Lenticelrot research at Agroscope

Andreas Bühlmann
Agroscope

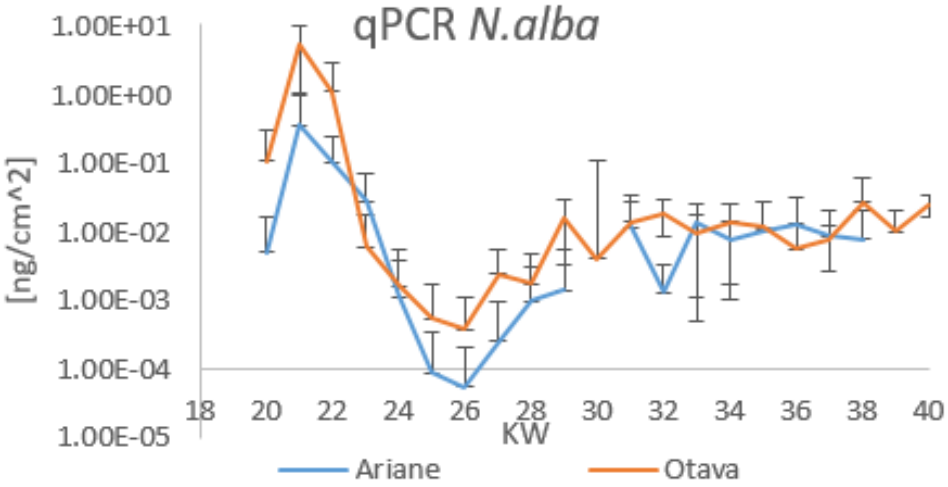
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

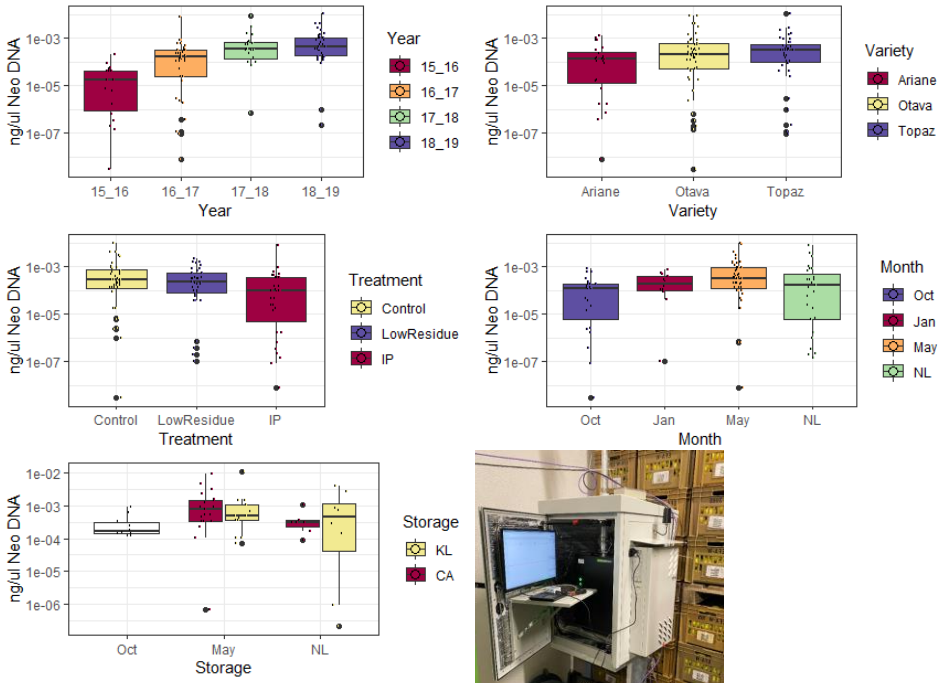
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

- Spore sampling/skin sampling/spoilage in field and storage
- Biocontrol
- Genome sequencing
- GWAS

Spore sampling in field, skin sampling in storage





- Infection time point doable with qPCR
- Lots of work in sampling
- Analysis straightforward

Solution?

Gasser et al. 2025 MSc thesis, BOKU Wien

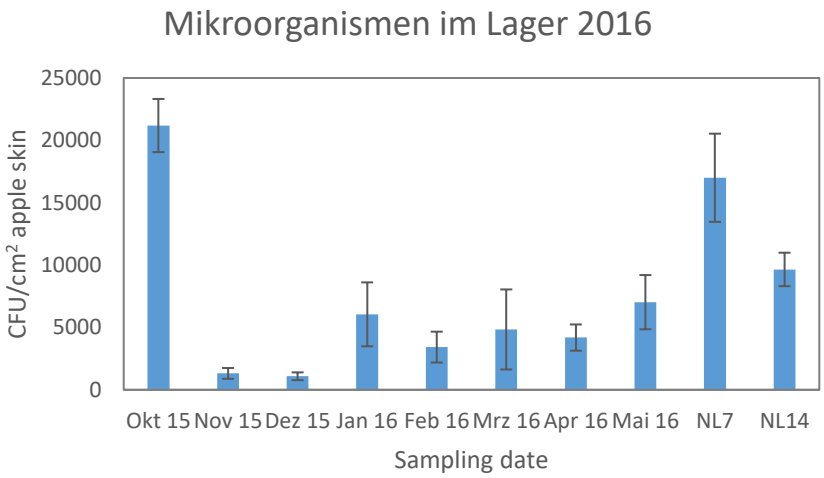
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

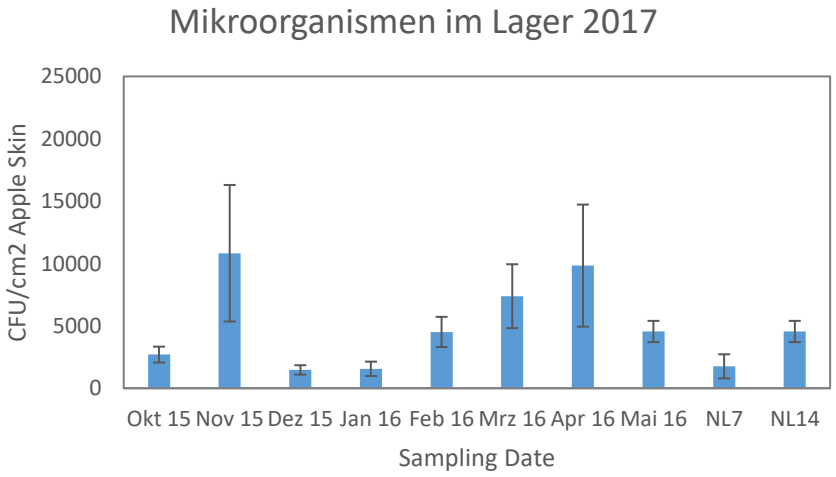
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Microbiome in storage

Spores/ Spoilage

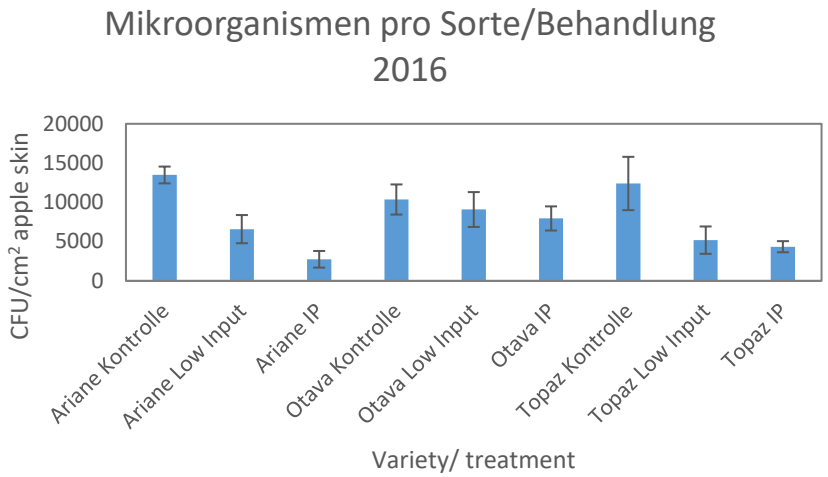


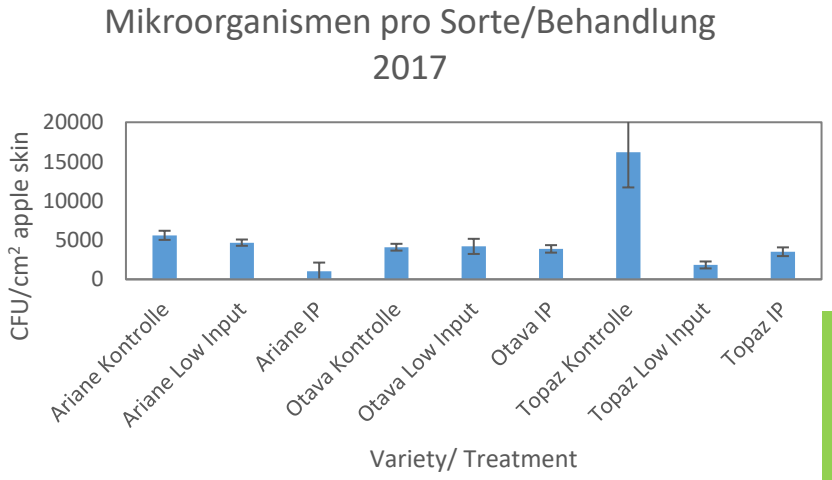


The microbiome changes
- During storage
- Between years

Microbiome in storage

Spores/ Spoilage





The microbiome shows
- Varietal differences
- Orchard management differences

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

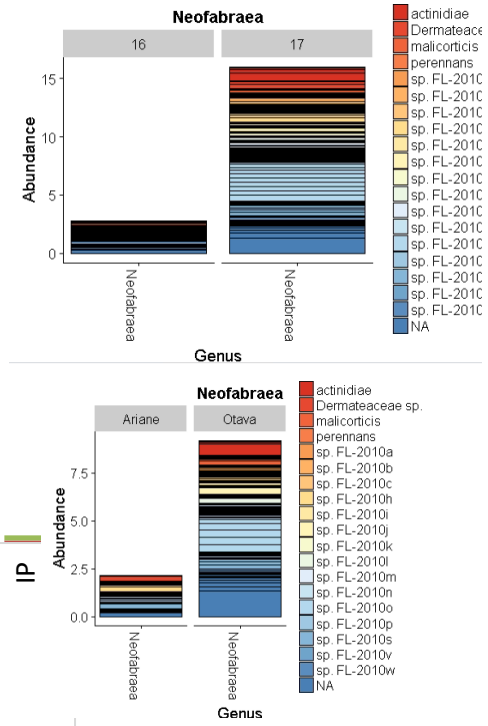
Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Metagenomics in storage

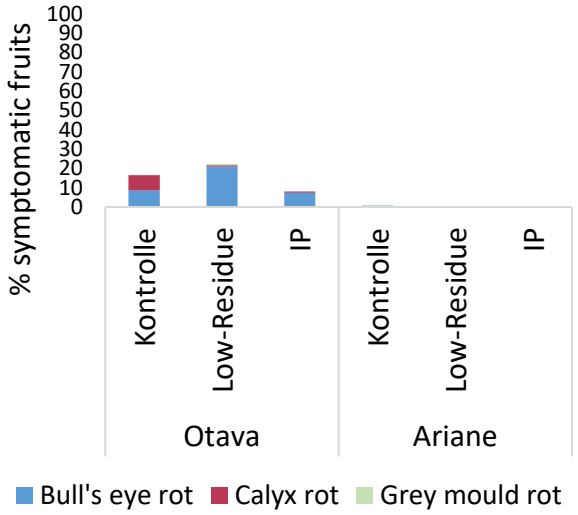
- Correlate metagenomics and disease scoring

Spores/ Spoilage

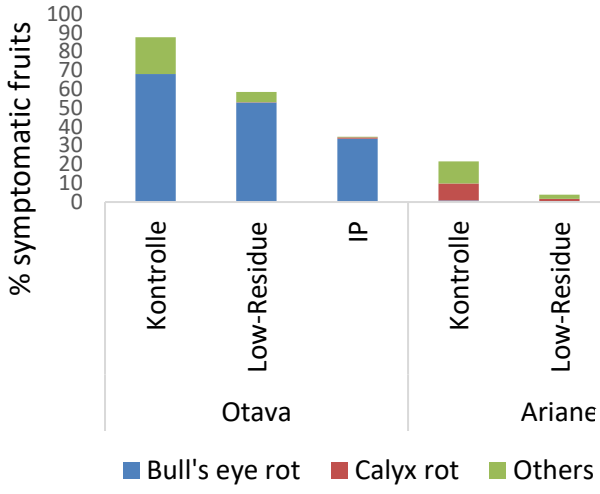
Neofabraea DNA

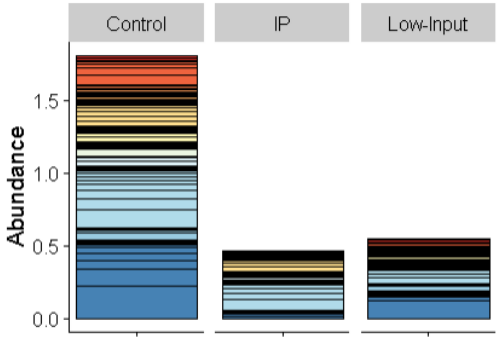


Storage Diseases 2016



Storage Diseases 2017





Neofabraea DNA abundance correlates with disease severity over:
Years
Treatment
Variety

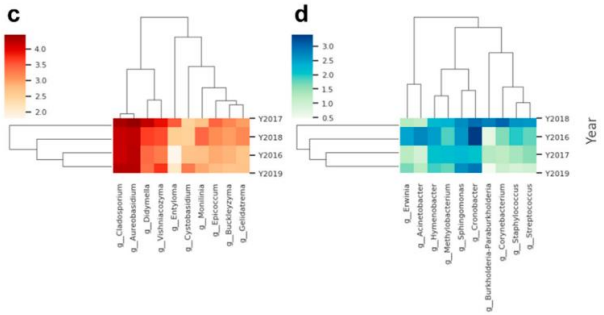
ETH zürich Agroscope POMACULTA Lubera lustvoll gärtnern

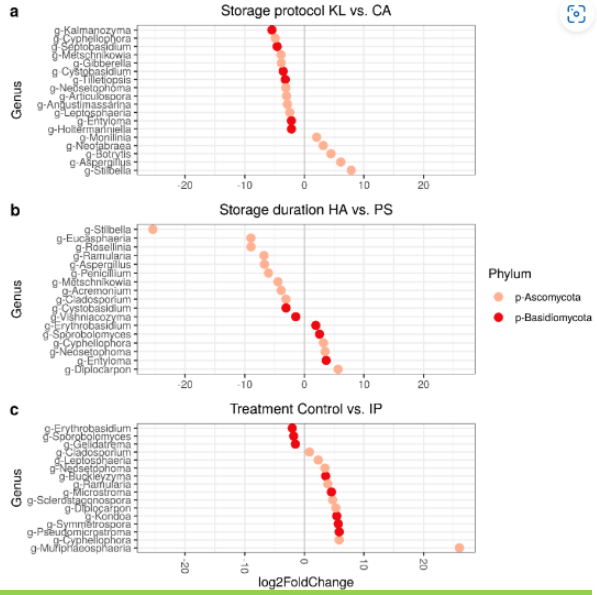
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Metagenomics in storage

Fungal diversity controlled by
Storage method > Storage time > Year > Treatment > Cultivar





Core microbiome very similar to global core microbiome

Identify key taxa for diseased vs healthy

Combine to design «synthetic» healthy microbiome > Good guys
Aureobasidium, Metschnikowia, Hanseniospora

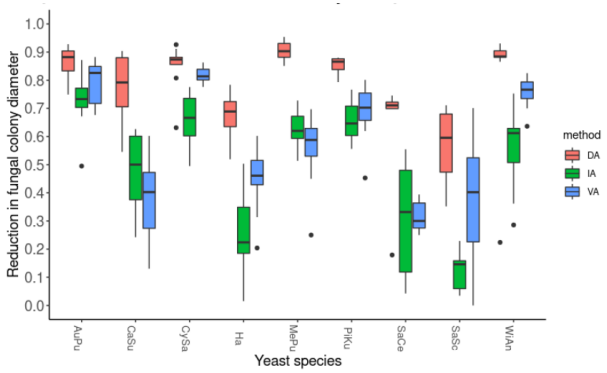
Dynamics of the Apple Fruit Microbiome after Harvest and Implications for Fruit Quality
Y Bösch, E Britt, … A Bühlmann … et al. 2021, - Microorganisms

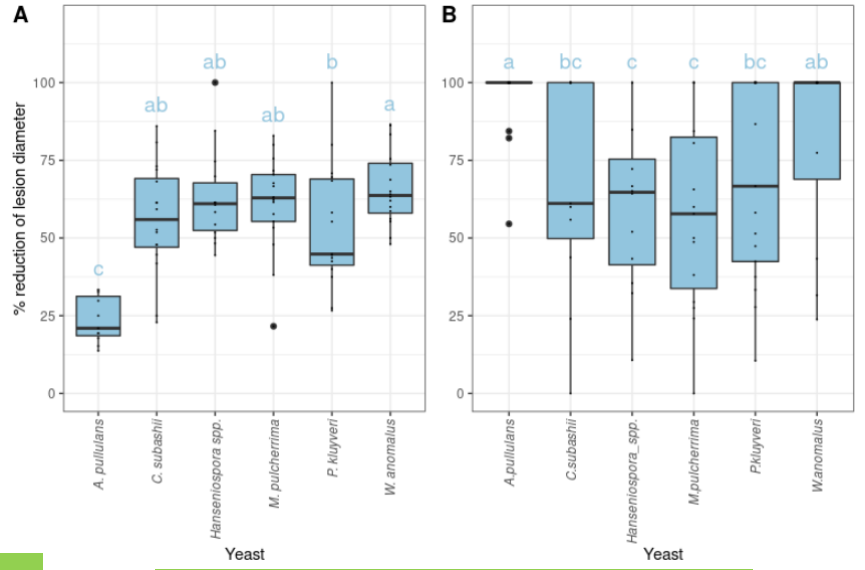
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Identify the good guys
Biocontrol using taxa from microbiome data – *In vitro* trials





- Biocontrol works in vitro/ in with high efficacy
- Different modes of action
  (Direct contact, Diffusable molecules, Volatiles,

Biocontrol works in situ
3h and 24h before infection

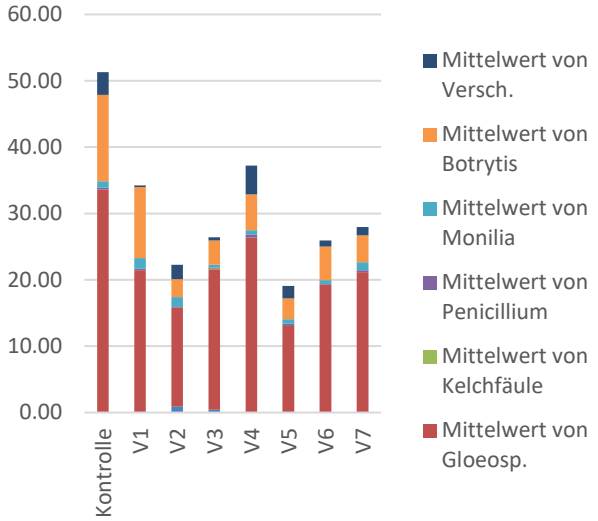
Stability of Dry and Liquid Metschnikowia pulcherrima Formulations for Biocontrol Applications against Apple Postharvest Diseases A. Bühlmann …F. Freimoser et al. 2022, - Horticulturae

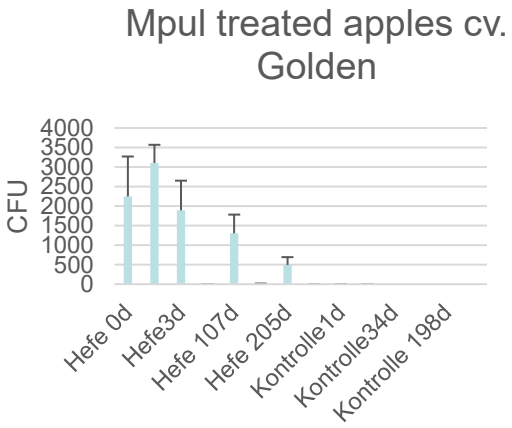
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

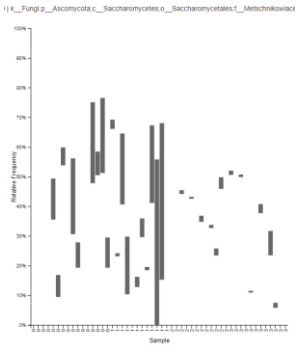
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Biocontrol treatment, reisolation, metagenomics







- Limited effects in vivo
- Optimisation to formulation that Mpul stays on fruit
- confirmed by culture and metagenomics

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Characterize bad guys, identify nutritional needs

collaboration Uni Bozen/ Uni Bologna

4 species of *Neofabraea*
Sequecing on 2 PromethION chips
Illumina shotgun + RNA seq
Flye assembly – Pilon polishing

Sample	# contigs	Total size (Mbp)	coverage (x)	N50 contig length	read length cutoff
Na_ELi5	13	38.33	180	3903075	36148
Nk_FU64	13	38.29	300	3135548	50647
Nm_CBS 122030	16	50.14	465	4200967	70237
Np_CBS102869	20	44.15	470	3239928	67843

P. Vagabunda published- comparative genomics to do

Genome resource of Phlyctema vagabunda strain 19EL15, a pathogen of post-harvest bull's eye rot of apple, G. Amaral,… A. Bühlmann et al. 2025 Microbiol Res Ann

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

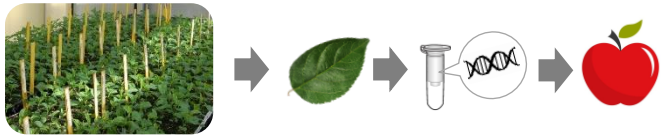
Projekt AZZ «Apfelzukunft dank Züchtung»

GWAS

Teilprojekt 1

Implementierung der genomischen Selektion für Fruchtqualitätseigenschaften in CH-Züchtungsprogramme

Charakterisierung des Zuchtmaterials und Implementierung molekularen Selektion im Zuchtprogramm von Lubera & Poma Culta

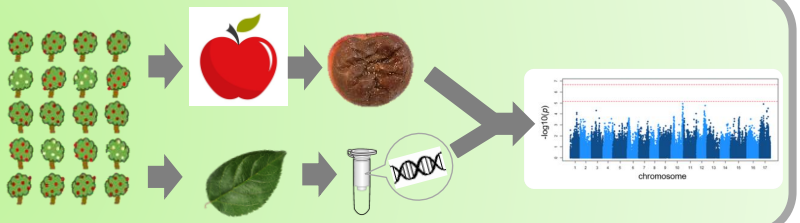


Teilprojekt 2

Kombination von «Fast Track» und genomischer Selektion für Fruchtqualitätseigenschaften

Teilprojekt 3

Neofabraea-Resistenz (Lentizellenfäulnis) Screening in Kombination mit genomweiter Assoziationsstudie (GWAS) zur Entwicklung von molekularer Marker



Andrea Knauf, Marius Hodel, Michaela Jung, Andreas Bühlmann

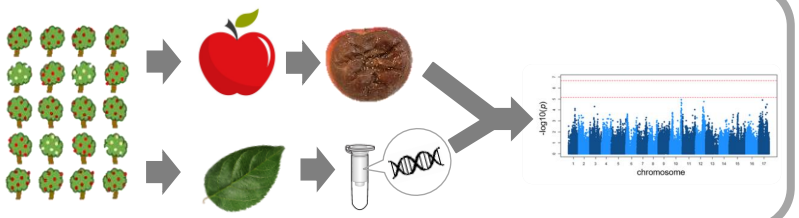
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Teilprojekt 3

Neofabraea-Resistenz (Lentizellenfäulnis) Screening in Kombination mit genomweiter Assoziationsstudie (GWAS) zur Entwicklung von molekularer Marker



1) Inoculation protocol

T13: Protokoll zur Bestimmung der *Neofabraea*-Resistenz von Äpfeln ist entwickelt.

2) Phenotyping

T14/15: Phänotypisierung des Zuchtmaterials auf *Neofabraea*-Resistenz: RefPop/ Zuchtmaterial

3) GWAS

T16 GWAS ist durchgeführt, mit Resistenz assoziierte Marker sind entwickelt.

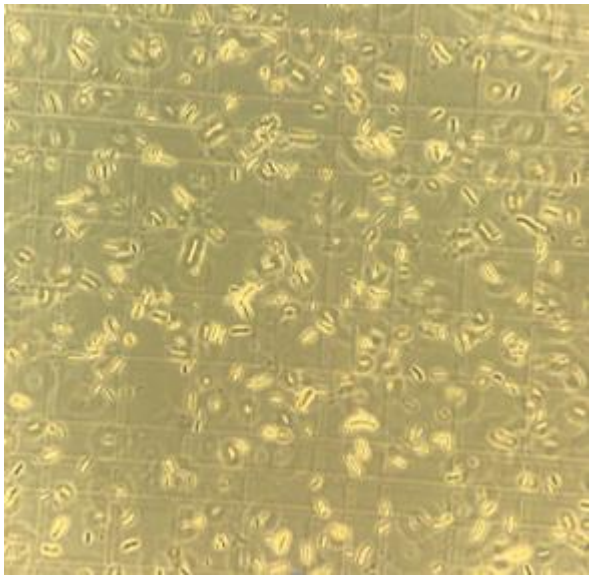
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Problem Infektiösität

GWAS



- Neuer Stamm N.alba
- Kontrollen des Sporenstocks
- Wachstumskontrollen
- Regelmässige Erneuerung
- Aufbewahrung der Sporen bei 0-4°C

Soweit möglich gelöst

Problem Kontamination

GWAS

- Wisch-Dekontamination EtOH 70 %
- Parafilm
- Anpassung Luftfeuchtigkeit
- Desinfektion der Kisten

Soweit möglich gelöst

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra
Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

2 Phänotypisierung

Lagerraum, 20°C, 70%ige Luftfeuchtigkeit
Lagerung: 21 d

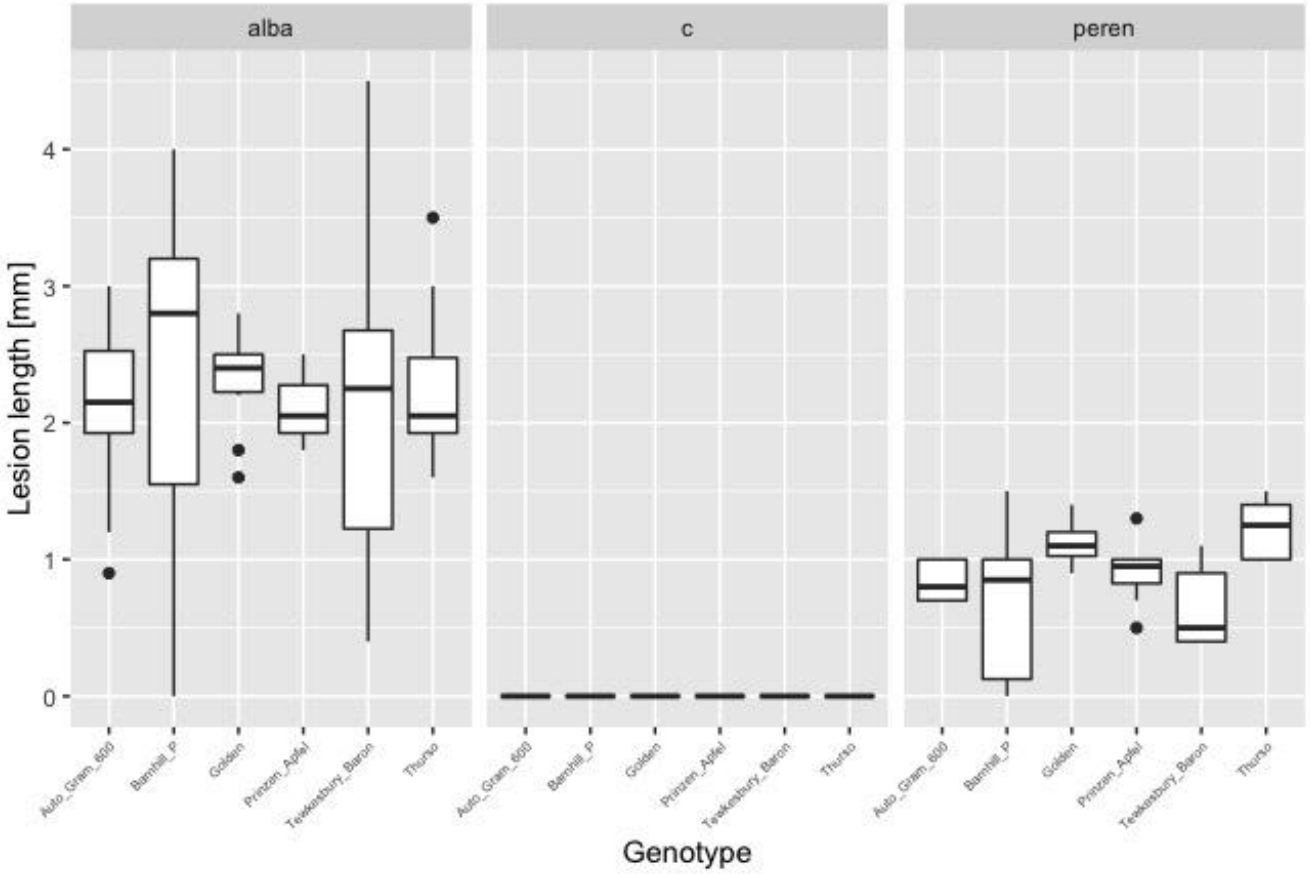
- **Pro Jahr:**
- **REFPOP**: n = 233 Genotypen, davon 32 doppelt
  - 1.325 Äpfel
  - 6.625 Inokulationen
- **Stufe A (Agroscope)**: n = 40 Genotypen
  - 200 Äpfel
  - 1000 Inokulationen

  - ~ 10% Kontaminationsrate / „150 Äpfel“

Ergebnisse

GWAS

Infektionsrate **98 %**
Kontaminationen **10 %**



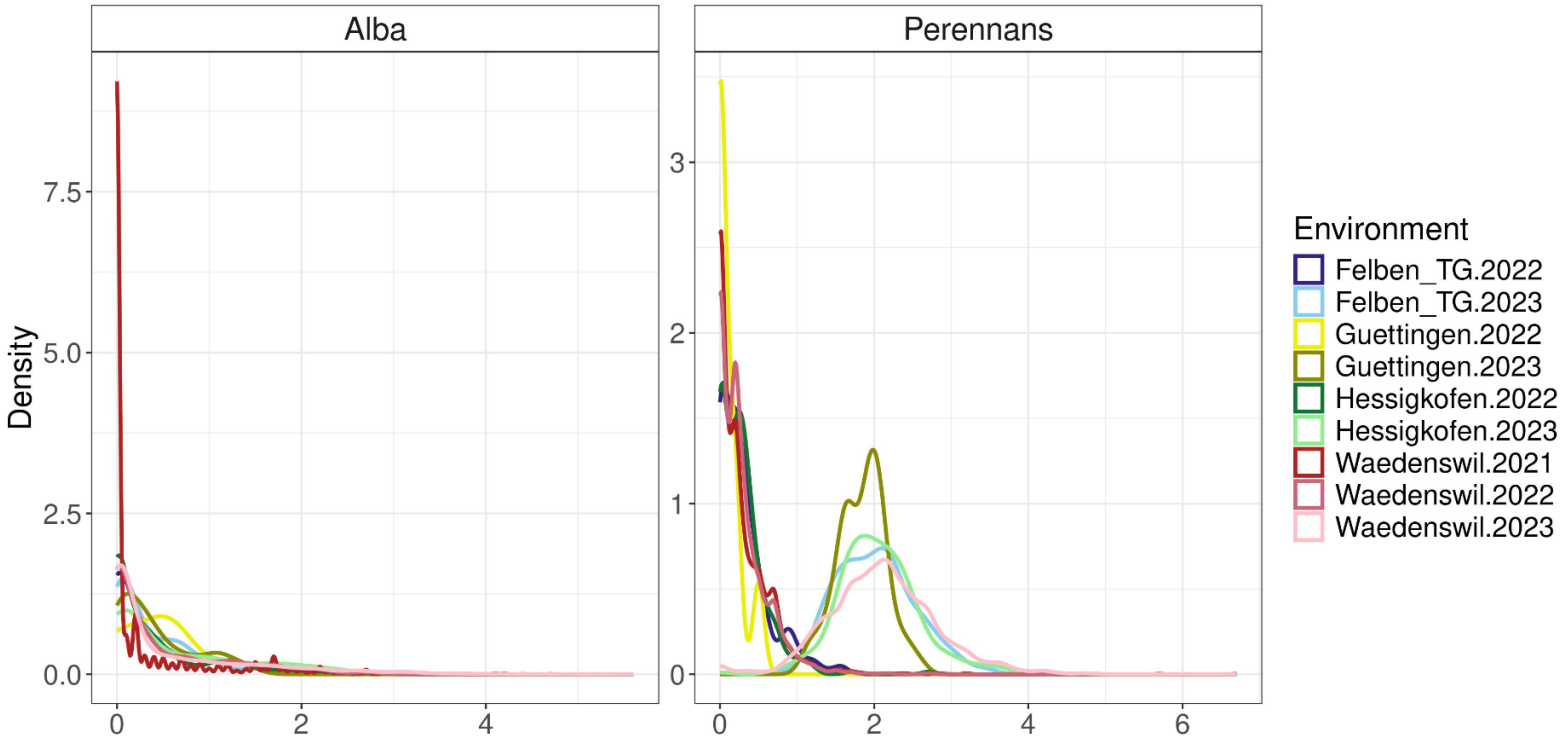
ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Ergebnisse Phänotypisierung

GWAS



ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

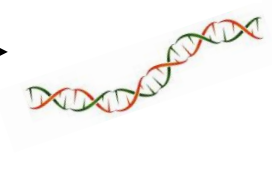
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

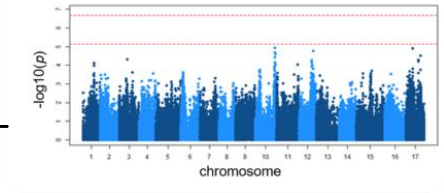
Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

3 GWAS

N. perennans

N. alba





GWAS

Blink/ Gemma

Genotyping
by sequencing

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

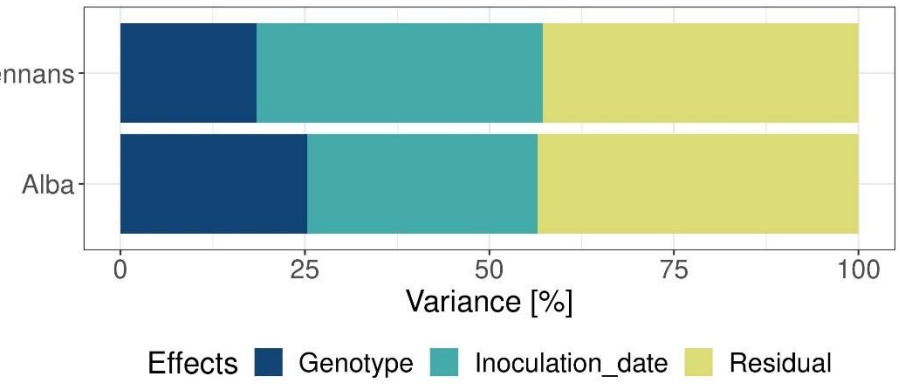
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

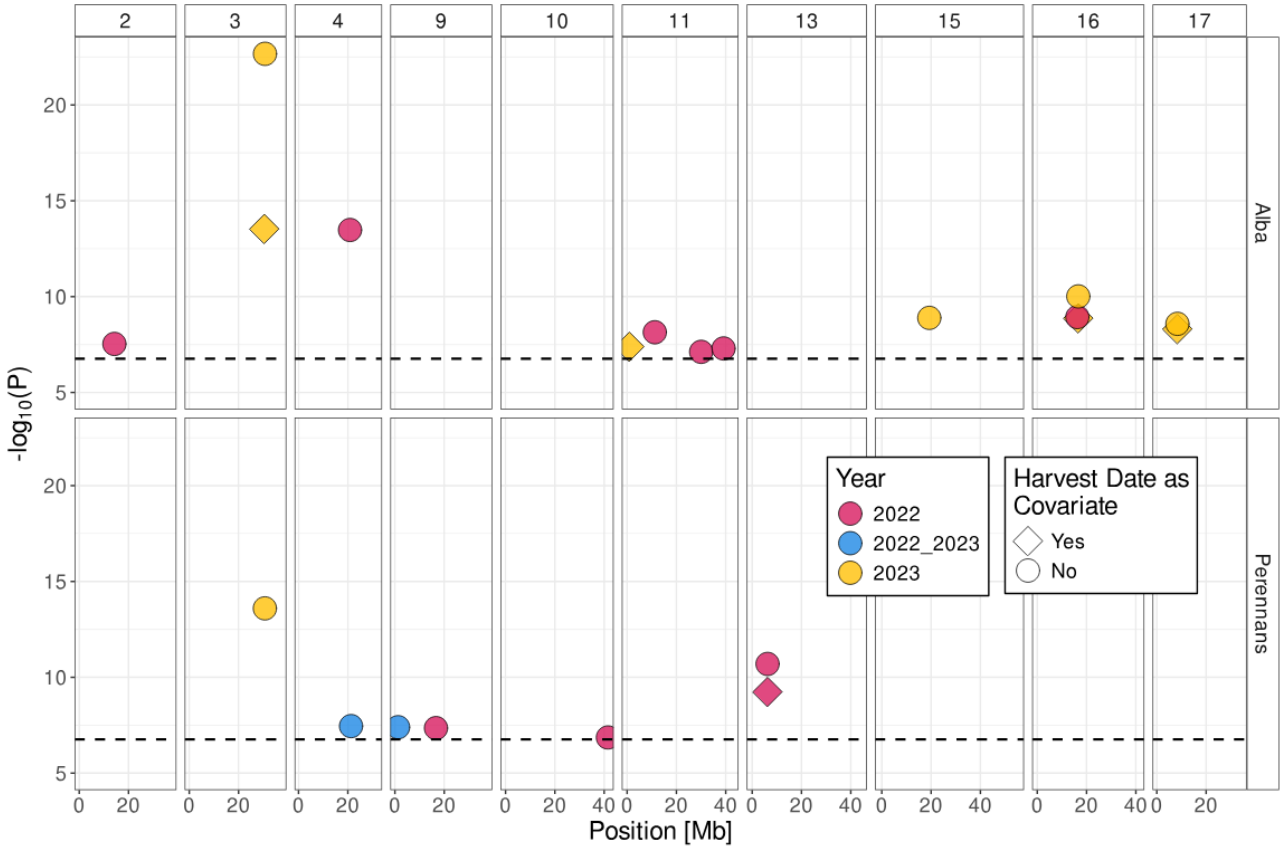
BLUPs – MLM I

- **Fixed effect:** Year_Location
- **Random effect:** Genotype & Inoculation date (trial effect)

- Inokulationsdatum hat grossen Effekt – kennen wir



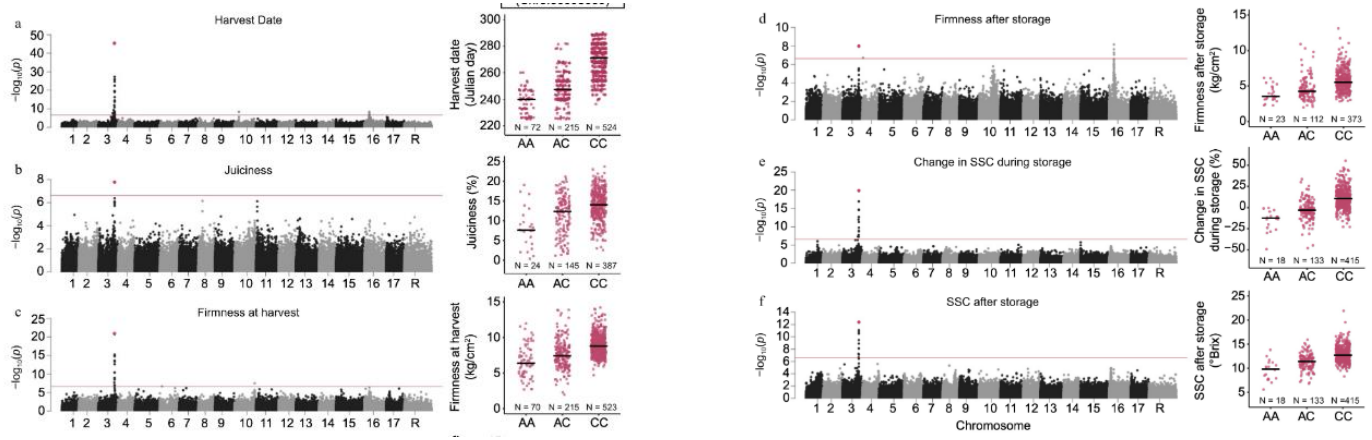
GWAS – full dataset



- Wichtiger Locus auf Chr3, kleinere auf 4 und 16

Was ist auf Chr3

GWAS



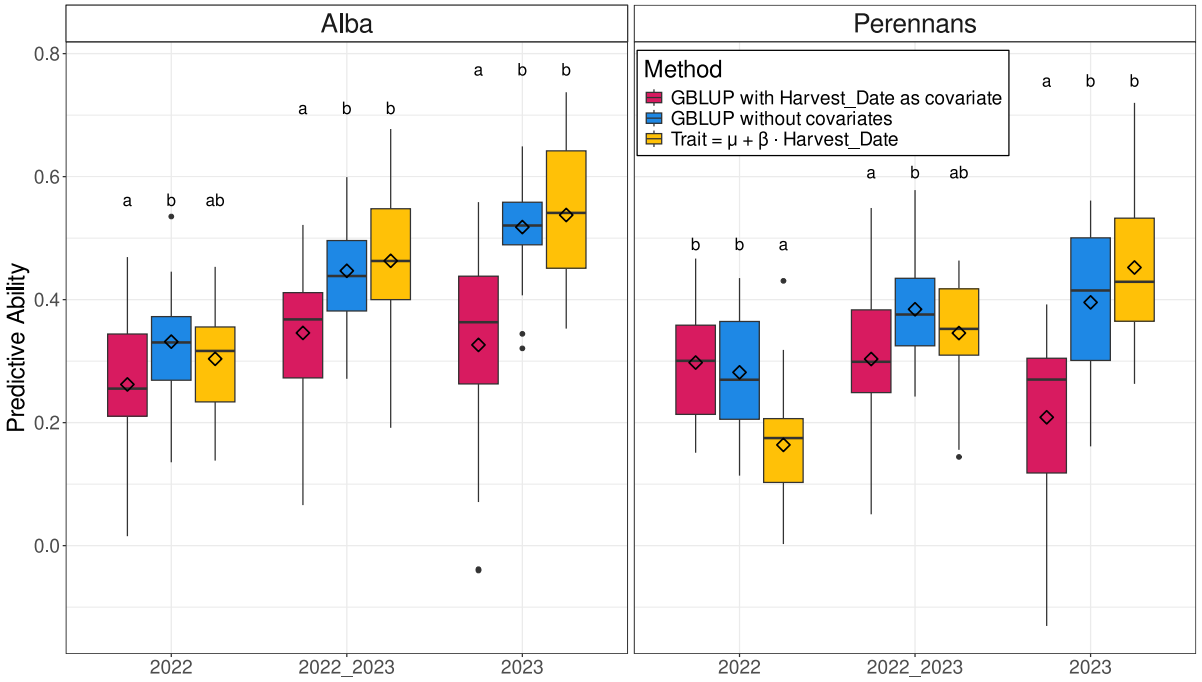
Chromosome	Class	Start	Stop	Annotation
Chr03	gene	30653663	30660855	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein
Chr03	gene	30669574	30673758	Peroxisomal membrane 22 kDa (Mpv17/PMP22) family protein
Chr03	gene	30676958	30677290	Protein of unknown function
Chr03	gene	30696191	30698216	NAC domain containing protein 2
Chr03	gene	30738599	30740479	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein

Region bekannt, Marker existiert, alle modernen Eltern haben «gutes» allel

Watts et al. 2023 Fruit research
Large-scale apple GWAS reveals NAC18.1 as a master regulator of ripening traits (maxapress.com)

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Falls zu polygen für Marker, ist genomic selection eine Lösung



Modell mit nur Erntedatum ist gleich gut wie genomic selection

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Summary

- **Spores/ Spoilage**
- Molekulare Markers for Lenticel rot difficult
- Limited problem since harvest date reasonabliy good predictor
- Robust early varieties unlikely
- Phenotyping our breeding program doable

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern
Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra
Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Next steps

Spores/ Spoilage

- Sampling too labor intensive- automatic spore sampling and ID

Biocontrol

- Continue to optimize formulation
- Optimize application – cold fumigation

Genome sequencing

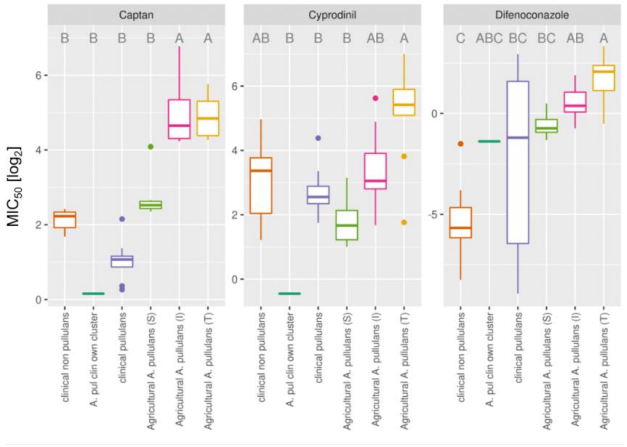
- Comparative genomics between species
- Diversity within P. vagabunda

GWAS

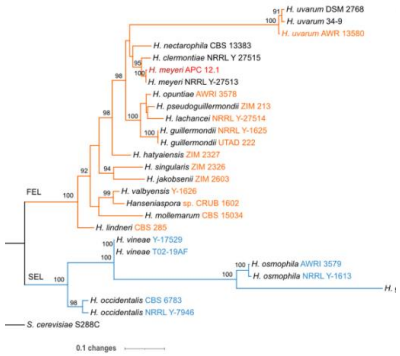
- 20 Genotypen WGS – check for NAC18.1 Locus – ETH/Gio
- NAC18.1 resequenzieren
- Chr4 und Chr16 loci charakterisieren
- Project RoBIS auf Birne– Masterarbeit für Neofabraea kienholzii

Characterize good guys, identify lifestyles, modes of action

Collaboration F. Freimoser, agroscope



Aureobasidium comparative genomics, fungicide resistance



Hanseniospora metabolic capabilities

Clinical *Aureobasidium* Isolates Are More Fungicide Sensitive than Many Agricultural Isolates E. Magoye…. A. Bühlmann … et al. 2023 Microbiol. Spectrum

Pantothenate Auxotrophy in a Naturally Occurring Biocontrol Yeast M. Rueda- Meija …. A. Bühlmann et al. 2023 Environm. Microbiol

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

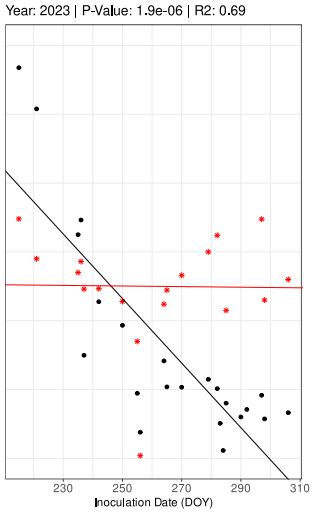
Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW

Inokulationsdatum – versuch zu normalisieren GWAS

Mittlere Läsionslänge pro Inokulationsdatum

Golden Control

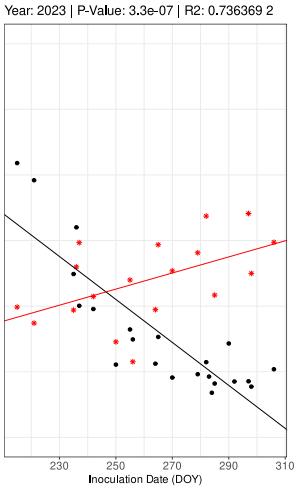
Genotypen



Mittlere Läsionslänge korrigiert mit Golden Kontrolle

Golden Control

Genotypen



Bringt nix weil Korrektur selber zu variabel ist

Lösung: als Covariable in die GWAS nehmen

ETH zürich Agroscope POMA CULTA Lubera lustvoll gärtnern

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
Bundesamt für Landwirtschaft BLW