

Résumé de la thèse intitulée

"L'ÉVALUATION DES VARIÉTÉS LOCALES DE VIEILLE POMME CONCERNANT LA RÉSISTANCE AUX MALADIES. "

Drd. MANAFU Dan Petrisor

Mots-clés: variétés locales, des formes de résistance, résistance génétique, *Venturia inaequalis*, descendances hybrides, l'inoculation, SSR, marqueurs moléculaires, isolement de l'ADN génomique, tavelure, PCR, fenotipage, genotipage

1.1. Introduction

Une des maladies les plus dangereuses est présent dans les vergers c'est la tavelure de la pomme (*Venturia inaequalis*). Cette maladie peut causer des pertes de récolte de plus de 30% dans les vergers négligés qu'il crée des conditions favorables pour le développement de la maladie. Dans les vergers de pommiers existe de nombreux traitements chaque année pour éviter des pertes matérielles causées par le refus de l'exportation de fruits attaqués par ce champignon. (Albert F., 1993)

Pour contrôler ce grand champignon pathogène de fruits une bonne stratégie génétique utilisée est la sélection d'espèces résistantes à la tavelure *Venturia inaequalis* induites (Cke.) Wint. Il ya une hypothèse que le gène *Vf* conférant héritées de la classe 3 réactions et les réactions d'atteindre de classe 1 et 2 sont d'autres gènes supplémentaires qui augmentent l'effet de pointe, basées sur diverses observations à la suite de plusieurs croisements avec les parents résistance *Vf* gène. *Vf* a été interprété par Tenzer I., et al 1993 comme «le résultat de réactions d'hypersensibilité et l'intensité de réaction d'hypersensibilité est renforcée par le gène quantitative hérité cumulatif».

1.2. Objectifs

L'objectif proposé est d'étudier certains aspects du comportement des anciennes variétés autochtones présentant une résistance partielle aux maladies à soutenir les petits producteurs de fruits surtout pas plus de ressources financières et parfois aucune expertise en matière de protection des plantes à obtenir des nouvelle variétés résistantes aux maladie mieux adaptés aux conditions dans notre pays avec un coût d'efficience / productivité plus élevée dans la culture. Nous avons établi une série de cibles synthétiques pour promouvoir leurs processus de réévaluation et d'amélioration à l'appui de cet objectif majeur, y compris:

- la fructification des anciennes variétés de pommes résistantes fonctions de surveillance et de croissance: ,Turnu', 'Sălciu', 'Venchi', 'Iridium', 'Vânatori 48', 'Mohorât', 'Fără Nume', 'Ouț alb', 'Călugaresc', etc.

- etude de la qualité des fruits;

- utiliser de nouveaux processus d'hybridation des anciennes variétés locales les plus intéressantes;

- l'isolation de l'ADN génomique chez les variétés étudiées;

- après l'infection artificielle avec *Venturia inaequalis* l'évaluation phénotypique des descendance hybrides.

- sélection assistée par les marqueur moléculaire chez les anciennes variétés de pommes prises en charges et aussi leur dernières décennies, à la fois dans le monde et dans notre pays, l'obtention des fruits bénéfiques biologiques ou écologiques pour les consommateurs deviennent la préoccupation fondamentale chez les chercheurs.

La nécessité d'étudier les processus impliqués dans l'amélioration de ces variétés de pommes avec une résistance génétique à la maladie de bonne conduite, même sous traitée avec un fongicide et donc une réduction significative de l'utilisation des pesticides et la pollution de l'environnement, est en droit d'obtenir génotypes de plus en plus responsable de la nouvelle vision de l'agriculture biologique compétitifs sur le marché mondial.

1.3. Matériel et méthodes

Le matériel végétal utilisé dans l'étude se compose de:

► anciennes variétés roumaines dans un assez grand nombre de identifiées et recueillies auprès de différentes régions du pays telles que: 'Venchi', 'Iridium', 'Prescurate', 'Gurguiate', 'Roșu Marin', 'Calvil alb', 'Transimre', 'Andrișișer', 'Renet portocaliu', 'Varga', 'Sălciu', 'Turnu', 'Vânători 48', 'Prescurate', 'Gurguiate', 'Viești', 'Cormoșe', 'Seghese', 'Trotuse', 'Fără nume', 'Măr Orbai' etc.

► du pollen de certains génotypes de pomme comme et certaines populations locales "Prescurate" et "Gurguiate", "Trotuse" , 'Mohorât', 'Nobile de Geoagiu', *Malus pumila* et *Malus floribunda*.

Matériel pathogène

Le champignon *Venturia inaequalis* maladie production appelée tavelure. La maladie peut se manifester sur les feuilles, sépales, les fruits, la tige, et rarement sur les pousses. Taches brune caractéristique - couverture olivacee feuilles des deux côtés, qui sont brun noirâtre avec le temps infesté, avec veloutée; sont petites et nombreuses, confluence, ce qui réduit la possibilité d'alimenter l'arbre et occupant une grande surface de la feuille.

Méthodes de travail

Une fois la relation: G / V , (g ou kg) / (ml ou l) a été fait pour déterminer le poids spécifique.

La quantité de **matière sèche totale** est représentée par un pourcentage en poids dans le premier cas ou le second cas, la différence entre le poids de la matière à analyser et l'eau perdue lors du séchage, et entre 100 et le pourcentage d'eau trouvée.

La substance solides solubles a été déterminé par voie de réfractométrie.

La détermination **de l'acidité titrable totale** a été obtenue par les méthodes actuelles, qui reposent sur titrage direct du produit, ou un extrait ou une dilution de celle-ci à la suite de la charge, avec une solution alcaline de concentration connue.

Utilisez procédés volumétriques (de titrage) neutralisant l'application pratique de ce principe, et selon eux, la façon dont leur neutralisation mutuelle est atteinte détermination quantitative d'acides ou de bases.

La détermination de substances polyphénoliques propos permanganometrică méthode indirecte est prévu comme suit: il détermine d'abord la quantité de potassium oxydation par le permanganate de toutes les matières nécessaires (phénolique nefenolice) du produit à l'étude. Ensuite, en utilisant du charbon actif, le matériau est éliminé par filtration les substances, tannage et colorants et on détermine dans le filtrat, la quantité de permanganate oxydation d'autres substances nécessaires, le nefenolice.

La détermination de **l'acide ascorbique** dans les produits végétaux peuvent être considérées comme la détermination de la vitamine C, à la suite de cela, il est chauffé à 60⁰ C en présence de 25 ml d'acide oxalique à 2% et une pincée de sable de quartz calciné, une quantité produit (5-20 g selon la richesse de sa teneur en vitamine C), pesait équilibre technique avec une précision de 0,01 g, bien coupé et broyer pour obtenir une pâte très fine. Dans un ballon de 100 ml d'extrait filtré obtenu.

Pour le phenotypage en serres ont été faites des infections artificielle avec champignons selon le protocole présenté par Chevalier et al. (1991). Un inoculum mixte a été utilisé pour l'inoculation. Avec une suspension de conidies de *Venturia inaequalis* a été pulvérisé sur les jeunes plants de 4-5 vraies feuilles.

Pour le genotypage, avant a été fait l'isolement de l'ADN sur les génotypes ne ayant présenté pas des symptômes dans le phénotype de la plante. L'ADN a été quantifié a NanoDrop puis révélé en gel elictroforeză 2%. Un kit de Applied Biosystems amplification avec des amorces spécifiques pour la détection de gène *Vf* a été utilisé pour effectuer la reacton PCR.

1.4. Resultats

L'utilisation de variétés de pommes anciennes (les mieux adaptées aux conditions climatiques de la Roumanie) dans le processus d'amélioration peut être une prémisse intéressante pour induire une résistance génétique à *Venturia inaequalis*, et d'autres maladies. Infection artificielle de ces variétés et hybrides peut fournir des informations sur le mécanisme de défense de la plante contre les infections pathogènes.

Les résultats les plus importants issus de ce travail sont:

1. En ce qui concerne l'étude du comportement des anciennes variétés, la pomme domestique avec une résistance génétique à la maladie en termes de croissance et de la capacité de fructification afin de reformuler et de promouvoir les programmes de sélection le plus précieux pour l'obtention de nouvelles variétés mieux adapté aux conditions spécifiques de notre

pays étaient en outre mis en évidence un certain nombre de variétés ne présentait des symptômes sur les fruits et les feuilles ce sont les variétés: : “ Kniș”, „Favoritul lui Polocsay”, „Wachsman Amelie”, „Wachsman Sammeling”, „Trotușe”, „Mohorât”. Un autre groupe de variétés dans des conditions de terrain a montré une résistance moyenne de *Venturia inaequalis* sont: „Anisovska”, „Dulci de Rădășeni”, „Segheșe”, „Pokomake”, „Roșior Călugăresc”, „Mere Tari”, „Cernenko”, „Măr Orbai”, „Verzi de Rădășeni”, „Nobile de Geoagiu”, „Roșii de Geoagiu”, „Trotușe” etc.

Le plus interessantes d'entres eux ont été utilisés dans les programmes de sélection pour obtenir des descendance hybride pour montrer leurs caractères précieux et en particulier la résistance *Venturia inaequalis*.

2. En termes d'évaluation de la qualité des fruits pour déterminer le plus viable plans de pollinisation les résultats ont été trouvés:

- le plus grand poids des fruits a été enregistrée par variétés "Renet orange» avec 165,47 g, suivie par la variété "Turnu» avec 158,70 g et la variété "Venchi» avec 156,45 g. Les fruits étaient les plus faibles enregistré la variété "Prescurate" avec 73,37 g.

Quellques variétés anciennes ont des fruits grandes, et la variété anume 298.6 g pour "Knis" suivie par la variété «Mar Orbai» avec 268,2 g suivie par la variété „Ancuța „ avec 222,6 g et "Fara Nume "avec 210,2 g, mais les fruits sont pétillante.

3. En ce qui concerne la **substance sèche soluble** valeur la plus élevée a enregistré la variété "Wachsman Amalie" avec 28,5%. suivie par la variété 'Roșu de Cluj avec "27,1% et "Fără Nume "avec 24,2%.

- En termes de fruit soluble teneur en matières solides est observé que les valeurs les plus élevées sont enregistrées dans la variété "Coadă scurtă» avec 20,6%, suivie par la variété 'Roșu Marin " avec19,0% et " Renet Portocaliu "avec 18,7% pour les variétés du groupe en 2013, la valeur la plus élevée enregistrée une variété "Wachsman Amalie" de 28,5%. suivie par la variété 'Roșu de Cluj avec "27,1% et " Fără Nume "avec 24,2%. et la plus part ont monter leurs caractères précieux et en particulier la résistance *Venturia inaequalis*.

- En termes de contenu en vitamine C est observé que comme le fruit progresse pendant leur stockage, la vitamine C diminue considérablement tous les 10 jours. La valeur la plus élevée en termes de teneur en vitamine C a été enregistrée par la variété "Andrișer» avec 36, 63 mg / 100 g pp, suivie par la variété "Iridium" avec 36,37 mg / 100 g pp.

La vitamine C est très instable et sa présence est également une indication de la fraîcheur des fruits. La teneur en vitamine C en nature «Gurguiate» était inférieure à 14,52 mg / 100g pp que la variété "Trotuse" à la fin de la durée d'une valeur de 35,32 mg / 100g pp.

1. En ce qui concerne la participation des anciennes variétés de recherche dans le processus de sélection de la pomme a été menée au cours de trois années de champ pollinisation contrôlée, l'hybridation avec nous et explorer d'autres sources de résistance comme certaines anciennes variétés de pommes, ils étant: “Amelie Wacsman” , “Gurguiate”,

“Fără nume”, “Mohorât”, “Nobile de Geoagiu”, “Favoritul lui Plocsay” etc. Tous ces résultats démontrent que, malgré un grand nombre de fleurs pollinisées, le nombre de graines obtenue était très très faible, ce qui est lié à la technologie agricole appliquée au cours de la saison de végétation. Par conséquent endroit où la pollinisation se fait est développements extrêmement importants dans la recherche et l'obtention de résultats.

2. D'après les résultats du phénotypage fait après l'infection artificielle avec *Venturia inaequalis* sur les anciennes variétés de pommes et les descendances hybrides noter que:

- ceux qui ont été rendues résistantes à la tavelure descendances de croisements aussi issue d'une variété sensibles (tels que «Idared») et une ancienne variété (" Favoritul lui Poloscaj ») démontre que la variété a une résistance récessive " Favoritul lui Poloscaj " a des allèles qui se manifeste. Aussi pour la variété locale «Mar Orbai" qui a été croisée avec une variété résistante "Géneros". Il soulève plusieurs hypothèses sur la résistance génétique à la suppression de la tavelure dans les espèces de pommes.

- après avis de l'infection artificielle qu'un certain nombre de variétés telles que "Prescuratele", "Turnu", "Venchi", "Gurguiate", "Rosu Marin» et «Sangeriu" a montré une certaine résistance génétique à *Venturia inaequalis*, montrant la classe 0 de résistance;

3. En ce qui concerne la concentration de l'ADN dans les deux variétés de pommes de parents et descendants ont montré que certaines valeurs sont plus élevées pour les parents d'hybrides, avec la plus grande valeur sur la variété 'Florina' à 2402,5 ng / µl, suivie par la variété «Gurguiate» avec des valeurs de 1937,9 ng / µl, puis la variété "Prescurate" avec 829,9 ng / µl par rapport aux valeurs hybrides simples centaines de 205,0 ng / µl la combinaison HCl 1-5, et le plus faible a été enregistré dans la combinaison 1-2 HCl 64,0 ng / µl. Parmi les variétés anciennes, variété "Turnu" pour montrer une valeur de 179,1 ng / µl, suivie par la variété « Calvil alb" avec des valeurs de 161,1 ng / µl, puis la variété "Varga" avec 155,0 ng / µl par rapport variétés Roşu Marin 12,6 ng / µl suivie par la variété Sălcium avec de 51,2 ng / µl. Des valeurs proches en concentrations d'ADN génomique ont été enregistrés pour la variété 'Nobile de Geoagiu " avec 179,1 ng / µl, suivie par la variété "Dulci de Rădăşeni" avec des valeurs de 161,1 ng / µl.

4. Améliorer la pomme, avec l'achèvement de la sélection phénotypique compléter avec la sélection au niveau moléculaire (sélection MAS - Sélection assistée par marqueurs), est plus en sécurité avec des offres spéciales et de l'efficacité. MAS sélection peut être effectuée à ne importe quel stade de croissance des plantes, y compris très jeune de phase, lorsque les hybrides sont dans la serre, de sorte qu'une grande partie de la matière biologique peut être enlevé et transféré dans le champ seulement plantes présentant les caractéristiques désirées et économisent- sont des parcelles de temps de terre, le travail, respectivement des sommes considérables. Le succès de détection gène *Vf* par PCR a été confirmé que dépend la qualité et la quantité d'ADN isolé pendant les procédures.

La structure des gènes hétérozygotes *Vf* a été confirmée entre les variétés. La manifestation de la réaction de génotypes hétérozygotes étudiés où gène *Vf* est probablement dû à un haut degré de pollinisation libre dans le genre *Malus*. La structure a été détectée dans les homozygotes clairement un grand nombre de lignées avec différents niveaux de résistance. Il est important d'utiliser plus de PCR avec les quatre amorces (A, B, C, D) en mélange.

1.5. Les conclusions se résument à :

- en Roumanie, dans l'améliorant se utilise largement comme donneur de résistance à la tavelure variétés de pommes avec gène majeur *Vf*.

- les combinaisons hybrides " Idared x Prescurate " et « Idared x Gurguiate » ont été obtenus en utilisant deux aspects génétiques hétérozygotes. Homozygotes dominants ont également été détectés par la fréquence de test de PCR. Pour les homozygotes récessifs a noté que dans les deux combinaisons hybrides était de 25% et 35%, respectivement.

- marqueurs spécifiques AL-07, AM-19 et U1400 ont révélé la présence d'un gène *Vf*, hybrides issus de variétés avec une résistance génétique ("Géneros" et "Florina"), aussi les hybrides F1 ont été obtenus à partir de croisements entre les deux variétés résistantes, ou de croisements entre eux et des variétés résistantes ou "Prescurate", "Gurguiate", "Trotuse"

- le marqueur AL 07 est une amorce co-dominante qui peut être utilisée pour distinguer les homozygotes de hétérozygote,

- pour un premier screening concernant la présence de génotypes du gène *Vf* chez les anciennes variétés de pommes et de la descendance hybride en dérive est recommandé couples marqueurs U1400 et AM 19, puis de différencier les génotypes hétérozygotes homozygotes peut être utilisé amorce AL 07 en tant q' une amorce codominante.

Le marquage moléculaire pour le gène d'intérêt est une première étape dans l'isolement et le clonage de gènes pour des banques génétiques nécessaires pour obtenir des gènes souhaités être incorporés et conservés pendant une période de temps.