

REZUMATUL TEZEI de doctorat cu titlul :
“ EVALUAREA UNOR SOIURI LOCALE VECHI DE MĂR DIN PUNCT DE
VEDERE AL REZISTENȚEI LA BOLI.”

ING. MANAFU DAN – PETRIȘOR

Cuvinte cheie: soiuri autohtone, clase de rezistență, rezistență genetică, *Venturia inaequalis*, descendențe hibride, inoculare, SSR, markeri moleculari, izolare ADN genomic, rapăn, PCR, fenotipaj, genotipaj.

1.1. Introducere

Una din cele mai periculoase boli prezente în livezile de măr este rapănul mărului (*Venturia inaequalis*). Această boală poate cauza pierderi de recoltă de peste 30% în livezile neglijate unde se creează condiții favorabile de dezvoltare. În livezile de măr se fac numeroase tratamente în fiecare an pentru a evita pierderile materiale cauzate de refuzul la export al fructelor atacate de această ciupercă. (Albert F., 1993)

Pentru controlul acestui patogen fungic major al fructelor o strategie genetică folosită este selecția speciilor rezistente la rapănul indus de *Venturia Inaequalis* (Cke.) Wint. Există ipoteza că *Vf* este o genă moștenită care conferă reacții de clasă 3 și că pentru a ajunge la reacții de clasă 1, și 2 sunt alte gene adiționale care cresc efectul *Vf*, bazându-se pe diferite observații ca urmare a mai multe încrucișări cu părinți cu gena *Vf*. Rezistența *Vf* a fost interpretată de către Tenzer I., și colab 1993 ca fiind „ rezultatul unei reacții hipersenzitive, iar intensitatea răspunsului hipersenzitiv este consolidată de gene cantitative moștenite cumulat”.

1.2. Obiective

Obiectivul propus este să studiem o serie de aspecte privind comportarea unor soiuri vechi autohtone cu rezistență parțială la boli pentru a veni în sprijinul micilor producători de fructe în special, care nu au resurse financiare mari și uneori nici cunoștințe de specialitate în protecția plantelor, în vederea obținerii de noi soiuri rezistente la boli, mai bine adaptate la condițiile de la noi din țară cu o eficiență cost/productivitate mai mare în cultură. Ne-am stabilit o serie de obiective sintetice în vederea reevaluării și promovării lor în procesele de ameliorare, în sprijinul acestui obiectiv major, dintre care:

- monitorizarea particularităților de creștere și fructificarea unor soiuri vechi de măr rezistente: “Turnu”, “Sălciu”, “Venchi”, “Iridium”, “Vânători 48”, etc.
- studiul calității fructelor;
- folosirea ca genitori în noi procese de hibridare a celor mai interesante soiuri vechi autohtone;
- la soiurile studiate s-a izolat ADN-ul genomic;

- evaluarea fenotipică a descendențelor hibride noi
- în urma infecțiilor artificiale cu *Venturia inaequalis* evaluarea fenotipică a descendențelor hibride noi.

- monitorizarea în urma infecțiilor artificiale cu *Venturia inaequalis*,
- la soiurile vechi de măr luate în studiu s-a realizat selecția asistată cu markeri moleculari.

În ultimele decenii, atât pe plan mondial cât și în țara noastră, obținerea unor fructe biologice sau ecologice benefice consumatorilor a devenit preocupări de bază ale cercetătorilor amelioratori.

Necesitatea studiului implicării în procesele de ameliorare a acestor soiuri de măr cu rezistență genetică la boli cu o comportare bună chiar în condiții de netratăre cu fungicide și, ca urmare cu o reducere importantă a consumului de pesticide și a poluării mediului, este îndreptățită în vederea obținerii de genotipuri din ce în ce mai competente pentru noua viziune a unei agriculturi biologice competitive pe piața mondială.

1.3. Material si metode

Materialul vegetal folosit în studiu este constituit din:

► soiuri vechi românești, într-un număr suficient de mare, identificate și colectate din diferite zone ale țării cum sunt: “Venchi”, “Iridium”, “Prescurate”, “Gurguiate”, “Roșu Marin”, “Calvil alb”, “Transimre”, “Andrișer”, “Renet portocaliu”, “Varga”, “Sălcium”, “Turnu”, “Vânători 48”, “Prescurate”, “Gurguiate”, “Viești”, “Cormose”, “Seghese”, “Trotuse”, “Fără nume”, “Măr Orbai” etc.

► polen de la unele genotipuri de măr și unele populații locale “Prescurate” și “Gurguiate”, “Trotuse” precum și *Malus pumila*, *Malus niedzwetzkyana*, *Malus sylvestris*.

Material patogen

Ciuperca *Venturia inaequalis* ce produce boala numită rapăn. Boala se poate manifesta pe frunze, pe sepale, pe fructe, pe peduncul, și mai rar pe lăstari. Pete caracteristice, cafenii - olivacee, acoperă frunzele atacate pe ambele fețe, care devin brun-negricioase cu timpul, cu aspect catifelat; sunt mici și multe, confluează, reducând posibilitatea de hrănire a pomului și ocupând o mare suprafață din frunză.

Metode de lucru

După relația: G/V , (g sau kg)/(ml sau l) a fost făcută determinarea greutății specifice.

Cantitatea de **substanță uscată totală** este reprezentată gravimetric în primul caz sau procentual în al doilea caz, ca diferență dintre greutatea materialului de analizat și apa pierdută prin uscare, respectiv dintre 100 și procentul de apă găsit.

Substanța uscată solubilă a fost determinată pe cale refractometrică.

Determinarea **acidității totale** titrabile se realizează prin metodele curente care se bazează pe titrarea directă a produselor, sau a unui extract sau diluat rezultat pe socoteala acestora, cu o soluție alcalină de concentrație cunoscută.

Se folosesc metode volumetrice (titrimetrice) de neutralizare pentru aplicarea practică a acestui principiu, și potrivit acestora, pe calea neutralizării reciproce a lor se realizează determinarea cantitativă a acizilor sau bazelor.

Determinarea substanțelor polifenolice pe cale indirectă este asigurată prin metoda permanganometrică, astfel: se stabilește mai întâi cantitatea de permanganat de potasiu necesară oxidării tuturor substanțelor (fenolice și nefenolice) din produsul supus analizei. După aceea, prin folosirea cărbunelui activ, se înlătură din material, prin filtrare, substanțele tanante și colorante și se stabilește, în filtrat, cantitatea de permanganat necesară oxidării celorlalte substanțe, cele nefenolice.

Determinarea acidului ascorbic în produsele vegetale poate fi considerată, ca fiind determinarea vitaminei C, ca urmare a acestui fapt, se încălzește la 60 °C în prezența a 25 ml acid oxalic 2% și a unui vârf de cuțit de nisip de cuarț calcinat, o cantitate de produs (5-20 g potrivit cu bogăția sa în vitamina C), cântărită la balanța tehnică cu o precizie de 0,01 g, bine mărunțit și se mojarază până se obține un terci foarte fin. Într-un balon cotat de 100 ml se filtrează extractul obținut.

Pentru fenotipaj, în seră au fost făcute infecții artificiale respectându-se cerințele conform protocolului prezentat de Chevalier et al. (1991). Un mix de inoculare a fost folosit pentru inoculare. Cu o suspensie de conidii de *Venturia inaequalis* CKE au fost pulverizate plântuțele tinere de 4-5 frunze adevărate.

Pentru genotipaj, în prealabil a fost efectuată izolarea ADN-ului la genotipurile care nu au manifestat simptome în fenotipul plantei. La nanodrop a fost cuantificat ADN-ul, iar apoi revelat în gel de electroforeză 2%. Un kit de amplificare de la Applied Biosystems cu primeri specifici pentru punerea în evidență a genei *Vf* a fost folosit pentru realizarea PCR-ului.

1.4. Rezultate

Folosirea soiurilor vechi de măr, (cel mai bine adaptate la condițiile pedoclimatice din România) în procesele de ameliorare poate fi o premiză interesantă pentru inducerea rezistenței genetice la *Venturia Inaequalis*, dar și a altor boli. Infecțiile artificiale ale acestor soiuri și hibrizi pot oferi informații despre mecanismul de apărare al plantelor în fața infecțiilor patogene.

Rezultatele cele mai importante care se desprind din această lucrare sunt:

1. În ceea ce privește studiul comportării unor soiuri vechi, autohtone de măr cu rezistență genetică la boli sub aspectul capacității de creștere și rodire, în vederea reformulării lor și promovării în programele de ameliorare a celor mai valoroase, pentru obținerea de soiuri noi

mai bine adaptate la condițiile specifice alte țării noastre s-au evidențiat o serie de soiuri care nu au manifestat simptome pe fructe și pe frunze cum sunt soiurile: „Knîș”, „Favoritul lui Polocsay”, „Wachsman Amelie”, „Wachsman Sammeling”, „Trotușe”, „Mohorât”. Un alt grup de soiuri care în condiții de câmp au manifestat o rezistență medie la *Venturia inaequalis*, sunt: „Anisovska”, „Dulci de Rădășeni”, „Segheșe”, „Pokomake”, „Roșior Călugăresc”, „Mere Tari”, „Cernenko”, „Măr Orbai”, „Verzi de Rădășeni”, „Nobile de Geoagiu”, „Roșii de Geoagiu”, „Trotușe” etc.

Cele mai valoroase dintre acestea au fost folosite în programele de ameliorare pentru obținerea de descendențe hibride care să manifeste caractere valoroase ale acestora dar mai cu seamă rezistența la *Venturia inaequalis*.

2. În ceea ce privește evaluarea calității fructelor, pentru stabilirea celor mai viabile scheme de polenizare au fost evidențiate rezultatele:

Fructele soiurilor vechi sunt mari, și anume 298.6 g la soiul „Knîș” urmat de soiul „Măr Orbai” cu 268.2 g urmat de soiul „Ancuța” cu 222.6 g și „Fără nume” cu 210.2 g, dar sunt acidulate.

Alte determinări în ceea ce privește **greutatea** fructelor au fost înregistrate de soiurile « Renet Portocaliu » cu 165,47 g, urmat de soiul « Turnu » cu 158,70 g și soiul « Venchi » cu 156,45 g. Fructele cele mai mici au fost înregistrate la soiul « Prescurate » cu 73,37 g;

3. În ceea ce privește substanța uscată solubilă valoarea cea mai ridicată a înregistrat-o soiul „Wachsman Amalie” cu 28.5 %. urmat de soiul „Roșu de Cluj” 27.1 % și „Fără nume” cu 24.2%

Alte valori în ceea ce privește conținutul fructelor în **substanță uscată solubilă** se observă la soiurile „Coadă scurtă” cu 20,6%, urmat de soiul „Roșu Marin” cu 19,0 %, „Renet Portocaliu” cu 18,7 %; din grupa soiurilor din 2013, valoarea cea mai ridicată a înregistrat-o soiul „Wachsman Amalie” cu 28.5 %. urmat de soiul „Roșu de Cluj” 27.1 % și „Fără nume” cu 24.2%.

Vitamina C este destul de instabilă iar prezența acesteia este, de asemenea, o indicație de prospețime la fructe . Conținutul de vitamina C la soiul "Gurguiate" a fost mai mic de 14.52 mg/100g pp decât la soiul "Trotuse" la sfârșitul perioadei de depozitare cu o valoare de 35.32 mg/ 100g pp

Aceasta demonstrează că, **conținutul în vitamina C**, scade pe măsură ce fructele avansează pe parcursul păstrării lor, aceasta scade vertiginos la fiecare 10 zile. Cea mai mare valoare în ceea ce privește conținutul în vitamin C a fost înregistrată de soiul « Andrifișer » cu 36, 63 mg/100 g p.p. urmat de soiul « Iridium » cu 36,37 mg/100 g p.p.

4. În ceea ce privește implicarea unor soiuri vechi de măr în procesul de ameliorare cercetările au fost derulate pe parcursul a 3 ani de polenizări controlate în câmp, prin noi hibridări, explorând alte surse de rezistență cum ar fi unele soiuri vechi de măr, ele fiind “Amelie Wacsman” , “Gurguiate”, “Fără nume”, “Mohorât”, “Nobile de Geoagiu”, “Favoritul lui Plocsay” etc. Toate aceste rezultate demonstrează că deși au fost polenizate un număr important de flori numărul de semințe obținute a fost foarte foarte redus, ceea ce are legătură cu agrotehnica aplicată pe timpul perioadei de vegetație. De aceea locația unde se efectuează polenizările este extrem de importantă pentru evoluția cercetărilor și obținerea rezultatelor.

5. Din **rezultatele privind fenotipajul** făcut în urma infecțiilor artificiale cu *Venturiainaequalis* atât la soiurile vechi de măr cât și asupra descendențelor hibride observăm că:

- obținerea de descendențe rezistente la rapăn din încrucișarea unui soi sensibil (cum este “Idared”) și un soi vechi (“Favoritul lui Polosca”) demonstrează faptul că soiul “Favoritul lui Polosca” manifestă alele de rezistență recesivă. La fel și în cazul soiului autohton “Măr Orbai” care a fost încrucișat cu un soi rezistent “Generos” . Aceasta ar ridica mai multe ipoteze privind controlul rezistenței genetice la rapăn în ce privește specia măr.

- în urma infecțiilor artificiale observăm că un număr de soiuri cum sunt “Prescuratele”, “Turnu”, “Venchi”, “Gurguiate”, “Roșu Marin” și “Sângeri” au manifestat o oarecare rezistență genetică la *Venturia inaequalis*, încadrându-se în clasa 0 de rezistență;

6. În ceea ce privește concentrația de ADN genomic la soiurile de măr atât părinții cât și unii descendenți au demonstrat că valorile sunt mai mari la părinți față de hibrizi, cu valoarea cea mai mare la soiul “Florina” cu 2402,5 ng/μl, urmat de soiul “Gurguiate” cu valori de 1937,9 ng/μl, apoi de soiul “Prescurate” cu 829,9 ng/μl, față de hibrizii cu valori doar de ordinul sutelor 205,0 ng/μl, în cazul combinației H C I 1-5, iar valoarea cea mai mică a fost înregistrată în cazul combinației H C I 1-2 cu 64,0 ng/μl. Între soiurile vechi, soiul “Turnu” a înregistrat 179,1 ng/μl, urmat de soiul “Calvil alb” cu valori de 161,1 ng/μl, apoi de soiul “Varga” cu 155,0 ng/μl, față de soiurile « Roșu Marin » de 12,6 ng/μl , urmat de soiului « Sălcu » cu 51,2 ng/μl. Valorile apropiate ale concentrației de AND genomic au fost înregistrate la soiul “Nobile de Geoagiu” de 179, 1 ng/μl, urmate de soiul “Dulci de Rădășeni” cu valori de 161,1 ng/μl.

7. Pentru ameliorarea mărilor, completarea selecției fenotipice cu cea efectuată la nivel molecular (selecția MAS - Marker Assisted Selection), conferă siguranță și eficiență deosebită. **Selecția MAS poate fi efectuată** în orice stadiu de creștere a plantelor, inclusiv în fază foarte tânără, când hibrizii sunt în seră, astfel că o mare parte din materialul biologic poate fi eliminat, fiind transferate în câmp numai plantele care prezintă caracteristicile dorite și economisindu-se timp, suprafețe de teren, muncă, respectiv fonduri bănești considerabile. Succesul detecției PCR

a genei *Vf* fost confirmat că depinde de calitatea și cantitatea ADN-ului izolat în timpul experimentelor.

Structura heterozigotă a genei *Vf*, a fost confirmată între soiuri. Motivul manifestării de genotipuri heterozigote în cazul genei studiate *Vf* este probabil, datorită unui grad ridicat de polenizare deschisă în genul *Malus*. Structura homozigotă a fost detectată în mod neechivoc la un număr important de descendențe cu grad diferit de rezistență. Important este să se utilizeze mai multe PCR-uri cu toate cele patru amorse (A, B, C, D).

1.5. Concluziile se referă la:

- în România amelioratorii folosesc intens ca donor de rezistență la rapăn soiuri de măr cu gene majore *Vf*.

- combinațiile hibride : “Idared x Prescurate” și “Idared x Gurguiate” au fost obținute prin folosirea a două aspecte genetice heterozigote. Homozigoții dominanți au fost, de asemenea, detectați prin testul PCR. S-a observat că frecvența homozigoților recesivi în ambele combinații hibride a fost de 25 și 35%, respectiv.

- markerii specifici AL-07, AM-19 și U1400 au pus în evidență prezența genei *Vf* la hibridii proveniți din soiurile cu rezistență genetică (“Generos” și “Florina”), indiferent dacă hibridii F1 au provenit din încrucișări între cele două soiuri rezistente, sau din încrucișări dintre acestea și soiuri fără rezistență respectiv ”Prescurate”, “Gurguiate”, “Trotușe”

- markerul AL 07 este un primer codominant care poate fi folosit pentru diferențierea homozigoților de heterozigoți,

- pentru un prim screening în ceea ce privește prezența genei *Vf* la genotipurile soiurilor vechi de măr dar și la descendențele hibride obținute din acestea se recomandă folosirea cuplurilor de markări AM 19 și U1400 urmand ca apoi pentru diferențierea genotipurilor homozigote de cele heterozigote, se poate folosi primerul AL 07 care un primer codominant.

Marcarea moleculară a genelor de interes este un prim pas în vederea izolării și clonării genelor pentru obținerea unor bănci în care să fie încorporate genele dorite și conservate pe o durată mare de timp.