

Université Catholique de Louvain

Ecole de Biologie

Université de Namur

Département de Biologie

---

 UCLouvain



# Etude des barrières de reproduction entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum*

Moreels Pauline

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme  
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteur : Muriel Quinet (UCL/ELIA)

Année académique 2021-2022

## Remerciements

---

J'aimerais remercier chaleureusement Muriel Quinet, pour m'avoir guidé tout au long de ce mémoire, pour avoir répondu à toutes mes questions, pour le temps accordé à toutes les relectures et pour son soutien et sa disponibilité pendant toute la période du mémoire, merci beaucoup.

J'aimerais également remercier grandement Servane Bigot pour tous ses conseils, son aide et plus généralement sa bonne humeur et son soutien qui ont rendu la réalisation de ce mémoire un réel plaisir. Merci d'avoir répondu à toute mes petites questions et d'avoir été patiente envers ma maladresse.

Merci aux membres du GRPV pour leur aide, leurs conseils et les discussions tout au long de mon séjour au labo. Merci à Marie et à Mathilde de m'avoir conseillé, merci à Brigitte de m'avoir aidé avec les plantes en serres. Je tiens tout particulièrement à remercier Marie-Eve, pour m'avoir aidé dans toute la biologie moléculaire et de m'avoir appris l'utilisation des machines nécessaires.

Merci aux autres mémorants, Augustin, Maurine et Chanceline, pour votre bonne humeur et vos conseils.

Merci à mon jury, composé de Muriel Quinet, Servane Bigot, Renate Wesselingh, Adrien Luyckx et Guillaume Lobet, pour la lecture de ce mémoire.

Merci à mes parents de m'avoir soutenu durant toutes mes années d'étude et durant tout ce mémoire et de l'avoir entièrement lu plusieurs fois même s'ils ne connaissaient rien au sujet.

Merci à mes amis et à ma sœur pour leur soutien et pour m'avoir écouté parler de tomates pendant toute une année.

## Résumé

---

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) est l'une des cultures maraichères les plus importantes au monde. Cependant, sa domestication puis son importation en Europe ont engendré un goulot d'étranglement génétique, et donc une réduction de la variabilité génétique de l'espèce. La tomate est notamment sensible à certains stress biotiques et abiotiques tels que le stress salin. Il existe toutefois d'autres espèces de tomates sauvages présentant potentiellement des gènes de résistances à divers stress, notamment au stress salin, qui pourraient potentiellement être introgressés chez la tomate cultivée. C'est le cas de *Solanum chilense*, une espèce de tomate sauvage retrouvée au Pérou et au Chili, principalement dans le désert de sel de l'Atacama.

*Solanum chilense* présente toutefois une auto-incompatibilité (AI) gamétophytique alors que *Solanum lycopersicum* est auto-compatible. De plus, le clade des *Lycopersicon*, regroupant la tomate cultivée et les tomates sauvages, présente une incompatibilité unilatérale (IU), qui se chevauche probablement avec les mécanismes d'auto-incompatibilité.

Ce mémoire porte donc sur les barrières de reproduction entre *Solanum lycopersicum* et *Solanum chilense*, mal connues. La phénologie des fleurs de *S. lycopersicum*, *S. chilense* et des hybrides résultants des deux espèces a été étudiée. Des croisements ont été effectués entre les plantes de *S. chilense*, *S. lycopersicum* et leurs hybrides et des allèles d'AI (S-RNases) ont été séquencés chez *S. chilense* et les hybrides. Finalement, l'expression des gènes *HT-A*, *HT-B* et *ODC2*, impliqués dans l'AI gamétophytique et dans l'IU a été étudiée chez *S. lycopersicum*, *S. chilense* et leurs hybrides.

Trois allèles d'AI ont pu être séquencés dont deux jamais décrits chez *S. chilense*. Les allèles de plusieurs plantes de *S. chilense* disponibles au laboratoire ont pu être déterminés grâce aux résultats des croisements entre différents individus de *S. chilense*. Les hybrides présentaient également une AI gamétophytique et l'existence d'une barrière de reproduction entre *S. chilense* et *S. lycopersicum* a pu être prouvées. Par ailleurs, la présence chez *S. chilense* et l'implication du gène *ODC2* dans l'IU et des gènes *HT-A* et *HT-B* dans l'AI gamétophytique et l'IU a pu être supposée au vu des expressions chez les différentes espèces.

En conclusion, les gènes *HT* et *ODC2* sont fort probablement impliqués dans l'incompatibilité unilatérale entre *S. chilense* et *S. lycopersicum* mais leur rôle exact n'est pas encore complètement compris.

## Abstract

---

The cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important vegetable crops in the world. However, its domestication and subsequent importation into Europe have created a genetic bottleneck, and thus a reduction in the genetic variability of the species. The tomato is particularly sensitive to certain biotic and abiotic stresses such as salt stress. However, there are other wild tomato species with potential resistance genes to various stresses, including salt stress, which could potentially be introgressed into cultivated tomatoes. This is the case of *Solanum chilense*, a wild tomato species found in Peru and Chile, mainly in the Atacama salt desert.

However, *Solanum chilense* shows gametophytic self-incompatibility (SI) whereas *Solanum lycopersicum* is self-compatible. In addition, the *Lycopersicon* clade, grouping cultivated and wild tomatoes, exhibits unilateral incompatibility (UI), which likely overlaps with the mechanisms of self-incompatibility.

This thesis therefore focuses on the poorly understood reproductive barriers between *Solanum lycopersicum* and *Solanum chilense*. The phenology of the flowers of *S. lycopersicum*, *S. chilense* and the resulting hybrids of the two species was studied. Crosses were made between plants of *S. chilense*, *S. lycopersicum* and their hybrids and alleles of SI (S-RNases) were sequenced in *S. chilense* and the hybrids. Finally, the expression of *HT-A*, *HT-B* and *ODC2* genes, involved in gametophytic SI and UI were studied in *S. lycopersicum*, *S. chilense* and their hybrids.

Three SI alleles could be sequenced including two never described in *S. chilense*. The alleles of several *S. chilense* plants available in the laboratory could be determined from the results of crosses between different *S. chilense* individuals. The hybrids also showed gametophytic SI and the existence of a reproductive barrier between *S. chilense* and *S. lycopersicum* could be proved. Moreover, the presence in *S. chilense* and the involvement of the *ODC2* gene in UI and of the *HT-A* and *HT-B* genes in gametophytic SI and UI could be assumed in view of the expressions in the different species.

In conclusion, the *HT* and *ODC2* genes are most likely involved in the unilateral incompatibility between *S. chilense* and *S. lycopersicum* but their exact role is not yet fully understood.

## Table des matières

---

Remerciements .....	1
Résumé .....	2
Abstract .....	3
Introduction .....	6
Synthèse bibliographique .....	8
La tomate .....	8
Généralités sur la tomate.....	8
<i>Solanum lycopersicum</i> L.....	9
<i>Solanum chilense</i> Dun.....	12
L'auto-compatibilité et l'auto-incompatibilité .....	14
Généralités sur l'auto-incompatibilité.....	14
L'auto-incompatibilité gamétophytique.....	15
Incompatibilité chez les espèces de tomates .....	17
Compatibilité interspécifique chez les tomates.....	18
Matériel et méthodes .....	21
Matériel végétal et conditions de culture.....	21
Mesures de la phénologie des fleurs et de leur fertilité .....	21
Croisements .....	22
Identification des S-RNases.....	23
Etude de l'expression des gènes HT et ODC2 par qRT-PCR .....	29
Arbres phylogénétiques .....	30
Analyses statistiques.....	31
Résultats .....	32
Partie I : Durée d'anthèse et fertilité des fleurs .....	32
Partie II : Croisements .....	34

Croisements <i>Solanum chilense</i> x <i>Solanum chilense</i> .....	34
Croisements hybrides x hybrides .....	36
Croisements entre <i>Solanum chilense</i> et <i>Solanum lycopersicum</i> .....	37
Partie III : Biologie moléculaire .....	39
Identification des allèles d'auto-incompatibilité.....	39
Arbres phylogénétiques .....	41
Etude de l'expression des gènes de <i>HT-A</i> , <i>HT-B</i> et <i>ODC2</i> .....	45
Discussion .....	48
Phénologie des fleurs.....	48
Auto-incompatibilité gamétophytique.....	49
Auto-incompatibilité chez <i>Solanum chilense</i> .....	49
Auto-incompatibilité chez les hybrides .....	53
Incompatibilité unilatérale.....	54
Conclusion et perspectives .....	57
Références .....	59
Annexes.....	66

## Introduction

---

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) est une des cultures maraichères les plus consommées au monde (Fernandes et al., 2018). Certains de ses composants, comme le lycopène, ont été reconnus comme anti-oxydants et anti-cancéreux et elle est également une très bonne source de métabolites secondaires (Gerszberg et al., 2015). Cependant, lors de sa domestication puis de son introduction en Europe, un nombre limité de génotypes ont été sélectionnés, réduisant la variabilité génétique de l'espèce (Faraone et al., 2021). La sélection de l'espèce s'est surtout focalisée sur la productivité au détriment d'autres aspects, ce qui fait que la tomate cultivée est sensible à plusieurs stress biotiques et abiotiques, notamment le stress salin (Gharbi et al., 2017a, Gharbi et al., 2017b, Verlaan et al., 2011), qui est un problème majeur dans l'agriculture moderne (Kashyap et al., 2021).

Parallèlement, il existe plusieurs espèces de tomates sauvages (Bedinger et al., 2011), dont *Solanum chilense*, originaire du Chili et possédant plusieurs résistances à des stress abiotiques, notamment au stress hydrique et salin (Gharbi et al., 2016, Gharbi et al., 2017a, Gharbi et al., 2017b, Martinez et al., 2012, Martinez et al., 2020, Nosenko et al., 2016). L'introgession des résistances de *S. chilense* chez la tomate cultivée serait donc intéressante d'un point de vue de l'amélioration végétale étant donné la proche parenté des deux espèces (Gharbi et al., 2017a, Gharbi et al., 2017b, Kashyap et al., 2020).

Cependant, *Solanum chilense* est une plante auto-incompatible tandis que *Solanum lycopersicum* est auto-compatible. Dans l'optique de l'amélioration végétale de *S. lycopersicum*, il est important de comprendre les mécanismes d'incompatibilité interspécifiques qui régissent les croisements entre les espèces de tomates (Tovar-Mendez et al., 2014). En effet, des croisements ont été réalisés précédemment au laboratoire en vue d'obtenir des hybrides entre *S. lycopersicum* et *S. chilense* et nous avons mis en évidence que la réussite de ces croisements dépendait du génotype des plantes parentes utilisées et que les croisements fonctionnaient avec certaines plantes de *S. chilense* mais pas toutes. Il a été montré que la compatibilité interspécifique chez diverses espèces de tomate dépendaient de mécanismes dépendant et indépendant des mécanismes d'auto-incompatibilité intra-spécifique (Qin et Chetelat, 2021) mais ces mécanismes restent à ce jour très largement méconnus, en particulier chez *S. chilense*.

Les objectifs de ce mémoire sont donc liés à l'incompatibilité interspécifique entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum* et sont multiples. Le premier objectif est de déterminer la phénologie des fleurs de *S. chilense*, de *S. lycopersicum* et des hybrides de ces deux espèces ainsi que de déterminer s'il existe une phase mâle et une phase femelle chez ces fleurs dans le but d'identifier le stade de développement le plus adéquat pour la réalisation des croisements. Notre hypothèse est qu'il n'existe pas de phase mâle et femelle ni chez *S. chilense*, ni chez *S. lycopersicum*, ni chez les hybrides. La viabilité pollinique ainsi que la réceptivité stigmatique sont également évaluées dans cet objectif. Le second objectif est d'évaluer les croisements entre différentes plantes de *S. chilense* et de *S. lycopersicum*, ainsi que les causes de l'incompatibilité lors de l'échec des croisements. Pour ce faire, les allèles d'auto-incompatibilité de *S. chilense* seront identifiés et l'expression des gènes connus comme étant impliqués dans l'incompatibilité interspécifique sera évaluée. Le dernier objectif a pour but de déterminer si les hybrides de *S. chilense* et *S. lycopersicum* sont capables de se croiser et s'ils présentent une auto-incompatibilité gamétophytique.

## Synthèse bibliographique

---

### La tomate

#### **Généralités sur la tomate**

La tomate cultivée, *Solanum lycopersicum*, est originaire d'Amérique du Sud et a été importée en Europe au XVI<sup>e</sup> siècle en tant que plante ornementale. Au XVII<sup>e</sup> siècle, elle a gagné en popularité en tant que culture maraichère et sa popularité s'est rapidement accrue en Europe (Mazzucato et al., 2010). Aujourd'hui, la tomate est considérée comme l'une des cultures maraichères les plus lucratives au monde et est la seconde culture légumière la plus cultivée sur Terre après la pomme de terre (Fernandes et al., 2018). En 2019, 180 millions de tonnes de tomates ont été produites mondialement sur 5 millions d'hectares répartis à travers le globe (FAOSTAT, 2021). Les plus grands pays producteurs de tomate sont la Chine, l'Inde, la Turquie, les Etats-Unis, l'Égypte, l'Iran et l'Italie (Kashyap et al., 2021).

La domestication puis, plus tard, l'introduction en Europe de la tomate a engendré un goulot d'étranglement génétique de l'espèce, les formes cultivées ayant alors une base génétique plus étroite que celle des espèces sauvages (Faraone et al., 2021). Cependant, la tomate cultivée présente beaucoup plus de tailles et de formes de fruits différentes par rapport aux espèces sauvages. Depuis les années 1930, des gènes de résistance aux stress biotiques provenant des espèces sauvages de tomate ont été introgressés chez la tomate cultivée afin d'élargir la diversité génétique des variétés modernes par rapport aux variétés anciennes (Verlaan et al., 2011). Au même moment, des variétés furent développées pour le marché du frais et dans les années 1960, des tomates spécifiques pouvant être récoltées mécaniquement furent développées (Sim et al., 2011). Ces différentes spécialisations ont engendré des différenciations génétiques dans les variétés de tomates contemporaines (Sim et al., 2011). Parallèlement, la tomate a acquis une nouvelle popularité ces dernières années via la découverte des propriétés anti-oxydantes et anti-cancéreuses d'un de ses composants, le lycopène (Gerszberg et al., 2015). Elle est également une très bonne source de métabolites secondaires tels que des caroténoïdes ou des composés phénoliques (Faraone et al., 2021). La tomate peut être vendue non seulement fraîche, mais également en soupe, en sauce, en jus, ou en concentré en poudre (Gerszberg et al., 2015).

La tomate est également un organisme modèle en biologie étant donné qu'elle offre, entre autres, plusieurs avantages. Son génome a été entièrement séquencé et est relativement petit (950 Mb), elle peut pousser sous différentes conditions de culture, son cycle de vie est assez

court, elle est auto-compatible, elle produit beaucoup de graines, une grande variété de mutants est disponible, etc (Gerszberg et al., 2015).

*Solanum lycopersicum* fait partie de la famille des Solanacées, du genre *Solanum* et plus particulièrement d'un clade appelé *Lycopersicon* comprenant 12 autres espèces de tomates sauvages. Ce groupe inclut des espèces telles que *Solanum chilense* ou *Solanum pimpinellifolium*, qui serait l'ancêtre sauvage le plus proche de la tomate cultivée (Gao et al., 2014, Gerszberg et al., 2015). Bien qu'elle soit à l'origine une plante tropicale, la tomate peut actuellement être cultivée pratiquement n'importe où sur Terre, excepté aux endroits où les températures sont très basses. Cependant, la tomate cultivée est sensible à plusieurs stress abiotiques dont le stress salin et pourrait être améliorée via l'utilisation de gènes de résistance présents chez les tomates sauvages, notamment chez *S. chilense* (Kashyap et al., 2021).

### ***Solanum lycopersicum* L.**

*Solanum lycopersicum* est originaire de la région des Andes, c'est une plante herbacée vivace. Les cultivars ayant une croissance déterminée peuvent atteindre 2 m de haut et ont un port érigé et buissonnant avec une période de floraison et de fructification restreinte. Les cultivars ayant une croissance indéterminée peuvent atteindre 10 m de hauteur en un an dans des conditions de serres et fleurissent régulièrement et de manière uniforme (Picken et al., 1986). Les plantes ayant une croissance indéterminée ne montrent pas de limite prédéterminée dans leur croissance, qui continue tant que les ressources de la plante le permettent. Les plantes ayant une croissance déterminée développent quant à elles un nombre prédéfini de feuilles et de fleurs sur une période fixée (Taiz et Zeiger, 2010). Leur croissance est ensuite interrompue par la production de deux inflorescences consécutives sur l'axe principal (Kwak et al., 2010).

*Solanum lycopersicum* a une croissance sympodiale, la tige végétative principale produit une inflorescence après le développement de 8 à 12 feuilles, ce premier segment est appelé segment initial. Une nouvelle tige végétative se développe ensuite à partir du bourgeon axillaire de la dernière feuille formée juste en-dessous de l'inflorescence terminale et développe une inflorescence après avoir produit généralement trois feuilles. La croissance de ce segment, appelé segment sympodial, reprend la croissance en hauteur de la tige en rejetant la première inflorescence sur le côté. Un nouveau segment sympodial se développe alors à partir du bourgeon axillaire de la dernière feuille formée et le cycle continue (Fig. 1) (Kimura et Sinha, 2008, Quinet et Kinet, 2007).

Fig. 1 : Croissance sympodiale de *Solanum lycopersicum*. Le segment en noir représente le segment initial du méristème apical, les segments en blanc et gris représentent les segments sympodiaux initiés par les méristèmes sympodiaux (Quinet et Kinet, 2007).

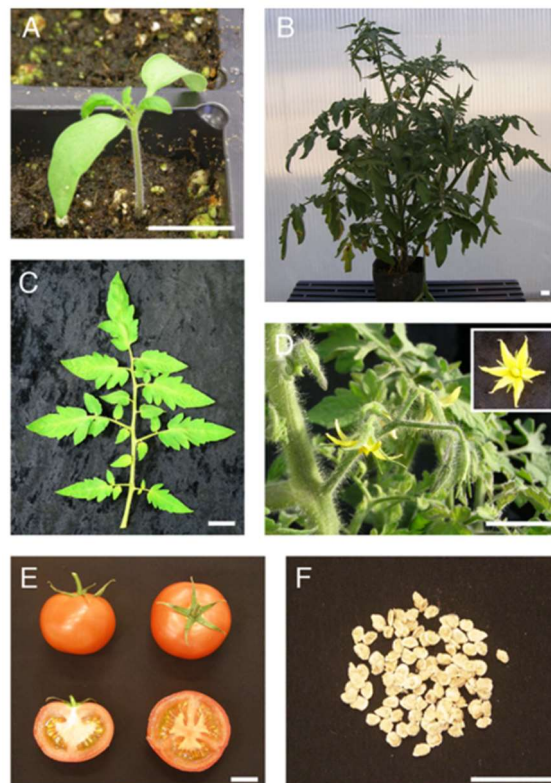


Les feuilles de la tomate sont composées unipennées et ont des morphologies parfois différentes en fonction des cultivars (Fig. 2C) (Kimura et Sinha, 2008, Picken et al., 1986). Les feuilles des variétés utilisées en serre font généralement 50 cm de long pour un peu moins de 50 cm de large, possèdent une grande foliole terminale ainsi que jusqu'à 8 folioles latérales qui peuvent elle-même être composées (Picken et al., 1986).

Les inflorescences de la tomate sont des racèmes (Fig. 2D). Les primordia sont situés en deux rangées disposées en angle droit et les primordia les plus vieux se trouvent à la base et disposés alternativement dans les rangées. Les fleurs sont hermaphrodites et actinomorphes (Quinet et Kinet, 2007). Le nombre d'organes floraux peut varier en fonction des génotypes (Atherton et Harris, 1986). On retrouve généralement cinq à six sépales fusionnés formant un court tube, une corolle de cinq à six pétales formant également un court tube, un verticille de cinq à six étamines attachées à la corolle via des filaments supportant des anthères allongées qui sont

fusionnées latéralement pour former un cône, un gynécée central composé de deux carpelles ou plus ayant un long style terminé par un stigmate plat enfermé dans l'androcée qui l'entoure (Quinet et Kinet, 2007). Les fleurs passent de jaune-vert à jaune profond à l'anthèse et les pétales s'ouvrent pour exposer le cône d'anthère (Atherton et Harris, 1986). Les fruits sont variables en forme et en taille, ils peuvent atteindre plus de 10 cm de diamètre et peser jusqu'à 500g (Fig 2E). Ils sont composés de chair faite des parois du péricarpe et de la peau ainsi que d'une pulpe faite de placenta et de tissus loculaires (Ho et Hewitt, 1986). La couleur est également un trait variant avec les variétés, allant de vert à rouge en passant par orange et jaune (Kimura et Sinha, 2008).

*Fig. 2 : Plantes et parties de Solanum lycopersicum. A : Plantule de Solanum lycopersicum. B : Plante entière de 40 jours. C : Feuille. D : inflorescence et fleur. E : Fruits. F : Graines. Echelle = 2cm (Kimura et Sinha, 2008).*



La tomate cultivée est une plante auto-compatible et autogame, ce qui la rend particulièrement intéressante en tant que culture mais également en tant qu'organisme modèle en biologie (Gao et al. 2014, Gerszberg et al., 2015).

### ***Solanum chilense* Dun.**

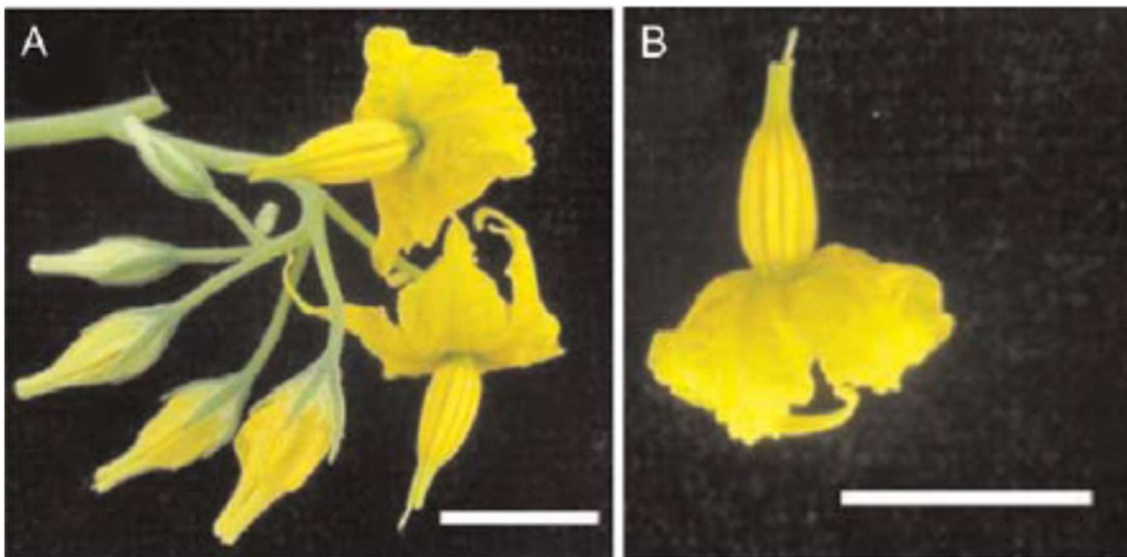
*Solanum chilense* est une espèce de tomate sauvage de la famille des Solanacées. Elle est trouvée en Amérique du Sud, dans les canyons volcaniques profonds des Andes, ainsi que sur les côtes chiliennes longeant l'océan Pacifique (Raduski et Igić, 2021). Son aire de répartition s'étend du Pérou au Chili et son aire d'altitude varie entre 0 et 3500 m (Chetelat et al. 2008). Raduski et Igić (2021) ont séparé deux groupes de populations de *S. chilense* en se basant sur des analyses génétiques. Le premier groupe comprend les populations côtières du Chili retrouvées dans de larges canyons en dessous de collines capturant la brume. Ces populations sont trouvées entre 0 et 1000 m d'altitude et sur 600 km dans le nord du Chili. Les plantes de ces populations ont généralement un port plus tombant et sont plus petites que celles des populations du second groupe. Le second groupe comporte les populations situées à l'intérieur des terres, trouvées le long des pentes occidentales de la cordillère des Andes, entre 800 et 3600 m d'altitude. Ces populations s'étendent du nord du Chili au sud du Pérou et occupent des pentes ouvertes ainsi que canyons andins. Elles forment souvent des peuplements plus denses et les plantes sont généralement plus grandes que celles du premier groupe (Raduski et Igić, 2021). Il est cependant important de préciser que d'après Blondel et al. (2015), les populations de *S. chilense* seraient plutôt séparées génétiquement en quatre groupes distincts, dont un étant génétiquement plus éloigné que les trois autres (Blondel et al., 2015). Ce groupe génétiquement plus éloigné de Blondel et al. (2015) correspond au premier groupe décrit par Raduski et Igić (2021) tandis que les trois autres groupes identifiés par Blondel et al. (2015) sont rassemblés au sein d'un même groupe par Raduski et Igić (2021). Cette différence est sans doute due aux marqueurs génétiques différents utilisés dans les deux études. Cet exemple illustre le fait que la séparation en différents groupes de l'espèce n'est pas unanime et que différentes visions peuvent être rencontrées quant au regroupement de populations au sein de l'espèce de *S. chilense* (Blondel et al., 2015, Raduski et Igić, 2021).

L'aire d'altitude large de *S. chilense* implique potentiellement une résistance aux basses températures de la part de la plante (Nosenko et al., 2016). Elle est également résistante au stress hydrique (Tapia et al., 2016) et survit dans des endroits très secs tels que la base de roches dans des falaises ou des crevasses rocheuses. *Solanum chilense* est également résistante au stress salin (Gharbi et al., 2016, Gharbi et al., 2017a, Gharbi et al., 2017b, Martinez et al., 2012, Martinez et al., 2020) et peut être retrouvée proche de dépôts de sel épais de plusieurs centimètres (Chetelat et al., 2009).

*Solanum chilense* atteint une hauteur comprise entre 0.5 et 1.5 m et possède une croissance sympodiale (Raduski et Igić, 2021). Les feuilles sont pétiolées et deux fois pennatifformes, les pédoncules sont longs (Rick et Lamm, 1955). Le système racinaire est développé et s'enfonce fortement dans le sol (Moyle, 2008).

Les inflorescences de *S. chilense* comptent 10 à 12 fleurs (Fig. 3). Chaque fleur possède un calice de cinq sépales, une corolle de cinq pétales, un cône jaune de cinq anthères et un pistil long dépassant du cône. Les grains de pollen sont arrondis, tricolpés et d'un diamètre d'environ 13  $\mu\text{m}$  (Gao et al., 2014). Ces grains sont libérés via des fentes longitudinales à l'intérieur du cône de l'anthère (Chetelat et al., 2008). Les fleurs passent d'une couleur vert clair à jaune avant l'anthèse (Gao et al., 2014). Les fruits sont verts-blancs, parfois rayés de mauve et portants des trichomes à la surface. Ils mesurent entre 1 et 1,5 cm de diamètre (Moyle, 2008).

Fig. 3 : Inflorescence (A) et fleur (B) de *Solanum chilense* (Gao et al., 2015) (Barre d'échelle = 1cm).



Les fleurs sont hermaphrodites et auto-incompatibles (Cheletat et al., 2009). Leur auto-incompatibilité est gamétophytique et permet donc d'éviter l'autopollinisation par le biais d'un mécanisme de reconnaissance et de rejet du pollen (Igić et al., 2009).

*Solanum chilense* possède plusieurs gènes de résistance aux stress biotiques qui peuvent participer à l'amélioration végétale de la tomate cultivée. Cela a notamment été le cas lors de l'introggression de gènes présents chez *S. chilense* et résistants aux begomovirus, causant la maladie des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (Tomato yellow leaf curl disease) chez la tomate cultivée (Verlaan et al., 2011). Le taux de résistance élevé à certains stress abiotiques

de la part de *S. chilense* pourrait également être utilisé dans l'amélioration végétale de la tomate cultivée (Gharbi et al., 2017a, Gharbi et al., 2017b, Kashyap et al., 2020).

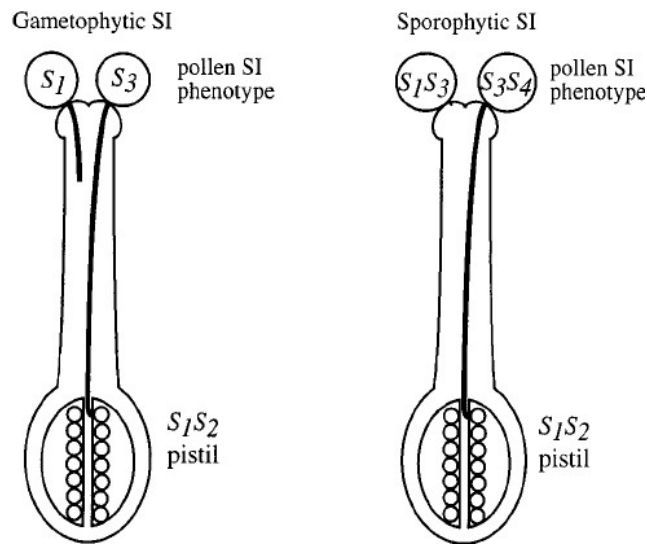
## L'auto-compatibilité et l'auto-incompatibilité

### **Généralités sur l'auto-incompatibilité**

L'auto-incompatibilité est un mécanisme présent chez les angiospermes qui empêche l'autofécondation des fleurs. Ce mécanisme sert donc à maintenir la diversité génétique de l'espèce en évitant la consanguinité (Fujii et al., 2016, Takayama et Isogai 2005). Il est en effet supposé que l'auto-compatibilité et la consanguinité chez des espèces engendre un plus grand taux d'extinction de celles-ci et sont parfois vues comme des culs-de-sac évolutifs (Fujii et al., 2016). La réponse d'auto-incompatibilité (AI) est composée d'un mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi entre le pollen et le pistil. Il est suivi par une inhibition du développement du tube pollinique lorsque le pollen provient du « soi ». Chez la plupart des espèces, la reconnaissance du soi ou du non-soi est contrôlée par un locus appelé le S-locus qui exhibe de multiples S-haplotypes (Takayama et Isogai, 2005). Chaque S-haploïtype comporte des déterminants spécifiques mâle et femelle appelés S-déterminants, la discrimination du soi ou du non-soi est réalisée grâce à ces S-déterminants (Fujii et al., 2016).

Il existe deux grands types d'auto-incompatibilité chez les angiospermes : l'auto-incompatibilité gamétophytique, notamment présente chez les Solanacées et l'auto-incompatibilité sporophytique, notamment présente chez les Brassicacées. Dans l'auto-incompatibilité gamétophytique, le pollen haploïde détermine la S-spécificité, le rejet du pollen est le résultat d'une absence d'interaction moléculaire et la reconnaissance du pollen non-soi permet la fécondation. Dans l'auto-incompatibilité sporophytique, le génotype du tissu diploïde donneur détermine la S-spécificité du pollen, les interactions alléliques sont donc très importantes dans ce type d'auto-incompatibilité. Le rejet est alors le résultat d'une interaction entre les déterminants mâle et femelle (Fig. 4) (Fujii et al., 2016).

Fig. 4 : Schéma comparatif de l'auto-incompatibilité gamétophytique et sporophytique (McCubbin et Kao, 2000)



Chez les Brassicacées, l'auto-incompatibilité sporophytique fonctionne comme suit. Deux gènes de S-déterminants sont fortement liés et hautement polymorphiques : le S-déterminant mâle est appelé Protéine S-locus 11 (SP11) ou Protéine S-locus riche en cystéine (SCR) et est un petit peptide se trouvant dans le manteau du pollen, le S-déterminant femelle est appelé S-locus Receptor Kinase (SRK) et est un récepteur kinase qui se situe dans la membrane plasmique des cellules papillaires du stigmate. L'interaction moléculaire directe entre SP11/SCR et SRK provenant d'un même haplotype engendre une réponse d'auto-incompatibilité dans le stigmate qui mène au rejet du pollen (Fujii et al., 2016).

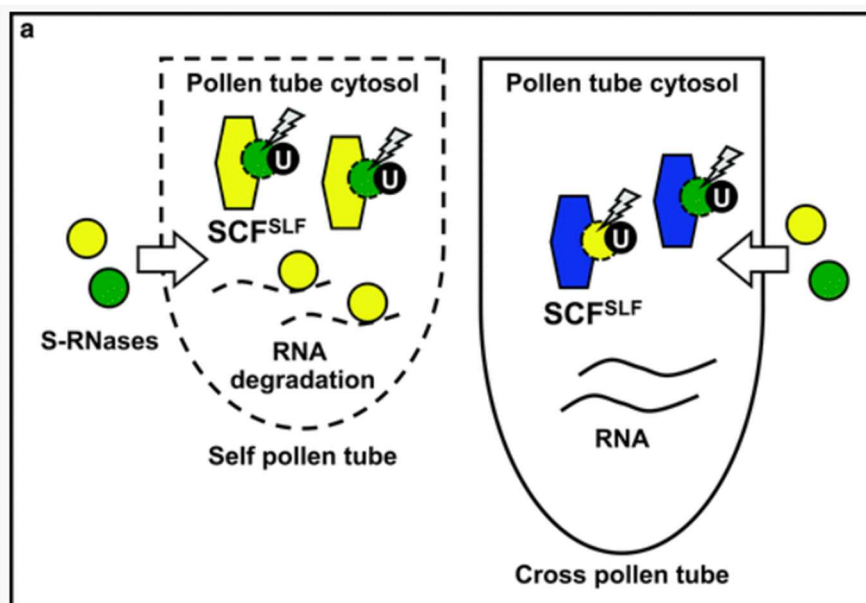
Chez les Solanacées, le déterminant femelle est une glycoprotéine S-RNase qui est présente abondamment dans le tissu du style. Le déterminant mâle est une protéine F-box appelée S-locus F-box (SLF) et qui est comprise dans un complexe E3 ubiquitine ligase appelé SCF. Le rejet du pollen s'effectue via la S-RNase qui entre dans le tube pollinique et inhibe la croissance du tube via son activité de ribonucléase cytotoxique si le pollen montre le même S-haplotype que la S-RNase (Fujii et al., 2016).

### L'auto-incompatibilité gamétophytique

Comme précisé précédemment, les Solanacées suivent un mécanisme d'auto-incompatibilité gamétophytique. Sous le modèle « collaborative non-self recognition », il est supposé que le S-déterminant mâle est constitué de multiples gènes. Chez les *Petunia* auto-incompatibles, entre 16 et 20 gènes ont été recensés comme étant liés aux S-RNases (Fujii et al., 2016), chez *Solanum pennellii*, 23 gènes ayant une fonction similaire ont été retrouvés, dont 19 sont également

représentés dans le génome de *S. lycopersicum* (Li et Chetelat, 2015). Ceci implique que chaque protéine SLF interagit avec une ou plusieurs S-RNases ayant un autre haplotype que la protéine SLF (Fujii et al., 2016). Cette interaction permet la détoxification de la S-RNase, le complexe SLF/SCF cible les protéines et les ubiquitine, elles vont ensuite être dégradées par le protéasome. L'interaction se fait comme suit. Les S-RNases possèdent cinq régions hautement conservées et deux domaines hypervariables chez les Solanacées, le complexe SLF/SCF contient également deux domaines ; l'un fixe le domaine hypervariable des S-RNases de façon spécifique au S-haplotype et l'autre fixe un domaine commun à toutes les S-RNases. La fixation de manière spécifique au S-haplotype mènerait à la poly-ubiquitination et la dégradation de la S-RNase fixée (Takayama et Isogai, 2005). La polyvalence des protéines SLF leur permettent donc d'ubiquitiner des S-RNases possédants différents S-haplotypes. Cependant, il a été mis en évidence que chaque S-haplotype ne porte pas de copie d'un SLF capable de reconnaître une S-RNase provenant du même S-haplotype(Fujii et al., 2016). Ceci implique donc que lorsqu'une S-RNase entre dans un grain de pollen possédant le même S-haplotype que l'un des deux S-haplotype du style, elle n'est pas fixée dans le complexe SLF/SCF, son activité ribonucléase engendrera alors un arrêt du tube pollinique dans le style (Fig 5), (Fujii et al., 2016).

Fig 5 : Modèle d'auto-incompatibilité gamétophytique chez les Solanacées. A gauche, les mêmes S-haplotypes sont représentées en jaune, la S-RNase jaune peut donc effectuer son activité ribonucléase. La S-RNase d'un S-haplotype différent (en vert) est ubiquitinée (représentée par la lettre U) par le complexe SLF/SCF. A droite, les deux S-RNases (vert et jaunes) sont d'un S-haplotype différent de celui du complexe SLF/SCF (bleu) et sont donc ubiquitinées (Kaathien-Nakayama et al., 2010).



Il est également supposé que des gènes modificateurs (« modifier genes », MGs) sont également impliqués dans la réponse d'auto-incompatibilité. Du côté du pistil, plusieurs gènes modificateurs ont été identifiés, notamment les protéines HT qui sont des glycoprotéines de 120 kDa ainsi qu'un inhibiteur de protéase NaStep. Ces gènes modificateurs sont directement impliqués dans le rejet du pollen S-spécifique. Du côté du pollen, les gènes modificateurs du complexe SLF/SCF incluent les gènes codants pour l'homologue de Skp1, Cullin1 et/ou certaines protéines faisant la liaison avec les S-RNases (Tovar-Mendez et al., 2014). Le rôle des gènes modificateurs serait de réguler l'expression des gènes du S-locus ou de participer à la signalisation de la réponse d'auto-incompatibilité (Liao et al., 2020, Nasrallah, 2017).

### **Incompatibilité chez les espèces de tomates**

Dans le clade des tomates, l'auto-incompatibilité a été perdue chez plusieurs espèces, notamment chez *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. galapagense* et *S. cheesmaniae*, qui sont strictement auto-compatibles (Bedinger et al., 2011). Cette perte d'auto-incompatibilité est associée à des mutations de *HT-A*, *HT-B* et/ou des gènes *S-RNases*, selon les espèces (Tovar-Mendez et al., 2014).

En général, une acquisition d'auto-compatibilité (AC) peut arriver selon deux possibilités. Premièrement, et comme cela a été le cas chez les espèces de tomates citées précédemment, une mutation entraîne la perte de fonction des gènes des S-RNases ce qui résulte en un S-haplotype qui acceptera n'importe quel pollen dans la population de l'individu, même le sien. Par ailleurs, une mutation peut entraîner le gain de reconnaissance de soi, c'est-à-dire la reconnaissance par les SLF des S-RNases du même haplotype. Dans ce dernier cas, même si l'auto-compatibilité est fixée dans la population, l'auto-incompatibilité peut à nouveau survenir si une mutation entraînant la perte de connaissance du soi surgit ou encore si une mutation touche les S-RNases de façon qu'elles ne puissent plus être reconnues par les SLF du même S-haplotype (Fujii et al., 2016).

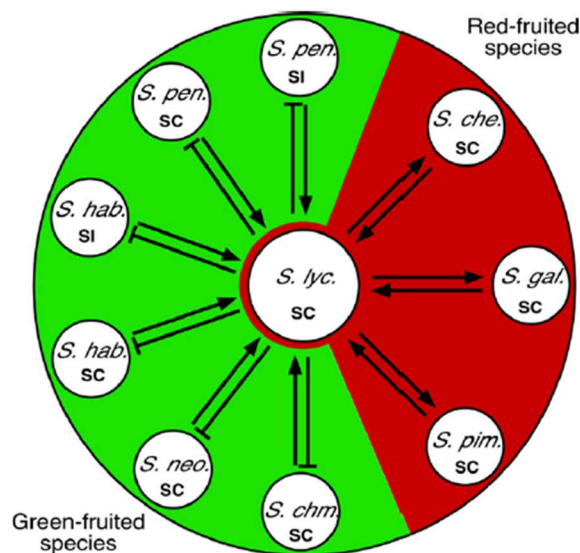
Certaines espèces du clade des tomates sont strictement auto-incompatibles, c'est notamment le cas de *S. chilense* (Bedinger et al., 2011). Dans le clade, il existe également des espèces qui sont auto-incompatibles de manière prédominante mais dont certaines populations sont auto-compatibles. C'est le cas pour *S. pennelli*, *S. peruvianum* et *S. habrochaites* (Bedinger et al., 2011).

Au niveau de la diversité des S-haplotypes chez le clade des *Lycopersicon*, 34 allèles de S-RNases ont été trouvés chez *S. chilense* (Iglıc et al., 2007).

### Compatibilité interspécifique chez les tomates

En plus de l'auto-incompatibilité, le clade des tomates possède également une barrière de reproduction interspécifique appelée l'incompatibilité unilatérale (IU) (Qin et Chetelat, 2021). L'incompatibilité unilatérale est une barrière de reproduction dans laquelle le pollen d'une espèce est rejeté du pistil d'une autre espèce tandis que le croisement contraire est accepté. L'incompatibilité unilatérale suit généralement la règle SI x SC (en français AI x AC). Cette règle stipule qu'une femelle d'une espèce AI rejettera unilatéralement le pollen d'une espèce AC (Fujii et al., 2016). Dans le clade des tomates, les espèces dites « à fruits rouges », qui sont auto-compatibles et n'ont pas de S-RNases ou de protéines HT fonctionnelles, acceptent le pollen des espèces dites « à fruits verts », qui sont auto-incompatibles et dont les S-RNases et protéines HT sont fonctionnelles (Fig 6) (Tovar-Mendez et al., 2014).

Fig. 6: Compatibilité entre espèces du groupe *Lycopersicon*. Les espèces en rouge sont les espèces à fruits rouges et les espèces en vert sont les espèces à fruits verts. Les flèches signifient un croisement compatible tandis que les lignes barrées indiquent un croisement incompatible (Tovar-Mendez et al., 2014).



Etant donné l'implication unilatérale de l'auto-incompatibilité, il a été supposé que celle-ci entre en jeu dans l'incompatibilité unilatérale (Tovar-Mendez et al., 2014). En effet, certains gènes impliqués dans le complexe SLF/SCF, tels que *CUL1* (un composant central d'un complexe ubiquitine ligase du SCF) ou *SpSLF-23* (un gène *SLF* chez *S. pennelli*) sont soit présents à l'état de pseudogène soit inexistant chez *S. lycopersicum* (Fujii et al., 2016). Par ailleurs, des mécanismes de rejet de pollen impliquant des S-RNases ont également été découverts dans le cadre de l'incompatibilité unilatérale (Chalivendra et al., 2013). En effet, Tovar-Mendez et al. (2014) ont mis en évidence que l'introduction de gènes *S-RNases* et *HT* fonctionnels chez *S. lycopersicum* engendrait une incompatibilité unilatérale entre *S. lycopersicum* et les autres espèces à fruits rouges (Tovar-Mendez et al., 2014). L'incompatibilité unilatérale dépendante des S-RNases fonctionnerait donc d'une manière similaire à l'auto-incompatibilité gamétophytique en rejetant le pollen n'ayant pas les protéines nécessaires à la résistance contre les S-RNases (Qin et Chetelat, 2021).

Il est cependant important de souligner que certains croisements interspécifiques ne nécessitent pas de S-RNases fonctionnelles. En effet, la souche LA0716 de *S. pennelli* ne possède pas de S-RNases mais est tout de même capable de rejeter le pollen de *S. lycopersicum* (Fujii et al., 2016). Ceci impliquerait donc l'existence d'une voie d'incompatibilité unilatérale indépendante des S-RNases (Tovar-Mendez et al., 2014). En effet, du côté du pistil, trois QTLs (« Quantitative Trait Loci » ou Loci de Caractère Quantitatifs) ont été identifiés comme contrôlant la force de rejet du pollen dans le cadre de l'incompatibilité unilatérale (Tovar-Mendez et al., 2014). Ces QTLs agiraient de concert pour rejeter le pollen. Les protéines HT-A et HT-B sont également impliqués dans les mécanismes de rejet du pollen dépendants et indépendants des S-RNases dans le cadre de l'IU et ont été identifiées comme étant un des trois QTLs précités. Du côté du pollen, des loci ont également été découverts comme ayant un rôle central dans l'IU. Les loci codant pour une suite de protéines SLF ainsi que la protéine Cullin1 agissent dans un mécanisme d'IU dépendant des S-RNases tandis qu'un gène codant pour la Farnesyl Pyrophosphate Synthase (*FPS2*) agit dans une voie d'IU indépendante des S-RNases (Tovar-Mendez et al., 2014). Qin et Chetelat (2021) ont isolé le groupe de gènes responsable côté pistil de la sélectivité pollinique de *FPS2* dans l'IU. Ces gènes codent pour l'ornithine décarboxylase et sont appelés *ODC2* et ont été précédemment cartographiés comme étant des QTLs impliqués dans l'IU. Quatre gènes *ODC2* sont présents chez *S. pennellii* tandis qu'un seul gène *ODC2* est retrouvé chez *S. lycopersicum* (Qin et Chetelat, 2021). Le produit de ces gènes, l'ornithine décarboxylase, est une enzyme intervenant dans le métabolisme des polyamines et

est supposé avoir un rôle dans le mécanisme de rejet du pollen indépendant des S-RNases. Les gènes *ODC2* interagissent également avec les loci codants pour les protéines HT-A et HT-B, ce qui suggère que le mécanisme de rejet du pollen dépendant de *ODC2* pourrait se chevaucher avec les mécanismes d'auto-incompatibilité (Qin et Chetelat, 2021). La présence des gènes *HT* et *ODC2* n'a pas encore été étudiée chez *S. chilense*.

## Matériel et méthodes

---

### Matériel végétal et conditions de culture

Trois espèces végétales ont été utilisées dans cette étude : la tomate cultivée (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, TGRC, accession LA2838A), l'espèce parente halophyte *S. chilense* (TGRC, accession LA4107), ainsi que des hybrides résultants de croisements manuels entre des plantes femelles de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig et une même plante mâle de *S. chilense* (appelée SC2). Les graines de *S. chilense* et *S. lycopersicum* ont été fournies par le TGRC (Tomato Genetics Ressource Center, UC Davis, USA) et multipliées au laboratoire.

Dans la suite de ce travail, ces trois groupes de plantes seront mentionnées comme trois génotypes par souci de facilité.

Les plantes ont été cultivées en serres à Louvain-la-Neuve à une température moyenne de 23.5°C le jour et 20.4°C la nuit et à une humidité relative de 63% en moyenne.

### Mesures de la phénologie des fleurs et de leur fertilité

La durée de vie des fleurs de *S. chilense*, *S. lycopersicum* et des hybrides et leur phénologie a été suivie du stade 15 de Brukhin à la fin de l'anthèse (Brukhin, 2003). Pour ce faire, cinq fleurs par génotype ont été sélectionnées et ont été photographiées tous les jours, jusqu'à la sénescence des fleurs.

Par ailleurs, la période de fertilité femelle et mâle des fleurs de *S. chilense*, *S. lycopersicum* et des hybrides, a été évaluée respectivement pour l'analyse de la réceptivité stigmatique et la viabilité pollinique.

La réceptivité stigmatique a été détectée pour les trois génotypes (SC2 pour *S. chilense* et *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig et les hybrides) deux jours avant l'anthèse et lors de l'anthèse en testant l'activité peroxydase à la surface du stigmate en suivant la méthode de Dafni et Maués (1998). Dix fleurs ont été récoltées par stade de développement et génotype. Les stigmates ont ensuite été disséqués et immergés durant 5 minutes dans la solution décrite au tableau 1. La coloration rouge-brune s'étant développée à la surface du stigmate indique que le stigmate est réceptif et lui confère un score de 1 tandis que l'absence de coloration indique que le stigmate n'est pas réceptif et lui confère un score de 0.

Tableau 1 : Composition du tampon acétate pour la réceptivité stigmatique.

Réactifs	Concentrations
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	112,2 mM
<b>3-amino-9-éthylcarbazole</b>	2,3 mM
<b>N-N-diméthylformamide</b>	4% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	3% (v/v)

La viabilité pollinique a également été mesurée sur deux étamines par fleur et dix fleurs par stade de développement et génotype. La viabilité pollinique a été évaluée en utilisant du colorant d'Alexander (Tableau 2). Chaque étamine a été écrasée sur une lame de microscopie pour en faire sortir le pollen et 10 µL de colorant d'Alexander ont été rajoutés avant observation au microscope. Le pollen était considéré comme viable lorsqu'il présentait une coloration rouge tandis qu'il était considéré non-viable lorsqu'il présentait une coloration bleue. Un minimum de cent grains de pollen par anthère a été compté et le rapport entre les grains de pollen viables et non viables a été calculé.

Tableau 2 : Composition du colorant d'Alexander pour 100mL de solution (Alexander, 1969).

Réactifs	Quantité
<b>Alcool 95%</b>	10 ml
<b>Vert de malachite</b>	10 ml
<b>Eau distillée</b>	50 ml
<b>Glycérol</b>	25 ml
<b>Phénol</b>	5 ml
<b>Chloral hydraté</b>	5 mg
<b>Acide fuschine</b>	50 mg
<b>Orange G</b>	5 mg

### Croisements

Trois types de croisements ont été réalisés :

1) *S. chilense* x *S. chilense*. Pour tester la compatibilité entre plantes et attester des différences dans les S-haplotypes au sein de la population de plantes de *S. chilense*, des croisements entre onze plantes de *S. chilense* ont tout d'abord été réalisés. Les fleurs en anthèse d'une plante de *S. chilense* ont été pollinisées manuellement à l'aide du pollen d'une autre plante de *S. chilense*.

Les autres fleurs de l'inflorescence pollinisée qui n'étaient pas en anthèse au moment de la pollinisation ont été retirées. Au total, vingt fleurs ont été pollinisées par croisement et 19 croisements ont été effectués.

2) croisements interspécifiques : Afin d'évaluer la compatibilité interspécifique, des croisements entre des plantes de *S. chilense* et *S. lycopersicum* (*S. chilense* femelle et *S. lycopersicum* mâle et vice-versa) ont été réalisés. Pour les croisements entre *S. chilense* et *S. lycopersicum*, entre 5 et 20 fleurs en anthèse par type de croisements ont été pollinisées tandis que pour les croisements avec les hybrides, entre 2 et 6 fleurs en anthèse par type de croisement ont été pollinisées. Lors des croisements entre *S. lycopersicum* femelle et *S. chilense* mâle ainsi que *S. lycopersicum* femelle et hybride mâle, les fleurs de *S. lycopersicum* ont été émasculées au stade 15 de Brückhin (2003). Comme mentionné précédemment les fleurs non pollinisées restant sur l'inflorescence ont été retirées.

3) hybride x hybride : Pour tester s'il existe de l'auto-incompatibilité chez les hybrides, des pollinisations croisées ont été réalisées entre plantes hybrides à raison de 8 à 16 fleurs en anthèse par type de croisement. Comme mentionné précédemment les fleurs non pollinisées restant sur l'inflorescence ont été retirées.

Le succès des différents croisements a été évalué par le nombre de fruits produits afin de calculer le taux de mise à fruit (pourcentage du nombre de fruits par nombre de fleurs pollinisées pour chaque croisement). Pour chaque fruit obtenu, le nombre de graines par fruit a également été compté.

### Identification des S-RNases

Afin d'identifier les S-haplotypes (allèles de S-RNases) dans la population de *S. chilense* disponible au laboratoire, les pistils d'environ trente à cinquante fleurs d'une même plante (pour un total de 6 plantes) ont été récoltés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C. L'ARN a été extrait grâce au RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Strasse 1, 40724 Hilden, Germany). Les pistils ont été broyés plante par plante à l'azote liquide et chaque broyat a été transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL auquel 450 µL de tampon RLT ont été ajoutés pour lyser les cellules. Après mélange au vortex, le lysat de chaque tube a été transféré dans une colonne QIAshredder, elle-même placée dans un tube de collection de 2 mL et centrifugé pendant 2 minutes à 14 000 RPM. L'éluat a été transféré dans un nouveau tube de centrifugation auquel 225 µL d'éthanol 96 % ont été ajoutés et mélangés par pipetage. L'échantillon a été directement transféré dans une colonne placée dans un tube de collection de 2 mL. Après centrifugation (15 secondes, 10

000 RPM), l'éluat a été éliminé et 700 µL de tampon RW1 ont été ajoutés à la colonne qui a été à nouveau centrifugée (15 secondes, 10 000 RPM). Après élimination de l'éluat, 500 µL de tampon RPE ont été ajoutés à la colonne afin de laver l'ARN, qui a été centrifugée pendant 15 secondes à 10 000 RPM. Un second lavage avec 500 µL de tampon RPE a été réalisé mais la centrifugation a duré cette fois 2 minutes. La colonne a ensuite été placée dans un nouveau tube de collection et a été centrifugée 1 minute à 10 000 RPM afin de sécher la membrane. Après transfert dans un nouveau tube de collection et ajout de 30 µL d'eau RNase-free, la colonne a été centrifugée (1 minute, 10 000 RPM) afin d'éluer l'ARN. L'opération a été répétée sur la même colonne avec 20 µL d'eau RNase-free.

Les concentrations d'ARN obtenues pour chaque échantillon ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

Chaque échantillon d'ARN a été rétrotranscrit en cDNA par deux méthodes : via la méthode RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) et via la méthode oligo-dT. La méthode oligo-dT consiste en l'utilisation d'un primer possédant une queue poly(T) se liant à la queue poly(A) des ARN messagers. C'est une méthode peu spécifique qui a été utilisée afin de rétrotranscrire tous les ARN messagers. La méthode RACE consiste ici en l'utilisation d'un primer appelé RaceA composé d'une queue poly(T) et d'une séquence connue (Tableau 3). La queue poly(T) se lie avec la queue poly(A) des ARN messagers qui sont rétrotranscrits en cDNA et possèdent alors une séquence terminale connue. Un second primer, appelé RaceB (Tableau 3), est complémentaire à la séquence connue de RaceA et vient donc s'y lier. Parallèlement, un troisième primer, ici PR1 (Tableau 3), est utilisé afin de se lier avec les séquences conservées des S-RNases. Cette méthode est donc très spécifique et a été utilisée dans le cadre du séquençage des S-RNases.

La transformation d'ARN en cDNA via la méthode RACE a été effectuée d'après Igic et al (2007) en utilisant le kit Thermofisher Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher, 168 3rd Avenue, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Le volume correspondant à 100 ng d'ARN a été dilué à de l'eau DEPC Milli-Q afin d'obtenir un volume total de 11 µL, et 2 µL de primer Race A 10µM ont été ajoutés (Tableau 3). Après incubation 5 minutes à 65°C, les échantillons ont été déposés sur glace. Après ajout du mélange décrit en tableau 4, les échantillons ont été incubés 1h à 42°C puis 15 minutes à 70°C. Par après, une amplification des cDNA a été réalisée par PCR en utilisant 2 µL de cDNA et les primers spécifiques PR1 et RaceB (Tableau 3 et mix Tableau 5) et la Go Taq (Go Taq G2 DNA Polymerase, Promega 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA). La PCR a consisté en une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à

94°C, de 35 cycles composés chacun d'une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation de 30 sec à 48°C et d'une étape d'élongation de 1 minute à 72°C, suivie par une élongation finale de 12 minutes à 72°C.

Pour la synthèse de cDNA via oligo-dT, le volume correspondant à 500 ng d'ARN a été ajouté au mix détaillé au tableau 6 et à de l'eau Milli-Q DEPC afin d'obtenir 12 µL en utilisant le kit Thermofisher Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Les échantillons ont été placés à 65°C pendant 5 minutes et après ajout de l'enzyme, les échantillons ont été placés à 42°C pendant une heure puis à 70°C pendant 5 minutes. Une PCR qualitative (mix décrit au tableau 7) a ensuite été réalisée avec la GoTaq afin de vérifier les cDNA amplifiés. Elle comprenait une dénaturation initiale (94°C pendant 3 minutes), puis 35 cycles (94°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 minute) et finalement une élongation finale à 72°C pendant 12 minutes. Les cDNA obtenus via la méthode RACE et la méthode oligo-dT ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 1,8% pour vérifier la présence des produits PCR amplifiés.

Afin de séquencer les deux allèles de S-RNAses pour chaque plante, les fragments amplifiés par la méthode RACE ont été clonés et multipliés. Pour le clonage avec le kit TopoTA Cloning Kit (Invitrogen), les produits PCR amplifiés par RaceB et PR1 ont été mis en présence d'1 µL de solution saline (provenant du kit), de 2µL d'eau et de 1µL de solution contenant le vecteur pCR4-TOPO (provenant du même kit). La solution a ensuite été incubée à température ambiante pendant 5 minutes. Pour la transformation des bactéries, 2 µL de la solution ont été prélevés et ajoutés à 25µL de bactéries thermo-compétentes TOP 10F One Shot E. Coli sous flux laminaire. L'ensemble a été mélangé et a reposé 5 minutes dans la glace puis 30 secondes dans un bain marie chauffé à 42°C suivi directement d'un bain de glace avant ajout immédiat sous flux de 200 µL de milieu LB (1 % tryptone, 0,5 % yeast extract, 0,5 % NaCl, 0,75 % agar). Les bactéries ont ensuite été multipliées dans un agitateur à 150 RPM pendant une heure à 37°C. Elles ont ensuite été déposées sous flux dans des boîtes de pétri comprenant du milieu LB et 0.1 mg. mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et ayant préalablement reçu un mix de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, 80 µL 20 mg.mL<sup>-1</sup>) et d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 20 µL 200 mM) à trois concentrations différentes de solution bactérienne : 20 µL, 100 µL et 400 µL par boîte. La présence d'un gène de résistance à l'ampicilline dans le vecteur pCR4-TOPO permet seulement aux bactéries ayant intégré le plasmide de se développer sur le milieu tandis que la présence d'IPTG et d'XGal permet de révéler les bactéries contenant un plasmide avec fragment PCR. En effet, le fragment PCR est

inséré dans le gène LacZ du plasmide, le rendant non-fonctionnel. La réaction entre les bactéries possédant de tels plasmides et le X-Gal et IPTG du milieu engendrent une coloration blanche. Les bactéries présentant un gène LacZ fonctionnel montrent quant à elles une coloration bleue dans un milieu comprenant du X-Gal et IPTG (détails en Annexe S1). Après incubation 1 nuit à 37°C, 5 colonies blanches par échantillon ont été sélectionnées pour vérifier la présence du fragment PCR dans le plasmide et sa taille. Les 5 colonies blanches ont été transférées à l'aide d'un cure-dent stérile dans une nouvelle boîte de Petri contenant du milieu LB mélangé à de l'ampicilline 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> (afin de conserver une réserve de bactéries) ainsi que dans un tube PCR contenant de l'eau MILLI-Q en vue de réaliser une PCR de vérification en utilisant les primers universels T3 et T7 présents dans le plasmide de part et d'autre de l'insert (Tableau 8 pour les conditions du mix PCR, Tableau 3 pour détails des primers). Finalement, le cure-dent a été plongé dans un tube falcon contenant 4 mL de LB liquide avec ampicilline afin de multiplier la colonie en culture liquide. Les tubes falcon ont été déposés dans un incubateur à 37°C tournant à 180 RPM pendant 24h. Les conditions PCR étaient de 94°C pendant 3 min, 35 cycles de 94°C pendant 30 sec, 55°C pendant 30 sec, 72°C pendant 1 min puis finalement 72°C pendant 10 min (mix détaillé au Tableau 8). Après dépôt sur gel, les colonies contenant des plasmides avec un insert correspondant à la taille des S-RNases ont été marquées afin d'en extraire les plasmides et de les séquencer.

Les plasmides ont ensuite été extraits des bactéries grâce au kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA). Deux fois 1.5 mL de culture bactérienne ont été ajoutés à un tube et centrifugés (30 secondes, 14 000 RPM) et le surnageant a été éliminé. Ensuite, 600 µL de tampon TE ont été ajoutés au tube et la solution a été re-suspendue entièrement. Les cellules bactériennes ont été lysées par l'ajout de 100 µL de tampon Cell Lysis (mélange par inversion du tube six fois). Ensuite, 350 µL de solution neutralisante froide ont été ajoutées et mélangées en inversant le tube. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à vitesse maximale (14 000 RPM) pendant 3 minutes. Le surnageant a été transféré doucement (pour éviter le transfert du culot) dans une mini-colonne PureYield afin de fixer les plasmides dans la colonne. La mini-colonne a été placée dans un tube collecteur et centrifugée à vitesse maximale pendant 15 secondes. L'éluat a été éliminé et la mini-colonne a été remise dans le même tube collecteur. Afin de nettoyer la mini-colonne, 200 µL de tampon ERB (Endotoxin Removal Wash) ont été ajoutés à la colonne qui a été centrifugée à vitesse maximale pendant 15 secondes. 400 µL de solution CWC (Column Wash Solution) ont ensuite été ajoutés à la colonne qui a été centrifugée à vitesse maximale pendant 30 secondes. Afin d'éluer la

solution, la mini-colonne a été transférée dans un nouveau tube collecteur et 30 µL de tampon d'éluion ont été ajoutés directement sur la matrice de la mini-colonne. Une période d'une minute de pose a été respectée puis la mini-colonne a été centrifugée pendant 15 secondes afin d'éluier l'ADN plasmidique, qui a été entreposé à -20°C.

La concentration des échantillons d'ADN a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). L'équivalent de 960 ng d'ADN ont ensuite été prélevés et ajoutés à 2.5µL de primer soit forward T3 soit reverse T7 (Tableau 3) et ajustés à 15 µL avec de l'eau et envoyés à séquencer via la méthode Sanger à Microsynth (Microsynth Seqlab GmbH, Germany).

Une fois les échantillons séquencés, les fichiers contenant les séquences ont été nettoyés en repérant les primers T3, PR1, RaceA ou T7 et en retirant les séquences qui n'étaient pas comprises entre les primers. Les séquences forward et reverse ont ensuite été alignées sur BioEdit (version 7.0.5.3). Elles ont enfin été blastées sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), afin de trouver les correspondances avec les séquences des S-RNases décrites sur le site.

Tableau 3 : Description des primers utilisés pour la transformation d'ARN en cDNA, les températures d'hybridation sont toutes de 48°C (Igic et al. 2007).

<i>Nom des primers</i>	<i>Séquences (5'-3')</i>
<i>RaceA</i>	GCGCACGCGTC GACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>PR1</i>	GAATTCAYGGNYTNTGGCCNGA
<i>RaceB</i>	GCGCACGCGTCGA CTAGTAC
<i>T3</i>	GCAATTAACCCTCACTAAAGG
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG

Tableau 4 : Description du mix utilisé pour la synthèse de cDNA par la méthode RACE

<i>Réactifs</i>	<i>Volumes</i>
<i>Tampon transparent x5</i>	4 µL
<i>Ribolock 20 unités/µL</i>	1 µL
<i>dNTP</i>	1 µL
<i>RevertAid Minus RT</i>	1 µL

Tableau 5 : Description du mix utilisé pour l'amplification de cDNA par PCR pour la méthode RACE.

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes</b>
<i>dNTP</i>	1 $\mu$ L
<i>Primer forward PR1</i>	1 $\mu$ l
<i>Primer reverse Race B</i>	1 $\mu$ L
<i>Tampon transparent x 5</i>	10 $\mu$ L
<i>GoTaq 200 unités</i>	25 $\mu$ L
<i>Eau Milli-Q</i>	34,75 $\mu$ L

Tableau 6 : Description du mix utilisé pour la synthèse de cDNA par la méthode oligo-dT.

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes</b>
<i>Tampon x5</i>	4 $\mu$ L
<i>Ribolock 20 unités/<math>\mu</math>L</i>	1 $\mu$ L
<i>dNTP</i>	2 $\mu$ L
<i>RevertAid HMinus</i>	1 $\mu$ L

Tableau 7 : Description du mix utilisé pour la PCR quantitative de la méthode oligo-DT. Les séquences des primers sont disponibles dans le tableau 9.

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes</b>
<i>cDNA oligodT</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Primer forward LEEF1alphaF</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Primer reverse LEEF1alphaR</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Tampon vert x5</i>	5 $\mu$ L
<i>GoTaq 200 unités</i>	0,125 $\mu$ L
<i>dNTP</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Eau Milli-Q</i>	17,875 $\mu$ L

Tableau 8 : Description du mix utilisé pour la PCR de vérification suite à la transformation.

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes</b>
<i>Eau Milli-Q</i>	13,37 $\mu$ L
<i>Tampon x5</i>	5 $\mu$ L
<i>dNTP</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Primer T3</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Primer T7</i>	0,5 $\mu$ L
<i>goTaq 200 unités</i>	0,125 $\mu$ L

## Etude de l'expression des gènes HT et ODC2 par qRT-PCR

L'expression des gènes *HT-A*, *HT-B* et *ODC2* (*Ornithine décarboxylase 2*) a été étudiée. Ces gènes ont été sélectionnés sur base de la littérature (Tovar-Mendez et al., 2014 ; Qin et Chetelat, 2021) car ils interviennent dans l'auto-incompatibilité et/ou l'incompatibilité unilatérale.

Les séquences des trois gènes chez la tomate ont été identifiées sur base des articles sus-cités et les séquences homologues chez *S. chilense* ont été identifiées par blast de nucléotide sur les banques de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et du SGN (Solanaceae Genomics Network, <https://solgenomics.net/>). Les séquences complètes ont été utilisées pour dessiner les primers soit par Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) soit manuellement après alignement sur BioEdit (version 7.0.5.3). Les séquences des primers sont décrites en tableau 9.

Durant l'anthèse, des pistils et des étamines ont été récoltés chez les fleurs de *S. chilense*, *S. lycopersicum* et d'hybrides. L'extraction d'ARN et la synthèse des cDNA par la méthode oligo-dT ont été faites comme décrit au paragraphe précédent. Des PCR de vérification avec un gène de référence (*LeEF1alpha*) ont été réalisées afin de contrôler l'efficacité des primers sur le cDNA des pistils et étamines (Tableau 9). Les niveaux d'expression des gènes candidats et de référence (Tableau 9) ont ensuite été quantifiés par qPCR en triplicats pour chaque réplicat biologique. Ces qPCR ont été réalisées en utilisant le GoTaq qPCR Master Mix (Promega) dans une machine StepOnePlus Real-Time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ; le mix PCR est décrit au tableau 10. Les cycles de la qPCR consistaient en un cycle de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 seconde à 60°C. Les gènes *LeEF1- $\alpha$*  (Elongation factor 1-alpha, Solyc06g005060) et *TIP41* (TIP41-like protein, Solyc10g049850) ont été utilisés comme gènes de référence (Asins et al., 2013, Leelatanawit et al. 2017). Les résultats ont ensuite été exprimés via la méthode de calcul de la droite de calibration en unités arbitraires en comparant l'expression des pistils de *S. lycopersicum* sous des conditions de contrôle et en les normalisant avec *LeEF1- $\alpha$*  et *TIP41*. Une analyse de type melt-curve a également été réalisée afin de vérifier la présence d'amplifications spécifiques.

Tableau 9 : Détails des primers utilisés pour la RT-qPCR (toutes les températures d'hybridation sont de 60°C, F signifie forward et R, reverse)

Nom du primer	Séquence	Sens
<i>ODC2</i>	GTGCTAGCTTACTCGAGATTG	F
<i>ODC2</i>	TAGTGAGATTGACCCCAACAG	R
<i>HTA-F</i>	GAATTGGACAATCCGACGCT	F
<i>HTA-longR</i>	CTAACAACACATGGCTTTAC	R
<i>HTA-courtR</i>	AACTGCAACCCAAACACGCT	R
<i>HTA-SCR</i>	TTTTTGGGCAACTGCAACCCA	R
<i>HTB-SCF</i>	TTGGACAAGGGCAACGTGAAC	F
<i>HTB</i>	CCATAATACAGAGCTGAACA	F
<i>HTB</i>	CTTGGACAAGGGCAACGTGA	R
<i>LeEF1alpha</i>	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	F

Tableau 10 : Détails du mix PCR de vérification des primers utilisés pour la RT-qPCR

Réactifs	Volumes
<i>Tampon x5 vert</i>	5 $\mu$ l
<i>goTaq polymerase</i>	0,125 $\mu$ L
<i>dNTP</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Eau Milli-Q</i>	17,875 $\mu$ L
<i>cDNA dilué</i>	3 $\mu$ L
<i>Primer forward</i>	0,5 $\mu$ L
<i>Primer reverse</i>	0,5 $\mu$ L

### Arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques des séquences de gènes des espèces de tomates sauvages et de la tomate cultivée du clade *Lycopersicon* ont été réalisés pour les gènes *ODC2*, *HT-A*, et *HT-B* afin de vérifier le nombre de copies par espèce et leur homologie. Pour ce faire, la séquence de *ODC2* (Solyc03g098300) provenant de Qin et Chetelat (2021) et les séquences de *HT-A* (Solyc12g056585.1.1) et *HT-B* (AB066585 *Solanum lycopersicum*) de *S. lycopersicum* trouvées sur NCBI ont été blastées sur NCBI et sur SGN afin de trouver les gènes homologues chez d'autres espèces de *Solanum*. Pour chaque gène, les séquences des différentes espèces ont ensuite été alignées sur Bioedit (version 7.2) et nettoyées si besoin en fonction de l'alignement. Les séquences ont été renommées pour correspondre à la nomenclature de SGN lorsque c'était

possible. Un arbre phylogénétique a ensuite été construit grâce au site phylogeny.fr. Les séquences ont tout d'abord été alignées avec MUSCLE (version 3.8.31). Les séquences ambiguës (par exemple les séquences qui contiennent des trous ou qui s'alignent mal) ont été enlevées avec Gblocks (version 0.91b). L'arbre phylogénétique a ensuite été reconstruit en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance implémentée dans le programme PhyML (version 3.1/3.0 aLRT). La représentation graphique et l'édition de l'arbre phylogénétique ont été faites en utilisant TreeDyn (version 198.3).

### Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été effectués sur le logiciel R Studio (version 4.1.2). Les tests de corrélation ont été effectués avec la fonction « cor.test » et en utilisant la méthode de Spearman. Lors d'un test ANOVA, les conditions d'application, soit l'homoscédasticité et la normalité des variances, ont été vérifiées avec les fonctions « shapiro.test » et « flinger.test ». Lorsque les conditions n'étaient pas remplies, une transformation de la variable réponse a été effectuée via une transformation logarithmique ou racine carrée. Si les conditions étaient correctes, l'ANOVA a été réalisée. Si après transformation les conditions ne sont toujours pas correctes, un test non paramétrique est alors utilisé (tous les tests dont les conditions n'étaient pas remplies ont nécessité un test Kruskal-Wallis). Des analyses post-hoc sont ensuite appliquées pour comparer chaque génotype (fonction Tukey pour les tests ANOVA, fonction DunnTest pour les tests Kruskal-Wallis). Pour les variables comptage, des régressions linéaires de type Poisson ont été effectuées. Les différents graphes ont été effectués sur le logiciel Excel (version 2111 Build 16.0.14701.20254).

## Résultats

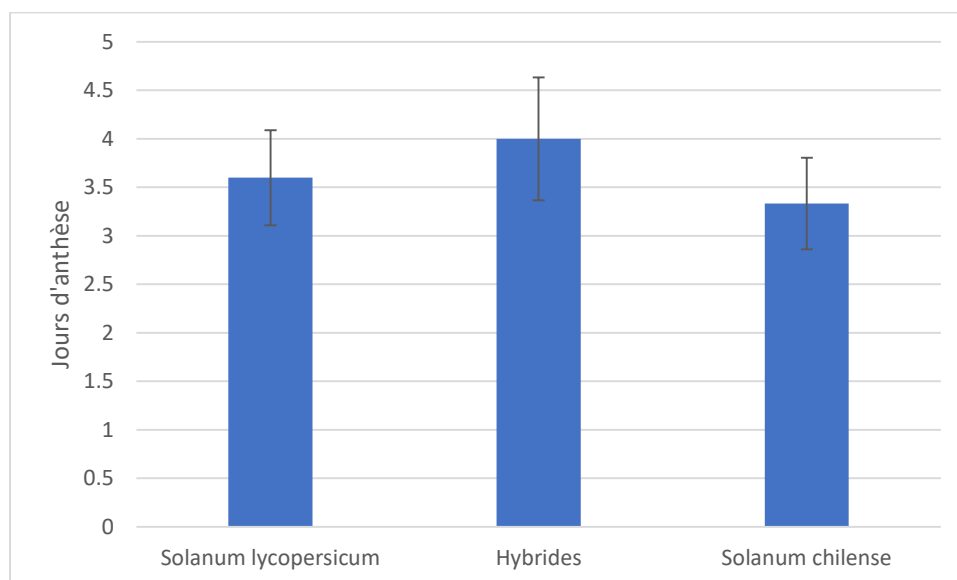
Les résultats de ce mémoire se divisent en trois parties. La première partie compare la durée d'anthèse et la fertilité des fleurs de *S. lycopersicum*, *S. chilense* et des hybrides. Une deuxième partie décrit les croisements qui ont été réalisés entre *S. lycopersicum*, *S. chilense* et les hybrides afin d'identifier les génotypes compatibles et incompatibles. Finalement, la troisième partie porte sur les analyses de biologie moléculaire qui ont été réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes génétiques impliqués dans la régulation de l'auto-incompatibilité et de l'incompatibilité unilatérale chez ces espèces.

### Partie I : Durée d'anthèse et fertilité des fleurs

Le développement des fleurs de *S. chilense*, *S. lycopersicum* et des hybrides a été suivi avant anthèse (stade de 15 de Brukhin, Brukhin et al., 2003, annexe S2) jusqu'à la fanaison des fleurs et la fertilité des fleurs (viabilité pollinique et réceptivité stigmatique) a été évaluée avant (stade 15 ou 16 de Brukhin, Brukhin et al., 2003) et en anthèse afin de déterminer les meilleurs stades de développement pour la réalisation des croisements.

La durée d'anthèse était similaire pour les 3 génotypes ( $F_{2,10} = 1,1674$ , p-val = 0,3503, Figure 7). Elle était en moyenne de 4 jours pour *S. lycopersicum* et respectivement de 3,33 et 3,69 jours pour *S. chilense* et les hybrides.

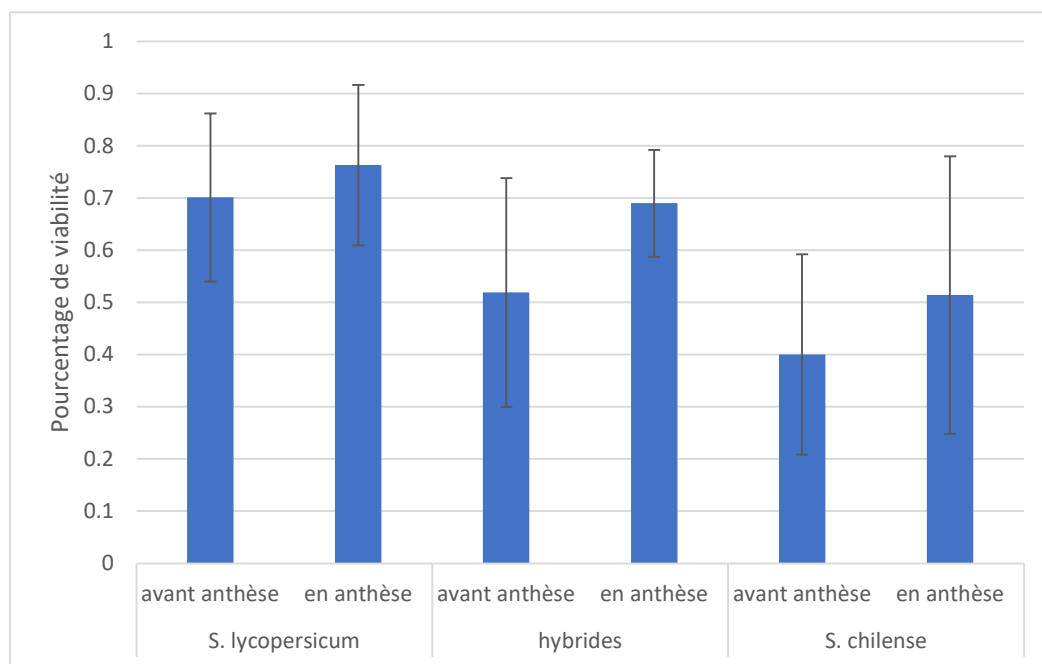
Figure 7 : Durée d'anthèse pour les trois génotypes de tomate.



La viabilité pollinique différait entre génotypes ( $\chi^2 = 33,622$  et p-val = 5,001e-08) ainsi qu'au cours du développement des fleurs ( $\chi^2 = 11,679$  et p-val = 0,0006322, Figure 8). En effet, *S. lycopersicum* avait un pourcentage de viabilité pollinique plus élevé que les hybrides, qui eux-

mêmes avaient une viabilité pollinique plus élevée que *S. chilense* (Figure 8). Bien que l'interaction du génotype et du traitement n'ait pas eu d'effet significatif sur la viabilité pollinique ( $\chi^2 = 2,747$  et p-val = 0,2532702), celle-ci était plus faible chez les hybrides avant anthèse que lors de l'anthèse ( $\chi^2 = 10,343$  et p-val = 0,0013) mais cette différence n'était significative ni chez *S. chilense* ( $\chi^2 = 2,4964$  et p-val = 0,1141) ni chez *S. lycopersicum* ( $\chi^2 = 2,0619$  et p-val = 0,151).

Figure 8 : Viabilité pollinique des fleurs chez les trois génotypes de tomate avant anthèse (stade 15 de Brukhin, Brukhin et al., 2003) et en anthèse (stade 20).



Au contraire de la viabilité pollinique, la réceptivité stigmatique était de 100% pour les pistils des trois génotypes tant avant anthèse qu'en anthèse.

## Partie II : Croisements

Plusieurs sortes de croisements ont été effectués. Tout d'abord, des plantes de *S. chilense* ont été croisées entre elles et le taux de mise à fruit et le nombre de graines par fruit ont été suivis afin de déterminer les croisements compatibles et incompatibles et ainsi identifier les génotypes possédant des allèles d'auto-incompatibilité différents. Par ailleurs des plantes hybrides ont également été croisées entre elles et la production de fruits et de graines a été analysée. Tous les hybrides croisés provenaient du même parent mâle *S. chilense*, appelé SC2. Ces croisements ont permis de vérifier si les hybrides étaient auto-incompatibles comme leur parent mâle et de déterminer quelles plantes possédaient les mêmes allèles d'auto-incompatibilité. Finalement, des croisements entre *S. chilense* et *S. lycopersicum* ont été effectués et le taux de mise à fruit et le nombre de graines par fruit ont été comptés, pour déterminer les plantes plus ou moins compatibles dans les croisements interspécifiques.

### **Croisements *Solanum chilense* x *Solanum chilense***

Des croisements ont été réalisés entre 9 plantes de *S. chilense*. Les différents croisements réalisés sont présentés au Tableau 11 et les taux de mises à fruits et de nombre de graines par fruit sont présentés dans la figure 9. Un tableau récapitulatif détaillant plus amplement les résultats des croisements est disponible en annexe (Annexe S3). Au niveau de la compatibilité des croisements, trois groupes de *S. chilense* ont pu être mis en évidence d'après le tableau S3 en annexe et sont détaillés dans le tableau 11.

Premièrement, certains croisements n'ont donné aucun fruit, suggérant une auto-incompatibilité entre les génotypes impliqués. C'est le cas des croisements PIS6 x PIS 19, PIS 10 x PIS 19, PIS 6 x PIS 21, PIS 9 x PIS 21, PIS 10 x PIS 21, PIS 31 x PIS 32 (Tableau 11).

A l'opposé, certaines plantes de *S. chilense* se sont montrées compatibles avec plusieurs autres plantes. C'est le cas des croisements entre PIS 10 et PIS 23 et entre PIS 21 et PIS 23 (Tableau 11). Pour ces croisements le taux de mises à fruit est supérieur à 75% et le nombre de graines par fruit est de  $10,364 \pm 82$  et  $7,222 \pm 5,96$  respectivement.

Finalement, un grand nombre de croisements se sont révélés peu ou moyennement compatibles. Les croisements peu compatibles sont PIS 9 x PIS 10, PIS 6 x PIS 14, PIS 9 x PIS 17, PIS 19 x PIS 23, PIS 9 x PIS 23, PIS 6 x PIS 9, PIS 17 x PIS 23, PIS 9 x PIS 14, PIS 10 x PIS 32 (Tableau 11). Pour ces croisements, le taux de mise à fruit variait entre 5 % et 41,67 % et le nombre de graines par fruit variait entre 3 et 11,8. Les croisements moyennement compatibles concernent

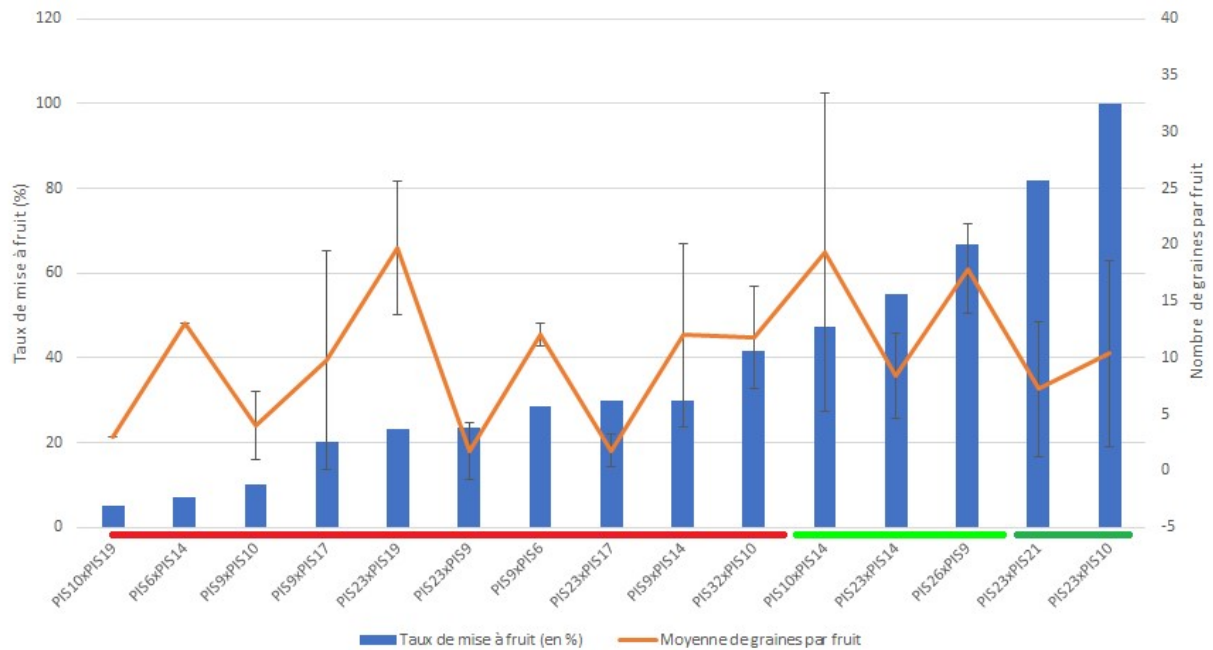
PIS 10 x PIS 14, PIS14 x PIS 23 et PIS 9 x PIS 26 (Tableau 11). Ces croisements ont montré un taux de mise à fruit compris entre 47,37 % et 66,67% et le nombre de graines par fruit variait entre 8,375 et 19,33. Par ailleurs, un taux élevé de mise à fruit n'impliquait pas forcément un grand nombre de graines par fruit (Figure 9) et il n'y avait pas de corrélation entre le nombre de fruits et le nombre de graines par fruit ( $R = -0,021$ ,  $p\text{-val} = 0,9391$ ). En effet, le croisement PIS23 x PIS21 qui a eu un taux important de mise à fruit (66,67%) n'a eu en moyenne que 7 graines par fruit alors que le croisement PIS6 x PIS14, malgré un taux très bas de mise à fruit (7,14%) a eu en moyenne 13 graines par fruit (Tableau 11).

Tableau 11 : synthèse des croisements réalisés entre plantes de *S. chilense* en fonction du succès des croisements

mâle femelle	PIS 6	PIS 9	PIS 10	PIS 14	PIS 17	PIS 19	PIS 21	PIS 23	PIS 26	PIS 32
PIS 6	-	croisements peu compatibles	-	croisements peu compatibles	-	x	x	-	-	-
PIS 9	-	-	croisements peu compatibles	croisements peu compatibles	croisements peu compatibles	-	x	croisements fortement compatibles	croisements moyennement compatibles	-
PIS 10	-	-	-	croisements moyennement compatibles	-	x	x	croisements fortement compatibles	-	croisements peu compatibles
PIS 14	-	-	-	-	-	-	-	croisements moyennement compatibles	-	-
PIS 17	-	-	-	-	-	-	-	croisements fortement compatibles	-	-
PIS19	-	-	-	-	-	-	-	croisements fortement compatibles	-	-
PIS 21	-	-	-	-	-	-	-	croisements moyennement compatibles	-	-
PIS 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIS 26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIS 31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
PIS 32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Légende : - : pas de croisement ; x : croisements non-compatible (0% de mise à fruit) ; *croisements peu compatibles* (<50% de mise à fruit), *croisements moyennement compatibles* (50-75% de mise à fruits), *croisements fortement compatibles* (>75% de mise à fruits)

Figure 9 : Nombre moyen et écart-type de graines par fruit en fonction du taux de mise à fruit dans les croisements entre S. chilense et S. chilense. Légende : voir Tableau 11.



### Croisements hybrides x hybrides

Huit combinaisons de croisements ont été réalisées entre 6 plantes hybrides différentes (Tableau 12). Plusieurs croisements, notamment ceux entre H5A et H9C ainsi qu'entre H13B et H9A, n'ont donné aucun fruit, ce qui suggère que ces croisements sont incompatibles. Pour les autres croisements, le taux de mise à fruit n'a pas dépassé 33% et seuls deux croisements ont donné des graines (H7A x H9C et H9A x H9B). Cependant, le nombre de graines par fruit n'a pas pu être analysé pour tous les croisements car un grand nombre de fruits résultant de croisements entre hybrides sont morts en cours de développement.

Tableau 12 : Production de fruits et de graines pour les différents croisements réalisés entre hybrides.

Femelle	Mâle	N fleurs pollinisées	N fruits	N graines totales	N fruits morts	Mise à fruit (%)	N graines par fruit
H5A	H9C	9	0	0	0	0	0 ± 0
H13B	H9A	10	0	0	0	0	0 ± 0
H9A	H9C	16	1	0	1	6,25	0 ± 0
H13B	H9C	12	1	0	1	8,333	0 ± 0
H9B	H9C	8	1	0	1	12,5	0 ± 0
H7A	H9C	13	2	7	0	15,385	3,5 ± 3,5
H9C	H7A	8	2	0	2	25	0 ± 0
H9A	H9B	9	3	22	0	33,333	7,333 ± 6,129

Légende : N = nombre de

### **Croisements entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum***

Des croisements ont été réalisés en utilisant soit *S. chilense* comme parent femelle, soit *S. lycopersicum* comme parent femelle.

Neufs plantes *S. chilense* différentes ont servi de parent femelle pour les croisements avec *S. lycopersicum* et entre 5 et 20 fleurs ont été pollinisées par croisement (Tableau 13). Ces croisements n'ont pas donné de fruits, à une exception près. Il s'agit du croisement PIS 10 x *S. lycopersicum*, qui a donné 3 fruits sur les 20 fleurs pollinisées mais deux fruits sont morts et le seul fruit mûr a donné deux graines.

Tableau 13 : Production de fruits et de graines pour les différents croisements réalisés entre *S. chilense* (parent femelle) et *S. lycopersicum* (parent mâle).

Femelle	Mâle	N fleurs	N fruits	N fruits morts	Mise à fruit (%)	N graines total
PIS 10	AC	20	3	2	15	2
PIS 9	AC	15	0	0	0	0
PIS 21	AC	11	0	0	0	0
PIS 14	AC	14	0	0	0	0
PIS 31	AC	21	0	0	0	0
PIS 19	AC	21	0	0	0	0
PIS 23	AC	10	0	0	0	0
SC 2	AC	10	0	0	0	0
PIS 26	AC	5	0	0	0	0

Légende : AC = *Solanum lycopersicum*, N = nombre de.

Cinq plantes de *S. chilense* ont servi de parent mâle dans les croisements avec *S. lycopersicum*. Entre 2 et 6 fleurs ont été pollinisées par croisement (Tableau 14). Cinq croisements ont donné des fruits. Deux croisements, respectivement AC x PIS 10 ainsi que AC x PIS 19, ont donné un fruit pour un taux de mise à fruit inférieur à 50% (respectivement 20 % et 33,33 %) et les deux fruits ont produit respectivement 20 graines et 9 graines. Par ailleurs, deux croisements, AC x PIS 9 et AC x PIS 31, ont chacun donné 1 et 2 fruits pour un taux de mise à fruit égal ou supérieur à 50% (50 % et 66,66 % respectivement). Ces deux croisements ont donné 2 graines et 22 graines au total. Les croisements restants détaillés dans le tableau 14 n'ont engendré aucun fruit.

Tableau 14 : Production de fruits et de graines pour les différents croisements réalisés entre *S. lycopersicum* (parent femelle) et *S. chilense* (parent mâle).

Femelle	Mâle	N fleurs	N fruits	Mise à fruit (%)	N graines total	N graines par fruit
AC	Pis10	5	1	20	20	20 ± 0
AC	Pis19	6	1	33,33	9	9 ± 0
AC	Pis9	2	1	50	2	2 ± 0
AC	Pis31	3	2	66,66	22	11 ± 12,73
AC	Pis23	5	0	0	0	0
AC	Pis9	4	0	0	0	0

Légende : AC = *Solanum lycopersicum*, N = nombre de.

### Partie III : Biologie moléculaire

Afin de mieux comprendre les mécanismes génétiques sous-tendant l'auto-incompatibilité et l'incompatibilité unilatérale chez la tomate, plusieurs analyses moléculaires ont été réalisées. Premièrement, les S-allèles d'auto-incompatibilité ont été identifiés chez certaines plantes de *S. chilense* et d'hybrides afin de potentiellement lier ces S-allèles au comportement reproducteur de la plante observé précédemment. Par ailleurs, des arbres phylogénétiques ont été réalisés pour les gènes *HT-A*, *HT-B* et *ODC* à partir des séquences de plusieurs espèces du clade des tomates ou du genre *Solanum*. Ces différents gènes semblent impliqués dans le contrôle de l'auto-incompatibilité et de l'incompatibilité unilatérale chez la tomate au niveau du pistil (Tovar-Mendez et al., 2014 ; Qin et Chetelat, 2021). L'élaboration de ces arbres a pour but de comprendre l'histoire évolutive de ces gènes et de voir le nombre de copies existants chez les différentes espèces. L'expression de ces gènes a ensuite été étudiée chez *S. lycopersicum*, *S. chilense* et les hybrides afin de pouvoir potentiellement lier l'expression de ces gènes avec les comportements de reproduction intra- et interspécifiques des espèces représentées.

#### **Identification des allèles d'auto-incompatibilité**

L'ARN de quatre plantes de *S. chilense* (PIS 9, PIS 19, PIS 23, SC2) et de deux plantes hybrides (H9B, H13B) présentant potentiellement des S-allèles différents sur base de nos croisements a été extrait afin d'identifier les allèles d'auto-incompatibilité. Le cDNA de ces échantillons a été obtenu avec la méthode RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends), et leur migration sur gel a permis de confirmer l'amplification des fragments ADN et que la taille des bandes obtenues correspondait à la taille attendue pour les S-RNAses (Figure 10). Ces fragments ont ensuite été introduits dans un plasmide et multipliés après transformation de bactéries. Cinq colonies par échantillon ont été amplifiées par PCR afin de vérifier l'insertion du fragment d'intérêt. Après vérification via gel (Figure 11), des bandes ont pu être obtenues pour tous les échantillons excepté PIS19. En tout, 14 colonies (correspondant à 5 plantes) ont été sélectionnées sur base de la taille du fragment amplifié et après extraction, les plasmides ont été séquencés.

Figure 10 : Gel des échantillons PCR convertis en cDNA par la méthode RACE. Ladder benchtop 100 bp.

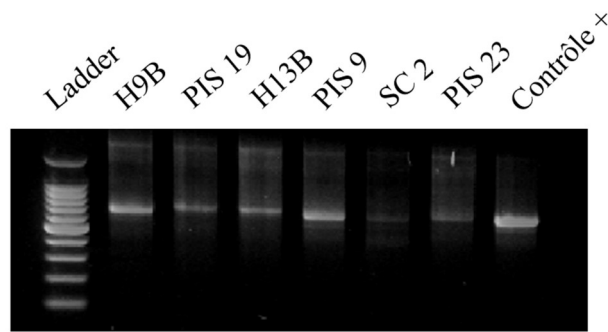
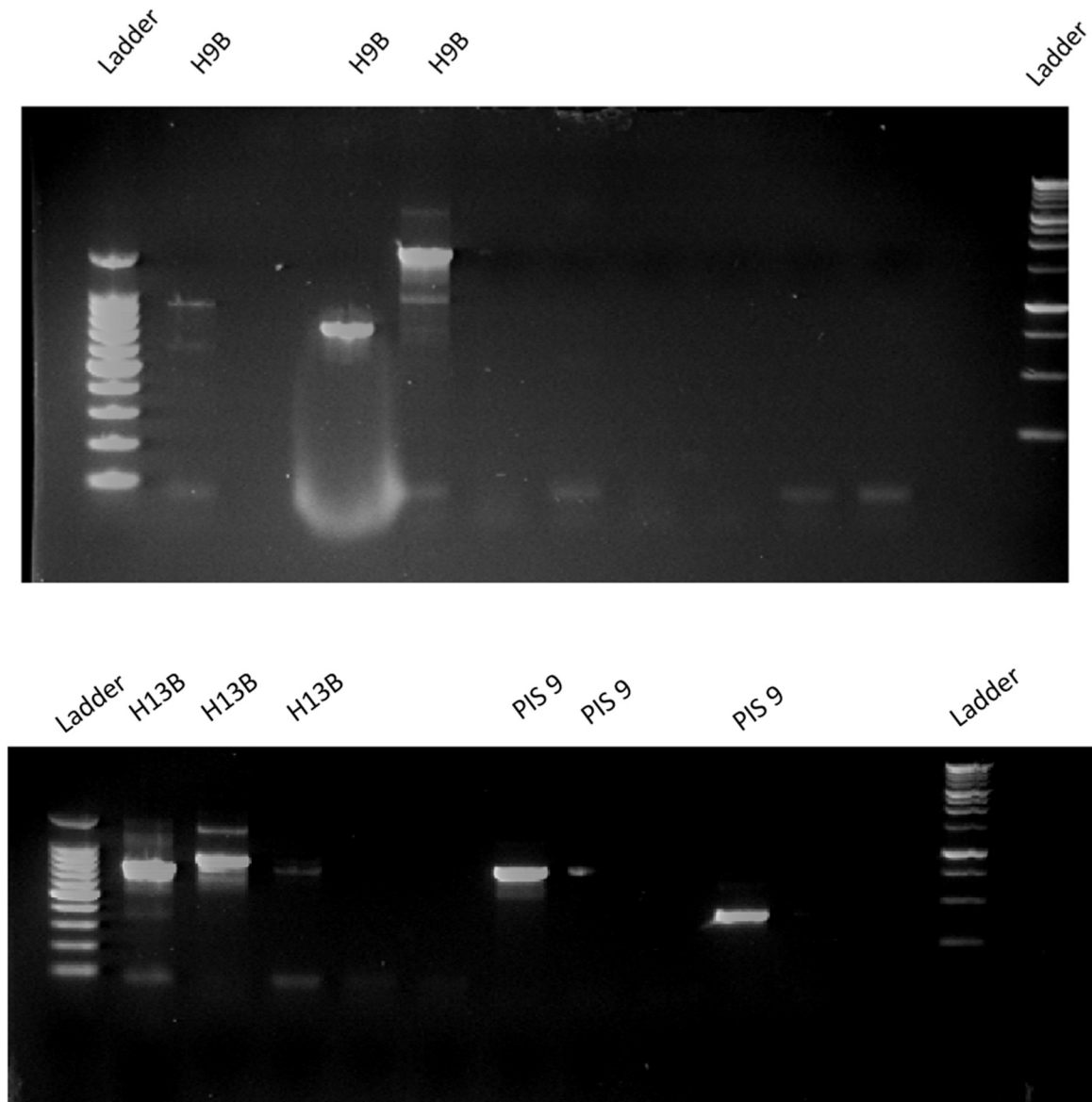
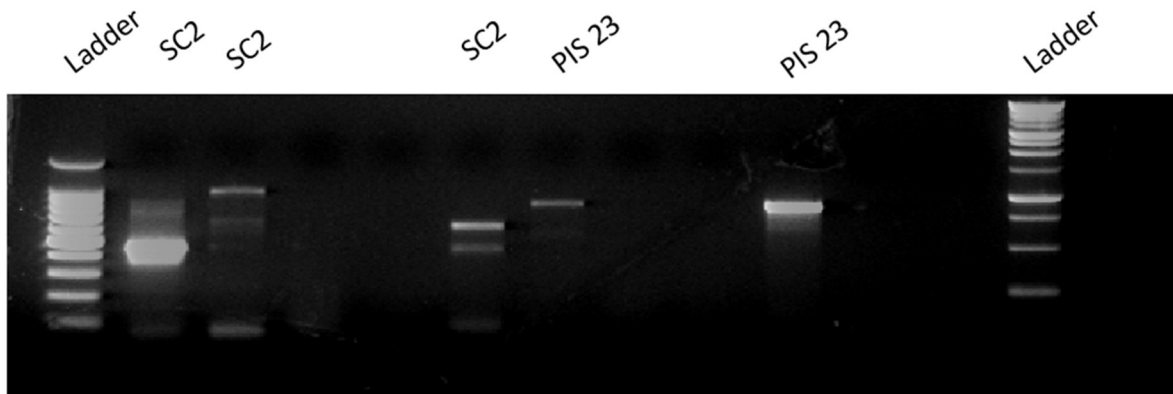


Figure 11 : Gel de vérification par PCR de la présence de plasmide avec fragment d'intérêt dans les colonies bactériennes. Les échantillons dont les plasmides ont été séquencés sont annotés selon leur plante d'origine. Ladder benchtop 100bp à gauche et ladder benchtop 1kbp à droite.





La séquence des S-RNases a été obtenue pour cinq individus (H9B, H13B, PIS 9 PIS 23, SC 2). Pour les échantillons provenant des plantes hybrides, deux S-allèles différents ont été séquencés, l'un provenant de H9B, l'autre provenant de H13B. Le blast de ces séquences sur NCBI a permis d'identifier que l'allèle extrait de H9B correspondait à l'allèle *S10 S-RNase* (n° NCBI EF680088.1) d'auto-incompatibilité de *S. chilense* (annexe S4) et que celui extrait de H13B correspondait à un allèle non encore décrit chez *S. chilense* mais similaire à deux allèles d'auto-incompatibilité de *S. peruvianum* *S16-RNase* (n°NCBI AB072458.1) et *SP13 S-RNase*, (n° NCBI HM357225.1) avec un pourcentage de similarité de respectivement 90,13% et 90,54% (Annexe S5). Pour les échantillons provenant de plantes de *S. chilense*, trois S-allèles ont pu être séquencés. Pour PIS 9, deux allèles ont pu être déterminés. Le premier allèle est le même que l'allèle *S10 S-RNase* trouvé chez H9B (annexe S6) et le second allèle est le même que celui trouvé chez H13B et blaste également avec deux allèles de *S. peruvianum* (*S16-RNase* à 90,46 % et *SP13 S-RNase* à 91,23 %, annexe S7). Pour PIS 23, le blast a été réalisé sur SGN, un allèle a pu être déterminé et correspond à l'allèle *S8 S-RNase* de *S. pimpinellifolium* (n° SGN Sopim01g055200.0.1, annexe S8) mais il n'a pas non plus été décrit pour *S. chilense* à ce jour. Le deuxième allèle de PIS 23 ainsi que les deux allèles de SC2 n'ont pas pu être déterminés via le séquençage car les fragments amplifiés ne correspondaient pas à des S-RNases. Les séquences des S-allèles identifiés ainsi que leurs alignements avec les séquences disponibles sur NCBI pour PIS 9, H9B et H13B et SGN pour PIS 23 sont disponibles en annexe (Annexes S4 à S8).

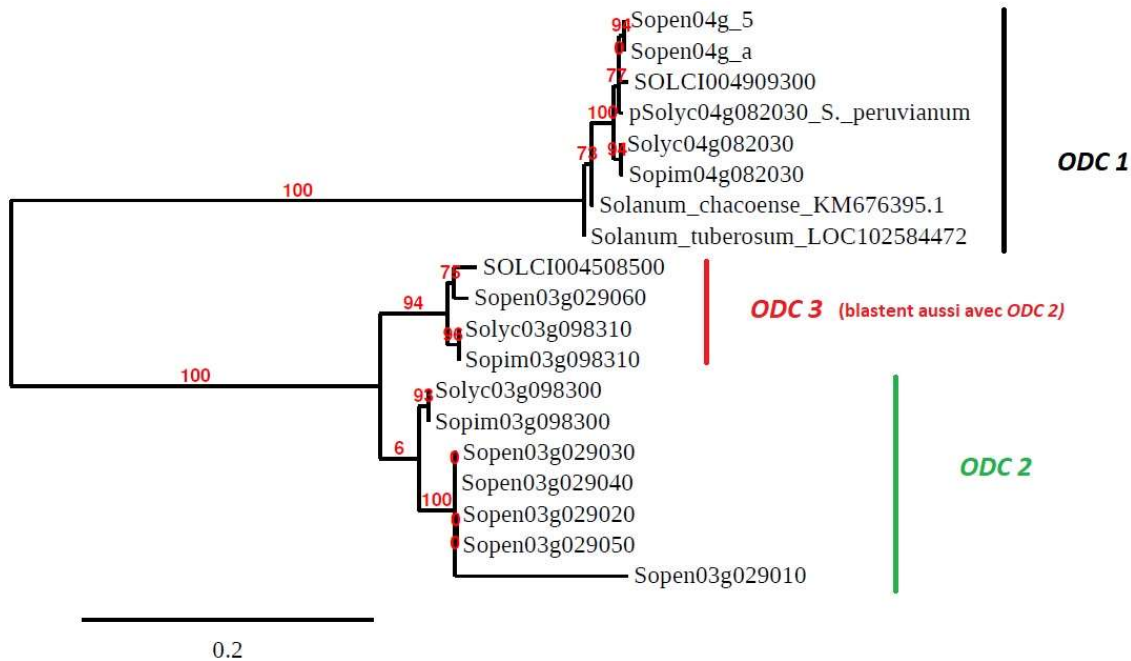
### Arbres phylogénétiques

Sur base des séquences de *S. lycopersicum* pour *ODC1* (n° SGN : Solyc04g082030.1.1), *ODC2* (n° NCBI : XM004235341.3) et *ODC3* (n° SGN : Solyc03g098310.1) d'une part et de *HT-A* (n° NCBI : GU362647.1) et *HT-B* (n° NCBI : AB066585.1) d'autre part, les séquences proches

pour d'autres espèces de tomate ont pu être obtenues en utilisant la fonction « blast » du site du NCBI et de SGN. Les arbres ont ensuite pu être construits à partir de ces séquences.

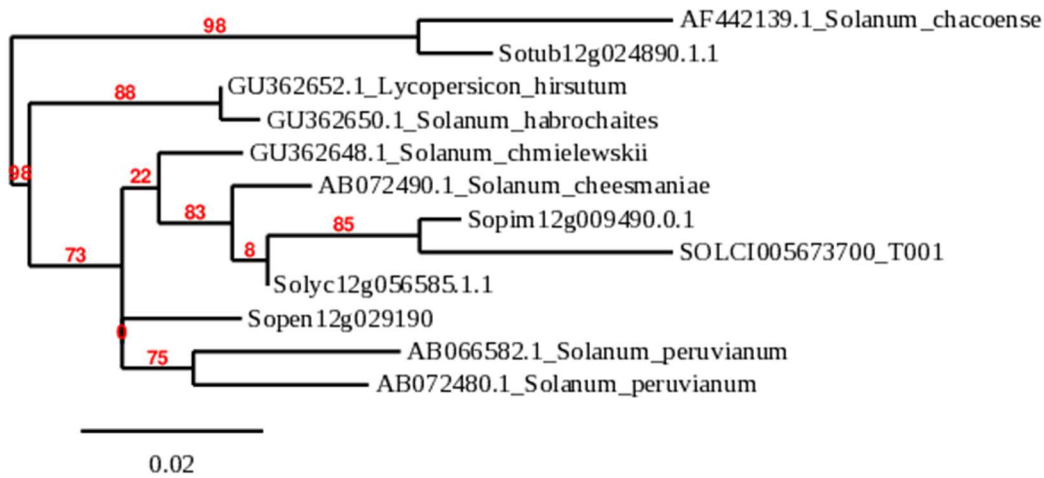
L'arbre phylogénétique des gènes *ODC1*, *ODC2* et *ODC3* (Figure 12) reprend 8 séquences provenant de *S. pennellii* (Sopen), 2 séquences provenant de *S. chilense* (SOLCI), une séquence provenant de *S. peruvianum* (pSolyc), 3 séquences provenant de *S. lycopersicum*, 3 séquences provenant de *S. pimpinellifolium* (Sopim), une séquence provenant de *Solanum chacoense*, et une séquence provenant de la pomme de terre *Solanum tuberosum*, ces deux dernières espèces n'appartenant pas au clade des tomates (*Solanum*, section *Lycopersicon*, Peralta et al 2008). L'arbre phylogénétique se sépare en deux branches principales. La première branche de l'arbre sépare les séquences correspondant à *ODC1* de celles correspondant à *ODC2* et *ODC3*. Au sein du groupe *ODC2-ODC3*, une deuxième démarcation peut être notée. Le premier groupe rassemble des séquences de *S. chilense*, *S. pennellii* et *S. pimpinellifolium* proches de Solyc03g098310 (*ODC3*). Le deuxième groupe rassemble des séquences proches de Solyc03g098300 (*ODC2*) appartenant à *S. pennellii* et *S. pimpinellifolium*. Les membres du groupe de *ODC3* blastent également avec la séquence *ODC2* de *S. lycopersicum*. Il existe donc 2 gènes codant pour *ODC* chez *S. chilense* et la séquence de *S. chilense* homologue à *ODC2* est SOLCI004508500. Les alignements utilisés pour construire cet arbre sont disponible en annexe S9.

Figure 12 : Arbre phylogénétique des gènes ODC de plusieurs espèces de tomates sauvages, de la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) et de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). SOLCI, Solyc, Sopen Sopim, gènes de respectivement *Solanum chilense*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennellii*, *Solanum pimpinellifolium*.



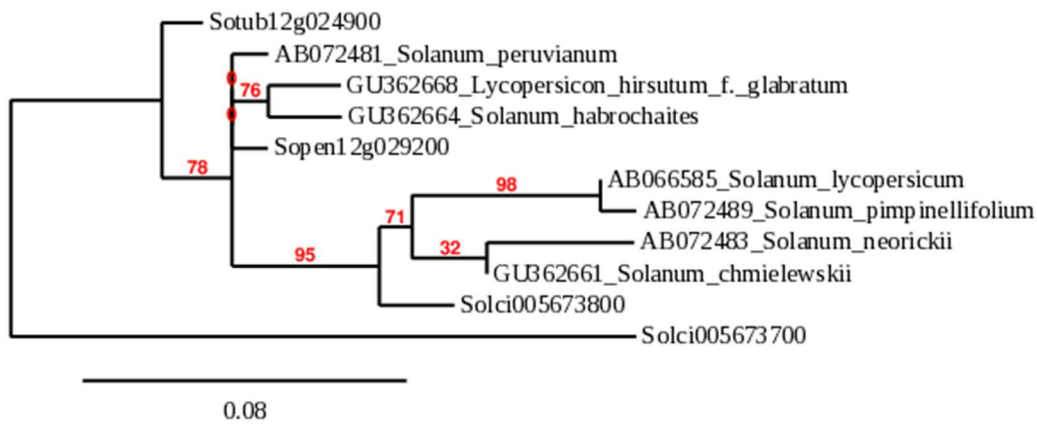
L'arbre phylogénétique du gène *HT-A* (Figure 13) comprend une séquence pour les espèces *S. chacoense*, *S. tuberosum*, *S. hirsutum*, de *S. habrochaites*, *S. chmielewskii*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S. lycopersicum*, *S. pennellii*, et deux séquences pour *S. peruvianum*. L'arbre sépare tout d'abord le clade des tomates des espèces de pommes de terre (*S. chacoense* et *S. tuberosum*). Une deuxième séparation isole les séquences de *S. hirsutum* et *S. habrochaites* du reste des tomates. Dans le dernier groupe, trois sous-groupes peuvent être observés. Le premier regroupe les deux séquences de *S. peruvianum*, le second montre la séquence de *S. pennellii* dans un groupe isolé et le troisième regroupe des séquences de *S. chmielewskii*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense* et *S. lycopersicum*. L'arbre confirme qu'il existe une seule séquence de *HT-A* chez *S. chilense* et qu'elle est homologue à la séquence de *S. lycopersicum*. Les alignements utilisés pour construire cet arbre sont disponible en annexe S10.

Figure 13 : Arbre phylogénétique du gène *HT-A* de plusieurs espèces de tomates sauvages, de la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*), de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et d'une pomme de terre sauvage (*Solanum chacoense*). *SOLCI*, *Solyc*, *Sopen Sopim*, *Sotub* gènes de respectivement *Solanum chilense*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennellii*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum tuberosum*.



L'arbre phylogénétique de *HT-B* (Figure 14) comprend une séquence issue de *S. tuberosum*, de *S. peruvianum*, de *S. hirsutum*, de *S. habrochaites*, de *S. pennellii*, de *S. lycopersicum*, de *S. pimpinellifolium*, de *S. neorickii*, de *S. chmielewskii*, et deux séquences de *S. chilense*. L'arbre sépare tout d'abord une des séquences de *S. chilense* du reste des séquences. Une deuxième subdivision sépare la séquence de la pomme de terre *S. tuberosum* des autres séquences de tomates. Plusieurs divisions sont ensuite à noter. Quatre branches se séparent, la première comprenant une séquence de *S. peruvianum* isolée, la deuxième comprenant les séquences de *S. hirsutum* et *S. habrochaites*, la troisième isolant la séquence de *S. pennellii* et la quatrième comprenant les séquences restantes. Dans cette dernière séparation, une division isole la deuxième séquence de *S. chilense* des autres séquences. Deux groupes peuvent être observés dans les séquences restantes, l'un comprenant les séquences de *S. lycopersicum* et *S. pimpinellifolium* et l'autre comprenant les séquences de *S. neorickii* et *S. chmielewskii*. Il ressort de l'arbre que la séquence *HT-B* de *S. chilense* la plus proche de celle de *S. lycopersicum* est *Solci005673800*. Les alignements utilisés pour construire cet arbre sont disponibles en annexe S11.

Figure 14 : Arbre phylogénétique du gène *HT-B* de plusieurs espèces de tomates sauvages, de la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*), de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et d'une pomme de terre sauvage (*Solanum chacoense*). *Solci*, *Sopen*, *Sotub* gènes de respectivement *Solanum chilense*, *Solanum pennellii*, *Solanum tuberosum*.

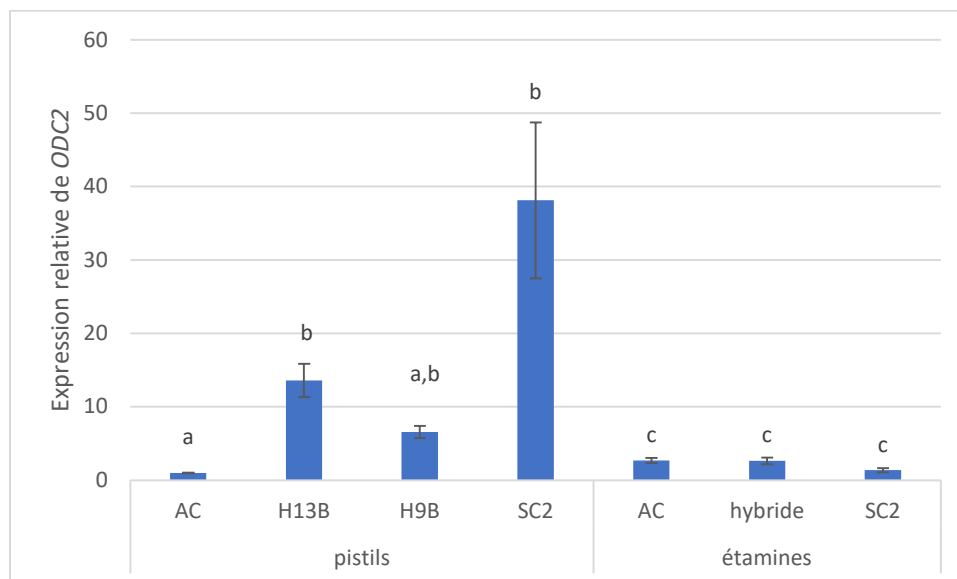


### Etude de l'expression des gènes de *HT-A*, *HT-B* et *ODC2*

L'analyse phylogénétique a permis d'identifier les gènes *HT-A*, *HT-B* et *ODC2* de *S. chilense* homologues aux séquences de *S. lycopersicum*. Suite à cela, l'expression des gènes *ODC2*, *HT-A* et *HT-B* a été étudiée par qPCR dans les pistils et les étamines de fleurs en anthèse chez *S. lycopersicum*, *S. chilense* et les hybrides en utilisant les gènes de référence *LeEF1-α* et *TIP41*.

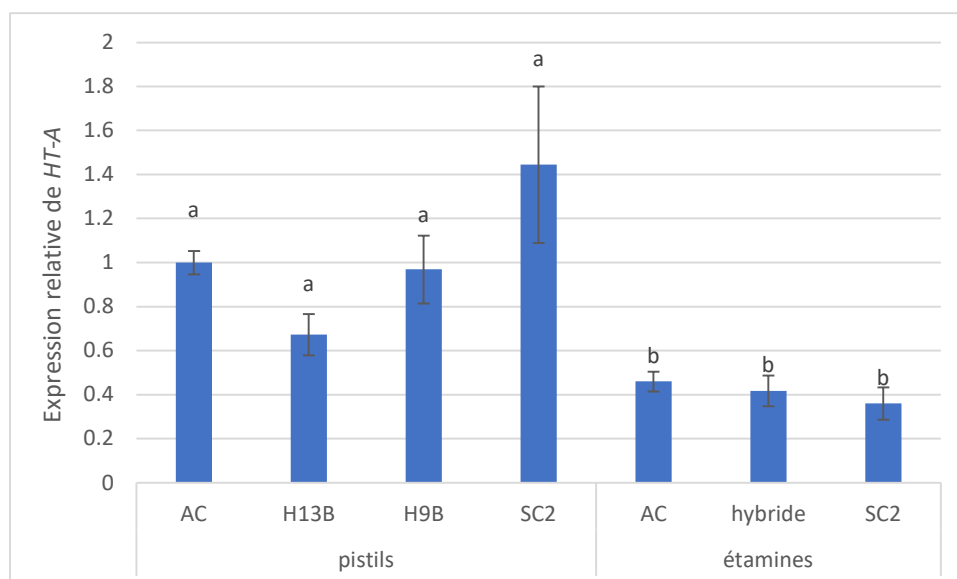
L'expression de *ODC2* était peu élevée dans les étamines par rapport aux pistils pour l'ensemble des génotypes (Figure 15). Au niveau des étamines, l'expression d'*ODC2* était similaire pour les 3 génotypes ( $F_{2,15} = 1,99$ ,  $p\text{-val} = 0,172$ ). Au niveau des pistils, l'expression d'*ODC2* différait entre les génotypes ( $\chi^2 = 18,207$  et  $p\text{-val} < 0,001$ ) et était significativement différente entre *S. chilense* et *S. lycopersicum* ( $Z = -4,123$ ,  $p\text{-val} < 0,001$ ) ainsi qu'entre *S. lycopersicum* et H13B ( $Z = -2,858$ ,  $p\text{-val} = 0,02133$ ).

Figure 15 : Expression de ODC2 normalisée aux pistils de *S. lycopersicum* (AC) avec EF1alpha et TIP41 comme gène de référence. H13B et H9B sont tous deux des hybrides et SC2 est la plante de *S. chilense* qui a été utilisée comme parent mâle pour la formation des hybrides. Les génotypes partageant une même lettre pour un même organe ne sont pas significativement différents ( $P > 0,05$ ).



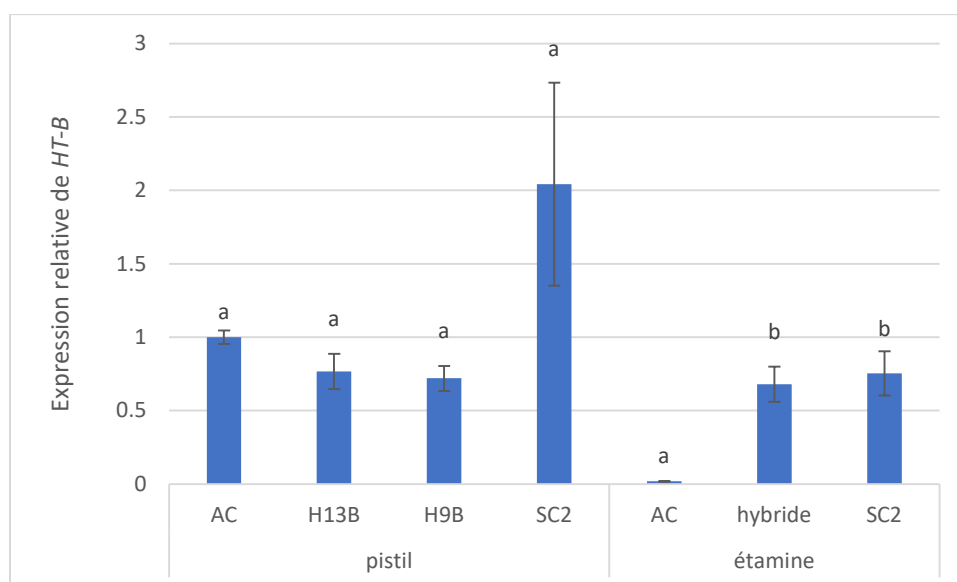
L'expression de *HT-A* était également plus basse dans les étamines que dans les pistils (Figure 16). Dans les étamines, l'expression était similaire chez les trois génotypes ( $F_{2,15} = 0,56$ ,  $p\text{-val} = 0,583$ ). Dans les pistils, l'expression de *HT-A* ne variait pas significativement entre les génotypes ( $\chi^2 = 4,687$  et  $p\text{-val} = 0,196$ ).

Figure 16 : Expression de HT-A normalisée aux pistils de *S. lycopersicum* (AC) avec EF1alpha et TIP41 comme gène de référence. H13B et H9B sont tous deux des hybrides et SC2 est la plante de *S. chilense* qui a été utilisée comme parent mâle pour la formation des hybrides. Les génotypes partageant une même lettre pour un même organe ne sont pas significativement différents ( $P > 0,05$ ).



L'expression de *HT-B* était également plus faible dans les étamines que dans les pistils (Figure 17). Dans les étamines, l'expression différait en fonction des génotypes ( $\chi^2 = 11,661$  et  $p\text{-val} = 0,003$ ). L'expression différait entre *S. lycopersicum* et les hybrides ( $Z = -2,65$ ,  $p\text{-val} = 0,0161$ ), entre *S. lycopersicum* et *S. chilense* ( $Z = -3,1903$ ,  $p\text{-val} = 0,004$ ), mais pas entre *S. chilense* et les hybrides ( $Z = -0,5407381$ ,  $p\text{-val} = 0,588688134$ ). Au niveau des pistils, l'expression ne variait pas significativement entre les génotypes ( $F_{3,20} = 2,9728$ ,  $p\text{-val} = 0,0563$ ).

Figure 17 : Expression de *HT-B* normalisée aux pistils de *S. lycopersicum* (AC) avec EF1alpha et TIP41 comme gène de référence. H13B et H9B sont tous deux des hybrides et SC2 est la plante de *S. chilense* qui a été utilisée comme parent mâle pour la formation des hybrides. Les génotypes partageant une même lettre pour un même organe ne sont pas significativement différents ( $P > 0,05$ ).



## Discussion

---

### Phénologie des fleurs

Nos résultats ont montré que la durée d'anthèse des fleurs de *S. lycopersicum*, *S. chilense* et de leurs hybrides était similaire et durait 3-4 jours. Par ailleurs, les mesures de réceptivité stigmatique ont montré que les trois génotypes possédaient des stigmates réceptifs déjà avant anthèse (stade 15 de Brukhin) et que les grains de pollen étaient également viables avant ouverture des anthères, bien que la viabilité pollinique était plus importante en anthèse pour les hybrides. Ces résultats sont en partie confirmés par Zhao et al (2011), qui ont étudié la viabilité pollinique à partir du début de l'anthèse et ont montré que le pollen de tomate était viable jusqu'à six jours après l'anthèse (Zhao et al., 2011). Les organes mâles et femelles des fleurs présentent donc une maturité concomitante, et il n'existe pas de phase mâle ou femelle chez *S. chilense*, *S. lycopersicum* et leurs hybrides. Le fait que les organes mâles et femelles sont fertiles en même temps favorise l'autopollinisation et l'autofécondation chez les fleurs hermaphrodites (Sandivo et al., 2008). C'est le cas de *S. lycopersicum* dont le style est également enfermé dans le cône d'étamines (Hurd et Cooper, 1970, Welty et al., 2007). *S. lycopersicum* est en effet considérée comme une espèce auto-compatible et peut donner des fruits et des graines sans intervention extérieure (Gerszberg et al., 2015). Au contraire, *S. chilense* a besoin d'une pollinisation croisée pour former des fruits et des graines (Chetelat, 2008). De ce fait, seuls l'exertion du style et les mécanismes d'auto-incompatibilité gamétophytique sont responsables de l'allogamie chez cette espèce (Gao et al., 2015, Li et Chetelat, 2009). Nous avons mis en évidence que les hybrides sont aussi auto-incompatibles et présentent une exertion du style (Leclef, 2021) comme leur parent *S. chilense*.

Le fait que les stigmates soient réceptifs avant l'ouverture de la fleur facilite la réalisation de croisements intra- et interspécifiques par pollinisation manuelle. Pour la réalisation de croisements chez *S. lycopersicum*, les fleurs de tomate sont généralement émasculées au stade 15-18 de Brukhin avant anthèse et déhiscence des étamines, or à ce stade les stigmates sont déjà réceptifs et peuvent donc être pollinisés, même si souvent un deuxième dépôt de pollen est réalisé un ou deux jours plus tard (Quinet et al, 2006). Nos résultats montrent également que le pollen peut être utilisé durant toute la période d'anthèse pour la réalisation des croisements. Etant donné que la phénologie et la fertilité des fleurs est similaire chez *S. chilense* et les hybrides, la même technique peut être utilisée pour les croisements intra et interspécifiques chez ces génotypes. Cependant, vu l'auto-incompatibilité de *S. chilense* et des hybrides,

l'émasculation des fleurs n'est pas toujours nécessaire avant pollinisation pour la réalisation de croisements. En effet, nous n'avons jamais observé de formation spontanée (sans pollinisation manuelle) de fruits en serres chez *S. chilense* et s'il peut y en avoir chez les hybrides, ce sont des fruits parthénocarpiques qui ne contiennent pas de graines (M. Quinet, communication personnelle).

### Auto-incompatibilité gamétophytique

Trois allèles d'auto-incompatibilité ont pu être identifiés dans ce travail dont deux qui n'ont jamais été décrits chez *S. chilense* à ce jour mais qui sont similaires à des *S-RNases* d'autres espèces proches. Il s'agit de l'allèle *S10 S-RNase* de *S. chilense*, de l'allèle *S8 S-RNase* de *S. pimpinellifolium* et de l'allèle *S16-SRNase/SP13 SRNase* de *S. peruvianum*. A ce jour, une trentaine de S-allèles ont été décrits chez *S. chilense* (Igic et al., 2007). On considère qu'il doit exister autour d'une cinquantaine de S-allèles différents par espèce chez les plantes présentant une auto-incompatibilité gamétophytique (Igic et al., 2007). Il est connu que les séquences de *S-RNases* d'un même S-allèle d'espèces proches sont plus similaires que les séquences de différents S-allèles au sein d'une même espèce, montrant que la diversification des S-allèles est antérieure à la séparation des espèces (Brisolara-Correa et al., 2015). Nous avons ainsi pu identifier les deux S-allèles de *S. chilense* PIS 9 (*S10* et *S16/SP13*), un des S-allèle de *S. chilense* PIS 23 (*S8*) et les S-allèles des hybrides H9B (*S10*) et H13B (*S16/SP13*). Même s'il n'a pas été possible de déterminer les allèles de SC2 (parent *S. chilense* des hybrides actuels) par séquençage, ces allèles ont pu être déduits grâce aux hybrides. En effet, SC2 étant le parent mâle de tous les hybrides, chacun de ceux-ci possède un des deux allèles de SC2, l'autre provenant du parent femelle *S. lycopersicum*. *S. lycopersicum* a une *S-RNase* tronquée et non fonctionnelle, ce qui la rend auto-compatible (Kondo et al., 2002). Il est donc possible d'affirmer que SC2 possède l'allèle *S10* (qu'on retrouve chez H9B) ainsi que l'allèle *S16/SP13* (présent chez H13B). Pour l'allèle de PIS 23 qui n'a pas pu être identifié, il est possible de statuer que cet allèle n'est pas le même qu'un des deux allèles de PIS 9 étant donné que les deux plantes sont capables de se croiser.

### **Auto-incompatibilité chez *Solanum chilense***

Au niveau des croisements des plantes de *S. chilense*, il est possible de prédire quelle plante possède au moins un des allèles identifiés précédemment en fonction de son comportement de croisement avec les plantes PIS 9 et PIS 23. En effet, PIS 9 ne se croise pas avec PIS 21, il est donc possible de supposer que PIS 21 possède au moins un allèle commun avec PIS 9. Il est

également possible de statuer que PIS 9 et PIS 21 ne possèdent qu'un seul allèle en commun étant donné que PIS 21 ne se croise pas avec PIS 10 alors que ce croisement fonctionne avec PIS 9. En poussant cette logique, on peut alors statuer que PIS 21 et PIS 10 ont un allèle en commun (qui n'est donc pas le même qu'un des allèles de PIS 9), qui est également commun avec PIS 19 étant donné que ni PIS 21 ni PIS 10 ne se croisent avec PIS 19. De même, PIS 19 ne se croise pas avec PIS 6 mais ces deux plantes ont en commun un allèle différent de celui que partage PIS 19 avec PIS 21 et PIS 10 étant donné que PIS 21 se croise avec PIS 6. Par ailleurs, PIS 31 et PIS 32 ont au moins un allèle en commun, qui n'est pas le même que partagent PIS 10, PIS 19 et PIS 21. Il serait intéressant de poursuivre l'analyse des différentes S-RNases chez les individus qui ont été identifiés comme ne partageant pas les mêmes S-RNases sur base des croisements afin de confirmer les relations de compatibilité/incompatibilité.

Comme expliqué précédemment, les S-Rnases sont les déterminants femelles de l'auto-incompatibilité, les déterminants mâles sont de multiples gènes appelés *SLF* (*S-locus F-box*) (Williams et al., 2015). Les protéines SLF sont comprises dans un complexe E3 ubiquitine ligase appelé SCF (Fujii et al., 2016). Les S-Rnases des Solanacées sont composées de cinq régions conservées et deux régions hypervariables (Takayama et Isogai, 2005). Ces changements dans les régions hypervariables engendrent un grand nombre de S-haplotypes différents. En effet, selon Igic et al. (2007), il existerait au moins 35 S-allèles différents chez *S. chilense* (Igic et al., 2007). Les S-RNases sont synthétisées dans les cellules du stigmate, du style et de l'ovaire (Liao et al., 2020), elles sont ensuite transportées dans le cytosol du tube pollinique par endocytose ou par des transporteurs membranaires (Williams et al., 2015). Selon le modèle « non-self recognition », les S-RNases interagissent alors avec le complexe SCF<sup>SLF</sup>, qui reconnaît uniquement les allèles du non-soi. Les S-RNases du non soi reconnues sont ubiquitinées par le complexe et ensuite dégradées dans le protéasome. Les S-RNases du soi, non-reconnues par le complexe, engendrent un arrêt de croissance du tube pollinique grâce à leur activité RNase (Takayama et Isogai, 2005). Cependant, un tel mécanisme implique qu'un grain de pollen contient un arsenal de protéines SLF capables de reconnaître n'importe quel S-haplotype excepté le sien. Chez *Petunia inflata*, une autre espèce de Solanacées montrant une auto-incompatibilité gamétophytique, certaines protéines SLF ont été identifiées (Williams et al., 2015). Certaines sont capables d'interagir avec un seul S-haplotype de S-RNases, mais il a également été observé que d'autres SLF sont capables d'interagir avec plusieurs S-haplotypes de S-RNases différents, notamment S2-SLF1, qui est capable d'interagir avec quatre S-haplotypes différents (Williams et al., 2015). Cette observation pourrait expliquer les

différences dans les taux de mise à fruit obtenus dans nos croisements. En effet, le taux de mise à fruit dans les croisements de *S. chilense* pourrait être supposé comme étant un système tranché, de par le fonctionnement de l'auto-incompatibilité gamétophytique. De prime abord, étant donné le système « clé-serrure » de l'auto-incompatibilité gamétophytique, l'expectative serait d'avoir trois situations tranchées :

- 1) des croisements compatibles entre S-allèles différents donnant un nombre de fruits et de graines relativement élevé et similaire,
- 2) des croisements semi-compatibles quand les plantes partagent un S-allèle commun et diffèrent par le deuxième, ne permettant donc le succès et la mise à fruit/graine que de la moitié des croisements,
- 3) des croisements incompatibles entre S-allèles identiques et ne donnant aucun fruit/graine.

Or, nous avons plutôt observé un gradient dans nos croisements de *S. chilense*. Ceci pourrait être expliqué par des facteurs externes tels que les conditions environnementales ainsi que par le nombre et la nature des pollinisations effectuées sur les fleurs de la plante (Visser et Marcucci, 1984), mais également par la capacité d'interaction des SLF du pollen (Williams et al., 2018). En effet, si un grain de pollen possède des protéines SLF sachant chacune interagir avec un seul S-haplotype, le tube pollinique aura plus de risque d'être détruit par les S-RNases si les protéines SLF subissent des mutations. Seulement, si un grain de pollen possède des protéines SLF chacune capable d'interagir avec plusieurs S-haplotypes différents, alors les chances de rejet suite à une mutation des SLF sont plus basses étant donné que d'autres SLF seraient potentiellement capables de se lier avec toutes les S-RNases (Williams et al., 2015). Les gradients observés dans les taux de mise à fruit des croisements pourraient alors être en partie expliqués par les différences dans les nombres d'interactions des SLF des différentes plantes de *S. chilense*. De plus, certaines incohérences dans les croisements pourraient également être expliquées grâce aux affinités des SLF. Par exemple, dans les croisements effectués dans le cadre de ce mémoire, le croisement PIS 9 x PIS 21 était incompatible alors que des croisements effectués précédemment ont montré que le croisement PIS 21 x PIS 9 était compatible. Les deux plantes ne seraient peut-être pas incompatibles. Il se pourrait qu'il n'existe chez PIS 21 qu'une seule protéine SLF capable de détoxifier chaque S-RNase de PIS 9 et que celle-ci ait subi une mutation, la rendant incapable de détoxification. De nombreuses inconnues demeurent sur la structure du S-locus chez *S. chilense* et le fonctionnement des SLF chez cette espèce et les autres espèces de tomate sauvage. Par ailleurs, nous avons évalué le

succès des croisements en regardant les taux de mise à fruits et à graines, or l'arrêt de la croissance des tubes polliniques suite à l'auto-incompatibilité gamétophytique a lieu dans le style (McCubbin et Kao, 2000). Nous ne pouvons donc pas exclure que d'autres barrières pré et post-zygotiques sont intervenues et expliqueraient nos résultats. Il serait intéressant de suivre la croissance des tubes polliniques afin d'observer si leur croissance est arrêtée ou non dans le style en fonction des croisements. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de relation entre le taux de mise à fruit et le nombre de graines par fruit, ce qui pourrait impliquer que le développement des fruits et des graines dépend en partie de mécanismes différents.

Il est également intéressant de noter que PIS 23 se croise avec un particulièrement grand nombre de plantes. Ceci pourrait être expliqué par le fait que PIS 23 possède des allèles rares dans la population disponible au laboratoire. En effet, dans 6 croisements sur 7, PIS 23 était utilisée dans les croisements comme plante femelle, ce qui implique que ses deux allèles sont peu présents dans la population. De fait, les plantes possédant un S-allèle rare ont une plus grande chance de reproduction que les plantes possédant des S-allèles communs, ce qui engendre une sélection négative dépendante de la fréquence des allèles (Wright, 1939). Cette sélection négative engendre une persistance du polymorphisme au sein du S- locus (Igic et al., 2007). De fait, les S-allèles des Solanacées sont hautement polymorphiques (Liao et al., 2020, Paape et Kohn, 2011, Williams et al., 2015). Les allèles rares sont donc hautement favorisés par sélection, il serait donc possible d'en observer dans la population disponible au laboratoire, et PIS 23 en montre les caractéristiques.

Par ailleurs, selon Liao et al. (2020), d'autres gènes sont impliqués dans l'auto-incompatibilité, dont certains seraient reliés aux S-allèles et en modifieraient l'expression (Liao et al., 2020). Les gènes *HT* feraient partie de ces gènes. En effet, la suppression de l'expression des gènes *HT* empêche le rejet du pollen de même S-haplotype (Goldraji et al., 2006, Tovar-Mendez et al., 2017). Les gènes *HT* pourraient jouer un rôle dans la séquestration des S-RNases en fonction de la réponse d'incompatibilité. Certaines théories ont été émises sur le rôle des protéines HT dans la réponse auto-incompatible liée aux S-RNases, dont celle de Goldraji et al. (2006) qui ont décrit un modèle de « compartimentalisation ». Selon ce modèle, les S-RNases transportées dans le cytosol du tube pollinique seraient directement compartimentées dans la vacuole et leur libération serait dictée par la présence de protéines HT-B, selon la réponse d'auto-incompatibilité. Ce modèle a été élaboré à la suite de plusieurs observations. La première est que les S-RNases sont compartimentées dans la vacuole du tube pollinique et la deuxième est que l'absence de protéines HT engendre une séquestration des S-RNases dans la vacuole

(Goldraji et al., 2006). Ce modèle s'oppose donc au modèle qui a été présenté précédemment (pouvant être qualifié de modèle de « dégradation »), étant donné que les S-RNases ne sont pas dégradées par le protéasome, mais compartimentées dans la vacuole (Liu et al., 2014). Cependant, ce modèle a été remis en question, notamment par Liu et al. (2014), qui ont réussi à mettre en évidence la dégradation des S-RNases du non-soi via l'implication du complexe SCF<sup>SLF</sup> et du protéasome chez *Petunia hybrida* (Liu et al., 2014). Il est toutefois possible de combiner les deux modèles afin de prendre en compte les observations faites par Goldraji et al. Les S-RNases pourraient être transportées vers le cytosol du tube pollinique, puis interagir avec le complexe SCF<sup>SLF</sup>. Les S-RNases du non-soi seraient alors mono-ubiquitinées et envoyées vers les vacuoles, pour ensuite être dégradées (Williams et al., 2015). Ce nouveau modèle laisse cependant certaines questions sans réponse, dont le rôle exact des protéines HT. Nos résultats ont montré que les gènes *HT-A* et *HT-B* étaient exprimés dans les pistils des trois génotypes, sans distinction significative dans l'expression entre les génotypes pour *HT-A*. Ceci conforte l'idée de l'implication des protéines HT dans la réponse d'auto-incompatibilité (Goldraji et al., 2006, Liao et al., 2020, Liu et al., 2014, Tovar-Mendez et al., 2017). Par ailleurs, l'expression des gènes *HT* chez *S. lycopersicum* correspond avec la littérature stipulant que la perte de l'auto-incompatibilité chez *S. lycopersicum* résulte d'une mutation de perte de fonction des gènes codants pour les S-RNases ainsi que pour les protéines HT. *Solanum lycopersicum* montre donc une expression de gènes *HT* mais ces gènes ne codent pas pour des protéines fonctionnelles (Kondo et al., 2002). Les protéines HT sont considérées comme intervenant uniquement dans la partie femelle du contrôle de l'auto-incompatibilité (Tovar-Mendez et al., 2017), nos résultats d'expression confirment que *HT-B* et *HT-A* sont surtout exprimés dans le pistil bien que nous ayons aussi observé une faible expression dans les étamines.

### **Auto-incompatibilité chez les hybrides**

Au niveau des allèles chez les hybrides, l'identification des S-RNases concorde avec les résultats des croisements. En effet, H9B et H13B possèdent chacun un allèle différent au sein des deux allèles présents dans la population. Ceci se vérifie également avec les croisements, H9B se croise avec l'hybride H9A, qui ne se croise pas avec H13B. De même, H13B se croise avec H9C, qui ne se croise pas avec H9B. Ces résultats dans les croisements sous-entendent que les hybrides montrent également de l'auto-incompatibilité. Par ailleurs, la présence d'une expression des gènes *HT-A* et *HT-B* chez les hybrides a été démontrée dans les résultats. Ce constat, en combinaison du comportement d'auto-incompatibilité des hybrides, suggère que ceux-ci possèdent au moins un allèle fonctionnel pour *HT-A* et pour *HT-B*.

### Incompatibilité unilatérale

Les barrières de reproduction interspécifiques permettent de maintenir une isolation reproductive entre les espèces qui vivent en sympatrie (Covey et al., 2010). Chez les Solanacées notamment, les barrières de reproduction interspécifiques s'expriment sous forme d'incompatibilité unilatérale, qui est le fait que, dans un croisement entre plantes de deux espèces différentes, le pollen d'une espèce est rejeté du pistil de l'autre espèce tandis que dans le croisement contraire, le pollen n'est pas rejeté par le pistil. L'incompatibilité unilatérale suit la règle AI x AC (auto incompatible x auto compatible) chez les Solanacées, c'est-à-dire que le pollen d'une espèce auto-compatible sera rejeté par le pistil d'une espèce auto-incompatible mais que le croisement contraire est accepté (Fujii et al., 2016). Nos résultats confirment en effet qu'il existe une incompatibilité unilatérale entre *S. chilense* et *S. lycopersicum* car nous n'avons pas obtenu de fruits, à une exception près, dans les croisements interspécifiques où *S. chilense* était utilisé comme parent femelle alors que plusieurs fruits et graines ont été obtenus quand *S. lycopersicum* était utilisé comme parent femelle. Cependant l'incompatibilité unilatérale n'a pas été complète car nous avons obtenu 3 fruits et 2 graines quand PIS 10 a été utilisé comme parent femelle, sans pour autant savoir pourquoi ce croisement a été possible.

Il est supposé que certains facteurs impliqués dans l'auto-incompatibilité entrent également en jeu dans l'incompatibilité unilatérale (Tovar-Mendez et al., 2014). De fait, certaines études génétiques ont montré que des QTL coïncidant avec le locus S ont un effet majeur dans la réponse d'incompatibilité unilatérale dans le grain de pollen mais aussi dans le pistil. Les espèces auto-incompatibles possèdent des S-RNases fonctionnelles, tandis que les espèces auto-compatibles ne possèdent pas de S-RNases fonctionnelles ou de complexe SCF<sup>SLF</sup> capable de détoxifier des S-RNases et cette différence expliquerait en partie pourquoi les croisements ne sont possibles que dans un sens (Li et Chetelat, 2010, Qin et Chetelat, 2021). A côté du S-locus, d'autres QTL ont été identifiés. Ces QTL sont du côté pollen, la protéine Cullin1 et Skp1, qui sont des composants du complexe SCF<sup>SLF</sup> impliqué dans l'auto-incompatibilité, ainsi que la protéine NASIPP, qui est une protéine de transport de phosphate mitochondrial. Du côté pistil, les QTL connus comme étant impliqués dans l'incompatibilité unilatérale sont le locus des gènes HT, une thiorédoxine réductase (NaTrxh), un inhibiteur de protéase (NaStEP) et une protéine de 120KDa (Tovar-Mendez et al., 2014, Qin et Chetelat, 2021). Nous n'avons pas pu identifier les S-allèles de PIS10 afin de voir pourquoi ce croisement a fonctionné au contraire des autres quand *S. chilense* est utilisé comme parent femelle dans les croisements avec *S. lycopersicum*. Par contre, nous avons identifié les gènes *HT-A* et *HT-B* chez *S. chilense* et tous

deux sont exprimés dans le pistil et pourraient donc intervenir dans l'incompatibilité unilatérale et empêcher la croissance des tubes polliniques de *S. lycopersicum* dans les styles de *S. chilense*. Tovar-Mendez et al. (2014) ont démontré que l'instauration de S-RNases et de protéines HT fonctionnelles chez *S. lycopersicum* entraînait une barrière de reproduction interspécifique au niveau du pistil (Tovar-Mendez et al., 2014). Par ailleurs, ils ont également démontré que la suppression de l'expression des protéines HT chez les espèces auto-compatibles telles que *S. habrochaites* et *S. arcanum* engendrait une levée des barrières de reproduction (Tovar-Mendez et al., 2017). Dans notre étude, l'expression de *HT-A* était similaire dans le pistil de *S. chilense* et de *S. lycopersicum* mais pour *HT-B*, l'expression chez *S. chilense* était significativement supérieure par rapport à *S. lycopersicum*. Il est supposé que HT-B intervient surtout dans l'auto-incompatibilité tandis que HT-A intervient plutôt dans l'incompatibilité unilatérale (Covey et al., 2010, Goldraji et al., 2006). Il serait intéressant d'étudier l'expression de ces gènes en réponse à des croisements compatibles et incompatibles pour mieux comprendre leur implication. De même il serait également intéressant d'identifier les déterminants mâles chez *S. chilense* et de voir leur niveau d'expression dans le pollen et les tubes polliniques.

Les arbres phylogénétiques effectués sur *HT-A* et *HT-B* nous ont permis d'identifier qu'il y avait une copie de chaque gène chez *S. chilense* au contraire de d'autres espèces de tomate. Ces arbres montrent également une séparation des espèces en fonction de leur auto-compatibilité/auto-incompatibilité. Les espèces de tomates auto-compatibles présentes dans les arbres sont : *S. chmielewskii*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium*, *S. neorickii* et *S. lycopersicum* (Baek et al., 2015). Les espèces montrant des populations auto-incompatibles et d'autres auto-compatibles sont : *S. pennellii*, et *S. habrochaites* (qui est la même espèce que *Lycopersicon hirsutum*) (Baek et al., 2015, Peralta et al., 2005). Les espèces auto-incompatibles présentes dans les arbres sont : *S. peruvianum*, *S. chilense*, (Peralta et al., 2005). Dans les arbres se retrouvent également des espèces du clade *Petota*, à savoir *S. tuberosum* et *S. chacoense*, elles ne font donc pas partie du clade *Lycopersicon* (Miller et Spooner, 1996). Pour résumer les arbres phylogénétiques de *HT-A* et *HT-B*, l'arbre de *HT-B* présente un regroupement des espèces complètement auto-compatibles et une isolation de ces espèces par rapport aux espèces auto-incompatibles et aux espèces qui présentent les deux types de compatibilité. Comme expliqué précédemment, le gène *HT-B* est considéré comme étant associé principalement à l'auto-incompatibilité par rapport à *HT-A* qui serait plutôt impliqué dans l'incompatibilité unilatérale (Covey et al., 2010, Goldraji et al., 2006). Cette observation pourrait expliquer l'isolation des espèces auto-compatibles dans l'arbre phylogénétique de *HT-B*, qui auraient

toutes subies des mutations dans le gène *HT-B* rendant la protéine non-fonctionnelle, et séparant donc ces espèces des autres espèces de *Lycopersicon*. Pour ce qui est des espèces présentant les deux types de compatibilité, il est possible que les populations ayant perdu l'auto-incompatibilité ne présentent des mutations que dans les S-RNases et pas dans le gène *HT-B*, le rendant similaires à celui des espèces auto-incompatibles strictes. Il est plus difficile d'isoler une tendance dans l'arbre phylogénétique de *HT-A*, principalement à cause de l'emplacement de *S. chilense*. Il est tout de même intéressant de souligner à nouveau l'isolation des espèces auto-compatibles strictes, même si elle ne peut pas être expliquée par l'incompatibilité unilatérale étant donné que le groupe contient également *S. chilense*.

A côté des facteurs impliqués dans l'auto-incompatibilité, l'incompatibilité unilatérale implique d'autres mécanismes qui se chevauchent (Qin et Chetelat, 2021). Il existe en effet des cas où une espèce auto-compatible rejette tout de même le pollen d'une autre espèce auto-compatible dans un croisement interspécifique. C'est le cas de *Solanum pennellii* qui rejette le pollen de *Solanum lycopersicum* alors que *S. pennellii* n'a pas de S-RNases fonctionnelles. Ceci implique qu'il existe un mécanisme indépendant des S-RNases dans l'incompatibilité unilatérale (Qin et al., 2018). En effet, Qin et Chetelat (2021), ont montré qu'un gène exprimé dans le pollen, *FPS2* (farnésyl phosphate synthase), était nécessaire pour rejeter le pollen auto-compatible indépendamment des S-RNases chez *S. pennellii* (Qin et al., 2018). Ils ont également montré que le rejet de pollen auto-compatible via *FPS2* nécessitait un autre locus chez *S. pennellii*, appelé *ODC2* (ornithine décarboxylase) et exprimé dans le pistil. Par ailleurs, *ODC2* interagirait avec le locus qui code pour les protéines HT-A et HT-B, ce qui pourrait suggérer que le mécanisme de rejet du pollen dépendant de *ODC2* se chevauche avec les mécanismes d'auto-incompatibilité (Qin et Chetelat, 2021) et que les gènes *HT* interviennent également dans les mécanismes de rejet du pollen indépendant des S-RNases. Sur base de l'arbre phylogénétique des gènes *ODC*, nous avons mis en évidence qu'il existe un gène *ODC2* chez *S. chilense* homologue du gène *ODC2* de *S. lycopersicum* alors qu'il existe plusieurs copies chez *S. pennellii*. Nous avons pu montrer que le gène *ODC2* s'exprimait dans le pistil chez *S. chilense* et que son expression était bien supérieure à celle de *S. lycopersicum*, ce qui laisse suggérer qu'il peut jouer un rôle dans l'incompatibilité unilatérale. Ceci soutiendrait la théorie que les mécanismes d'incompatibilité unilatérale se chevauchent, même chez les espèces auto-incompatibles, étant donné que *S. chilense* pourrait donc montrer des mécanismes de rejet du pollen dépendants et indépendants des S-RNases.

## Conclusion et perspectives

---

En conclusion, ce mémoire a permis de démontrer plusieurs points liés à l'auto-incompatibilité gaméophytique et l'incompatibilité unilatérale chez les Solanacées ainsi que sur la phénologie des fleurs de *S. chilense*, *S. lycopersicum* et de leurs hybrides. En ce qui concerne la phénologie des fleurs, nous avons pu montrer qu'il n'existait pas de phase mâle ou femelle chez les trois génotypes et que l'allogamie chez *S. chilense* était seulement due à l'auto-incompatibilité gaméophytique et à l'exertion du style.

Au niveau de l'auto-incompatibilité gaméophytique, nous avons décrit trois S-allèles, dont deux jamais décrits chez *S. chilense* et avons pu déduire les S-allèles de toute une série de plantes disponibles au laboratoire. Nous avons également pu conforter l'idée que les protéines HT sont impliquées dans le mécanisme d'auto-incompatibilité gaméophytique. Par ailleurs, nous avons supposé que le gradient observé dans les taux de mise à fruits des croisements de *S. chilense* est en partie dû aux capacités d'interaction variées des protéines SLF avec différents S-haplotypes. Finalement, nous avons pu montrer que les hybrides présentaient également une auto-incompatibilité gaméophytique.

En ce qui concerne l'incompatibilité unilatérale, nous avons pu mettre en évidence qu'il existait bien une barrière de reproduction entre *S. chilense* et *S. lycopersicum*, que *S. chilense* possède des copies des gènes *HT-A*, *HT-B* et *ODC2* et que ces gènes pourraient intervenir dans l'incompatibilité unilatérale, ce qui tend à confirmer que les mécanismes impliqués dans l'incompatibilité unilatérale sont multiples et se chevauchent avec ceux de l'auto-incompatibilité.

Plusieurs perspectives peuvent être imaginées pour la suite de ce travail. Premièrement, il serait intéressant de caractériser d'autres S-allèles dans la population de *S. chilense* disponible au laboratoire. Ceci permettrait potentiellement d'expliquer le gradient observé dans le taux de mise à fruit dans les croisements de *S. chilense* ainsi que de confirmer les relations de compatibilité.

Par ailleurs, il serait intéressant d'effectuer des rétrocroisements entre les hybrides et les parents *S. chilense* et *S. lycopersicum* afin d'analyser l'incompatibilité unilatérale. Nous avons pu mettre en avant que les hybrides présentaient une expression de *ODC2* intermédiaire aux parents, il serait donc intéressant d'observer les conséquences de cette expression intermédiaire sur les rétrocroisements, afin de potentiellement comprendre les niveaux d'expressions de

*ODC2* requis dans l'incompatibilité unilatérale. Par ailleurs, il a été démontré qu'un gène côté pistil, appelé *FPS2*, agit dans les mêmes voies indépendantes des S-RNases de l'incompatibilité unilatérale que *ODC2* (Qin et Chetelat, 2021). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de ce gène dans les étamines des trois génotypes et de mettre en lien ces expressions et les résultats des rétrocroisements. De même, Munoz-Sanz et al. (2021) ont mis en évidence l'implication du gène *Defective in Induced Resistance 1-like (SpDIRIL)* dans une voie de rejet du pollen indépendante des S-RNases chez *S. pennellii*. Munoz-Sanz et al. ont également pu démontrer que ce gène n'engendrait pas de production de protéines chez *S. lycopersicum* (Munoz-Sanz et al., 2021). Vérifier l'existence de ce gène chez *S. chilense* ainsi que d'étudier l'expression de ce gène chez *S. chilense* et les hybrides permettrait de mettre en évidence l'implication de cette voie dans l'AI chez ces espèces. Une autre stratégie serait de créer des mutants knock-out des gènes *ODC2* et *SpDIRIL* afin de vérifier si ces gènes sont impliqués dans la même voie de rejet du pollen et s'il existe une relation entre eux.

Ce mémoire a illustré l'importance des protéines HT dans l'auto-incompatibilité et dans l'incompatibilité unilatérale. Il serait donc intéressant d'étudier les protéines HT chez les hybrides, notamment de vérifier si les protéines sont fonctionnelles et de mettre en lien ces résultats avec les rétrocroisements. De plus, la création de mutants knock-out pour les gènes *HT-A* et *HT-B* pourrait également permettre de mieux comprendre l'implication de *SpDIRIL* dans l'incompatibilité unilatérale.

## Références

- Asins, M. J., Villalta, I., Aly, M. M., Olías, R., Álvarez De Morales, P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E. A., & Belver, A. (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant, Cell & Environment*, *36*(6), 1171-1191. <https://doi.org/10.1111/pce.12051>
- Atherton, J. G., & Harris, G. P. (1986). Flowering. In J. G. Atherton & J. Rudich (Éds.), *The Tomato Crop : A scientific basis for improvement* (p. 167-200). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_4)
- Baek, Y. S., Covey, P. A., Petersen, J. J., Chetelat, R. T., McClure, B., & Bedinger, P. A. (2015). Testing the SI × SC rule : Pollen–pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (Solanum section Lycopersicon, Solanaceae). *American Journal of Botany*, *102*(2), 302-311. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400484>
- Bedinger, P. A., Chetelat, R. T., McClure, B., Moyle, L. C., Rose, J. K. C., Stack, S. M., van der Knaap, E., Baek, Y. S., Lopez-Casado, G., Covey, P. A., Kumar, A., Li, W., Nunez, R., Cruz-Garcia, F., & Royer, S. (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade : Opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*, *24*(3), 171-187. <https://doi.org/10.1007/s00497-010-0155-7>
- Böndel, K. B., Lainer, H., Nosenko, T., Mboup, M., Tellier, A., & Stephan, W. (2015). North–South Colonization Associated with Local Adaptation of the Wild Tomato Species *Solanum chilense*. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(11), 2932-2943. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv166>
- Brisolara-Corrêa, L., Thompson, C. E., Fernandes, C. L., & de Freitas, L. B. (2015). Diversification and distinctive structural features of S-RNase alleles in the genus *Solanum*. *Molecular Genetics and Genomics*, *290*(3), 987-1002. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0969-3>
- Brukhin, V., Hernould, M., Gonzalez, N., Chevalier, C., & Mouras, A. (2003). Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. Sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*, *15*(6), 311-320. <https://doi.org/10.1007/s00497-003-0167-7>
- Chalivendra, S. C., Lopez-Casado, G., Kumar, A., Kassenbrock, A. R., Royer, S., Tovar-Méndez, A., Covey, P. A., Dempsey, L. A., Randle, A. M., Stack, S. M., Rose, J. K. C., McClure, B., & Bedinger, P. A. (2013). Developmental onset of reproductive barriers and associated proteome changes in stigma/styles of *Solanum pennellii*. *Journal of Experimental Botany*, *64*(1), 265-279. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers324>
- Chetelat, R. T., Pertuzé, R. A., Faúndez, L., Graham, E. B., & Jones, C. M. (2009). Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the Atacama Desert region of northern Chile. *Euphytica*, *167*(1), 77-93. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9863-6>

- Covey, P. A., Kondo, K., Welch, L., Frank, E., Sianta, S., Kumar, A., Nuñez, R., Lopez-Casado, G., Van Der Knaap, E., Rose, J. K. C., McClure, B. A., & Bedinger, P. A. (2010). Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *The Plant Journal*, *64*(3), 367-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04340.x>
- FAOSTAT. (s. d.). Consulté 20 mai 2021, à l'adresse <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>
- Faraone, I., Russo, D., Ponticelli, M., Candido, V., Castronuovo, D., Cardone, L., Sinisgalli, C., Labanca, F., & Milella, L. (2021). Preserving Biodiversity as Source of Health Promoting Compounds : Phenolic Profile and Biological Activity of Four Varieties of *Solanum lycopersicum* L. *Plants*, *10*(3), 447. <https://doi.org/10.3390/plants10030447>
- Fernandes, M. de O., Bianchi, P. A., Silva, L. R. A. da, Vianna, L. S., Santos, E. A., Moulin, M. M., Fernandes, M. de O., Bianchi, P. A., Silva, L. R. A. da, Vianna, L. S., Santos, E. A., & Moulin, M. M. (2018). Morpho-agronomic characterization and analysis of genetic divergence among accessions of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Ciência Rural*, *48*(11). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180433>
- GaoMei-Feng, PengHui-Zhen, LiShan-Shuang, WangXiao-Lei, GaoLei, WangMing-Hui, ZhaoPan-Feng, & ZhaoLing-Xia. (2015). Insight into flower diversity in *Solanum lycopersicum* and *Solanum chilense* using comparative biological approaches. *Canadian Journal of Plant Science*. <https://doi.org/10.4141/cjps-2014-237>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *120*(3), 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Gharbi, E., Martínez, J.-P., Benahmed, H., Fauconnier, M.-L., Lutts, S., & Quinet, M. (2016). Salicylic acid differently impacts ethylene and polyamine synthesis in the glycophyte *Solanum lycopersicum* and the wild-related halophyte *Solanum chilense* exposed to mild salt stress. *Physiologia Plantarum*, *158*(2), 152-167. <https://doi.org/10.1111/ppl.12458>
- Gharbi, E., Martínez, J.-P., Benahmed, H., Hichri, I., Dobrev, P. I., Motyka, V., Quinet, M., & Lutts, S. (2017). Phytohormone profiling in relation to osmotic adjustment in NaCl-treated plants of the halophyte tomato wild relative species *Solanum chilense* comparatively to the cultivated glycophyte *Solanum lycopersicum*. *Plant Science*, *258*, 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.02.006>
- Gharbi, E., Martínez, J.-P., Benahmed, H., Lepoint, G., Vanpee, B., Quinet, M., & Lutts, S. (2017). Inhibition of ethylene synthesis reduces salt-tolerance in tomato wild relative species *Solanum chilense*. *Journal of Plant Physiology*, *210*, 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.12.001>
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-Garcia, F., & McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, *439*(7078), 805-810. <https://doi.org/10.1038/nature04491>

- Grooms, K. (2019, juin 21). *Selecting the Right Colony : The Answer is There in Blue and White*. Promega Connections. <https://www.promegaconnections.com/selecting-the-right-colony-the-answer-is-there-in-blue-and-white/>
- Ho, L. C., & Hewitt, J. D. (1986). Fruit development. In J. G. Atherton & J. Rudich (Éds.), *The Tomato Crop : A scientific basis for improvement* (p. 201-239). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_5)
- Hurd, R. G., & Cooper, A. J. (1970). The Effect of Early Low Temperature Treatment on the Yield of Single-Inflorescence Tomatoes. *Journal of Horticultural Science*, 45(1), 19-27. <https://doi.org/10.1080/00221589.1970.11514328>
- Igic, B., Smith, W. A., Robertson, K. A., Schaal, B. A., & Kohn, J. R. (2007). Studies of self-incompatibility in wild tomatoes : I. S-allele diversity in *Solanum chilense* Dun. (Solanaceae). *Heredity*, 99(5), 553-561. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801035>
- Kaathien-Nakayama, P., Isogai, A., & Takayama, S. (2010). Self-Incompatibility Systems in Flowering Plants. In E. C. Pua & M. R. Davey (Éds.), *Plant Developmental Biology—Biotechnological Perspectives : Volume 1* (p. 459-485). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02301-9\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02301-9_22)
- Kashyap, S. P., Kumari, N., Mishra, P., Moharana, D. P., & Aamir, M. (2021). Tapping the potential of *Solanum lycopersicum* L. pertaining to salinity tolerance : Perspectives and challenges. *Genetic Resources and Crop Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01174-9>
- Kashyap, S. P., Prasanna, H. C., Kumari, N., Mishra, P., & Singh, B. (2020). Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome profiling and de novo assembly of wild tomato *Solanum chilense*. *Scientific Reports*, 10(1), 15835. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72474-w>
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) : A Model Fruit-Bearing Crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(11), pdb.emo105. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105>
- Kondo, K., Yamamoto, M., Matton, D. P., Sato, T., Hirai, M., Norioka, S., Hattori, T., & Kowiyama, Y. (2002). Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *The Plant Journal*, 29(5), 627-636. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01245.x>
- Kwak, M., Toro, O., Debouck, D. G., & Gepts, P. (2012). Multiple origins of the determinate growth habit in domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Annals of Botany*, 110(8), 1573-1580. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs207>
- Leclef, Claire. Impact d'un stress salin sur la croissance, la reproduction et la physiologie d'hybrides de tomates entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum*. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2021. Prom. : Quinet, Muriel.

- Leelatanawit, R., Saetung, T., Phuengwas, S., Karoonuthaisiri, N., & Devahastin, S. (2017). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in postharvest tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) treated by continuous low-voltage direct current electricity to increase secondary metabolites. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 1942-1950. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13477>
- Li, W., & Chetelat, R. T. (2010). A Pollen Factor Linking Inter- and Intraspecific Pollen Rejection in Tomato. *Science*, 330(6012), 1827-1830. <https://doi.org/10.1126/science.1197908>
- Li, W., & Chetelat, R. T. (2015). Unilateral incompatibility gene ui1.1 encodes an S-locus F-box protein expressed in pollen of *Solanum* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(14), 4417-4422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423301112>
- Liao, J., Wei, X., Chen, Z., Qin, X., Pan, Z., Niu, Y., Suo, W., Zheng, Y., Ma, W., & Chen, S. (2020). Research on the regulatory mechanisms of self-incompatibility plasticity in *Nicotiana glauca*. *Euphytica*, 216(9), 149. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02687-7>
- Liu, W., Fan, J., Li, J., Song, Y., Li, Q., Zhang, Y., & Xue, Y. (2014). SCFSLF-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Frontiers in Genetics*, 5, 228. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00228>
- Martínez, J., Antúnez, A., Pertuzé, R., ACOSTA, M., Palma, X., Fuentes, L., AYALA, A., & Araya, H. (2012). Effects of saline water on water status, yield and fruit quality of wild (*Solanum chilense*) and domesticated (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) tomatoes. *Experimental Agriculture*, 48. <https://doi.org/10.1017/S001447971200066X>
- Martínez, J. P., Fuentes, R., Farías, K., Lizana, C., Alfaro, J. F., Fuentes, L., Calabrese, N., Bigot, S., Quinet, M., & Lutts, S. (2020). Effects of Salt Stress on Fruit Antioxidant Capacity of Wild (*Solanum chilense*) and Domesticated (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) Tomatoes. *Agronomy*, 10(10), 1481. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101481>
- Mazzucato, A., Ficcadenti, N., Caioni, M., Mosconi, P., Piccinini, E., Reddy Sanampudi, V. R., Sestili, S., & Ferrari, V. (2010). Genetic diversity and distinctiveness in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces : The Italian case study of 'A pera Abruzzese'. *Scientia Horticulturae*, 125(1), 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.02.021>
- McCubbin, A., & Kao, T. (2000). McCubbin AG, Kao TH. Molecular recognition and response in pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 333-364. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.333>
- Miller, J. T., & Spooner, D. M. (1996). Introgression of *Solanum chacoense* (*Solanum* sect. *Petota*) : Upland Populations Reexamined. *Systematic Botany*, 21(4), 461-475. <https://doi.org/10.2307/2419609>
- Moyle, L. C. (2008). Ecological and Evolutionary Genomics in the Wild Tomatoes (*Solanum* Sect. *Lycopersicon*). *Evolution*, 62(12), 2995-3013. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00487.x>

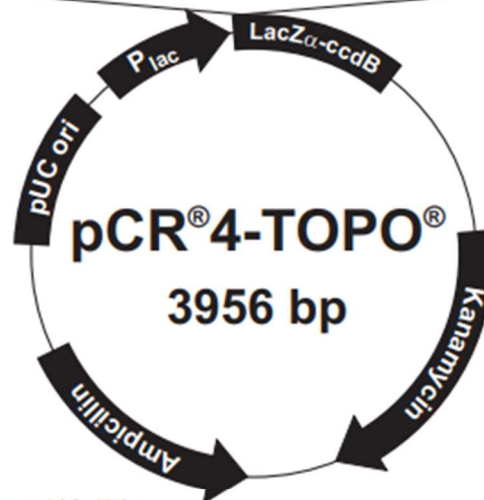
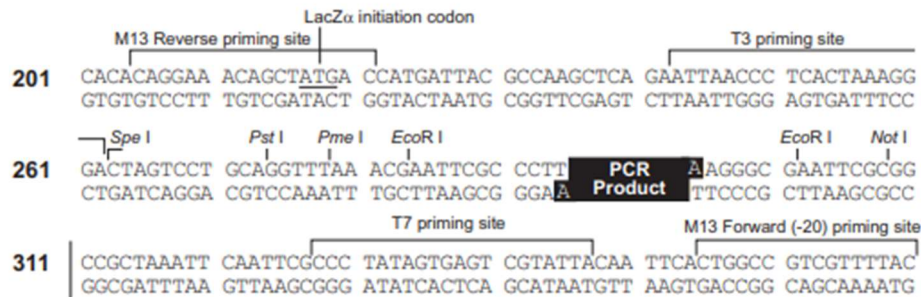
- Muñoz-Sanz, J. V., Tovar-Méndez, A., Lu, L., Dai, R., & McClure, B. (2021). A Cysteine-Rich Protein, SpDIR1L, Implicated in S-RNase-Independent Pollen Rejection in the Tomato (*Solanum* Section *Lycopersicon*) Clade. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13067. <https://doi.org/10.3390/ijms222313067>
- Nasrallah, J. B. (2017). Plant mating systems : Self-incompatibility and evolutionary transitions to self-fertility in the mustard family. *Current Opinion in Genetics & Development*, 47, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.08.005>
- North–South Colonization Associated with Local Adaptation of the Wild Tomato Species Solanum chilense* | *Molecular Biology and Evolution* | *Oxford Academic*. (s. d.). Consulté 24 mai 2021, à l'adresse <https://academic.oup.com/mbe/article/32/11/2932/982055?login=true>
- Nosenko, T., Böndel, K. B., Kumpfmüller, G., & Stephan, W. (2016). Adaptation to low temperatures in the wild tomato species *Solanum chilense*. *Molecular Ecology*, 25(12), 2853-2869. <https://doi.org/10.1111/mec.13637>
- Paape, T., & Kohn, J. R. (2011). Differential strengths of selection on S-RNases from *Physalis* and *Solanum*(*Solanaceae*). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 243. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-243>
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon* : *Solanaceae*) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424-434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>
- Picken, A. J. F., Stewart, K., & Klapwijk, D. (1986). Germination and vegetative development. In J. G. Atherton & J. Rudich (Éds.), *The Tomato Crop : A scientific basis for improvement* (p. 111-166). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_3)
- Qin, X., & Chetelat, R. T. (2021). Ornithine decarboxylase genes contribute to S-RNase-independent pollen rejection. *Plant Physiology*, 186(1), 452-468. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab062>
- Qin, X., Li, W., Liu, Y., Tan, M., Ganai, M., & Chetelat, R. T. (2018). A farnesyl pyrophosphate synthase gene expressed in pollen functions in S-RNase-independent unilateral incompatibility. *Plant Journal*, 93(3), 417-430. Scopus. <https://doi.org/10.1111/tpj.13796>
- Quinet, M., Dielen, V., Batoko, H., Boutry, M., Havelange, A., & Kinet, J.-M. (2006). Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist*, 170(4), 701-710. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01717.x>
- Quinet, M., & Kinet, J.-M. (2007). Transition to Flowering and Morphogenesis of Reproductive Structures in Tomato. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1(1), 64.
- Raduski, A. R., & Igić, B. (2021). Biosystematic studies on the status of *Solanum chilense*. *American Journal of Botany*, 108(3), 520-537. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1621>
- Rick, C. M., & Lamm, R. (1955). Biosystematic Studies on the Status of *Lycopersicon chilense*. *American Journal of Botany*, 42(7), 663-675. <https://doi.org/10.2307/2485327>

- Sanvido, O., Widmer, F., Winzeler, M., Streit, B., Szerencsits, E., & Bigler, F. (2008). Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Research*, 17(3), 317-335. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9103-1>
- Sim, S.-C., Robbins, M. D., Deynze, A. V., Michel, A. P., & Francis, D. M. (2011). Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Heredity*, 106(6), 927-935. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.139>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates.
- Takayama, S., & Isogai, A. (2005). Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 467-489. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249>
- Tapia, G., Méndez, J., & Inostroza, L. (2016). Different combinations of morpho-physiological traits are responsible for tolerance to drought in wild tomatoes *Solanum chilense* and *Solanum peruvianum*. *Plant Biology*, 18(3), 406-416. <https://doi.org/10.1111/plb.12409>
- Tovar-Méndez, A., Kumar, A., Kondo, K., Ashford, A., Baek, Y. S., Welch, L., Bedinger, P. A., & McClure, B. A. (2014). Restoring pistil-side self-incompatibility factors recapitulates an interspecific reproductive barrier between tomato species. *The Plant Journal*, 77(5), 727-736. <https://doi.org/10.1111/tpj.12424>
- Tovar-Méndez, A., Lu, L., & McClure, B. (2017). HT proteins contribute to S-RNase-independent pollen rejection in *Solanum*. *The Plant Journal*, 89(4), 718-729. <https://doi.org/10.1111/tpj.13416>
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl\_2), W71-W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., Edwards, J. D., & Bai, Y. (2013). The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLOS Genetics*, 9(3), e1003399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>
- Verlaan, M. G., Szinay, D., Hutton, S. F., Jong, H. de, Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., & Bai, Y. (2011). Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene Ty-1. *The Plant Journal*, 68(6), 1093-1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04762.x>
- Visser, T., & Marcucci, M. C. (1984). The interaction between compatible and self-incompatible pollen of apple and pear as influenced by their ratio in the pollen cloud. *Euphytica*, 33(3), 699-704. <https://doi.org/10.1007/BF00021897>
- Welty, N., Radovich, C., Meulia, T., & van der Knaap, E. (2007). Inflorescence development in two tomato species. *Canadian Journal of Botany*, 85(1), 111-118. <https://doi.org/10.1139/b06-154>

- Williams, J. S., Wu, L., Li, S., Sun, P., & Kao, T.-H. (2015). Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia* : Recent findings and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 41. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00041>
- Wright, S. (1939). The Distribution of Self-Sterility Alleles in Populations. *Genetics*, 24(4), 538-552.
- Zhao, P., Zhao, L., Sheng, Q., Li, S., & Peng, H. (2011). The days anthesis in relation to the floral shapes, pollen size, and S-RNase gene identifying in selfincompatibility of wild species. *African Journal of Biotechnology*, 10(65), 14319-14328. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i65>

## Annexes

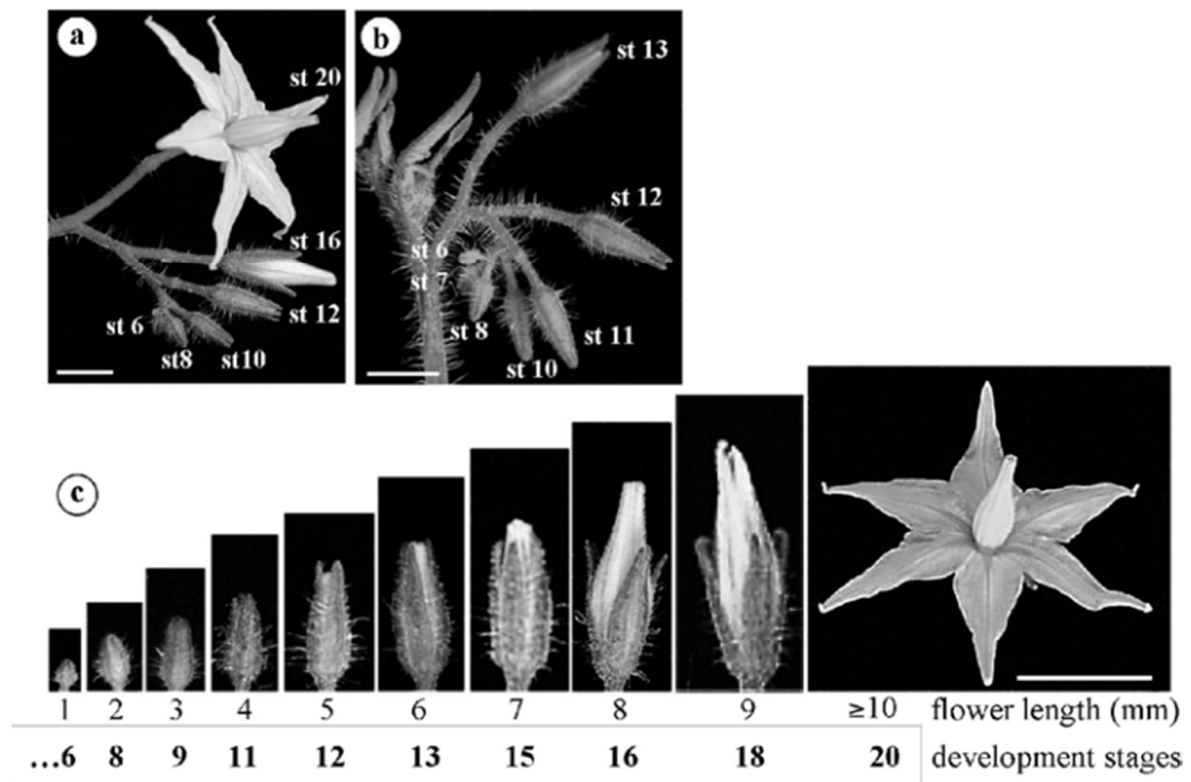
### Annexe S1 : Composition du vecteur pCR4-TOPO (Thermofisher, thermofisher.com)



#### Comments for pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> 3956 nucleotides

- lac* promoter region: bases 2-216
  - CAP binding site: bases 95-132
  - RNA polymerase binding site: bases 133-178
  - Lac repressor binding site: bases 179-199
  - Start of transcription: base 179
  - M13 Reverse priming site: bases 205-221
  - LacZ $\alpha$ -*ccdB* gene fusion: bases 217-810
    - LacZ $\alpha$  portion of fusion: bases 217-497
    - ccdB* portion of fusion: bases 508-810
  - T3 priming site: bases 243-262
  - TOPO<sup>®</sup> Cloning site: bases 294-295
  - T7 priming site: bases 328-347
  - M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
  - Kanamycin promoter: bases 1021-1070
  - Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
  - Ampicillin (*b/a*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
  - Ampicillin (*b/a*) promoter: bases 3064-3160 (c)
  - pUC origin: bases 3161-3834
- (c) = complementary strand

Annexe S2 : Stades de Brukhin du développement floral de *Solanum lycopersicum* (Brukhin et al., 2003)



Annexe S3 : : Récapitulatif des croisements entre les plantes de *Solanum chilense*, avec le taux de mise à fruit, de production de graines et de fruits morts (n'ayant pas donné de graines).

Femelles	Mâles	Nombre de fleurs pollinisées	Nombre de fruits totaux	Taux de mise à fruit (en %)	Nombre de graines totales	Fruits avec graines (en %)	Fruits sans graines (en %)	Fruits morts (en %)
PIS 19	PIS 10	23	0	0	0	0	0	0
PIS 21	PIS 9	24	0	0	0	0	0	0
PIS 21	PIS 10	22	0	0	0	0	0	0
PIS 23	PIS 19	17	3	23,0769231	49	100	0	0
PIS 23	PIS 9	17	4	23,5294118	7	0	0	100
PIS 19	PIS 9	20	1	5	0	0	0	100
PIS 19	PIS 17	9	1	11,1111111	0	0	0	100
PIS 9	PIS 10	20	2	10	8	50	50	0
PIS 19	PIS 21	22	0	0	0	0	0	0
PIS 23	PIS 10	11	11	100	114	81,81	0	27,27
PIS 19	PIS 23	12	3	25	49	100	0	0
PIS 21	PIS 6	23	6	26,086957	0	0	0	100
PIS 23	PIS 17	21	11	30	9	60	40	0
PIS 23	PIS 14	20	8	55	67	75	0	25
PIS 9	PIS 14	20	6	30	48	33,33	0	66,66
PIS 6	PIS 14	14	1	7,1428571	13	0	0	100
PIS 10	PIS 14	19	9	47,3684211	174	100	0	0
PIS 9	PIS 17	20	4	10	39	50	0	50
PIS 9	PIS 6	7	2	28,5714286	24	100	0	0
PIS 19	PIS 6	20	0	0	0	0	0	0
PIS 10	PIS 9	23	1	5	3	100	0	0
PIS 26	PIS 9	12	8	10	125	100	0	0
PIS 32	PIS 10	12	5	41,6666667	59	100	0	0
PIS 23	PIS 21	11	9	81,8181818	65	77,77	22,22	0
PIS 31	PIS 32	20	0	0	0	0	0	0

Annexe 4 : Alignements entre la séquence de S-RNase de H9B et allèle S10 S-RNase (n° NCBI EF680088.1).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5       15      25      35      45      55

H9B      CTTGATTCAT GGTTTGTGGC CAGATAATGA GAACAACGTG CTGAATAACT GCAAGCCTAA
S10 allele ----ATTTCAT GGGCTGTGGC CGGATAATGA GAACAACGTG CTGAATAACT GCAAGCCTAA
Clustal Co ***** ** ***** * ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      65      75      85      95     105     115

H9B      ATCTTACAAA GATATAAGGG ATTTGCCCAT TCAAAACAAG ATATACGATC GCTGGCCTGA
S10 allele ATCTTACAAA GATATAAGGG ATTTGCCCAT TCAAAACAAG ATATACGATC GCTGGCCTGA
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      125     135     145     155     165     175

H9B      CTTGAAAAGA GCAAAGTGGT TGTGTATGAA AGATCAAGAG TTCTGGCGAC ATGAATTTAA
S10 allele CTTGAAAAGA GCAAAGTGGT TGTGTATGAA AGATCAAGAG TTCTGGCGAC ATGAATTTAA
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      185     195     205     215     225     235

H9B      TAAGCATGGA TCGTGCAGCA TGGACAGATA CGATCAAAAA GCATATTTTCG ATTTAGCTAT
S10 allele TAAGCATGGA TCGTGCAGCA TGGACAGATA CGATCAAAAA GCATATTTTCG ATTTAGCTAT
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      245     255     265     275     285     295

H9B      AAATTTAAAG GACAAGTTTG ACCTTTTGAC AACTCTCCGG AAACATAGAA TTTATCCTGG
S10 allele AAATTTGAAG GACAAGTTTG ACCTTTTGAC AACTCTCCGG AAACATAGAA TTTATCCTGG
Clustal Co ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305     315     325     335     345     355

H9B      ATTCGCTTAT ACTGTTAAAG AAATTGGGGA TGCTATCAAA ACAGTTACGA CGGTTTATCC
S10 allele ATTCGCTTAT ACTGTTAAAG AAATTGGGGA TGCTATCAAA ACAGTTACGA CGGTTTATCC
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      365     375     385     395     405     415

H9B      AAACATGAAG TGCACGGTA ATTCTGCAGG ACAAATGGTA CTATTAGAAA TCGGGATATG
S10 allele AAACATGAAG TGCAC----- ----- ----- ----- -----
Clustal Co ***** *****

```

Annexe 5 : Alignements entre la séquence de S-RNase de H13B et les allèles S. peruvianum S16-RNase (n°NCBI AB072458.1) et SP13 S-RNase, (n° NCBI HM357225.1).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5       15      25      35      45      55

S16-RNase ATACATGGGG TGTGCCAGA TAACCATTCT AGGCAGCTGA ATTACTGTGA CCGCCAGGCT
H13B      -TTCATGGTT TATGCCCGGA TAATCACTCG AGGCAGCTAA ATTACTGTGA CCGCCAGGCT
Clustal Co * ***** * ***** ** *** ** ** ***** * ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      65      75      85      95     105     115

S16-RNase ACTTTTGTGG ACGTCCCATT AGGCAAGAAA CTCGATGATC TAGACAAGCG ATGGCCTCAA
H13B      ACTTTTGTGG ACGTCCCATT AGGCAAGAAA CTCGGTATC TAGACAAGCG ATGGCCTCAA
Clustal Co ***** * ***** * ***** **** * ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      125     135     145     155     165     175

S16-RNase CTGAAACACA ATAAGGAATA TGGTGAGAAA CACCAGCCTC ACTGGAGAGA AGAATTCATG
H13B      TTGAAACACA GTAAGAAATA TGGTGAGGAA GCGCAGCCTC ATTGGAGAGA AGAATTCATG
Clustal Co ***** * ***** * ***** ** ***** * ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      185     195     205     215     225     235

S16-RNase AAGCATGGAA CATGTTGCAA AAATCTGTAC AACGAAGAAC AATACTTTGA TTTAGCTATA
H13B      AAGCATGGAA CGTGTGTAA GAATCTATAC AACGAAGAAC AATACTTTGA TCTAGCTATG
Clustal Co ***** * ***** ** ***** ** ***** ***** * *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      245     255     265     275     285     295

S16-RNase AACTTCATAG ATAGGTTTGA TATTTTGAGA ATACTCAGAT ATCACGGAAT TATCCCTGGA
H13B      AACTTGATAG ACAGGTTTGA TATTTTGAGA ATACTTGGAT ATCAGGGGAT TATCCCTGGA
Clustal Co ***** * ***** ***** ***** ***** ** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305     315     325     335     345     355

S16-RNase AAATCTTACA TCGTTCAAAA GGTCCAAGAT GCAATCAGGA CCGTTACGCA TAACTTCTCT
H13B      AATTCTTACA TCGTTCAGAA GGTCCAAGAC GCAATCATGA CCGTTACGCA TAATCTTCTCT
Clustal Co ** ***** ***** ** *** ***** ***** ** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      365     375     385     395     405     415

S16-RNase AAGCTCCAGT GCCTTGAGAA TTCTGTAGGA TTGGAAGTAT CTGAGGTTGG TATAT-----
H13B      AAGCTCCAGT GCCTTGAGAG TTCTCTGGA TTTGAACTAA GTGAGGTAGT TATATGTTTC
Clustal Co ***** ***** **** * ** ** ***** ***** * *****

```

Annexe 6 : Alignement entre la séquence de 5-RNase de PIS 9 et l'allèle S10  
 5-RNase (n° NCBI EF680088.1).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5       15      25      35      45      55

S10 allele ATTCATGGGC TGTGGCCGGA TAATGAGAAC AACGTGCTGA ATAACTGCAA GCCTAAATCT
PIS 9      ---ATGGAT TGTGGSCTGA TAATGAGAAC AACGTGCTGA ATAACTGCAA GCCTAAATCT
Clustal Co ***** * ** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      65      75      85      95      105     115

S10 allele TACAAAGATA TAAGGGATTG GCCCATTCAA AACAAGATAT ACGATCGCTG GCCTGACTTG
PIS 9      TACAAAGATA TAAGGGATTG GCCCATTCAA AACAAGATAT ACGATCGCTG GCCTGACTTG
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      125     135     145     155     165     175

S10 allele AAAAAGAGCAA AGTGGTTGTG TATGAAAGAT CAAGAGTTCT GGCGACATGA ATTTAATAAG
PIS 9      AAAAAGAGCAA AGTGGTTGTG TATGAAAGAT CAAGAGTTCT GGCGACATGA ATTTAATAAG
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      185     195     205     215     225     235

S10 allele CATGGATCGT GCAGCATGGA CAGATACGAT CAAAAAGCAT ATTTTCGATT AGCTATAAAT
PIS 9      CATGGATCGT GCAGCATGGA CAGATACGAT CAAAAAGCAT ATTTTCGATT AGCTATAAAT
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      245     255     265     275     285     295

S10 allele TTGAAGGACA AGTTTGACCT TTTGACAAC CTCCGGAAAC ATAGAATTTA TCCTGGATTC
PIS 9      TTAAAGGACA AGTTTGACCT TTTGACAAC CTCCGGAAAC ATAGAATTTA TCCTGGATTC
Clustal Co ** ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305     315     325     335     345     355

S10 allele GCTTATACTG TAAAGAAAT TGGGGATGCT ATCAAAACAG TTACGACGGT TTATCCAAAC
PIS 9      GCTTATACTG TAAAGAAAT TGGGGATGCT ATCAAAACAG TTACGACGGT TTATCCAAAC
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      365     375     385     395     405     415

S10 allele ATGAAGTGCA CT----- -----
PIS 9      ATGAAGTGCA CTGGTAATTC TGCAGGACAA ATGGTACTAT TAGAAATCGG GATATGCTTC
Clustal Co ***** **

```

Annexe 7 : Alignement entre la séquence de 5-RNase de PIS 9 et les allèles 5. peruvianum S16-RNase (n°NCBI AB072458.1) et SP13 S-RNase, (n° NCBI HM357225.1).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5      15      25      35      45      55
PIS 9 -----CTCG AGGCAGCTAA ATTACTGTGA CCGCCAGGCT
S16-RNase ATACATGGGG TGTGGCCAGA TAACCATTTCG AGGCAGCTGA ATTACTGTGA CCGCCAGGCT
Clustal Co          ***          *          *          *          *          *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      65      75      85      95      105     115
PIS 9 ACTTTTGTTG ACGTCCCGAT AGGCAAGAAA CTCGGTGATC TAGACAAGCG ATGGCCTCAA
S16-RNase ACTTTTGTTG ACGTCCCGTT AGGCAAGAAA CTCGATGATC TAGACAAGCG ATGGCCTCAA
Clustal Co ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      125     135     145     155     165     175
PIS 9 TTGAAACACA GTAAGAAATA TGGTGAGGAA GCGCAGCCTC ATTGGAGAGA AGAATTCATG
S16-RNase CTGAAACACA ATAAGGAATA TGGTGAGAAA CACCAGCCTC ACTGGAGAGA AGAATTCATG
Clustal Co ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      185     195     205     215     225     235
PIS 9 AAGCATGGAA CGTGTGTGAA GAATCTATAC AACGAAGAAC AATACTTTGA TCTAGCTATG
S16-RNase AAGCATGGAA CATGTTGCAA AAATCTGTAC AACGAAGAAC AATACTTTGA TTTAGCTATA
Clustal Co ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      245     255     265     275     285     295
PIS 9 AACTTGATAG ACAGGTTTGA TATTTTGAGA ATACTTGGAT ATCAGGGGAT TATCCCTGGA
S16-RNase AACTTCATAG ATAGGTTTGA TATTTTGAGA ATACTCAGAT ATCACGGAAT TATCCCTGGA
Clustal Co ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305     315     325     335     345     355
PIS 9 AATTCTTACA TCGTTCAGAA GGTCAAGAC GCAATCATGA CCGTTACGCA TAATCTTCCT
S16-RNase AAATCTTACA TCGTTCAAAA GGTCCAAGAT GCAATCAGGA CCGTTACGCA TAACTTCCT
Clustal Co ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      365     375     385     395     405     415
PIS 9 AAGCTCCAGT GCCTTGAGAG TTCTCTGGA TTTGAACTAA GTGAGGTAGT TATATGTTTC
S16-RNase AAGCTCCAGT GCCTTGAGAA TTCTGTAGGA TTGGAECTAT CTGAGGTTGG TATAT-----
Clustal Co ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



Annexe S9 : Alignement des séquences utilisées pour la création de l'arbre phylogénétique des gènes *ODC*.

```

              10          20          30          40          50          60
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Solanum_chacoen ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Solanum_tuberos ATTATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Solyc04g082030 ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Sopim04g082030 ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
SOLCI004909300 ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Sopen04g_5      ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Sopen04g_a      ---ATGGCCGGCCAAACAGTCATTGTTTCCGGTTTGAA-----TCCGGCGGCCATTCT
Solyc03g098310 ---ATGTTA-----
Sopim03g098310 ---ATGTTA-----
Sopen03g029060 -----
SOLCI004508500 ---ATGTTA-----
Sopen03g029010 -----
Solyc03g098300 ---AAGATACTTTAGAGATTGACATTATTGTATATAAAGGAGAGGTAGGAAGCCTATTTT
Sopim03g098300 -----
Sopen03g029030 -----
Sopen03g029020 -----
Sopen03g029050 -----
Sopen03g029040 -----

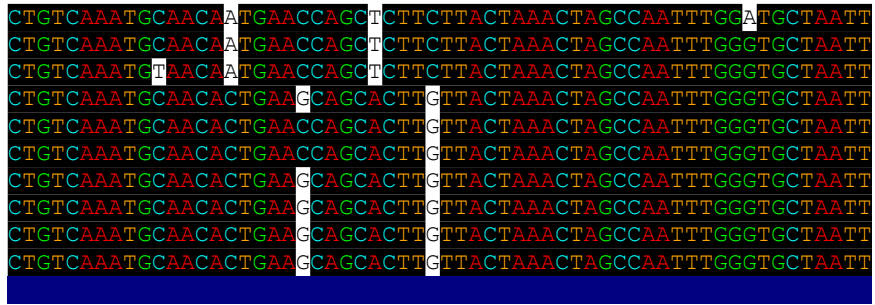
              70          80          90          100         110         120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 TCAGTCCCAATCGGYGGAGCTCCGGTGGC-----AGCGGCGGCGGAGAACG
Solanum_chacoen TCAGTCCCAATCGGCGGAGTTCGGTGGC-----AGCAGCGGCGGAGAACG
Solanum_tuberos TCAGTCCCAATCGGCGGAGTTCGGTGGC-----AGCAGCGGCGGAGAACG
Solyc04g082030 TCAGTCCCAATCGGTGGAGCTCCGGTGGC-----AGCGGCGGCGGAGAACG
Sopim04g082030 TCAGTCCCAATCGGTGGAGCTCCGGTGGC-----AGCGGCGGCGGAGAACG
SOLCI004909300 TCAGTCCCAATCGGTGGAGCTCCGGTGGC-----AGCGGCGGCGGAGAACG
Sopen04g_5      TCAGTCCCAATTGGCGGAGCTCCGGTGGC-----AGCGGCGGCGGAGAACG
Sopen04g_a      TCAGTCCCAATTGGCGGAGCTCCGGTGGC-----AGCGGCGGCGGAGAACG
Solyc03g098310 -CTGTCTCATCTCATGTCATGTC-----
Sopim03g098310 -CTGTCTCATCTCATGTCATGTC-----
Sopen03g029060 -ATGTCCAAA-----
SOLCI004508500 -TGTCTCAGCTCATGTCATGTC-----
Sopen03g029010 -ATGTCTCAAATTTTGGT-----
Solyc03g098300 CATATCATCAAGTTAAAAACTAGCTAGCTTTTATACATCAAAGCATTATATTTGTTTA
Sopim03g098300 -ATGTCTA-----
Sopen03g029030 -ATGTCTCAAATTTTGGT-----
Sopen03g029020 -ATGTCTCAAATTTTGGT-----
Sopen03g029050 -ATGTCTCAAATTTTGGT-----
Sopen03g029040 -ATGTCTCAAATTTTGGT-----

              130         140         150         160         170         180
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 GCCATACSGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Solanum_chacoen GCCATACCGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Solanum_tuberos GCCATACCGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Solyc04g082030 GCCATACGAGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Sopim04g082030 GCCATACGAGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
SOLCI004909300 GCCATACGAGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Sopen04g_5      GCCATACGAGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Sopen04g_a      GCCATACGAGAAAAGTTGTTCCCTCTGTCAAAAGATGC---CCTTCAGGATTTCATGGTTT
Solyc03g098310 -----CAAATAC-----CAAAAGATGGCACCATGACTGATTTAATCCGTT
Sopim03g098310 -----CAAATAC-----CAAAAGATGGCACCATGACTGATTTAATCCGTT
Sopen03g029060 -----TACCAAAAGATGGCACCATGACTGATTTAATCCGTT
SOLCI004508500 -----CAAATAC-----CAAAAGATGGCACCATGACTGATTTAATCCGTT
Sopen03g029010 -----AAAATTACTGTTGTAGCAAAAGCG---CATGACAAATTTAATCCGTT

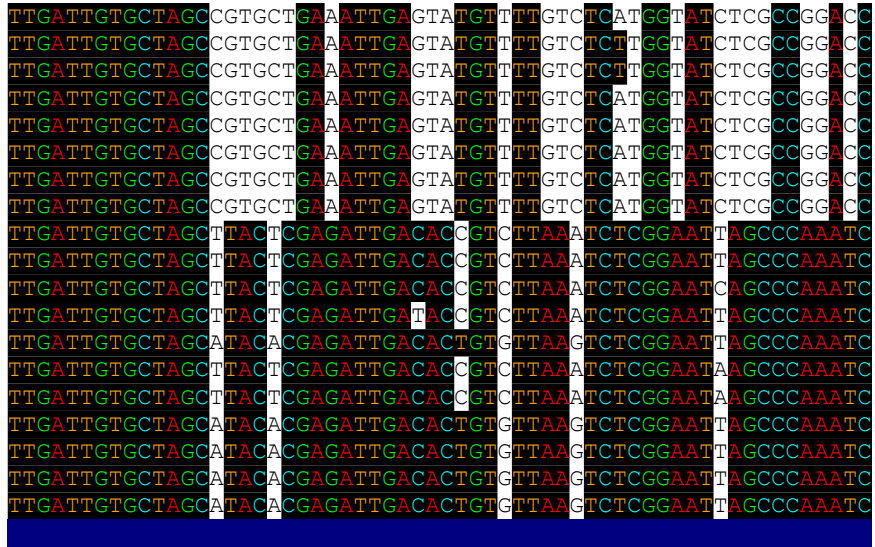
```



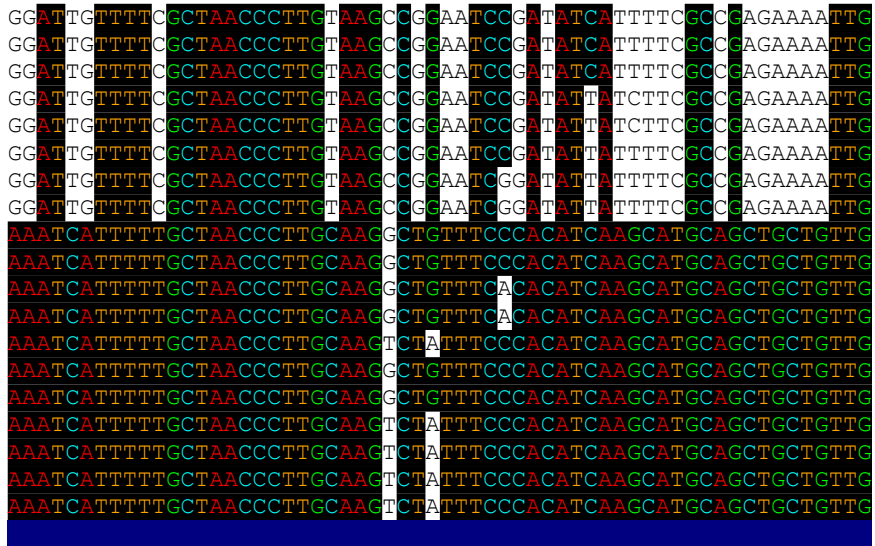
Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040



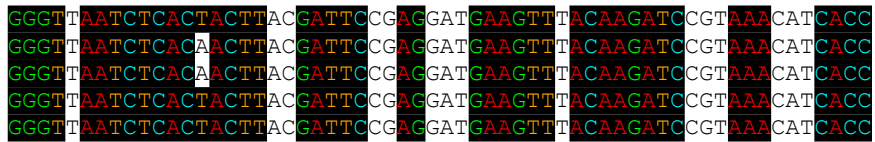
pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040



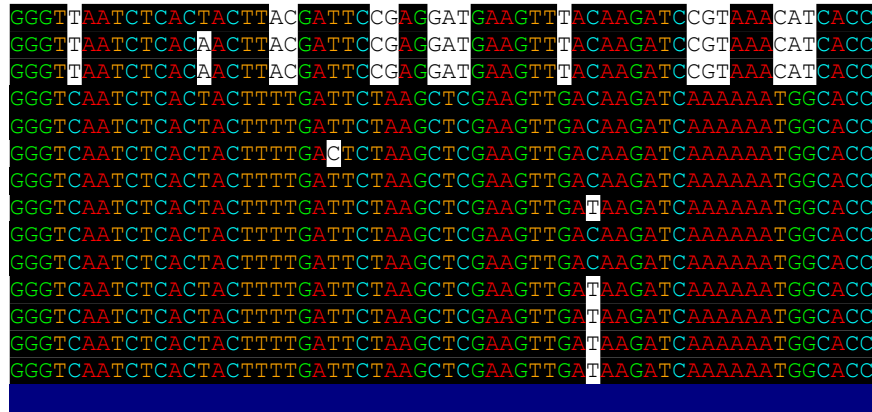
pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040



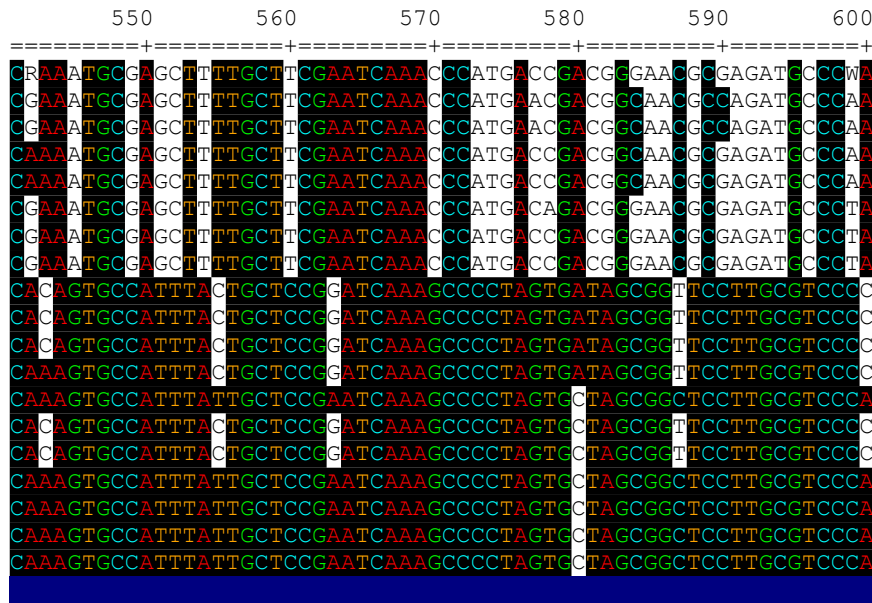
pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030



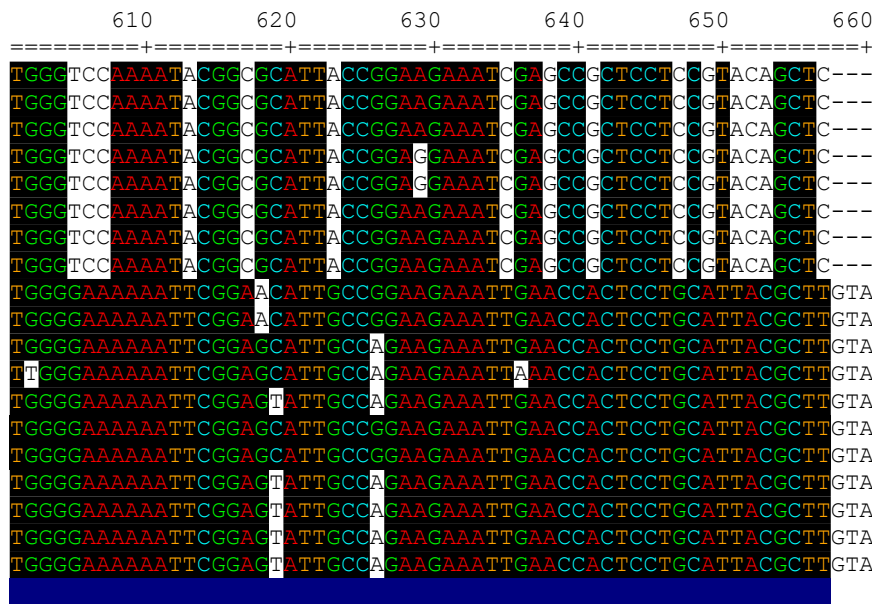
SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040



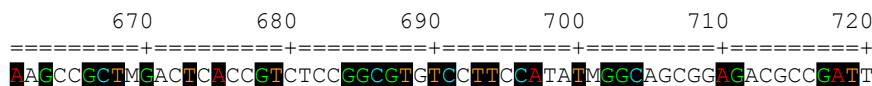
pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040



pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040



pSolyc04g082030



Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040

730 740 750 760 770 780  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+

pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040

790 800 810 820 830 840  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+

pSolyc04g082030  
 Solanum\_chacoen  
 Solanum\_tuberos  
 Solyc04g082030  
 Sopim04g082030  
 SOLCI004909300  
 Sopen04g\_5  
 Sopen04g\_a  
 Solyc03g098310  
 Sopim03g098310  
 Sopen03g029060  
 SOLCI004508500  
 Sopen03g029010  
 Solyc03g098300  
 Sopim03g098300  
 Sopen03g029030  
 Sopen03g029020  
 Sopen03g029050  
 Sopen03g029040

```

      850      860      870      880      890      900
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 TCACCGCCGCTGCTCCCGCGTTAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGCACTTCCCTG
Solanum_chacoen TCACCTCCGCTGCTCCCGCGTGAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGAACTCCCCGG
Solanum_tuberos TCACCTCCGCTGCTCCCGCGTGAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGAACTCCCCGG
Solyc04g082030 TCACCGCCGCTGCTCCCGCGTTAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGCACTTCCCTG
Sopim04g082030 TCACCGCCGCTGCTCCCGCGTTAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGCACTTCCCTG
SOLCI004909300 TCACCGCCGCTGCTCCCGCGTTAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGCACTTCCCTG
Sopen04g_5 TCACCGCCGCTGCTCCCGCGTTAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGCACTTCCCTG
Sopen04g_a TCACCGCCGCTGCTCCCGCGTTAAATCAGCTCTGGA AACCTTCCAGCACTTCCCTG
Solyc03g098310 TCGAAGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ACTATTTACCCGA---CCTTA
Sopim03g098310 TCGAAGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ACTATTTACCCGA---CCTTA
Sopen03g029060 TCGAAGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ACTATTTACCCGA---TCTTA
SOLCI004508500 TCGAAGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ACTATTTACCCGA---CCTTA
Sopen03g029010 -----TATACCTTACTCA-----
Solyc03g098300 TCGAGGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ATTTTCCCCGA---CCCTA
Sopim03g098300 TCGAGGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ATTTTCCCCGA---CCCTA
Sopen03g029030 TCGAGGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ATTTTCCCCGA---CCCAA
Sopen03g029020 TCGAGGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ATTTTCCCCGA---CCCTA
Sopen03g029050 TCGAGGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ATTTTCCCCGA---CCCTA
Sopen03g029040 TCGAGGAAATAGCTACTGTAGTAAACGAAGCAGTCCAAG ATTTTCCCCGA---CCCTA

```

```

      910      920      930      940      950      960
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 AGCTAACCATCATC GCTGAACCMGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--AGCGTTCACTTTAGC
Solanum_chacoen AGCTAACAATCATC GCTGAACCGGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--GCGTTCACTTTAGC
Solanum_tuberos AGCTAACAATCATC GCTGAACCGGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--GCGTTCACTTTAGC
Solyc04g082030 AGCTAACCATCATC GCTGAACCMGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--AGCGTTCACTTTAGC
Sopim04g082030 AGCTAACCATCATC GCTGAACCMGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--AGCGTTCACTTTAGC
SOLCI004909300 AGCTAACCATCATC GCTGAACCMGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--AGCGTTCACTTTAGC
Sopen04g_5 AGCTAACCATCATC GCTGAACCMGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--AGCGTTCACTTTAGC
Sopen04g_a AGCTAACCATCATC GCTGAACCMGGT CGTTCCTTCG CCGAAAC--AGCGTTCACTTTAGC
Solyc03g098310 GTTTAAACAATAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopim03g098310 GTTTAAACAATAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopen03g029060 ATTTAACAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--GCTTTTACTTTAGT
SOLCI004508500 GTTTAAACAATAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopen03g029010 -----GAGAGCTCAAGACTT-----AAGAAACAAA GAGGTCATTTCCATT
Solyc03g098300 ATTTGAAAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopim03g098300 ATTTGAAAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopen03g029030 ATTTGAAAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopen03g029020 ATTTAAAAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopen03g029050 ATTTAAAAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT
Sopen03g029040 ATTTAAAAATAAATT GCAGAGCCTGGG CGTTCCTTTC CTGAAAC--TGCTTTTACTTTAGT

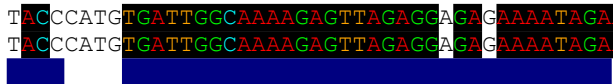
```

```

      970      980      990      1000      1010      1020
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TMCTGGATCAACGAYGG
Solanum_chacoen AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
Solanum_tuberos AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
Solyc04g082030 AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
Sopim04g082030 AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
SOLCI004909300 AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
Sopen04g_5 AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
Sopen04g_a AACRACCATCATC GGC AAAAGAGT CAGAGGTGA ATTAAAAGAA TACTGGATCAACGATGG
Solyc03g098310 CACACATG TGATTGGT AAAAGAGTTAGAGGTGA GAAAGATAGA GTATTGGATTGACGAAGG
Sopim03g098310 CACACATG TGATTGGT AAAAGAGTTAGAGGTGA GAAAGATAGA GTATTGGATTGACGAAGG
Sopen03g029060 CACACATG TGATTGGT AAAAGAGTTAGAGGTGA GAAAGATAGA GTATTGGATTGACGAAGG
SOLCI004508500 CACACATG TGATTGGT AAAAGAGTTAGAGGTGA GAAAGATAGA GTATTGGATTGACGAAGG
Sopen03g029010 ACC----TCATGGTCAAGATCTG GTAAAGCACTTAACTA-----
Solyc03g098300 TACCCATG TGATTGGCAAAAAGAGTTAGAGGAGACAAAATAGAA TATTGGATTGATGAGGG
Sopim03g098300 TACCCATG TGATTGGCAAAAAGAGTTAGAGGAGACAAAATAGAA TATTGGATTGATGAGGG
Sopen03g029030 TACCCATG TGATTGGCAAAAAGAGTTAGAGGAGACAAAATAGAA TATTGGATTGATGAGGG
Sopen03g029020 TACCCATG TGATTGGCAAAAAGAGTTAGAGGAGACAAAATAGAA TATTGGATTGATGAGGG

```

Sopen03g029050 TACCCATGTCGATTGGCAAAAGAGTTAGAGGAGAGAAAATAGAAATTATTGGATTGATGAGGG  
 Sopen03g029040 TACCCATGTCGATTGGCAAAAGAGTTAGAGGAGAGAAAATAGAAATTATTGGATTGATGAGGG



1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+  
 pSolyc04g082030 GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCGACGGYGACSKCGRGCCATT  
 Solanum\_chacoen GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCTACGGTGACGGCGACGCCATT  
 Solanum\_tuberos GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCTACGGTGACGGCGACGCCATT  
 Solyc04g082030 GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCGACGGTGACGGCGACGCCATT  
 Sopim04g082030 GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCGACGGTGACGGCGACGCCATT  
 SOLCI004909300 GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCGACGGTGACGGCGACGCCATT  
 Sopen04g\_5 GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCGACGGTGACGGCGACGCCATT  
 Sopen04g\_a GTTATACGGATCGATGAACTGTGTACTTTACGACCATGCGACGGTGACGGCGACGCCATT  
 Solyc03g098310 GATTTATGGATCATTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopim03g098310 GATTTATGGATCATTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopen03g029060 GATTTATGGATCATTAGGCCAACACTTTATAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 SOLCI004508500 GATTTATGGATCATTAGGCCAACACTTTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopen03g029010 -----  
 Solyc03g098300 GGTTTATGGATCGTTTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopim03g098300 GGTTTATGGATCGTTTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopen03g029030 GGTTTATGGATCGTTTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopen03g029020 GGTTTATGGATCGTTTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopen03g029050 GGTTTATGGATCGTTTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----  
 Sopen03g029040 GGTTTATGGATCGTTTAGGCCAACACTGTACAACAGTTGCTTTGTGG-----

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+  
 pSolyc04g082030 AGCGTGCATGTCGAATCGTAAATCAACTCACTRCRRCRGSTCGAAAACGTT-----  
 Solanum\_chacoen AGCATGCATGTCGAATCGTAAACAACCTCAACTGCGGGGGGTGCGAAAACGTT-----  
 Solanum\_tuberos AGCGTGCATGTCGAATCGTAAACAACCTCAACTGCGGGCGGGTTCGAAAACGTT-----  
 Solyc04g082030 AGCGTGCATGTCGAATCGTAAATCAACTCAACTGCGGGCGGGTTCGAAAACGTT-----  
 Sopim04g082030 AGCGTGCATGTCGAATCGTAAATCAACTCAACTGCGGGCGGGTTCGAAAACGTT-----  
 SOLCI004909300 AGCGTGCATGTCGAATCGTAAACAACCTCAACTGCGGGCGGGTTCGAAAACGTT-----  
 Sopen04g\_5 AGCGTGCATGTCGAATCGTAAATCAACTCAAGCTGCGGGCGGGTTCGAAAACGTT-----  
 Sopen04g\_a AGCGTGCATGTCGAATCGTAAATCAACTCAAGCTGCGGGCGGGTTCGAAAACGTT-----  
 Solyc03g098310 -----GTATCAAGCCAATTTCAA TGAAATC-----AGAATGTTGTAAAATAC  
 Sopim03g098310 -----GTATCAAGCCAATTTCAA TGAAATC-----AGAATGTTGTAAAATAC  
 Sopen03g029060 -----GTATCAAGCCAATTTCAA TGAAAGCATCAGAAGAATGTTGTAAAATAT  
 SOLCI004508500 -----GTATCAAGCCAATTTCAA TGAAAGCATCAGAAGAATGTTGTAAAATAT  
 Sopen03g029010 -----AAAGCCAGCAAGCTTAAAG-----AAAAGG-----  
 Solyc03g098300 -----GCATCAAACCAATTTCAA CGAA-----AGAAAGTTGTGAAAATAC  
 Sopim03g098300 -----GCATCAAACCAATTTCAA CGAA-----AGAAAGTTGTGAAAATAC  
 Sopen03g029030 -----GCATCAAACCAATTTCAA TGAA-----AGAAAGTTGTGAAAATAC  
 Sopen03g029020 -----GCATCAAACCAATTTCAA TGAA-----AGAAAGTTGTGAAAATAC  
 Sopen03g029050 -----GCATCAAACCAATTTCAA TGAA-----AGAAAGTTGTGAAAATAC  
 Sopen03g029040 -----GCATCAAACCAATTTCAA TGAA-----AGAAAGTTGTGAAAATAC



1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+  
 pSolyc04g082030 ----TCCGTCGACTGTATTTCRRGSCACCTGTGATGCRCTTGATACC GYGTAAAGGGATT  
 Solanum\_chacoen ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTCGATACC GTGTTAAGGGATT  
 Solanum\_tuberos ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTTGATACC GTGTTAAGGGATT  
 Solyc04g082030 ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTTGATACC GTGTTAAGGGATT  
 Sopim04g082030 ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTTGATACC GTGTTAAGGGATT  
 SOLCI004909300 ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTTGATACC GTGTTAAGGGATT  
 Sopen04g\_5 ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTTGATACC GTGTTAAGGGATT  
 Sopen04g\_a ----TCCGTCGACTGTATTTCGGGCCACCTGTGATGCACCTTGATACC GTGTTAAGGGATT  
 Solyc03g098310 GTGAATCATCGACTATTTACGGACCAAGTTGTGACTCCCTTGATG CAGTGGCCATTGACA  
 Sopim03g098310 GTGAATCATCGACTATTTACGGACCAAGTTGTGACTCCCTTGATG CAGTGGCCATTGACA  
 Sopen03g029060 GTGAATCATCGACTATTTACGGACCAAGTTGTGACTCCCTTGATG CAGTGGCCATTGACA  
 SOLCI004508500 GTGAATCATCGACTATTTACGGACCAAGTTGTGACTCCCTTGATG CAGTGGCCATTGACA  
 Sopen03g029010 -----AAGCACTGCTAAAGTTCCACAGGATG

Solyc03g098300 GCGA---GTCGACCATTTACGGACCAAGTTGTGACTG**CCTTGATAAAAGTGG**CTGAGGACA  
 Sopim03g098300 GCGA---GTCGACCATTTACGGACCAAGTTGTGACTG**CCTTGATAAAAGTGG**CTGAGGACA  
 Sopen03g029030 GCAA---GTCGACGATTTACGGACCAAGTTGTGACTA**CCTTGATAAAAGTGG**CTGAGGACA  
 Sopen03g029020 GCGA---GTCGACGATTTACGGACCAAGTTGTGACTG**CCTTGATAAAAGTGG**CTGAGGACA  
 Sopen03g029050 GCGA---GTCGACGATTTACGGACCAAGTTGTGACTG**CCTTGATAAAAGTGG**CTGAGGACA  
 Sopen03g029040 GCGA---GTCGACGATTTACGGACCAAGTTGTGACTG**CCTTGATAAAAGTGG**CTGAGGACA

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+  
 pSolyc04g082030 AC**CAGTKA**CCGGAGY**TACA**GGTTAATGATTGGCTGATT**TTTCC**TAAT**ATGG**GTGCTTATA  
 Solanum\_chacoen AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTG**GT**TTTCC**TAAT**ATGGGTGCTTATA  
 Solanum\_tuberos AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTG**GT**TTTCC**TAAT**ATGGGTGCTTATA  
 Solyc04g082030 AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTGATT**TTTCC**TAAT**ATGG**GTGCTTATA  
 Sopim04g082030 AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTGATT**TTTCC**TAAT**ATGG**GTGCTTATA  
 SOLCI004909300 AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTGATT**TTTCC**TAAT**ATGG**GTGCTTATA  
 Sopen04g\_5 AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTGATT**TTTCC**TAAT**ATGG**GTGCTTATA  
 Sopen04g\_a AC**CAGTTA**CCGGAGCT**TACA**GGTTAATGACTGCTGATT**TTTCC**TAAT**ATGG**GTGCTTATA  
 Solyc03g098310 **TACA**AATTC**CCTGAGCTA**GA**ATTAGATG**ATT**FGATTGT**ATT**CTATAACATGG**GCGCATACT  
 Sopim03g098310 **TACA**AATTC**CCTGAGCTA**GA**ATTAGATG**ATT**FGATTGT**ATT**CTATAACATGG**GCGCATACT  
 Sopen03g029060 **TACA**AATTC**CCTGAGCTA**GA**ATTAGATG**ATT**FGATTGT**ATT**CTATAACATGG**GCGCATACT  
 SOLCI004508500 **TACA**AATTC**CCTGAGCTA**GA**ATTAGATG**ATT**FGATTGT**ATT**CTATAACATGG**GCGCATACT  
 Sopen03g029010 CT**CA**---**TAAAGGA**ACT**CAAG**GCT**GATG**---**TACGTCAT**TT**CTG****TAAAA**GA-----  
 Solyc03g098300 **TAAA**AATTG**CCGGAGCTT****CAGTTG****GATG**ATT**FGATA**GT**TTCTATAACATGG**GTGCATATT  
 Sopim03g098300 **TAAA**AATTG**CCGGAGCTT****CAGTTG****GATG**ATT**FGATA**GT**TTCTATAACATGG**GTGCATATT  
 Sopen03g029030 **TAAA**AATTG**CCGGAGCTT****CAGTTG****GATG**ATT**FGATA**GT**TTCTATAACATGG**GTGCATATT  
 Sopen03g029020 **TAAA**AATTG**CCGGAGCTT****CAGTTG****GATG**ATT**FGATA**GT**TTCTATAACATGG**GCGCATATT  
 Sopen03g029050 **TAAA**AATTG**CCGGAGCTT****CAGTTG****GATG**ATT**FGATA**GT**TTCTATAACATGG**GCGCATATT  
 Sopen03g029040 **TAAA**AATTG**CCGGAGCTT****CAGTTG****GATG**ATT**FGATA**GT**TTCTATAACATGG**GTGCATATT

1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+  
 pSolyc04g082030 C**RAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTYAATGGAT**T**TAACACATCCGCA**-----  
 Solanum\_chacoen C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTCAATGGAT**T**TAATACATCCGCA**-----  
 Solanum\_tuberos C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTCAATGGAT**T**TAATACATCCGCA**-----  
 Solyc04g082030 C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTCAATGGAT**T**TAACACATCCGCA**-----  
 Sopim04g082030 C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTCAATGGAT**T**TAACACATCCGCA**-----  
 SOLCI004909300 C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTAATGGAT**T**TAACACATCCGCA**-----  
 Sopen04g\_5 C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTCAATGGAT**T**TAACACATCCGCA**-----  
 Sopen04g\_a C**AAA**AGCTGCT**GGATCAA**AT**TTCAATGGAT**T**TAACACATCCGCA**-----  
 Solyc03g098310 C**AA**ATTGTG**CA****GAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGACATGTTATCAA**-----  
 Sopim03g098310 C**AA**ATTGTG**CA****GAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGACATGTTATCAA**-----  
 Sopen03g029060 C**AA**ATTGTG**CA****GAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGACATGTTATCGA**-----  
 SOLCI004508500 C**AA**ATTGTG**CA****GAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGACATGTTATCGA**-----  
 Sopen03g029010 -----**AGGACACTGT****CAGAGA**GAT-----  
 Solyc03g098300 C**AAA**ATGTG**TTGAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGATATGTTATCCA**-----  
 Sopim03g098300 C**AAA**ATGTG**TTGAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGATATGTTATCCA**-----  
 Sopen03g029030 C**AAA**ATGTG**TTGAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGATATGTTACCACCAATTCTGCCTAAAA**  
 Sopen03g029020 C**AAA**ATGTG**TTGAACAAAGTTCAACGGAT**T**TGATATGTTAACCA**-----  
 Sopen03g029050 C**AAA**ATGTG**TTGAACAAAGTTCAACGGAT**T**TGATATGTTAACCA**-----  
 Sopen03g029040 C**AAA**ATGTG**TTGAACAAAGTTCAATGGAT**T**TGATATGTTATCCA**-----

1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+  
 pSolyc04g082030 -----**TTGTTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AAACTAA**-----  
 Solanum\_chacoen -----**TTGTTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AACTAA**-----  
 Solanum\_tuberos -----**TTGGTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AACTAA**-----  
 Solyc04g082030 -----**TTGTTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AAACTAA**-----  
 Sopim04g082030 -----**TTGTTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AAACTAA**-----  
 SOLCI004909300 -----**TTGTTACTCAC**TTAGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AAACTAA**-----  
 Sopen04g\_5 -----**TTGTTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AAACTAA**-----  
 Sopen04g\_a -----**TTGTTACTCAC**TTGC-----**TTATGCTTATCC**-----**AAACTAA**-----  
 Solyc03g098310 -----**CGCCTACCTATAT**TGT-----**TAGCACA**AATTC-----**TACCTAA**-----

```

Sopim03g098310 -----CGCCTACCTATATTGT----TAGCACCAATTC----TACCTAA-----
Sopen03g029060 -----CGCCTACCTATATTGT----TAGCACCAATTC----TACCTAA-----
SOLCI004508500 -----CGCCTACCTATATAGT----TAGCACCAATTC----TACCTAA-----
Sopen03g029010 -----TGCCTGA-----
Solyc03g098300 -----CACCTACCTATCTTGT----TACCACCAATTC----TACCTAAAACTTGGATC
Sopim03g098300 -----CACCTACCTATCTTGT----TACCACCAATTC----TACCTAA-----
Sopen03g029030 CTTGGATCATCTACCCATGCTATGCTATGCTGCTTGTTTTCTATGATTAA-----
Sopen03g029020 -----CACCTACCTATCTTGT----TACCACCAATTC----TACCTAA-----
Sopen03g029050 -----CACCTACCTATCTTGT----TACCACCAATTC----TACCTAA-----
Sopen03g029040 -----CACCTACCTATCTTGT----TACCACCAATTC----TACCTAA-----

```

```

                1390      1400      1410      1420      1430      1440
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 -----
Solanum_chacoen -----
Solanum_tuberos -----
Solyc04g082030 -----
Sopim04g082030 -----
SOLCI004909300 -----
Sopen04g_5 -----
Sopen04g_a -----
Solyc03g098310 -----
Sopim03g098310 -----
Sopen03g029060 -----
SOLCI004508500 -----
Sopen03g029010 -----
Solyc03g098300 AGCTACCTATGCTGCTTGTTTTCTATGATTAAATTTGTTTCCAATCATTAAATTTGTATGA
Sopim03g098300 -----
Sopen03g029030 -----
Sopen03g029020 -----
Sopen03g029050 -----
Sopen03g029040 -----

```

```

                1450      1460      1470      1480      1490
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
pSolyc04g082030 -----
Solanum_chacoen -----
Solanum_tuberos -----
Solyc04g082030 -----
Sopim04g082030 -----
SOLCI004909300 -----
Sopen04g_5 -----
Sopen04g_a -----
Solyc03g098310 -----
Sopim03g098310 -----
Sopen03g029060 -----
SOLCI004508500 -----
Sopen03g029010 -----
Solyc03g098300 TTGTGAGATTAACATATCGCTATTTTATTAATTACAAGCTTAATTTCCCAAATAA
Sopim03g098300 -----
Sopen03g029030 -----
Sopen03g029020 -----
Sopen03g029050 -----
Sopen03g029040 -----

```

Annexe S10 : Alignement des séquences utilisées pour la création de l'arbre phylogénétique du gène *HT-A*.

```

                10      20      30      40      50      60
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola -----ATGGCATTCAAGGCAAATATCTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
Sotub12g024890. -----ATGGCATTCAAGGCAAATATCTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
GU362652.1_Lyco AAAAAATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTTATGCTTATAT
GU362650.1_Sola AAAAAATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTTATGCTTATAT
AB066582.1_Sola -----ATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
AB072480.1_Sola AAAAAATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
Sopim12g009490. -----ATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
AB072490.1_Sola -----ATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
SOLCI005673700 -----ATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
GU362648.1_Sola AAAAAATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
Solyc12g056585. AAAAAATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT
Sopen12g029190 -----ATGGCATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTCTTTGGTTCTTATGATTATAT

```

```

              70          80          90          100         110         120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----
Sotub12g024890. CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----
GU362652.1_Lyco CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAGGGTAAGTTGTTCTAATTGTAGTTTAAAG
GU362650.1_Sola CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAGGGTAAGTTGTTCTAATTGTAGTTTAAAG
AB066582.1_Sola CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----
AB072480.1_Sola CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAGAGTAAGTTGTTCTAATTGTAGTTTAAAG
Sopim12g009490. CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----
AB072490.1_Sola CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----
SOLCI005673700 CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----
GU362648.1_Sola CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAGGGTAAGTTGTTCTAATTGTAGTATTAAG
Solyc12g056585. CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAGGGTAAGTTGTTCTAATTGTAGTTTAAAG
Sopen12g029190 CATCAGAGGTTATTGCAAGGGAATGGTTGAG-----

```

```

              130         140         150         160         170         180
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco TACTAATTACAAATTTTCATATGACAAATTAATAAGTGCATAATGGGATATGGTC--AA
GU362650.1_Sola TACTAATTACAAATTTTCATATGACAAATTAATAAGTGCATAATGGGATATGGTC--AA
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola TACTAATTACAAATTTTCATATGACAAATTAATAAGTGCATAATGGGATATGGTCAAAA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola TACTAATTACAAATTTTCATATGACAAATTAATAAGTGCATAATGGGATAT-GTCAAAA
Solyc12g056585. TACTAATTACAAATTTTCATATGACAAATTAATAAGTGCATAATGGGGTATGGTCAAAA
Sopen12g029190 -----

```

```

              190         200         210         220         230         240
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco AGAGAACTTTTACTTTATGAAATATCTTAGTTTTACCCTTTGTTTTATAGCCTTGTTATT
GU362650.1_Sola AGAGAACTTTTACTTTATGAAATATCTTAGTTTTACCCTTTGTTTTATAGCCTTGTTATT
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola AGAGAACTTTTACTTTATGAAATATCTTAGTTTTACCCTTTGTTTTATAGCCTTGTTATT
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola AGAGAACTTTTACTTCATGAAATATCTTAGTTTTACCCTTTGTTTTATAGCCTTGTTATT
Solyc12g056585. AGAGAACTTTTACTTCATGAAATATCTTAGTTTTACCCTTTGTTTTATAGCCTTGTTATT
Sopen12g029190 -----

```

```

              250         260         270         280         290         300
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco AGCAAATCGTCTCATGCAAATGAGTAATTTTGAACCTTTTTTTTACAAAGTATTGTAATA
GU362650.1_Sola AGCAAATCGTTTCATGCAAATGAGTAATTTTGAACCTTTTTTTTACAAAGTATTGTAATA
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola AGCAAATCGTCAGATGCAAATGAGTAATTTTGAACCTTTT-TTCTATAAAGTATTGTAATA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola AGCAAATCGTCAGATGCAAATGAGTAATTTTGAAGTTTTT-TTTTACAAAGTATTGTAATA
Solyc12g056585. AGCAAATCGTCTCATGTCAATGAGTAATTTTGAACCTTTTCTTTTACGAAGTATTGTAATA
Sopen12g029190 -----

```

```

          310      320      330      340      350      360
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco CGTAAAACCTCAACGTCTAAATTTGGAGCTCATTTATGTTTTAAAATTAAGAGCAAATATGA
GU362650.1_Sola TGTAAAAACCTCAACGTCTATATTGAAGCTCATTTAAATTTTAAAATTAAGCGCAAATATGA
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola TGTAAAAACCTCAACGTCTATATTGGAGCTCACTCAAATTTTAAAATTAAGAGCAAATATGA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola TGTAAAAACCTCAACGTCTATATTGGAGCTCAATTAATTTTAAAATTAAGAGCAATTATGA
Solyc12g056585. TGTAAAAACCTCAACGTCTATATTGAAGCTCATTTAAATTTTAAAATTAAGAGCAAATATAA
Sopen12g029190 -----

```

```

          370      380      390      400      410      420
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco GAGAATTTACCAGTGTAATACTATATAAAAATAGACCCAAAATATAATTAAGGGTAAACATT
GU362650.1_Sola GAGAATTTACTAGTGTAAAAACCTATATAAAAATAGACCCAAAATATAATTAAGGGTAAAATT
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola GAGAATTTACTAGTGTAAAAACCTATATAAAGTAGACCTAAAATATAATTAAGGGTAAAATT
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola GAGAATTTACTAGTGTAAAAACCTATATAAAAATAGACCCAAAATATAATTAAGGGTAAAATT
Solyc12g056585. GAGAATTTACTAGTGTAAAAACCTATATAAAAATAGACCCAAAATATAATTAAGGGTAAAATT
Sopen12g029190 -----

```

```

          430      440      450      460      470      480
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco AAGAAATCTTATATAGTAGCATTAGTTGACTTGTCTAAGCAACCATTGATCCCACATGAA
GU362650.1_Sola AAGAAATCTTATATAGTAGCATTAGTTGACTTGTCTAAGCAACCATTGATCCCACATGAA
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola AAGAAATCTTATATAGTAGCATTAGTTGACTTGTCTAAGCAACCATTGATCCCACATGAA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola AAGAAATCTTATATAGTAGTATTAGTTGACTTGTCTAAGTAACCATTGATCCCACATGAA
Solyc12g056585. AAGAAATCTTATATAGTAGCATTAGTTGACTTGTCTAAGCAACCATTGATCCGACATGAA
Sopen12g029190 -----

```

```

          490      500      510      520      530      540
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco AAAGGTGGTATATTTGACTATATAGAGAAAAAAGAAAATTATAATAATTACT-----
GU362650.1_Sola AAAGGTGGTATATTTGACTATATAGAGAAAAAAGAAAATTAT-AATAATTACT-----
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola AAAGGTGGTATATTTGACTATATGGAGAAAAAAGAAAATTATAATAATTACTATTAAA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola AAAGGTGGTATATTTGACTATATAGAGAAAAAAGAAAATTATAAATAATTACTATTAAA
Solyc12g056585. AAAGGTGGTATATTTGACTATATAGAGAAAAAAGAAAATTAT-AATAATTACTATTAAA
Sopen12g029190 -----

```

```

                    550      560      570      580      590      600
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco -----ATGAAGAAAATGTTATGAACTTCATTATTATATTTTTGATTTTTGAA
GU362650.1_Sola -----ATGAAGAAAATGTTATGAACTTCATTATTATATTTTTGATTTTTGAA
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola ATTAACATGGAAGAATTAAGAAAATGTTATGAACTTAATTATTATATTTTTGATTTTTGAA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola ATTAACATGGAAGAATTAAGAAAATGTTATGAACTTAATTATTTTTATTTTTGATTTTTGAA
Solyc12g056585. ATTAACATGGAAGAATTAAGAAAATGTTATGAACTTAATTATTATATTTTTGATTTTTGAA
Sopen12g029190 -----

```

```

                    610      620      630      640      650      660
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola -----
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco CATATTTTCATTTTTTCTGTTCTCTAACAAAATTATTTGTACACATCAATTTTGGTGCA
GU362650.1_Sola CATATTTTCATTTTTTCTGTTCTCTAACAAAATTATTTGTACACATCAATTTTGGTGCA
AB066582.1_Sola -----
AB072480.1_Sola CATATTTTCATTTTTTCTGTTCTCTCACAAAATTGTTTGTACACATGAATTTTGTATGCA
Sopim12g009490. -----
AB072490.1_Sola -----
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola CATATTTTATTTTTTTTGTCTCTCATAAAAATTGTTTGTACACATGAATTTTGTATGCA
Solyc12g056585. TATATTTTATTTTTTCTGNCTCTCACAAAATTGTTTATACACATGAATTTTGTATGCN
Sopen12g029190 -----

```

```

                    670      680      690      700      710      720
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola AAATGAAGTTCAAAATACATTTGAATTGAACAACCCGACACTCCAAGAAAAAGGTGTGG
Sotub12g024890. AAATGAAGTTCAAAATACATTTGAATTGAACAACCCGACACTCCAAGAAAAAGGTGTGG
GU362652.1_Lyco AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGAATAATCCGACACTTCAGAAAAAGGTG----
GU362650.1_Sola AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGAATAATCCGACACTTCAGAAAAAGGTG----
AB066582.1_Sola AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAGAAAAAGGTGTGG
AB072480.1_Sola AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAAGAAAAAGGTG----
Sopim12g009490. AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAGAAAAAGGTGTGG
AB072490.1_Sola AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAGAAAAAGGTGTGA
SOLCI005673700 AAATGAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAAGAAAAAGGTGTGG
GU362648.1_Sola AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAGAAAAAGGTGTGG
Solyc12g056585. AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAGAAAAAGGTGTGA
Sopen12g029190 AAATCAAGTTCAAAATACATTTGAATTGGACAATCCGACACTCCAGAAAAAGGTG----

```

```

                    730      740      750      760      770      780
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

AF442139.1_Sola TGGGAAAGGTGGGGGATCATTGTTTCCCTAATACAGCGTGTTTGGTTGTAGTTGCCCAA
Sotub12g024890. TGGGAAAGGTGGGGGATCATTGTTTCCCTAATATAGCGTGTTTGGTTGCAGTTGCCCAA
GU362652.1_Lyco -----GGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
GU362650.1_Sola -----GGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
AB066582.1_Sola TGGAAAAGGTGGGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
AB072480.1_Sola -----GTTGGATCGTTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
Sopim12g009490. TGGAAAAGGC-----GGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGCGTTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
AB072490.1_Sola TGGAAAAGGC-----GGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
SOLCI005673700 TGGAAAAGGTGGGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
GU362648.1_Sola TGGAAAAGGTGGGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGTAGTTGCCCAA
Solyc12g056585. TGGAAAAGGC-----GGGGATCATTATTTCCCTAATATAGCGCGTTTGGGTTGCAGTTGCCCAA
Sopen12g029190 -----GGGGATCATTGTTTCCCTAATATAGCGTGTTGGGTTGCAGTTGCCCAA

```

```

              790      800      810      820      830      840
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola AAAA-----GATGATAATAATAATAATAATAAAGATGATGACGATGATGATG-
Sotub12g024890. AAAA AAT-----GATATAATAATAATAATAATAAAGATGACGATGATGATG-
GU362652.1_Lyco AAAAGATAATAAAA---AACATAATAATAATAATAATAAAGATGACGATGATGACG-
GU362650.1_Sola AAAAGATAAT-----AAAACAATAATAATAATAATAAAGATGACGATGATGACG-
AB066582.1_Sola AGATAAT-----AATAATAATAATAATAATAAACAAGATGACGATGATGACA-
AB072480.1_Sola AAAAGATAAC-----AATAACAATAACAATAATAAAGATGACGATGATGATG-
Sopim12g009490. AAAAGATAATAATAATAAACATAATAATAATAATAATAAACAATAACGATGACGATGACGATGA
AB072490.1_Sola AAAAGAT-----AATAATAATAATAATAACAATAATGATGACGATGATGACG-
SOLCI005673700 AAAAGATAATAATAACAATAATAATAATAATAATAATAATGATGACGATGACGATGA
GU362648.1_Sola AAAAGAT-----AATAATAACAATAATAATAAAGATGACGATGATGATG-
Solyc12g056585. AAAAGATAATAATAATAACAATAATAATAATAACAATAACGATGACGATGATGATG-
Sopen12g029190 AAAAGAT-----AATAACAATAATAATAATAAACAATGACGATGACG-----

```

```

              850      860      870      880      890      900
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola -----ATGATAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATTTGCTGTAGAGTAACTAAAG
Sotub12g024890. -----ATGATAGTTTCATCGTAATGTTTGTAAGCCATTTCTTGTAG-----
GU362652.1_Lyco -----ATGATAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
GU362650.1_Sola -----ATGATAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
AB066582.1_Sola -----ATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
AB072480.1_Sola -----ATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
Sopim12g009490. TGACGATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
AB072490.1_Sola -----ATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
SOLCI005673700 TGATGATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
GU362648.1_Sola -----ATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
Solyc12g056585. --ACAATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAGAGAAACAAAAG
Sopen12g029190 -----ATGACAGTTTCATTGGTAATGTTTGTAAGCCATGTTGTTAG-----

```

```

              910      920      930      940
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
AF442139.1_Sola ATATAACATTTTCTTCTGATCCGCTACTCAATATTATATGC--
Sotub12g024890. -----
GU362652.1_Lyco ATATATTAATTTTCTTCCCATCCGCTACTCAATATTATATGG--
GU362650.1_Sola ATATATTAATTTTCTTCCCATCCGCTACTCAATATTATATGG--
AB066582.1_Sola ATATATTAATTTTCTTCCCATCCGCTACTCAATATTATATGGTT
AB072480.1_Sola ATATATTAATTTTCTTCCCATCCGCTACTCAATATTATATGG--
Sopim12g009490. ATATATCATTTTCTTCCCATCCGCTGCTCAATATTATATGG--
AB072490.1_Sola ATATATCATTTTCTTCCCATCCGCTACTCAATATTATATGG--
SOLCI005673700 -----
GU362648.1_Sola ATATATTAATTTTCTTCCCATCCGCTACTCAATATTATATGG--
Solyc12g056585. ATATATCATTTTCTT-----
Sopen12g029190 -----

```

Annexe S11 : Alignement des séquences utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique du gène *HT-B*.

```

          10          20          30          40          50          60
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
Solci005673700  ATGGTATTCAAGGCAAATATTTTGCTTATATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATCATCA
GU362668_Lycope ATGGCATTCAATGCAAATATTTTGCTCATAATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATAATCA
GU362664_Solanu ATGGCATTCAATGCAAATATTTTGCTCATAATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATAATCA
Sotub12g024900  ATGG-----CAAATATTTTGCTTATATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATCATCA
Sopen12g029200  ATGGCATTCAATGCAAATATTTTGCTCATAATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATCATCA
AB072481_Solanu ATGGCATTCAATGCAAATATTTTGCTCATAATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATCATCA
AB066585_Solanu -----ATATCATCA
AB072489_Solanu -----ATATCATCA
Solci005673800  ATGGCATTCAATGCAAATATTTTGCTCATAATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATCATCA
AB072483_Solanu -----ATATCATCA
GU362661_Solanu ATGGCATTCAATTCAAATATTTTGCTCATAATTTTCTTTGGTTCCTTATGATTATATCATCA

          70          80          90          100         110         120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
Solci005673700  GAGGTTATTGCAAGGGAATAGTTGA-----
GU362668_Lycope GAAGTTATTGCAAGGGATATAGTTGAGCCTTCACTTCTATTGCTTGAGGGTAGTTAAGTT
GU362664_Solanu GAAGTTATTGCAAGGGATATAGTTGAGCCTTCACTTCTTTTGCTTGAGGGTAGTTAAGTT
Sotub12g024900  GAAGTTATTGCAAGGGAATAGTTGAGCCTTCACTTCCATTGCTTGAG-----
Sopen12g029200  GAAGTTATTGCAAGGGATATAGTTGAGCCTTCACTTCCATTGCTTGAGGGTAATTAAGTT
AB072481_Solanu GAAGTTATTGCAAGGGATATAGTTGAGCCTTCACTTCCATTGCTTGAGGGTAATTAAGTT
AB066585_Solanu GAGGTTATTGCAAGGGATAGTTGAGCCTTCATTTCCATTGCTTGAGGGTAATTAAGTT
AB072489_Solanu GAGGTTATTGCTTAGGGATAGTTGAGCCTTCATTTCCATTGCTTGAGGGTAATTAAGTT
Solci005673800  GAAGTTATTGCAAGGGCTAGGTTGAGCCTTCACTTCCATTGATT-----
AB072483_Solanu GAGGTTATTGCTTAGGGAAATGTTGAGCCTTCATTTCCATTGCTTGAGGGTAATTAAGTT
GU362661_Solanu GAAGTTATTGCAAGGGATATAGTTGAGCCTTCACTTCCATTGCTTGAGGGTAATTAAGTT

          130         140         150         160         170         180
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
Solci005673700  -----
GU362668_Lycope GTTTTTTAATATATATATATATATATAT-----ATATATATAT-----TTTGT-
GU362664_Solanu GTTTTTTAATATATATATATATATATAT-----ATATATATATATATATATATA
Sotub12g024900  -----
Sopen12g029200  GTTTTTTAATTGTAGTTTTTCTATATTTAATTTTTGAATATATATATATA--TTTTTGT-
AB072481_Solanu GTTTTTTAATTGTAGTTTTTCTATATTTAATTTTTGAACATATATATATAT--TTTTTGT-
AB066585_Solanu GTTTTTCAATTTTAGTTTTTCTATATTTAATTTTTGAACATATATATATATATTTTTTTGT-
AB072489_Solanu GTTTTTCAATTTTAGTTTTTCTATATTTAATTTTTGAACATATATATATATATTTTTTTGT-
Solci005673800  -----
AB072483_Solanu GTTTTTCCATTTTAGTTTTTCTATATTTAATTTTTGAACATATATATATATATATTTTTTGT-
GU362661_Solanu GTTTTTCAATTTGTAGTTTTTCTATATTTAATTTTTGAACATATATATATAT---TTTTTGT-

          190         200         210         220         230         240
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
Solci005673700  -----GCAAATGAAGTTCAAATACAGAAAT
GU362668_Lycope TATCGATCTAATAGAGTTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATTCATAATACAGAAAT
GU362664_Solanu TATCGATCTAATAGAGTTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATTCATAATACAAAT
Sotub12g024900  -----GAAAT
Sopen12g029200  TATCGATCTAATTGAGTTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATTCATAATACAGAAAT
AB072481_Solanu TATCGATCTAATAGAGTTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATTCATAATACAGAAAT
AB066585_Solanu TATCGATTTAATAGAGTTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATCCATAATACAGAGCT
AB072489_Solanu TATCGATTTAATAGAGTTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATCCATAATACAGAGCT
Solci005673800  -----CAAATGAAATCCATAATACAGAGCT

```

AB072483\_Solanu TATCGATTTAATAGTGTGTACGTGTTGGTGTA-GCAAATGAAATCCATAATACA **GAGCT**  
 GU362661\_Solanu TATCGATCTAATAGAGTTGTACGTGTTGGTGTAGGCAAATGAAATCCATAATACA **GAGCT**

```

                250      260      270      280      290      300
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
Solci005673700 GGACAATTTCGACGCTCCAAAAAAAAAGGTGGTGGTGGAAAAGGTGGGGGATC-----ATT
GU362668_Lycope GACAATCCAACACTCCAAAAAAAAAGATGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGGCGGGATG
GU362664_Solanu GACAATCCAACACTACAAAAAAAAAAGGTGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGGCGGGATG
Sotub12g024900 GACAATCCAACGCTCCAAAAAAAAAGGTGGTGG-----ATG
Sopen12g029200 GACAATCCAACACTCCAAAAAAAAAGGTGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGGCGGGATG
AB072481_Solanu GACAATCCAACACTCCAAAAAAAAAGGTGGTGG-----AAAATGGCCGGGATG
AB066585_Solanu GACA-----CTCCAAAAAAAAAGATGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGCCGGGATG
AB072489_Solanu GACA-----CTCCAAAAAAAAAGATGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGCCGGGATG
Solci005673800 GACAATCCAACACTCCAAAAAAAAAGGTGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGCCGGGATG
AB072483_Solanu GACAATCCAACACTCCAAAAAAAAAGGTGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGCCGGGATG
GU362661_Solanu GACAATCCAACACTCCAAAAAAAAAGGTGGTGGTGGTGAAGGTGGAAAATGGCCGGGATG

```

```

                310      320      330      340      350      360
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
Solci005673700 ATTTCCTAATATAGCGTGTTTGGGTTGCAGTTGCCCAAAAAAGATAATAATAACAATAA
GU362668_Lycope GATTTTTGATGCAGCCTATTCACGTTGCCTTGCCCAAGCAAAGATAATAATAATAACAA
GU362664_Solanu GATTTTTGATGCAGCCTGTTCACGTTGCCTTGCCCAAGCAAAGATAATAATAATAACAA
Sotub12g024900 GATTTTTGATGCAGCGTTTCACGTTGCCTTGCCCAAGCAAAGAT-----
Sopen12g029200 GATTTTTGATGCAGCCTGTTCACGTTGCCTTGCCCAAGCAAAGATAATAATAACAACAA
AB072481_Solanu GATTTTTGATGCAGCCTGTTCACGTTGCCACTTGCCCAAGCAAAGATAATAAAAAATAACAA
AB066585_Solanu GATTTTTGATACAGTCTGTTCACGTTGCCTTGCCAAGCAAAAAATAATAATAACAA
AB072489_Solanu GATTTTTGATACAGTCTGTTCACGTTGCCTTGCCAAGCAAAAAATAATAATAACAA
Solci005673800 GATTTTTGATGCAGTCTGTTCACGTTGCCTTGCCAAGCAAAGATAATAATAATAACAA
AB072483_Solanu GATTTTTGACGCAGTCTGTTCACGTTGTCCTTGTCCAAGCAAAAATAAATAATAATAACAA
GU362661_Solanu GATTTTTGACGCAGTCTGTTCACGTTGTCCTTGTCCAAGCAAAAATAAATAATAATAACAA

```

```

=====
Solci005673700 TAATAATAA
GU362668_Lycope TAATAATAA
GU362664_Solanu TAATAATAA
Sotub12g024900 -----
Sopen12g029200 CAACAATAA
AB072481_Solanu TAATAATAA
AB066585_Solanu CAACAATAA
AB072489_Solanu CAACAATAA
Solci005673800 TAATAATAA
AB072483_Solanu TAATAACAA
GU362661_Solanu TAATAACAA

```