Loaec, M. Lainé, D. Steinbach, F. Choulet, H. Rimbart, P. Leroy, N. Guilhot, J. Salse, C. Feuillet, International Wheat Genome Sequencing Consortium, E. Paux, K. Eversole, A.F. Adam-Blondon, H. Quesneville, 2018:** Linking the International Wheat Genome Sequencing Consortium bread wheat reference genome sequence to wheat genetic and phenomic data. *Genome Biology* **19** (1), 111, DOI: 10.1186/s13059-018-1491-4.
- Battache, M., M.H. Lebrun, K. Sakai, O. Soudière, F. Cambon, T. Langin, C. Sautenac, 2022:** Blocked at the Stomatal Gate, a Key Step of Wheat Stb16q-Mediated Resistance to *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science* **13**, 921074, DOI: 10.3389/fpls.2022.921074.
- Beukert, U., N. Pfeiffer, E. Ebmeyer, V. Hinterberger, S. Lueck, A. Serfling, F. Ordon, A.W. Schulthess, J.C. Reif, 2021:** Efficiency of a Seedling Phenotyping Strategy to Support European Wheat Breeding Focusing on Leaf Rust Resistance. *Biology (Basel)*, **10** (7), 628. DOI: 10.3390/biology10070628.
- Bolton, M.D., J.A. Kolmer, D.F. Garvin, 2008:** Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* **9**, 563–575, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x.
- Cobo, N., L. Pflüger, X. Chen, J. Dubcovsky, 2018:** Mapping QTL for Resistance to New Virulent Races of Wheat Stripe Rust from Two Argentinean Wheat Cultivars. *Crop Science* **58**, 2470–2483, DOI: 10.2135/cropsci2018.04.0286.
- Dadshani, S.A.W., 2018:** Genetic and physiological characterization of traits related to salinity tolerance in an advanced backcross population of wheat. Dissertation, Universität Bonn, 217 S.
- Du, L.Q., G.S. Ali, K.A. Simons, J.G. Hou, T.B. Yang, A.S.N. Reddy, B.W. Poovaiah, 2009:** Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457** (7233), 1154–U1116, DOI: 10.1038/nature07612.
- Fatima, F., B. McCallum, C. Pozniak, C.W. Hiebert, C. McCartney, G. Fedak, F. You, S. Cloutier, 2020:** Identification of new leaf rust resistance loci in wheat and wild relatives by array-based SNP genotyping and association genetics. *Frontiers in Plant Science* **11**, 583738, DOI: 10.3389/fpls.2020.583738.
- Figlan, S., K. Ntushelo, L. Mwadzingeni, T. Terefe, T.J. Tsilo, H. Shimelis, 2020:** Breeding Wheat for Durable Leaf Rust Resistance in Southern Africa: Variability, Distribution, Current Control Strategies, Challenges and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science* **11**, 549, DOI: 10.3389/fpls.2020.00549.
- Flor, H.H., V.E. Comstock, 1971:** Flax Cultivars with multiple Rust-conditioning Genes. *Crop Science* **11**, 64–66, DOI: 10.2135/cropsci1971.0011183X001100010021x.
- Gil, J., D. Solarte, J.D. Lobaton, V. Mayor, S. Barrera, C. Jara, S. Beebe, B. Raatz, 2019:** Fine-mapping of angular leaf spot resistance gene Phg-2 in common bean and development of molecular breeding tools. *Theoretical and Applied Genetics* **132** (7), 2003–2016, DOI: 10.1007/s00122-019-03334-z.
- Goyeau, H., R. Park, B. Schaeffer, C. Lannou, 2006:** Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in french wheat leaf rust populations. *Phytopathology* **96** (3), 264–273, DOI: 10.1094/PHYTO-96-0264.
- Hanzalová, A., V. Dumalášová, O. Zelba, 2021:** Virulence in the *Puccinia triticina* population in the Czech Republic and resistance genes in registered cultivars 1966–2019. *Euphytica* **217**, 1–4, DOI: 10.1007/s10681-020-02733-4.
- Herrera-Foessel, S.A., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, J. Crossa, A. Djurle, J. Yuen, 2008:** Genetic Analysis of Slow-Rusting Resistance to Leaf Rust in Durum Wheat. *Crop Science* **48**, 2132–2140, DOI: 10.2135/cropsci2007.11.0606.
- Kassa, M.T., F.M. You, C.W. Hiebert, C.J. Pozniak, P.R. Fobert, A.G. Sharpe, J.G. Menzies, D.G. Humphreys, N.R. Harrison, J.P. Fellers, B.D. McCallum, C.A. McCartney, 2017:** Highly predictive SNP markers for efficient selection of the wheat leaf rust resistance gene Lr16. *BMC Plant Biololgy* **17**, 45, DOI: 10.1186/s12870-017-0993-7.
- Kosambi, D.D., 1944:** The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Annals of Eugenics* **12**, 172–175, DOI: 10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x.
- Krattinger, S.G., E.S. Lagudah, W. Spielmeier, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H. McFadden, E. Bossolini, L.L. Selter, B. Keller, 2009:** A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* **323** (5919), 1360–1363, DOI: 10.1126/science.1166453.
- Kthiri, D., A. Loladze, P.R. MacLachlan, A. N'Diaye, S. Walkowiak, K. Nilsen, S. Dreisigacker, K. Ammar, C.J. Pozniak, 2018:** Characterization and mapping of leaf rust resistance in four durum wheat cultivars. *PLoS One* **13** (5), e0197317, DOI: 10.1371/journal.pone.0197317.
- Lagudah, E.S., 2009:** Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica* **179**, 81–91, DOI: 10.1007/s10681-010-0336-3.
- Lillemo, M., B. Asalf, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, X.M. Chen, Z.H. He, A. Bjørnstad, 2008:** The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theoretical and Applied Genetics* **116** (8), 1155–1166, DOI: 10.1007/s00122-008-0743-1.
- Lowe, I., L. Jankuloski, S. Chao, X. Chen, D. See, J. Dubcovsky, 2011:** Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American

- rices of stripe rust in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **123** (1), 143-157, DOI: 10.1007/s00122-011-1573-0.
- Martinez, F., R.E. Niks, R.P. Singh, D. Rubiales, 2001:** Characterization of Lr46, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* **135** (2-3), 111-114, DOI: 10.1111/j.1601-5223.2001.00111.x.
- McIntosh, R.A., C.R. Wellings, R.F. Park, 1995:** *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. East Malbourne, Australia, CSIRO, ISBN 0 643 05428 6.
- Numa, H., T. Itoh, 2014:** MEGANTE: A Web-based System for Integrated Plant Genome Annotation. *Plant and Cell Physiology* **55** (1), e2, DOI: 10.1093/pcp/pct157.
- Pinto da Silva, G.B., C.M. Zanella, J.A. Martinelli, M.S. Chaves, C.W. Hiebert, B.D. McCallum, L.A. Boyd, 2018:** Quantitative trait loci conferring leaf rust resistance in hexaploid wheat. *Phytopathology* **108**, 1344–1354, DOI: 10.1094/PHYTO-06-18-0208-RVW.
- Qiu, L., H. Wang,, Y. Li, W. Wang, Y. Liu, J. Mu, M. Geng, W. Guo,, Z. Hu, J. Ma, Q. Sun, C. Xie, 2020:** Fine Mapping of the Wheat Leaf Rust Resistance Gene LrLC10 (Lr13) and Validation of Its Co-segregation Markers. *Frontiers in Plant Science* **11**, 470, DOI: 10.3389/fpls.2020.00470.
- Qureshi, N., H.S. Bariana, P. Zhang, R. McIntosh, U.K. Bansal, D. Wong, M.J. Hayden, J. Dubcovsky, M. Shankar, 2018:** Genetic Relationship of Stripe Rust Resistance Genes Yr34 and Yr48 in Wheat and Identification of Linked KASP Markers. *Plant Disease*, **102** (2), 413-420, DOI: 10.1094/PDIS-08-17-1144-RE.
- Rollar, S., A. Serfling, M. Geyer, L. Hartl, V. Mohler, F. Ordon, 2021:** QTL mapping of adult plant and seedling resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) wheat population. *Theoretical and Applied Genetics* **134**, 37-51, DOI: 10.1007/s00122-020-03657-2.
- Rosewarne, G.M., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H.H. William, S. Bouchet, S. Cloutier, H. McFadden, E.S. Lagudah, 2006:** Leaf tip necrosis, molecular markers and beta1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. *Theoretical and Applied Genetics* **112** (3), 500-508, DOI: 10.1007/s00122-005-0153-6.
- Saintenac, C., F. Cambon, L. Aouini, E. Verstappen, S.M.T. Ghaffary, T. Poucet, W. Marande, H. Berges, S. Xu, M. Jaouannet, B. Favery, J. Alassimone, A. Sánchez-Vallet, J. Faris, G. Kema, O. Robert, T. Langin, 2021:** A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch. *Nature Communications* **12** (1), 433, DOI: 10.1038/s41467-020-20685-0.
- Serfling, A., I. Krämer, V. Lind, E. Schliephake, F. Ordon, 2011:** Diagnostic value of molecular markers for Lr genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 559-575, DOI: 10.1007/s10658-011-9778-2.
- Seyfarth, R., C. Feuillet, G. Schachermayr, M. Winzeler, B. Keller, 1999:** Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene Lr35 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **99** (3-4), 554-560, DOI: 10.1007/s001220051268.
- Singh, R.P., A. Mujeeb-Kazi, J. Huerta-Espino, 1998:** Lr46: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* **88** (9), 890-894, DOI: 10.1094/PHYTO.1998.88.9.890.
- Stein, N., G. Herren, B. Keller, 2001:** A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120**, 354-356, DOI: 10.1046/j.1439-0523.2001.00615.x.
- Suenaga, K., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H.M. William, 2003:** Microsatellite markers for genes Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* **93** (7), 881-890, DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.7.881.
- Wang, M., X. Chen, 2017:** Stripe Rust Resistance. In: Chen, X., Z. Kang (Hrsg.) *Stripe rust*. Dordrecht, the Netherlands, Springer, 353-558, ISBN: 978-94-024-1111-9.
- Wang, S., D. Wong, K. Forrest, A. Allen, S. Chao, B.E. Huang, M. Maccaferri, S. Salvi, S.G. Milner, L. Cattivelli, A.M. Mastrolongo, A. Whan, S. Stephen, G. Barker, R. Wieseke, J. Plieske, International Wheat Genome Sequencing Consortium; M. Lillemo, D. Mather, R. Appels, R. Dolferus et al., 2014:** Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 787-796, DOI: 10.1111/pbi.12183.
- Wang, Y., Q. Wang, H. Huang, W. Huang, Y. Chen, P.B. McGarvey, C.H. Wu, C.N. Arighi, UniProt Consortium, 2021:** A crowdsourcing open platform for literature curation in UniProt. *Plos Biology* **19** (12), e3001464, DOI: 10.1371/journal.pbio.3001464.
- Wen, W., Z. He, F. Gao, J. Liu, H. Jin, S. Zhai, Y. Qu, X. Xia, 2017:** A high-density consensus map of common wheat integrating four mapping populations scanned by the 90K SNP array. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1389, DOI: 10.3389/fpls.2017.01389.
- William, M, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, S. O. Islas, D. Hoisington, 2003:** Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene Lr46 and its association with stripe rust resistance gene Yr29 in wheat. *Phytopathology* **93** (2), 153-159, DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.2.153.
- Xiao, J., X. Jin, X. Jia, H. Wang, A. Cao, W. Zhao, H. Pei, Z. Xue, L. He, Q. Chen, X. Wang, 2013:** Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai. *BMC Genomics* **14**, 197, DOI: 10.1186/1471-2164-14-197.
- Yadav, I.S., A. Sharma, S. Kaur, N. Nahar, S.C. Bhardwaj, T.R. Sharma, P. Chhuneja, 2016:** Comparative Temporal Transcriptome Profiling of Wheat near Isogenic Line Carrying Lr57 under Compatible and Incompatible Interactions. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1943, DOI: 10.3389/fpls.2016.01943.

Zetsche, H., A. Serfling, F. Ordon, 2019: Breeding progress in seedling resistance against various races of stripe and leaf rust in European bread wheat. *Crop Breeding, Genetics and Genomics* **1**, e190021, DOI: 10.20900/cbgg20190021.

Zeven, A.C., 1976: Seventh supplementary list of wheat varieties classified according to their genotype for hybrid necrosis and geographical distribution of Ne-genes. *Euphytica* **25**, 255-276, DOI: 10.1007/BF00041556.

Christian Jung 

Induced mutations for studying Mendelian inheritance

Induzierte Mutationen zum Studium der Mendelschen Vererbung

Affiliation

Kiel University (CAU), Plant Breeding Institute, Kiel, Germany.

Correspondence

Prof. Dr. Christian Jung, Kiel University (CAU), Plant Breeding Institute, Olshausenstrasse 40, 24118 Kiel, Germany, email: c.jung@plantbreeding.uni-kiel.de

Abstract

All genetic variation results from mutations. Orders of magnitude can increase mutation rates by applying irradiation or chemical treatment. Genome editing offers new perspectives for mutation induction because mutation sites can be precisely targeted even within large plant genomes for the first time. Generally, transgenes after genetic engineering also result in new genetic variation. All single-gene mutations after genome editing, transgenesis, or chemical mutagenesis are inherited according to the Mendelian rules. Thus, offspring can be phenotypically classified into discrete classes, whereas polygenic inheritance results in continuous variation. However, genome-wide studies have blurred the boundaries between the two in recent years. Single-gene knockout mutations can be inherited non-Mendelian, mainly if transcription factor genes are targeted. Even classical Mendelian traits are now believed to be controlled by numerous genes. Therefore, Mendelian genetics should be limited to genetic variation, whereas phenotypic variation should be considered polygenic.

Keywords

mutagenesis, CRISPR-Cas, genome editing, TILLING, TILLING by sequencing, polyploidy

Zusammenfassung

Sämtliche genetische Variation resultiert aus Mutationen. Die Mutationsraten können durch Bestrahlung oder chemische Behandlung um mehrere Größenordnungen erhöht werden. Die Genom-Editierung bietet neue Perspektiven für die Mutationsinduktion, da erstmals Zielsequenzen auch innerhalb großer Pflanzengenome präzise anvisiert werden können. Im weitesten Sinne sind auch Transgene, die mit gentechnischen Verfahren in ein Genom eingeschleust wurden, Mutationen, die zu neuer genetischer Variation führen. Alle Einzelgen-Mutationen nach Genom-Editierung, Transgenese oder chemischer Mutagenese werden nach den Mendelschen Regeln vererbt. Die Nachkommen können phänotypisch in

diskrete Klassen eingeteilt werden, während polygene Vererbung zu kontinuierlicher Variation führt. Aber aufgrund genomweiter Studien ist eine derartige Einteilung nicht mehr gerechtfertigt. Knockout-Mutationen einzelner Gene können auf eine nicht-mendelnde Weise vererbt werden, vor allem, wenn Gene mutagen verändert werden, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Sogar klassische Mendel-Merkmale werden nach heutiger Kenntnis heute von zahlreichen Genen kontrolliert. Daher sollte die Mendelsche Genetik auf die genetische Variation beschränkt werden, während die phänotypische Variation als polygen angesehen werden sollte.

Stichwörter

Mutationen, Mutagenese, CRISPR-Cas, genome editing, TILLING, TILLING by sequencing, Polyploidie

Type and the origin of mutations

All genetic variation is caused by mutations that occur randomly and spontaneously. There are different types of mutations, ploidy mutations affecting whole genomes, chromosome mutations such as insertions/deletions, translocations, and inversions, and single-gene or single-nucleotide mutations. Mutations can occur spontaneously and can be induced by chemicals or by irradiation. Thanks to genome research, there is a good understanding of how often mutations occur spontaneously over generations. The frequency of spontaneous natural mutagenesis ranges from 10^{-8} – 10^{-9} per bp (Ossowski et al., 2010; Pixley et al., 2022). In this article, I will refer to induced mutations on the single nucleotide or single-gene level.

Since the early 20th century, it has been known that mutation rates can be drastically increased by gamma irradiation or fast neutron irradiation (Jung & Till, 2021). The mutations induced range from single nucleotide deletions to large chromosome rearrangements. In contrast, chemicals such as ethyl-methane-sulfonate (EMS) cause single-nucleotide mutations. Induced mutations have been used in plant breeding for more than 70 years. The number of mutations within a single genome can



(c) The author 2022

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

be enormous. For example, after whole-genome sequencing of a rapeseed EMS mutant population, each M_2 plant was found to carry 39,000 mutations on average (unpublished data).

Recently, the mutation paradigm has been changed. Genome editing enables precise mutation induction within a sequence previously selected. The CRISPR-Cas method is frequently applied to induce mutations between one and a few hundred nucleotides (Zhu et al., 2020). Further refinement of this method led to precise base changes (base editing) and sequence incorporation (gene replacement). In a broader context, genetic modification after transformation results in mutations by adding a new gene to a plant genome.

Mendelian inheritance of random mutations

Mutations affecting single genes in a diploid plant follow the Mendelian rules of inheritance. However, a clear distinction should be made between genotypic and phenotypic inheritance. As long as the mutation does not cause lethality or reduced fitness, it is inherited as a new allele. For example, in an M_2 family derived from a heterozygous M_1 plant, 75% of the plants carry the mutant allele disregarding the chimeric nature of M_1 plants (Figure 1).

The Mendelian rules set the foundations for mutant screening in the offspring of mutagenized populations. Because mutations within a target gene are rare, thousands of M_2 families need to be screened phenotypically. The mutant allele can be fixed in the next generation, giving rise to a homozygous mutant line. Unfortunately, mutant screening in polyploid plants is much more complicated because two or more copies of a gene exist. In autopolyploids, they are duplicates with essentially the same function. Therefore, the frequency of homozygotes in an M_2 population depends on the ploidy level. If one allele has been mutagenized (A_m) in an autotetraploid species, completely homozygous plants (quadruplex type, $A_m A_m A_m A_m$) can be found only in the M_3 generation. Suppose we can identify the duplex type in the M_2 ($A_m A_m A_x A_x$), which is only possible by DNA-based genotyping methods. After self-

ing this plant, the quadruple mutant in the M_3 is expected with a frequency of 2.8%. Here, the CRISPR-Cas technology is superior because we can get a quadruple mutant already in the M_1 generation.

In allopolyploid plants, homoeologous gene copies (paralogs) may have undergone neofunctionalization during evolution resulting in altered gene function. Historic duplications within genomes during evolution further complicate genetics. For example, rapeseed (*Brassica napus*) is an allotetraploid species ($2n=4x=38$). As a result of subgenome triplication, each gene of the related Brassica species *Arabidopsis thaliana* is represented by 4-6 copies in *B. napus* (Chalhoub et al., 2014) which severely complicates phenotypic mutant detection because only multiple mutation events give rise to a new phenotype. Therefore, huge M_2 populations must be screened to find a plant with multiple mutation events within the desired genes. For example, in our rapeseed mutant population, a single knockout mutation within a given gene is commonly found among ~500 M_1 offspring. For a double gene mutation, the frequency would decrease to 1 out of 250,000 M_1 plants demonstrating the difficulty in finding multiple mutations by phenotypic screening.

The situation changed drastically with the advent of sequence-based mutant screening methods commonly referred to as TILLING (Targeted Induced Local Lesions in Genomes) (Jung & Till, 2021), where mutations are detected by sequence analysis and not by phenotypic screening. In this way, mutant pyramiding became possible because single mutations from different M_1 plants could be combined by crossing to create multiple mutant genotypes (Braatz et al., 2018; Sashidhar et al., 2020a; Karunaratna et al., 2020). Recently, TILLING-by-sequencing has been applied in wheat (Krasileva et al., 2017) and rapeseed (unpublished data), where the exomes or whole genomes of M_2 plants are sequenced. Within a mutant family carrying the desired mutation, the mutant haplotype frequency is 50%. Consequently, sequencing four plants from each M_2 family is sufficient to find any mutation with a high probability. Typically, the bulked DNA is sequenced, reducing costs by 75% (unpublished data). In conclusion, Mendelian genetics are fundamental for mutant screening either by phenotype or genotype.

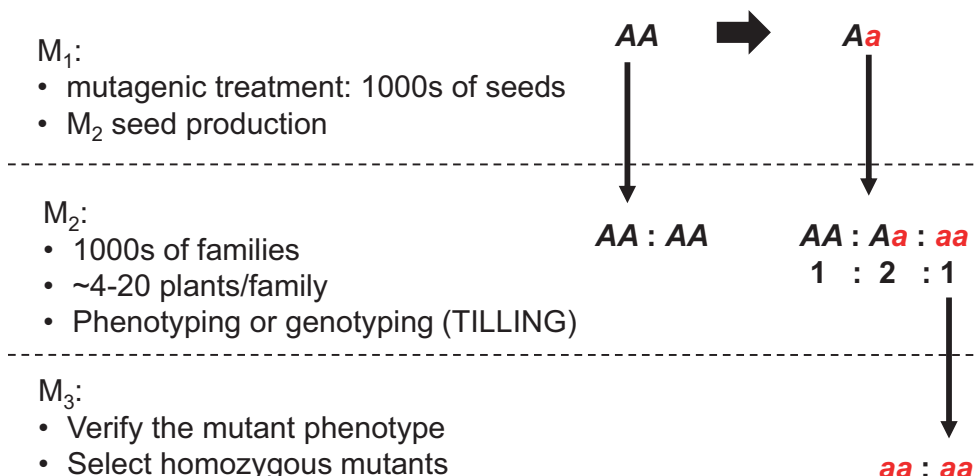


Figure 1. Inheritance of mutant alleles in segregating populations of diploid species.

Mutations by genetic modification

Since the 1980s, gene transfer has become a routine technique for studying gene function and creating new genetic variations in crops. In a broader sense, genetically modified organisms can be regarded as mutants. When the first genetically modified (transgenic) plant was produced in 1983, it was unknown whether the introduced gene was inherited as a Mendelian gene. But soon, it became clear that even transgenes from distantly related species are inherited according to Mendelian rules either as one or >1 gene owing to the number of insertion events once they have been stably incorporated into a host genome. This was the reason for their use in plant breeding because transgenes could be easily introduced to elite lines and selected in offspring generations by standard backcrossing.

In 2012, genome editing (GE) became routine based on the CRISPR-Cas technology. GE caused a shift in paradigm because mutations can be precisely induced at any position in the genome in contrast to *Agrobacterium*-mediated or vector-free gene transfer, where the integration site cannot be predicted. Like random mutations, mutations after GE are inherited as single Mendelian genes. CRISPR-Cas-induced knockout mutations are recessive and inherited according to Mendelian rules for dominant/recessive inheritance. Therefore, the presence of both mutant and wildtype alleles is called 'heterozygosity' in complete correspondence with Mendelian genetics. In a recent study from our lab, a CRISPR-Cas construct was transformed into rapeseed by *Agrobacterium*-mediated gene transfer (Table 1) (Braatz et al., 2017). The target gene *ALCATRAZ* (*ALC*) is involved in valve margin development and, thus, contributes to seed shattering from mature fruits, which before or during harvest, causes yield loss. Knockouts of two *ALC* paralogs resulted in increased pod-shattering resistance. In the T_2 offspring of a single T_1 transformant, the transgene segregated in a 3:1 manner typical for a single transformation event resulting in a hemizygous genotype. In rapeseed, the probability of linkage between transgene and target gene is 1/19. As expected, the transgene was not linked with the two *ALC* genes referred to as 'A' and 'C' (Table 1) because there were non-transgenic plants with all four mutant alleles. Altogether, we found eight out of nine genotypes expected for random segregation. Thus, non-transgenic mutants could be easily selected in the T_2 generation. The two *ALC* genes seg-

regated in a 1:2:1:2:4:2:1:2:1 manner which follows a digenic inheritance with random segregation.

De novo mutations can complicate Mendelian inheritance after GE in subsequent generations. For example, after the knockout of phytic acid synthesis genes in rapeseed by GE, new mutant alleles appeared in the T_2 generation (Sashidhar et al., 2020b). In this case, non-Mendelian inheritance can be explained by the chimeric nature of the T_1 plants and the inability of Cas9 to produce double-strand breaks in the initial transformant. If the Cas9 nuclease does not induce stable mutations in the first generation, it continues cleaving the target sequence in the next generation(s), giving rise to new mutant alleles. However, once the mutation has been 'stabilized' due to the absence of the *Cas9* gene or the alteration of the target sequence, the new mutant alleles are inherited in a Mendelian way. In conclusion, phenotypic studies on CRISPR-Cas mutagenized plants are only valid if homozygosity of the mutant locus has been proven, which gives rise to lines fixed for the mutant alleles (Jung & Till, 2021).

Phenotypic effects

There are different reasons why mutations do not always show the desired phenotypic effect, even in the case of homozygosity at the target locus. Gene redundancy can mask the mutant locus because functional paralogs can substitute its function in polyploids and diploids undergoing one or more genome duplications during evolution. Moreover, suppose the target gene is part of a highly variable genetic and metabolic pathway. In that case, it can be replaced by other genes encoding enzymes or transcription factors with equal or similar functions. In this respect, flowering time regulation can serve as a prime example. There are major flowering time genes whose gene products are important hubs of flowering regulatory pathways, such as the Arabidopsis *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) gene which encodes the florigen necessary for the transformation of the shoot apical meristem into a floral meristem (Blümel et al., 2015). Functional orthologs have been identified in most flowering plants studied so far. From the first glimpse, these are typical Mendelian genes with an apparent phenotype. They had been found after random mutagenesis followed by phenotypic screening (Koornneef et al., 1991). But even in the case of a single copy gene, knockout does not eliminate the competence to flower. Mutants can still perform the floral transition, albeit with a significant de-

Table 1. Inheritance of CRISPR-Cas9 induced mutations in two *BnALC* genes (A, C) of rapeseed. 36 T_2 plants were tested for the presence of the transgene and the CRISPR-Cas induced mutations by PCR. O = observed, E = expected number of plants (Braatz et al., 2018).

	Transgene genotypes			<i>alc</i> genotypes									
	Trans-genic	Non-transg.	Chi ² test ^b	A_2A_2 C_2C_2	A_2A_2 C_2C_3	A_2A_2 C_3C_3	A_2A_3 C_2C_2	A_2A_3 C_2C_3	A_2A_3 C_3C_3	A_3A_3 C_2C_2	A_3A_3 C_2C_3	A_3A_3 C_3C_3	Chi ² test ^c
O	27	9	0	3	4	0	3	14	2	1	6	3	8.52
E ^a	27	9		2.25	4.25	2.25	4.25	9	4.25	2.25	4.25	2.25	

^a: under the assumption that the T_1 parent was non-chimeric (A_2A_3/C_2C_3)

^b: 3:1 segregation, Chi²_(0.999; 2) = 13.82

^c: 1:2:1:2:4:2:1:2:1 segregation, Chi²_(0.999; 8) = 26.12

lay. It is known that other transcription factors and sRNAs can partly substitute *FT*, masking its knockout mutation's effect and shifting the qualitative (Mendelian) into a (semi)quantitative inheritance. If the phenotypic effect is low, the borders between Mendelian and quantitative inheritance vanish (Fig. 2).

This casts doubt on the concept of Mendelian genetics, as outlined in a recent opinion paper (Tautz et al., 2020). In the past years, many studies revealed that single mutations could cause major changes in global transcription profiles which is in line with the fact that a single transcription factor can control hundreds of downstream targets. Tautz et al. (2020) suggested reassessing the infinitesimal inheritance model, which has been the basis of quantitative genetics since Ronald Fisher worked out its statistical foundations in the 1920s. Today, in contrast to previous approaches, QTLs can be precisely localized, and their phenotypic effects can be calculated (Fig. 2). The knockout of a single gene contributing to a quantitative trait, such as in the case of the transcription factors *FT* and *ALC*, does not result in discrete phenotypic classes but increases quantitative variation. In contrast, knocking out a Mendelian gene, such as the *Hs4* gene causing complete resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) in sugar beet by a CRISPR-Cas-induced single nucleotide deletion resulted in complete loss of resistance (Kumar et al., 2021). As a result, the offspring of plants heterozygous at the *Hs4* locus segregated into two distinct phenotypic classes, resistant and susceptible, which is in line with monogenic Mendelian inheritance.

Outlook

In the past years, DNA-based mutant studies have confirmed Mendel's rules. The inheritance of mutant alleles follows the Mendelian rules as long as they are not part of major chromosomal rearrangements. However, genome-wide QTL and global transcription studies have revised our view of the phenotypic inheritance of "Mendelian" phenotypes, which can be much more complex. Transcriptome profiling and functional analysis of transcription factor genes shed new light on the complexity of Mendelian inheritance. While Mendel's rules are still valid regarding genotypic inheritance, they need to be revised to understand the makeup of phenotypes even if single genes control them.

This offers new perspectives for breeding traits of agronomic importance, which seemingly are controlled by polygenes but can be improved by only altering the genotype at a single (e.g., transcription factor) locus as has been suggested for improving yield capacity in rice and other cereals (Wang & Zhang, 2017). Therefore, new allelic variation will be needed. Manipulating quantitative traits by single-gene mutagenesis will be a challenge in the future. Gene transfer and CRISPR-Cas-mediated mutagenesis are already routine for many crops. Unfortunately, these technologies are (still) inaccessible to European breeders who can only exploit existing allelic variation or new variation induced by random mutagenesis (Jung & Till, 2021). This comes with several shortcomings, which whole genome sequencing of mutant populations could partly overcome in combination with genomic background screening.

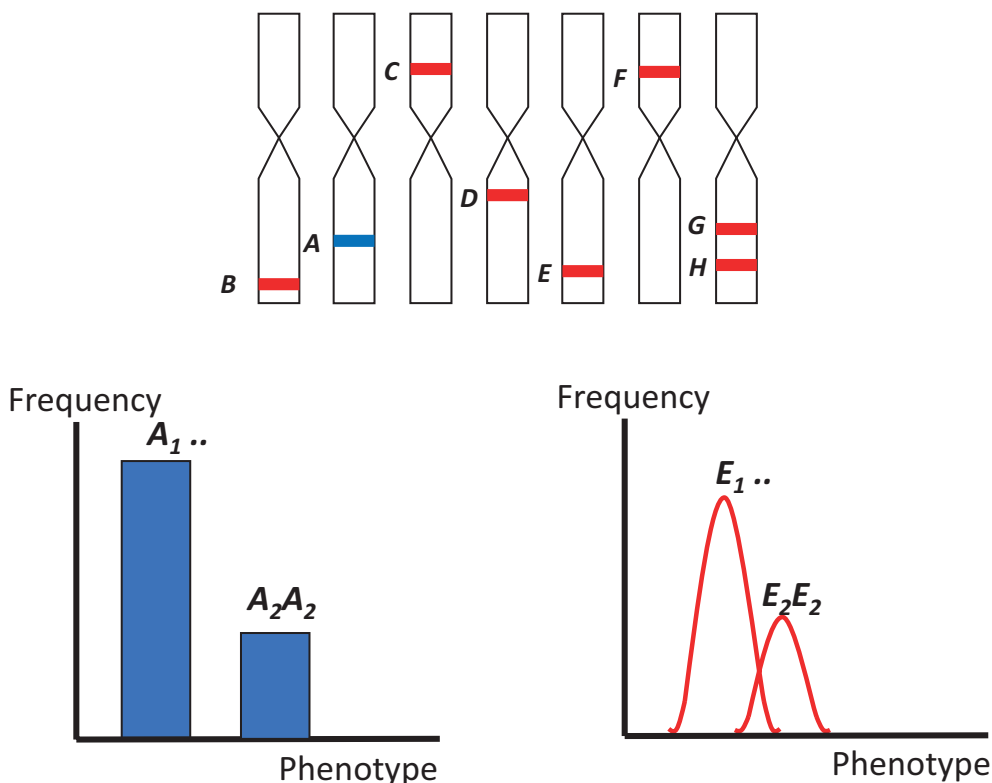


Figure 2. Frequency distributions and phenotypic values in segregating populations with qualitative (blue) and quantitative (red) inheritance. *A* is a Mendelian gene with complete dominance controlling a phenotype ($h^2 = 1$). *E* is a major QTL with partial dominance controlling a phenotype together with six other QTLs and depending on the environment ($h^2 < 1$).

Conflicts of interest

The author declares that he does not have any conflicts of interest.

References

- Blümel, M., N. Dally, C. Jung, 2015:** Flowering time regulation in crops — what did we learn from *Arabidopsis*? *Current Opinion in Biotechnology* **32**, 121-129, DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.023.
- Braatz, J., H.-J. Harloff, N. Emrani, C. Elisha, L. Heepe, S.N. Gorb, C. Jung, 2018:** The effect of *INDEHISCENT* point mutations on silique shatter resistance in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics* **131**, 959-971, DOI: 10.1007/s00122-018-3051-4.
- Braatz, J., H. Harloff, M. Mascher, N. Stein, A. Himmelbach, C. Jung, 2017:** CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Plant Physiology* **174**, 935-942, DOI: 10.1104/pp.17.00426.
- Chalhoub, B., F. Denoeud, S. Liu, I.A.P. Parkin, H. Tang, X. Wang, J. Chiquet, H. Belcram, C. Tong, B. Samans, M. Corréa, C. Da Silva, J. Just, C. Falentin, C.S. Koh, I. Le Clainche, M. Bernard, P. Bento, B. Noel, K. Labadie et al., 2014:** Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345** (6199), 950-953, DOI: 10.1126/science.1253435.
- Jung, C., B. Till, 2021:** Mutagenesis and genome editing in crop improvement: perspectives for the global regulatory landscape. *Trends in Plant Science* **26**, 1258-1269, DOI: 10.1016/j.tplants.2021.08.002.
- Karunaratna, N.L., H. Wang, H.J. Harloff, L. Jiang, C. Jung, 2020:** Elevating seed oil content in a polyploid crop by induced mutations in *SEED FATTY ACID REDUCER* genes. *Plant Biotechnology Journal* **18**, 2251-2266, DOI: 10.1111/pbi.13381.
- Koornneef, M., C.J. Hanhart, d. van, V, 1991:** A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG* **229** (1), 57-66, DOI: 10.1007/BF00264213.
- Krasileva, K.V., H.A. Vasquez-Gross, T. Howell, P. Bailey, F. Paraiso, L. Clissold, J. Simmonds, R.H. Ramirez-Gonzalez, X. Wang, P. Borrill, C. Fosker, S. Ayling, A.L. Phillips, C. Uauy, J. Dubcovsky, 2017:** Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114** (6), E913-E921, DOI: 10.1073/pnas.1619268114.
- Kumar, A., H. Harloff, S. Melzer, J. Leineweber, B. Defant, C. Jung, 2021:** A rhomboid-like protease gene from an interspecies translocation confers resistance to cyst nematodes *New Phytologist* **231**, 801-813, DOI: 10.1111/nph.17394.
- Ossowski, S., K. Schneeberger, J.I. Lucas-Lledó, N. Warthmann, R.M. Clark, R.G. Shaw, D. Weigel, M. Lynch, 2010:** The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327** (5961), 92-94, DOI: 10.1126/science.1180677.
- Pixley, K.V., J.B. Falck-Zepeda, R.L. Paarlberg, P.W.B. Phillips, I.H. Slamet-Loedin, K.S. Dhugga, H. Campos, N. Gutterson, 2022:** Genome-edited crops for improved food security of smallholder farmers. *Nature Genetics* **54** (4), 364-367, DOI: 10.1038/s41588-022-01046-7.
- Sashidhar, N., H. Harloff, C. Jung, 2020a:** Identification of phytic acid mutants in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by large scale screening of mutant populations through amplicon sequencing. *New Phytologist* **225**, 2022–2034, DOI: 10.1111/nph.16281.
- Sashidhar, N., H.J. Harloff, L. Potgieter, C. Jung, 2020b:** Gene editing of three *BnITPK* genes in tetraploid oilseed rape leads to significant reduction of phytic acid in seeds. *Plant Biotechnology Journal* **18**, 2241-2250, DOI: 10.1111/pbi.13380.
- Tautz, D., G. Reeves, L.F. Pallares, 2020:** New experimental support for long standing concepts of polygenic genetics implies that the Mendelian genetic paradigm needs to be revised. *The New (Old) Genetics*. Wittinghofer, A.H. Jäckle, Halle, DOI: 10.34714/leopoldina_nal-live_0001_01000.
- Wang, L., Q. Zhang, 2017:** Boosting Rice Yield by Fine-Tuning SPL Gene Expression. *Trends in Plant Science* **22** (8), 643-646, DOI: 10.1016/j.tplants.2017.06.004.
- Zhu, H., C. Li, C. Gao, 2020:** Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21** (11), 661-677, DOI: 10.1038/s41580-020-00288-9.

Bundesnaturschutzrecht – Kommentar, Vorschriften und Entscheidungen

Kommentar zum Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG), Vorschriften und Entscheidungen. Prof. Dr. K. Messerschmidt, begründet von Dr. A. Bernatzky † und O. Böhm. Loseblattwerk in 6 Ordnern mit CD-Rom. Heidelberg, rehm, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm, ISBN 978-3-8073-2393-0.

160. Aktualisierung, Stand: Juli 2022

Die Highlights dieser Aktualisierung:

- Überarbeitung der Kommentierungen §§ 14, 15, 18, 19 und 44
- Aktualisierung BayNatSchG
- 7 neue Entscheidungen

Das bringt Ihnen die 160. Aktualisierung:

Mit dieser Aktualisierung werden die §§ 14 (Eingriffe in Natur und Landschaft), § 15 (Verursacherplichten, Unzulässigkeit von Eingriffen; Ermächtigung zum Erlass von Rechtsverordnungen), § 18 (Verhältnis zum Baurecht), § 19 (Schäden an bestimmten Arten und natürlichen Lebensräumen) und § 44 (Vorschriften für besonders geschützte und bestimmte andere Tier- und Pflanzenarten) überarbeitet unter Berücksichtigung der aktuellen Gesetzgebung und Rechtsprechung.

Daneben wird das BayNatSchG aktualisiert.

Außerdem werden 7 neue Entscheidungen aufgenommen.

161. Aktualisierung, Stand: August 2022

Die Highlights dieser Aktualisierung:

- Überarbeitung der Kommentierung zu § 34 BNatSchG
- 7 neue Entscheidungen

Das bringt Ihnen die 161. Aktualisierung:

Die Aktualisierung des Kommentarteils wertet die Rechtsprechung des Bundesverwaltungsgerichts und des Europäischen Gerichtshofs sowie der Obergerichte seit 2020 bis Anfang 2022 aus. Wegen des Umfangs der daraus resultierenden Ergänzungen und Änderungen wurde eine Aufteilung erforderlich. Den größten Raum nimmt die Überarbeitung des § 34 BNatSchG ein. Im Vordergrund steht hier das Urteil des BVerwG vom 03.11.2020 zur Fehmarnbeltquerung (Az. 9 A 12.19), welches – je nach Seitenformatierung – bis zu 200 Druckseiten umfasst und in über 800 Randziffern gegliedert ist. Es klärt viele Fragen um die FFH-Verträglichkeitsprüfung, wirft aber auch einige neue auf. § 34 BNatSchG bleibt somit eine Dauerbaustelle. Dies gilt insbesondere für das Critical-Loads-Konzept und die Abschneidekriterien. Das für § 44 BNatSchG (und den Ausbau der Windkraft) zentrale Urteil „Skydda Skogen“ des Europäischen Gerichtshofs vom 04.03.2021 (Rs. C-473/19 und C-474/19) war bereits Gegenstand der letzten Aktualisierung.

Außerdem werden 7 neue Entscheidungen aufgenommen.

Die Redaktion

November/November

15. – 16.11.2022 | Berlin

Fachsymposium Stadtgrün

Thema: „Landwirtschaft in der urbanen grünen Infrastruktur“

<https://www.julius-kuehn.de/stadtgruen/>

Kontakt: Feldmann, Falko

E-Mail: falko.feldmann@julius-kuehn.de

23. – 24.11.2022 | Berlin

Vorratsschutz | Abschlussevent des Projekts VSnet

<https://www.netzwerk-vorratsschutz.de/vsnet/de/home>

Kontakt: Nadine Feuerbach

E-Mail: VSNet@julius-kuehn.de

24. – 25.11.2022 | Schwentimental

38. Tagung des DPG & DGaE Arbeitskreises:

„Nutzarthropoden und Entomopathogene Nematoden“

<https://plant-protection.net/de/arbeitskreise/nutzarthropoden>

2023

Januar/January

30. – 31.01.2023 | Braunschweig

36. Tagung des DPG-Arbeitskreises

<https://www.julius-kuehn.de/veranstaltungen/veranstaltung/news/36-tagung-des-dpg-arbeitskreises/>

36-tagung-des-dpg-arbeitskreises/

31.01.2023 | Braunschweig

17. Treffen des Fachausschuss Pflanzenschutzmittelresistenz – Fungizide

<https://www.julius-kuehn.de/veranstaltungen/veranstaltung/news/17-treffen-des-fachausschuss-pflanzenschutzmittelresistenz-fungizide/>

17-treffen-des-fachausschuss-pflanzenschutzmittelresistenz-fungizide/
Veranstalter: JKI

Kontakt: Bernd Rodemann

E-Mail: bernd.rodemann@julius-kuehn.de

Februar/February

20. – 23.02.2023 | Bozen, Italien

22. Entomologentagung der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie e.V. (DGaE)

<https://www.dgae.de/de/>

Kontakt am JKI: Jürgen Gross

Mail: juergen.gross@julius-kuehn.de

März/March

14. – 16.03. 2023 | Berlin

GMO Analysis and new genomic techniques

<https://www.bfr-akademie.de/gmo2023/>

April/April

23. – 27.04.2023 | Friedrichroda

International Reinhardsbrunn-Symposium

Modern Fungicides and Antifungal Compounds

<https://plant-protection.net/de/reinhardsbrunn>

E-Mail: info@reinhardsbrunn-symposium.de

30.04. – 04.05.2023 | St. Louis, USA

6th Symposium of the International Society for Biosafety Research (ISBR) – Advancing science in support of sustainable bio-innovation

<https://isbr.info/home>

Kontakt: Wilhelm, Ralf

E-Mail: ralf.wilhelm@julius-kuehn.de

Juni/June

19. – 23.06.2023 | Rostock

ILC 2023: 16th International Lupin Conference

<https://www.julius-kuehn.de/veranstaltungen/veranstaltung/news/ilc-2023-16th-international-lupin-conference/>

ilc-2023-16th-international-lupin-conference/

Kontakt: Brigitte Ruge-Wehling

E-Mail: brigitte.ruge-wehling@julius-kuehn.de

September/September

25.09.2023 | Göttingen

Wurzeln und Wasser: Gesunde Pflanzen in der Schwammstadt

<https://plant-protection.net/de/upc/>

Kontakt: Feldmann, Falko

E-Mail: falko.feldmann@julius-kuehn.de

26. – 29.09.2023 | Göttingen

Pflanzenschutztagung

<https://www.pflanzenschutztagung.de/>

Veranstalter: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e. V.

Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Pflanzenschutzamt

E-Mail: info@pflanzenschutztagung.de

Aus dem JKI Newsletter

Interessiert? Den aktuellen Newsletter finden Sie hier:

<https://www.julius-kuehn.de/newsletter-des-jki/>

Um weiter auf dem Laufenden zu bleiben, können Sie dort auch den Newsletter direkt abonnieren.

Aktuelles

13 Millionen für 17 interdisziplinäre Forschungsprojekte zum Klimaschutz
Die Forschung zur klimaoptimierten Pflanzenproduktion der Zukunft wird mit 13 Millionen Euro aus dem Klimaschutz-Sofortprogramm 2022 der Bundesregierung am JKI gefördert. Das Projektteam leitet die Forschung in Zusammenarbeit mit der Bundesregierung ein und bewertet die Klimaneutralität bis 2045 zu. Die Forschung umfasst die Bewertung der Humusgehalte von satelitenbasierten und bodenbasierten Methoden zur Erfassung von Erntegütern, tiefwurzelnde Kulturpflanzen und Torferzeugung von Erntegütern.
Pressemitteilung: [Julius Kühn-Institut](#)



Sucht Unterstützung auf Zuckerrüben
Das Projekt nützLINK richtet sich an erfahrene oder Landwirtinnen und Landwirte, die in der Landwirtschaft bei der Erfassung der Freiwilligen in einer umfassenden Datengrundlage für die nützLINK-Initiative helfen wollen. <https://nuetzlink.julius-kuehn.de/>



Im Gespräch



mit Dr. Sandra Krengel-Horney und Dr. Til Feike, über Landwirte und den Klimawandel.

[Link zum Interview...](#)

aus der Forschung Publikationen

Agroforstsysteme verringern N₂O-Emissionen von Erntegütern
Lachgas (N₂O) ist ein 265-fach stärkeres Treibhausgas als CO₂ und die wichtigste Hauptemissionsquelle von N₂O. Sie können sowohl Quelle als auch Senke für N₂O sein. Wenige Arbeitsgruppen weltweit sind in der Lage, Brutto-N₂O-Emissionen (Nettoaufnahme) von Böden im Feld zu messen. Forschende der Universität Gießen haben über zwei Vegetationsperioden hinweg monatlich N₂O-Emissionen mit der Verdünnungsmethode in Alley-Cropping-Agroforstsystemen und in Ackerreinkulturen gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass Agroforstsysteme deutlich geringere Brutto-N₂O-Emissionen führen. Obwohl die Fläche in Agroforstsystemen ausmachte, waren die Gesamtemissionen pro Fläche geringer als in Ackerreinkulturen. Zusätzlich wurde die Bruttoaufnahme von N₂O in Agroforstsystemen gemessen.

Andreas Stahl erhält Wricke-Forschungspreis

Der mit 25.000 Euro dotierte Günter und Anna Wricke-Forschungspreis ist verliehen. Er ist unter 40-Jährigen vorbehalten und wird für die Genetik und Züchtungsforschung an Kulturpflanzen vergeben. In seiner Arbeitsgruppe an der Universität Gießen forscht Andreas Stahl zur Optimierung der Wassernutzungseffizienz von Winterweizen. In Zusammenarbeit mit einer neuen Form der sensorbasierten Phänotypisierung und mehrjährigen Feldversuche war: Moderne Weizen mit gleicher Erntemenge effizienter und benötigen weniger Wasser.

[Link zur Meldung: JKI-Forscher Andreas Stahl erhält Wricke-Forschungspreis](#)



Mikrobiomforscherin Kornelia Smalla in den Ruhestand verabschiedet

Nach drei Dekaden Forschung zum Wurzelmikrobiom am Fachinstitut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik in Braunschweig beendet die wohl meistzitierte JKI-Wissenschaftlerin apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Kornelia Smalla ihren Dienst am Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen. Aufgrund ihrer starken internationalen Vernetzung wurde das Abschiedskolloquium Ende August als Live-Stream übertragen (hier geht es zur [Videoaufnahme](#)). Frau Smalla bleibt der Forschung jedoch erhalten. In ihren Worten: „I retire from my position – not from science“.

[Link zur Meldung: Mikrobiomforscherin Prof. Kornelia Smalla ...](#)

Journal für Kulturpflanzen

Journal of Cultivated Plants

Inhalt: Band 74 (11-12). S. 221-288, 2022, ISSN 1867-0911
Themenheft „Von Mendel zur Genomeditierung“

Frank Ordon, Wolf von Rhade

Gregor Mendel – ein genialer Forscher _____ 221

Wolfgang Friedt, Frank Ordon

Mendel's Laws and their impact on plant breeding
Zur Bedeutung der Mendel'schen Regeln für die Pflanzenzüchtung _____ 223

Ralf Uptmoor, Julian Kirchgesser

Mendel und der Beginn der modernen Genetik: zu gut um wahr zu sein?
Mendel and the onset of modern genetics: too good to be true? _____ 233

Henryk Flachowsky, Ofere Francis Emeriewen, Mirko Schuster, Andreas Peil, Janne Lempe, Thomas Wöhner

Der Einfluss der Mendelgenetik auf die Sortenzüchtung bei Apfel und Süßkirsche
The impact of Mendelian genetics on the breeding of apple and sweet cherry _____ 242

Reinhard Töpfer, Oliver Trapp

200 years Mendel: the grapevine breeding perspective
200 Jahre Mendel: die Perspektive der Rebenzüchtung _____ 257

Daniel von Maydell, Jens Keilwagen, Heike Lehnert, Thomas Berner, Frank Marthe

On the search for the vernalization locus in caraway (*Carum carvi*) using genotyping by sequencing data
Auf der Suche nach dem Vernalisations-Locus in Kümmel (*Carum carvi*) mittels Genotyping by Sequencing _____ 263

Aleksandra Varekhina, Victor Guerra, Andreas Stahl, Albrecht Serfling

Identification of seedling resistance against leaf rust using innovative phenotyping methods
Nachweis von Keimpflanzenresistenzen gegenüber Braunrost mit Hilfe innovativer Phänotypisierungsmethoden _____ 271

Christian Jung

Induced mutations for studying Mendelian inheritance
Induzierte Mutationen zum Studium der Mendelschen Vererbung _____ 282

Literatur _____ 287

Termine und Veranstaltungen _____ 288

Unser Titelbild:

200 Jahre Gregor Mendel. Bildzusammenstellung: Anja Wolck (JKI Berlin), Quellen: Bildelement Mendel: Unbekannter Urheber, Public Domain, via Wikimedia Commons; Bildelement DNA-Helix: AdobeStock: olleksandr – stock.adobe.com; Bildelement Erbsen: AdobeStock: Archivist – stock.adobe.com.