

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Etude des déterminants structuraux et génétiques de la texture de la pomme

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie, Biologie des Organismes

Spécialité : Biotechnologie agroalimentaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Didiana GALVEZ LOPEZ

Le 15 Juin 2011, devant le jury ci-dessous

Président	SIMIER Philippe, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs	COSTES Evelyne, Directrice de Recherche, INRA Montpellier
	VAN CUTSEM Pierre, Professeur, FUNDP Belgique
Examineurs	DIRLEWANGER Elisabeth, Chargé de Recherche, INRA Bordeaux
	GLOAGUEN Vincent, Professeur, Université de Limoges
Encadrants	Marc LAHAYE, Directeur de Recherche, INRANantes
	François LAURENS, Ingénieur de Recherche, INRA Angers

Directeur de thèse : Dr. Marc LAHAYE

ED : 495-VENAM

Ce travail de thèse a été développé au centre de recherche Angers-Nantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), au sein de l'unité Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA-Nantes) dans l'équipe 'Parois Végétales' et de l'UMR Génétique et Horticulture (Gen-Hort Angers) dans l'équipe 'Qualité des Fruits'. Cette thèse a été dirigée par M. Marc Lahaye et co-encadrée par M. François Laurens.

Liste de publications et communications

Publications scientifiques:

1. **Gálvez-López Didiana**, Laurens François, Devaux Marie Françoise, Lahaye Marc. **2011. Deciphering apple texture through instrumental, sensory and histological phenotyping in an apple progeny during storage**. *Euphytica*. *Accepted*.
2. **Gálvez-López Didiana**, Laurens François, Quémener Bernard, Lahaye Marc. **2011. Genetic variability of cell wall polysaccharides in an apple progeny**. *Plant Science*. *Submitted*.
3. **Galvez-Lopez Didiana**, Lahaye, Marc, Lasserre Pauline, Laurens François. **2011. Quantitative trait loci for texture attributes and cell wall structures in apple**. *Tree Genetics and Genomics*. *In process*.

Communications orales:

1. **Gálvez-López, D.**, Lahaye, M., Laurens, F. **Quantitative trait loci identification for cell wall determinants in apple texture**. Journée Jeunes Chercheurs BIA 2010. Nantes, France. Juin 15.
2. **Gálvez-López, D.**, Lahaye, M.; Mathis, F.; Devaux, M.; Quemener, B.; Bertrand, D.; Laurens, F. 2010. **Identification of Qtls for Cell Wall Determinants in Apple Texture**. 28th International Horticultural Congress, Lisbon-Portugal, 22-27 August 2010.
3. **Gálvez-López, D.**, Lahaye, M., Laurens, F. **Analisis de los determinantes estructurales y genéticos de la textura de la manzana**. Conference. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politecnico Nacional. Reynosa, Mexique. Septembre 27, 2010.
4. **Galvez-Lopez Didiana**, Lahaye Marc, Pauline Lasserre, Bernard Quémener, Laurens François. **Bases génétiques des composantes de la qualité de la texture chez la pomme**. Journée Réseau Française des Parois 2011. Lille, France. Juin 16-18, 2011.

Comunication par affiches:

1. **Gálvez-López, D.**, Quéméner B., Devaux M. F., Bertrand D., Laurens F., Lahaye M. 2009. **Variability of cell wall determinants of texture in an apple progeny**. 4th. ISAFRUIT General Assembly. Angers, Francia. Octobre 27-29.

2. **Gálvez-López, D.**, Laurens F., Lahaye M. 2010. Analyse des déterminants génétiques de la qualité de la texture chez la pomme. Doctorial 2010. Sablé sur Sarthe. Juin 27- Juillet 3, 2010.

REMERCIEMENTS

A l'issue de ces trois années de recherche, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à ma formation académique, scientifique, personnelle et culturelle. Cette grande aventure a été possible grâce au concours de nombreuses personnes que je tiens à remercier énormément. Malgré les difficultés trouvées, je tire un bilan largement positif de cette expérience.

J'exprime tout d'abord toute ma reconnaissance et mes remerciements au Dr Marc Lahaye, mon directeur de thèse, par son encadrement, sa disponibilité et son aide dans la réalisation de ce travail ambitieux, en assurant au quotidien le suivi des recherches et la rédaction de ce mémoire. Il m'a guidé dans l'apprentissage d'un sujet complètement nouveau mais passionnant pour moi. Sa rigueur scientifique a été une source de motivation et d'encouragement dans ma formation.

Je remercie également le Dr François Laurens pour son co-encadrement et son intérêt pour ce travail au cours duquel il m'a confié ce projet captivant et m'a accueilli en France dans son équipe de travail. Grâce à lui j'ai beaucoup appris sur la génétique des fruits. Je le remercie de sa rigueur, ses conseils et sa curiosité scientifique qui m'ont beaucoup apporté.

Je remercie toute mon équipe de travail 'Paroi Végétale' à l'INRA de Nantes pour l'encadrement dans l'utilisation des méthodes et des équipements concernant les polysaccharides pariétaux et histologiques. Pour l'ambiance chaleureuse, pour l'aide et surtout pour le précieux soutien dans les moments difficiles. Merci à tous.

Je remercie aussi toute mon équipe de travail 'Qualité des Fruits' à l'INRA d'Angers pour sa disponibilité et l'encadrement dans l'utilisation du matériel et méthodes phénotypiques et génétiques de cette thèse. Pour son encouragement et soutien dans les 3 ans.

Merci à M^{me} Elizabeth Chevreau (Directrice de GenHort) et M. Jacques Guéguen (Directeur de BIA) qui m'ont accueilli au sein de ces laboratoires et à travers eux, à l'Unité BIA et l'UMR GenHort qui m'ont permis de mener à bien mes recherches.

Je tiens à remercier le CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) du Mexique, pour avoir financé mes études de doctorat à travers la bourse octroyée dans ces trois ans de thèse

Merci au projet Européen Isafruit pour avoir financé mon travail technique, mes déplacements, les congrès internationaux et nationaux tout au long des trois ans de thèse.

Je remercie les membres de mon comité de thèse : Estelle Bonnin, Catherine Renard, Mondher Bouzayen, Mathilde Causse, Charles-Eric Durel, Pascale Guillermin, qui ont suivi l'avancement de

mon travail et pour l'intérêt qu'ils ont porté pendant les trois ans de recherche.

Je tiens à remercier également Evelyne Costes et Pierre Van Cutsem, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Merci à Philippe Simier, Elisabeth Dirlewanger et Vincent Gloaguen, examinateurs, d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie Dr Netzahualcoyotl Mayek-Perez pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant les trois mois de stage doctoral au Mexique. Merci de m'avoir toujours encouragé et pour tous vos conseils. Merci aux membres de son équipe de travail pour leur accueil.

Je remercie les nombreux collègues permanents et non permanents, doctorants, post-doctorants et étudiants avec qui j'ai pu interagir toutes ces années à Nantes et à Angers. Merci à ceux qui sont devenus plus que des collègues de travail et mes amis pour leur soutien, leur attention au quotidien et les bons moments ensemble. J'emporte avec moi de bons souvenirs de la France au Mexique. Merci à mes amis mexicains, qui m'ont toujours soutenu avec leurs conseils, leurs prières, leurs encouragements, etc. A semilla de Mostaza Reynosa et Bilbao pour être toujours avec moi.

Je remercie aussi le foyer Marguerite d'Anjou pour m'avoir accueilli pendant la dernière année et demie de ma thèse à Angers. Merci de votre soutien, pour m'avoir intégré à la communauté des jeunes filles qui m'a permis de connaître et de me faire des amies inoubliables dans le monde entier. Spécialement à Katia L, Malia T, Celine M, Elodie R, Hanan H, Mathilde H, Nour, Pasca, etc.

Un merci spécial à la famille Daniel de Nantes (Sylviane, Jose, et ses enfants) qui m'a fait sentir la chaleur familiale en France et qui m'a toujours aidé dans les moments difficiles et de joie. A Mme Claudine Surlève qui m'a accueilli chez elle durant mes déplacements à Nantes, pour son encouragement, ses conseils et son affection. Merci beaucoup à la Famille Prod Homme pour sa gentillesse et affection, pour me faire connaître la Bretagne. A Marie-Jeanne Crèpeau pour ses attentions et son aide précieuse dans les corrections du français de la thèse. A Bernard Quémener qui m'a motivé dans le monde des polysaccharides avec ses enseignements, pour m'avoir partagé sa culture musicale et son côté humain; merci aussi à sa famille. A Jacqueline, Anne-Cécile, Rachelle, Estelle, Sandrine, Marenn, Cécile, Xavier, Sylvie, Claire, Pauline, Luc, Marie-Françoise, Brigitte, etc.

Remerciements à Roland Robic (le Général), Maryline Lormeau, Marie Tellier et Christophe Vilfroy qui m'ont accueilli depuis le début et dont la sympathie a rendu le travail amusant. Merci à mes copines de bureau Gaele, Marie, Paula, Cindy. Merci à Koji Kawamura pour tous ses conseils en génétique. Merci à Jean-Guillaume B, Jean-Marc Celton, Marie-Hélène S, Patricia R, Elisabeth D, Patricia V, Chantal J, Caroline D, Pauline L, Philippe G, Fabrice F, Fabrice D, Patricia, etc. Un merci spéciale à Jean-Pierre Renou pour ses conseils et dispo pour des explications en génomique. Je remercie tous les autres dont je n'ai pas mentionné le nom mais qui ont aussi participé de près ou de

loin à mon travail de thèse ou qui m'ont soutenue durant ces trois années.

Merci à Dieu pour m'avoir donné la force, le courage et les moyens pour faire cette thèse qui a été mon rêve dès mon enfance. Merci Seigneur pour m'avoir soutenu dans cette grande épreuve, pour ta miséricorde et pour être avec moi toujours.

Merci à mes parents et mes sœurs qui m'ont aidé et supporté tout le temps, pour leurs efforts fourni auprès de Felise. Cette thèse leur a permis de voir se réaliser leur rêve. Merci à Paquito Peral, Noelia, Rene, Loyda et Famille Chávez.

Je dédie de tout cœur ce travail à Felise et Raymundo Rosas, les amours de ma vie. Merci d'avoir été avec moi et de m'avoir soutenue avec votre amour tous les moments. Je vous aime.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	4
1. Enjeux de la texture de la pomme	4
2. Définitions et mesures de la texture	6
2.1. Définitions	6
2.2. Mesures de la texture	7
2.2.1. L'analyse sensorielle	7
2.2.2. Mesures instrumentales de la texture	8
2.2.2.1. Pénétrométrie	9
2.2.2.2. Compression	9
2.2.3. La Relation entre les mesures instrumentales et sensorielles de la texture	11
3. Origine et variabilité de la texture de la pomme	13
3.1. Facteurs tissulaire	14
3.1.1. Organisation cellulaire et tissulaire	14
3.2.2. Impact des tissus sur les propriétés mécaniques de la pomme	16
3.2.2.1. Anisotropie cellulaire	16
3.2.2.2 Rôle de la cuticule	18
3.2. Facteur liés aux parois cellulaires	19
3.2.1. Composition des parois	19
3.2.1.1. Réseau cellulose – hémicellulose	20
3.2.1.2. Réseau pectique	22
3.2.1.3. Protéines structurales	24
3.2.2. Rôle des assemblages pariétaux sur la cohésion et les propriétés mécaniques des cellules	25
3.2.3. Impact du remodelage enzymatique des structures pariétales sur la texture	27
3.2.4. Autre facteur cellulaire : la pression de turgescence	29
3.3. Facteurs physiologiques impliqués dans la texture de la pomme	31
4. L'amélioration génétique chez le pommier	32

5. Le déterminisme génétique de la texture des fruits	33
5.1 Estimation des paramètres génétiques : hérédibilités et corrélations génétiques	33
5.2. Apport des marqueurs moléculaires et de la génomique fonctionnelle pour la connaissance des bases de la texture des fruits	33
5.2.1 La tomate	35
5.2.2. Généralités sur les études génétiques chez les rosacées	36
5.3. QTLs de texture chez la pomme	37
6. Contexte et objectifs de l'étude.	40
7. Références bibliographiques	42

CHAPITRE II : Variation de caractères instrumentaux, sensoriels et histologiques de la texture de la pomme dans une descendance en fonction de sa conservation

Contexte	56
Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping	58
1. Introduction	59
2. Materials and methods	60
2.1 Plant material	60
2.2. Texture analysis	61
2.2.1. Sensory analysis	61
2.2.2. Instrumental texture analyses	61
2.3. Image acquisition of cellular structure of parenchyma	62
2.4 Statistical analysis	62
3. Results and discussion	62
3.1. Storage affected sensory attributes and instrumental parameters of apple texture	63
3.2. The progeny showed histological variability	64
3.3. Instrumental texture variables correlated with sensory descriptors and parenchyma cell size distribution	65
3.4. Instrumental and sensory texture variables and histology characteristics are highly heritable traits	67
3.5. Reciprocal crosses and scab selection have low impact on texture variables in the progeny	68
4. Conclusion	69
5. References	71

CHAPITRE III : Variation des déterminants structuraux de la paroi cellulaire dans une descendance de pomme 88

Contexte	89
Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicellulose fine structure in an apple progeny	90
1. Introduction	91
2. Materials and methods	92
2.1. Plant material	92
2.2. Cell wall material preparation	93
2.3. Chemical cell wall composition	93
2.4. Enzymatic degradation and mass spectrometry	94
2.5. Statistical Analysis	94
3. Results and discussion	95
4. Conclusion	98
5. Bibliography	99

CHAPITRE IV : Cartographie des déterminants structuraux et génétiques associés à la variabilité phénotypique de la texture de la pomme : caractérisation des QTL. 114

Contexte	115
1. Introduction	116
2. Materials and methods	119
2.1. Plan material and orchard location	119
2.2. Harvest period and phenotypic data collection	119
2.2.1. Sensory, instrumental and histological analysis	119
2.2.2. Polysaccharide cell wall composition and mass spectrometry	120
2.3. Genotypic data collection	121
2.4. Phenotypic data analysis	121
2.5. Genetic map construction	122
2.6. QTL analysis	123
3. Results and discussion	124
3.1. Genetic map	124
3.2. QTL results	124
3.4.1. Instrumental and sensory QTLs	125

3.4.2. QTLs for cell size	126
3.4.3. QTLs of cell wall polysaccharides	127
4. Conclusion	127
5. References	131
Conclusion générale et perspective	140
Annexes	145
Un nouveau chapitre de la thèse	146

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Pour contribuer à pallier le déficit de consommation en fruits et légumes responsable de désordres en santé publique, le projet européen ISAFRUIT (FP6-FOOD 016279-2, 2006-2010) a eu pour objectif de développer des travaux visant l'amélioration génétique des fruits, de leur culture et transformation. La variabilité de la texture des fruits étant un critère majeur limitant leur consommation, un volet de ce programme s'est consacré à en identifier l'origine chez la pomme et à développer des nouveaux outils génétiques permettant de la contrôler. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le déterminisme structural et génétique de la qualité de la texture de la pomme. L'approche générale de cette étude a consisté en un phénotypage de la texture et de ses déterminants structuraux et à en exploiter leur variabilité par la recherche de nouveaux QTL au sein d'une descendance de 150 individus. Une originalité de ce travail vise à identifier des zones chromosomiques contrôlant à la fois des caractères de texture sensorielle ou instrumentale et des variables histologiques ou biochimiques. Grâce au séquençage du génome de la pomme récemment finalisé, ces régions clés dans le contrôle de la texture permettront de cibler la recherche de gènes déterminants dans les mécanismes responsables de cette variabilité qualitative.

Le manuscrit est divisé en 4 chapitres : une synthèse bibliographique sur l'origine de la variabilité de la texture de la pomme (1), l'étude de la variabilité des caractères instrumentaux et sensoriels de la texture associée à la variabilité de paramètres histologiques en fonction de la conservation d'une descendance de pommes (2), l'étude de la variabilité de la composition et de la structure des polysaccharides des parois cellulaires de cette même descendance (3), et la cartographie de QTL associés à la variabilité phénotypique et structurale de la texture de la pomme (4). Enfin, une discussion générale permettra de relier les différents résultats obtenus, de dresser des nouvelles hypothèses sur les origines de la texture de la pomme et de proposer différents moyens pour mieux la contrôler.

Ce travail de thèse a été développé dans deux laboratoires : à l'INRA de Nantes (Biopolymères, Interactions, Assemblages ; équipe Parois Végétales) sous la direction de M. Marc LAHAYE et à l'INRA d'Angers (Génétique et Horticulture ; équipe Pommier) sous l'encadrement de M. François Laurens.

Ce travail a été financé par : le projet européen ISAFRUIT (FP6-FOOD 016279-2, 2006-2010), ainsi que par le National Council on Science and Technology of Mexico (CONACyT) au travers une bourse de doctorat.

CHAPITRE I

Synthèse Bibliographique

CHAPITRE I: Synthèse bibliographique

1. Enjeux de la texture de la pomme

De nombreux travaux épidémiologiques ont permis d'associer un régime alimentaire riche en fruits et légumes à un moindre risque de développer des cancers, des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et autres maladies chroniques (Lampe, 1999). Cette protection serait due à l'abondance dans ces végétaux de composants bioactifs, fibres alimentaires, vitamines, etc. (Dragsted et Gormley, 2010). Fort de ces résultats, un des plus grands défis actuels des programmes européens de santé publique est de promouvoir la consommation d'au moins 5 fruits et légumes par jour (Dragsted et Gormley, 2010). Dans ce contexte, la pomme présente un certain nombre d'atouts (Tableau 1). C'est une des productions fruitières européennes majeures avec 10 millions de tonnes en 2010, principalement en Italie, en Pologne et en France (FAOSTAT, 2010). Sur l'ensemble de la production française, environ 35% des pommes sont destinées à la consommation directe, 35% à l'exportation et le reste à la transformation. C'est un fruit populaire (98 % de la population française en consomme) dû à sa disponibilité tout au long de l'année, sa praticité et pour ses bénéfices sur la santé (Serrurier et Ottens., 2010). En conséquence de ce succès, les consommateurs sont devenus plus critiques sur la qualité du produit et ont développé des nouvelles exigences. Selon les consommateurs, une pomme de bonne qualité doit répondre à des critères d'apparence visuelle (attractivité), de perception organoleptique (équilibre sucre/acide, texture) et aromatique (Harker et al., 1997a). La fermeté, la farinosité, la jutosité, le croquant des pommes sont devenus des critères de texture importants qui déterminent le choix des consommateurs. Afin de répondre à ces exigences, de nombreuses recherches sont développées pour comprendre et maîtriser les facteurs biologiques, écophysologiques et technologiques qui contrôlent l'élaboration et l'évolution de la qualité du fruit tout au long de la filière de production et de commercialisation. Nombre d'entre elles se concentrent sur le développement de méthodes de mesure de la texture selon différents descripteurs ainsi que sur les origines génétiques, physiologiques, biochimiques et structurales de sa variabilité. En effet, la maîtrise de l'ensemble de ces paramètres pourrait permettre son contrôle tout au long

de la filière et, à terme, créer de nouvelles variétés de pommes répondant aux caractéristiques souhaitées.

Tableau 1. Caractéristiques nutritionnelles d'une pomme (pour 100 g de produit frais; Aprifel, 2010).

Composants	(g)	Vitamines	(mg)	Minéraux	(mg)	Apports énergétiques
Glucides	12.6	Acide ascorbique	5	Phosphore	9	54 K Calories
Protides	0.3	Carotène	0.07	Calcium	4	
Lipides	0.3	Thiamine	0.03	Magnésium	4	
Eau	84.3	Riboflavine	0.02	Sodium	3	
Fibres alimentaires	2.10	Nicotinamide	0.3	Fer	0.2	
		Acide panothénique	0.1	Cuivre	0.04	
		Piridoxine	0.05	Zinc	0.09	
		Acide folique	0.012	Manganèse	0.03	
		Tocophérols	0.5			

2. Définitions et mesures de la texture

2.1 Définition

La texture des aliments est une notion complexe qui est définie selon Bourne (1982) comme un « ensemble des caractères physiques résultant des éléments structuraux de l'aliment, évalués par la sensation de toucher avec la main ou de goûter avec la bouche, mesurés en fonction de la force, de la distance et du temps ». Szczesniak (2002) la définit comme une propriété sensorielle multi-attributs découlant de la structure de l'aliment et détectée par les sens. Ainsi, pour la pomme, la texture correspond à un ensemble de descripteurs perçus par le consommateur qui découlent de sa structure et de sa rhéologie. Les plus communs sont la fermeté, le croquant, la jutosité, le fondant, la granulosité, la fibrosité et la farinosité (Harker

et al., 2002; Mehinagic et al., 2003). La définition des principaux descripteurs sensoriels est donnée dans le Tableau 2. L'appréciation de la texture par le consommateur ne peut cependant pas être déconnectée de la perception des saveurs et des arômes. Une cartographie des préférences au Royaume-Uni a mis en lumière une segmentation des consommateurs en deux groupes : ceux qui préfèrent les pommes sucrées et fermes et ceux qui apprécient les fruits acides et juteux (Daillant-Spinnler et al., 1996). Malgré le fait que l'appréciation sensorielle d'un fruit puisse varier selon la géographie et l'origine culturelle des consommateurs (Harker et al., 1997a), l'acidité et la farinosité des pommes sont des causes importantes du rejet des consommateurs (Jeager et al., 1998).

2.2. Mesures de la texture

2.2.1. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est la méthode de référence pour évaluer les descripteurs de la texture. Les évaluations sensorielles peuvent être classées en hédoniques et analytiques. Les évaluations hédoniques sont réalisées avec des consommateurs non entraînés. Celles-ci permettent d'établir une liste de descripteurs et une échelle de préférence basées sur le goût ou l'acceptabilité d'un produit (Harker et al., 1997a). Ces évaluations ne peuvent pas être utilisées pour la détermination des propriétés des attributs spécifiques de texture. Des mesures objectives visant à évaluer de façon quantitative plusieurs descripteurs de la texture sont réalisées par un jury d'experts préalablement entraînés (Harker et al., 2002; Allan-Wojtas et al., 2003). Cette méthode présente quelques limites car la perception d'un attribut organoleptique peut varier d'un individu à un autre (Abbott et al., 1984). Afin de limiter l'impact de ces variations, des études recommandent d'augmenter le nombre d'évaluateurs (Harker et al., 1997a; Mehinagic et al., 2003). Daillant-Spinnler et al. (1996) privilégient une bonne définition des concepts de la texture à évaluer et un bon entraînement des évaluateurs pour qu'ils développent une bonne expérience et une sensibilité aux caractères sondés. Cependant, par sa lourdeur et son coût de mise en œuvre, l'analyse sensorielle n'est pas utilisée de façon courante dans la filière pomme.

Tableau 2. Descripteurs sensoriels décrivant la texture de la pomme :

Descripteur	Définition (Harker et al., 2002; Mehinagic et al., 2003; Kouassi et al., 2009, Lormeau, Laurens Com. Pers.)
Fermeté	Force requise pour mordre dans l'échantillon
Croquant	Croustillant à la première morsure, plus la quantité du bruit de cette morsure avec les dents de devant
Jutosité	Quantité de jus libéré de la chair dans les trois premières bouchées
Fondant	Force requise pour écraser la chair de la pomme non pelée entre la langue et le palais.
Grain	Perception physique des grains de la chair dans la bouche
Fibre	Perception physique de la fibre de la chair dans la bouche
Farinosité	Perception de la chair sèche et farineuse

2.2.2 Mesures instrumentales de la texture

Diverses méthodes instrumentales existent pour mesurer la texture du fruit. Initialement développées pour suivre et classer les fruits en fonction de leur fermeté tout au long de la filière, diverses méthodes instrumentales ont été développées pour évaluer un potentiel de conservation, de transport et de commercialisation du fruit ainsi que pour mieux appréhender les attentes des consommateurs vis-à-vis de la texture (Harker et al., 1997a).

Les méthodes de mesure de la texture ont été classées en deux catégories : les méthodes non-destructives et les méthodes destructives (Camps et al., 2005). Les techniques non destructives sont récentes et toujours en phases exploratoires. Les plus connues sont l'imagerie multi spectrale, la spectroscopie proche infra rouge (McGlone et al., 2002; Peirs et al., 2005; Camps et al., 2007), la sonométrie et la mesure acoustique (Abbott et al., 1992). La plupart de ces méthodes sont développées pour mesurer des caractéristiques biochimiques ou organoleptiques comme la couleur, la teneur en sucres solubles et la fermeté. Elles s'appuient sur divers types de traitements des signaux, des analyses chimiométriques adaptées et des

modèles statistiques pour l'interprétation des résultats (Hertog et al., 2008). S'agissant de l'évaluation de la texture, ces méthodes restent marginales au sein de la filière car elles nécessitent une mise en œuvre experte.

Les méthodes destructives sont plus couramment utilisées dans la filière, dues à leur simplicité de mise en œuvre, leur rapidité et leur coût. Ces méthodes sont basées sur la mesure de la résistance mécanique du fruit lorsque celui-ci est soumis à une déformation résultant par exemple, d'un test de poinçonnage, de compression, de cisaillement, d'écrasement ou d'extrusion. Ces mesures sont généralement exprimées par une force ou une déformation (Harker et al., 1997b). Les méthodes destructives les plus communes sont la pénétrométrie et la compression.

2.2.2.1 Pénétrométrie

La pénétrométrie consiste à mesurer la force exercée lorsqu'un poinçon de forme et de taille déterminé est enfoncé à une vitesse prédéterminée et constante dans le fruit à analyser. Ce poinçon est souvent cylindrique avec le bout convexe et est introduit dans la chair du fruit sur une profondeur allant de 7 à 11.1 mm (Harker et al., 1997b; Mehinagic et al., 2003; Camps et al., 2005). Ces mesures réalisées à l'équateur du fruit (Bourne, 1982), donnent lieu à des courbes reliant le déplacement à la force mesurée (Figure 1A). Celles-ci diffèrent si le fruit est épluché ou non. L'analyse des courbes permet d'extraire des paramètres liés à la fermeté de la chair (Roudot et al., 1991; Harker et al., 1997b; Camps et al., 2005) dont les six principaux sont donnés dans le Tableau 3 avec leur interprétation. La pénétrométrie est la méthode de référence utilisée par la profession pour évaluer la fermeté des pommes. Ses grands avantages sont sa rapidité de mise en œuvre et la possibilité d'être appliquée sur le terrain.

2.2.2.2 Compression

Le test de compression consiste à mesurer la force de résistance du fruit placé entre deux plateaux se déplaçant à une vitesse constante. La déformation du fruit est donnée par le rapport entre la variation de hauteur de l'échantillon à sa hauteur initiale (Harker et al., 1997b). Le test de compression est effectué sur le fruit complet ou sur un échantillon test. Les résultats obtenus sont des courbes reliant la force à la déformation, à partir desquelles sont

extraits des paramètres caractérisant la fermeté du fruit (Figure 1B ; Roudot et al., 1991). Certains auteurs ont développé une méthode à double compression. Des essais de fatigue réalisés sur le produit, ont permis la mise en œuvre de deux cycles de compression successifs. Ces essais ont mis en évidence que la majorité de la déformation élastique (recouvrance totale de la déformation après la sollicitation mécanique) survient lors du premier cycle et que le second est représentatif d'un comportement viscoélastique (la réponse à la sollicitation mécanique dépend du temps ; non-recouvrance totale de la déformation du fait de la contribution visqueuse à la réponse mécanique). Dans cette étude, les tests ont montré que la réalisation des deux cycles peut s'avérer nécessaire pour caractériser le comportement d'un produit, mais qu'au-delà de deux cycles, aucune information supplémentaire n'est fournie (Roudot and Duprat, 1990; Harker et al., 1997a). Chacune des deux cycles de la double compression est composé de deux étapes : la charge, présentant le comportement du fruit lorsqu'on lui applique une déformation, et la décharge, correspondant au comportement du fruit lors du retour à la déformation initiale. A partir de cette courbe, plusieurs paramètres sont obtenus : le coefficient d'élasticité (la pente lors de la charge), l'énergie de déformation (intégrale de la courbe de charge), l'hystérèse (énergie dissipée dans le fruit au cours du cycle de charge et décharge) et la résilience (aire sous la courbe lors de la décharge). La définition des points clés est donnée dans le Tableau 3.

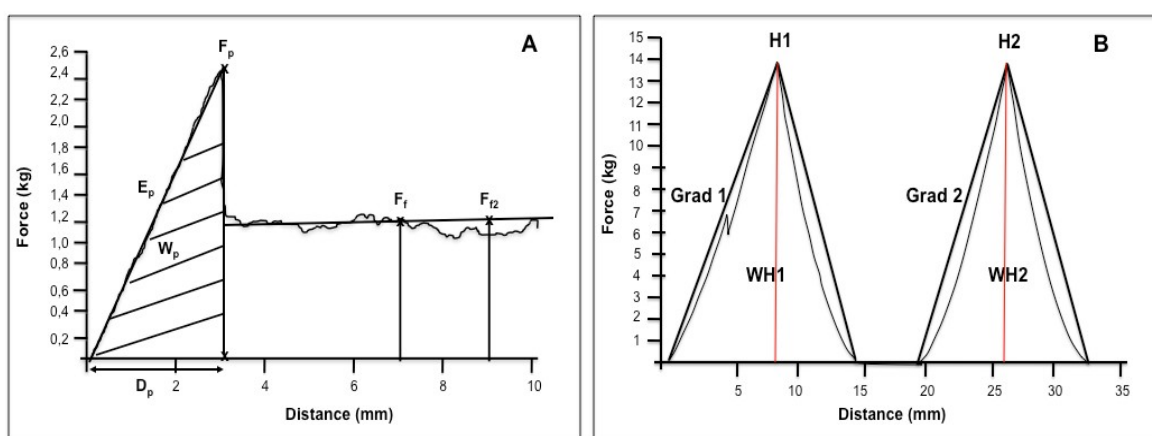


Figure 1. (A) Courbe de pénétrométrie avec les paramètres clés de fermeté étudiés ; (B) Courbe de test de double compression (Harker et al., 2002; Mehinagic et al., 2004; Camps et al., 2007).

Tableau 3. Définitions des paramètres de compression et pénétrométrie

Paramètres	Définitions (Mehinagic et al., 2004; Camps et al., 2005)
Courbes de pénétrométrie	
Fp (Kg)	Force maximale sur la courbe permettant de rompre la peau du fruit et de pénétrer dans la chair du fruit
Dp (mm)	Déformation associée à Fp avant rupture de la peau
Wp (Kg.mm)	Aire sous la courbe entre 0 et Fp. Travail mécanique pour pénétrer dans la chair du fruit
Ep (Kg.mm-1)	Pente de la courbe entre 0 et Fp représentative de l'élasticité du tissu
Ff (Kg)	Force mesurée à 7 mm de déformation
Ff2 (Kg)	Force mesurée à 9 mm de déformation
Courbes de double compression	
H1 (Kg)	Force maximale de la première compression
H2 (Kg)	Force maximale de la seconde compression
WH1 (Kg.mm)	Aire sous la première courbe de charge/décharge
WH2 (Kg.mm)	Aire sous la seconde courbe de charge/décharge
Grad1 (Kg.mm-1)	Pente de la phase de charge de la première compression
Grad2 (Kg.mm-1)	Pente de la phase de charge de la seconde compression

2.2.3. Relations entre les mesures instrumentales et sensorielles de la texture

Des méthodes de mesures instrumentales de la texture permettant de prédire la perception d'attributs sensoriels sont actuellement recherchées. Elles sont motivées par la nécessité de développer des mesures de contrôle - qualité pertinentes vis-à-vis de la texture, au plus proche des exigences de la filière et des consommateurs (Harker et al., 1997a). Elles cherchent également à mieux définir les déterminants structuraux responsables de ces perceptions.

Des corrélations permettent de suivre certains attributs de la texture de la pomme tout au long de la filière. Par exemple, la fermeté et le croquant sont les caractères les mieux estimés par des tests de pénétrométrie, de cisaillement et de compression (Harker et al.,

1997a; Mehinagic et al., 2004). Cette approche corrélative a été étendue à d'autres descripteurs sensoriels de la texture. Ainsi, Barreiro et al (1998) ont établi des modèles statistiques pour prédire la fermeté, la farinosité et la jutosité de la pomme à partir d'une combinaison de paramètres de compression et de sonométrie. D'autre part, Harker et al. (2002) ont trouvé des corrélations fortes entre le croquant, la jutosité initiale et le jus libéré au cours de la mastication avec des mesures de traction et de pénétrométrie. D'autres auteurs (Mehinagic et al., 2004) ont observé que des mesures pénétrométriques étaient mieux corrélées aux descripteurs de «résistance au toucher », de fondant et de croquant à la récolte alors que la compression permettait de mieux prédire la farinosité et la jutosité développées pendant le stockage des fruits. Plusieurs études rapportent également des corrélations entre des mesures sensorielles et instrumentales de la texture (Camps et al., 2005; Ioannides et al., 2007; Billy et al., 2008). Cependant, la variabilité des juges dans les jurys de dégustation, l'hétérogénéité des fruits au sein du lot ou du fruit des zones testées par les approches instrumentales et sensorielles peuvent présenter des limites dans ces approches (Harker et al., 2002) et affecter les corrélations (Abbott et al., 2004). Des facteurs écophysiologiques et biologiques peuvent également être à l'origine de variations de texture des fruits en fonction des années de récolte et conduire à la nécessité de ré-établir des calibrations entre méthodes instrumentales et perceptions sensorielles.

Une démarche analogue est réalisée entre perceptions sensorielles et mesures physiques non-destructives (spectroscopie IR, spectroscopie laser, acoustique). Elle est toutefois moins développée due à la combinaison de la complexité des signaux mesurés, de leur interprétation au regard des caractères sensoriels et des modèles statistiques nécessaires (Harker et al., 1997a; Mehinagic et al., 2003).

A ce jour, les méthodes instrumentales destructives restent les mieux corrélées aux mesures sensorielles (Abbott et al., 1984; Barreiro et al., 1998; Harker et al., 2002; Mehinagic et al., 2004) puisqu'elles s'approchent, d'une certaine façon, des effets de la mastication. Cependant, devant la nécessité de coupler plusieurs méthodes instrumentales à des modèles statistiques nécessitant des calibrations spécifiques par expérience, le recours à l'évaluation sensorielle reste une méthode incontournable en recherche pour décrire et évaluer au plus près la texture d'un fruit (Harker et al., 1997a). Dans ce contexte, le développement de mesures instrumentales pour la détermination des caractères sensoriels de la texture reste encore un défi. De meilleures connaissances sur les relations entre les différents niveaux de structure des

fruits et les mécanismes de perception de la texture permettront d'avancer dans la conception de nouvelles méthodes de mesure instrumentales plus pertinentes.

3. Origine et variabilité de la texture de la pomme

Comme pour tout autre aliment, la qualité de la texture de la pomme trouve son origine dans les caractéristiques physiques et chimiques du fruit à différentes échelles (Figure 2) (Waldron et al., 2003). Plusieurs revues de synthèse ont été consacrées à ce sujet et l'objectif de cette partie est de résumer les principaux éléments clés.

Réduite aux propriétés mécaniques, la texture des fruits résulte de la nature des tissus, de la taille et de l'arrangement des cellules, de l'épaisseur et des comportements mécaniques (rigidité, adhésion) de la paroi cellulaire et de la turgescence cellulaire. A ces caractéristiques qui ont été largement étudiées dans différents modèles de fruits, s'ajoute un facteur dynamique lié au développement et à la maturation des fruits. La pomme étant un fruit climactérique, elle subit des modifications majeures lors de sa maturation. Celle-ci est initiée par un accroissement de la respiration cellulaire du fruit et par la production d'éthylène. A partir d'un certain seuil cette hormone initie plusieurs programmes génétiques qui conduisent à la régression de l'amidon, au métabolisme des acides organiques, de la chlorophylle, à la synthèse de pigments et au désassemblage pariétal. Ce dernier point impliquant diverses enzymes et protéines clés contrôlant la texture (Vicente et al., 2007) a été plus particulièrement étudié sur la tomate, compte tenu des facilités de manipulation (Saladie et al., 2007; Matas et al., 2009).

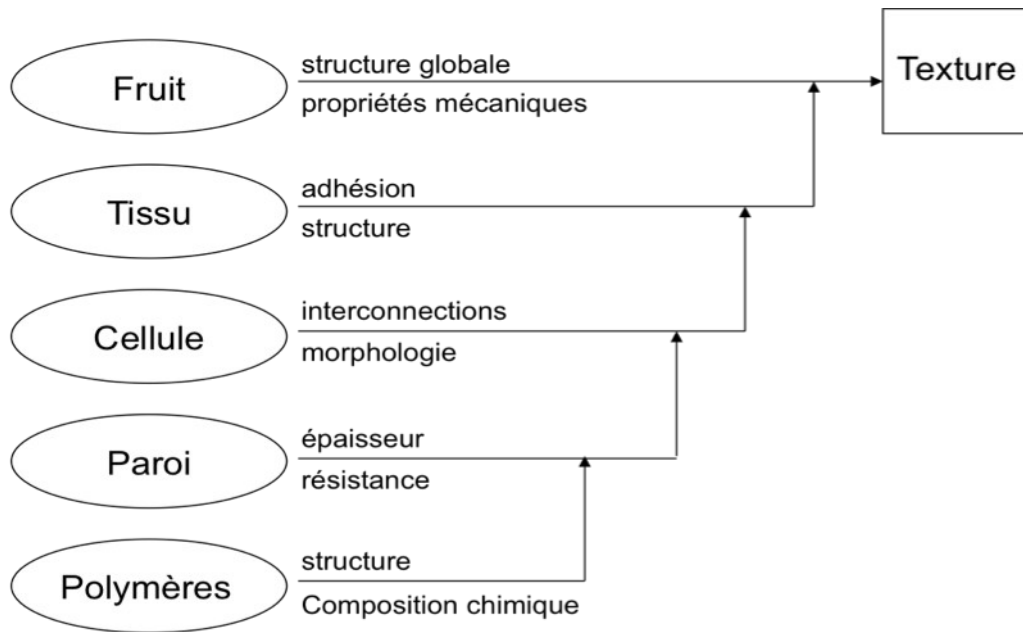


Figure 2. Représentation schématique des différents niveaux de structure contribuant aux propriétés mécaniques des tissus.

3.1. Facteurs tissulaires

3.1.1. Organisation cellulaire et tissulaire

Le pommier (*Malus domestica*) appartient à la famille des Rosacées, la sous-famille des Spiraeoideae et la tribue des Pyreae (Potter et al, 2007). Son fruit est complexe proche de la baie et porte le nom générique de piridion. C'est un fruit charnu sans noyau dur, qui provient de la fécondation d'un ovaire infère à cinq loges (Smock, 1950). Au cours de la formation du fruit, les tissus se différencient en cinq structures principales : le cœur, les vaisseaux conducteurs, le parenchyme, le derme (épiderme et hypoderme) et la cuticule (Figure 3). La proportion de ces tissus et leur organisation évoluent lors du développement de la pomme (Harker et Ferguson, 1988). Le grossissement du fruit se manifeste par l'expansion cellulaire et par des changements de forme et d'agencement cellulaire (Pitt, 1982). Les cellules parenchymateuses possèdent une paroi fine non lignifiée, dont l'épaisseur varie entre 0,4 μm et 1 μm , et une grande vacuole contenant près de 90% de l'eau. Les parois des cellules

voisines sont séparées entre elles par une région morphologique distincte appelée « lamelle moyenne » (Huber, 1983). Dans le fruit mature, le parenchyme représente la majeure partie du fruit. Il se caractérise par des cellules à peu près sphériques de 50 μm de diamètre en moyenne au niveau externe du parenchyme. Dans cette région, les espaces intercellulaires sont également de morphologie relativement homogène. En progressant vers l'intérieur du fruit, la taille des cellules augmente (~ 300 μm de diamètre) puis elles s'allongent radialement vers le cœur du fruit formant ainsi des structures en colonne (Figure 3). La limite séparant les cellules sphériques du parenchyme de celles qui forment la structure en colonne se situerait entre 5 mm et 10 mm sous la cuticule, en fonction de la variété de pomme (Khan and Vincent, 1990).

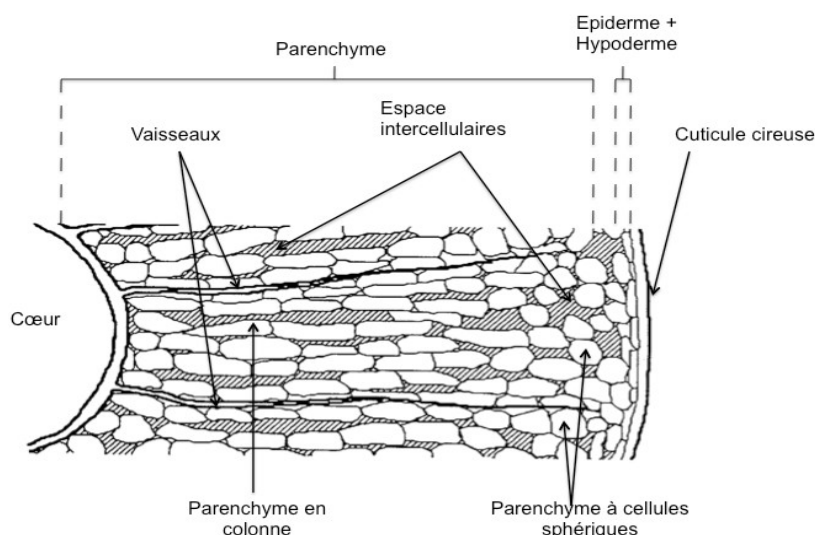


Figure 3. Représentation d'une section radiale du cortex de la pomme illustrant la variation de la taille des cellules, les espaces intercellulaires et leur orientation en fonction de leur profondeur (Image modifiée de Khan et Vincent, 1990).

3.2.2. Impact des tissus sur les propriétés mécaniques de la pomme

3.2.2.1. Anisotropie cellulaire

Les structures cellulaires du parenchyme de la pomme ont été associées aux propriétés mécaniques du tissu (Vincent, 1989). Khan et Vincent (1990) ont montré que la morphologie des cellules et des espaces intercellulaires dans la pomme affectait son comportement mécanique selon l'orientation de la sollicitation. Les tissus sous compression radiale supportent une déformation plus importante avant de rompre que lors d'une compression tangentielle. De façon similaire, Abott et Lu (1996) ont comparé l'orientation (radiale et tangentielle), la profondeur (allant de l'épiderme vers l'endocarpe) et la latitude (allant de la cuvette pédonculaire vers la cuvette oculaire) du prélèvement de tissu sur l'élasticité et la déformation à la rupture de 3 variétés de pommes : Golden Delicious, Delicious et Rome Beauty. L'élasticité des tissus est plus grande et la déformation à la rupture plus faible lorsque les tissus sont comprimés de façon radiale. Les échantillons prélevés près de l'endocarpe ont une élasticité et déformation à la rupture significativement plus grandes que ceux prélevés plus près de l'épiderme. En effet, les cellules proches de l'endocarpe sont mieux organisées, avec un espace intercellulaire réduit comparé à celles proche de l'extérieur du fruit. Ces auteurs montrent également que l'anisotropie cellulaire des pommes est plus prononcée dans la section équatoriale des fruits que dans les cuvettes (pédonculaire et oculaire).

La grande proportion d'espaces intercellulaires est une caractéristique du parenchyme de la pomme. Celle-ci varie de 15 à 40% du volume total du fruit en fonction de la maturité et de la variété (Harker et al., 1997a). Cette macroporosité évolue lors du développement et de la maturation du fruit. Les actions conjointes des remaniements pariétaux et de la pression de turgescence conduisent à une décohésion des parois cellulaires avec pour conséquence une augmentation de la sphéricité des cellules. Outre les modifications des propriétés mécaniques intrinsèques aux parois, ces changements de morphologie et de densité de zones de contact cellulaire contribuent à la texture des fruits. Harker et Hallet (1992) ont montré qu'une tension appliquée à un fruit mûr provoque des fractures majoritairement liées à un détachement cellulaire alors que sur des fruits plus jeunes, juteux ou croquants, une telle sollicitation provoque des fractures principalement liées à la rupture des cellules. Ce mode de

fracture liée à la perte d'adhésion cellulaire confère à la pomme une texture farineuse (Harker and Hallett, 1992). D'autres auteurs ont attribué une texture blette à un fruit dont le parenchyme est riche en cellules sphériques.

Les tissus vasculaires (xylème, phloème) peuvent également contribuer aussi à l'anisotropie du parenchyme des fruits charnus. Ces tissus traversent transversalement la chair des fruits, depuis les principaux faisceaux conducteurs en leur conférant ainsi une texture fibreuse. La présence de tissus de type sclérenchymateux donne généralement aux fruits une texture granuleuse telle que retrouvée chez la poire et la goyave et est souvent associée à une grande fermeté du fruit (Martin-Cabrejas et al., 1994; Harker et al., 1997a). Cependant, chez la pomme, l'influence de ces tissus est négligeable sur la texture (Harker et al., 1997a).

Différentes approches de modélisation numérique ont été mises en œuvre pour mieux appréhender l'impact de l'organisation du tissu et de l'arrangement cellulaire ainsi que la relation entre ces variables sur les comportements mécaniques de parenchymes. Plusieurs auteurs (Wenian et al., 1991) ont modélisé la structure histologique du parenchyme de pomme pour évaluer l'impact de la géométrie des assemblages cellulaires lors d'une compression uniaxiale. Ils ont montré que les lignes de fractures engendrées lors de la déformation du tissu sont dépendantes de l'arrangement cellulaire et de la proportion des espaces intercellulaires. Wu et Pitts (1999) ont modélisé par la méthode des éléments finis la déformation du parenchyme de la pomme soumis à une compression. Cette modélisation a pris en compte la géométrie des cellules, leur hétérogénéité au sein du tissu et la pression de turgescence dans le comportement du parenchyme à la compression. Le modèle obtenu permet de simuler des déformations du parenchyme proche de celles qui sont mesurées expérimentalement. Toutefois ce type de modélisation se heurte à l'analyse histologique du fruit qui est difficilement quantitative et donc statistiquement peu représentative du fruit.

D'autres travaux ont été réalisés pour mettre en relation la morphologie cellulaire avec le ramollissement du fruit (Choi and Yun, 2004), ses propriétés sensorielles (Allan-Wojtas et al., 2003; Mann et al., 2005) et son comportement rhéologique (Zdunek and Umeda, 2005). Ces études ont nécessité des mesures de tailles, de formes, de distribution et d'arrangement cellulaire à partir d'images. Dans la tomate, Allende et al. (2004) ont montré que les propriétés micromécaniques (contrainte et déformation à la rupture) de différentes sections du péricarpe (cuticule, épiderme, hypoderme et parenchyme) étaient fonction de paramètres

géométriques cellulaires obtenus à l'échelle de la microscopie optique. Pour pallier aux difficultés de représentativité des images à cette échelle, Devaux et al. (2008) ont développé une méthode de prise d'image de tissu à l'échelle du cm^2 associé à une analyse d'image permettant de mesurer des tailles moyennes et des distributions cellulaires. McAtee et al. (2009) ont développé une méthode basée sur l'isolement enzymatique des cellules à partir de tissu et sur leur mesure morphologique par analyse d'image. Cette méthode, appliquée à cinq variétés de pommes, indiquerait que la taille cellulaire serait indépendante de la fermeté, et que les tissus composés de cellules avec une forme angulaire tendraient à être plus fermes.

3.2.2.2 Rôle de la cuticule

La cuticule joue un rôle important dans la physiologie du fruit et dans sa texture. Chez la pomme, elle est constituée d'une matrice de triglycérides et d'une épicuticule cireuse, dont le composant principal est le biopolymère cutine. Cette épicuticule forme l'interface naturelle entre le fruit et son environnement. Elle permet de limiter les pertes en eau en limitant la surface de perméabilité et de transpiration (Blackman and Parija, 1928; Schreiber et al., 1999). Différents facteurs, comme les conditions environnementales et les conditions de stockage, sont susceptibles de modifier la structure et la composition chimique de la cuticule influençant le temps de conservation et la qualité du produit. La composition chimique peut varier d'une variété de pomme à l'autre mais aussi en fonction de l'année de récolte (Veraverbeke et al., 2001). La cuticule fournit un support structural et donne la capacité mécanique au fruit pour résister au stress de déformation par compression ou pénétration (Matas et al., 2004). Pour les fruits comme la tomate le raisin ou la cerise, la cuticule (en association avec l'épiderme et le sur-épiderme) contribue à la résistance mécanique du fruit mûr. Lopez-Casado et al. (2010) a récemment proposé un modèle numérique simulant les propriétés mécaniques de la cuticule de tomate en prenant en compte l'influence de la température et de l'hydratation. Ce modèle montre que l'arrangement macromoléculaire des biopolymères est déterminant dans le comportement mécanique de la cuticule.

3.2. Facteurs liés aux parois cellulaires

Les parois cellulaires contribuent de façon importante aux propriétés mécaniques des tissus. La nature et l'assemblage de leurs constituants contribuent à la rigidité des cellules face à la pression de turgescence ainsi qu'aux mécanismes d'adhésion cellulaire impliqués dans la cohésion des tissus. Les parois cellulaires subissent d'importants remodelages tout au long du développement des fruits et en particulier lors de sa maturation (Harker et al., 1997a; Carpita et McCann, 2000; Brummell et Harpster, 2001; Johnston et al., 2002a; Jarvis et al., 2003; Goulao et Oliveira, 2008) .

3.2.1. Composition des parois

Les parois de parenchyme de pomme sont principalement de type « primaires », c'est-à-dire souples, hydrophiles et non lignifiées. Cette paroi est un assemblage macromoléculaire poreux essentiellement composé de polysaccharides et comprenant également des protéines structurales, diverses enzymes et d'autres métabolites pondéralement mineurs (lipides, enzymes, ions, sucres) et de l'eau (Carpita et McCann, 2000). C'est une structure dynamique fortement remaniée durant les différents stades du développement du fruit (développement, maturation, sénescence ; Harker et al., 1997a). Au cours de la croissance cellulaire, sous la contrainte de la pression de turgescence et des différentes enzymes pariétales, des liaisons existantes entre les polysaccharides sont rompues ou réorganisées, et des polysaccharides nouvellement synthétisés sont insérés parmi ceux qui étaient déjà présents. De ce fait, les cellules peuvent croître en longueur sans que la rigidité de leur paroi soit affectée (Jarvis et al., 2003).

Trois réseaux principaux de polysaccharides interagissent pour constituer la paroi primaire : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Figure 4).

3.2.1.1. Réseau cellulose - hémicellulose

La cellulose des parois primaires est considérée comme l'armature rigide de la paroi. Elle représente environ 15 à 30% de la matière sèche des parois primaires (Carpita et McCann, 2000). Elle est composée par des chaînes de β -(1-4)-D-glucanes organisées par des liaisons hydrogènes en microfibrilles semi cristallines (Figure 5). Cette organisation confère à la cellulose une résistance aux dégradations physiques, chimiques et enzymatiques (Harris et Bronwen, 2006). La structure ordonnée et l'organisation des microfibrilles ainsi que leur orientation sont à l'origine des propriétés mécaniques de la paroi (Emons et Mulder, 1998).

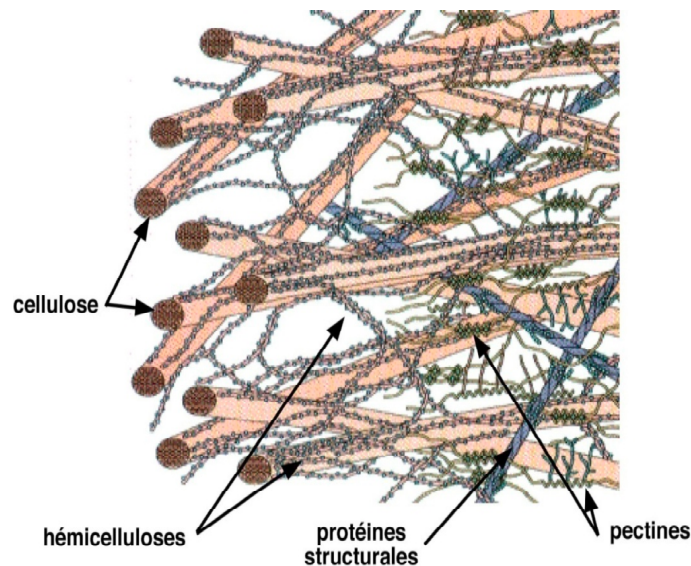


Figure 4 : Représentation schématique de la paroi cellulaire. (Carpita et McCann, 2000)

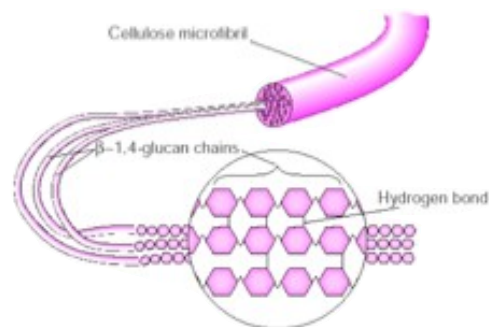


Figure 5: Représentation schématique des microfibrilles de cellulose (Carpita et McCann, 2000).

Les hémicelluloses sont composées de trois familles de polysaccharides : xylanes, mannanes et xyloglucanes. Les xylanes sont des polysaccharides pariétaux quantitativement mineurs dans les parois des dicotylédones. Ils sont formés d'une chaîne principale de β -(1,4)-D-xylopyranose. Selon la nature des substituants et leur agencement, il existe deux types de xylanes : les arabinoxylanes et les glucuronoarabinoxylanes. Dans les deux cas, des résidus α -L-arabinofuranose et/ou d'acide (4-O-méthyl) α -D-glucuronique ramifie la chaîne xylane en O-2 et/ou O-3. D'autre part, les mannanes sont des polymères de β -(1,4)-D-mannopyranose. Ils peuvent être sous la forme de copolymères avec du glucose (β -(1,4)-D-mannopyranose- β -(1,4)-D-glucopyranose ; glucomannanes) et ramifiés par du galactose (galactoglucomannanes; Scheller et Ulvskov, 2010 ; Figure 6). Les arabinoxylanes et (galacto-gluco)mannanes sont présents en quantités de traces dans les parois cellulaires de la pomme (Voragen et al., 1986) et leurs structures fines restent encore méconnues. Les xyloglucanes sont les hémicelluloses majeures des parois de pommes (Voragen et al., 1986; Renard et al., 1992). Ce sont des chaînes de β -(1-4)-D-glucanes substituées en O-6 principalement par des résidus α -D-xylopyranose. Ces ramifications peuvent être également substituées par des résidus β -D-galactopyranose ou des disaccharides comme le α -L-fucopyranose-(1,2)- β -D-galactopyranose (Figure 6). Une nomenclature des structures composant les xyloglucanes a été établie en fonction des différentes chaînes latérales présentes (Fry et al., 1993). Les structures de base les plus représentées dans la pomme sont exposées sur le Tableau 4. Les hémicelluloses peuvent aussi comporter des groupements acétyles sur les résidus galactosyles, arabinosyles et glucosyles (O'Neill and York, 2003). Ces trois différentes hémicelluloses interagissent par des liaisons hydrogènes avec la cellulose et forment un réseau cellulose-hémicellulose. Celui-ci s'inscrit dans un réseau pectique.

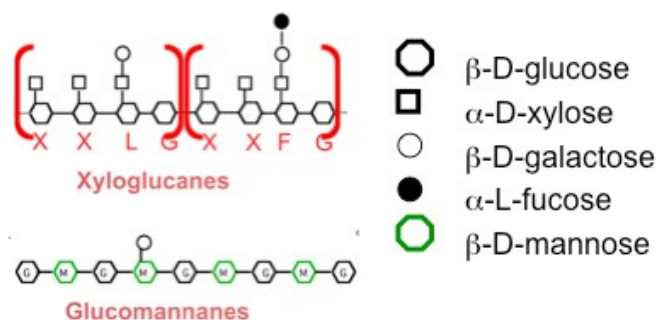


Figure 6. Représentations structurales des xyloglucanes et glucomannanes.

3.2.1.2. Réseau pectique

Les pectines sont les constituants majeurs de la paroi en représentant environ 30 de la matière sèche des parois des fruits charnus et sont constituées de trois domaines structuraux: les homogalacturonanes (HGs) qui représentent la structure la plus abondante et les rhamnogalacturonanes de type I et de type II (RGsI et RGsII). Les pectines régulent la porosité, l'hydratation et le pH des parois par leurs charges (Carpita et McCann, 2000). Elles ont aussi un rôle mécanique qui assure l'adhésion cellulaire (Jarvis et al., 2003). Le squelette homogalacturonane (HG) est constitué de 85 à 250 acide α -(1-4)-D-galacturonique (Bonnin et al., 2002) souvent substitués par des groupements méthyles esters sur la fonction acide et plus rarement acétylés sur les hydroxyles libres d'acides uronique (Figure 7A ; Voragen et al., 1986). Un degré d'estérification par le méthanol (DM) définit le nombre de fonctions acides méthyl-estérifiées pour 100 unités d'acide galacturonique. Plus le DM est faible, plus les HGs ont la capacité à dimériser par l'intermédiaire des ions calcium et forment ainsi un réseau tridimensionnel (« gel ») qui contribue aux propriétés mécaniques et à la rigidité de la paroi (Jarvis et al., 2003). Outre le DM, la répartition des méthyl-esters joue un rôle important dans la capacité des HG à dimériser (Slavov et al., 2009). Cette répartition doit jouer un rôle prépondérant dans la pomme pour laquelle le DM moyen des HG est élevé (DM 65-80 ; de Vries et al., 1981; Renard et Thibault, 1993). La lamelle moyenne ainsi que les zones de jonction cellulaires sont riches en homogalacturonanes ; ces derniers joueraient un rôle important dans l'adhésion cellule-cellule (Willats et al., 2001; Jarvis et al., 2003) et par extension, dans la texture des fruits. Dans le cas particulier de la pomme, des esters d'acide

acétique et des ramifications par le xylose substituant partiellement l'acide galacturonique (Schols et al., 1995). La présence de ces substituents perturbe la dimérisation des HGs et contribuerait à la dissociation cellulaire (Renard et al., 1990; Willats et al., 2001; Willats et Knox, 2003). D'autres ramifications par des chaînes latérales d'oses complexes contenant du rhamnose existent et sont à l'origine de la dénomination rhamnogalacturonane II. Ce domaine minoritaire jouerait un rôle dans le contrôle de la porosité pariétale par sa capacité à former des dimères via le borate et le calcium (Fleischer et al., 1999). Le squelette du domaine structural rhamnogalacturonane de type I (RGI) est constitué d'acide α -(1,4)-D-galacturonique alternant avec le α -(1,2)-L-rhamnose (Figure 7B). Ce dernier porte fréquemment des ramifications de chaînes de β -(1,4)-D-galactopyranose, de α -(1,5/1,3/1,3,5)-L-arabinofuranose et/ou d'arabinose et de galactose. Des interactions entre ces chaînes latérales et la cellulose ont été montrées in-vitro révélant un rôle potentiel de ces domaines pectiques dans le contrôle des propriétés mécaniques de la paroi (Zykwinska et al., 2005).

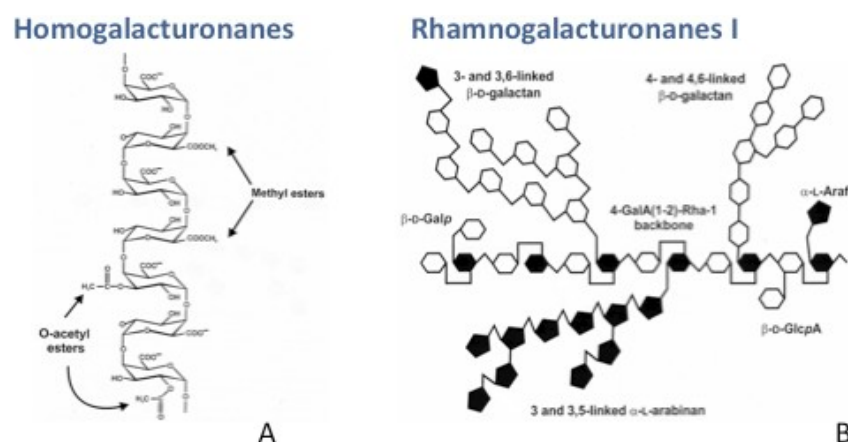


Figure 7 : Représentation des principaux domaines structuraux des pectines : (A) Homogalacturonane : chaîne d'acide α -D-galacturonique lié 1->4, partiellement méthyle esterifiée. (B) Rhamnogalacturonane I : chaîne d'acide α -D-galacturonique lié 1->4 alternant avec de α -L-rhamnose lié 1->2; ramification de chaînes latérales galactane/arabinane liées au rhamnose.

Tableau 4. Nomenclature des structures principales des xyloglucanes de pomme selon Fry (Fry et al., 1993). **G** = β -D-glucose, **X**= α -D-xylose, **L**= β -D-galactose, **F**= α -L-fucose.

Chemical structure	Code
$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}$	G
$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}-\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)}^{\uparrow}$	X
$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)}^{\uparrow}$	L
$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}-\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)}-\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)}^{\uparrow}$	F

3.2.1.3. Protéines structurales

La paroi cellulaire contient également des protéines enzymatiques et structurales. Ces protéines constituent entre 2 et 10% de la paroi (Waldron et al., 2003). Il existe quatre classes principales de protéines structurales ou assimilées: les protéines riches en proline (PRPs), les protéines riches en hydroxyproline (HRGPs), les protéines riches en glycine (GRPs) et les arabinogalactanes (AGPs).

Les HRGPs, appelée « extensines », constituent le type de protéine structurale le plus étudié. Ces protéines sont glycosylées par l'arabinose dont le degré de polymérisation peut varier de 1 à 4 et par le galactose (Waldron et al., 2003). Leurs rôles ne sont pas parfaitement connus, cependant, les HRGPs semblent être impliquées dans la protection contre les agents pathogènes, le dessèchement et dans le renforcement mécanique de la paroi. Il a été proposé que les extensines agissent comme un point d'ancrage pour les composants de lignine et les liens pectiques. Les HRGPs ont pour motif répétitif Ser-(Hyp)₄ et Tyr-Lys-Tyr, imposant les structures secondaires et tertiaires et leur conformation est du type bâtonnet rigide.

La conformation des PRPs n'est pas connue, mais leur similitude compositionnelle avec

les HRPGs indiquerait une structure en bâtonnet. Ces protéines jouent un rôle dans le développement des différents tissus tels que les vasculaires, nodules et fleurs (Waldron et al., 2003).

Les GRPs, dont certaines contiennent plus de 70 % de glycine, présentent une structure de type feuillet β à l'interface de la membrane plasmique.

Les AGPs sont souvent appelées protéoglycanes car elles sont composées de plus de 90 % de leur masse par des polysaccharides (arabinose et galactose). La partie protéique est riche en Hyp Ala et Ser. Les AGPs ont été identifiés dans les tissus végétaux, soit dans la paroi, soit associées à la membrane plasmique. Il a été proposé que les AGPs puissent jouer un rôle important au niveau de l'adhésion cellulaire (en formant par exemple des sites de nucléation pour l'assemblage de la paroi) et dans la signalisation cellulaire au cours du développement (Carpita et McCann, 2000).

Le rôle des protéines structurales dans les parois cellulaires est peu connu notamment en lien avec la texture des fruits.

3.2.2. Rôles des assemblages pariétaux sur la cohésion et les propriétés mécaniques des cellules

Lors du développement du fruit, la division cellulaire crée des nouvelles interfaces (lamelle moyenne) et des points sensibles au niveau des jonctions tri-cellulaires où la contrainte mécanique liée à la pression de turgescence est la plus forte (Figure 8 ; Jarvis et al., 2003). Les pectines particulièrement présentes au niveau de ces interfaces jouent un rôle majeur dans la cohésion cellulaire par leur capacité à dimériser avec les ions calcium. Cependant dans des phases précoces de développement des organes, la lamelle moyenne peut également être composée de xyloglucanes et de RGI non ramifiés dont les rôles dans l'adhésion cellulaire reste à identifier (Ordaz-Ortiz et al., 2009 ; Moise et al., 2010).

Des études sur modèles synthétiques de parois ont mis en lumière les rôles spécifiques des assemblages hémicellulose-pectines-cellulose dans les propriétés mécaniques des parois cellulaires. A partir de ces systèmes, Chanliaud et al. (2002) ont simulé les effets de la

pression de turgescence de la paroi primaire par une déformation biaxiale. La cellulose est le principal composé supportant la contrainte mécanique dans le réseau. Les pectines modulent l'enchevêtrement de la cellulose et permettent une réorganisation limitée des fibrilles de cellulose sous contrainte. Les xyloglucanes en interconnectant les fibrilles de cellulose diminuent la contrainte supportée par le système et permettent à celui ci sa réorganisation lors d'une sollicitation mécanique. Ces résultats montrent que les assemblages pariétaux jouent un rôle déterminant dans les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire.

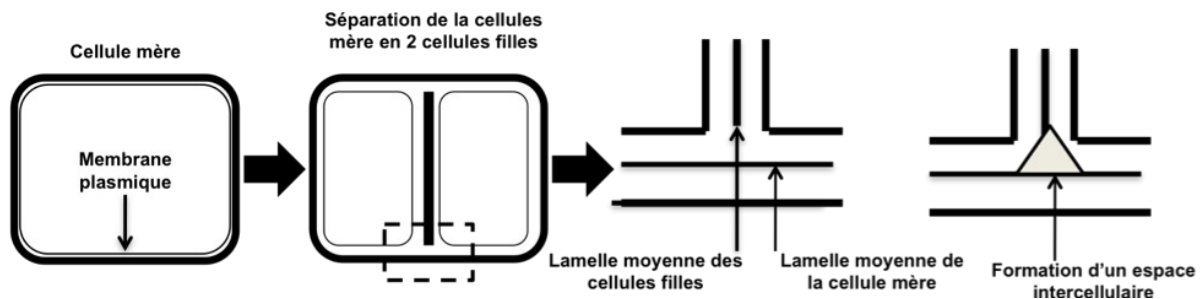


Figure 8. Séparation d'une cellule mère en deux filles et point de formation d'un espace intercellulaire (Jarvis et al., 2003).

3.2.3. Impact du remodelage enzymatique des structures pariétales sur la texture

Lors du développement et de la maturation des fruits, les assemblages pariétaux sont fortement remaniés par un consortium enzymatique et protéique affectant la structure et les interactions des pectines et des hémicelluloses (Brummell et Harpster, 2001). Ces enzymes incluent différents types d'endoglycanases coordonnées pour couper les squelettes des matrices des hémicelluloses ou pectines. Les glycosidases qui peuvent supprimer des chaînes latérales peuvent moduler les interactions entre les polysaccharides. Les transglycosylases peuvent couper des polysaccharides et reformer des liaisons entre eux. Les estérases peuvent éliminer des groupes méthyles ou acétyles à partir des polysaccharides. Ces changements réalisés de façon coordonnée affectent les propriétés physiques de la paroi cellulaire (Darley et al., 2001; Goulao et Oliveira, 2008).

Les enzymes qui modifient les réseaux de polysaccharides pariétaux sont classées en enzymes pectolytiques et non-pectolytiques, selon la classe de substrat spécifique sur lequel elles agissent. Les enzymes pectolytiques regroupent les endo- et exo- polygalacturonases, les pectate lyases, les pectine-méthylesterases, les pectines acétylsterases, les β -galactosidases et les α -L-arabinofuranosidases (Goulao et Oliveira, 2008). Ces enzymes sont capables de scinder ou de modifier la structure du squelette pectique et d'enlever des oses neutres des chaînes latérales pectiques. Les enzymes non-pectolytiques sont responsables des modifications des hémicelluloses et incluent les endo-1,4- β -D-glucanases, les endo-1,4- β -D-xylanases, les xyloglucanes endotransglycosylases/hydrolases (XETs/XTHs) et les protéines sans activité enzymatique connue, les expansines.

Au cours de la maturation des fruits, ces remaniements conduisent généralement à une solubilisation accrue des pectines et à une perte de résidus galactoses et arabinoses des chaînes latérales des domaines RGI (Yoshioka et al., 1992; Redgwell et al., 1997). La solubilisation des pectines apparaît très tôt durant la maturation avant même que la dépolymérisation soit détectable (Rose et al., 1998; Brummell et al., 2004). La dépolymérisation des homogalacturonanes résulte souvent de l'action conjointe de méthyle-estérases (PMEs) et d'endo-polygalacturonases (endo-PGs) (Brummell et Harpster, 2001) ou

de pectine/pectate-lyases (Goulao et Oliveira, 2008). La perte de ces chaînes latérales pectique par l'action de β -D-galactosidases et d' α -L-arabinofuranosidases ne semble cependant pas être à l'origine du ramollissement des fruits (Brummell et al., 2004). Outre la décohésion des cellules au niveau de la lamelle moyenne, ces modifications pectiques entraînent généralement un gonflement du volume des parois. Une réorganisation des parois impliquant plus spécifiquement le réseau cellulose-xyloglucane sous l'action des XETs/XTHs et d'expansines intervient également (Saladie et al., 2006 ; Brummell, 2006). Les XETs/XTHs catalysent la coupure et la formation de nouvelles liaisons au sein de xyloglucanes (Rose et Bennett, 1999; Saladie et al., 2006). Cependant pour que la dépolymérisation des pectines et des hémicelluloses se produise, un relâchement de la matrice cellulose-hemicellulose par les expansines apparaît nécessaire. Par exemple, dans la tomate verte, la surexpression des expansines en relation avec la maturation provoque une dépolymérisation précoce de la matrice de xyloglucanes (Brummell, 2006), probablement en permettant une accessibilité accrue des enzymes à leurs substrats pariétaux. Au moins sept isomorphes d'expansine s'expriment avec différents profils d'expression pendant la croissance et la maturité de la tomate, mais seulement *LeExp1* est spécifique du fruit et en relation avec la maturité (Goulao et Oliveira, 2008). L'expression et les mécanismes d'action des expansines, dont le rôle majeur est lié à l'expansion cellulaire, sont impliqués dans la régulation du désassemblage de la paroi cellulaire au cours de la maturation des fruits charnus. Il existe un certain nombre d'enzymes additionnelles telles que des osidases et des peroxydases, impliquées dans le remodelage de la paroi et notamment dans le phénomène de maturation et ramollissement du fruit, dont les substrats et les fonctions ne sont pas clairement connus.

Dans le cas de la pomme, les remaniements enzymatiques au cours de la maturation conduisent à une augmentation de la composition pariétale en acide galacturonique et une diminution du galactose et arabinose (Fischer et Amado, 1994; Pena et Carpita, 2004). Les différentes enzymes potentiellement associées à ses remaniements lors de la maturation du fruit ont été répertoriées par Johnston et al. (2002a ; Tableau 5). Une étude systématique a été réalisée par Goulao et Oliveira (2008) qui ont suivi les activités enzymatiques pariétales au cours du développement et de la maturation du fruit. Ils ont réalisé une analyse *in vitro* des activités enzymatiques et les ont reliées au profil d'expression génique pendant la maturation du fruit. Les résultats ont montré une augmentation coordonnée et quantitative des mRNA et des protéines associées au cours de la maturation du fruit. Cette étude fait la synthèse sur la

complexité des consortiums enzymatiques et de leurs régulations impliquées dans le remaniement pariétal associé à la maturation des fruits charnus. Ce consortium est dépendant de l'espèce de fruit.

D'autre part, l'identification des rôles spécifiques des réseaux pariétaux dans la texture des fruits a été abordée par des expériences transgéniques modulant l'expression des gènes codant les protéines enzymatiques pariétales responsables de leur remaniement (Saladie et al., 2006 ; Vicente et al., 2007). Par exemple, dans la tomate la répression du gène pTOM-6 codant la polygalacturonase spécifique à la maturation du fruit produit une diminution de la dépolymérisation des pectines (Smith et al., 1998). La surexpression de ce gène dans les mutants de maturité *rin* a rétabli l'activité des PG et la dégradation des pectines. Cependant aucune relation n'a pu être établie entre cette modulation enzymatique et le ramollissement du fruit. Cela signifie que cette polygalacturonase est fortement associée à la dépolymérisation des pectines intervenant lors de la maturation de la tomate mais n'est pas déterminante dans le contrôle du ramollissement du fruit. Dans la pomme, le mécanisme enzymatique pariétal associé à la maturation du fruit est très différent de celui de la tomate. Des pommes transgéniques qui surexpriment constitutivement le gène polygalacturonase spécifique du fruit ont été produites (Atkinson et al., 2002). Cette surexpression conduit à un effet pléiotrope en affectant d'autres tissus de l'arbre, telles que la couleur des feuilles, la formation des stomates, l'abscission des feuilles, etc. L'expression de cette polygalacturonase, dont l'activité n'est pas majeure lors de la maturation du fruit, conduit à des défauts au niveau de la structure chimique des pectines et des interactions cellulaires dans différents organes. La sous-expression de ce gène conduit à un fruit plus ferme (Atkinson et al. 2008) mais la relation de causalité entre la modulation des interactions cellulaires par celle de cette enzyme et la texture du fruit reste à être établie.

3.2.4. Autre facteur cellulaire : la pression de turgescence

La pression de turgescence est exercée par des fluides vacuolaires sur la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire. Elle dépend du potentiel osmotique cellulaire, c'est à dire de la différence de concentration en osmolytes au sein des compartiments cellulaires internes

(vacuole, cytoplasme) et externe (apoplaste). Moteur de l'expansion cellulaire dans les organes en développement, cette pression a un impact sur la déformation et sur les propriétés mécaniques des cellules et des tissus (Oey et al., 2007). Dans la tomate, elle chute avec la maturation et le ramollissement du fruit (Schackel et al., 1991) résultant d'une modification du potentiel osmotique (la transformation de l'amidon en petits métabolites; la modification de la perméabilité des membranes cytoplasmique et vacuolaire ; la modification de la concentration en osmolytes apoplastiques; la transpiration). Une telle modification de la pression de turgescence avec la maturation est également probable chez la pomme mais n'est pas connue.

Tableau 5. Enzymes modifiant les parois durant le mûrissement de la pomme (Johnston et al., 2002a).

Enzyme pariétale	Fonction	Activité au cours du mûrissement	Référence
Exo-polygalacturonase EC 3.2.1.67	Suppression du résidu galacturonosyl terminal de la pectine	Non mesurée	Bartley (1976)
Endo-polygalacturose EC 3.2.1.15	Clivage de la liaison α -1,4-galacturonosyl dans les pectines non estérifiées	Augmente	Wu et al. (1993) Atkinson et al. (1998)
Pectine methyl esterase EC. 3.1.1.11	Suppression des groupes méthyl des pectines estérifiées	Augmente	Klein et al.(1998)
Glycosidases (i.e., β -galactosidase) EC 3.1.1.23	Suppression des résidus galactosyl placés en position terminale des pectines et xyloglucanes	Augmente	Wallner (1978) Dick et al.(1990) Yoshioka et al. (1995)
α -L-arabinofuranosidase	Suppression des résidus arabinosyl et certains autres résidus de la pectine	Augmente	Yoshioka et al. (1995)
Rhamnogalacturonase I	Hydrolyse des liaisons α -1,2 entre les résidus galacturonosyl et rhamnosyl de pectine	Non mesurée	Gross et al. (1995)
Xyloglucan endotransglycosylase EC 2.4.1.207	Hydrolyse et/ou xyloglucan transglycosilase	Diminue	Percy et al. (1996)
Endo-glucanases (cellulase) EC 3.2.1.4	Hydrolyse des liaisons β -1,4 de glycanes dans la cellulose et les xyloglucanes	Diminue	Abeles & Biles (1991)

3.3. Facteurs physiologiques impliqués dans la texture de la pomme

D'autres facteurs environnementaux incluant le climat, la conduite de culture au verger ainsi que les itinéraires post-récoltes peuvent avoir une profonde influence sur le développement ou la maturation du fruit et donc sur sa qualité (Harker et al., 1997a; Johnston et al., 2002a). Par exemple, un traitement post-récolte par du calcium contribue à préserver la fermeté du fruit lors de sa conservation (Sams, 1999; Abbott et al., 2000). Celle-ci serait due à une meilleure préservation de l'adhésion cellulaire, de la perméabilité membranaire et de la structure cellulaire (Glenn et Poovaiah, 1990). La date de récolte et les conditions de conservation sont également déterminantes. Généralement les fruits sont récoltés juste après la survenue de la crise climactérique sur la base d'une modification de la couleur de l'épiderme et de la régression de l'amidon. La perte de fermeté initiée lors de cette crise est particulièrement marquée pendant le stockage. La cinétique de ramollissement du fruit lors de sa conservation comporte une phase au cours de laquelle la perte de la fermeté est faible, suivie d'une autre dont la perte de fermeté est rapide et enfin d'une dernière durant laquelle la perte se stabilise et redevient faible (Figure 9) (Johnston et al., 2001). Pour une variété donnée cette cinétique est affectée par la date de récolte (Harker et al., 1997a) ainsi que par les conditions de conservation: température, humidité relative, atmosphère des chambres de stockage et présence d'éthylène (Johnston et al., 2002b).

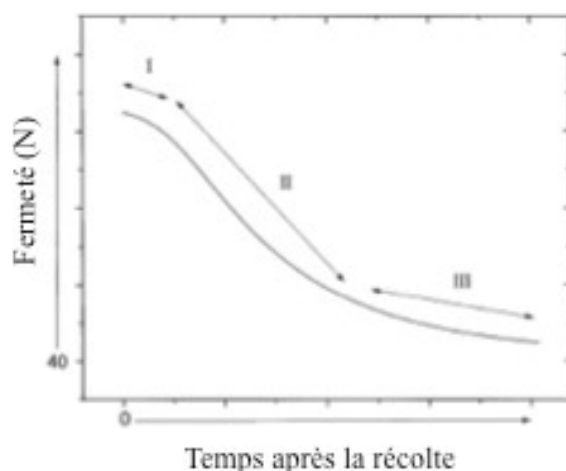


Figure 9. Profil de ramollissement de la pomme (*Malus domestica*) lors de sa conservation (Johnston et al., 2001). Le ramollissement se décompose en trois phases : une phase lente (phase I), rapide (II) et de nouveau lente (phase III).

4. L'amélioration génétique chez le pommier

L'amélioration génétique du pommier est très active dans le monde et particulièrement en Europe où il a été recensé, en 2005, 32 programmes de création variétale pour la pomme à couteau, dont 26 développés par des instituts publics (Y. Lespinasse, com. pers.). Sur les autres continents, il y a beaucoup moins de programmes et ils sont en général présents dans les pays ou les états gros producteurs de pomme (Laurens, 1999).

Le premier objectif de l'ensemble de ces programmes est de créer des variétés d'excellente qualité organoleptique, de longue conservation et produisant régulièrement de bons rendements. Beaucoup de programmes essaient aujourd'hui d'y associer des résistances ou tolérance aux bio-agresseurs (champignons, bactéries et ravageurs) mais pour avoir un développement commercial les nouvelles variétés doivent atteindre un niveau de qualité qui correspond aux exigences du marché.

Le pommier est une espèce très difficile à améliorer génétiquement. En effet, elle possède des caractéristiques morphologiques (volume des arbres), génétiques (auto-

incompatibilité) et physiologiques (période juvénile) qui rendent la sélection longue et coûteuse (Lauri et Laurens, 2005). De plus, contrairement à d'autres espèces fruitières, comme le pêcher, les caractères agronomiques les plus importants sont à hérédité quantitative. L'ensemble de ces raisons fait que les méthodes de sélection restent encore très empiriques (sélection phénotypique et massale ; Laurens et al, 2010); une autre conséquence est la très longue durée des cycles de sélection : 20 à 25 ans (Laurens *et al.*, 2005).

Les bases génétiques de la plupart des programmes sont très étroites (Noiton et Alspach, 1996) la production mondiale de pomme est essentiellement représentées par des variétés issues de semis de hasard (Golden Delicious, Red Delicious,...) ou des variétés issues d'hybridations contrôlées dérivant d'un très faible nombre de géniteurs (Golden Delicious, Fuji, ...). De nouvelles variétés intégrant des gènes de résistance à la tavelure, la maladie la plus importante du pommier apparaissent aujourd'hui sur le marché (Laurens et al., 2010) mais connaissent pour le moment un succès limité.

5. Le déterminisme génétique de la texture des fruits

5.1. Estimation des paramètres génétiques : hérédités et corrélations génétiques

Avant l'avènement des marqueurs moléculaires, de nombreuses études ont été dédiées à l'analyse de caractères à hérédité simple. C'est particulièrement le cas du pêcher qui contrairement au pommier possède de nombreux caractères de qualité déterminés par des gènes majeurs : couleur de la chair (gène Y), caractère fondant de la chair (gènes M, St, Hd), faible teneur en acide malique (gène D), épiderme glabre ou pubescent (gène G), attachement du noyau (gène F ; revues dans Scorza et Sherman, 1996 ; Peace et Norelli, 2009). Chez la pomme, les caractères à hérédité simple contrôlant la qualité du fruit sont très rares : le plus marqué est la teneur en acide malique (gène Ma ; Janick et al, 1996). Cependant les caractères de texture sont considérés à hérédité quantitative, c'est à dire, sous contrôle multi-génétique (Soglio et al., 2009). Le niveau d'hérédité de ces caractères doit être estimé par des approches statistiques.

En réalité, très peu d'études en génétique quantitative ont été développées car les

dispositifs statistiques à mettre en œuvre pour estimer les paramètres génétiques sont difficilement compatibles avec les contraintes liées aux espèces fruitières et notamment le volume des arbres. Scorza et Sherman (1996) citent les travaux de Hansche en 1972 sur la pêche dont les valeurs d'héritabilité obtenues sont très basses (0.13 pour la fermeté ; 0.19 pour l'acidité). Bell et Janick (cité par Bell et al, 1996) ont obtenu des valeurs d'héritabilité pour la texture de la poire de l'ordre de 0.3. C'est chez la pomme que le plus d'études de génétique quantitative classiques ont été réalisées (Durel et al, 1998 ; Oraguzie et al, 2001, Alspach et Oraguzie, 2002, Iwanami et al, 2008, Kouassi et al, 2009). Mais aucune n'était basée sur des dispositifs expérimentaux réellement adéquats pour l'estimation de paramètres génétiques. Ces études ont en effet été réalisées sur des descendance F1 plein frères souvent génétiquement connectés ou proches: les améliorateurs se sont en effet basées sur un très faible nombre de variétés élite telles que Golden Delicious, Jonathan, Mc Intosh, Gala, Fuji, Braeburn... (Noiton et Shelbourne, 1992). La non prise en compte de ces facteurs d'apparentement conduit à des biais dans l'estimation des paramètres génétiques. Pour s'en affranchir et bénéficier de l'ensemble des informations génétiques issues de son programme d'amélioration, l'INRA d'Angers a utilisé l'approche REML (Restricted maximum likelihood) pour l'estimation des paramètres génétiques de caractères de qualité sensorielle et instrumentale du fruit à la récolte et au cours de la conservation (Durel et al, 1998 ; Kouassi et al, 2009). L'approche REML est considérée comme optimale à partir de données déséquilibrées sur les espèces pérennes (Furlani et al, 2005 cité par Kouassi et al, 2009). Les valeurs d'héritabilité pour les variables instrumentales étaient de moyennes à fortes et globalement inférieures pour les variables sensorielles. Les valeurs d'héritabilité les plus élevées ont été observées sur les données enregistrées après deux mois de conservation. Cette étude apporte également des informations sur les corrélations génétiques entre caractères; on y apprend notamment que la qualité globale du fruit est génétiquement corrélée à la qualité de la texture, à la jutosité et à l'arôme du fruit (Kouassi et al, 2009). Ces informations sont importantes pour le sélectionneur.

5.2. Apport des marqueurs moléculaires et de la génomique fonctionnelle pour la connaissance des bases de la texture des fruits

5.2.1. Tomate

C'est sur la tomate, espèce modèle pour les fruits charnus, que les avancées en matière de connaissance des bases des caractères liés à la qualité sont les plus avancées. De nombreuses études génétiques ont eu pour but de localiser des QTLs pour les attributs sensoriels de la texture chez la tomate sur les caractères de fermeté, fondant, farinosité, jutosité et caractéristiques de la peau (dureté, facilité à avaler), mais également sur d'autres caractères importants : les goûts sucré, et acide et l'intensité de l'arôme (Causse et al., 2001; Causse et al., 2002). Ces études ont montré que les caractères de fermeté et fondant sont déterminés principalement par des gènes majeurs ($R^2 > 30\%$). Les propriétés sensorielles caractérisant la texture sont fortement liées aux propriétés mécaniques du fruit. D'autres études ont révélé des QTLs contrôlant les variations instrumentales de la résistance à la déformation, à l'élasticité et à la fermeté du fruit ainsi que la variation du diamètre, de la taille, du poids et de la fermeté du fruit (critères indispensables dans la qualité de la tomate ; Saliba-Colombani et al., 2001; Causse et al., 2004; Chaib et al., 2007). Des études complémentaires ont démontré que les variations de la taille et du poids du fruit étaient contrôlées par un petit nombre de QTLs majeurs (Lecomte et al., 2004). Les résultats de ces études permettent de mettre en évidence cinq régions qui regroupent un nombre important de QTLs pour les différents attributs de la qualité notamment de la texture de la tomate. Ils ont ensuite été choisis comme cibles pour la mise en place de la sélection assistée par marqueurs (Lecomte et al., 2004). Les études de stabilité de ces QTLs ont confirmé qu'il existe des variations dans l'expression de ces paramètres d'une année à l'autre (Chaib et al., 2006).

Des études histologiques ont également été réalisées pour mieux comprendre les relations entre taille et comportement mécanique du fruit (Bertin et al., 2003). Plusieurs QTLs ont été associés à la morphologie cellulaire de la tomate, plus particulièrement avec sa structure et l'hétérogénéité du péricarpe (Chaib et al., 2007).

C'est également sur la tomate que les études en génomique fonctionnelle ont été les plus développées sur les processus de maturité et de ramollissement du fruit. Ces approches aboutissent à la création d'importantes bases de données de séquences d'ADN et de très

nombreux profils d'expression (Gur et al., 2004). L'objectif final de ces approches est d'identifier les événements, les voies de signalisation et les mécanismes impliqués dans l'induction et la régulation de la maturité des fruits. Pour compléter ces approches, les diverses méthodes génomiques sont couplées à la construction des cartes génétiques qui, dans le cas de la tomate, ont permis d'identifier des gènes contrôlant des caractères organoleptiques du fruit (Chaib et al., 2006, Vicente et al., 2007) ainsi que dans la régulation de ces processus (Lecomte et al., 2004). De même, des gènes candidats impliqués dans la division et l'expansion cellulaire ont été colocalisés avec des QTLs liés à la croissance et au développement du fruit (Bertin et al., 2009).

Ces travaux se poursuivent maintenant à une échelle plus large grâce au développement des approches de la transcriptomique, métabolomique et protéomique (Vicente et al., 2007, Garcia et al., 2009) et de collections végétales adaptées à des études génétiques très fines (populations de mutants ; Fernandez et al., 2009). Les résultats et concepts développés dans le cadre de ces études sont transposables à des études sur d'autres fruits charnus complexes telle que la pomme.

5.2.2. Généralités sur les études génétiques chez les rosacées

Depuis les 20 dernières années, grâce au développement des technologies moléculaires, des progrès importants ont été réalisés pour mieux comprendre le déterminisme génétique des principaux caractères horticoles.

Le pommier et le pêcher sont les espèces de la famille des rosacées qui ont vu les plus grandes avancées en matière de cartographie génétique de gènes majeurs et de QTLs (Arús and Gardiner, 2007; Shulaev et al., 2008; Bus et al., 2009). Les efforts les plus importants ont été réalisés pour étudier les caractères de résistance aux bio-agresseurs. Chez le pommier, des gènes majeurs et des QTLs ont été localisés principalement pour la résistance à la tavelure (*Venturia inaequalis*: revue faite par Gessler et al., 2006), avec pour objectif de comprendre les mécanismes de la résistance durable. Des travaux ont également été développés sur l'oïdium (*Podosphaera leucotricha*), feu bactérien (*Erwinia amylovora*), le puceron cendré (*Dysaphis plantaginea*) et le puceron lanigère (*Eriosoma lanigerum* ; Gardiner et al., 2007).

Les études des bases génétiques des caractères de qualité du fruit ont été beaucoup

moins développées chez les rosacées. Elles ont pris en compte des caractères classiques avec des approches phénotypiques souvent basiques (Abbott et al, 2007; Gardiner et al, 2007). Chez la pêche, les recherches ont principalement porté sur des gènes majeurs et QTLs (Quilot et al., 2004) intervenant sur des caractères tels que la fermeté, la chair fondante, la couleur du fruit, l'attachement du noyau, la forme du fruit, la teneur en acide et en sucre. Quelques co-localisations ont été trouvées entre des gènes candidats et des caractères évoluant au cours de la conservation (farinosité, brunissement) mais également la teneur en sucre et en acide (Peace et al, 2005, Dirlewanger et al., 1998; Etienne et al., 2002; Le Dantec et al., 2010). La stabilité de ces paramètres peut varier en fonction de l'environnement et des conditions physiologiques de l'arbre ou de la plante.

Contrairement aux études en cartographie, les premières approches en génomique fonctionnelle ont été majoritairement dédiées à l'étude de la qualité des fruits et de leur maturité : biosynthèse de l'éthylène (Oraguzie et al., 2004; Costa et al., 2005, 2008, 2010), texture de la chair (Peace et al., 2005; Costa et al., 2005, 2008; Goulao et Oliveira, 2008; Nobile et al, 2011), teneur en sucre et en acide (Etienne et al., 2002; Le Dantec et al., 2010), mais aussi sur la couleur de la chair des fruits (Chagné et al., 2007). La disponibilité des premières banques d'EST a permis la construction de puces à DNAC. La publication récente de la séquence complète du génome du pommier (Velasco et al., 2010) et celle du pêcher qui devrait sortir très prochainement apportent des informations déterminantes pour les connaissances en biologie et génétique sur ces espèces et devraient apporter des outils pour leur amélioration génétique. Cela permettra de i) faciliter l'identification des gènes candidats et le clonage positionnel de caractères agronomiques, ii) développer des études fonctionnelles sur des processus métaboliques clés (développement de la fleur, du fruit, maturation du fruit, résistance aux parasites, architecture de l'arbre), iii) faciliter la découverte d'un très grand nombre de marqueurs moléculaires de type SNP (Single-Nucleotide-Polymorphism) qui permettront de développer de nouvelles approches en génétique quantitative (génétique d'association) mais également de réaliser des études génétiques beaucoup plus précises en travaillant sur des cartes génétiques plus denses.

5.3. QTLs de texture chez la pomme

Chez la pomme, plusieurs études se sont intéressées aux attributs de la qualité et en particulier

à la texture. Elles se sont principalement focalisées sur la fermeté mesurée avec un pénétromètre, associés à d'autres paramètres de qualité (acidité, sucre ; King et al., 2000, Liebhard et al., 2003; Kenis et al., 2008). Une seule étude (King et al., 2001) a été un peu plus loin en matière de phénotypage en comparant plusieurs approches complémentaires: dégustation, pénétrométrie, compression, test de fracture (wedge test), observations histologiques. Kenis et al., (2008) ont également enregistré des mesures acoustiques (stiffness).

Tableau 6. Synthèse des résultats des études QTLs sur la texture de la pomme

Auteurs	Groupes de liaison											
	1	2	3	6	7	8	10	11	12	14	15	16
King et al 2000	X			X		X	X		X		X	X
King et al 2001	X			X	X	X					X	X
Liebhart et al 2003			X	X				X	X	X		
Kenis et al 2008		X					X					X

Les groupes de liaison (GL) 1, 6, 8, 10, 12, 15 et 16 sont révélés dans au moins deux des quatre études. Les QTLs les plus explicatifs sont les GL 1, 6, 10, 15 et 16. Les études réalisées par Kenis et al (2008) et King et al (2000) mettent en évidence des effets années et lieux très significatifs : de nombreux QTLs ne sont pas stables.

Une autre étude très extensive a été réalisée dans le cadre du projet européen HiDRAS (2003-2007). Elle visait à comprendre et localiser sur la carte génétique du pommier les principales régions jouant un rôle dans la qualité de la pomme (Gianfranceschi et Soglio, 2004). Ce projet a analysé 28 familles issues de 10 programmes d'amélioration européens et connectées via leurs ancêtres communs. De nombreux paramètres liés à la qualité du fruit et notamment sa texture ont été mesurés à la récolte et à trois périodes en cours de conservation. Les analyses QTL ont été réalisées à l'aide du logiciel FlexQTL (Bink et al, 2008) qui prend en compte les informations du pedigree pour localiser plus précisément les QTLs et apporter des informations sur la diversité des allèles et leur influence sur l'expression des caractères.

Les résultats non encore publiés de cette vaste étude mettent en évidence des QTLs liés aux divers paramètres de texture pratiquement sur l'ensemble des groupes de liaison.

Des études plus spécifiques sur la production d'éthylène et le ramollissement du fruit ont révélé des régions chromosomiques clés dans la biosynthèse de cette hormone (Zhu and Barritt, 2008). La biosynthèse de l'éthylène est précurseur du ramollissement du fruit. L'étude des gènes ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxilase synthéase) et ACO (1-aminocyclopropano-1-carboxilate oxydase), médiateurs de la synthèse de l'éthylène, a permis de repérer des QTLs qui contrôlent ces enzymes dans le génome de la pomme (Costa et al., 2005). D'autres positionnements des gènes candidats de l'expansine (Costa et al., 2008) et la polygalacturonase (Costa et al., 2010), enzymes fortement associées au ramollissement du fruit, ont également été découverts.

Malgré des études génétiques et génomiques très développées chez certaines espèces, l'utilisation des résultats en sélection reste limitée à un petit nombre de caractères à hérédité simple (Dekkers et Hospital, 2002). Chez les rosacées : la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) est utilisée dans le cadre d'un tout petit nombre de programmes sur quelques caractères à hérédité simple essentiellement liés à la résistance au parasite et/ou la qualité des fruits (Frey et al., 2004, Bassil et Lewers, 2009, Peace et al, 2009). Un nouveau projet Européen, FruitBreedomics s'est donné pour but de combler ce vide entre recherche scientifique en génétique et applications potentielles en sélection (Laurens et al, 2010). D'ici 2015, il devrait apporter aux améliorateurs des outils, des méthodologies optimales pour développer l'utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration des espèces fruitières.

6. Contexte et objectifs de l'étude.

La maîtrise de la qualité de la texture de la pomme est un enjeu majeur de toute la filière et un critère de choix des consommateurs. La texture est décrite par un grand nombre de descripteurs sensoriels (fermeté, croquant, jutosité, finesse, granulosité, farinosité) qui traduisent le comportement mécanique de l'aliment en bouche. Ces paramètres sont souvent inter-corrélés, le plus souvent difficiles à évaluer individuellement et peuvent évoluer en cours de conservation jusqu'à devenir rédhibitoires pour le consommateur (manque de fermeté, manque de jus, farinosité). Un des points importants dans le cas de la pomme est donc de maintenir ces qualités le plus longtemps en conservation.

De nombreux travaux sur la physiologie du fruit indiquent que les paramètres intervenant dans la texture sont liés le plus souvent aux propriétés mécaniques de la paroi en conjonction avec la pression de turgescence cellulaire et l'adhésion intercellulaire. L'adhésion cellulaire fait intervenir de nombreux composés biochimiques et principalement les polysaccharides. La distribution et les caractéristiques physiques des cellules au sein des tissus représentent d'autres facteurs modulant les propriétés mécaniques de la texture.

Les programmes d'amélioration génétique sur le pommier visent la création de variétés à bon comportement vis-à-vis des bio-agresseurs, de production régulière et importante mais leur objectif essentiel, pour que ces nouveaux produits s'implantent sur le marché, est d'atteindre des niveaux de qualité organoleptique élevés notamment pour les caractères de texture. Pour mener à bien ces programmes, il est essentiel de connaître les bases génétiques de la qualité de la texture de la pomme au cours de son développement et de sa conservation. A ce jour très peu d'études se sont consacrées à ce sujet. Elles ont été uniquement basées sur des approches sensorielles et des mesures mécaniques de base telles que la pénétrométrie et la compression sur fruits entiers et n'ont pas permis d'aborder finement l'étude des facteurs complexes constituant la texture de la pomme.

L'objectif original de cette thèse est donc de réaliser une étude génétique des

caractères de la texture de la pomme en associant aux analyses sensorielles et instrumentales classiques des approches histologiques fines et biochimiques par l'analyse de la composition et de la structure des polysaccharides des parois cellulaires.

Le travail a été réalisé sur une descendance F1 de croisement autour de deux volets principaux :

1- Analyse de la variabilité phénotypique :

- caractérisation par des approches instrumentales (compression et pénétrométrie), histologique et sensorielle à trois différents stades de conservation au froid.
- analyse par des approches biochimiques de la structure des polysaccharides pariétaux et des hémicelluloses lors du processus de ramollissement de la pomme après deux mois de conservation.

2- Génotypage et recherche de QTLs :

- construction d'une carte génétique avec des marqueurs microsatellites et SNPs (Single-Nucléotide polymorphism).
- recherche de QTLs associés aux différents paramètres mesurés

Les résultats obtenus apportent un nouvel éclairage sur les structures fines des hémicelluloses de la paroi cellulaire de la pomme lors du ramollissement de la texture. Ils apportent également grâce aux approches utilisées (marqueurs SNPs ; outils de phénotypage et chénotypage) des nouvelles connaissances plus précises sur le déterminisme génétique de la qualité de la texture de la pomme.

7. Références Bibliographiques

- Abbott JA, Affeldt HA, Liljedahl LA** (1992) Firmness measurement of stored 'Delicious' apples by sensory methods, Magness-Taylor, and sonic transmission. *Journal of the Americal Society for Horticultural Sciences* **117**: 590-595
- Abbott JA, Klein JD, Campbell TA, Conway WS** (2000) Sensory and firmness measurements of calcium- and heat-treated apples. *Journal of Texture Studies* **31**: 109-121
- Abbott JA, Lu R** (1996) Anisotropic mechanical properties of apples. *Transaction of the American Society of Agricultural Engineers* **39**: 1451-1459
- Abbott JA, Saftner RA, Gross KC, Vinyard BT, Janick J** (2004) Consumer evaluation and quality measurement of fresh-cut slices of 'Fuji', 'Golden Delicious', 'Gold Rush', and 'Granny Smith' apples. *Postharvest Biology and Technology* **33**: 127-140
- Abbott JA, Watada AE, Massie DR** (1984) Sensory and instrumental measurement of apple texture. *Journal of the Americal Society for Horticultural Sciences* **109**: 221-228
- Abbott AG, Arús P, Scorza R** (2007) Peach. In: Kole C (ed) *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Fruits and Nuts*, vol 4. Springer, Berlin, pp. 137-156.
- Allan-Wojtas P, Sanford KA, McRae KB, Carbyn S** (2003) An integrated microstructural and sensory approach to describe apple texture. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 381-390
- Allende A, Desmet M, Vanstreels E, Verlinden BE, Nicolai BM** (2004) Micromechanical and geometrical properties of tomato skin related to differences in puncture injury susceptibility. *Postharvest Biology and Technology* **34**: 131-141
- Alspach PA and Oraguzie NC** (2002) Estimation of genetic parameters of apple (*Malus domestica*) fruit quality from open-pollinated families. *NZ J. Crop Horti. Sci.* **30**:219-228.
- Aprifel** (2010). La pomme. Web-site: www.aprifel.com (Date de consultation: 19-01-2011).
- Arús P and Gardiner S** (2007) Genomics for improvement of Rosaceae temperate tree fruit. In: *Genomics-Assited Crop Improvement, Volume 2:Genomics applications in Crops*. R.K. Varshney and R. Tuberosa (eds.). Springer (Dordrecht), pp 357-397.
- Atkinson RG, Schröder R, Hallett IC, Cohen D, MacRae EA** (2002) Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple tree leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. *Plant Physiology* **129**, 122-133.
- Atkinson RG, Schaffer RJ, Gunaseelan K, Schroder R** (2008) Methods and compositions for increasing storage-life of fruit. Patent NZ, No. NZ570886.
- Bassil N, Lewers K** (2009) Genomics opportunities, new crops and new products. In: Foltá KM and Gardiner SE (eds), *Genetics and Genomics of Rosaceae, Plant Genetics and Genomics: crops and models*, **6**:55-70

- Barreiro P, Ortiz C, Ruiz-Altisent M, De Smedt V, Schotte S, Andani Z, Wakeling I, Beyts PK** (1998) Comparison between sensory and instrumental measurements for mealiness assessment in apples. A collaborative test. *Journal of Texture Studies* **29**: 509-525
- Bell RL, Quamme A, Layne REC, Skirvin RM** (1996) Pears. In *Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits* ed. J. Janick and J. N. Moore. p441-514.
- Bertin N, Borel C, Brunel B, Cheniclet C, Causse M** (2003) Do genetic make-up and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and DNA endoreplication? *Annals of Botany* **92**: 415-424
- Bertin N, Causse M, Brunel B, Tricon D, Génard M** (2009) Identification of growth processes involved in QTLs for tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **60**: 237-248
- Billy L, Mehinagic E, Royer G, Renard CMGC, Arvisenet G, Prost C, Jourjon F** (2008) Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology* **47**: 315-324
- Bink MCAM, Boer MP, Ter Braak CJF, Jansen J, Voorrips RE, Van de Weg WE** (2008) Bayesian analysis of complex traits in pedigreed plant populations. *Euphytica* **161**: 85–96. DOI: 10.1007/s10681-007-9516-1.
- Blackman FF, Parija P** (1928) Analytic studies in plant respiration. I. The respiration of a population of senescent ripening apples. *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences* **B103**: 412-445
- Bonnin E, Dolo E, Le Goff A, Thibault JF** (2002) Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydrate Research* **337**: 1687-1696
- Bourne MC** (1982) Principles of objective texture measurement. In *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. Academic Press, New York, pp 44-117/319
- Brummell DA** (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* **33**: 103-119
- Brummell DA, Dal Cin V, Lurie S, Crisosto CH, Labavitch JM** (2004) Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2041-2052
- Brummell DA, Harpster MH** (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **47**: 311-340
- Bus VGM, Esmenjaud D, Buck E, Laurens F** (2009) Application of genetic markers in rosaceous crop. In: Folta KM and Gardiner SE (eds), *Genetics and Genomics of Rosaceae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, **6**: 563-599.
- Camps C, Guillermin P, Mauget JC, Bertrand D** (2005) Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits. *Journal of Texture Studies* **36**: 387-401.
- Camps C, Guillermin P, Mauget JC, Bertrand D** (2007) Discrimination of storage duration

- of apples stored in a cooled room and shelf-life by visible-near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **15**: 169-177
- Carpita N, McCann MC** (2000) The cell wall. *In* W Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Washington DC, pp 52-108
- Causse M, Chaib J, Lecomte L, Buret M, Hospital F** (2007) Both additivity and epistasis control in the genetic variation for fruit quality traits in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **115**: 429-442
- Causse M, Duffe P, Gomez MC, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Gur A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C** (2004) A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1671-1685
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffé P, Rousselle P, Buret M** (2002) QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions controls the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2089-2098
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lesschaeve I, Buret M** (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 273-283
- Chaib J, Devaux M-F, Grotte M-C, Robini K, Causse M, Lahaye M, Marty I** (2007) Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1915-1925.
- Chaib J, Lecomte L, Buret M, Causse M** (2006) Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTLs) for organoleptic quality in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 934-944
- Chagné D, Carlisle CM, Blond C, Volz RK, Whitworth CJ, Oraguzie NC, CrowHust RN, Allan AC, Espley RV, Hellens RP, Gardiner SE** (2007) Mapping a candidate gene (*MdMYB10*) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC Genomics* **2**:212.
- Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G, Gidley MJ** (2002) Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta* **215**: 989-996
- Choi DG, Yun SY** (2004) Reduced cell size and cell wall components of apple softening before ripening on the tree. *Hortscience* **39**: 1227-1230
- Costa F, Stella S, Van de Weg WE, Guerra W, Cecchin M, Dallavia J, Koller B, Sansavini S** (2005) Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica* **141**: 181-190
- Costa F, Van de Weg W, Stella S, Dondini L, Pratesi D, Musacchi S, Sansavini S** (2008) Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus domestica* Borkh) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics and Genomes* **4**: 575-586
- Costa F, Peace CP, Stella S, Serra S, Musacchi S, Bazzani M, Sansavini S, Van de Weg WE** (2010) QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-

- dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus domestica* Borkh.). Journal of Experimental Botany **61** (11) 3029-3039.
- Dailliant-Spinnler B, MacFie HJH, Beyts PK, Hedderley D** (1996) Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the southern hemisphere. Food Quality and Preference **7**: 113-126
- Darley CP, Forrester AM, McQueen-Mason SJ** (2001) The molecular basis of plant cell wall extension. Plant Molecular Biology **47**: 179-195
- De Smedt V, Pauwels E, De Baerdemaeker J, Nicolaï B** (1998) Microscopic observation of mealiness in apples: a quantitative approach. Postharvest Biology and Technology **14**: 151-158
- Deekers JC, and Hospital F** (2002) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. Nat Rev Genet **3**:22-32.
- De Vries JA, Voragen AGJ, Rombouts FM, Pilnik W** (1981) Extraction and purification of pectins from alcohol insoluble solids from ripe and unripe apples. Carbohydrate Polymers **1**: 117-127
- Devaux M-F, Bouchet B, Legland D, Guillon F, Lahaye M** (2008) Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. Postharvest Biology and Technology **47**: 199-209
- Dirlewanger E, Cardinet G, Boudehri K, Renaud C, Monllor S, Illa E, Howad W, Arus P, Croset C, Poessel JL, Maucourt M, Deborde C, Moing A** (2009) Detection of QTLs controlling major fruit quality components in peach within the European project ISAFRUIT. Acta Horticulturae: 533-538
- Dirlewanger E, Moing A, Pronier V, Svanella L, Guye A, Monet R, Rothan C** (1998) Detection of QTLs controlling peach fruit acidity and sweetness. Fourth International Peach Symposium, Vols 1-2: 89-98
- Dragsted L, Gormley, R.** (2010) Fruit for health: Laboratory & clinical trial outcomes on fruit. In R Gormley, & Brunton, N., ed, Fruit, Health and the Consumer: Outcomes from ISAFRUIT Fruit Forum Conference, Dublin, pp 4-10
- Durel CE, Laurens F, Fouillet A, Lespinasse Y** (1998). Utilisation of pedigree information to estimate genetic parameters from large unbalanced sets in apple. Theor. Appl. Genet. **96**:1077-1085.
- Emons AMC, Mulder BM** (1998) The making of the architecture of plant cell wall: how cell exploit geometry. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **95**: 7215-7219
- Etienne C, Rothan C, Moing A, Plomion C, Bodenes C, Svanella-Dumas L, Cosson P, Pronier V, Monet R, Dirlewanger E** (2002) Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Theoretical and Applied Genetics **105**: 145-159
- FAOSTAT** (2010) Apple production. Web-site: www.faostat.fao.org
- Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-**

- Chamley M, Rothan C, Hilson P** (2009). Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol.* **151**: 1729-1740
- Fischer M, Amado R** (1994) Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 1: Analysis of alcohol-insoluble residue. *Carbohydrate Polymers* **25**: 161-166
- Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R** (1999) The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology* **121**: 829-838
- Folta K, M. & Gardiner, Susan, E.** (2009) *Genetics and Genomics of Rosaceae*, Vol VI. Springer Science + Business Media, New York
- Frey JE, Frey B, Sauer C, Kellerhals M** (2004) Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for high-throughput marker-assisted selection (MAS) in apple breeding. *Plant breeding* **123**: 554-557.
- Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau JP, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Reid JSG, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ, White AR** (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* **89**: 1-3
- Garcia V, Stevens R, Gil L, Gilbert L, Gest N, Petit J, Faurobert M, Maucourt M, Deborde C, Moing A, Poessel JL, Jacob D, Bouchet J-P, Giraudel J-L, Gouble B, Page D, Alhagdow M, Massot C, Gautier H, Lemaire-Chamley M, de Daruvar A, Rolin D, Usadel B, Lahaye M, Causse M, Baldet P and Rothan C** (2009) An integrative genomics approach for deciphering the complex interactions between ascorbate metabolism and fruit growth and composition in tomato. *CR Biology* **332**: 1007-1021
- Gardiner SE, Bus VGM, Rusholme RL, Chagne D, Rikkerink EHA** (2007) Apple. In: Kole C (ed) *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Fruits and Nuts*, vol 4. Springer, Berlin, pp 1–62.
- Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L** (2006) *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Crit Rev Plant Sci* **25**: 473–503.
- Gianfranceschi L, Soglio V** (2004) The European Project HiDRAS: Innovative Multidisciplinary Approaches to Breeding High Quality Disease Resistant Apples. *Acta Hort.* **663**, ISHS 2004, 327-330.
- Glenn GM, Poovaiah BW** (1990) Calcium-mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in 'Golden Delicious' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* **115**: 962-968
- Goulao LF, Oliveira CM** (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* **19**: 4-25
- Gur A, Semel Y, Cahaner A, Zamir D** (2004) Real Time QTL of complex phenotypes in tomato interspecific introgression lines. *Trends in Plant Science* **9**: 107-109
- Harker FR, Ferguson IB** (1988) Calcium ion transport across discs of the cortical flesh of apple fruit in relation to fruit development. *Physiologia Plantarum* **74**: 695-700

- Harker FR, Hallett IC** (1992) Physiological-changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. *Hortscience* **27**: 1291-1294
- Harker FR, Maindonald J, Murray SH, Gunson FA, Hallett IC, Walker SB** (2002) Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* **24**: 225-239
- Harker FR, Maindonald J, Murray SH, Gunson FA, Hallett IC, Walker SB** (2002) Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* **24**: 225-239
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G** (1997a) Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* **20**: 121-224
- Harker FR, Stec MGH, Hallett IC, Bennett CL** (1997b) Texture of parenchymatous plant tissue: A comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biology and Technology* **11**: 63-72
- Harris P, J., Bronwen GS** (2006) Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* **41**: 129-143
- Hertog MLATM, Nicolai, B. M., De Ketelaere, B., Lammertyn, J., De Baerdemaeker, J.** (2008) Non-Destructive techniques and quality models for the supply chain: a review. *Acta Horticulturae* **768**, *ISHS* **2008**: 375-384
- Huber DJ** (1983) The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Reviews* **5**: 169-219
- Ioannides Y, Howarth MS, Raithatha C, Defernez M, Kemsley EK, Smith AC** (2007) Texture analysis of Red Delicious fruit: Toward multiple measurements on individual fruit. *Food Quality and Preference* **18**: 825-833
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP** (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell and Environment* **26**: 977-989
- Janick J, Cummins JN, Brown SK, Hemmat M** (1996) Apples. *In* FruitBreeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits ed. J. Janick and J. N. Moore p 1-77.
- Jeager SR, Andani Z, Wakeling IN, Macfie HJH** (1998) Consumer preferences for fresh and aged apples: a cross-cultural comparison. *Food Quality and Preference* **9**: 355-366
- Johnston JW, Hewett EW, Banks NH, Harker FR, Hertog MLATM** (2001) Physical change in apple texture with fruit temperature: effect of cultivar and time in storage. *Postharvest Biology and Technology* **23**: 13-21
- Johnston JW, Hewett EW, Hertog MLATM** (2002a) Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **30**: 145-160
- Johnston JW, Hewett EW, Hertog MLATM, Harker FR** (2002b) Temperature and ethylene affect induction of rapid softening in 'Granny Smith' and 'Pacific RoseTM' apple cultivars. *Postharvest Biology and Technology* **25**: 257-264

- Kenis K, Keulemans J, Davey M** (2008) Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 647-661
- Khan AA, Vincent JFV** (1990) Anisotropy of apple parenchyma. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **52**: 455-466
- King GJ, Lynn JR, Dover CJ, Evans KM, Seymour GB** (2001) Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 1227-1235
- King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, Alston FH, Durel CE, Evans KM, Griffon B, Laurens F, Manganaris AG, Schrevens T, Tartarini S, Verhaegh J** (2000) Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 1074-1084
- Kouassi AB, Durel CE, Costa F, Tartarini S, Weg EDv, Evans K, Fernandez-Fernandez F, Govan C, Boudichevskaja A, Dunemann F, Antofie A, Lateur M, Stankiewicz-Kosyl M, Soska A, Tomala K, Lewandowski M, Rutkowski K, Zurawicz E, Guerra W, Laurens F** (2009) Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. *Tree Genetics & Genomes* **5**: 659-672
- Lampe JW** (1999) Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**: 475-490
- Laurens F** (1999) Review of the current apple breeding programmes in the world: objectives for scion cultivar improvement. *Acta Horticulturae* **484**: 163-170.
- Laurens F, Lespinasse Y, Fouillet A** (2005) A new scab resistant apple: 'Ariane'. *HortScience* **40**(2), 484-485.
- Laurens F, Durel CE, Patocchi A, Peil A, Salvi S, Tartarini S, Velasco R, Van de Weg E** (2010) Review on apple genetics and breeding programmes and presentation of a new European initiative to increase fruit breeding efficiency. *Journal of Fruit Science*, **27**:102-107.
- Lauri P.E. and Laurens F** (2005). Architectural types in apple (*Malus x domestica* Borkh.) - Concepts and use for tree management and genetic improvement in France. In "Crops: growth, quality and biotechnology R. Dris (ed.). The Haworth Press, Inc. p1300-1313.
- Le Dantec L, Cardinet G, Bonet J, Fouche M, Boudehri K, Monfort A, Poessel JL, Moing A, Dirlwanger E** (2010) Development and mapping of peach candidate genes involved in fruit quality and their transferability and potential use in other Rosaceae species. *Tree Genetics & Genomes* **6**: 995-1012
- Lecomte L, Saliba-Colombani V, Gautier A, Gomez-Jimenez MC, Duffé P, Buret M, Causse M** (2004) Fine mapping of QTLs of chromosome 2 affecting the fruit architecture and composition of tomato. *Molecular Breeding* **13**: 1-14
- Liebhart R, Kellerhals M, Pfammatter W, Jertmini M, Gessler C** (2003) Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Molecular Biology* **52**: 511-526

- Lopez-Casado G, Matas AJ, Dominguez E, Cuartero J, Heredia A** (2010) Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3875-3883
- Mann H, Bedford D, Luby J, Vickers Z, Tong C** (2005) Relationship in instrumental and sensory texture measurements of fresh and stored apples to cell numbers and size. *Hortscience* **40**: 1815-1820
- Martin-Cabrejas MA, Waldron KW, Selvendran RR, Parker ML, Moates GK** (1994) Ripening-related changes in the cell-walls of spanish pear (*Pyrus communis*). *Physiologia Plantarum* **91**: 671-679
- Matas AJ, Cobb ED, Bartsch JA, Paolillo DJ, Niklas KJ** (2004) Biomechanics and anatomy of *Lycopersicon esculentum* fruit peels and enzyme-treated samples. *American Journal of Botany* **91**: 352-360
- Matas AJ, Gapper NE, Chung MY, Giovannoni J, Rose JKC** (2009) Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Current Opinion in Biotechnology* **20**: 197-203
- McAtee P, Hallett I, Johnston J, Schaffer R** (2009) A rapid method of fruit cell isolation for cell size and shape measurements. *Plant Methods* **5**: 1-7
- McGlone VA, Jordan RB, Martinsen PJ** (2002) Vis/NIR estimation at harvest of pre- and post-storage quality indices for 'Royal Gala' apple. *Postharvest Biology and Technology* **25**: 135-144
- Mehinagic E, Royer G, Bertrand D, Symoneaux R, Laurens F, Jourjon F** (2003) Relationship between sensory analysis, penetrometry and visible-NIR spectroscopy of apples belonging to different cultivars. *Food Quality and Preference* **14**: 473-484
- Mehinagic E, Royer G, Bertrand D, Symoneaux R, Laurens F, Jourjon F** (2003) Relationship between sensory analysis, penetrometry and visible—NIR spectroscopy of apples belonging to different cultivars. *Food Quality and Preference* **14**: 473-484
- Mehinagic E, Royer G, Symoneaux R, Bertrand D, Jourjon F** (2004) Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. *Postharvest Biology and Technology* **34**: 257-269
- Mehinagic E, Royer G, Symoneaux R, Bertrand D, Jourjon F** (2004) Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. *Postharvest Biology and Technology* **34**: 257-269
- Moreno E, Obando J, Dos-Santos N, Fernández-Trujillo J, Monforte A, Garcia-Mas J** (2008) Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **116**: 589-602
- Moise A, Quemener B, Bouchet B, Marty I, Guillon F, Lahaye M** (2010) Cell wall construction and evolution during tomato fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* **submitted**
- Mouille G, Witucka-Wall H, Bruyant MP, Loudet O, Pelletier S, Rihouey C, Lerouxel O, Lerouge P, Hofte H, Pauly M** (2006) Quantitative trait loci analysis of primary cell wall composition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**: 1035-1044

- Mueller LA, Lankhorst RK, Tanksley SD, Giovannoni JJ, White R, Vrebalov J, Fei Z, van Eck J, Buels R, Mills AA, Menda N, Tecle IY, Bombarely A, Stack S, Royer SM, Chang S-B, Shearer LA, Kim BD, Jo S-H, Hur C-G, Choi D, Li C-B, Zhao J, Jiang H, Geng Y, Dai Y, Fan H, Chen J, Lu F, Shi J, Sun S, Chen J, Yang X, Lu C, Chen M, Cheng Z, Li C, Ling H, Xue Y, Wang Y, Seymour GB, Bishop GJ, Bryan G, Rogers J, Sims S, Butcher S, Buchan D, Abbott J, Beasley H, Nicholson C, Riddle C, Humphray S, McLaren K, Mathur S, Vyas S, Solanke AU, Kumar R, Gupta V, Sharma AK, Khurana P, Khurana JP, Tyagi A, Sarita, Chowdhury P, Shridhar S, Chattopadhyay D, Pandit A, Singh P, Kumar A, Dixit R, Singh A, Praveen S, Dalal V, Yadav M, Ghazi IA, Gaikwad K, Sharma TR, Mohapatra T, Singh NK, Szinay D, de Jong H, Peters S, van Staveren M, Datema E, Fiers MWEJ, van Ham RCHJ, Lindhout P, Philippot M, Frasse P, Regad F, Zouine M, Bouzayen M, Asamizu E, Sato S, Fukuoka H, Tabata S, Shibata D, Botella MA, Perez-Alonso M, Fernandez-Pedrosa V, Osorio S, Mico A, Granell A, Zhang Z, He J, Huang S, Du Y, Qu D, Liu L, Liu D, Wang J, Ye Z, Yang W, Wang G, Vezzi A, Todesco S, Valle G, Falcone G, Pietrella M, Giuliano G, Grandillo S, Traini A, D'Agostino N, Chiusano ML, Ercolano M, Barone A, Frusciante L, Schoof H, Jöcker A, Bruggmann R, Spannagl M, Mayer KXF, Guigó R, Camara F, Rombauts S, Fawcett JA, Van de Peer Y, Knapp S, Zamir D and Stiekema W (2009) The Plant Genome 2:78 A Snapshot of the Emerging Tomato Genome Sequence.**
- Nobile P, Wattebled F, Quecini V, Girardi C, Lormeau M, Laurens F (2011).** Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. *J. Ex. Bot. Accepted*.
- Noiton D. and Alspach PA (1996)** Founding clones, inbreeding, coancestry and status number of modern apple cultivars/journal of American Society for Horticultural Science **121**:773-782.
- Noiton D. and Shelbourne CJA (1992)** Quantitative genetics in an apple breeding strategy. *Euphytica* **60**:213-219.
- O'Neill MA, York WS (2003)** The composition and structure of plant primary cell walls. *In* JKC Rose, ed, *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 1-54
- Oey ML, Vanstreels E, De Baerdemaeker J, Tijskens E, Ramon H, Hertog MLATM, Nicolai B (2007)** Effect of turgor on micromechanical and structural properties of apple tissues: A quantitative analysis. *Postharvest Biology and Technology* **44**: 240-247
- Ordaz-Ortiz JJ, Marcus SE, Knox JP (2009)** Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Molecular Plant* **2**: 910-921
- Oraguzie NC, Hofstee ME, Brewer LR, Howard C (2001)** Estimation of genetic parameters in a recurrent selection program in apple. *Euphytica*, **118**:29-37.
- Oraguzie NC, Iwanami H, Soejima J, Harada T, Hall A (2004)** Inheritance of the Md-ACS1 gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus domestica* Borkh). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **108**: 1526-1533

- Oraguzie N, Alspach P, Volz R, Whitworth C, Ranatunga C, Weskett R, Harker R** (2009) Postharvest assessment of fruit quality parameters in apple using both instruments and an expert panel. *Postharvest Biology and Technology* **52**: 279-287
- Peace CP, Crisosto CH, Gradziel TM** (2005). Endopolygalacturonase: a candidate gene for Freestone and Melting flesh in peach. *Molecular Breeding* **16**:21-31.
- Peace C, Norelli JL**, (2009) Genomics approaches to crop improvement in the Rosaceae. In *Genetics and Genomics of Rosaceae, Plant genetics and Genomics: Crops and Models*, 6. Eds Foltá KM and Gardiner SE: 19-53.
- Peirs A, Schenk A, Nicolai BM** (2005) Effect of natural variability among apples on the accuracy of VIS-NIR calibration models for optimal harvest predictions. *Postharvest Biology and Technology* **35**: 1-13
- Pena MJ, Carpita NC** (2004) Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiology* **135**: 1306-1313
- Pitt RE** (1982) Models for the reology and statistical strength of uniformly stressed vegetative tissue. *Transaction of the ASAE*: 1776-1784
- Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, Kerr M, Robertson KR, Arsenault M, Dickinson TA, Campbell CS** (2007) Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* **266**: 5-43
- Quilot B, Wu BH, Kervella J, Genard M, Foulongne M, Moreau K** (2004) QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 884-897
- Redgwell RJ, Fischer M, Kendal E, MacRae EA** (1997) Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* **203**: 174-181
- Renard CMGC, Lomax JA, Boon JJ** (1992) Apple-fruit xyloglucan: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and of alkali-extracted xyloglucans. *Carbohydrate Research* **232**: 303-320
- Renard CMGC, Thibault JF** (1993) Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydrate Research* **244**: 99-114
- Renard CMGC, Voragen AGJ, Thibault JF, Pilnik W** (1990) Studies on apple protopectin: I. extraction of insoluble pectin by chemical means. *Carbohydrate Polymers* **12**: 9-25
- Rose JKC, Bennett AB** (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* **4**: 176-183
- Rose JKC, Hadfield KA, Labavitch JM, Bennett AB** (1998) Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology* **117**: 345-361
- Roudot AC, Duprat F** (1990) A graphical model to simulate the mechanical behavior of apple flesh. In *22nd Conferencia Internacional de Mecanization Agraria*, Zaragoza, pp 37-42

- Roudot AC, Duprat F, Wenian C** (1991) Modelling the response of apples to loads. *Journal of Agricultural Engineering Research* **48**: 249-259
- Saladie M, Matas AJ, Isaacson T, Jenks MA, Goodwin SM, Niklas KJ, Xiaolin R, Labavitch JM, Shackel KA, Fernie AR, Lytovchenko A, O'Neill M, Watkins CB, Rose JKC** (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* **144**: 1012-1028
- Saladie M, Rose JKC, Cosgrove DJ, Catala C** (2006) Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *Plant Journal* **47**: 282-295
- Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, Philouze J, Buret M** (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 259-272
- Sams CE** (1999) Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology* **15**: 249-254
- Schackel KA, Greve C, Labavitch JM, Ahmadi H** (1991) Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiology* **97** (2): 814-816
- Scheller HV, Ulvskov P** (2010) Hemicelluloses. *In Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, Vol 61. Annual Reviews, Palo Alto, pp 263-289
- Schols HA, Bakx EJ, Schipper D, Voragen AGJ** (1995) A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* **279**: 265-279
- Scorza R. and Sherman W** (1996) Peaches. *In Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits* ed. J. Janick and J. N. Moore. p 325-440.
- Schulze V., Korban SS, Sosinski B, Abbott AG, Aldwinckle HS, Foltz KM, Iezzoni A, Main D, Arus P, Dandekar AM, Lewers K, Brown SK, Davis TM, Gardiner SE, Potter D, Veilleux RE** (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant. Physiol.* **147**:985-1003.
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J** (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1267-1280
- Serrurier M, Ottens, N.** (2010) Ctifl Mémento fruits et légumes, Ed Ctifl. Ctifl Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris
- Slavov A, Garnier C, Crépeau M-J, Durand S, Thibault J-F, Bonnin E** (2009) Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydrate Polymers* **77**: 876-884
- Soglio, V., F. Costa, J.W. Molthoff, W.M.J. Weeman-Hendriks, H.J. Schouten, and L. Gianfranceschi.** 2009. Transcription analysis of apple fruit development using DNA microarrays. *Tree Genetics and Genomes* **5**: 685-698.
- Smith DL, Starrett DA, Gross KC** (1998) A gene coding for tomato fruit beta-galactosidase II is expressed during fruit ripening - Cloning, characterization, and expression pattern. *Plant Physiology* **117**: 417-423

- Smock RMaN, A. M.** (1950) Apples and products, Vol 2. Intersciences, Inc., New York, & Ltd. London, New York, USA
- Szczesniak AS** (2002) Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference* **13**: 215-225
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R** (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**: 833-+
- Veraverbeke EA, Lammertyn J, Saevels S, Nicolai BM** (2001) Changes in chemical wax composition of three different apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology* **23**: 197-208
- Vicente AR, Ortugno C, Powell ALT, Greve LC, Labavitch JM** (2007) Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of Raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 4119-4124
- Vincent JFV** (1989) Relationship between density and stiffness of apple flesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **47**: 443-462
- Vincent JFV** (1990) Fracture properties of plants. *Advances in Botanical Research* **17**: 235-287
- Voragen AGJ, Schols HA, Pilnik W** (1986) Structural features of the hemicellulose polymers or apples. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* **183**: 105-110
- Waldron KW, Park ML, Smith AC** (2003) Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**: 101-119
- Waldron KW, Parker ML, Smith AC** (2003) Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*: 2 (4) 101-119 **2**: 101-119
- Wenian C, Duprat F, Roudot AC** (1991) Evaluation of the importance of the cellular tissue geometry on the strains observed on apples after a compression or an impact. *Sciences Des Aliments* **11**: 99-110
- Willats WG, Knox JP** (2003) Molecules in context: probes for cell wall analysis. In JKC Rose, ed, *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 92-110
- Willats WG, McCartney L, Mackie W, Knox JP** (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**: 9-27

- Wu N, Pitts MJ** (1999) Development and validation of a finite element model of an apple fruit cell. *Postharvest Biology and Technology* **16**: 1-8
- Yoshioka H, Aoba K, Kashimura Y** (1992) Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**: 600-606
- Zdunek A, Umeda M** (2005) Influence of cell size and cell wall volume fraction on failure properties of potato and carrot tissue. *Journal of Texture Studies* **36**: 25-43
- Zhu Y, Barritt B** (2008) Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (*Malus domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 555-562
- Zykwinska AW, Ralet M-C, Garnier CD, Thibault JF** (2005) Evidence for in vivo binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology* **139**: 397-407

CHAPITRE II

Variation de caractères instrumentaux, sensoriels et histologiques de la texture de la pomme dans une descendance en fonction de sa conservation post-récolte

Variation de caractères instrumentaux, sensoriels et histologiques de la texture de la pomme dans une descendance en fonction de sa conservation post-récolte

Contexte

Ce chapitre aborde les principaux résultats du phénotypage sensoriel, instrumental (compression et pénétrométrie) et histologique d'une descendance de pommes à trois différents stades de conservation. La descendance était composée de 141 génotypes récoltés sur deux ans. L'évaluation de la texture a été réalisée lors de la récolte, à deux et à quatre mois de stockage au froid pour les analyses de texture sensorielle et instrumentale. Les analyses histologiques ont été faites seulement après 2 mois de stockage. Le plan d'expérience a permis d'évaluer l'impact de la sélection de résistance à la tavelure et les effets du sens de croisement sur les caractères de la texture dans la descendance. Les corrélations décrites dans la littérature sur la texture de la pomme à niveau inter et intra données instrumentales et sensorielles ont été confirmées. Les évaluations instrumentales et sensorielles ont été trouvées complémentaires pour la caractérisation de la texture de la pomme. La distribution de la taille cellulaire a permis de différencier les individus dans la descendance et a également confirmé le rôle clé de la distribution en taille des cellules sur le comportement mécanique des tissus de la pomme. D'autre part, une relation entre la taille des cellules et la perception de la jutosité a été mise en évidence. Les effets d'année ont affecté tous les caractères de la texture. Au sein d'une même de récolte, la durée de stockage a montré un effet dominant sur la sélection de

résistance à la tavelure et l'effet du sens de croisement. Les fortes valeurs d'héritabilité ont montré que tous les caractères de texture mesurés sont sous contrôle génétique.

Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping

Didiana Gálvez López ^{1,2}, François Laurens¹, Marie Françoise Devaux², Marc Lahaye^{2*}

¹ INRA, UMR1259 Génétique et Horticulture, BP 60057, F-49071 Beaucouzé, France

² INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, BP 71627, F-44316 Nantes, France

*corresponding author lahaye@nantes.inra.fr tel : 33 240 67 50 63

Summary

Phenotypic analysis of texture traits was performed in an apple progeny by three complementary approaches: two classical instrumental measures (compression and penetrometry), sensory assessment and histological screening. The progeny was composed of 141 individuals harvested over two years. Sensory and instrumental texture were assessed at harvest and after two and four months of cold storage. Histological screening was performed by combining macro-vision of outer parenchyma sections and image analysis on fruits after 2 months storage. Harvest year was observed to have a major impact on texture phenotypes followed by storage and genetic factors. Principal component analysis of data from the instrumental texture evaluations showed that the two methods complemented each other in characterizing the texture of the apple progeny. Compression parameters correlated better than penetrometry variables with sensory descriptors related to crispness, firmness, and graininess. Cell size distribution differentiated individuals in the apple progeny. It correlated with instrumental texture analyses and with juiciness perception. The high heritability values of all measured texture related traits showed that they were all under genetic control. Higher values were obtained for fruits after two months storage. These results provide ground for future search of new apple texture QTLs.

keywords: apple progeny; compression; penetrometry; sensory assessment; image analysis; storage

1. Introduction

Fleshy fruit texture is one of the major criteria determining consumer preference and is of prime interest for stakeholders of the horticultural and agro-industrial sectors (Redgwell and Fischer 2002). Apple, being the 3rd fruit production in the world (FAO 2009), is the focus of many studies aiming at understanding and mastering its texture. Apple texture changes all along fruit development (Volz et al. 2003) and markedly softens with ripening and during post-harvest storage (Johnston et al. 2002; Mehinagic et al. 2004; Camps et al. 2007; Varela et al. 2007; Alamar et al. 2008). The mechanisms involved are complex and imply several factors at different scales (Harker et al. 1997a). They include cell-cell de-bounding and cell wall disassembly, which have been the focus of many biochemical and genomic studies (Johnston et al. 2002; Brummell 2006; Goulao and Oliveira 2008). Apple cell wall enzymes / proteins involved in these processes comprise pectinolytic enzymes, xyloglucan transglucosylases/hydrolase (XTH), glucanase and expansin. Arabinofuranosidase and galactosidase prune pectic arabinan and galactan side chains during apple ripening, but unlike other fleshy fruits, pectin methyl esterase and endopolygalacturonase do not appear as major enzymes responsible for the increased solubility of pectin occurring during softening (Johnston et al. 2002; Brummell 2006; Goulao and Oliveira 2008). At the cellular scale, softening was related with changes in turgor pressure (Lin and Pitt 1986; Tong et al. 1999; De Belie et al. 2000; Rojas et al. 2001; Oey et al. 2007) while at the tissue scale, histological characteristics were shown to impact mechanical characteristics of apple flesh (Vincent 1989; Khan and Vincent 1993; Abbott and Lu 1996) and texture perceptions (Allan-Wojtas et al. 2003; Mann et al. 2005). Key sensory determinants for apple appreciation are flesh firmness, crispness, juiciness and mealiness (Jaeger et al. 1998; Dailland-Spinnler et al. 1996) but, to date, only firmness and crispness perceptions can be reliably assessed by mechanical tests, such as by double compression, penetrometry or tensile tests (Mehinagic et al. 2004; Harker et al. 1997b; Chauvin et al. 2010). Evaluation of other texture descriptors relies essentially on sensory analysis (Harker et al. 2002).

In the objective of developing breeding programs based on marker-assisted selection, few studies have been engaged to decipher the genetic and genomic bases of texture traits. They all have been based on sensory tasting and global instrumental phenotypic data. They led to the location of several QTLs widespread over the apple genome (King et al. 2000; Iwanami et al. 2008b; Costa et al. 2010b; Kouassi et al. 2009). In addition, few candidate genes linked to

the ethylene pathway and cell wall compounds were shown to be putatively involved in the control of the trait variability (Costa et al. 2005; Costa et al. 2008; Costa et al. 2010a). To complete these results, we engaged in the mapping of new texture related QTLs based on more targeted determinants of texture: histology and cell wall chemistry. In this report, we present the phenotyping of a progeny of 141 individuals for instrumental and sensory texture traits and for histological parameters. Compression and penetrometry mechanical tests and sensory analysis were measured in an apple progeny harvested over two years after 0, 2 and 4 months storage. Cell size distributions in parenchyma tissue after 2 months storage of fruits were related to mechanical and sensory data. The impact of reciprocal crossing as well as of a preliminary selection step for scab resistance in the progeny was evaluated on all texture related variables.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The plant material consisted of 141 individuals of one segregating progeny (12-IHVW) plus their parents. The parents named X3259 and X3263 are two genitors of the INRA Angers apple breeding program (Kouassi et al. 2009). They are both carrying the V_f scab resistance gene. The parent X3259 has a good taste quality that is inherited from one of its parent, the cultivar ‘Chantecler’. X3263 resulted from the cross between a dark red fruit cultivar, ‘Red Winter’, and the INRA genitor X3177 that presents a good and regular cropping. To test the effect of the reciprocal crossing and the effect of the scab selection test on fruit quality traits, the parents were crossed in two reciprocal ways: X3259 and X3263 being used as both male and female. Each family was then separated in two lots: one followed the normal selection way with an early test in greenhouse which discarded the non V_f individuals, the other one on which no selection test was performed. Progenies and parents were planted in an experimental orchard at INRA Angers (France). A total of 141 individuals from this progeny were studied. For practical reasons, 105 individuals were harvested in 2007 and another 50 individuals were harvested in 2009. Fourteen individuals were common to the two years. Fruit were collected at optimum maturity based on taste, ground color and starch staining measurements (Pitts and Cavalieri 1988; Kouassi et al. 2009). The harvest period for both years spread from September to November. Three sets of fruits were evaluated: at harvest

(date 1) then after 2 (date 2) and 4 months in storage (date 3) at 1.5 °C and 80 % of relative humidity. Before measurements and degustation, apples were brought up to room temperature for 24 h.

2.2. Texture analyses

2.2.1. Sensory analysis

Sensory analysis was performed on two fruits per individual. Firmness (FIRM), crispness (CRISP), juiciness (JUIC), meltiness (MELT), graininess (GRAIN), fibrousness (FIBER) and mealiness (MEALI) traits were defined according to Harker et al. (2002), Mehinagic et al. (2003) and Kouassi et al. (2009). Each trait was scored from 1 (very low) to 5 (very high) being nine final values (e.g. 1, 1.5, 2, 2.5...). The sensory panel included four permanent experts working in two separate groups for each sample (2 fruits/sample/date); two sensory scores were given for each of the six texture attributes (Laurens pers. com.).

2.2.2. Instrumental texture analyses

2.2.2.1. Penetrometry

Penetrometry testing was performed on 10 unpeeled apples per individual at dates 1, 2 and 3 according to Camps et al. (2005) using the texture analyzer TA.XT.PLUS (Stable Micro system) equipped with a 4-mm-diameter convex probe. Penetration speed was fixed at 3.3 mm s⁻¹. Perforations from the surface of the fruit to a final depth of 10 mm were made on two opposite sides of each fruit in the blush and shaded regions. Six parameters were extracted from the force/deformation curves: Fp (kg): maximal force needed to break apple skin and flesh, Ff and Ff2 (kg): force measured at 7 and 9 mm of deformation needed to penetrate the flesh when the skin is broken, Dp (mm): deformation associated with Fp, Wp (kg.mm): area under the curve between 0 and Dp, work required for the rupture of apple skin and flesh, Ep (kg.mm): gradient on the curve (between 0 and Fp; Figure1 A).

2.2.2.2 Compression

Double compression of 10 unpeeled apples per individual at dates 1, 2 and 3 was realized using the TA.XT.PLUS analyzer. Fruits were placed at the equator of the rounded side and at

intermediate color regions between two parallel plates (lower: 100 mm of diameter and 15 mm of thickness, upper: 50 mm of diameter and 4 mm of thickness) and compressed twice to 5% deformation at 50 mm sec⁻¹. Six parameters were determined from the force/distance curves as reported by Mehinagic et al. (2004; H1 and H2 (kg): forces associated with the first and second compression, respectively, WH1 and WH2 (kg.mm): works associated with the first and second compression, respectively, Grad1 and Grad2 (kg/mm): slope of the first and second compression, respectively; Figure 1 B).

2.3. Image acquisition of cellular structure of parenchyma

Cell size distribution in apple flesh of three apples per individual at date 2 was realized according to Devaux et al. (2008). Two equatorial opposite radial sections per fruit were sampled from the outer parenchyma (thick: 200 µm, diameter: 10 mm; Figure 2). Sections were cut using a vibrating blade microtome (Microm HM 650 V) and degassed by a short ultrasound treatment. Images were acquired using a prototype of macrovision system built in the lab and improved from the one described in Devaux et al. (2008). The system encloses a CCD camera (Prosilica Digital Camera DCAM 1.31) equipped with a lens corresponding to a 1.2 X magnification (Navitar Precise Eye). Back-lighting is obtained using an optical fibre ring-light controlled in intensity (SCHOTT DCRIV). Images in grey levels were coded between 0 (black) to 255 (white). Image texture analysis was performed by applying grey level using mathematical morphological procedures (Soille 2005). "Closing" were applied using a square structuring element. Grey levels granulometric curves are obtained and interpreted as cell size distribution. Principal component analysis of the granulometric curves collection allowed to distinguish the contributions of the cell size distribution and the homogeneous-heterogenous cell size distribution to the total variance on the first (PC1) and the second (PC2) components, respectively (Devaux et al. 2008). The scores of each individual along these two components were then used as measures of the progeny histological characteristics.

2.7. Statistical analysis

Data treatment and statistical analyses were performed with R (R Development Core Team

2010) and MatLab® softwares (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, U.S.A). The normality of the data distribution at the three storage dates was tested. Principal component analyses (PCA) were performed to analyze the variability of individuals of each data set: instrumental, sensory and histological granulometric curves. Effects of storage dates on instrumental and sensory texture variables were searched. Analyses of variance (ANOVA) were also performed to check for genetic, storage period, reciprocal crossing and scab selection effects on all apple texture traits. Individual broad sense heritabilities ($h^2_{bs\ ind}$) was computed with the following formula:

$$h^2_{bs\ ind} = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_e)$$

with σ^2_g and σ^2_e being the individual genetic and residual variances, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Storage affected sensory attributes and instrumental parameters of apple texture.

The progeny of 141 individuals was harvested over two years (2007 and 2009), with 14 common individuals to the two harvests. Each individual was tested for instrumental and sensory characters of texture according to storage. Variation of texture attributes at harvest (date 1), after 2 (date 2) and 4 (date 3) months cold storage are shown in Figure 3. Most instrumental variables distributed according to a normal law. Differences in the mean value of variables were observed between harvest years (Figure 3). An analysis of variance realized on the individuals common to the two harvests revealed highly significant effects of individual, year and of the interaction of two factors on texture attributes (Supplementary Table 1). According to the Fischer coefficient, the year effect was dominant over the individual effect. These results support previous observations on the harvest year dependency of fruit softening under different storage conditions (Ingle and Morris 1989). Due to these effects, the harvests from 2007 and 2009 were analyzed separately.

For each year, an analysis of variance revealed highly significant effects of the genetic and storage factors as well as of their interaction on texture and histological characters (Supplementary Table 2). According to the Fischer coefficient, the storage effect was dominant over the individual effect. These results agree with the reported evolution of apple

texture during storage (Holt and Schoorl 1984; Kingston 1992; Harker et al. 2002; Mehinagic et al. 2004; Mehinagic et al. 2003; Iwanami et al. 2005; Camps et al. 2005; Billy et al. 2008), which is known to be under genetic control (Iwanami et al. 2008b; Kouassi et al. 2009). These changes reflect the combination of the enzymatic cell wall disassembly (Goulao and Oliveira 2008) and the loss of cell turgor pressure (Johnston et al. 2002; Iwanami et al. 2008a) occurring during fruit ripening.

In our progeny, most compression (H1, Grad1, H2, WH1, WH2), penetrometry (Fp, Wp, Ep, Ff, Ff2) and sensory (CRISP, FIRMN, JUIC, FIBER) variables decreased with increasing storage time (Figure 3). In contrast, Dp, among the penetrometric variables and the perception of meltiness, graininess and mealiness increased. These results agree with reports by Mehinagic et al. (2004) and Billy et al. (2008) on ‘Fuji’, ‘Braeburn’ and ‘Golden delicious’ after 28 and 30 weeks of storage. In our study, after four months of storage, only about half of the individuals resisted spoilage and thus, due to the limited amount of individuals, date 3 data were not considered for further analysis.

3.2. The progeny showed histological variability

Apple parenchyma cellular structures have been associated with gas transport properties (Schotsmans et al. 2004) and tissue mechanical properties (Vincent 1989). Sensory texture descriptors were related with microstructure typologies of apple flesh (Allan-Wojtas et al. 2003). In order to evaluate the contribution of histology to texture attributes, cell size distributions (size distribution, homogeneous/heterogeneous distribution) were assessed in parenchyma sections under the cuticle of all individuals from the 2007 and 2009 harvests after 2 months storage. Curves of cell size distributions measured by image analysis of sections are shown on Figure 4A. One single peak with a mode ranging between 50-150µm was observed. Apple cell size varies depending on the region of the parenchyma (Abbott and Lu 1996) but commonly range from 100 to 200 µm (Khan and Vincent 1990). The average cell size estimated in the parenchyma tissue under the cuticle of the present progeny ranged from 97 to 120 µm, which was within the range of reported values.

Principal component analysis applied on the set of granulometric curves revealed variations in cell size distributions among the individuals at the second date of storage. As previously shown on tomato pericarp tissue (Devaux et al. 2008), PC1 (87% of variance) and

PC2 (6.6% of variance) (Figure 4B) of the granulometric curves took mainly cell size into account and homogeneous-heterogeneous cell size distribution, respectively (Figure 4C, D). The score of individuals along PC1 distributed according to a normal statistical law (Figure 4 E) with the parents located opposite to each other (Figure 4 B). An analysis of variance of the common individuals to the two harvests showed very significant effect of harvest year and individuals on PC1 ($p > 0.000$) but no significant interactions (Supplementary Table 1). Individuals had smaller mean cell size in 2007 than in 2009 (PC1 mean value: 0.34 and -1.54, for 2007 and 2009, respectively, with the negative values corresponding to larger cell sizes, see Figure 4C). PC2 was not significantly affected by harvest year but was highly affected by individuals ($p < 0.000$) and showed a significant interaction of the two factors.

Although there was histological variability within individuals as observed for the parents (Figure 5), cell size distribution correlated with fruit weight variation ($r^2 = 0.3$; Figure 5). This correlation indicated that cell size distribution likely reflected fruit size differences (Harada et al. 2005; Volz et al. 2003).

3.3. Instrumental texture variables correlated with sensory descriptors and parenchyma cell size distribution

Principal component analysis of all texture attributes measured from the progeny harvested in 2007 is shown on Figure 6 and Pearson correlation coefficients are shown on Table 1. As previously reported (Mehinagic et al., 2004), all compression and penetrometry values strongly cross-correlated particularly H1 and H2 as well as Ff and Ff2. The first two axes of the PCA showed that most penetrometry and compression data described different mechanical aspects of the fruits as they distribute within two different groups (Figure 6B). An exception is Dp among the penetrometry parameters as it negatively correlated with compression variables. Dp represents the fruit deformation at puncture and may reflect the mechanical contribution due to tissue collapse and reorganization of the flesh under the cuticle prior to its puncture. In contrast, the force at puncture, Fp, is more representative of the cuticle contribution to the mechanical characteristics of the fruit (Grotte et al. 2001). In agreement with results on different apple varieties (Mehinagic et al. 2003; Mehinagic et al. 2004; Billy et al. 2008), firmness correlated positively with fibrousness, crispness and juiciness attributes, while it correlated negatively with graininess, mealiness and meltiness perceptions.

Correlations between sensory perceptions were found with all compression and penetrometry variables except Dp and Wp for crispness and juiciness (Table 1). Firmness, crispness, juiciness, fibrousness positively correlated while meltiness, grain and mealiness, negatively correlated with instrumental texture variables. According to correlation values (Table 1) and the PCA variable map (Figure 6B), compression parameters appeared better estimators of sensory descriptors than penetrometry data. Duprat et al. (2000) and Grotte et al. (2001) showed that puncture tests on peeled and un-peeled apples gave very close data regarding flesh texture (our Ff, Ff2). The major force peak (Fp) obtained at the puncture of the fruit with the skin reflects the large contribution of the cuticle to puncture. In our study, Fp was highly correlated ($r=0.87$) with Ff, representing the flesh firmness. Ff had slightly higher correlations with each of the texture sensory attributes (except mealiness.). The difference noted between penetrometry and compression data as estimators of sensory perceptions likely reflected the different mechanical characteristics tested by the two approaches. Penetrometry combines both compression and shear stress as the probe ruptures and penetrates the flesh. This test appears to be less pertinent in predicting sensory perceptions of this progeny by the sensory panel. Double compression data (H1, H2, Grad1 and Grad2) have previously been shown to correlate to apple juiciness and mealiness perceptions (Mehinagic et al. 2004). These authors showed that in particular H2 and Grad1 could be used in a regression model to predict apple mealiness. No such correlations were found with our progeny. Correlations between instrumental and sensory texture descriptors have been reported by several authors (Abbott et al. 1984; Harker et al. 2002; Mehinagic et al. 2004; Camps et al. 2005; Ioannides et al. 2007), but besides firmness and crispness (Harker et al. 2002), compression and penetrometry variables are known to be poor predictors of sensory descriptors, such as mealiness, meltiness or juiciness (Harker et al. 2002; Camps et al. 2005). In support of King et al. (2000) observations, the close genetic relatedness between individuals in our progeny likely led to absence of relation or to lower correlation values than those reported for genetically contrasted apple varieties (Barreiro et al. 1998; Harker et al. 2002; Mehinagic et al. 2003; Mehinagic et al. 2004; Shmulevich et al. 2003).

Correlations were also assessed between instrumental and sensory texture attributes with the parenchyma cellular structure after 2 months storage from the two harvest years (Table 1). Although there was a relatively high intra-individual variability and a high genetic relatedness among individuals, cell size distribution (PC1) correlated with sensory and

instrumental texture variables. PC1 positively correlated with all compression parameter except Grad1. The fact that apple parenchyma made of smaller cells (high PC1 values) presented higher resistance to compression (H1, H2, WH1, WH2) can be explained by a higher cell density and thus a higher amount of cell wall materials per unit volume than tissue made of large cells (Khan and Vincent 1990). Conversely to compression data, PC1 negatively correlated with the penetrometry parameters Fp, Ff and Ff2. Although the cuticle plays a large contribution of to the penetrometry parameters (Fp), this result is interpreted as reflecting a higher brittleness of small cells that may have a higher tendency to break under the shearing stress induced by the probe as it penetrated the tissue compared to a higher ductility of large cells. PC1 positively correlated with juiciness in agreement with Allan-Wojtas et al. (2003), who reported that juicy fruits were composed of large cells with thin walls. Compression parameters may be better representing cellular density in the parenchyma tissue.

3.4. Instrumental and sensory texture variables and histology characteristics are highly heritable traits

In order to select the most pertinent traits for further genetic studies (QTL detection), broad sense genetic heritability of all instrumental and sensory texture and histological traits was evaluated (Table 4). Most parameters measured from the present progeny presented high genetic broad sense heritability for all dates and were relatively stable over storage periods. The values measured for instrumental texture variables ($h^2 = 0.32$ to 0.79) were within the range reported by Kouassi et al. (2009) on 29 different apple families or Iwanami et al. (2008b) on 40 families. Compression h^2 values increased between date 1 and 2, which confirmed the overall trend observed by Kouassi et al. (2009). However, this trend is not so clear for penetrometry, which showed increase for some traits (Dp, Wp), stability for Ff and decrease for the rest (Fp, Ep, Ff2). The heritability of sensory traits was higher than those of instrumental and tended to increase with storage. They were higher ($h^2 = 0.72$ to 0.94) than those of Kouassi et al. (2009) ($h^2 = 0.14$ to 0.58) and (Iwanami et al. 2008b) ($h^2 = 0.545 \pm 0.194$) probably resulting from the different experimental design of the sensory evaluation.

Histological traits presented also moderate to high heritability values and that of PC1 was higher than that of PC2 (Table 2). According to our knowledge, this is the first study reporting

heritability of histological traits. The high heritability for most of traits suggests that future QTL search will be reliable.

3.5. Reciprocal crosses and scab selection have low impact on texture variables in the progeny

Many studies in different species, such as *Zea mays*, *Heliantus annuus* and *Arabidopsis thaliana* demonstrated differences in phenotypic expression according to the reciprocal cross on pest resistance, plant size, grain yield and physical and chemical seed characteristics (Corey et al. 1976; Kang et al. 1999; Dhliwayo et al. 2005; Haro et al. 2007; Samano et al. 2009). However, among the few recent quantitative genetic studies performed on apple (Durel et al. 1998; Oraguzie et al. 2001; Iwanami et al. 2008b; Kouassi et al. 2009), very seldom are those who took into account reciprocal and/or maternal effects. Today most of apple breeding programs have as first objective to release scab resistant cultivars. In the selection process, scab tests are performed at an early stage on young plantlets in greenhouse. Such selection eliminated on average half of the progenies (Laurens et al. 2000). Our experimental design allowed studying both reciprocal crosses and scab selection effects at harvest and after two months storage. An analysis of variance (Supplementary Table 3) showed that the effect of the assessment date is of prior importance on all texture traits compared to that of reciprocal crosses and scab test. Reciprocal crosses had a significant effect on some compression (H1, H2, Grad2 and WH1) and penetrometry (Dp) parameters. Sensory variables were only significantly affected by date of assessment ($p < 0.000$) and not by reciprocal crosses. Results not shown indicated that the effects on those traits were more significant at date 2. But in any cases, the F values for reciprocal crosses were much lower than those of assessment date (Supplementary Table 3). The other penetrometry parameters, sensory and histological traits were not significantly affected. Early scab selection had a slight effect only on few compression traits (Grad2, WH1, WH2) and on histological traits (PC1 and PC2) with low F values compared to those of the assessment date. Sensory variables were not significantly affected by scab selection.

Overall these results show that reciprocal crosses and scab selection have a more limited impact on texture traits than storage and thus are not expected to affect markedly future QTL search.

4. Conclusion:

This report presents the first phenotyping of an apple progeny on texture related traits by three complementary approaches: two classical instrumental measures (compression and penetrometry), sensory assessment and histological screening. Relationships described in the apple literature within and between instrumental and sensory data were confirmed. The two instrumental texture evaluations were found complementary to each other in characterizing the apple flesh texture. Ongoing studies will follow up on the role of the combined contribution of microstructure, cell turgor, cell wall rigidity and adhesion and of other complex parameters contributing to the puncture and shear resistance of probe penetration involved in these mechanical behavior. Although correlated with sensory descriptors, none of these mechanical measures discriminate these traits. The pertinence of these measures with regard to the sensory mechanisms at the basis of texture perceptions remains a challenge. The original screening method developed to estimate cell size distributions in tomato pericarp tissue (Devaux et al. 2008) was found highly valuable to differentiate individuals in the apple progeny. The results confirmed the key role of histology on the mechanical behavior of apple tissue and further indicated a relationship between cell size and juiciness perception that needs to be examined.

The progeny texture traits varied with harvest year in response to likely difference in environmental factors. Within one harvest year, storage time was found to be the dominating source of instrumental and sensory texture traits variations of the progeny compared to scab resistance pre-selection and reciprocal crossing effects. The heritability estimates showed that all the texture related traits measured were under genetic control. Fruits stored for 2 months at low temperature presented the highest heritability values. The high cross-correlation of some of them, particularly among instrumental texture parameters, allows the reduction of the number of traits to be used for QTL search. For example, H1 and W1 measures for compression and Dp, Wp, Fp, Ff for penetrometry would be sufficient to describe apple mechanical behavior. This data set will be further used to identify new texture related QTLs in apple.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Dominique Bertrand (INRA-BIA, Nantes, France) for helpful discussions; R. Looten, X. Falourd, (INRA-BIA), M. Lormeau, R. Robic (INRA-GenHort, Angers, France) for their technical help. This work has been partly funded by the EU FP6 ISAFRUIT program (contract N° FP6-FOOD 016279-2). Doctoral studies of D. Gálvez-López were supported by CONACYT México (fellow 194867).

5. References

- Abbott JA, Lu R (1996) Anisotropic mechanical properties of apples. *Trans ASAE* 39:1451-1459
- Abbott JA, Watada AE, Massie DR (1984) Sensory and instrumental measurement of apple texture. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 109:221-228
- Alamar MC, Vanstreels E, Oey ML, Molto E, Nicolai BM (2008) Micromechanical behaviour of apple tissue in tensile and compression tests: Storage conditions and cultivar effect. *J Food Engin* 86:324-333
- Allan-Wojtas P, Sanford KA, McRae KB, Carbyn S (2003) An integrated microstructural and sensory approach to describe apple texture. *J Am Soc Hortic Sci* 128:381-390
- Barreiro P, Ortiz C, Ruiz-Altisent M, De Smedt V, Schotte S, Andani Z, Wakeling I, Beyts PK (1998) Comparison between sensory and instrumental measurements for mealiness assessment in apples. A collaborative test. *J Texture Stud* 29 (5):509-525
- Billy L, Mehinagic E, Royer G, Renard CMGC, Arvisenet G, Prost C, Jourjon F (2008) Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biol Technol* 47:315-324
- Brummell DA (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33:103-119
- Camps C, Guillermin P, Mauget JC, Bertrand D (2005) Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits. *J Texture Stud* 36:387-401
- Camps C, Guillermin P, Mauget JC, Bertrand D (2007) Discrimination of storage duration of apples stored in a cooled room and shelf-life by visible-near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 15:169-177
- Chauvin MA, Ross CF, Pitts M, Kupferman E, Swanson B (2010) Relationship between instrumental and sensory determination of apple and pear texture. *Journal of Food Quality* 33 (2):181-198
- Costa F, Alba R, Schouten H, Soglio V, Gianfranceschi L, Serra S, Musacchi S, Sansavini S,

- Costa G, Fei Z, Giovannoni J (2010a) Use of homologous and heterologous gene expression profiling tools to characterize transcription dynamics during apple fruit maturation and ripening. *BMC Plant Biology* 10 (1):229
- Costa F, Peace CP, Stella S, Musacchi S, Bazzani M, Sansavini S, Van de Weg WE (2010b) QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus domestica* Borkh.). *J Exp Bot* 61 (11):3029-3039.
- Costa F, Stella S, Van de Weg WE, Guerra W, Cecchinell M, Dallavia J, Koller B, Sansavini S (2005) Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica* 141 (1):181-190.
- Costa F, Van de Weg WE, Stella S, Dondini L, Pratesi D, Musacchi S, Sansavini S (2008) Map position and functional allelic diversity of *MD-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics & Genomes* 4:575-586
- Dailliant-Spinnler B, MacFie HJH, Beyts PK, Hedderley D (1996) Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the southern hemisphere. *Food Qual Pref* 7:113-126
- De Belie N, Hallett I, Harker FR, De Baerdemaeker J (2000) Influence of ripening and turgor on the tensile properties of pears: a microscopic study of cellular and tissue changes. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 125:350-356
- Devaux M-F, Bouchet B, Legland D, Guillon F, Lahaye M (2008) Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biol Technol* 47:199-209
- Duprat, F, Grotte, M, Loonis, D, Pietri, E (2000) Etude de la possibilité de mesurer simultanément la fermeté de la chair et de l'épiderme des pommes. *Sci. Alim.*, 20:253-264
- FAO (2009) FAOSTAT; <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. 2009
- Goulao LF, Oliveira CM (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* 19:4-25
- Grotte M, Duprat F, Loonis D, Pietri E (2001) Mechanical properties of the skin and the flesh of apples. *International Journal of Food Properties* 4:149-161

- Harada T, Kurahashi W, Yanai M, Warkasa Y, Satoh T (2005) Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species. *Sci Hortic* 105:447-456
- Harker FR, Maindonald J, Murray SH, Gunson FA, Hallett IC, Walker SB (2002) Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. *Postharvest Biol Technol* 24:225-239
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G (1997a) Texture of fresh fruit. *Hort Rev* 20:121-224
- Harker FR, Stec MGH, Hallett IC, Bennett CL (1997b) Texture of parenchymatous plant tissue: a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biol Technol* 11:63-72
- Holt JE, Schoorl D (1984) Mechanical properties and texture of stored apples. *J Texture Stud* 15:377-394
- Ingle M, Morris JC (1989) Predicting firmness changes of 'Rome' apples in refrigerated storage. *J Am Soc Hortic Sci* 114:90-94
- Ioannides Y, Howarth MS, Raithatha C, Defernez M, Kemsley EK, Smith AC (2007) Texture analysis of Red Delicious fruit: Towards multiple measurements on individual fruit. *Food Qual Pref* 18 (6):825-833
- Iwanami H, Moriya S, Kotoda N, Abe K (2008a) Turgor closely relates to postharvest fruit softening and can be a useful index to select a parent for producing cultivars with good storage potential in apple. *Hortscience* 43:1377-1381
- Iwanami H, Moriya S, Kotoda N, Takahashi S, Abe K (2005) Influence of mealiness on the firmness of apples after harvest. *Hortscience* 40:2091-2095
- Iwanami H, Moriya S, Kotoda N, Takahashi S, Abe K (2008b) Estimations of heritability and breeding value for postharvest fruit softening in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 133:92-99
- Jaeger SR, Andani Z, Wakeling IN, Macfie HJH (1998) Consumer preferences for fresh and aged apples: A cross-cultural comparison. *Food Qual Pref* 5:355-366
- Johnston JW, Hewett EW, Hertog MLATM (2002) Postharvest softening of apple (*Malus*

domestica) fruit: a review. N Z J Crop Hortic Sci 30:145-160

Khan AA, Vincent JFV (1990) Anisotropy of apple parenchyma. J Sci Food Agric 52:455-466

Khan AA, Vincent JFV (1993) Anisotropy in the fracture properties of apple flesh as investigated by crack-opening tests. J Mat Sci 28:45-51

King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, Alston FH, Durel CE, Evans KM, Griffon B, Laurens F, Maganaris AG, Schrevers E, Tartarini S, Verhaegh, J. (2000) Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). Theoretical and Applied Genetics 100:1074-1084

Kingston CM (1992) Maturity indices for apple and pear. Hort Rev 13:407-432

Kouassi AB, Durel CE, Costa F, Tartarini S, Van de Weg E, Evans K, Fernandez-Fernandez F, Govan C, Boudichevskaja A, Dunemann F, Antofie A, Lateur M, Stankiewicz-Kosyl M, Soska A, Tomala K, Lewandowski M, Rutkovski K, Zurawicz E, Guerra W, Laurens F (2009) Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. Tree Genetics & Genomes 5:659-672

Lin T-T, Pitt RA (1986) Rheology of apple and potato tissue as affected by cell turgor pressure. J Texture Stud 17:291-313

Mann H, Bedford D, Luby J, Vickers Z, Tong C (2005) Relationship of instrumental and sensory texture measurements of fresh and stored apples to cell number and size. Hortscience 40:1815-1820

Mehinagic E, Royer G, Bertrand D, Symoneaux R, Laurens F, Jourjon F (2003) Relationship between sensory analysis, penetrometry and visible—NIR spectroscopy of apples belonging to different cultivars. Food Qual Pref 14:473-484

Mehinagic E, Royer G, Symoneaux R, Bertrand D, Jourjon F (2004) Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. Postharvest Biol Technol 34:257-269

Oey ML, Vanstreels E, De Baerdemaeker J, Tijskens E, Ramon H, Hertog MLATM, Nicolai B (2007) Effect of turgor on micromechanical and structural properties of apple tissues: A quantitative analysis. Postharvest Biol Technol 44:240-247

Pitts MJ, Cavalieri RP (1988) Objective assessment of apple maturity based on starch

location. Transaction of the ASAE 31:962-966

R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria

Redgwell RJ, Fischer M (2002) Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In: Knee M (ed) Fruit quality and its biological basis. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp 46-88

Rojas AM, Gerschenson LN, Marangoni AG (2001) Contributions of cellular components to the rheological behaviour of kiwifruit. Food Res Int 34:189-195

Schotsmans W, Verlinden BE, Lammertyn J, Nicolai B (2004) The relationship between gas transport properties and histology of apple. J Sci Food Agric 84:1131-1140

Shmulevich I, Galili N, Howarth MS (2003) Nondestructive dynamic testing of apples for firmness evaluation. Postharvest Biol Technol 29:287-299

Soille P (2005) Beyond self-duality in morphological image analysis. Image and Vision Computing 23 (2):249-257

Tong C, Kureger D, Vickers Z, Bedford D, Luby J, El-Shiekh A, Schackel K, Ahmadi H (1999) Comparison of softening-related changes during storage of 'Honeycrisp' apple, its parents, and 'Delicious'. Journal of the American Society for Horticultural Sciences 124:407-415

Varela P, Salvador A, Fiszman S (2007) Changes in apple tissue with storage time: rheological, textural and microstructural analyses. J Food Engin 78:622-629

Vincent JFV (1989) Relationship between density and stiffness of apple flesh. J Sci Food Agric 47:443-462

Volz RK, Harker FR, Lang S (2003) Firmness decline in 'Gala' apple during fruit development. Journal of the American Society for Horticultural Sciences 128:797-802

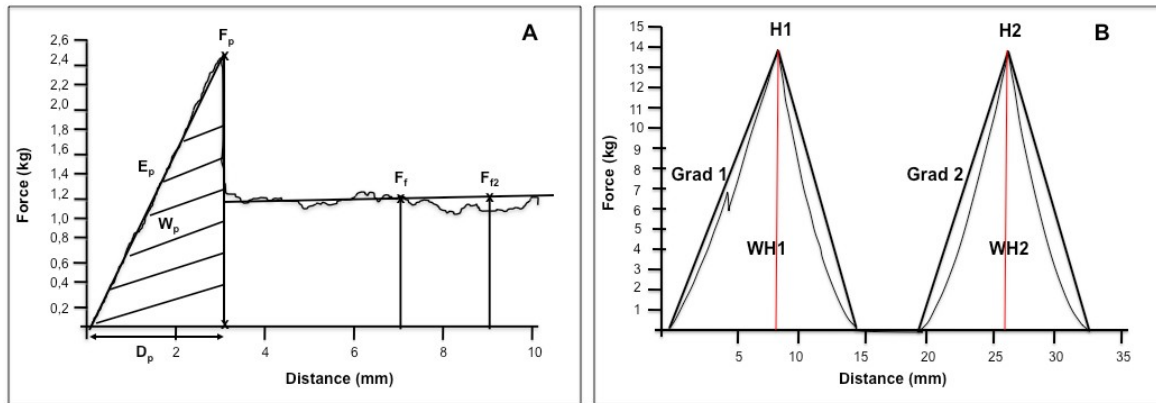


Figure 1. Force/deformation curves obtained during penetrometry (A) and compression (B) test on unpeeled apples.

Penetrometry variables: F_p (kg), maximal force on the curve; D_p (mm), deformation associated with F_p ; W_p (kg.mm), area under the curve between 0 and F_p ; E_p (kg.mm⁻¹), slope of the curve between 0 and F_p ; F_f (kg), force measured at 7 mm of deformation; F_{f2} (kg), force measured at 9 mm probe penetration.

Compression variables: $H1$ (kg) maximal force associated with the first compression, $H2$ (kg) maximal force associated with the second compression, $WH1$ (kg.mm) surface area under the first compression curve, $WH2$ (kg.mm) surface area under the second compression curve, $Grad1$ (kg.mm⁻¹) slope of the first compression, $Grad2$ (kg.mm⁻¹) slope of the second compression.

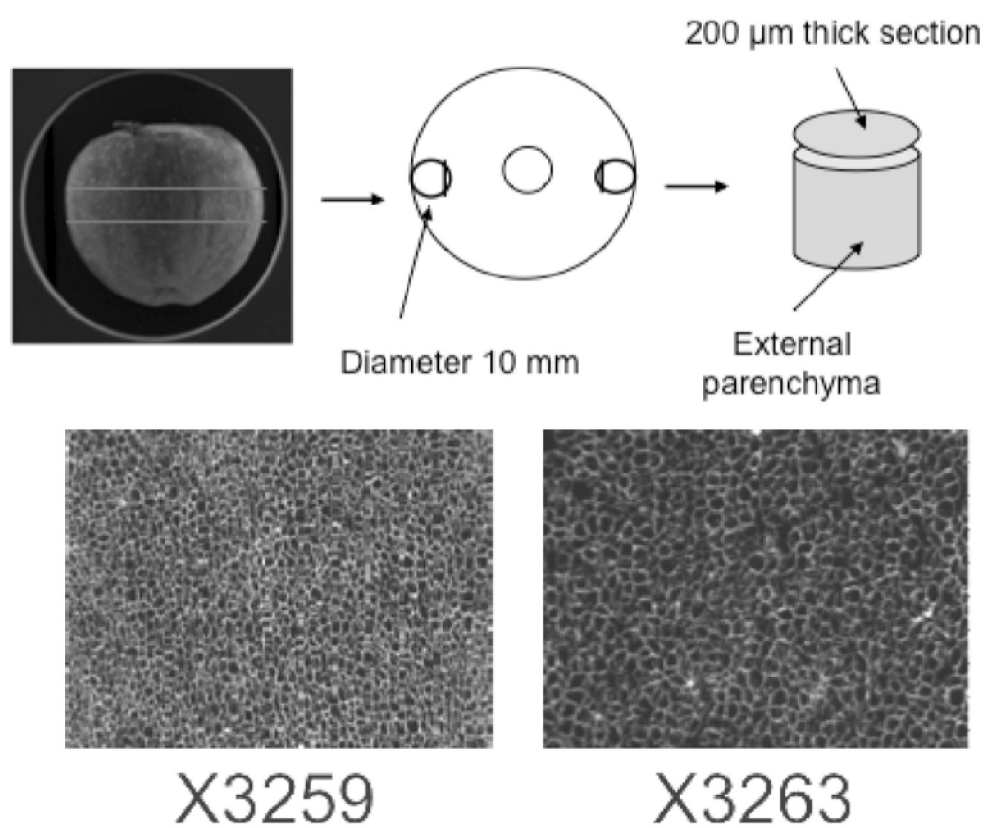


Figure 2. Sampling of parenchyma sections in the apple progeny and representative image (5.50 x 7.25 mm) of sections from the parents of the progeny (X3259, X3263).

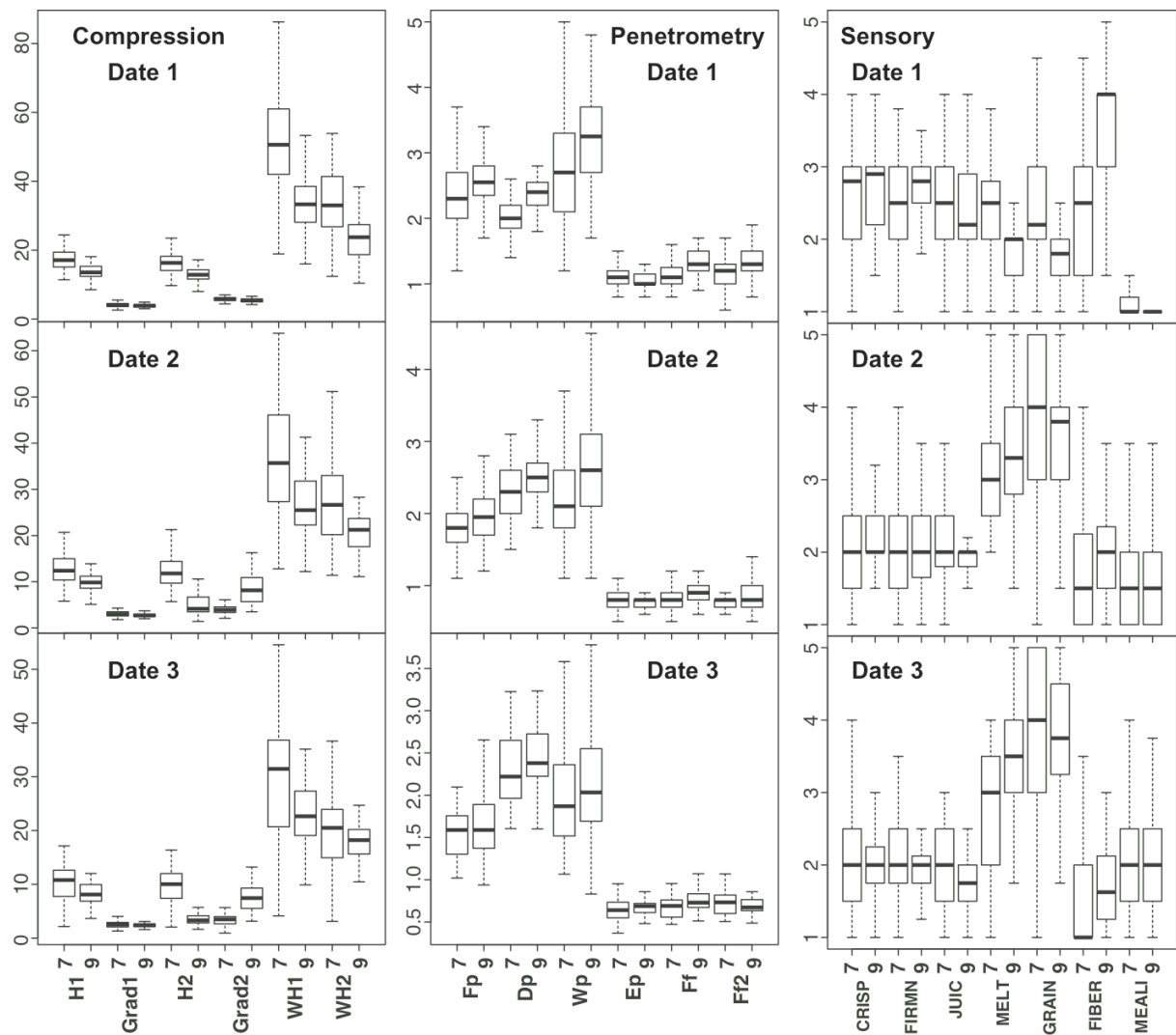


Figure 3. Box plot of instrumental and sensory texture variables of the apple progeny harvested in 2007 (7) and 2009 (9) and tested at harvest (Date 1) and after 2 (Date 2) and 4 months (Date 4) cold storage. Labels of X axis and value of the Y axis of compression and penetrometry variables are as defined in Figure 1. For sensory variables: CRISP: crispness, FIRMN: firmness, JUIC: juiciness, MELT: meltiness, GRAIN: graininess, FIBER: fibrousness, MEALI: mealiness noted on a scale from 1 to 5 by the tasting jury.

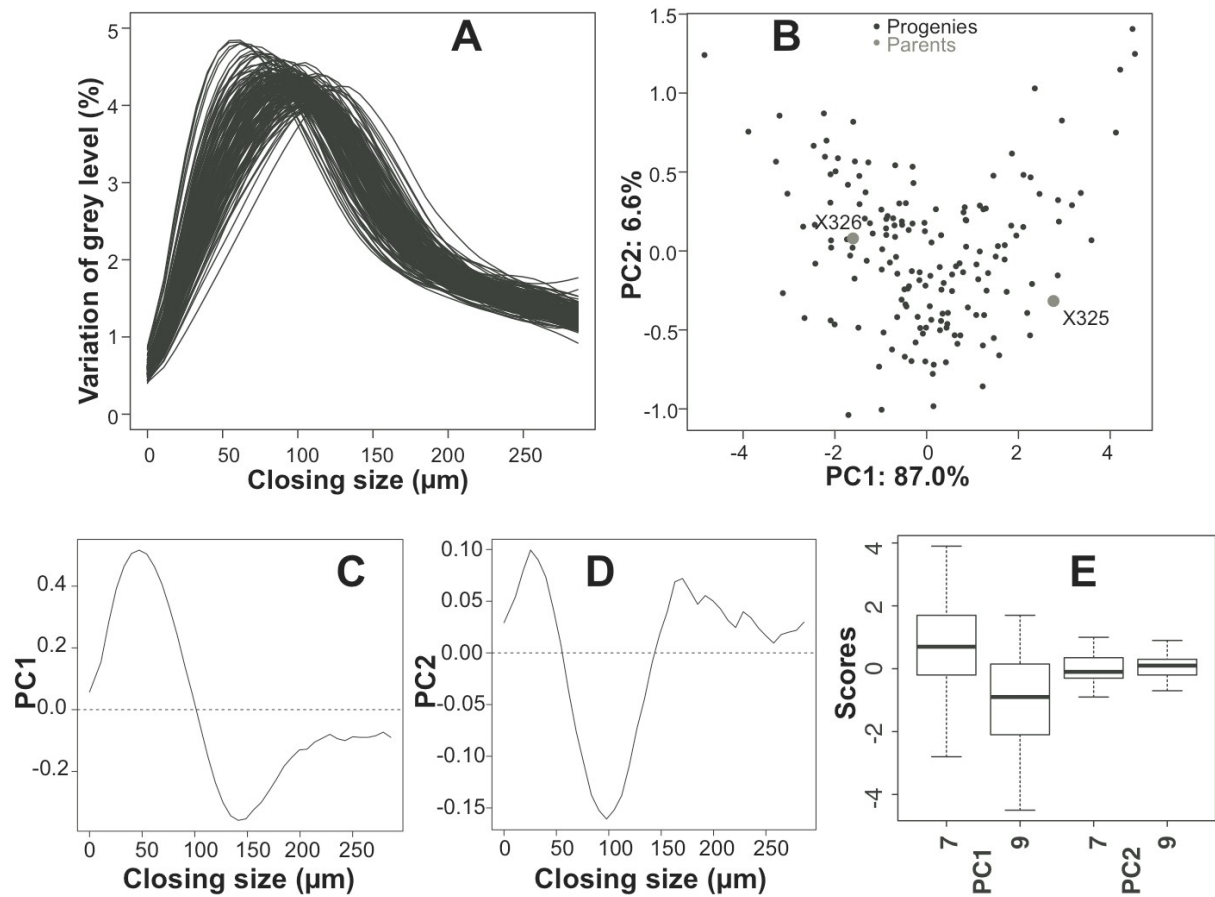


Figure 4. Cell size distribution of the progeny for the 2007 and 2009 harvest. A: Granulometric curve from image analysis by closing of sections from apple sub-cuticular parenchyma region. Each curve represents the mean estimate cell size distribution per individual; B: Principal component analysis of the granulometric curves; C and D: loading of the first and second principal components, respectively; E Box plot of the individual scores along the two first components for the 2007 (7) and 2009 (9) harvests.

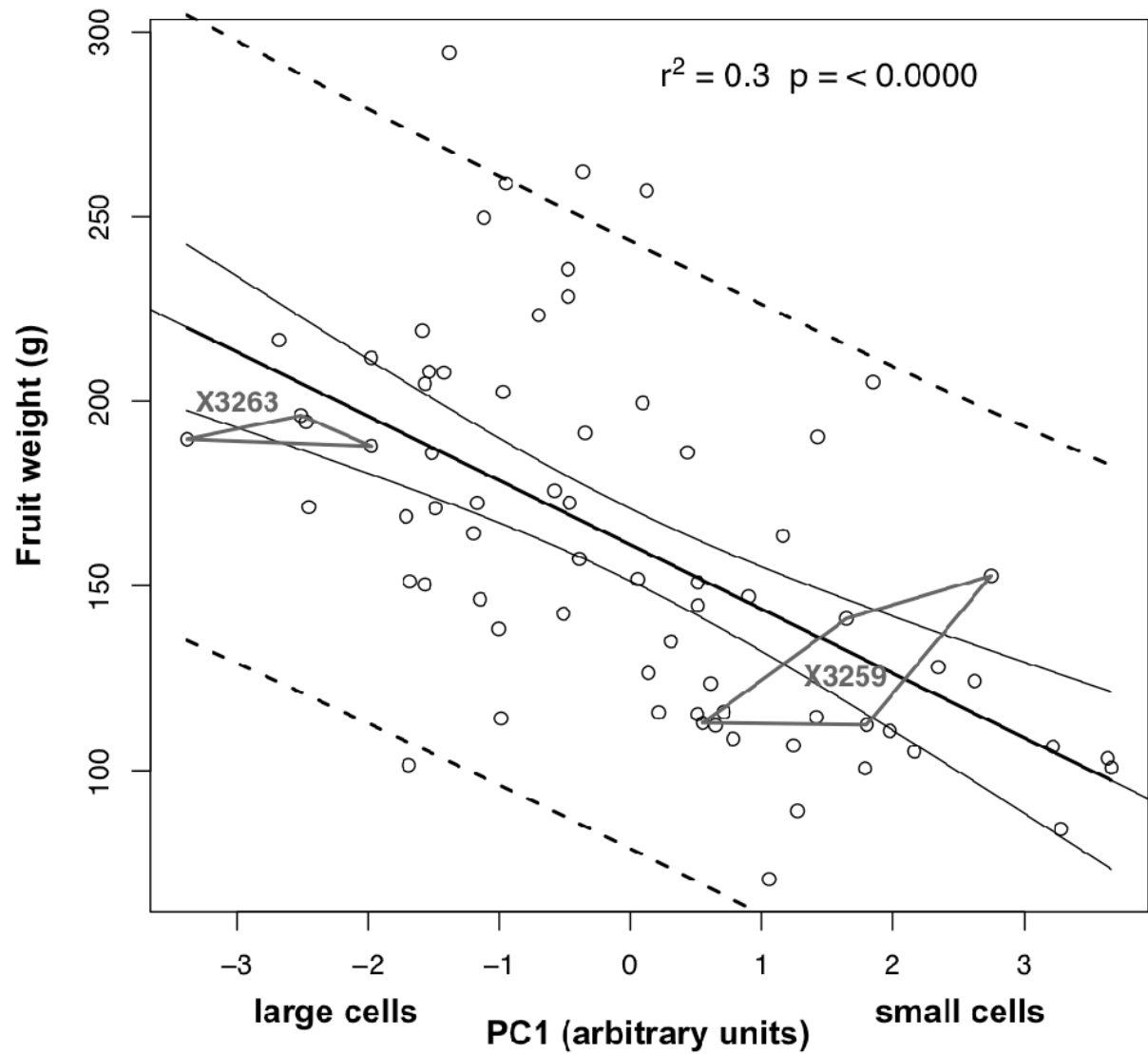


Figure 5. Relationship between cell size distribution (PC1) and fruit weight (g) from the 2009 harvest. Parent replicates (X3263, X3259) are indicated by the grey polygons. The center line corresponds to the regression line; the close-by fine curves are the confidence intervals of regression line. The dotted lines are the prediction intervals.

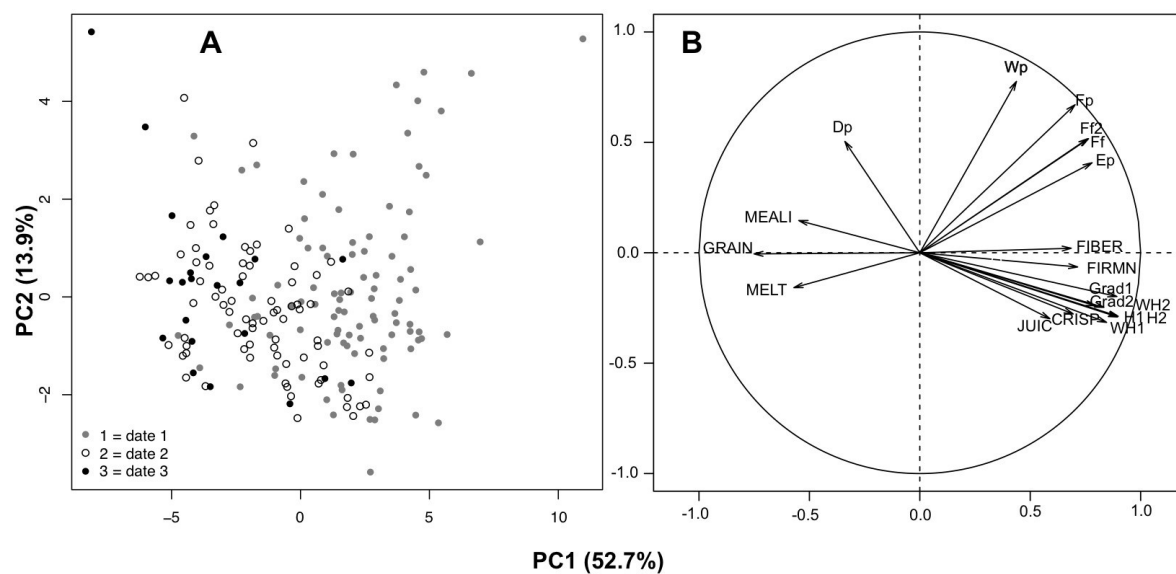


Figure 6. Principal component analysis of progeny 2007 harvest at all dates of analysis. A: individual map, B: variables map (variable labels as in Figures 1 and 3)

Table 1. Pearson's correlation coefficients between texture (all dates) mean values for the 2007 harvest and for histological data for all years at date 2. In bold are significant coefficients : $p < 0.001$

	H1	Grad1	H2	Grad2	WH1	WH2	Fp	Dp	Wp	Ep	Ff	Ff2	CRISP	FIRMN	JUIC	MELT	GRAIN	FIBER	MEALI
Grad1	0.94																		
H2	1.00	0.94																	
Grad2	0.87	0.92	0.85																
WH1	0.97	0.84	0.97	0.76															
WH2	0.92	0.79	0.93	0.63	0.96														
Fp	0.47	0.50	0.47	0.42	0.43	0.46													
Dp	-0.46	-0.52	-0.44	-0.60	-0.38	-0.26	0.10												
Wp	0.21	0.21	0.22	0.11	0.21	0.28	0.88	0.54											
Ep	0.61	0.68	0.60	0.63	0.53	0.50	0.85	-0.38	0.52										
Ff	0.54	0.64	0.54	0.56	0.46	0.46	0.87	-0.25	0.60	0.94									
Ff2	0.54	0.64	0.54	0.58	0.46	0.45	0.86	-0.26	0.60	0.93	0.98								
CRISP	0.56	0.53	0.57	0.42	0.55	0.59	0.30	-0.16	0.16	0.32	0.30	0.29							
FIRMN	0.51	0.52	0.52	0.36	0.49	0.54	0.38	-0.14	0.23	0.41	0.46	0.45	0.74						
JUIC	0.49	0.45	0.50	0.42	0.48	0.47	0.25	-0.11	0.16	0.25	0.21	0.20	0.72	0.50					
MELT	-0.39	-0.44	-0.39	-0.38	-0.35	-0.36	-0.38	0.08	-0.27	-0.39	-0.47	-0.47	-0.37	-0.60	-0.15				
GRAIN	-0.52	-0.52	-0.52	-0.45	-0.48	-0.50	-0.47	0.06	-0.36	-0.44	-0.47	-0.47	-0.70	-0.69	-0.64	0.52			
FIBER	0.46	0.45	0.47	0.34	0.45	0.49	0.41	-0.05	0.30	0.39	0.43	0.42	0.63	0.71	0.45	-0.60	-0.87		
MEALI	-0.37	-0.33	-0.40	-0.24	-0.39	-0.42	-0.29	-0.03	-0.23	-0.21	-0.22	-0.20	-0.63	-0.59	-0.68	0.26	0.68	-0.57	
PC1	0.35	0.04	0.49	-0.40	0.41	0.35	-0.32	-0.09	-0.27	-0.23	-0.49	-0.48	0.12	-0.05	0.33	0.02	-0.11	0.04	-0.11
PC2	-0.07	-0.02	-0.14	0.19	-0.11	-0.15	0.06	-0.02	0.03	0.07	0.02	0.03	-0.28	-0.17	-0.19	0.08	0.29	-0.24	0.20

Table 2. Estimate of heritability of fruit instrumental compression, penetrometry, sensory and histological traits at harvest (date 1) and after two months storage (date 2) for the 2007 harvest.

	Date 1	Date 2
Compression		
H1	0.63	0.72
Grad1	0.57	0.67
H2	0.56	0.71
Grad2	0.40	0.69
WH1	0.66	0.74
WH2	0.64	0.71
Penetrometry		
Fp	0.65	0.53
Dp	0.32	0.58

Wp	0.45	0.51
Ep	0.79	0.60
Ff	0.66	0.63
Ff2	0.69	0.61
Sensory		
CRISP	0.85	0.89
FIRMN	0.86	0.87
JUIC	0.80	0.73
MELT	0.72	0.79
GRAIN	0.84	0.89
FIBER	0.81	0.94
MEALI	0.89	0.80
Histology		
PC1		0.56
PC2		0.45

Supplementary Table 1: Analysis of variance of the texture and histological variables of the 14 common individuals (ind) to the two harvest years (year) a harvest (Date 1) and after 2 (Date 2) and 4 months storage (Date 3). In bold, significant effect at $p < 0.05$.

Compression				Penetrometry				Sensory				Histology			
Variable ^a	Df ^b	F value ^c	P ^d	Variable	Df	F value	P	Variable	Df	F value	P	Variable	Df	F value	P
Date 1															
H1	ind ^e	13	24.86 0.000	Fp	ind	11	8.48 0.000	CRISP	ind	13	11.44 0.000				
	year	1	203.65 0.000		year	1	22.82 0.000		year	1	61.13 0.000				
	ind*year	13	4.64 0.000		ind*year	11	5.12 0.000		ind*year	13	7.98 0.000				
	residuals	264			residuals	471			residuals	26					
Grad1	ind	13	5.37 0.000	Dp	ind	11	15.96 0.000	FIRMN	ind	13	4.59 0.000				
	year	1	7.43 0.007		year	1	125.84 0.000		year	1	40.25 0.000				
	ind*year	13	6.49 0.000		ind*year	11	4.73 0.000		ind*year	13	13.70 0.000				
	residuals	264			residuals	471			residuals	26					
H2	ind	13	25.16 0.000	Wp	ind	11	10.08 0.000	JUIC	ind	13	12.68 0.000				
	year	1	202.23 0.000		year	1	30.86 0.000		year	1	23.43 0.000				
	ind*year	13	5.71 0.000		ind*year	11	4.32 0.000		ind*year	13	2.12 0.050				
	residuals	264			residuals	471			residuals	26					
Grad2	ind	13	7.96 0.000	Ep	ind	11	17.24 0.000	MELT	ind	13	5.42 0.000				
	year	1	6.91 0.009		year	1	18.79 0.000		year	1	33.18 0.000				
	ind*year	13	6.56 0.000		ind*year	11	12.69 0.000		ind*year	13	5.60 0.000				
	residuals	264			residuals	471			residuals	26					
WH1	ind	13	36.41 0.000	Ff	ind	11	14.10 0.000	GRAIN	ind	13	4.81 0.000				
	year	1	359.93 0.000		year	1	62.54 0.000		year	1	62.61 0.000				
	ind*year	13	4.48 0.000		ind*year	11	8.48 0.000		ind*year	13	6.07 0.000				
	residuals	264			residuals	471			residuals	26					
WH2	ind	13	31.59 0.000	Ff2	ind	11	19.49 0.000	FIBER	ind	13	1.97 0.068				
	year	1	250.96 0.000		year	1	77.34 0.000		year	1	90.08 0.000				
	ind*year	13	6.14 0.000		ind*year	11	7.52 0.000		ind*year	13	3.00 0.008				
	residuals	264			residuals	471			residuals	26					
								MEALI	ind	13	17.08 0.000				
									year	1	94.47 0.000				
									ind*year	13	15.00 0.000				
									residuals	26					
Date 2															
H1	ind	13	53.23 0.000	Fp	ind	13	31.28 0.000	CRISP	ind	13	10.31 0.000	cp1	ind	11	25.44 0.000
	year	1	238.37 0.000		year	1	90.93 0.000		year	1	2.13 0.159		year	1	129.55 0.000
	ind*year	13	3.77 0.000		ind*year	13	5.72 0.000		ind*year	13	9.72 0.000		ind*year	11	2.02 0.032
	residuals	244			residuals	513			residuals	21			residuals	120	
Grad1	ind	13	26.84 0.000	Dp	ind	13	19.81 0.000	FIRMN	ind	13	9.27 0.000	cp2	ind	11	6.26 0.000
	year	1	68.26 0.000		year	1	111.77 0.000		year	1	0.59 0.451		year	1	3.49 0.064
	ind*year	13	2.71 0.001		ind*year	13	5.10 0.000		ind*year	13	7.35 0.000		ind*year	11	3.90 0.000
	residuals	244			residuals	513			residuals	21			residuals	120	
H2	ind	13	37.67 0.000	Wp	ind	13	22.03 0.000	JUIC	ind	13	4.78 0.001				
	year	1	2068.77 0.000		year	1	97.83 0.000		year	1	14.48 0.001				
	ind*year	13	13.99 0.000		ind*year	13	4.18 0.000		ind*year	13	2.88 0.015				
	residuals	244			residuals	513			residuals	21					
Grad2	ind	13	37.98 0.000	Ep	ind	13	21.79 0.000	MELT	ind	13	4.17 0.002				
	year	1	685.44 0.000		year	1	0.00 0.982		year	1	4.83 0.039				
	ind*year	13	14.26 0.000		ind*year	13	8.08 0.000		ind*year	13	4.05 0.002				
	residuals	244			residuals	513			residuals	21					
WH1	ind	13	60.04 0.000	Ff	ind	13	42.72 0.000	GRAIN	ind	13	2.12 0.061				
	year	1	206.03 0.000		year	1	85.02 0.000		year	1	3.61 0.071				
	ind*year	13	6.27 0.000		ind*year	13	18.73 0.000		ind*year	13	2.59 0.026				
	residuals	244			residuals	513			residuals	21					
WH2	ind	13	37.53 0.000	Ff2	ind	13	36.35 0.000	FIBER	ind	13	2.13 0.060				
	year	1	104.80 0.000		year	1	92.07 0.000		year	1	19.14 0.000				
	ind*year	13	7.02 0.000		ind*year	13	16.77 0.000		ind*year	13	2.44 0.034				
	residuals	244			residuals	513			residuals	21					
								MEALI	ind	13	4.85 0.001				
									year	1	13.30 0.002				
									ind*year	13	4.73 0.001				
									residuals	21					
Date 3															
H1	ind	4	46.26 0.000	Fp	ind	4	23.59 0.000	CRISP	ind	8	4.76 0.001				
	year	1	10.84 0.001		year	1	4.92 0.028		year	1	2.63 0.118				
	ind*year	4	0.63 0.645		ind*year	4	0.38 0.820		ind*year	8	3.25 0.012				
	residuals	80			residuals	168			residuals	24					
Grad1	ind	4	29.54 0.000	Dp	ind	4	31.29 0.000	FIRMN	ind	8	3.59 0.007				
	year	1	0.00 0.985		year	1	0.26 0.614		year	1	1.13 0.299				
	ind*year	4	0.48 0.750		ind*year	4	0.89 0.470		ind*year	8	1.30 0.291				
	residuals	80			residuals	168			residuals	24					
H2	ind	4	17.27 0.000	Wp	ind	4	36.32 0.000	JUIC	ind	8	3.30 0.011				
	year	1	101.33 0.000		year	1	3.30 0.071		year	1	7.82 0.010				
	ind*year	4	0.62 0.648		ind*year	4	0.38 0.826		ind*year	8	4.52 0.002				
	residuals	80			residuals	168			residuals	24					
Grad2	ind	4	11.33 0.000	Ep	ind	4	0.50 0.733	MELT	ind	8	3.42 0.009				
	year	1	55.10 0.000		year	1	3.92 0.049		year	1	23.88 0.000				
	ind*year	4	0.90 0.470		ind*year	4	1.33 0.262		ind*year	8	2.36 0.049				
	residuals	80			residuals	168			residuals	24					
WH1	ind	4	42.18 0.000	Ff	ind	4	17.25 0.000	GRAIN	ind	8	10.03 0.000				
	year	1	4.74 0.032		year	1	44.64 0.000		year	1	0.17 0.687				
	ind*year	4	1.90 0.118		ind*year	4	0.26 0.904		ind*year	8	3.34 0.010				
	residuals	80			residuals	168			residuals	24					
WH2	ind	4	17.19 0.000	Ff2	ind	4	19.67 0.000	FIBER	ind	8	5.18 0.001				
	year	1	0.33 0.565		year	1	2.44 0.120		year	1	2.76 0.110				
	ind*year	4	1.50 0.210		ind*year	4	1.77 0.137		ind*year	8	3.60 0.007				
	residuals	80			residuals	168			residuals	24					
								MEALI	ind	8	13.06 0.000				
									year	1	0.20 0.660				
									ind*year	8	2.38 0.048				
									residuals	24					

^a compression (H1, H2, Grad1, Grad2, WH1, WH2) and penetrometry (Fp, Dp, Wp, Ep, Ff, Ff2) defined as in Figure 1, sensory (CRISP: crispness, FIRMN: firmness JUIC: juiciness, MELT: meltiness, GRAIN: graininess, FIBER: fibrousness, MEALI: mealiness) and histology (cp1 and cp2 correspond to principal components 1 and 2 individual coordinates; ^b Df: degree of freedom; ^c Fischer coefficient; ^d P: probability value; ^e ind: individuals corresponding to the genetic effect

Supplementary Table 2 Analysis of variance of all texture and histological data from the 2007 and 2009 harvest at the 3 storage dates

Variables		2007			2009		
		Df	F value	P value	Df	F value	P value
Compressio							
H1	individuals	105	37.7	0.000	65.00	42.1	0.000
	date	2	1219.9	0.000	2.00	1730.2	0.000
	individuals:date	121	4.2	0.000	90.00	5.8	0.000
	residuals	1619			1243.00		
Grad1	individuals	105	26.6	0.000	65.00	24.3	0.000
	date	2	1326.2	0.000	2.00	2016.4	0.000
	individuals:date	121	4.8	0.000	90.00	6.7	0.000
	residuals	1619			1243.00		
H2	individuals	105	34.8	0.000	65.00	27.2	0.000
	date	2	1034.0	0.000	2.00	4451.9	0.000
	individuals:date	121	4.1	0.000	90.00	14.9	0.000
	residuals	1619			1243.00		
Grad2	individuals	105	22.2	0.000	65.00	17.1	0.000
	date	2	2118.0	0.000	2.00	423.0	0.000
	individuals:date	121	6.1	0.0000	90.00	14.0	0.0000
	residuals	1619			1243.00		
WH1	individuals	105	42.1	0.000	65.00	53.5	0.000
	date	2	794.5	0.000	2.00	749.3	0.000
	individuals:date	121	3.6	0.000	90.00	5.4	0.000
	residuals	1619			1243.00		
WH2	individuals	105	36.8	0.000	65.00	36.5	0.000
	date	2	398.9	0.000	2.00	288.6	0.000
	individuals:date	121	3.3	0.000	90.00	5.4	0.000
	residuals	1619			1243.00		
Penetrometry							
Fp	individuals	105	39.3	0.000	65.00	53.7	0.000
	date	2	1336.0	0.000	2.00	1278.4	0.000
	individuals:date	117	15.0	0.000	72.00	13.9	0.000
	residuals	3408			2258.00		
Dp	individuals	105	27.2	0.000	65.00	22.3	0.000
	date	2	246.0	0.000	2.00	53.1	0.000
	individuals:date	117	14.0	0.000	72.00	10.2	0.000
	residuals	3408			2258.00		
Wp	individuals	105	22.4	0.000	65.00	28.7	0.000
	date	2	234.7	0.000	2.00	258.3	0.000
	individuals:date	117	8.5	0.000	72.00	8.3	0.000
	residuals	3408			2258.00		
Ep	individuals	105	73.5	0.000	65.00	70.1	0.000
	date	2	3921.2	0.000	2.00	2787.9	0.000
	individuals:date	117	31.3	0.000	72.00	22.9	0.000
	residuals	3408			2258.00		

Ff	individuals	105	45.0	0.000	65.00	103.8	0.000
	date	2	2246.3	0.000	2.00	3007.0	0.000
	individuals:date	117	17.5	0.000	72.00	20.8	0.000
	residuals	3408			2258.00		
Ff2	individuals	105	50.9	0.000	65.00	106.8	0.000
	date	2	3277.7	0.000	2.00	4032.2	0.000
	individuals:date	117	19.4	0.000	72.00	23.2	0.000
	residuals	3408			2258.00		
Sensory							
CRISP	individuals	105	14.9	0.000	65.00	7.7	0.000
	date	2	180.5	0.000	2.00	206.8	0.000
	individuals:date	166	6.2	0.000	119.00	5.9	0.000
	residuals	113			139.00		
FIRMN	individuals	105	14.9	0.000	65.00	13.9	0.000
	date	2	126.1	0.000	2.00	188.8	0.000
	individuals:date	166	5.3	0.000	119.00	4.8	0.000
	residuals	113			139.00		
JUIC	individuals	105	9.4	0.000	65.00	8.3	0.000
	date	2	148.5	0.000	2.00	236.4	0.000
	individuals:date	166	3.3	0.000	119.00	3.7	0.000
	residuals	113			139.00		
MELT	individuals	105	9.1	0.000	65.00	9.5	0.000
	date	2	125.4	0.000	2.00	501.6	0.000
	individuals:date	166	4.0	0.000	119.00	4.5	0.000
	residuals	113			139.00		
GRAIN	individuals	105	15.7	0.000	65.00	9.3	0.000
	date	2	484.1	0.000	2.00	590.6	0.000
	individuals:date	166	6.4	0.000	119.00	3.8	0.000
	residuals	113			139.00		
FIBER	individuals	105	15.0	0.000	65.00	9.1	0.000
	date	2	170.4	0.000	2.00	495.0	0.000
	individuals:date	166	5.2	0.000	119.00	4.4	0.000
	residuals	113			139.00		
MEALI	individuals	105	16.0	0.000	65.00	7.8	0.000
	date	2	248.6	0.000	2.00	260.5	0.000
	individuals:date	166	5.5	0.000	119.00	4.1	0.000
	residuals	113			139.00		
Histology							
pc1	individuals	98.00	8.62	0.000	63.00	22.54	0.000
	residuals	495.00			356.00		
pc2	individuals	98.00	5.98	0.000	63.00	8.34	0.000
	residuals	495.00			356.00		

Supplementary Table 3. Effects of date of assessment, genetic cross and scab selection on the texture traits measured in the progeny individuals harvested in 2007. In bold $p < 0.001$

Compression					Penetrometry			
Effects	Variables	Df	F value	P value	Variables	Df	F value	P value
Date	H1	1	493.7	0.000	Fp	1	741.4	0.000
Cross		1	18.6	0.000		1	2.1	0.148
Scab test		1	3.7	0.053		1	1.6	0.208
Cross:Scab test		1	3.4	0.065		1	8.1	0.004
Cross:Date		1	0.0	0.907		1	0.1	0.782
Scab test:Date		1	2.1	0.145		1	12.7	0.000
Cross:Scab test:Date		1	1.8	0.183		1	13.0	0.000
Residuals		1366				2664		
Date	Grad1	1	591.4	0.000	Dp	1	179.0	0.000
Cross		1	9.2	0.003		1	12.1	0.001
Scab test		1	5.3	0.021		1	13.3	0.000
Cross:Scab test		1	4.1	0.043		1	9.5	0.002
Cross:Date		1	0.8	0.363		1	12.0	0.001
Scab test:Date		1	2.0	0.154		1	48.7	0.000
Cross:Scab test:Date		1	1.4	0.232		1	0.8	0.385
Residuals		1366				2664		
Date	H2	1	420.6	0.000	Wp	1	178.8	0.000
Cross		1	17.3	0.000		1	2.4	0.118
Scab test		1	4.3	0.039		1	0.3	0.577
Cross:Scab test		1	4.3	0.038		1	10.3	0.001
Cross:Date		1	0.1	0.747		1	2.0	0.154
Scab test:Date		1	2.4	0.121		1	33.1	0.000
Cross:Scab test:Date		1	2.0	0.162		1	14.5	0.000
Residuals		1366				2664		
Date	Grad2	1	1331.1	0.000	Ep	1	1460.3	0.000
Cross		1	19.7	0.000		1	0.5	0.494
Scab test		1	16.5	0.000		1	6.9	0.009
Cross:Scab test		1	5.0	0.026		1	0.6	0.423
Cross:Date		1	0.4	0.549		1	7.9	0.005
Scab test:Date		1	2.5	0.116		1	0.8	0.364
Cross:Scab test:Date		1	2.1	0.147		1	2.1	0.152
Residuals		1366				2664		
Date	WH1	1	308.9	0.000	Ff	1	1074.8	0.000
Cross		1	19.5	0.000		1	0.0	0.828
Scab test		1	15.3	0.000		1	7.2	0.008
Cross:Scab test		1	1.8	0.179		1	7.0	0.008
Cross:Date		1	0.1	0.737		1	0.8	0.361
Scab test:Date		1	1.8	0.176		1	0.4	0.514
Cross:Scab test:Date		1	2.1	0.148		1	2.2	0.135
Residuals		1366				2664		
Date	WH2	1	132.6	0.000	Ff2	1	1680.0	0.000
Cross		1	9.9	0.002		1	0.1	0.796
Scab test		1	20.5	0.000		1	6.2	0.013
Cross:Scab test		1	2.3	0.128		1	5.1	0.024
Cross:Date		1	0.0	0.903		1	0.4	0.523
Scab test:Date		1	0.5	0.468		1	0.8	0.376
Cross:Scab test:Date		1	1.9	0.171		1	0.7	0.401
Residuals		1366				2664		

CHAPITRE III

Variation des déterminants structuraux de la paroi cellulaire dans une descendance de pomme

Variation des déterminants structuraux de la paroi cellulaire dans une descendance de pomme

Contexte

Les polysaccharides de la paroi cellulaire sont des acteurs clés dans le développement de la texture des fruits charnus. L'objectif de ce chapitre était d'étudier leur variabilité chimique au sein d'une descendance de 141 individus récoltés sur deux années. La composition et structure fine des polysaccharides pariétaux ont été étudiées après deux mois de conservation. Une étude structurale fine a été réalisée sur les hémicelluloses. Ces polysaccharides sont la cible d'enzymes (XET/XTH) et protéines (expansines) modifiant leurs structures et interactions au sein de la paroi lors du ramollissement des fruits mais les conséquences de ces modifications sur leur structure chimique restent méconnues. L'effet du sens de croisement et d'une pré-sélection pour une résistance à la tavelure a également été étudié sur la biochimie des parois.

Les résultats indiquent que l'année de récolte a eu un fort impact sur la composition et structure des polysaccharides de la paroi cellulaire. Pour chaque année de récolte, les effets génétiques ont eu un impact plus fort sur la composition chimique des polysaccharides pariétaux que la sélection à la résistance à la tavelure et le sens du croisement. Les valeurs d'héritables observées pour les teneurs en acide uronique, glucose, galactose et xylose, ainsi que pour les structures hémicellulosiques de type glucomannane (Hex4a2) et xyloglucane (XLXGa1, XLFGa1, XLFG, XXFG, XXFGa1, XXFGa2, XLFGa2, GFG) sont faibles à moyennes. Des corrélations ont été établies entre les données chimiques et indiqueraient des co-régulations lors de la biosynthèse ou du métabolisme des hémicelluloses.

Cette étude est la première se basant sur le chémotypage des polysaccharides de la paroi cellulaire sur une descendance de pomme. Les résultats ouvrent des perspectives pour la recherche de nouveaux marqueurs génétiques liés à la texture du fruit.

Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicellulose fine structure in an apple progeny

^{1,2}D. Galvez-Lopez, ²F. Laurens, ¹B. Quémener, ^{*1}M. Lahaye

¹ INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, BP 71627, F-44316 Nantes, France; ² INRA, UMR1259 Génétique et Horticulture, BP 60057, F-49071 Beaucouzé, France. Corresponding author. E-mail adress: lahaye@nantes.inra.fr

• Abstract

Cell wall polysaccharides are key actors in the texture of fleshy fruits. To assess the genetic variability of apple cell walls, the chemical composition and structure of polysaccharides in a progeny of 141 individuals harvested over 2 years and after 2 months storage were studied. A focus was made on the fine structural variations of hemicelluloses by combining glucanase degradation and MALDI-TOF MS analysis. The genetic contribution was distinguished from harvest year as well as from parental crossing patterns and scab resistance selection. Results showed that harvest year had a major impact on cell wall polysaccharide composition and structure. Within each harvest, genetic effect had a much higher significant impact on cell wall polysaccharide chemistry than those of reciprocal cross and early scab selection. Correlations between the chemical results were observed and discussed with regards to putative biosynthetic or metabolic regulations between cell wall polysaccharides structures. High heritable variations were observed for uronic acids, glucose, galactose and xylose contents as well as for hemicelluloses structures attributed to glucomannan (**Hex4a2**) and xyloglucan (**XLXGa1**, **XLFGa1**, **XLFG**, **XXFG**, **XXFGa1**, **XXFGa2**, **XLFGa2**, **GFG**). These results pave the way for the search of new genetic markers of apple texture based on cell wall determinants.

Keywords: apple; cell wall polysaccharides; hemicelluloses; xyloglucan; MALDI-TOF MS; genetic variability

1. Introduction

Fleshy fruit texture is an important quality trait impacting post-harvest itineraries, shelf-life and consumers choice. It results from coordinated events implying different determinants at several scales including cell walls [1, 2]. Apple represents a major production worldwide among fleshy fruits and receives a lot of attention with regard to quality. In particular, several reports focused on its cell walls disassembly during fruit softening [3-5]. Both homogalacturonan (HG) and rhamnogalacturonan I (RGI) structural domains of pectins undergo modifications. These include a limited degradation of the partially methyl-esterified α -1,4-linked D-galacturonic acid of HG by the combined action of endo-polygalacturonase and pectin methyl-esterase activities [3, 4]. HG being particularly present at the cell-cell interfaces, their modifications are known to modulate the calcium mediated cell-cell adhesion [6, 7]. The β -1,4-linked D-galactan, α -1,5-linked L-arabinan, and arabinogalactan side-chains on the repeating α -1,4-linked D-galacturonic acid and α -1,2-linked L-rhamnose of RGI pectic structural domains are pruned during ripening [8-10] by different glycosidases [3, 4]. Modulations of RGI side chains structure have often been associated with tissue mechanical properties [11, 12] as well as with tomato [13, 14] and apple texture [15, 16] probably through their ability to hydrogen bond to cellulose [17]. In contrast to pectins, the expression or the activities of enzymes reshuffling hemicelluloses structure and interactions with cellulose during softening [3, 4] are not linked with marked compositional and solubility changes [18, 19] of their major xyloglucan, minor glucomannans and trace xylan components [20-22]. However, little is known about their fine structural modifications as a consequence of their re-organization by expansin and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) during fruit development and ripening [23-27]. Expansin loosens the cell wall by breaking hydrogen bonds between xyloglucan and cellulose [28], which facilitates access of cell wall polysaccharides to degrading enzymes during ripening [29, 30] while XTH cleaves and rejoins xyloglucan chains to temporarily loosen cell wall [31]. Both of these modifications are expected to impact the structure and organization of hemicelluloses in the cell wall and thus, their contribution to the wall mechanical properties and fruit texture. The high number of genes coding expansin (6) [24] and XTH in apple (11) with two particularly expressed

during ripening (*Md-XTH2* and *Md-XTH10*) [23] suggests that they might have different specific functions and targets in the cell wall as the fruit develops and ripens.

Little is known about the genetic variability of apple cell wall polysaccharides chemical structures. Such lack of knowledge limits the genetic improvement of apple on texture traits. The genetic basis of apple texture has recently been studied using both global instrumental and sensory traits analysis [25, 32-35] but did not consider the contributions of specific determinants of texture such as, histological, turgor pressure or cell wall chemical characteristics [1, 2, 5]. In the line of these studies, we engaged in the mapping of new texture related Quantitative Trait Loci (QTL) based on the genetic variability of histological characteristics and cell wall chemistry in a progeny of 141 individuals harvested over 2 years. In a previous report on this progeny, instrumental and sensory texture variables as well as of parenchyma tissue cell size distribution were shown to be under genetic control and markedly affected by harvest year and storage [36]. Relationships between histological characteristics and texture variables were established, notably between cell size and compression and penetrometric parameters as well as with juiciness perception. This study reports the first characterization of the genetic impact on cell wall polysaccharide compositional and structural variations on the same apple progeny with a special focus on the fine structure variation of hemicelluloses.

2. Materials and methods

2.1. Plant Material

The apple material consisted of the population previously studied [36]. Briefly it consisted of 141 individuals of one segregating progeny (12-IHVW) and their parent genitors (X3259 and X3263). The latter are used in INRA Angers apple breeding programs and both carrying the V_f scab resistance gene [35]. To test for the effects of the reciprocal cross and scab selection on fruit quality traits, the two parents were crossed in reciprocal ways, each being used as both male and female. Each family was then split into two lots: one following an early selection to discard the non V_f individuals, and the

other one, on which no selection test was performed. Progenies and parents were planted in an experimental orchard at INRA Angers (France). Due to fruit availability, samples were harvested in 2007 (105 individuals) and 2009 (50 individuals) with 14 common individuals over the two harvest years. Fruits were collected at optimum maturity based on taste, ground color and starch staining measurements [35, 37]. The harvest period for both years spanned from September to November. Fruits were analyzed after 2 months storage at 1.5 °C and 80 % of relative humidity.

2.2. Cell wall material preparation

Parenchyma tissue from three fruits per genotype was sampled at random from the outer flesh region (3 x about 2 cm³) as described for histological assessment tissue sampling in [36]. Samples were immediately frozen in liquid N₂ and freeze-dried. Each dried sample was ground to a fine powder (FastPrep, MP Biomedicals, Solon, USA) and extensively washed with 70 % ethanol at 100°C and 100 bars in an automated extractor (ASE250, Dionex Sunnyvale, CA, USA) until the ethanol solution was free of soluble sugars and then with 96% ethanol. The alcohol insoluble material (AIM) was further dehydrated at 40°C under vacuum over P₂O₅. All biochemical measurements were performed from dry AIM.

2.3. Chemical cell wall composition

Identification and quantification of cell wall neutral sugars were performed by gas-liquid chromatography (GC) after sulfuric acid degradation [38]. AIM was dispersed in 13 M sulfuric acid for 30 min at 25 °C and then hydrolyzed in 1 M sulfuric acid (2h, 100 °C). Sugars were converted to alditol acetates [39] and chromatographed on a DB 225 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA; temperature 205 °C, carrier gas H₂). Standard sugars solution and inositol as internal standard was used for calibration. Uronic acids in acid hydrolyzates were quantified using the methahydroxydiphenyl colorimetric acid method [40]. Contaminating glucose from residual starch in the AIM was measured by HPAEC (PA1 analytical column, 250 x 4 mm, Dionex) after amylolysis [41]. AIM glucose content was corrected for residual starch.

2.4. Enzymatic degradation and mass spectrometry

Cell wall material was degraded by endo-1,4- β -glucanase from *Trichoderma longibrachiatum* (540 U/mL, Megazyme, Bray, Ireland) and the oligosaccharides released were analyzed by MALDI-TOF MS. AIM samples (5 mg) from each of the 3 fruits per individual were randomly selected and suspended in water containing 10.8 U of glucanase. Glucanase hydrolysates (5 μ L) were mixed with the Super DHB matrix (5 μ L) [42]. The matrix was prepared by a mixture (90/10, v/v) of 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) at 10 mg/mL in water and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid at 10 mg/mL in pure methanol, respectively. Finally 4 μ L of the mixture were deposited on the target and left to dry overnight at room temperature. For each hydrolysate, three replicates were realized. MALDI-TOF MS analysis was performed in the positive ion mode on a MALDI-TOF/TOF (Autoflex III Smartbeam, Bruker, Germany) equipped with a Yag laser (355 nm). Analyses were carried out in the reflector mode using a laser frequency of 200 Hz and an accelerating voltage of 19 kV. Spectra were recorded in the mass range m/z 500-2000. A low mass gate value of m/z 500 was selected for analysis in order to avoid saturation of the detector. The instrument was externally calibrated using the monoisotopic masses of main oligosaccharides ($[M+Na]^+$ ion) released from xyloglucans (**XXG**: 791.243 Da, **XXXG**: 1085.338 Da, **XXFGa1**: 1435.459 Da, **XLFGa1**: 1597.512 Da). Nomenclature of oligosaccharides followed that of (Fry et al., 1993) extended to account for acetyl groups noted a (Table 1). Hexose containing oligosaccharides attributed to glucomannans were noted **Hex**. The number following the structure codes denoted the number of building structures and acetyl groups in the oligosaccharides (i.e. **Hex3a2** corresponds to 3 hexoses and 2 acetyl groups).

2.5. Statistical Analysis

Data treatment and statistical analyses were performed with R software [43]. Outliers from the data distribution were eliminated from the data set. An analysis of variance (ANOVA) and Student's t-test were performed to evaluate the effects of genetic, harvest year, reciprocal cross and scab resistance selection on the chemical data. Individual

broad sense heritabilities ($h^2_{bs\ ind}$) was computed with the following formula:

$$h^2_{bs\ ind.} = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_e)$$

with σ^2_g and σ^2_e being the individual genetic and residual variances, respectively.

3. Results and discussion

The sugar composition of the alcohol insoluble material from the progeny (AIM; Table 2) was typical of apples [9, 20, 44-46]. Cell wall polysaccharides were mainly composed of glucose, uronic acid, arabinose, xylose and galactose. Mannose, rhamnose and fucose represented minor contributors. The variation in the content of major sugars is shown in Figure 1 for the two harvests. An analysis of variance realized on the sugar composition of the 14 common genotypes to the two harvests showed that xylose, mannose, glucose and uronic acid contents were significantly affected by harvest year ($p < 0.000$). On these common genotypes, as a mean, xylose, mannose and glucose contents were higher in 2007 fruits (8.2, 2.2, 36.8 mol%, respectively) compared to 2009 fruits (7.7, 2.2, 34.3 mol %, respectively). In contrast, uronic acids content was higher in 2009 fruits (32.3 mol%) compared to 2007 fruits (26.5 mol%). Genotypes behaved differently with harvest year for xylose, mannose and uronic acids contents (significant interaction between year and genotype $p < 0.000$).

The fine structural variation of apple parenchyma hemicellulose was assessed by combining glucanase degradation and MALDI-TOF MS analysis of the oligosaccharides released. Such approach was successful in the identification of various cell wall mutants [47-49] and for the location of QTL for hemicellulose structures variability in *Arabidopsis thaliana* [50]. The mean MALDI-TOF mass spectrum of the glucanase hydrolyzate of the progeny is shown on Figure 2. Although great care must be taken when interpreting ions intensity with regard to the impact of sample preparation on ionization [51], variations in the normalized intensities were taken as representative of differences in oligosaccharides concentration. Two series of ions were attributed according to their specific m/z to xyloglucan and to hexose based hemicelluloses. The major ions corresponded to **XXFGa1**, **XLFGa1** and **XXXG** together with minor structures identified as **GFG**, **XFG**, **XXG**, **XLXG**, **XLXGa1**, **XXFG**, **XXFGa2**, **XLFG** and **XLFGa2**

structures as previously reported in apple xyloglucan [52-56]. **GFG** and **XFG** were also identified using tandem ESI-Q-TOF mass spectrometry (Quemener et al., to be published). However the spectra showed that the **XXFG** and **XLFG** structures were mainly present as acetylated derivatives, which were not previously shown in the literature likely due to artefactual deacetyl-esterification introduced in the analyses. Minor acetyl-esterified hexose containing structures (**Hexa**) were also identified and attributed to glucomannan. This hemicellulose is present in apple cell wall [20, 22] and is usually acetyl esterified in plant cell walls [57].

Like for sugar contents, hemicellulose oligosaccharides ion intensity varied with the harvest year (Figure 3). In the common individuals to the two harvests, all but **Hex4a1**, **XXG**, **XLG**, **XFG**, **XXFG**, **XLFG** hemicellulose structures were significantly affected by the year of harvest ($p < 0.037$ - 0.000). An analysis of variance showed that all structures differed according to genotype ($p < 0.003$ - 0.000). **Hex4a2**, **Hex7a3** and all xyloglucan oligomers except **XXFGa2** showed highly significant interactions ($p < 0.000$) between year and genotype.

The differences observed in the cell wall polysaccharides chemical composition and hemicellulose fine structure between harvest years were likely due to environmental factors affecting both fruit development and ripening processes. All individuals were not affected similarly by harvest year indicating a genetically determined sensitivity to environmental factors. To test for common compositional and structural variations in the two harvests, significant correlations ($p < 0.001$) shared in the two harvests were searched (Table 3). Negative correlations were observed between uronic acid content and the major other sugars (glucose, galactose and arabinose) indicating a distinct variability in the content of homogalacturonan structural domains of pectins from that of cellulose and pectic rhamnogalacturonan I side chains. Although both galactose and arabinose are mainly bound to rhamnose in RGI pectic domains, only galactose and rhamnose correlated. The negative correlation observed is in keeping with the ripening associated cell wall metabolism impacting mostly galactan pectic side chains particularly during storage [9, 10]. A positive correlation between rhamnose and xylose contents was observed and may account for a relationship between RGI and galacturonan pectic

domains substituted by xylose (xylogalacturonan), which are linked to each other in apple pectins [58, 59]. Other correlations were observed between **Hexa** oligomers that indicated their belonging to the same acetylated glucomannans (Table 3). Correlations between xyloglucan structures differing by galactose, fucose and acetyl-ester contents may indicate close modulations of glycosyl- or acetyl-transferases or hydrolases and esterases during biosynthesis, reorganization and metabolism of the fruit cell wall. Correlations were also observed between glucomannan and xyloglucan structures suggesting a possible co-regulation of these hemicelluloses during fruit development and ripening. Previous reports already pointed to xyloglucan structure regulations with organ or developmental variables in pea [48, 60] and *Arabidopsis* [50]. All these correlations ask for more in-depth investigations of pectin and hemicelluloses structural tailoring mechanisms and their relationships with cell development and fruit texture.

In order to select the most pertinent variables for the identification of QTLs controlling cell wall polysaccharides chemical variability, broad sense genetic heritability of sugars and hemicelluloses structures was measured from the 2007 harvest. Most variables presented moderate (> 0.4) to high (> 0.6) genetic heritability (Table 4). For sugar, the highest values were obtained for the major cell wall components, uronic acids (0.54), glucose (0.49), galactose (0.49) and xylose (0.42). For xyloglucan hemicelluloses structures, these were **XLXGa1** (0.65), **XLFGa1** (0.59), **XLFG** (0.47), **XXFG** (0.46), **XXFGa1** (0.45), **XXFGa2** (0.44), **XLFGa2** (0.41), **GFG** (0.40) and for glucomannan, **Hex4a2** (0.42). Heritability values were on the overall higher than those reported for chemical traits in *Arabidopsis* [50]. Differences with *A. thaliana* values may reflect a greater dynamic in cell wall polysaccharides composition and structure in rapidly growing hypocotyls compared to ripening apple fruit parenchyma tissue.

Reciprocal cross in different species have been reported to affect phenotypic expression of different traits, such as physical and chemical seed properties [61-65]. However, among the few recent quantitative genetic studies performed on apple [35, 66-68], very seldom are those who took into account reciprocal and/or maternal effects. With today's major issue on scab resistance selection of apple cultivars, the breeding set up of this experiment allowed testing the impact of both reciprocal cross and scab

selection on the cell wall polysaccharides chemistry of the progeny. Reciprocal cross was found to significantly affect only the proportions of the xyloglucan structures **XXG** ($p = 0.001$), **XLXGa1** ($p = 0.004$), **XXFG** ($p = 0.003$) and **XXFGa1** ($p = 0.000$) but no other cell wall chemical variables. On the other hand, scab selection only significantly affected the proportions of galactose ($p = 0.002$) and uronic acids ($p = 0.007$) and that of the **XFG** ($p = 0.001$) among the xyloglucan structures. Overall, reciprocal cross and scab selection had a lower impact on the progeny cell wall polysaccharide chemical variability compared to the genotype effect.

4. Conclusion

This first chemotyping of the cell wall polysaccharides chemical variability in an apple progeny segregating for texture related traits pointed to the genetic control of sugar composition and fine structural features of hemicelluloses. Further work should specify how the variability in the chemistry of cell wall polysaccharides is related to cell-wall biosynthesis and/or disassembly processes and to apple texture. In particular this study revealed variations in the fine structure of hemicelluloses that awaits to be explained with regard to the activity of XTHs, expansins and other cell wall hydrolases and esterases during fruit development and ripening. The harvest year impact on the chemical data requires more detailed analyses of ecophysiological conditions controlling fruit development and cell wall characteristics. Reciprocal cross and scab selection had low impacts on overall cell wall chemistry variability, however both aspects merit special attention in future studies on the genetic expression of texture traits. This data set will be further used to identify cell wall chemistry related QTLs in apple.

Acknowledgements

The authors thank R. Looten, X. Falourd, S. Daniel, M. J. Crepeau, C. Surlève, J. Vigoroux (INRA-BIA, Nantes, France), M. Lormeau, R. Robic (INRA-GenHort, Angers, France) for their technical help. This work has been supported in part by funds from the program EU

FP6 ISAFRUIT (contract N° FP6-FOOD 016279-2). Doctoral studies of D. Gálvez-López were supported by CONACYT México (fellow 194867).

5. Bibliography

- [1] Harker F.R., Redgwell R.J., Hallett I.C., Murray S.H., Carter G., Texture of fresh fruit, Hort. Rev. 20 (1997) 121-224.
- [2] Waldron K.W., Park M.L., Smith A.C., Plant cell walls and food quality, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2 (2003) 101-119.
- [3] Brummell D.A., Cell wall disassembly in ripening fruit, Functional Plant Biology 33 (2006) 103-119.
- [4] Goulao L.F., Oliveira C.M., Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit, Trends Food Sci. Technol. 19 (2008) 4-25.
- [5] Johnston J.W., Hewett E.W., Hertog M.L.A.T.M., Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review, N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 30 (2002) 145-160.
- [6] Jarvis M.C., Briggs S.P.H., Knox J.P., Intercellular adhesion and cell separation in plants, Plant Cell Env. 26 (2003) 977-989.
- [7] Willats W.G.T., McCartney L., Steele-King C.G., Marcus S.E., Mort A.J., Huisman M., van Alebeek G.-J.W.M., Schols H.A., Voragen A.G.J., Le Goff A., Bonnin E., Thibault J.F., Knox J.P., A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment, Planta 218 (2004) 673-681.
- [8] de Vries J.A., Voragen A.G.J., Rombouts F.M., Pilnik W., Changes in the structure of apple pectic substances during ripening and storage, Carbohydr. Polym. 4 (1984) 3-13.
- [9] Fischer M., Arrigoni E., Amado R., Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions, Carbohydr. Polym. 25 (1994) 167-175.

- [10] Knee M., Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples, *Phytochemistry* 12 (1973) 1543-1549.
- [11] McCartney L., Knox J.P., Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 707-713.
- [12] McCartney L., Ormerod A.P., Gidley M.J., Knox J.P., Temporal and spatial regulation of pectic (1 → 4)-β-D- galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties, *Plant J.* 22 (2000) 105-113.
- [13] Devaux M.-F., Barakat A., Robert P., Bouchet B., Guillon F., Navez B., Lahaye M., Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue, *Postharvest Biol. Technol.* 37 (2005) 209-221.
- [14] Smith D.L., Abbott J.A., Gross K.C., Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening, *Plant Physiol.* 129 (2002) 1755-1762.
- [15] Nara K., Kato Y., Motomura Y., Involvement of terminal-arabinose and -galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage, *Postharvest Biol. Technol.* 22 (2001) 141-150.
- [16] Pena M.J., Carpita N.C., Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple, *Plant Physiol.* 135 (2004) 1306-1313.
- [17] Zykwincka A.W., Ralet M.-C., Garnier C.D., Thibault J.F., Evidence for in vivo binding of pectin side chains to cellulose, *Plant Physiol.* 139 (2005) 397-407.
- [18] Percy A.E., Melton L.D., Jameson P.E., Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening, *Plant Sci.* 125 (1997) 31-39.
- [19] Siddiqui S., Brackmann A., Streif J., Bangerth F., Controlled atmosphere storage of apples: cell wall composition and fruit softening, *J. Horticult. Sci.* 71 (1996) 613-620.
- [20] Aspinall G.O., Fanous H.K., Structural investigations on the non-starchy polysaccharides of apples, *Carbohydr. Polym.* 4 (1984) 193-214.

- [21] Stevens B.J.H., Selvendran R.R., Structural features of cell-wall polymers of the apple, *Carbohydr. Res.* 135 (1984) 155-166.
- [22] Voragen A.G.J., Schols H.A., Pilnik W., Structural features of the hemicellulose polymers of apples, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 183 (1986) 105-110.
- [23] Atkinson R.G., Johnston S.L., Yauk Y.-K., Sharma N.N., Schröder R., Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple, *Postharvest Biol. Technol.* 51 (2009) 149-157.
- [24] Wakasa Y., Hatsuyama Y., Takahashi A., Sato T., Niizeki M., Harada T., Divergent expression of six expansin genes during apple fruit ontogeny, *European Journal of Horticultural Science* 68 (2003) 253-259.
- [25] Costa F., Van de Weg W.E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S., Sansavini S., Map position and functional allelic diversity of *MD-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*), *Tree Genet. Genomes* 4 (2008) 575-586.
- [26] Goulao L.F., Santos J., de Sousa I., Oliviera C.M., Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples, *Postharvest Biol. Technol.* 43 (2007) 307-318.
- [27] Goulao L.F., Cosgrove D.J., Oliveira C.M., Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples, *Postharvest Biol. Technol.* 48 (2008) 37-51.
- [28] Cosgrove D.J., Growth of the plant cell wall, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (2005) 850-861.
- [29] Brummell D.A., Harpster M.H., Civello P.M., Palys J.M., Bennett A.B., Dunsmuir P., Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening, *Plant Cell* 11 (1999) 2203-2216.
- [30] Wei W., Yang C., Luo J., Lu C., Wu Y., Yuan S., Synergism between cucumber [alpha]-expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase, *J. Plant Physiol.* 167 (2010) 1204-1210.

- [31] Fry S.C., Smith R.C., Renwick K.F., Martin D.J., Hodge S.K., Matthews K.J., Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants, *Biochem. J.* 282 (1992) 821-828.
- [32] Costa F., Peace C.P., Stella S., Musacchi S., Bazzani M., Sansavini S., Van de Weg W.E., QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus domestica* Borkh.), *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 3029-3039.
- [33] Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinell M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S., Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.), *Euphytica* 141 (2005) 181-190.
- [34] King G.J., Maliepaard C., Lynn J.R., Alston F.H., Durel C.E., Evans K.M., Griffon B., Laurens F., Maganaris A.G., Schrevers E., Tartarini S., Verhaegh, J., Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.), *Theor. Appl. Genet.* 100 (2000) 1074-1084.
- [35] Kouassi A.B., Durel C.E., Costa F., Tartarini S., Van de Weg E., Evans K., Fernandez-Fernandez F., Govan C., Boudichevskaja A., Dunemann F., Antofie A., Lateur M., Stankiewicz-Kosyl M., Soska A., Tomala K., Lewandowski M., Rutkovski K., Zurawicz E., Guerra W., Laurens F., Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe, *Tree Genet. Genomes* 5 (2009) 659-672.
- [36] Galvez Lopez D., Laurens F., Devaux M.F., Lahaye M., Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping *Euphytica* submitted (2011).
- [37] Pitts M.J., Cavalieri R.P., Objective assessment of apple maturity based on starch location, *Transaction of the ASAE* 31 (1988) 962-966.
- [38] Hoebler C., Barry J.-L., David A., Delort-Laval J., Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 360-

365.

[39] Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A., A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydr. Res.* 113 (1983) 291-299.

[40] Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.* 54 (1973) 484-489.

[41] McCleary B.V., Gibson T.S., Mugford D.C., Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- α -amylase method: collaborative study, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 571-579.

[42] Karas M., Ehring H., Nordhoff E., Stahl B., Strupat K., Hillenkamp F., Grehl M., Krebs B., Matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry with additives to 2,5 dihydroxybenzoic acid, *Org. Mass Spectrom.* 28 (1993) 1476-1481.

[43] R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria, 2010.

[44] Massiot P., Baron A., Drilleau J.-F., Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell-wall polysaccharides from different tissue zones of apple, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 145-154.

[45] Renard C.M.G.C., Voragen A.G.J., Thibault J.F., Pilnik W., Studies on apple protopectin: I. extraction of insoluble pectin by chemical means, *Carbohydr. Polym.* 12 (1990) 9-25.

[46] Voragen A.G.J., Heutink R., Pilnik W., Solubilization of apple cell walls with polysaccharide-degrading enzymes, *J. Appl. Biochem.* 2 (1980) 452-468.

[47] Lerouxel O., Choo T.S., Seveno M., Usadel B., Faye L., Lerouge P., Pauly M., Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting, *Plant Physiol.* 130 (2002) 1754-1763.

[48] Obel N., Erben V., Schwartz T., Kuhnel S., Fodor A., Pauly M., Microanalysis of plant

cell wall polysaccharides, *Molecular Plant* 2 (2009) 922-932.

[49] Westphal Y., Schols H.A., Voragen A.G.J., Gruppen H., MALDI-TOF MS and CE-LIF Fingerprinting of Plant Cell Wall Polysaccharide Digests as a Screening Tool for *Arabidopsis* Cell Wall Mutants, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4644-4652.

[50] Mouille G., Witucka-Wall H., Bruyant M.P., Loudet O., Rihouey C., Lerouxel O., Lerouge P., Hofte H., Pauly M., QTL analysis of primary cell wall composition in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* 141 (2006) 1035-1044.

[51] Kang M.-J., Tholey A., Heinzle E., Quantitation of low molecular mass substrates and products of enzyme catalyzed reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Com. Mass Spectro.* 14 (2000) 1972-1978.

[52] Ito S., Mitsuishi Y., Okuno T., Kato Y., Changes in the structure of xyloglucan of apple fruit during development, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 73 (2004) 51-56.

[53] Renard C.M.G.C., Lomax J.A., Boon J.J., Apple-fruit xyloglucan: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and of alkali-extracted xyloglucans, *Carbohydr. Res.* 232 (1992) 303-320.

[54] Spronk B.A., Rademaker G.J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Vincken J.-P., Voragen A.G.J., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., Dimers of GFG hexasaccharide occur in apple fruit xyloglucan, *Carbohydr. Res.* 305 (1998) 233-242.

[55] Vincken J.-P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 75-85.

[56] Vincken J.-P., van den Broek L.A.M., van der Lei D.D., Beldman G., Voragen A.G.J., Fungal and plant xyloglucanases may act in concert during liquefaction of apples, *J. Sci. Food Agric.* 73 (1997) 407-416.

[57] Scheller H.V., Ulvskov P., Hemicelluloses, *Annual Review of Plant Biology* 61 (2010) 263-289.

- [58] Coenen G.J., Bakx E.J., Verhoef R.P., Schols H.A., Voragen A.G.J., Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I, *Carbohydr. Polym.* 70 (2007) 224-235.
- [59] Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D., Voragen A.G.J., A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin, *Carbohydr. Res.* 279 (1995) 265-279.
- [60] Pauly M., Qin Q., Greene H., Albersheim P., Darvill A., York W.S., Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation, *Planta* 212 (2001) 842-850.
- [61] Corey L.A., Matzinger D.F., Cockerham C.C., Maternal and reciprocal effects on seedlings characters in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Genetics* 82 (1976) 677-683.
- [62] Dhliwayo T., Pixley K.V., Kazembe V., Combining ability for resistance to maize weevil among 14 Southern African maize inbred lines, *Crop Sci.* 45 (2005) 662-667.
- [63] Haro R.P.A., Julia M.M.C., Reyes-Valdes M.H., Maternal determination of oil content in sunflower seeds, *Rev. Fitotec. Mex.* 30 (2007) 39-42.
- [64] Kang M.S., Zhang Y., Magari R., Combining ability for rind puncture resistance in maize, *Crop Sci.* 39 (1999) 368-371.
- [65] Samano G.D., Rincon S.F., Ruiz T.N., Espinoza V.J., De Leon C.H., Genetic effects of direct and reciprocal crosses obtained from two germplasm group lines in maize., *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (2009) 67-74.
- [66] Durel C.E., Laurens F., Fouillet A., Lespinasse Y., Utilization of pedigree information to estimate genetic parameters from large unbalanced data sets in apple, *Theor Appl Genet* 96 (1998) 1077-1085.
- [67] Iwanami H., Moriya S., Kotoda N., Takahashi S., Abe K., Estimations of heritability and breeding value for postharvest fruit softening in apple, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133 (2008) 92-99.
- [68] Oraguzie N., Hofstee M., Brewer L., Howard C., Estimation of genetic parameters in

a recurrent selection program in Apple, *Euphytica* 118 (2001) 29-37.

Table 1 Structure and nomenclature used to refer to hemicelluloses structures

Hemicelluloses	Chemical structure	Code
Xyloglucan		
	$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}$	G ¹
	$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}$ $\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)}^{\uparrow}$	X
	$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}$ $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)}^{\uparrow}$	L
	$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}$ $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)}^{\uparrow}$	F
Glucomannan		
	$-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}$	Hex
	$-\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)-}$	Hex
Substituting group		
	$\text{CH}_3\text{-CO-O-}$	a

¹ Elementary building block of xyloglucan structures (Fry et al., 1993): **XLFG** is made of the linkage of **X**, **L**, **F** and **G** elements. The number following **Hex** or **a** refers to the number of these respective structures in the oligosaccharide

Table 2 Mean and standard deviation (SD) of cell wall sugar composition in the alcohol insoluble material obtained from apple parenchyma after 2 month storage at 1.5 °C.

	Total sugar	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
	Weight %	Mol %							
2007									
Mean	87.3	1.3	1.5	15.6	8.2	2.2	7.1	36.8	27.3
SD	7.9	0.2	0.3	1.9	1.0	0.5	2.0	2.9	4.0
2009									
Mean	85.2	1.2	1.4	14.7	7.7	2.2	7.3	34.3	31.2
SD	6.2	0.2	0.1	1.9	0.6	0.4	2.3	3.2	3.3

Table 3 Pearson correlations ($p \leq 0.000$) between chemical variables in the cell walls of the 14 common individuals harvested in 2007 and 2009

Variables		2007	2009	Variables		2007	2009	Variables		2007	2009
Rha	Xyl	0.35	0.37	Hex7a3	XLG	0.41	0.53	XLXG	XLFGa1	0.41	0.32
	Gal	-0.34	-0.34		GFG	0.39	0.53		XLFG	0.34	0.50
Ara	UA	-0.46	-0.27		XFG	0.32	0.44		XLXGa1	0.26	0.32
Gal	UA	-0.33	-0.57		XXG	0.29	0.54		GFG	0.20	0.18
Glc	UA	-0.68	-0.48		XLXG	0.25	0.27		XXFG	0.17	0.31
					XXXG	0.21	0.34		XXFGa1	-0.32	-0.29
Hex4a1	Hex4a2	0.73	0.70					XLXGa1	XXFGa2	0.16	0.29
	Hex5a2	0.62	0.45	XXG	XLG	0.64	0.63		XLFGa1	-0.21	-0.33
	Hex7a3	0.15	0.25		XXXG	0.61	0.63	XXFG	XLFG	0.58	0.52
	XXXG	0.57	0.46		XFG	0.53	0.65		XXFGa1	0.15	0.26
	XLG	0.48	0.44		XLXGa1	0.42	0.55	XXFGa1	XXFGa2	0.31	0.35
	XXG	0.41	0.43		GFG	0.41	0.56		XLFGa2	0.20	0.15
	XLXG	0.38	0.25		XLXG	0.40	0.45		XLFGa1	-0.19	-0.47
	GFG	0.34	0.41		XLFGa1	-0.32	-0.36		XLFG	-0.30	-0.43
	XFG	0.26	0.37	XLG	XXXG	0.73	0.75	XXFGa2	XLFGa2	0.89	0.92
	XLFGa2	-0.25	-0.17		XLXG	0.62	0.75		XLFGa1	-0.24	-0.27
Hex4a2	Hex5a2	0.55	0.52		XFG	0.40	0.36	XLFG	XLFGa1	0.45	0.49
	Hex7a3	0.21	0.37		GFG	0.35	0.38				
	XXXG	0.40	0.28		XLXGa1	0.22	0.42				
	XLG	0.39	0.38		XLFG	0.15	0.34				
	XXG	0.38	0.43	XXXG	XLXG	0.75	0.74				
	GFG	0.31	0.39		GFG	0.40	0.40				
	XFG	0.21	0.39		XFG	0.36	0.29				
Hex5a2	Hex7a3	0.27	0.33		XLFG	0.22	0.29				
	XLG	0.48	0.42		XXFG	0.19	0.29				
	XXXG	0.43	0.29		XLFGa1	0.18	0.19				
	XLXG	0.42	0.25		XLXGa1	0.17	0.23				
	XXG	0.33	0.30	XFG	GFG	0.67	0.75				
	GFG	0.28	0.40		XLXG	0.30	0.16				
	XFG	0.20	0.31		XXFG	0.27	0.32				
					XLFGa1	-0.19	-0.45				

Table 4 Broad sense heritability values of sugar and hemicellulose structures contents in the 2007 apple progeny harvest after two months storage.

Variable	Heritability
UA	0.54
Gal	0.49
Glc	0.49
Xyl	0.42
Man	0.34
Fuc	0.28
Rha	0.21
Ara	0.20
Hex4a2	0.42
Hex4a1	0.35
Hex5a2	0.34
Hex7a3	0.24
XLXGa1	0.65
XLFGa1	0.59
XLFG	0.47
XXFG	0.46
XXFGa1	0.45
XXFGa2	0.44
XLFGa2	0.41
GFG	0.40
XFG	0.36
XLXG	0.32
XXG	0.26
XXXG	0.16

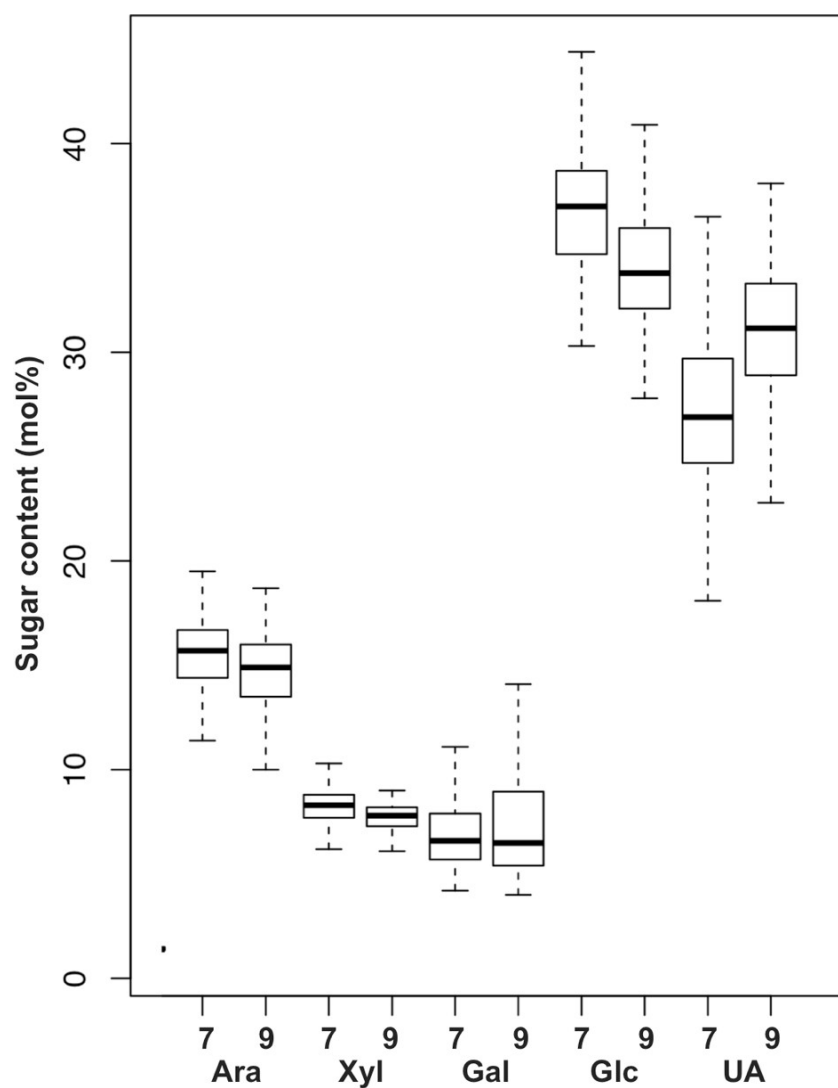


Figure 1 Boxplot of the main sugars (Ara: arabinose, Xyl: xylose, Gal: galactose, Glc: glucose, UA: uronic acids) proportions (mol%) from individuals collected in 2007 (7) and 2009 (9).

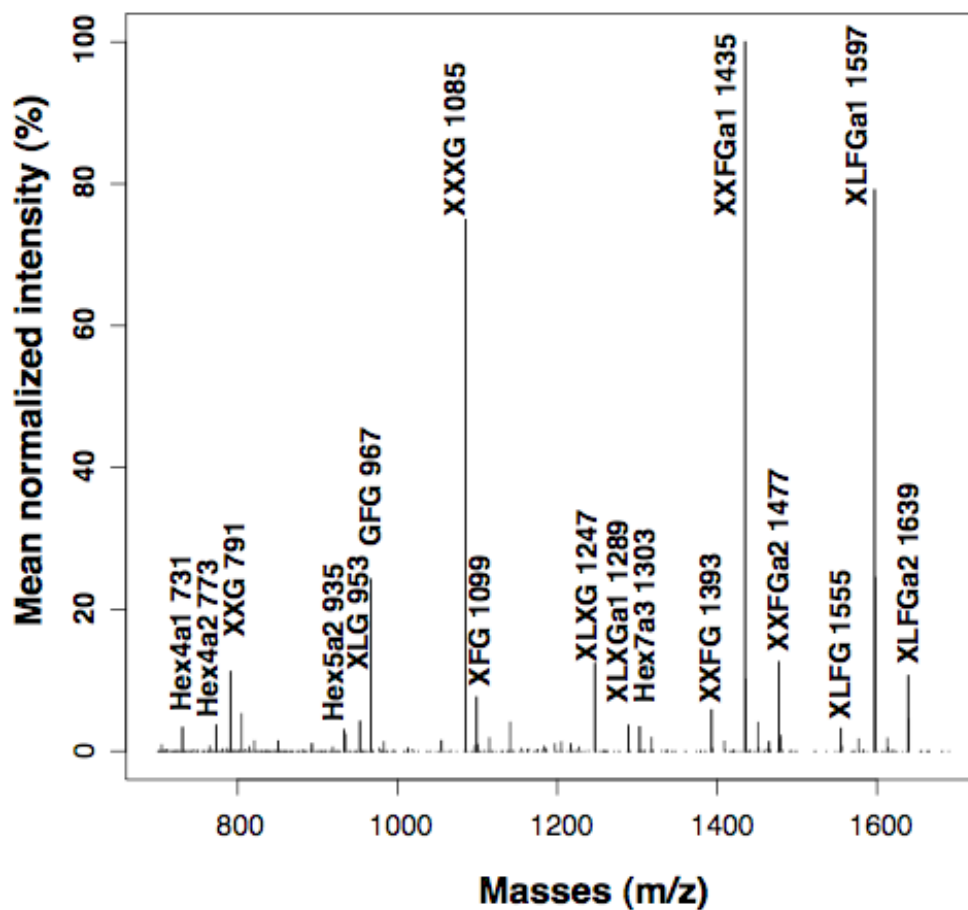


Figure 2 Mean MALDI-TOF MS spectrum of the cell wall glucanase hydrolysate from the apple progeny. Ion nomenclature is based on Table 1 and is followed by mass value.

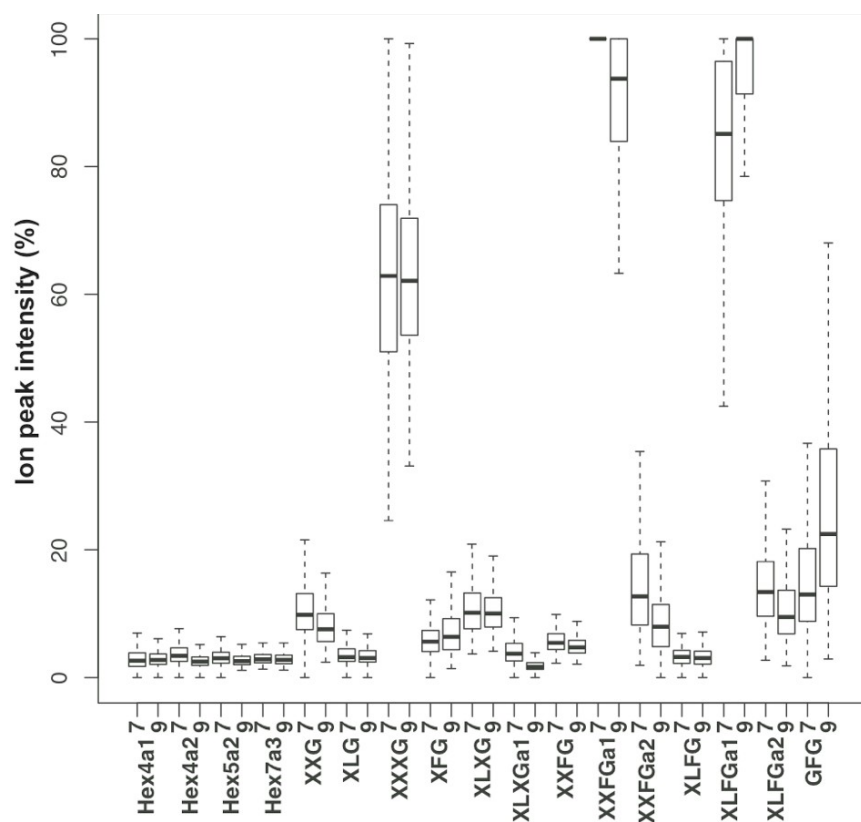


Figure 3 Boxplot of MALDI-TOF MS ion intensity of hemicellulose oligosaccharides from the glucanase hydrolyzate of individuals harvested in 2007 (7) and 2009 (9). Nomenclature of oligomers are as described in Table 1.

CHAPITRE IV

Cartographie des déterminants structuraux et génétiques associés à la variabilité phénotypique de la texture de la pomme : caractérisation des QTL

Cartographie des déterminants structuraux et génétiques associés à la variabilité phénotypique de la texture de la pomme : caractérisation des QTLs

Contexte

Les étapes de phénotypage et de chémotypage d'une descendance de 141 individus ont permis d'identifier plusieurs variables héritables (Chapitres II et III). L'objectif de cette partie était de rechercher de nouveaux QTLs associés à la variabilité de la texture et de ses déterminants. Un nombre limité à 31 variables héritables a été sélectionné à partir de ces résultats. Au préalable une descendance de 182 individus avait été génotypée comprenant les individus phénotypés. La construction des cartes génétiques a été effectuée en utilisant des marqueurs SSR et SNPs. Un total de 127 QTL ont été identifiés sur 36 régions distribuées dans les 17 groupes de liaison du pommier : 19 régions codant pour des caractères instrumentaux, 15 pour les paramètres sensoriels, sept pour les variables histologiques et 27 pour les structures biochimiques de la paroi cellulaire.

Des caractères sensoriels et/ou instrumentaux ont été co-localisés avec des variables histologiques et/ou biochimiques dans 15 régions, révélant pour la première fois des liens importants entre le contrôle génétique des caractères de texture de la pomme avec des déterminants histologiques et structuraux de la paroi cellulaire. Trois régions portant des QTLs de propriétés instrumentales et biochimiques correspondent aux mêmes régions rapportées dans la littérature comme portant des gènes candidats liés au développement et mûrissement de la pomme. Ces résultats originaux fournissent une base pour la découverte de nouveaux gènes qui contrôlent les déterminants structuraux de la texture. Ils ouvrent aussi de nouvelles perspectives pour améliorer la qualité de la pomme par sélection assistée par marqueurs moléculaires.

Quantitative trait loci for texture attributes and cell wall structures in apple

Didiana Galvez-Lopez^{1,2}, Marc Lahaye², Pauline Lasserre¹, François Laurens¹

¹ INRA, UMR1259 Génétique et Horticulture, F-49071 Beaucouzé, France

² INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France

Summary

Texture is a major criterion of apple quality. It depends of cellular (cell wall and turgor pressure) and histological factors at different scales, which are under genetic control. The objective of this research was to identify new genetic markers related to fruit texture traits. A progeny of 150 individuals was phenotyped at two storage dates for sensory and mechanical traits, for histological parameters and cell wall biochemistry. QTL mapping of 31 highly heritable variables was realized. A total of 127 QTL were located on 36 regions within the 17 apple linkage groups: 19 regions map for instrumental, 15 for sensory parameters, seven for histological and 27 for biochemical cell wall structures. Sensory and/or instrumental characters were co-localized with histological and/or biochemical traits in 15 regions, revealing for the first time links between the genetic controls of apple texture traits with those of structural cell wall determinants. Three regions co-localized with candidate genes related to fruit development and ripening identified in previous studies. These original results provide a basis for deciphering new genes controlling structural determinants of texture and open new perspectives for improving the quality of apple by molecular marker-assisted breeding.

Keywords: Apple, quality, texture, cell wall, histology, polysaccharides, genetic, QTLs.

1. Introduction

The improvement and control of apple texture remains a major challenge for the fruit commercial area and is one of the prime interests for the consumers. Texture is described by a large number of sensory descriptors (firmness, crispness, juiciness, graininess, fibrousness, mealiness...) (Harker et al., 2002; Szczesniak, 2002) difficult to assess beside by sensory panels. Furthermore, it can evolve during fruit storage to become unacceptable by the consumer (softness, dryness and mealiness). Therefore, one important objective for the apple sector is to keep the optimal texture characteristics as long as possible all along the storage life of the fruit.

Several reports related fruit texture to cell wall mechanical properties in conjunction with internal turgor pressure and intercellular adhesion. Most of these characteristics rely on cell wall polysaccharides composition, structure and organization as well as on the distribution and physical characteristics of cells within the tissues (Atkinson et al., 2002; Jarvis et al., 2003; Waldron et al., 2003).

Apple breeding programs aim to create new cultivars resisting to bio-aggressors and with a high and regular cropping. These new cultivars also need to meet sensory qualities requested by consumers, notably for texture characteristics, in order to enter and stay in the market. To achieve this goal, a prior knowledge of the genetic bases of apple texture quality during fruit development and storage is required. To date few data are available based on sensory evaluations and mostly penetrometry and compression measurements of whole fruits, which do not encompass all the complex factors determining apple texture. (Liebhard et al., 2003; Kenis et al., 2008) identified genetic markers associated with apple firmness measured by penetrometry or acoustic analysis (stiffness) in association with other quality parameters (acidity, sugar) while (King et al., 2001) combined sensory, instrumental approaches (penetrometry, compression, wedge test) and histological observations. The most frequent QTLs have been found on LG 1, 6, 10, 15 and 16. Significant year effects and QTLs instability were also noted (Kenis et al., 2008; (King et al., 2000). Other apple quality traits in 28 families connected by few common ancestors from 10 European breeding programs have been mapped (Gianfranceschi and Soglio, 2004) but results await to be published.

Several candidate genes involved in ethylene biosynthesis, the hormone controlling climacteric fruit ripening or other coding proteins responsible for the cell wall disassembly during fruit softening were mapped on the apple genome. The genes ACS (1-Aminocyclopropane-carboxylic-synthase) and ACO (1-Aminocyclopropane-carboxylic-oxydase) were respectively mapped on LG 15 and 10 (Costa et al., 2005). Candidate genes of expansin (Costa et al., 2008) and polygalacturonase (Costa et al., 2010), which are key protein and enzyme involved with fruit softening, were also discovered on respectively LG1 and 10.

In the objective of identifying new genetic markers of apple texture based on the phenotypic variability of its structural determinants, we previously reported on the variability and heritability of compression, penetrometry, sensory variables as well as histological and cell wall biochemical variables in a progeny of 141 individuals (cell wall polysaccharides sugar composition, hemicelluloses fine structure; Galvez-Lopez et al., 2011a, 2011b). These studies confirmed known relationships within and between instrumental and sensory data and the complementarities of penetrometry and compression tests in the evaluation of apple texture. We confirmed that cell size distribution in apple flesh has a key role on the mechanical behaviour of the fruit and we showed a relationship between cell size and juiciness perception. On another hand, correlations between cell wall polysaccharides chemical data indicated possible biosynthetic or metabolic regulations of hemicelluloses structures during the fruit softening process. Unfortunately, no correlations were found between instrumental, sensory or histological variables and cell wall chemical data, indicating that the scales at which the analyses were performed (whole fruit for texture evaluation, outer cortical area of cell wall biochemistry) may need to be adjusted and that another cellular variable (turgor pressure) had to be taken into account in such relationships. We now report on the QTL mapping of selected phenotypic variables from these studies. From a total of 56 phenotypic variables, 31 were selected based on their high heritability value: seven sensorial, six instrumental, one histological, and 17 biochemical cell wall variables (six for sugar composition and 11 hemicelluloses; Table 1). Results will be discussed with regard to the apple texture QTLs literature and with possible new mechanisms relating texture traits and histological and biochemical variables in chromosomic regions co-localizing QTLs.

2. Materials and methods

2.1. Plan material and orchard location

A progeny of 182 F1 individuals from a cross between X3259 and X3263 genotypes was used for map construction. From those, only 105 individuals were used for the QTL analysis. The parents named X3259 and X3263 are two genitors of the INRA Angers apple-breeding program. They both carry the V_f scab resistance gene. The parent X3259 has a good taste, which it inherited from one of its parent, the cultivar ‘Chantecler’. X3263 resulted from the cross between a dark red fruit cultivar, ‘Red Winter’, and the INRA genitor X3177 that presents a good and regular cropping. The progeny and the parents are located in an experimental orchard at INRA Angers (France).

2.2. Harvest period and phenotypic data collection

Samples were harvested in 2007 at optimum maturity based on taste, soil, color and starch staining measurements (Pitts and Cavalieri 1988; Kouassi et al. 2009). The harvest period lasted from September to November. After harvest, the fruits were stored in cold room at 1.5 °C and a relative humidity of 80 % for two months. Before measurements, the apples were taken out and left to adapt to the outside temperature for 24 h.

2.2.1. Sensory, instrumental and histological analysis

The sensory, instrumental and histological analyses are widely described in Galvez-Lopez et al. (Gálvez-Lopez et al., 2011 accepted in *Euphytica*; chapter II). In brief, sensory evaluations consisted of the measurement of texture traits characters by an expert panel. The traits studied were: firmness (FIRM), crispness (CRISP), juiciness (JUIC), meltiness (MELT), graininess (GRAIN), fibrousness (FIBER) and mealiness (MEALI). The instrumental measurements for penetrometry and compression were performed on the whole, unpeeled fruits using the TA.XT.PLUS (Stable Micro System). For penetrometry analyses, the apples were penetrated from the surface of the fruit, to a depth of 10 mm, in both blush and shaded regions, using a

convex probe with a diameter of 4-mm. For compression, apples were compressed twice to 5% deformation at 50 mm sec.⁻¹, using two parallel plates. The parameters analyzed are described in chapter 1. Cell size was assessed in parenchyma sections of all individuals. Two equatorial opposite radial sections per fruit were sampled from the outer parenchyma. Principal component analysis applied on the set of granulometric curves obtained, revealed variations in cell size distributions among the genotypes (PC1). Important correlations among sensory, instrumental and histological parameters were performed and discussed in Galvez-Lopez et al. (Galvez-Lopez et al., 2011. Chap II).

2.2.2. Polysaccharide cell wall composition and mass spectrometry

The analysis of major sugars of the cell wall and fine hemicelluloses structures were described in Galvez-Lopez et al. (see chapter III). In brief, the cell wall sugars were identified and quantified by gas-liquid chromatography (GC) from the alcohol insoluble material (AIM), on three fruits per genotype. The most common polysaccharides components that were found in the cell wall were: xylose (Xyl), glucose (Glc), uronic acids (UA), arabinose (Ara), manose (Man) and galactose (Gal). For hemicelluloses structures the cell wall material was degraded by endo-1,4- β -glucanase from *Trichoderma longibrachiatum* and the oligosaccharides released were analyzed by MALDI-TOF MS. AIM samples (5 mg) from each of the 3 fruits per individual, randomly selected, were suspended in water containing 10.8 U of glucanase. Glucanase hydrolysates (5 μ L) were mixed with the Super DHB matrix (5 μ L) (Karas et al., 1993). The matrix was prepared by a mixture of (90/10, v/v) 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) at a concentration of 10 mg/mL in water and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid at 10 mg/mL in pure methanol, respectively. Finally 4 μ L of the mixture was deposited firmly on the wells and left to dry overnight at room temperature. For each hydrolysate, three replicates were made. MALDI-TOF MS analysis was performed in the positive ion mode on a MALDI-TOF/TOF (Autoflex III Smartbeam, Bruker, Germany) equipped with a Yag laser (355 nm). Analyses were carried out in the reflector mode using a laser frequency of 200 Hz and an accelerating voltage of 19 kV. The spectra were recorded in the mass range of m/z 500-2000. A low mass gate value of m/z 500 was selected for analysis in order to avoid saturation of the detector. The instrument was externally calibrated using the monoisotopic masses of main oligosaccharides ([M+Na]⁺ ion) released from xyloglucans

(**XXG**: 791.243 Da, **XXXG**: 1085.338 Da, **XXFGa1**: 1435.459 Da, **XLFGa1**: 1597.512 Da). Nomenclature of xyloglucans and glucomannans oligosaccharides structures were described in detail in the publication Galvez-Lopez (Galvez-Lopez et al., 2011).

2.3. Genotypic data collection

Genomic DNA of each genotype of the population was extracted from young leaves (100 mg) using Dneasy_96 Plant Kit, QIAGEN, following the manufacturer's protocol. A total of 294 molecular markers were used to construct the genetic map: 88 SSR (Single sequence repetition), previously used on apple (Silfverberg-Dilworth et al., 2006), and 206 SNPs (Single-nucleotide polymorphism). The SNP markers were developed by 'Technology Illumina' and mapped at IASMA institute (San Michelle, Italy).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification for SSRs was carried out under the conditions described in Silfverberg-Dilworth et al. (2006). The length polymorphism of PCR products was detected by a capillary sequencer according to the protocol described Silfverberg-Dilworth et al. (2006). The SNP amplifications were performed according to the protocol established by Micheletti et al. (2011). An Illumina bead array of 384 SNPs based on the GoldenGate assay (Illumina Inc., San Diego, California) was developed from a set of 1,679 SNPs mapped in an integrated apple genetic map (<http://genomics.research.iasma.it/>). The 384 SNPs were selected to be evenly spaced throughout the 17 apple linkage groups. SNP-based markers were developed from SNPs detected from apple genomic sequence, originally discovered within the IASMA 'Golden Delicious' genome sequencing project (Velasco et al. 2010). Genotyping was performed using an Illumina BeadXpress® Reader with VeraCode® Technology according to the manufacturer's protocol (www.illumina.com). SNP data were analyzed using GenomeStudio that clusters and call the data automatically. From the 384 polymorphic SNPs developed, 206 were chosen for the genetic map construction.

2.4. Phenotypic data analysis

The R software performed data treatment and statistical analyses. Phenotypical data variation was tested on all the data set. An analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate

the effects of harvest, reciprocal cross and scab resistance selection on all the characters. Genotypic correlations (r) between traits were estimated using the Pearson correlation coefficients with student's t-test. Details were widely described on Galvez-Lopez et al. (see chapter III). Individual broad sense heritability ($h^2_{bs\ ind}$) was computed for all phenotypic values using the following formula:

$$h^2_{bs\ ind} = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_e)$$

with σ^2_g and σ^2_e being the individual genetic variance and the residual variances, respectively.

Mean values were computed for each trait of each genotype. All the phenotypic data analyses were conducted using the JMP software version 8.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

2.5. Genetic map construction

The genetic linkage map was built using JoinMap[®]4.0 (Van Ooijen 2006). A LOD (Logarithme-of-odds ratio) threshold of 9 was used to determine linkage groups. The Kosambi function was used to calculate genetic distances. The order of SSR markers was fixed according to Silfverberg-Dilworth (Silfverberg-Dilworth et al., 2006). The order of SNP markers was determined based on regression mapping by using the pairwise data of only those loci that showed a recombination frequency smaller than 0.499 and a LOD threshold between two markers of 0.01. Parental maps were also created separately using uni-parental and common bi-parental markers. The homologous parental linkage groups with common bi-parental markers were then combined, and an integrated map was built based on mean recombination frequencies and combined LOD scores, using the 'combine groups for map integration function' in JoinMap[®]4.0 (Van Ooijen 2006). For each marker, one dash separate the terminology F, M or FM, that indicates from which parental female, male or female-male, respectively, is given the polymorphism. Marker segregation distortion was then tested against the expected Mendelian segregation ratios using the chi-square test in the software. Maps were drawn using MapChart version 2.1 software (Voorrips 2002).

2.6. QTL analysis

QTL analysis was carried out using MapQTL[®] 5.0 (Van Ooijen, 2004) on the mean traits per genotype and on the integrated map. Firstly, a LOD threshold at which a QTL was declared significant was determined according to a genome-wide error rate of 0.05 over 1,000 permutations of the data (Churchill and Doerge 1994). Secondly, interval-mapping analysis was performed with a step size of 1 cM to find regions with potential QTL effects, i.e., where the LOD score was greater than the permutation threshold. In the region of the potential QTLs, the markers with the highest LOD values were taken as cofactors. A backward elimination procedure was used to select cofactors significantly associated with each trait at $P < 0.02$. Subsequently, multiple QTL mapping (MQM, Jansen and Stam 1994) was performed with a step size of 1 cM. If LOD scores in the region of the potential QTLs were below the significance threshold, their cofactor loci were removed, and MQM mapping was repeated. QTL positions were assigned to local LOD score maxima. Confidence intervals of the map position were indicated in centimorgans corresponding to a 1- or 2-LOD interval. The variance percentage explained by each QTL (R^2) was taken from the MQM mapping output %Expl. Following the method proposed by Knott et al. (Knott et al., 1997), allelic effects were estimated as follows:

$$A_f = [(\mu_{ac} + \mu_{ad}) - (\mu_{bc} + \mu_{bd})] / 4$$

$$A_m = [(\mu_{ac} + \mu_{bc}) - (\mu_{ad} + \mu_{bd})] / 4$$

$$D = [(\mu_{ac} + \mu_{bd}) - (\mu_{ad} + \mu_{bc})] / 4$$

where μ_{ac} , μ_{bc} , μ_{ad} , and μ_{bd} are estimated phenotypic means associated with each of the four possible genotypic classes, ac, bc, ad, and bd, deriving from the cross ab (female) x cd (male), and were taken from the MQM mapping output of MapQTL[®]. A_f is female additivity, i.e., the average effect of substituting one female allele for the other ($b \rightarrow a$) and A_m is male additivity, i.e.: the average effect of substituting one male allele for the other ($d \rightarrow c$). D is the overall dominance effect, i.e.: the deviation from additivity, where a value of zero indicates complete additivity.

3. Results and discussion

3.1. Genetic map

The female X3259 map is based on 201 markers (136 SNPs and 65 SSRs) and covers 1173.3 cM. The male X3263 map is based on 199 markers (130 SNPs and 69 SSR) and covers 1059.4 cM. Homologous linkage groups were then combined to built an integrated map, which is composed of 294 markers (206 SNP and 88 SSRs) and covers 1233.4 cM in comparison with the reference map of Silfverberg-Dilworth (Silfverberg-Dilworth et al., 2006), which covers 1145.3 cM for the Fiesta map and 1417 cM for Discovery. The number of linkage groups was assigned according to the Silfverberg-Dilworth map. The average marker density for integrated map is 4.19 cM/marker. The largest gap between two markers was 23.4 cM in LG 17.

The extremities of LG03, LG07, LG08, LG09, LG13, LG14 were extended in this study compared to the reference map. The LG4 remained short due to homozygous frequency of markers developed on the bottom part. The development of SNP markers permitted the creation of a denser map. Some genetic markers, including SSRs presented distortions in few regions, i.e: CH-Vf1_FM (LG01), Hi07b06_FM (LG 06), CH03d11_FM (LG10) and NH009b_FM (LG 13).

3.2. QTL results

Few studies have investigated QTLs for fruit texture traits (King et al., 2000, 2001; Liehbard et al., 2003, Kennis et al., 2008) and all of them have been focused on instrumental and sensory traits. In this study, several complementary approaches were developed in order to identify regions of interest controlling the apple texture. From the 31 variables used for the QTL mapping, a total of 127 QTL were located on 36 regions within the 17 apple linkage groups: 19 regions for instrumental, 15 for sensory, seven for histology and 27 for cell wall polysaccharides. To be more informative and give broader view, Figure 1 and Tables 2a and 2b present the position of significant QTLs which are over the threshold but also some putative QTLs which are below but close to it (they are specified as “NS”). In this study, 26 new regions related to apple texture were located. Hereafter, we present the QTL results in

three different paragraphs related to 1) sensory and instrumental traits, 2) histology and 3) cell wall biochemistry.

3.4.1. Instrumental and sensory QTLs

This study confirms QTLs reported in the literature for sensory and instrumental parameters on linkage groups 1, 2, 6, 8, 10, 11, 12, 15, and 16 (King et al., 2000, 2001; Liehbard et al., 2003; Kennis et al., 2008). The highest density of markers used in this study and the better coverage of the genetic map allowed to locate additional QTLs controlling instrumental and sensory traits compared with previous studies: on new linkage groups (4, 5, 7, 11 and 13) or new regions on already reported LGs (1b, 2a, 6b, 6c, 8a, 8c, 11b, 12a, 15b, 16b; Figure 1 and Table 2). This comparison cannot be exhaustive since it is difficult to match the QTL areas with those previously reported in the literature due to the fact that the regions in the maps are seldom reported in these studies. Overall, we detected 25 regions coding for sensory and/or instrumental traits. The R^2 range values varied from 3.4 to 38.9 for instrumental variables, from 6.80 to 26.5 for sensory, from 11.4 to 23 for histology and from 7.4 to 27.3 for cell wall polysaccharides.

QTLs of penetrometry and compression parameters cluster on only five regions: 2a, 6c, 8a, 12a, and 16a. But interestingly, there are many regions mapping specifically for penetrometry data: 1c, 2b, 4b, 6b, 11a, 12b, 13b, 15b. In the selected penetrometry parameters, Ff is specific to the flesh whereas Wp, Dp and Fp are taking into account both flesh and skin contributions to the mechanical properties. Specific regions for these later traits (Fp, Dp, Wp) can be found on regions 2b, 4b, 12b and 13b; no one is dedicated only on Ff. Two regions (middle of LG6 and top of LG11) are coding for both.

There are only three regions where QTLs specific for compression are located: 1b, 5b and 14b. In the literature (King et al., 2001), the Vf region (our 1c zone) is well known to co-locate with texture QTLs. Costa et al. (2008) located the *Exp7* expansin gene about 10 cm upstream the Vf gene. In this study we detected a significant QTLs for the compression parameter WH1 ($r^2 = 24.7$) and sensory traits (juiciness, mealiness and fibre) about 20 cM upstream the Vf region which seems to code for sensory and compression (WH1) traits with R^2 varying from 9.5 to 24.7 %. It could correspond to the *Exp7* region described by Costa et al. (2008). We also confirmed a group of QTLs of penetrometry (Ff and Dp) clustering with

Vf gene.

Sensory traits are either clustering with instrumental parameters (with both penetrometry and compression: 2a, 8a and 12a; with only penetrometry: 2b, 4b, 15b, 16b; or with only compression: 1b and 5b). We cannot highlight specific association within sensory traits or between sensory traits and instrumental variables. Other important regions (5a, 8b, 8c, 10a, 10b and 11b) were found controlling only sensory parameters with no co-location with any instrumental QTLs. This result shows that at the genetic level, instrumental texture variables cannot reflect the whole sensory texture perception of consumers.

LG10 has already been reported in the literature to be an important region for texture trait (Kenis et al., 2008). So far, three candidat genes have been mapped: XET and PG1 on the middle part (10a in this study; Costa et al., 2010) and ACO1 gene on the bottom part (10b; Costa et al., 2005). This study emphasizes two main regions: one close to the XET candidate gene on the middle of LG10 (10a), the other one on the bottom part of the linkage group close to ACO1. It is noteworthy that no QTL for instrumental trait is detected in these regions; only sensory traits (grain, crisp, meltiness, mealiness, fiber). The opposite feature is found on the top of LG16, where only instrumental QTLs are present. Actually, the *Ma* major gene coding for acidity is also mapping in this region (King et al, 2000, 2001). These authors also found significant QTLs for many sensory attributes in this region but wondered if these co-localisations were not only due to “sensory bias”. In fact it is known that acidic fruits are also tasted as more juicy and firmer. Our study shows that the link is not an artefact and this region actually codes for both “objective” instrumental parameters and the *Ma* gene.

3.4.2. QTLs for cell size

Seven QTLs for cell size were localized (1a, 1c, 6b, 9, 13a, 14b and 15b) and four of them (1a, 1c, 14b and 15b) showed significant LODs (3.76, 5.33, 2.98 and 2.83, respectively). Three of them maps with penetrometry parameters (1c, 6b and 15b), one with compression (14b) and two are associated with sensory parameters (14b and 15b). The regions 1a and 13 show no co-location with any other variables. This study is the first report identifying QTLs linked with cell size traits.

The regions coding both for cell size and penetrometric variables are interesting because

they can explain the control of the mechanical behaviour of fruit. Galvez-Lopez et al. (2011a) showed that cell size distribution (PC1) and Ff were negatively correlated suggesting that the cell size impacted on the mechanical properties of the flesh. The co-localization of these QTLs supports this relationship between histological characteristics and mechanical characteristics of fleshy fruits tissue. One of such co-localization is found in the middle of LG6 where is located an expansin gene (Costa et al., 2008). It is possible that modulation of this protein, which is responsible for cell wall expansion during apple development or ripening, has an impact on both cell size and on penetrometric variable. Other novelty of this study was to find one cell size QTL co-locating with the V_f gene coding for scab resistance. On the other hand, the compression and sensory variables that localize with cell size on LG 14 suggests also important correlations between cell size and fruit size.

3.4.3. QTLs of cell wall polysaccharides

QTLs for cell wall composition and hemicellulose structure were to our knowledge reported only in *Arabidopsis* (Mouille et al., 2006). Our study revealed for the first time in apple, several QTLs for cell wall sugar composition, fine structure of xyloglucan and glucomannans and particular co-localizations between biochemical QTLs and texture related variables. The latter open new questions on the genetic controls of apple texture traits with those of structural cell wall determinants (Mouille et al., 2006).

27 clusters of QTLs for cell wall biochemical compounds were located on 15 LG (1b, 1c, 2b, 3, 4a, 4b, 5a, 5c, 5d, 6a, 6c, 7a, 7b, 8a, 8b, 8c, 9, 10a, 10b, 13b, 14a, 14b, 15a, 15b, 16a, 16b, 17). 19 of them are co-locating with QTL of texture parameters, sensory or instruments, or histological traits. Three main biochemical compounds have been analyzed in this study: major sugars and two types of hemicelluloses structures (xyloglucans and glucomannans).

There is significant clustering between QTLs: those of the glucomannans Hex4a1 and Hex4a2 are co-locating on 6a, 6c, 8b. The chemotyping data on this progeny showed that these structures correlated strongly (0.73; Galvez-Lopez et al. 2011b) indicating their possible co-regulation during biosynthesis and metabolism in the cell wall. In apple glucomannans are minor hemicelluloses and their content decreases with ripening (Lahaye et al. 2011) but the relationship with other variables are unknown.

There are also major clusters of xyloglucans QTLs on the bottom of LG2, the bottom of LG4, on the top of LG10 and on the bottom of LG13 (with Hex5a2). It is possible that these xyloglucan regions are controlling the reshuffling mechanisms of xyloglucans structures on the cell wall. Less clustering is observed for the QTLs of major sugar. Nevertheless, it can be shown clear links between QTLs of uronic acids and arabinose on LG 14 and xylose and glucose on the top of LG5. The regions controlling uronic acids and arabinose contents are of interest as these two sugars contents were found to vary significantly opposite to one another (-0.46; Galvez-Lopez et al., 2011b) and thus their proportion appear co-regulated.

All along the genome, some hot spots of QTLs can be found. This study exhibits many significant clustering between QTLs of hemicelluloses and those of texture and/or histological parameters. Three regions show co-locations between QTLs of cell size and hemicelluloses: on the top and bottom of LG1 with two xyloglucans, respectively XLFG ($r^2=16.7$) and XXG ($r^2=14.4$). The QTL of XXG is clustering with QTLs of penetrometry (Dp $-r^2=9$; Ff- $r^2=9.4$). It is close to the Md-Exp7 (Costa et al., 2008) and the Vf gene but the confidence interval is too wide to reach definite conclusion. QTL of cell size (PC1) is also clustering on the bottom of LG9 with the glucomannan Hex4a1. This co-location of QTLs suggest that glucomannan structural variation impacts on cell expansion and mechanical characteristics of apple flesh.

Other regions show co-locations between QTLs of hemicelluloses and various texture traits (sensory or instrumental). On the bottom of LG2, the QTL of Fp is at the same position as two xyloglucans structures (XLFG $r^2=12.3$; XXFG ($r^2=20.2$)). The new region at the bottom of LG4 expresses a nice and clear clustering between QTLs of four xyloglucans structures, XXG, XLFG, XLXGa1, XLXG, of sensory traits (mealiness and firmness) and interestingly with only penetrometry parameters (Wp, Dp and Fp). The parallel can be made with the bottom of LG6 where the QTLs of two glucomannan structures Hex4a1 and Hex4a2 co-locate with specific QTLs of compression parameters.

On the middle part of LG10 (10a), one QTL for graininess ($r^2= 8.3$ but not over the threshold) co-locates with two xyloglucan structures (XLXG, $r^2=12.6$) and XLFGa1 ($r^2=14.8$). They are both close to the Md-XET gene candidates mapped by Costa et al. (2008). Downstream of this region, one significant QTL of Hex5a2 is close to the Md-PG1 gene (Costa et al, 2005). The middle part of LG13 also shows quite clear co-location between one QTL of glucomannan structure Hex5a2 ($r^2=15.6$), one of xyloglucan structure XXG ($r^2=13.5$)

and Dp. All these co-locations suggest a strong relationship between both glucomannan and xyloglucan hemicellulose fine structural variations with tissue mechanical characteristics and apple texture perception. This is in keeping with the known involvement of expansin, XET/XTH (MTH) reshuffling hemicelluloses structure and cell wall interactions during ripening.

Interesting clusterings between QTLs of major sugars and some texture traits are noteworthy to highlight: two QTLs of mannose are linked with QTLs of sensory and instrumental traits: at the bottom of LG2 (crispness and graininess) and at the top of LG8 (Ff, WH1, H1 and meltiness). Arabinose QTL clusters with several sensory QTLs of texture at the bottom of LG10 (fibrousness, graininess, mealiness, meltiness and crispness). These QTLs are close to Md-ACO1 gene, which is one of the genes controlling ethylene biosynthesis. Such co-location is in keeping with the ripening related evolution of texture perceptions for which arabinose cell wall content would represent a marker. Also on the bottom of LG14: an arabinose QTL co-localizes with uronic acid and a weak QTL for H1. Such co-locations of QTLs involving arabinose are in support with Pena and Carpita (2004) who report a relationship between arabinose branching in apple cell wall with texture and particularly mealiness. The cell wall arabinose content is known to decrease with the ripening but the rate at which it occurs appear to be determinant of texture characteristics (Goulao et al., 2008; Nobile-Macedo et al., 2011).

On top of LG5 a QTL of xylose co-localizes with one for the fiber perception and two less significant QTLs of glucose and uronic acid. At the bottom of LG14 a co-localization of galactose and cell size QTL is observed. These co-locations require more detailed chemical structural work to establish whether the variation in the content of the minor xylan hemicellulose in apple cell wall impacts the fruit fibrousness perception and whether there is a relationship between pectic galactan side chains content and cell size distribution.

4. Conclusion

This study quantified the genetic variability of apple texture traits and biochemical cell structures in a F1 progeny. This is the first genetic study combining sensory, instrumental,

histology and biochemical cell wall phenotyping. A high number of QTLs were detected revealing several genomic regions controlling these characters, and demonstrating the feasibility of combining multiple datasets obtained from different approaches for their genetic association on texture control. The QTL co-localizations confirmed regions reported in the literature but several new zones were discovered and found controlling variations in texture due to better coverage of the genetic map. These findings underlie an important orchestration of several genes on the apple genome controlling the high diversity of the multiple variables affecting texture.

This is the first report revealing QTL regions controlling histology and cell wall structures of apple. From the overall regions, a few were specific for instrumental or sensory variables and others for histology or biochemical cell wall structures. Specific co-localizations between sensory and instrumental variables, or histology and instrumental, demonstrated significant complementarities between the phenotypic approaches. The high level of association between cell size distribution, penetrometry variables and xyloglucan structures revealed important genomic regions controlling the mechanical behavior of apple flesh.

These original results need to be completed to take into account the allelic diversity of the major QTLs and also verify their genetic stability over several years in different genetic backgrounds. They will be at the basis for future research for key genes controlling structural determinants acting on cell wall assembly and cell development taking advantage of the actual knowledge of genome sequence and available genomic tools. They also open new perspectives for improving the quality of apple by molecular marker-assisted breeding. It also provides the scientific community with newer, more accurate and detailed knowledge on the genetic determinism of the apple quality texture.

5. References

- Atkinson RG, Schröder R, Hallett IC, Cohen D, MacRae EA** (2002) Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple tree leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. *Plant Physiology* **129**: 122-133
- Costa F, Peace CP, Stella S, Serra S, Musacchi S, Bazzani M, Sansavini S, Van de Weg WE** (2010) QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Experimental Botany*
- Costa F, Stella S, Van de Weg WE, Guerra W, Cecchin M, Dallavia J, Koller B, Sansavini S** (2005) Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica* **141**: 181-190
- Costa F, Van de Weg W, Stella S, Dondini L, Pratesi D, Musacchi S, Sansavini S** (2008) Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus domestica* Borkh) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics & Genomes* **4**: 575-586
- Churchill GA, Doerge RW** (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**:963–971
- Galvez-Lopez D, Laurens F, Devaux MF, Lahaye M** (2011a). Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping. *Euphytica*. *Accepted*
- Galvez-Lopez D, Laurens F, Quemener B, Lahaye M** (2011b). Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicellulose fine structure in an apple progeny. *Plant Science*. *Submitted*
- Gianfranceschi L, Soglio V** (2004) The European project HiDRAS: Innovative multidisciplinary approaches to breeding high quality disease resistant apples. *In* Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Vols 1 and 2. International Society Horticultural Science, Leuven 1, pp 327-330
- Harker FR, Maindonald J, Murray SH, Gunson FA, Hallett IC, Walker SB** (2002) Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* **24**: 225-239
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP** (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell and Environment* **26**: 977-989
- Kenis K, Keulemans J, Davey M** (2008) Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 647-661
- King GJ, Lynn JR, Dover CJ, Evans KM, Seymour GB** (2001) Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 1227-1235
- King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, Alston FH, Durel CE, Evans KM, Griffon B, Laurens F, Manganaris AG, Schrevers T, Tartarini S, Verhaegh J** (2000) Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 1074-1084

- Kenis K, Keulemans J, Davey M** (2008) Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 647-661
- Kouassi AB, Durel CE, Costa F, Tartarini S, Weg EDv, Evans K, Fernandez-Fernandez F, Govan C, Boudichevskaja A, Dunemann F, Antofie A, Lateur M, Stankiewicz-Kosyl M, Soska A, Tomala K, Lewandowski M, Rutkowski K, Zurawicz E, Guerra W, Laurens F** (2009) Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. *Tree Genetics and Genomes* **5**: 659-672
- Lahaye, M., Malick, M., Quemener, B., & Laurens, F.** (2011). Cell walls as determinant of apple texture quality. QUALITA 2011. Angers, France.
- Liebhart R, Kellerhals M, Pfammatter W, Jertmini M, Gessler C** (2003) Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Molecular Biology* **52**: 511-526
- Mehinagic E, Royer G, Bertrand D, Symoneaux R, Laurens F, Jourjon F** (2003) Relationship between sensory analysis, penetrometry and visible-NIR spectroscopy of apples belonging to different cultivars. *Food Quality and Preference* **14**: 473-484
- Micheletti D, Troggio M, Zharkikh A, Costa F, Malnoy M, Velasco R, Salvi S** (2011) Genetic diversity of the genus *Malus*; and implications for linkage mapping with SNPs. *Tree Genetics & Genomes*: 1-12
- Mouille G, Witucka-Wall H, Bruyant MP, Loudet O, Pelletier S, Rihouey C, Lerouxel O, Lerouge P, Hofte H, Pauly M** (2006) Quantitative trait loci analysis of primary cell wall composition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**: 1035-1044
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, Van de Weg WE, Van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F, Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A** (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* **2**: 202-224
- Szczesniak AS** (2002) Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference* **13**: 215-225
- Van Ooijen JW** (2004) MAPQTL_ 5.0 software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Plant Research International, Wageningen
- Van Ooijen JW** (2006) JoinMap_ 4.0 software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Plant Research International, Wageningen
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett**

- JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R** (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**: 833-
- Voorrips RE** (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77–78
- Waldron KW, Park ML, Smith AC** (2003) Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**: 101-119
- Zhu Y, Barritt B** (2008) Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (*Malus domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 555-562

Table 1 Estimate of heritability of fruit instrumental compression, penetrometry, sensory, histological and biochemical cell wall variables at two months storage. The bold variables were used for the QTL search.

Variable	h ²	Variable	h ²
Compression		Sugar major	
H1	0.72	UA	0.54
Grad1	0.67	Gal	0.49
H2	0.71	Glc	0.49
Grad2	0.69	Xyl	0.42
WH1	0.74	Man	0.34
WH2	0.71	Fuc	0.28
		Rha	0.21
		Ara	0.20
Penetrometry		Glucomannans	
Fp	0.53	Hex4a2	0.42
Dp	0.58	Hex4a1	0.35
Wp	0.51	Hex5a2	0.34
Ep	0.60	Hex7a3	0.24
Ff	0.63		
Ff2	0.61		
Sensory		Xyloglucans	
CRISP	0.89	XLXGa1	0.65
FIRMN	0.87	XLFGa1	0.59
JUIC	0.73	XLFG	0.47
MELT	0.79	XXFG	0.46
GRAIN	0.89	XXFGa1	0.45
FIBER	0.94	XXFGa2	0.44
MEALI	0.80	XLFGa2	0.41
		GFG	0.40
Histology		XFG	0.36
PC1	0.56	XLXG	0.32
PC2	0.45	XXG	0.26
		XXXG	0.16

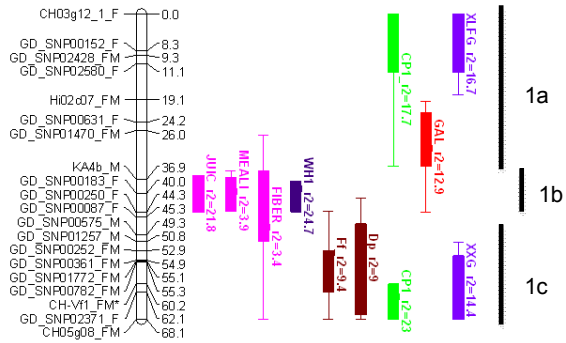
Table 2a QTL detected for sensory, instrumental (compression and penetrometry) and histology variables, detected by multiple QTL mapping and permutation tests using the mean for each parameter.

Variable	LG	LOD MQM	Distance (cM)	R ²	Additivity female	Additivity male	dominance	Locus	Cofactor
FIRMN	4b	4.46	51.41	38.90	0.09	0.40	0.15	CH02c02d_F	CH02c02b_F
	11b	4.69	70.72	18.30	-0.03	0.28	0.03	GD_SNP02910_F	
CRISP	2a	2.68	28.32	7.00	0.20	0.01	-0.16	GD_SNP_00985_F	GD_SNP00360_M
	2b	2.34	70.45	5.70	0.14	-0.01	-0.15	GD_SNP01322_F	
	10b	5.30	77.24	65.50	-0.65	-0.14	0.09	GD_SNP00360_M	
	11b	3.00	51.90	11.30	-0.17	0.07	0.14	GD_SNP02475_F	
	15b	3.64	57.57	11.90	0.22	0.15	0.01	GD_SNP02029_FM	
JUIC	1b	4.22	41.03	21.80	-0.07	-0.27	-0.03	GD_SNP00183_F	GD_SNP00183_F
	12a	2.35	0.00	9.70	-0.14	-0.09	-0.01	CH05d04_FM	
MCLT	5b	3.01	25.50	17.00	-0.10	0.15	-0.00	CH04g09_F	GD_SNP01G9G_M/CI04g09_M
	8a	5.20	73.67	10.70	-0.04	-0.01	0.46	HI23g12_2_F	
	10b	4.29	83.32	56.00	0.48	0.04	0.02	GD_SNP00360_M	
MEAL	1b	3.51	41.03	3.90	0.17	0.16	0.06	GD_SNP00183_F	CH02c02b_F/GD_SNP00183_F
	2a	3.13	0.00	8.00	-0.17	0.02	-0.11	CH02f06_F	
	4b	6.84	51.41	58.00	0.50	-0.73	-0.45	CH02c02b_F	
	10b	7.29	72.24	15.30	-0.17	0.17	-0.26	CH04g09_F	
GRAIN	2b	3.79	70.91	7.50	0.12	-0.15	0.26	GD_SNP00471_F	GD_SNP02371_F/GD_SNP00063_M/GD_SNP00360_M
	8a	2.23	34.34	5.20	-0.17	-0.10	0.17	GD_SNP00086_FM	
	8b	2.80	48.99	5.60	-0.14	-0.07	0.24	GD_SNP00320_FM	
	10a	2.76	36.95	7.00	0.02	-0.03	-0.27	GD_SNP00781_FM	
	10b	7.33	83.32	73.60	1.04	0.12	-0.11	GD_SNP00360_M	
	15b	3.97	63.57	6.60	-0.24	-0.17	-0.16	GD_SNP00241_FM	
	16a	1.97	24.101	6.9	0.19	0.14	0.35	GD_SNP01179_F	
	16b	3.15	60.478	13.1	0.16	0.38	0.34	GD_SNP00626_FM	
FIBER	1b	2.34	41.03	3.40	0.03	-0.23	0.23	GD_SNP00250_F	GD_SNP00360_M
	5a	3.21	2.78	7.90	-0.11	-0.07	0.24	GD_SNP00244_FM	
	10b	6.36	83.32	30.10	-0.85	0.00	-0.03	GD_SNP00360_M	
	12a	3.74	0.00	9.20	-0.12	-0.26	0.09	CH05d04_FM	
	15b	2.44	69.25	5.10	0.45	-0.16	0.25	GD_SNP00241_FM	
H1	2a	4.03	14.74	19.40	0.73	0.78	-0.74	GD_SNP00243_F	GD_SNP00243_F
	5b	3.77	19.05	15.10	1.02	0.29	-0.55	GD_SNP01896_FM	
	6c	2.23	71.52	8.30	-0.37	-0.15	-0.97	CH05a05_FM	
	8a	2.53	4.20	9.50	0.93	-0.30	-0.71	GD_SNP00419_M	
	12a	2.44	0.00	9.40	-1.00	-0.21	0.43	CH05d04_FM	
	14b	2.30	58.66	10.50	-0.59	0.35	-0.89	GD_SNP00948_FM	
	16a	2.68	0.00	10.70	-0.41	0.93	-0.48	CH02a03_FM	
WH1	1b	4.12	42.03	24.70	-2.10	-6.32	-0.30	GD_SNP00183_F	GD_SNP00183_F
	2a	2.51	28.32	9.50	2.03	2.74	-2.19	GD_SNP00985_FM	
	6c	2.61	68.88	10.30	-1.60	-1.05	-3.86	CH05a05_FM	
	8a	2.92	4.20	11.10	3.48	-0.25	-3.00	GD_SNP00419_M	
	12a	2.97	0.00	12.40	-4.23	-0.51	1.69	CH05d04_FM	
	16a	3.31	0.00	11.30	-0.65	4.30	-1.61	CH02a03_FM	
Fp	2b	3.08	64.37	13.10	-0.10	-0.07	0.01	CH02a04_F	CH02a04_F/GD_SNP0168_FM
	4b	4.12	27.08	15.10	0.12	0.08	-0.01	GD_SNP00148_M	
	6c	3.50	60.37	15.00	0.00	-0.12	-0.07	GD_SNP01682_FM	
	7b	2.37	39.07	10.20	0.04	-0.01	0.11	HI03a10_F	
	11a	2.85	26.047	10.8	0.08	0.06	0.03	GD_SNP00735_M	
Dp	1c	3.02	54.89	8.60	-0.12	-0.08	0.03	GD_SNP00361_FM	GD_SNP00985_FM/GD_SNP00196_F
	2a	5.11	29.32	18.50	-0.03	-0.16	0.06	GD_SNP00985_FM	
	4b	3.36	51.41	18.90	0.07	0.15	0.09	CH02c02b_F	
	12b	4.60	41.97	16.10	-0.17	0.07	-0.02	GD_SNP01769_M	
	12a	3.80	17.84	10.80	-0.15	0.03	-0.01	GD_SNP01769_M	
	13b	3.23	34.85	9.50	-0.03	0.04	-0.13	NH009b_FM*	
	15b	2.41	68.25	6.80	-0.04	-0.07	0.10	GD_SNP00241_FM	
	16a	6.87	11.04	24.50	0.20	-0.09	-0.06	GD_SNP00923_F	
Wp	2a	3.86	42.84	14.70	-0.11	-0.26	0.06	GD_SNP02144_FM	GD_SNP02144_FM/GD_SNP00196_F
	4b	3.33	51.41	26.50	0.13	0.24	0.23	CH02c02b_F	
	12a	5.04	14.84	17.20	-0.31	0.08	-0.02	GD_SNP00272_F	
	12b	3.41	40.966	14.4	-0.28	0.08	0.00	GD_SNP01769_M	
	15b	2.20	68.25	7.50	-0.07	-0.10	0.18	GD_SNP00241_FM	
	16b	3.94	11.04	15.90	0.27	-0.07	-0.09	GD_SNP00196_F	
Ff	1c	2.50	60.15	9.40	0.05	0.00	0.02	CH-Vf1_FM*	GD_SNP00527_M/GD_SNP00735_M
	2a	2.53	15.75	10.00	-0.03	0.02	-0.04	GD_SNP00243_F	
	6b	2.56	52.81	9.90	-0.01	-0.02	-0.05	GD_SNP01681_FM	
	8a	4.95	4.19	18.30	0.22	-0.12	-0.19	GD_SNP00419_M	
	11a	3.37	26.04	13.80	0.02	0.06	0.00	GD_SNP00735_M	
CP1	1a	3.76	8.34	11.40	-0.21	0.37	-0.39	GD_SNP00152_F	GD_SNP02371_F
	1b	5.33	67.13	23.00	-0.32	-0.63	-0.01	CH05g08_FM	
	6b	2.50	46.30	12.60	0.37	0.18	0.25	GD_SNP01556_FM	
	9	2.72	46.79	13.70	-0.20	-0.05	-0.46	CH01h02_M	
	13a	3.85	7.81	13.50	0.00	-0.41	0.30	CH05h05_M	
	14b	2.98	45.34	11.50	0.31	0.31	0.15	CH05g11_M	
	15b	2.83	64.57	11.60	0.29	0.07	-0.37	GD_SNP00241_FM	

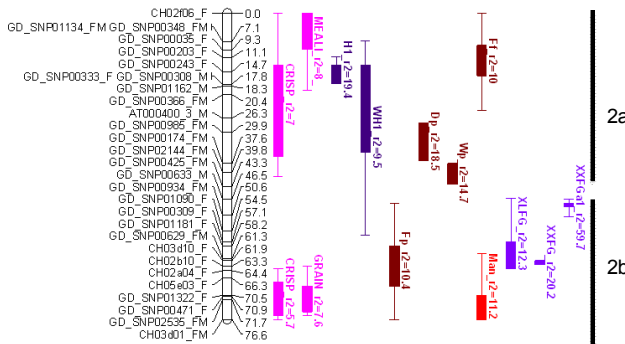
Table 2b QTL detected for cell wall polysaccharides of apple texture, detected by multiple QTL mapping and permutation tests, using the mean m/z peak for hemicelluloses oligomers.

Variable	LG	LOD MQM	Distance (cM)	R ²	Aditivité female	Aditivité male	dominance	Locus	Coofacteur
Glc	5a	2.53	0.00	10.80	0.64	0.30	-0.53	Hi04a08_M	Hi04d02_FM
	5b	3.59	49.17	17.60	-0.56	-0.58	0.62	Hi04b02_FM	
	7a	3.19	19.23	11.90	-0.68	0.69	0.24	GD_SNP01433_FM	
	7b	3.59	56.752	20.3	0.06	-0.34	-0.48	GD_SNP01848_M	GD_SNP00213_M/GD_SNP00360_M
Ara	10b	2.99	70.24	16.1	-0.09	0.41	0.30	CH04g09_M	
	13b	2.88	57.96	9.20	0.07	0.35	-0.21	GD_SNP02238_FM	
	14b	4.24	61.467	14.5	-0.02	-0.09	-0.56	GD_SNP00213_M	
	4a	3.12	0.00	11.80	0.23	1.06	-0.56	Hi23g02_FM	CH05a02_FM
UA	5a	2.53	0.00	10.80	-1.02	-0.30	0.49	Hi04a08_M	
	8c	3.06	13.67	13.50	-0.11	0.02	1.21	CH05a02_FM	
	14b	2.80	64.89	12.10	0.03	0.28	1.22	MDAJ761_M	
	2b	2.94	74.69	11.20	0.11	-0.07	0.03	CH03d01_FM	GD_SNP01696_M/GD_SNP00770_FM
Man	8a	5.41	8.772	23.3	0.16	-0.06	-0.14	GD_SNP01696_M	
	16b	3.69	18.132	13.4	0.07	0.12	0.01	GD_SNP01094_F	
	5a	2.92	0.00	13.10	0.26	0.14	0.00	Hi04a08_M	Hi04a08_M
	16b	2.75	40.183	11.3	0.27	-0.03	0.03	CH05a04_FM	
XLXG	4a	3.06	25.907	9.3	0.33	-0.85	0.25	GD_SNP00321_M	GD_SNP00321_M/Hi02a03_F/GD_SNP00781_FM
	4b	2.31	51.14	19.20	0.20	-0.06	-0.09	CH02c02b_F	
	5d	3.37	79.136	13.2	-0.69	-0.81	0.29	Hi02a03_F	
	7a	3.15	13.133	27.3	-1.25	1.03	-1.90	CN444794_F	
XLXGa1	10a	4.00	38.951	12.6	-0.24	1.02	0.25	CH02c11_FM	
	13	2.79	51.20	9.30	-0.24	0.41	0.76	GD_SNP00532_M	
	4b	8.18	49.61	70.00	-2.69	-2.49	3.08	CH02c02b_F	CH02c02b_F
	1a	3.16	0.00	16.70	-0.26	-0.60	0.20	CH03g12_1_F	GD_SNP02144_FM/CH03d10_F/CH02c02b_F
XLFG	2b	2.76	62.941	12.3	-0.38	0.58	-0.12	GD_SNP00629_FM	
	4b	2.83	51.41	16.10	0.27	-0.44	-0.32	CH02c02b_F	
	15b	4.16	40.035	17.4	-0.45	-0.43	0.11	CH01d08_FM	
	16a	2.91	17.132	7.4	-0.31	-0.19	0.24	GD_SNP01094_F	
XLFGa1	10a	3.53	31.124	14.8	0.86	4.32	1.26	GD_SNP01267_M	GD_SNP01267_M
	17	2.91	19.642	14.8	-3.05	2.44	-3.37	CH01h01_M	
	2b	4.58	61.941	20.2	-0.65	0.37	-0.38	CH03d10_F	CH03d10_F
	15a	4.09	23.05	14.20	-0.31	-0.30	-0.49	GD_SNP01047_M	
XXFG	2b	9.57	47.51	59.70	-12.66	-4.95	4.91	GD_SNP00633_M	GD_SNP00425_FM/GD_SNP02550_M
	17	8.45	19.377	74.1	-13.61	-1.94	2.43	CH01h01_M	
	1c	2.93	65.13	14.40	0.09	0.30	0.48	GD_SNP02371_FM	GD_SNP02371_F/GD_SNP00101_F
	4b	2.63	51.43	12.50	0.34	0.43	0.18	CH02c02b_F	
Hex4a1	13b	3.53	34.85	13.50	0.03	0.60	-0.20	NH009b_FM*	
	6a	2.96	26.60	12.30	-0.37	0.14	-0.21	NZ23g04_FM	CH05a05_FM/CH01h02_M
	6b	3.29	72.52	12.1	0.10	0.40	-0.22	CH05a05_FM	
	8b	4.53	37.338	15.2	0.44	0.15	0.25	CH01f09_FM	
Hex1a2	9	3.20	48.794	16.8	0.22	-0.11	-0.55	CH01h02_M	
	15b	2.97	91.372	10.9	0.41	-0.25	0.11	CH02c09_M	
	3	3.28	58.46	13.30	0.31	0.35	-0.10	GD_SNP01329_M	
	6a	2.65	24.60	11.60	-0.44	0.14	-0.16	NZ23g04_FM	
Hex5a2	6b	3.95	72.52	17.90	-0.09	0.36	-0.45	CH05a05_FM	
	8b	3.49	38.34	13.30	0.41	0.13	0.24	CH01f09_FM	
	5d	3.49	70.13	14.40	0.22	-0.30	0.05	CH03a04_F	CH03a04_F/CH02c11_FM/CH05c06_FM
	10a	3.25	41.74	9.70	0.08	0.34	-0.07	CH02c11_FM	
Gal	13b	4.16	33.64	15.60	0.33	0.27	-0.19	NH009b_FM*	
	16a	2.98	4.53	10.20	-0.23	0.26	-0.13	CH05c06_FM	
	1b	2.98	25.985	12.6	-0.26	-0.56	-0.17	GD_SNP01470_FM	
	9	2.8	60.51	15.00	-0.46397	-0.143075	0.526935	GD_SNP02460_F	
Gal	14a	2.8	7	22.4	-0.2620875	-0.5613075	-0.1677725	CH05g07_3_F	
	14b	2.53	46.342	13.9	-0.3541625	0.2839175	-0.4586425	CH05g11_M	

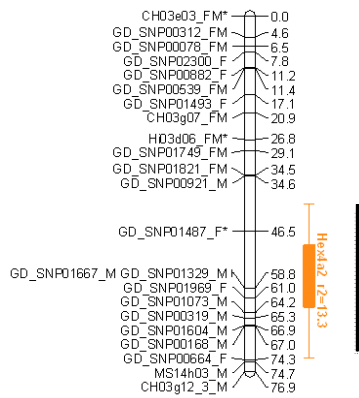
IHWV_01



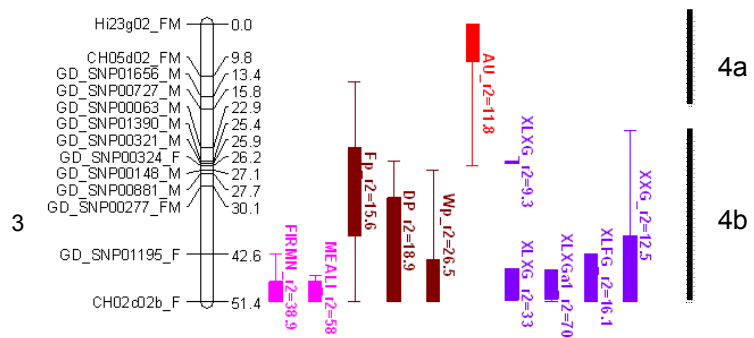
IHWV_02

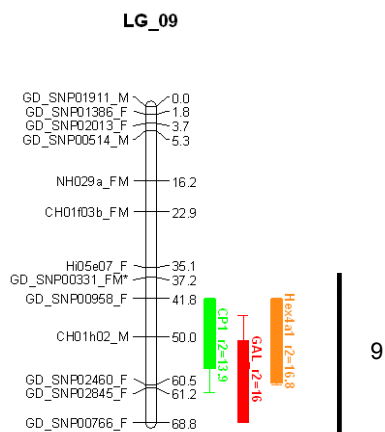
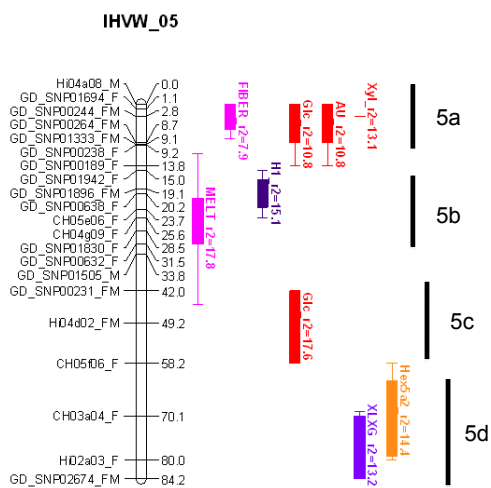


IHWV_03



IHWV_04





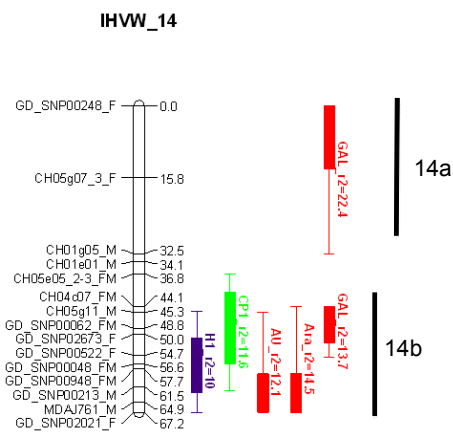


Figure 1 Molecular map showing the regions of interest carrying quantitative trait loci (QTLs) for texture and cell wall polysaccharides, based on F1 progeny derived from the cross X3259 x X3263 apple hybrids. Distances in Kosambi centiMorgans are given on the right of the chromosomes and markers names are on the left. Arrows determine the localization of clusters of QTLs located. The variable names are indicated on Table 1.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans l'optique de développer de nouveaux outils pour l'amélioration variétale du pommier, une descendance de 141 individus a été phénotypée sur deux années à trois stades de conservation pour des caractères de texture par des approches sensorielle et instrumentale ainsi que par l'analyse des déterminants histologiques et des composés biochimiques des parois cellulaires. De fortes corrélations ont été établies entre des caractères sensoriels, instrumentaux et histologiques. Cependant, la prise en compte des dimensions physiques des fruits (calibre, densité du volume poreux, etc.) dans les variables histologiques et mécaniques de compression et pénétration, devrait permettre de préciser les relations entre le calibre du fruit, et sa microstructure sur ses propriétés mécaniques et organoleptiques, en particulier, sa fermeté.

D'autre part l'étude de la composition et de la structure fine de polysaccharides pariétaux (xyloglucanes et glucomananes) de la pomme a révélé une variabilité biochimique des pectines et des hémicelluloses. Des corrélations fortes entre les variations de ces composés signalent une éventuelle co-régulation de la biosynthèse ou le métabolisme des hémicelluloses lors du développement et/ou maturation du fruit.

Aucune corrélation entre les paramètres de texture instrumentaux et sensoriels ou les mesures histologiques n'a pu être établie avec la variabilité compositionnelle et structurale des polysaccharides pariétaux de la pomme. Ce résultat indique qu'il est nécessaire de réaliser ces mesures sur les mêmes échelles et d'intégrer de nouvelles variables telle que la pression de turgescence cellulaire.

Le phénotypage global réalisé sur cette descendance a permis de réaliser une étude génétique inédite sur des variables histologiques et biochimiques des parois en lien avec les approches classiques sensorielles et instrumentales de la texture. Les valeurs d'héritabilité calculées parmi les 56 variables ont permis d'en choisir 31 pour la recherche de QTL : sept sensorielles, six instrumentales, une histologique et 17 biochimiques (six sucres majeurs et 11 hémicelluloses). L'estimation de l'héritabilité des caractères histologiques et biochimiques des parois cellulaires de la pomme est un apport original dans l'étude de la génétique de la pomme. Nous avons initié la recherche de QTL sur les 31 variables les plus hérissables. Au

total, 127 QTL ont été localisés dans 36 régions réparties sur les 17 groupes de liaison du pommier : 25 régions codent pour des variables instrumentales et sensorielles dont 15 non encore répertoriées dans la littérature, six pour des paramètres histologiques et 27 pour des composés biochimiques de la paroi. De nombreuses co-localisations entre QTLs de ces différentes variables ont été mises en évidence, révélant pour la première fois des liens entre le contrôle génétique de caractères de texture de la pomme avec ceux de déterminants structuraux des parois. Par exemple, la co-localisation de QTLs expliquant des variations structurales des xyloglucanes avec ceux de variables de pénétrométrie suggère un contrôle des propriétés mécaniques du fruit par des variations structurales d'hémicelluloses modulées par des gènes localisés sous ces QTLs. On note également une co-localisation significative entre des QTLs de paramètres sensoriels de texture, un QTL pour la teneur en arabinose et la position du gène Md-ACO1. Ceci indiquerait une forte régulation via l'éthylène du métabolisme de polysaccharides contenant de l'arabinose (pectines) avec une implication forte sur la texture.

Ces résultats sur le plan génétique sont en accord avec les études physiologiques réalisées sur les fruits. Ils ouvrent de nouvelles perspectives à court terme pour la recherche de gènes impliqués dans la physiologie de la maturation de la pomme et leur impact sur la texture. La séquence complète du génome du pommier a été publiée en août 2010. C'est une source d'information très riche pour approfondir ce type d'approche. L'étape suivante de ce travail va consister à rechercher sous les clusters de QTLs principaux mis en évidence dans cette étude, des séquences de gènes potentiels et de prédire leurs fonctions possibles. Les QTLs trouvés sont bornés par des marqueurs moléculaires qui seront ancrés sur la séquence génomique du pommier (carte physique). Ces données permettront d'extraire les portions de génome correspondantes et portant les gènes impliqués dans le déterminisme de la qualité de la pomme. Ces séquences portent des prédictions de gènes qu'il faudra annoter pour leurs structures (motifs) et leurs fonctions potentielles par homologie de séquence. Enfin, compte tenu des caractères liés à la qualité du fruit et à la connaissance des voies métaboliques potentiellement impliquées, un ensemble de gènes candidats pourra être extrait. Les informations sur la séquence seront également très utiles pour réaliser des études d'expression a priori (gènes candidats) ou sans a priori.

Dans ce contexte, l'UMR GenHort de l'INRA d'Angers vient de développer une puce à oligonucléotides (Nimblegen) originales qui couvre tous les transcrits du génome du

pommier. Les analyses transcriptomiques entre individus à textures contrastées prévues à très court terme avec cette puce permettront d'identifier les gènes impliqués dans la texture et s'exprimant au cours du développement et de la maturation du fruit. Ces approches génomiques permettront d'aborder d'une manière beaucoup plus exhaustive et large l'étude de la texture. Il sera ainsi possible de vérifier le rôle de gènes déjà identifiés tels que les expansines, des XTH/MTH, PG, PL, PME, mais également d'en mettre en évidence d'autres qui participent au remodelage de la structure des polysaccharides et de leurs interactions dans la paroi. On peut aussi envisager la recherche de gènes codant ou contrôlant l'expression d'enzymes de biosynthèse des polysaccharides pariétaux telles que celles qui participent à la construction des oses nucléotides précurseurs (UDP-D-glucose, UDP-D-galactose, UDP-L-arabinose, UDP-D-xylose, UDP-D-acide galacturonique, GDP-D-mannose...) ainsi que des glycosyl transférase qui pourraient être associées à la variabilité de composition des parois localisés dans plusieurs régions chromosomiques de cette descendance.

A plus long terme, ces résultats originaux pourraient ouvrir de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la qualité de la pomme par sélection assistée par marqueurs moléculaires. Mais des études préliminaires seront indispensables pour 1) acquérir de l'information sur la diversité allélique des principaux QTLs, 2) vérifier leur stabilité sur plusieurs années et dans différents fonds génétiques, 3) choisir des marqueurs peu coûteux et adaptables au haut débit, 4) mettre au point des protocoles expérimentaux adaptés.

Chacun de ces points sera abordé dans le nouveau projet Européen Fruit Breedomics dont l'objectif principal est de développer des outils, des méthodes et du matériel végétal permettant de rendre les programmes d'amélioration génétique des fruitiers plus performants. Un des points importants du projet sera de développer un protocole de sélection assistée par marqueurs et de le mettre en pratique dans des programmes commerciaux de création variétale. En parallèle, des travaux importants seront mis en place pour approfondir les études génétiques en recherchant des liens étroits entre marqueurs génétiques et les principaux caractères agronomiques. Deux approches innovantes seront développées pour acquérir, en plus, des informations sur la diversité allélique de ces caractères : la "Pedigree based Analysis" qui se base sur l'analyse de descendance connectées via leur pedigrees et la génétique d'association qui se base sur des collections de variétés. L'objectif du projet est également d'élargir la base génétique des programmes d'amélioration actuels. FruitBreedomics se basera sur une approche multidisciplinaire incluant des approches

génétiques, génomiques, écophysiologiques et bio-informatiques.

Finalement, pour approfondir ces résultats sur la texture de la pomme et avoir une idée plus précise du contrôle génétique des assemblages pariétaux, le développement de nouvelles approches de phénotypage dédiées plus spécifiquement à l'étude de la variabilité des structures des pectines, ainsi que des enzymes/protéines agissant sur la structure et les interactions des polysaccharides pariétaux reste nécessaire. L'unité BIA de l'INRA de Nantes a mis au point des nouvelles méthodes de phénotypage des polysaccharides pariétaux beaucoup plus performantes et adaptées à l'analyse de collections végétales. Ces développements permettront de faire un phénotypage plus large, sur plus de répétitions et donc d'accroître la précision des résultats. Ces nouvelles approches de phénotypage seront notamment mises en oeuvre dans les études transcriptomiques (puces cDNA ou RNAseq) et génétiques mentionnées ci-dessus.

Annexes

UN NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE

« *Un nouveau chapitre de la thèse* »®

Didiana GALVEZ LOPEZ

Ecole doctorale: VEMAN ED-495

Spécialité en Biotechnologie agroalimentaire

Université de Nantes

Mentor : Sophie BELLEC

**Analyse des déterminants génétiques de la qualité de la
texture chez la pomme**

Date présentation orale du « NCT » : 22 Juin 2010

Sujet académique de la thèse : Analyse des déterminants génétiques de la qualité de la texture chez la pomme

Directeur de Thèse : Dr. Marc LAHAYE

INRA-BIA Nantes

Co-encadrant de thèse : Dr. François LAURENS

INRA-GenHort Angers

Date de soutenance de la thèse : 17 février 2011

Association Bernard Gregory
2010

22 Juin

1. Cadre général et enjeux

1.1. Présentation succincte

La pomme est la deuxième espèce fruitière cultivée en Europe après le raisin. La France est le 5^{ème} producteur mondial avec 2 143 670 tonnes (2008; FAO) et est le quatrième exportateur mondial. L'enjeu du marché de la pomme tient à la disponibilité de fruits à longue durée de conservation, résistants aux maladies avant et après la récolte, et à de bonnes qualités organoleptiques. En Europe et aux Etats-Unis, des programmes sont développés pour la création des nouvelles variétés qui réunissent ces critères permettant ainsi de renforcer la compétitivité de ces pays sur ce marché.

La qualité de la texture chez la pomme est un critère important qui détermine son acceptation par le consommateur et son succès sur le marché. La fermeté de la chair, son croquant, sa jutosité et sa farinosité sont des descripteurs sensoriels clés à maîtriser. Ces descripteurs sont liés à la perception de propriétés mécaniques des tissus qui découlent de variables histologiques, physiologiques, structurales et mécaniques au niveau des parois cellulaires. Ces différents facteurs sont déterminés par la génétique de chaque fruit en fonction de son développement et de son environnement. De nombreuses études ont permis de décrire un certain nombre de modifications intervenant au cours du ramollissement des fruits. Chez la pomme des paramètres biochimiques et physiques sont connus, mais des études plus fines sur la structure des parois cellulaires sont encore à développer pour mieux comprendre l'impact de leur variabilité sur la texture des tissus. Ces constructions cellulaires et pariétales étant sous la dépendance de gènes, il convient également d'identifier les gènes clés associés à l'élaboration de la texture du fruit. L'ensemble de ces connaissances est nécessaire pour entreprendre des travaux de sélection variétale ambitieuse sur des critères de texture du fruit et dépasser ainsi les résultats sommaires existants sur la fermeté du fruit.

Le programme Européen ISAFRUIT, initié en mai 2006, regroupe 16 pays pour mettre en oeuvre des recherches visant à satisfaire les besoins et les attentes des filières de productions fruitières, des transformateurs et des consommateurs et développer ainsi la consommation de fruits et favoriser l'amélioration de la santé des citoyens européens. Cette thèse représente une des contributions de l'INRA à ce programme et s'insère dans des travaux visant à établir les bases génétiques de la qualité des fruits par une cartographie des principaux gènes concernés. L'objectif de cette thèse est double. D'une part, il est d'étudier les déterminants génétiques de la qualité de la texture chez la pomme par le biais de la recherche de marqueurs moléculaires. Cet objectif permettra à terme de développer la sélection variétale raisonnée et assistée par marqueurs. L'autre objectif est la formation par une thèse d'un personnel qui disposera de compétences originales doubles, d'une part sur la caractérisation phénotypiques de multiples facteurs liés à la texture et d'autre part sur le développement d'outils performant pour l'amélioration des plantes. Cette thèse est financée par une bourse étudiant octroyée par le CONACYT, (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia) organisme Mexicain dont l'un des objectifs est la formation de ressources humaines de haut niveau scientifique.

1.2 La thèse dans son contexte :

Ce travail de thèse se développe au sein du centre INRA Angers-Nantes dans les équipes « parois végétales » de l'unité BIA à Nantes et « qualité de la pomme » de l'UMR GenHort sur le site d'Angers, à une distance d'environ 100 km l'une de l'autre. Pour les études fines cellulaires de la pomme, l'équipe « Parois végétales » a plusieurs années d'expérience sur l'étude fine de la composition et les propriétés des parois chez la pomme et d'autres organes végétaux (tomate, grains de céréales, etc.). L'équipe « qualité de la pomme » est spécialiste des bases génétiques des composantes de la qualité des fruits. Elle développe également un programme d'amélioration génétique sur le pommier en partenariat avec les pépiniéristes de la société Novadi pour la création de nouvelles variétés résistantes aux principaux bioagresseurs, de très bonne qualité organoleptique et de production régulière. Ce travail de thèse complètera les connaissances sur des individus potentiellement intéressants pour cet objectif.

Ce travail de thèse est réalisé dans le cadre du Workpackage 6.1 du projet européen Isafruit qui regroupe des équipes françaises de l'INRA (Angers-Nantes, Avignon, Bordeaux) et d'autres pays européens pour travailler en collaboration sur la génétique des principaux attributs de la qualité des fruits charnus (pomme, pêche, abricot) cultivés en zone tempérée. Pour le développement du projet, la composition des équipes et la position des directeurs de thèse sont présentées sur la figure ci-dessous. L'UMR Génétique et Horticulture (GenHort, Angers) est dirigée par Elisabeth Chevreau. L'unité Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA) à Nantes est dirigée par Jacques Gueguen.

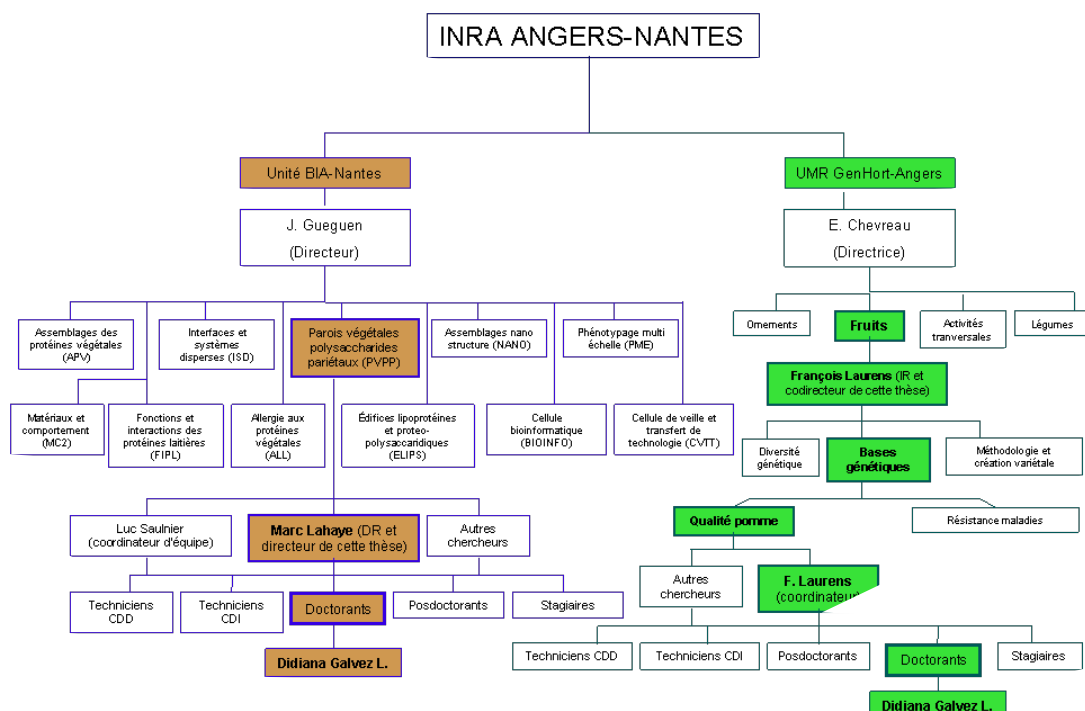


Figure 1. Organigramme des équipes de travail, encadrants et doctorants. Les carrés en gras marquent les points clés de ce travail de thèse.

1.3. Moi dans ce contexte

Pendant ma formation académique au Mexique, je me suis particulièrement intéressée aux biotechnologies. En effet, j'ai compris par mes lectures que cette science peut aider à la résolution de problématiques agroalimentaires et je voulais y participer pour le bénéfice de ma région. Cela m'a mené à obtenir à l'université le diplôme d'Ingénieur en Biotechnologie, puis à suivre un Master en Biotechnologie génomique. Ces formations m'ont donné de l'expérience et des compétences en recherche appliquée sur la biotechnologie moléculaire des fruits. Grâce à mes connaissances dans le domaine et la nécessité de mon pays à former le personnel afin de développer des programmes d'amélioration génétique des fruits, mon principal intérêt scientifique est devenu l'amélioration génétique des arbres fruitiers en utilisant les QTLs (recherche des gènes).

A la fin de mes études, un scientifique mexicain m'a parlé des travaux réalisés à l'INRA d'Angers sur la création variétale, les bases génétiques de la qualité des fruits et de la résistance aux maladies, ce sujet m'a semblé intéressant, j'ai donc cherché le support financier du CONACYT pour venir en France. Le CONACYT est un organisme mexicain public qui gère le développement de la science et technologie du Mexique. Cet organisme choisit parmi les meilleurs étudiants mexicains ceux qui ont de bonnes aptitudes pour la science et la recherche et facilite le financement de leur Doctorat dans des centres de recherche reconnus au niveau international, soit au Mexique soit à l'étranger. Dans le concours de recrutement annuel du CONACYT pour les bourses de formations académiques à l'étranger, une des disciplines prioritaires est la biotechnologie. Ayant le profil académique pour participer à ce concours, j'ai contacté mes actuels encadrants en France. Mes

compétences académiques en biotechnologie agricole, particulièrement avec les marqueurs moléculaires, correspondaient aux besoins des équipes de GenHort et BIA. J'ai donc été acceptée pour venir à l'INRA.

Ayant reçu la confirmation de ma venue au laboratoire français, j'ai fait la demande d'une bourse de thèse au CONACYT et passé un concours pour évaluer mes connaissances, expériences et compétences scientifiques, ainsi que mon niveau de langues (anglais, français). Le CONACYT a également évalué l'expérience et le prestige scientifique des chercheurs et des équipes qui se proposaient de m'accueillir. A l'issue de ce concours, le CONACYT m'a attribué une bourse de thèse pour faire mon Doctorat en France à l'INRA Angers-Nantes. Je me suis inscrite à l'Université de Nantes et je suis arrivée en France en septembre 2007 pour débiter ma thèse.

2. Déroulement, gestion et coût estimé du projet de thèse

2.1. Préparation et cadrage du projet

La définition de mon sujet de thèse a été réalisée par mes encadrants sur la base de travaux antérieurs. En effet, certaines expériences menées sur la tomate sur le site de Nantes, et sur la pomme à Angers ont décidé mes encadrants à les appliquer à toute une grande descendance de pommier. La mise en commun des différentes idées entre mes directeurs de thèse et moi a ensuite été nécessaire afin d'établir les hypothèses pertinentes et les démarches à suivre.

Pendant le déroulement de la thèse, le directeur à l'INRA de Nantes m'a apporté des connaissances sur la biochimie des polysaccharides des parois cellulaires, et a mis à ma disposition d'importants moyens instrumentaux de mesure : macro-imageur, lyophilisateur, chromatographes en phase gazeuse, HPLC, HPAEC, spectromètre de masses, etc. D'autre part, le directeur de l'INRA d'Angers a contribué à me former dans le domaine génétique (construction des cartes génétiques et recherche des gènes) et des évaluations instrumentales et sensorielles de pomme. Il a mis à disposition d'important moyens biologiques (collections génétiques de pommiers, marqueurs moléculaires) et instrumentaux (texturomètre, équipements de PCR, séquenceur, robots).

La complexité du projet et la diversité des méthodes utilisées m'ont permis de collaborer avec différents partenaires scientifiques (ingénieurs de recherche et d'études et techniciens, au sein des deux équipes). Un comité de thèse a été réuni et la première évaluation de mon travail s'est déroulée au milieu de la deuxième année de thèse. Il a réuni non seulement mes encadrants et les chercheurs associés de l'INRA Angers Nantes, mais aussi des chercheurs extérieurs au centre (INRA Avignon, INRA Toulouse).

Cette thèse a été sujette à des facteurs de réussite et de risque pendant son développement, les principaux sont les suivants:

Facteurs de réussite :

- Moyens financiers disponibles pour le développement technique du travail et ma bourse de thèse.
- Compétences et expérience des encadrants et des équipes de travail (dans le domaine de la qualité des fruits).
- Mes aptitudes et compétences pour l'apprentissage rapide et la maîtrise des méthodes appliquées dans le travail de thèse.
- Suivi régulier du directeur et du co-encadrant de thèse.
- Matériels biologiques disponibles et équipements de travail suffisants.
- Bonne collaboration entre les unités de recherche.
- Support des techniciens des deux laboratoires pour aider au développement de certaines expériences.

Facteurs de risque :

- Risque de perte du matériel végétal (pourrissement)
- Risques liés à la logistique. Les travaux sont réalisés sur 2 sites distants de 100 km : mobilité et hébergement. Plusieurs déplacements entre les laboratoires (d'Angers à Nantes et vice versa) ont impliqué 12 déménagements et des démarches administratives importantes.
- Problèmes de logistique et d'agendas des deux encadrants qui ont provoqué des difficultés pour concilier les échéances du travail dans chaque site et la planification des réunions d'avancement des travaux et discussions collectives (Peu de réunions pour discuter des résultats).
- Divergences d'intérêt entre les équipes affectant la coordination et la planification du travail sur chaque site.

2.2. Conduite du projet :

Ce travail a été divisé en trois étapes principales. La première étape, la plus longue, s'articule autour des analyses phénotypiques de deux descendances de pommier ; la deuxième autour des analyses génétiques et de la construction des cartes génétiques des familles étudiées, et la troisième autour de la recherche des QTLs (gènes liés à la texture du fruit).

Le phénotypage a été réalisé sur les 2 centres d'études, et s'appuie sur des analyses instrumentales, sensorielles, histologiques et biochimiques de paroi cellulaire. Le génotypage, la construction des cartes génétiques et la recherche des gènes ont été faites

sur le site d'Angers. Un calendrier récapitulatif des différentes étapes des activités développées pendant les trois ans est présenté ci-dessous (Figure 2).

Malgré les contraintes pendant le déroulement de la thèse, le planning pré-établi a été respecté et le travail a progressé correctement. Il me reste encore à faire quelques analyses génétiques au laboratoire pour après finaliser les cartes génétiques, ainsi que la recherche des gènes de texture, l'écriture des articles scientifiques et la rédaction de la thèse. Les problèmes logistiques avec les multiples déménagements ont été résolus au milieu de la thèse par mon emménagement définitif à une adresse fixe.

D'autre part, toutes les contraintes rencontrées au cours de ma thèse m'ont permis de m'adapter aux différents milieux de travail, ainsi que de me former un caractère plus discipliné et exigeant avec moi-même pour la réussite de mon projet.

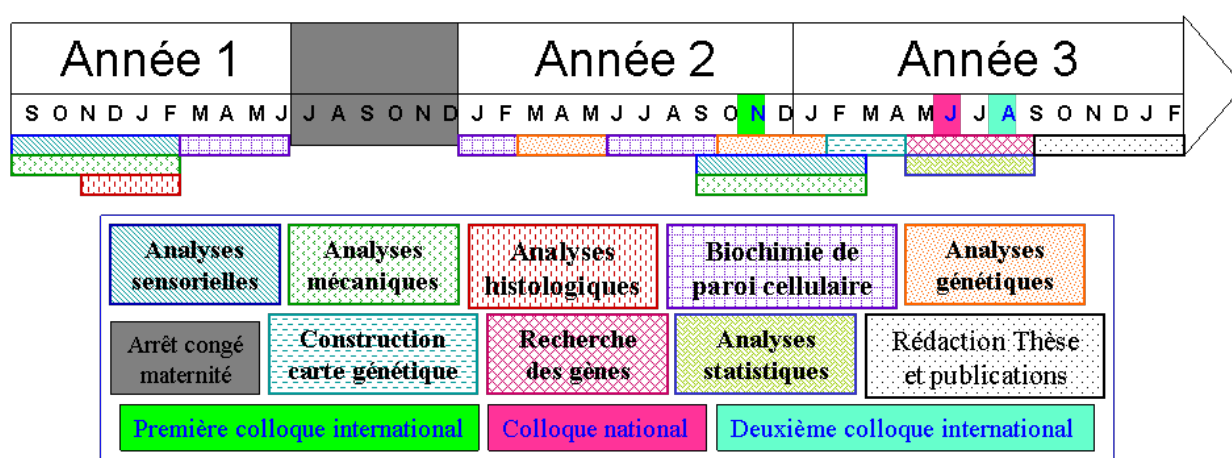


Figure 2. Calendrier des étapes principales du projet de thèse dans les trois ans.

2.2. Estimation et prise en charge du coût du projet

Le projet de thèse dans son ensemble a coûté environ de 117 846 Euros. Ce calcul a été fait en deux parties parce que la thèse s'est déroulée sur deux sites de travail différents. Le tableau suivant résume le coût approximatif de la thèse (tableaux 2a et 2b) et la répartition de ce coût entre organismes et laboratoires. Le tableau « 2a » montre les dépenses réalisées sur le site GenHort-Angers et le tableau « 2b » les dépenses sur le site BIA-Nantes.

Tableau 1. Coût total approximatif investi dans la thèse et les origines des fonds. Les détails sont décrits dans les tableaux suivants.

Origine des fonds	Débit (Euros)
INRA Nantes	39 985
INRA Angers	40 925
CONACYT Mexique	36 936
TOTAL	117 846

Tableau 2a. Coût estimé sur le site GenHort-Angers.

§ Estimation car coût non disponible.

* Les laboratoires ne paie pas de loyer, seulement les charges afférentes.

ESTIMATION DU COUT CONSOLIDE DE LA THESE

SITE UMR GEN-HORT ANGERS

Montants en euros TTC

	Nature de la dépense	Détails		Coûts totaux (Euros TTC)				Resources
				Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total	
1	Ressources Humaines							
1.1	Doctorant	bourse		35	990	100%	34650	CONACYT
1.2	Coodirecteur de thèse	Salaire brut	Charges	19	4472	10%	8497	INRA
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)	Salaire brut	Charges	0	0	0	0	
	Technicien 1			6	1695	50%	5085	INRA
	Technicien 2			6	2685	50%	8055	INRA
	Technicien 3			6	1671	70%	7018	INRA
	Ingénieur d'études			4	2833	30%	3399	INRA
	Sous-total Ressources Humaines						66704	
2	Consommables							
2.1	Fournitures expérimentales:							
	pommes en parcelle (entretien en verger)			24	142,7	100%	3425	INRA
	consommables plastiques						392	INRA
	réactifs biologie moléculaire						503	INRA
	petit matériel de pailasse						100	INRA
2.2	Fournitures de bureau						40	INRA
2.3	Autres achats (analyses extérieures)						1700	INRA
	Sous-total Consommables						6160	
3	Infrastructures							
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat				?			
3.2	Loyers des locaux	Loyer brut	Charges locatives		?			INRA
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)				?			INRA
3.4	Autres							
	Sous-total Infrastructures							
4	Matériel (amortissements)							
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement					0	
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement					0	
4.3	Logiciels de bureau	Taux d'amortissement					129	INRA
	Sous-total Matériel						129	
5	Déplacements							
5.1	Missions en France	Transport	Hébergement + autres frais	19			873	INRA
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				0	
5.3	Congrès en France	Transport	Hébergement + autres frais				0	
5.4	Congrès à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				1500	INRA
	Sous-total Déplacements						2373	
6	Formation							
6.1	Formations						120	INRA
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)			3 ans	762	100%	2286	CONACYT
	Sous-total Formation						2406	
7	Documentation et communication							
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone						0	
7.2	Publicité, communication, impressions	Direct	Sous-traitance agence				89	INRA
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)						0	
7.4	Autres							
	Sous-total Documentation et communication						89	
8	Charges financières (intérêts des emprunts)							
	Sous-total Charges financières						0	
9	Charges exceptionnelles							
	Sous-total Charges exceptionnelles						0	
10	TOTAL						77861	

Tableau 2b. Coût estimé sur le site BIA-Nantes.

* Les laboratoires ne paient pas de loyer, seulement les charges afférentes.

ESTIMATION DU COUT CONSOLIDE DE LA THESE

Montants en euros TTC		BIA NANTES					
	Nature de la dépense	Détails *		Coûts totaux (Euros TTC)			
				Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	Ressources Humaines						
1.2	Directeur thèse	Salaire brut	Charges	13	7000	15	13650
1.3	Prime Encadrement			0	0	0%	0
	Ingénieur Recherche			2	7000	5%	2100
	Ingénieur Recherche			7	7000	20%	7350
	5 techniciens			14	3800	70%	7980
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)	Salaire brut	Charges				0
1.7	Sous-traitance						0
	Sous-total Ressources Humaines						31080
2	Consommables						
2.1	Fournitures expérimentales			13	500	100	6500
2.2	Fournitures de bureau			13	60	100	780
2.3	Autres achats						0
	Sous-total Consommables						7280
3	Infrastructures						
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat				?*E		
3.2	Loyers des locaux	Loyer brut	Charges locatives		?*E		
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)			13	25	100	325
3.4	Autres						
	Sous-total Infrastructures						325
4	Matériel (amortissements)						
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement					0
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement					0
4.3	Logiciels de bureau	Taux d'amortissement					0
4.4	Autre	Taux d'amortissement					0
	Sous-total Matériel						0
5	Déplacements						
5.1	Missions en France	Transport	Hébergement + autres frais	13	100	100	1300
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				0
5.3	Congrès en France	Transport	Hébergement + autres frais				0
5.4	Congrès à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				0
	Sous-total Déplacements						1300
10	TOTAL						39985

3.

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

Mon travail de thèse actuelle contient 85% de nouveautés (connaissances, méthodes, techniques, etc.) qui n'étaient pas du tout dans mon domaine d'expertise. La thèse a donc été un nouveau défi professionnel et personnel pour acquérir ces nouvelles compétences et les appliquer dans mes futurs domaines scientifiques.

Au cours de mon projet de thèse, j'ai acquis des **compétences techniques** suivantes :

- En **génétique**: maîtrise des marqueurs moléculaires SSR (microsatellites) ; construction des multiplex, maîtrise de robots séquenceurs d'ADN, robot Biomek multicanaux ; construction des cartes génétiques, recherche des QTL's (gènes), maîtrise des logiciels impliqués dans chaque méthode mentionnée : GeneMapper, JoinMap, MapQTL, etc.
- En **biochimie** : histologique par macrovision et analyse d'image, préparation du matériel : isolement de parois cellulaires, chromatographie en phase gazeuse, HPLC, dosages colorimétriques, HPAEC, dégradation enzymatique, spectrométrie de masse et la maîtrise des logiciels associés.
- Mise en oeuvre des techniques appliquées à la **texture des fruits** par mesures **instrumentales** (pénétration et compression de fruits par un texturomètre) et **sensorielles** (avec un panel des dégustateurs experts).

Cette diversité des techniques appliquées à mon projet a nécessité une bonne organisation du travail en fonction de la disponibilité des appareils dans chaque équipe de travail. Cette gestion du temps m'a permis de développer davantage le sens du travail en équipe, le sens de la communication et notamment l'acquisition du français courant, utilisé aussi bien dans la vie quotidienne que dans la vie professionnelle (langage scientifique). Les bonnes relations avec les personnes avec qui j'ai pu travailler m'ont permis directement ou indirectement de bien avancer sur le projet lors des deux premières années (les plus laborieuses). J'ai pu également améliorer et développer mes connaissances en biostatistiques, en génétique des fruits et dans l'écriture des publications en anglais.

Les résultats de mon projet sont en cours de valorisation sous forme de publications scientifiques en anglais dans des revues internationales. Les discussions avec mes encadrants sur les résultats et leur interprétation m'ont permis de devenir plus autonome sur mon projet et d'être plus synthétique et claire dans les explications. J'ai pu renforcer ce que j'avais acquis au Mexique à travers l'expérience de cette thèse. J'ai également amélioré ma façon de vulgariser mon travail de thèse dans un langage simple pour des personnes non spécialistes dans le domaine, notamment en français et en anglais.

D'autre part, j'ai suivi diverses formations non seulement dans le cadre de l'Ecole Doctorale, mais aussi proposé par d'autres organismes de recherche : INRA Angers Nantes (MISTER I, II et III), Instituto Politécnico Nacional du Mexique (Bioéthique) par vidéoconférence. Cela m'a donné la possibilité de découvrir des domaines scientifiques nouveaux et de stimuler ma curiosité scientifique. J'ai pu participer également à différents colloques nationaux organisés par l'INRA et internationaux (congrès en relation directe avec mon projet de recherche en France et à Lisbonne), lors desquels j'ai pu communiquer oralement les résultats obtenus. Ces présentations orales m'ont permis d'acquérir la maîtrise du stress lié à l'emploi d'une langue autre que ma langue maternelle et lié à la présence d'un public international.

Finalement, mon projet de thèse dans son ensemble m'a beaucoup apporté non seulement sur l'expertise professionnelle scientifique et technique décidé conjointement entre le CONACYT et moi, mais aussi sur le plan humain et personnel. Les difficultés rencontrées au cours de ma thèse, s'ajoutant à ma situation familiale qui a changé

pendant cette période, m'ont permis de développer ma ténacité et une constance dans le travail, le courage de supporter un éloignement affectif, et une souplesse pour faire face à des situations difficiles.

4. Résultats: impact de la thèse et identification des pistes professionnelles

Les travaux réalisés au cours de mon projet de thèse ont contribué à une meilleure compréhension de la texture de la pomme. Les résultats obtenus ont contribué d'une part, à l'élucidation de régions chromosomiques impliquées dans la texture de la pomme et d'autre part, à identifier des pommiers potentiels géniteurs à utiliser pour des futurs programmes d'amélioration génétique. Les résultats de phénotypage ont donné des points clés pour mieux étudier la texture des fruits charnus. Tous ces résultats sont en cours de rédaction pour des publications scientifiques en anglais dans des revues internationales. Ils trouveront leurs applications au sein des améliorateurs du pommier en Europe, plus particulièrement dans le cadre du partenariat industriel du projet ISAFRUIT.

Mes travaux ont contribué également à la mise au point des futures recherches sur la texture de la pomme (projet européen Fruit Breedomics), premièrement parce qu'ils ont permis le développement de nouvelles approches expérimentales développées pour l'étude de la texture des fruits et par les données génétiques obtenues qui serviront de base pour des travaux en génomique pour la validation de gènes candidats.

Les compétences scientifiques et personnelles développées au cours de ma thèse me permettront une insertion dans un centre de recherche aussi bien dans le secteur public que privé. Un poste dans une grande entreprise biotechnologique ou agro-alimentaire pourrait constituer un débouché potentiel.

En février 2009 j'ai reçu une offre de travail chez Pionner Dupont pour travailler dans leurs laboratoires (février 2009). En juillet 2009 un centre de recherche public au Mexique (de l'Instituto Politécnico Nacional) m'a fait une offre similaire. En novembre 2009 j'ai également reçu une offre de post-doctorat dans l'université de Davis California et en mars 2010 j'ai reçu une offre de travail comme chercheuse dans un autre centre de recherche au Sud du Mexique (Universidad Autonoma de Chiapas). J'effectuerai mon choix selon des critères familiaux.

Etude des déterminants structuraux et génétiques de la texture de la pomme

Résumé

La texture est un critère majeur déterminant la qualité de la pomme. Elle dépend de facteurs cellulaires (parois cellulaires et pression de turgescence) et histologiques à différentes échelles lesquelles sont sous contrôle génétique. L'objectif de cette thèse était d'identifier des marqueurs génétiques associés à la texture du fruit. Une descendance de 150 individus a été phénotypée sur deux années à trois stades de conservation pour des caractères sensoriels et mécaniques, et pour des variables histologiques et biochimiques de la paroi cellulaire. Des corrélations entre des mesures instrumentales et sensorielles et des paramètres histologiques ont été établies alors qu'aucune n'a été trouvée avec les variables biochimiques. Les valeurs d'héritabilité varient de 0.16 à 0.94 pour l'ensemble des variables. La recherche de QTL s'est focalisée sur les 31 caractères les plus héritables. Au total, 127 QTL ont été localisés dans 36 régions réparties sur les 17 groupes de liaison du pommier : 25 codent pour les variables instrumentales et sensorielles, sept pour des paramètres histologiques, 27 pour des structures biochimiques pariétales. 19 régions montrent une co-localisation entre des caractères sensoriels et/ou instrumentaux avec les mesures histologiques et/ou biochimiques, révélant pour la première fois des liens entre le contrôle génétique de caractères de texture de la pomme avec ceux de déterminants structuraux de la paroi. Ces résultats originaux offrent une base pour la recherche de gènes les contrôlant. Ils ouvrent également de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la qualité de la pomme par sélection assistée par marqueurs moléculaires.

Mots-clés: Pomme, qualité, texture, paroi cellulaire, histologie, génétique, QTL, héritabilité.

Study of structural and genetic determinants of apple texture

Abstract

Texture is a major criterion of apple quality. It depends of cellular (cell wall and turgor pressure) and histological factors at different scales, which are under genetic control. The objective of this thesis was to identify new genetic markers related to fruit texture traits. A progeny of 150 individuals was phenotyped over two years at three different storage dates for sensory and mechanical traits, for histological parameters and cell wall biochemistry. Significant correlations were found between texture and histological traits, but no correlations were established with cell wall structures. The heritability values for all the traits varied from 0.16 to 0.94. The QTL mapping was focused on the 31 most heritable variables. A total of 127 QTL were located on 36 regions within the 17 apple linkage groups: 25 map for instrumental and sensory parameters, seven for histological and 27 for biochemical cell wall structures. 19 regions showed co-localization between sensory and/or instrumental characters with histological and/or biochemistry, revealing for the first time links between the genetic control of apple texture traits with those of structural cell wall determinants. Three regions co-localized with candidate genes related to fruit development and ripening identified in previous studies. These original results open new perspectives for improving the quality of apple by molecular marker-assisted breeding. They also provide a basis for deciphering new genes controlling structural determinants of texture.

Keywords: Apple, quality, texture, cell wall, histology, genetic, QTLs, heritability.

INRA-Centre de Recherche de Nantes
Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages
Rue de la Géraudière - BP 71627, 44316 Nantes cedex 3-
FRANCE

INRA - Centre de Recherche de ANGERS
UMR-Génétique et Horticulture
42, Rue Georges MOREL 49071 BEAUCOUZE Cedex
- FRANCE