

Université catholique de Louvain
Ecole de biologie

Université de Namur
Département de biologie



Étude des barrières de reproduction intraspécifiques chez la tomate sauvage *Solanum chilense*

Schreiber Robin

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

Promotrice : Muriel Quinet (ELIA – GRPV)
Encadrante : Pauline Moreels (ELIA – GRPV)

Année académique 2024-2025

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à exprimer mes remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire. Il n'aurait pas vu le jour sans leur soutien, leurs conseils, et leur accompagnement.

Je commence par remercier chaleureusement Professeure Muriel Quinet, promotrice de ce mémoire, pour son encadrement exemplaire, sa disponibilité inestimable, et son incroyable pédagogie. Vos explications claires, vos corrections minutieuses et vos conseils avisés ont été des piliers tout au long de ce travail. Merci également pour votre soutien constant qui m'a permis d'avancer avec sérénité et confiance.

Un immense merci également à Pauline Moreels, pour ton encadrement, ta disponibilité, tes conseils, et ta bonne humeur. Tes explications et retours constructifs et ton enthousiasme ont contribué à rendre cette année plus enrichissante et agréable.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux techniciens du laboratoire pour leur aide précieuse au quotidien. Une mention particulière à Marie-Eve, dont les explications sur les manipulations de biologie moléculaire et les conseils avisés m'ont beaucoup aidé. Merci aussi à Paul et Brigitte pour le soin apporté à l'entretien de mes plants en serre. Je remercie également les autres membres du GRPV pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur, qui ont créé un environnement de travail agréable et stimulant.

Je tiens à remercier André Lejeune, Corentin Defalque, Muriel Quinet et Pauline Moreels, membres de mon jury, pour leur implication, leurs pistes de réflexion après les séminaires, et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à l'évaluation de mon travail.

Enfin, je tiens à remercier de tout cœur ma maman et Lyse, pour leur soutien, leur patience et leurs relectures attentives. Merci à ma famille d'avoir été à mes côtés tout au long de mes études, m'encourageant dans les moments de doute et m'écoutant parler de tomates pendant une année entière sans jamais perdre patience.

RÉSUMÉ

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) est l'une des plantes maraîchères les plus cultivées au monde. Cependant, sa domestication a considérablement réduit sa diversité génétique, augmentant sa vulnérabilité aux stress biotiques et abiotiques. L'introduction de gènes de résistance issus d'espèces sauvages apparentées, comme *Solanum chilense*, constitue une piste prometteuse afin d'augmenter sa résilience. Originaire du désert d'Atacama, *S. chilense* est intéressante pour sa résistance aux stress hydrique, salin et thermique. Cependant, cette espèce affiche des barrières de reproduction intraspécifiques, notamment une auto-incompatibilité gamétophytique (AIG) ainsi qu'une incompatibilité unilatérale avec la tomate cultivée. Une meilleure compréhension de ces barrières intra- et interspécifiques est nécessaire pour utiliser le potentiel génétique de *S. chilense*. Ce mémoire se concentre sur les barrières intraspécifiques au sein d'une population de *S. chilense*.

Nous avons tout d'abord regardé si la morphologie florale, et notamment l'exsertion du stigmate, était liée à l'AIG comme précédemment suggérée. La surface et la taille des organes floraux ont été mesurées chez plusieurs individus. Des allèles d'AIG (S-allèle) ont été identifiés au niveau du S-locus, et l'expression relative de ces S-allèles ainsi que des gènes *HT-A* et *HT-B* impliqués dans l'AIG a été analysée. Aucune corrélation entre la morphologie florale et l'expression de ces gènes n'a été observée suggérant que le lien supposé précédemment n'est influencé par l'expression de ces gènes.

Ensuite, nous avons étudié la présence d'un gradient de compatibilité dans les croisements et regardé si des différences entre la compatibilité théorique (obtenue à partir des S-allèles) et la compatibilité réelle étaient observées. Des croisements entre individus ont été réalisés afin d'analyser cette compatibilité réelle au niveau prézygotique (germination du pollen et croissance des tubes polliniques) et postzygotique (taux de mise à fruits et à graines). Un gradient de compatibilité réelle entre individus – non prédit par la compatibilité théorique – a été relevé, montrant la complexité de l'AIG.

À partir des données de croisements, nous avons analysé l'état des barrières de reproduction chez *S. chilense*, afin d'étudier la présence d'autres barrières ou l'importance de celle déjà connue. Le taux de germination des grains de pollen, l'arrêt de la croissance des tubes polliniques dans les 1^{er} et 2^e tiers du style lors de croisements non compatibles, ainsi que la corrélation avec le taux de mise à fruit a permis de suggérer l'absence de barrières postzygotiques. De plus, un lien entre le taux de mise à fruit et le nombre de graines par fruit a permis de suggérer que leurs développements ne sont pas forcément indépendants.

Enfin, nous avons étudié le lien entre l'expression de gènes impliqués dans l'AIG et la compatibilité réelle. Bien que des variations d'expression des gènes aient été observées, celles-ci ne semblent pas expliquer les différences de croissance des tubes polliniques, de taux de mise à fruit ou de nombre de graines par fruit, montrant que le rôle précis de ces gènes dans l'AIG reste incertain et que notre compréhension des mécanismes régulant l'AIG chez *S. chilense* doit être approfondie.

ABSTRACT

The cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most cultivated crops in the world. However, its domestication has significantly reduced its genetic diversity, increasing its vulnerability to biotic and abiotic stresses. Introducing resistance genes from wild relatives, such as *Solanum chilense*, represents a promising approach to enhance its resilience. Native to the Atacama Desert, *S. chilense* is particularly interesting due to its resistance to drought, salinity, and heat stress. However, this species shows intraspecific reproductive barriers, i.e. gametophytic self-incompatibility (GSI), and unilateral incompatibility with cultivated tomato. A better understanding of these intra- and interspecific barriers is essential to utilize the genetic potential of *S. chilense*. This master thesis focuses on intraspecific barriers within a population of *S. chilense*.

First, we investigated whether floral morphology, particularly stigma exertion, was linked to GSI as previously suggested. The surface area and size of floral organs were measured in several individuals. GSI alleles (S-alleles) were identified at the S-locus, and the relative expression of these S-alleles as well as *HT-A* and *HT-B* genes involved in GSI was analyzed. No correlation between floral morphology and gene expression was observed, suggesting that the previously hypothesized link is not influenced by the expression of these genes.

Next, we examined the presence of a compatibility gradient in crosses and evaluated whether differences between theoretical compatibility (predicted from S-alleles) and actual compatibility were observed. Crosses between individuals were made to analyze real compatibility at prezygotic levels (pollen germination and pollen tube growth) and postzygotic levels (fruit and seed set rates). A gradient of real compatibility among individuals – unpredicted by theoretical compatibility – was identified, highlighting the complexity of GSI.

Based on crosses, we analyzed the state of reproductive barriers in *S. chilense* to study the presence of other barriers or the importance of the one already known. Pollen germination rates, pollen tube growth in the first and second thirds of the style during incompatible crosses, and their correlation with fruit set rates suggested the absence of postzygotic barriers. Moreover, a relationship between fruit set and seed set suggested that their development might not be entirely independent.

Finally, we studied the relationship between the expression of genes involved in GSI and real compatibility. Although variations in gene expression were observed, they did not seem to explain differences in pollen tube growth, fruit set rates, or seed numbers per fruit. This indicates that the precise role of these genes in GSI remains uncertain, and that further research is needed to better understand the mechanisms regulating GSI in *S. chilense*.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION – REVUE DE LITTÉRATURE.....	6
A. LE CLADE DE LA TOMATE (LYCOPERICON)	6
I. Généralités et taxonomie de la tomate cultivée (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	6
II. Importance de la tomate cultivée.....	7
III. Domestication, importation et changements climatiques	7
IV. Sélection végétale.....	8
V. Généralités de la tomate sauvage <i>Solanum chilense</i> Dun.	9
VI. Distribution géographique et description taxonomique de <i>S. chilense</i>	10
VII. Description morphologique de <i>S. chilense</i>	11
VIII. Caractéristiques génétiques et physiologiques de <i>S. chilense</i>	14
B. LES BARRIÈRES DE REPRODUCTION.....	15
I. Barrières de reproduction intraspécifiques et auto-incompatibilité	15
II. Barrières de reproduction interspécifiques et incompatibilité unilatérale.....	24
PROBLÉMATIQUE, QUESTION DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DU MÉMOIRE ..	28
MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
A. MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITION DE CULTURE.....	31
B. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET MESURE DE L'EXSERTION DU STIGMATE.....	31
C. CROISEMENTS INTRASPÉCIFIQUE DE <i>S. CHILENSE</i>.....	32
I. Taux de mise à fruit et nombre de graines par fruit	32
II. Germination du pollen et croissance des tubes polliniques	32
D. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	33
I. Extraction d'ARN	33
II. Synthèse de cDNA et PCR	34
III. Identification de S-allèles.....	38
IV. Étude d'expression de <i>HT-A</i> , <i>HT-B</i> , <i>S10</i> et <i>S35</i> par RT-qPCR.....	40
E. ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT RACINAIRE PAR BOUTURAGE.....	42
F. ANALYSES STATISTIQUES	43
RÉSULTATS	45
A. PARTIE 1 – MORPHOLOGIE FLORALE ET EXSERTION DU STIGMATE.....	45
B. PARTIE 2 – IDENTIFICATION DES S-ALLÈLES	48
I. Méthode RACE.....	48
II. Méthode oligo(dT) avec amorces S10, S35, S36.....	49
III. Vérification des étapes de la méthode RACE.....	50
IV. Méthode oligo(dT) et amorces « Groupe ».....	52
C. PARTIE 3 – CROISEMENTS INTRASPÉCIFIQUES DE <i>S. CHILENSE</i>.....	57
I. Taux de mise à fruit et nombre moyen de graines par fruit	57
II. Germination du pollen et croissance des tubes polliniques	60
D. PARTIE 4 – EXPRESSION RELATIVE DES GÈNES <i>HT-A</i>, <i>HT-B</i>, <i>S10</i> ET <i>S35</i>	64
E. PARTIE 5 – ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT RACINAIRE PAR BOUTURAGE	66
DISCUSSION.....	68
A. PRÉAMBULE - COMPLEXITÉ DE L'ÉTUDE DES BARRIÈRES DE REPRODUCTION	68
B. OBJECTIF 1 - LIEN ENTRE LA MORPHOLOGIE FLORALE ET LA COMPATIBILITÉ	69
C. OBJECTIF 2 – DIFFÉRENCES ENTRE COMPATIBILITÉ THÉORIQUE ET RÉELLE.....	71
D. OBJECTIF 3 – ÉTAT ET IMPORTANCE DES BARRIÈRES DE REPRODUCTION.....	77
E. OBJECTIF 4 – LIEN ENTRE EXPRESSION GÉNÉTIQUE ET COMPATIBILITÉ	79
F. OBJECTIF 5 – ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT RACINAIRE PAR BOUTURAGE	80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	82
BIBLIOGRAPHIE	85
ANNEXES.....	97

INTRODUCTION – REVUE DE LITTÉRATURE

A. LE CLADE DE LA TOMATE (*LYCOPERICON*)

I. Généralités et taxonomie de la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum* L.)

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum* L.) est l'une des plantes maraichères les plus cultivées au monde (Fernandes et al., 2018). En 2022, plus de 186 millions de tonnes de tomates ont été produites, sur près de 4,9 millions d'hectares (FAOSTAT, 2024).

Solanum lycopersicum L. appartient à la famille des Solanacées, qui comprend plus de 3 000 espèces, dont de nombreuses cultivées pour l'alimentation, comme la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), le poivron (*Capsicum annuum* L.) et l'aubergine (*Solanum melongena* L.) (Knapp & Peralta, 2016). Le genre *Solanum* compte environ 1200 espèces, il est le plus grand genre des Solanacées et l'un des plus grands genres d'angiospermes (Frodin, 2004). Les tomates sont regroupées dans le clade *Lycopersicon* qui comprend 13 espèces, dont 12 espèces sauvages, toutes présentes sur le versant ouest des Andes dans des régions désertiques ou prédésertiques ainsi qu'aux îles Galapagos (Knapp & Peralta, 2016). Au sein du clade *Lycopersicon* on retrouve des espèces à fruit de couleurs rouge-orange, comme *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, ce sont les espèces du sous-groupe *Esculentum* et d'autres espèces à fruit de couleur vert-mauve, comme *Solanum pennellii* et *Solanum chilense* (Figure 1) (Pease et al., 2016; Peralta et al., 2008).

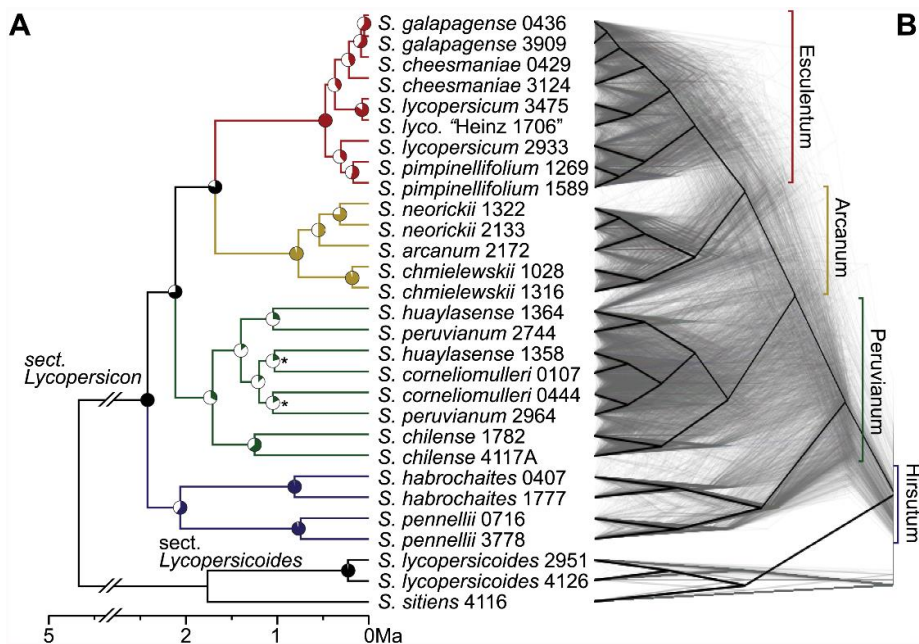


Figure 1 : Phylogénie du clade *Lycopersicon* (A) "Whole-transcriptome concatenated molecular clock phylogeny" de 26 accessions du clade *Lycopersicon* avec le clade *Lycopersicoides* comme outgroup. Les couleurs des branches indiquent les quatre sous-groupes principaux. Tous les nœuds sont possédent 100 répliques bootstrap, sauf « * » qui indique un score de soutien bootstrap de 68. (B) Un « cloudogram » de 2 745 arbres (gris) déduits de fenêtres génomiques de 100-kb qui ne se chevauchent pas. Pour contraster, la phylogénie consensus est représentée en noir (Pease et al., 2016).

II. Importance de la tomate cultivée

La tomate cultivée est une espèce d'intérêt majeur pour plusieurs raisons. Elle présente de nombreuses qualités nutritionnelles par sa teneur élevée en nutriments essentiels et en composés antioxydants bénéfiques pour la santé humaine (minéraux, acides aminés essentiels, acides gras mono-insaturés, caroténoïdes, comme le lycopène) (Ali et al., 2021; Dorais et al., 2008; Gerszberg et al., 2015). Ce dernier est l'un des caroténoïdes principaux de la tomate, il pourrait avoir des propriétés anticancéreuses et jouer un rôle de protection contre les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose et les maladies neurodégénératives (Ali et al., 2021).

Cette espèce est donc largement utilisée dans l'alimentation, mais elle est aussi utilisée comme matériel de recherche. Elle présente plusieurs caractéristiques qui en font un organisme modèle : un cycle de vie court, une culture adaptable à différentes conditions, une production abondante de graines et un génome relativement petit (950 Mb) (Gerszberg et al., 2015). De plus, elle est auto-compatible, autogame, possède un contrôle facile de la pollinisation et de l'hybridation, ainsi qu'une reproduction asexuée par greffage et bouturage (Gerszberg et al., 2015). Elle peut régénérer des plantes entières à partir d'explants (Gerszberg et al., 2015) et peut être génétiquement transformée via *Agrobacterium tumefaciens* (Chetty et al., 2013).

L'intérêt de la tomate cultivée comme organisme modèle en génétique grandit fortement depuis son séquençage, le séquençage d'espèces apparentées (Fernandez-Pozo et al., 2015; Mata-Nicolás et al., 2020; Sato et al., 2012) et depuis la présence d'une grande collection de mutants accessibles (Saito et al., 2011). La tomate est donc utilisée dans les études sur l'évolution et le développement des fruits (Kimura & Sinha, 2008; Yin et al., 2010). Les espèces du clade *Lycopersicon* sont aussi utilisées pour intégrer des outils et des approches génomiques dans la recherche écologique et évolutive des plantes, comme cas de spéciation (Moyle, 2008), ainsi que dans l'étude des barrières de reproduction (Bedinger et al., 2011; Moreels et al., 2023).

III. Domestication, importation et changements climatiques

La domestication de la tomate débute en Amérique latine, l'endroit exact et les premiers événements de cette domestication restent méconnus. Selon les hypothèses, le pays d'origine de domestication de la tomate pourrait être le Mexique ou le Pérou (Peralta & Spooner, 2006). Après son introduction en Europe au XVIe siècle, la domestication de la tomate s'est poursuivie. En se basant sur des caractéristiques phénotypiques telles que la taille et la forme du fruit, ce processus a provoqué un goulot d'étranglement génétique, entraînant une réduction de sa diversité génétique (Bai & Lindhout, 2007; Doebley et al., 2006). Cette sélection a provoqué la

perte de gènes de résistance aux stress biotiques et abiotiques, au profit d'un meilleur rendement (Bai & Lindhout, 2007). Ainsi, la tomate cultivée est sujette à une étendue de stress biotiques (attaque de ravageurs, d'agents pathogènes, ...) et abiotiques (salinité, sécheresse, ...), une fragilité qui est amplifiée par les changements climatiques (Surówka et al., 2020).

Les changements climatiques futurs impacteront négativement les cultures de tomates dans certaines régions, principalement en raison de l'augmentation des températures, de la sécheresse, de la salinisation des sols et de l'accroissement du risque d'épidémies causées par les ravageurs (Litskas et al., 2019). Cammarano et al. (2022) se sont intéressés à l'impact des changements climatiques sur la production de tomate. Ils ont simulé cette production sous différents scénarios climatiques jusqu'en 2100. Les résultats ont montré une grande incertitude quant à cette production future. Des différences régionales ont été observées, avec la possibilité d'augmentation de rendement en Chine, mais des diminutions dans d'autres régions, comme les États-Unis et l'Italie (Cammarano et al., 2022). Bien que l'augmentation des concentrations en CO₂ observées suite aux émissions de gaz à effet de serre puisse améliorer la photosynthèse, elle ne compense que partiellement les effets négatifs du réchauffement climatique sur le rendement des tomates (Cammarano et al., 2022). L'amélioration des résistances de *Solanum lycopersicum* aux stress abiotiques et biotiques représente désormais un des principaux défis à surmonter pour assurer un rendement optimal lors de sa culture (Bai & Lindhout, 2007; Rezk et al., 2021).

IV. Sélection végétale

Il existe plusieurs stratégies afin de renouveler les résistances aux stress abiotiques et biotiques de la tomate cultivée : les stratégies de sélection traditionnelle (sélection sur base des traits phénotypiques, greffage, hybridation) et les stratégies de sélection via les biotechnologies (mutagenèse, édition génétique, techniques *in vitro*, transgénèse) (Rezk et al., 2021). Ces récentes biotechnologies de sélection végétale font l'objet de régulations, de débats juridiques (Turnbull et al., 2021) et soulèvent des questions éthiques, sociales et déontologiques (Louwaars & Jochemsen, 2021).

Le génome de la tomate contient moins de 5% de la diversité génétique observée chez ses espèces sauvages apparentées (Miller & Tanksley, 1990). N'ayant pas subi de goulot d'étranglement génétique, les espèces de tomates sauvages regorgent donc de gènes de résistance aux diverses pressions abiotiques et biotiques, elles peuvent ainsi être utilisées dans un contexte d'amélioration végétale (Rezk et al., 2021).

L'hybridation de la tomate cultivée avec une espèce sauvage résistante apparentée permet d'introgesser des allèles d'intérêt au sein de l'espèce cultivée, c'est actuellement la meilleure stratégie pour améliorer les traits de la tomate par la sélection (Calafiore et al., 2019; Rezk et al., 2021; Vitale et al., 2023). L'introgession se définit comme l'incorporation d'allèle d'une espèce donneuse dans le pool génétique d'une espèce receveuse généralement via hybridation et rétrocroisement (**Figure 2**) (Harrison & Larson, 2014). L'introgession de gènes vers la tomate cultivée a déjà été réalisée à plusieurs reprises, notamment avec l'espèce sauvage *Solanum pennellii*, étant donné la forte compatibilité entre les deux espèces (Calafiore et al., 2019; Eshed & Zamir, 1994; Vitale et al., 2023). D'autres espèces de tomates sauvages pourraient être de bonnes candidates afin d'améliorer la résistance de la tomate cultivée face aux stress, c'est notamment le cas de *Solanum chilense*.

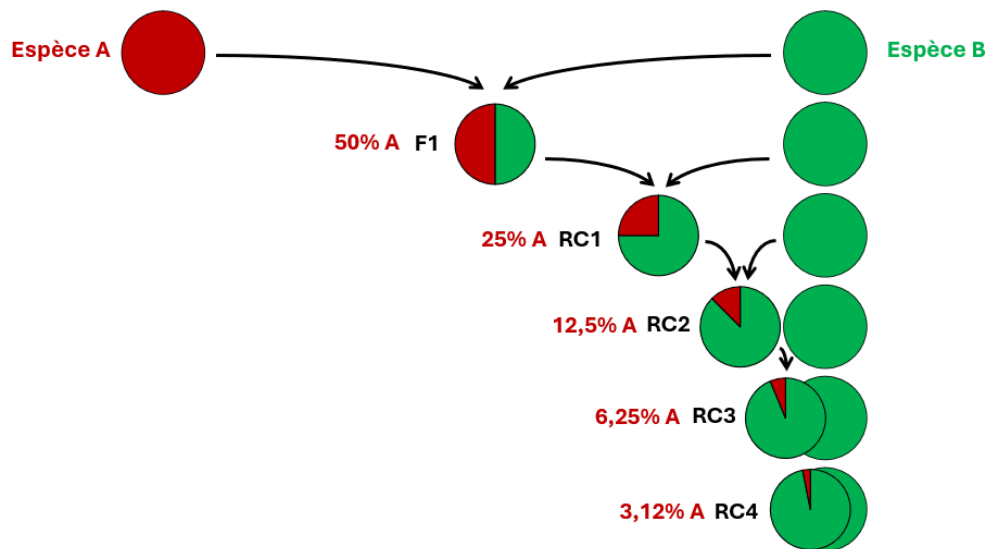


Figure 2 : Introgression d'allèle de l'espèce A donneuse (en rouge) vers l'espèce B receveuse (en vert). Premièrement, l'hybridation des espèces est réalisée pour donner la première génération d'hybride F1. Ensuite, une succession de rétrocroisements (RC) est réalisée afin d'incorporer seulement une partie du pool génétique de l'espèce A au sein de l'espèce B.

V. Généralités de la tomate sauvage *Solanum chilense* Dun.

La tomate sauvage *Solanum chilense*, de par ses caractéristiques physiologiques, sa grande variabilité génétique et son comportement extrêmophile, pourrait être une source de gènes très prometteuse pour la sélection de la tomate face aux stress abiotiques et biotiques (Bigot et al., 2023; Böndel et al., 2018; Nakazato et al., 2010). *Solanum chilense* a d'ailleurs déjà été utilisée pour introgresser des gènes de résistance au *Begomovirus*, responsable de la maladie d'enroulement des feuilles jaunes de la tomate, chez *Solanum lycopersium* (Dhaliwal et al., 2020).

Cependant, pour que l'introgression soit possible, il faut que les deux espèces soient compatibles, que l'hybridation produise des hybrides fertiles capables de s'hybrider avec le parent femelle receveur (rétrocroisement) (Harrison & Larson, 2014). Comme d'autres espèces du clade *Lycopersicon*, *Solanum chilense* présente des barrières de reproduction, elle est auto-incompatible au niveau intraspécifique et partiellement compatible avec la tomate cultivée au niveau interspécifique (Bedinger et al., 2011; Igić et al., 2007; Moreels et al., 2023). La présence de barrières de reproduction forme donc un obstacle majeur pour la sélection de la tomate.

VI. Distribution géographique et description taxonomique de *S. chilense*

Solanum chilense présente une distribution géographique diversifiée, étant présente à la fois le long des côtes chiliennes et à l'intérieur des terres dans les régions montagneuses des Andes. On la retrouve donc dans trois pays : au Pérou, au Chili et à l'ouest de la Bolivie. (Raduski & Igić, 2021) (**Figure 3**).

Sur la côte Pacifique, à une altitude allant de 0 à 1000 mètres, l'espèce se trouve dans des habitats spécifiques, comme les canyons et les oasis de collines, où elles sont adaptées à des conditions de brume et de faible pluviométrie. Elles sont de tailles plus modestes et ont tendance à être plus décombantes. (Raduski & Igić, 2021).

À l'intérieur des terres, dans les montagnes des Andes, les populations de *Solanum chilense* sont plus denses et les plantes sont plus grandes. Elles se répartissent depuis le Salar d'Atacama jusqu'au Pérou. On les retrouve dans des environnements de plus haute altitude allant de 800 à 3500 mètres où elles occupent des pentes ouvertes et des lits secs de rivières (Raduski & Igić, 2021).

Selon le marqueur génétique étudié, différentes phylogénies peuvent être observées chez *Solanum chilense*. La sous-structure des populations peut être divisée en 4 groupes (côtier, intérieur nord, intérieur central et intérieur sud) (Böndel et al., 2015) ou en 2 groupes (côtier et intérieur) (Raduski & Igić, 2021). Cette complexité phylogénétique est aussi présente à un niveau taxonomique supérieur, au sein du clade *Lycopersicon* dont les différentes phylogénies sont conflictuelles (Grandillo et al., 2011; Pease et al., 2016; Peralta et al., 2008; Zuriaga et al., 2009).

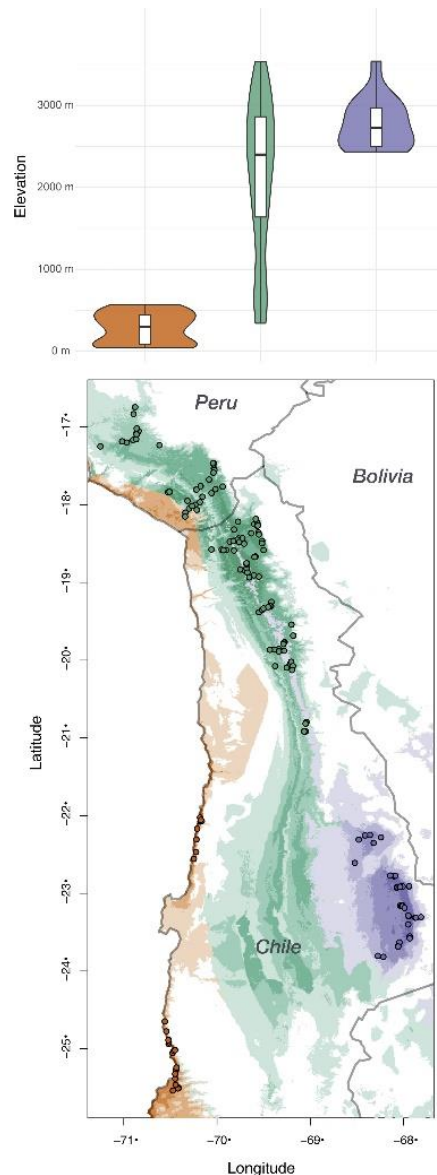


Figure 3 : Distribution géographique des populations de *Solanum chilense*. En orange : population côtière, en vert : population intérieure nord, en violet : population intérieure sud au niveau du Salar d'Atacama. Les zones de couleurs représentent l'air de répartition estimé par les modèles de distribution et les cercles représentent des recensements des individus (Raduski & Igić, 2021).

VII. Description morphologique de *S. chilense*

Solanum chilense (**Figure 4**) est une plante pérenne pouvant atteindre une hauteur variant entre 0,5 et 1,5 mètre et devenant ligneuse à la base. Elle se caractérise par un port buissonnant et une croissance sympodiale (Delbecq, 2024; Peralta et al., 2008). Avec ce type de croissance, le méristème apical arrête son activité après la formation d'un bourgeon floral et la croissance est relayé par un méristème axillaire latérale (**Figure 5**).



Figure 4 : Photographies de *Solanum chilense* en nature au Chili. (A) Plant complet (B) Inflorescences (C) Fruits. (Juan Pablo Martinez, INIA)

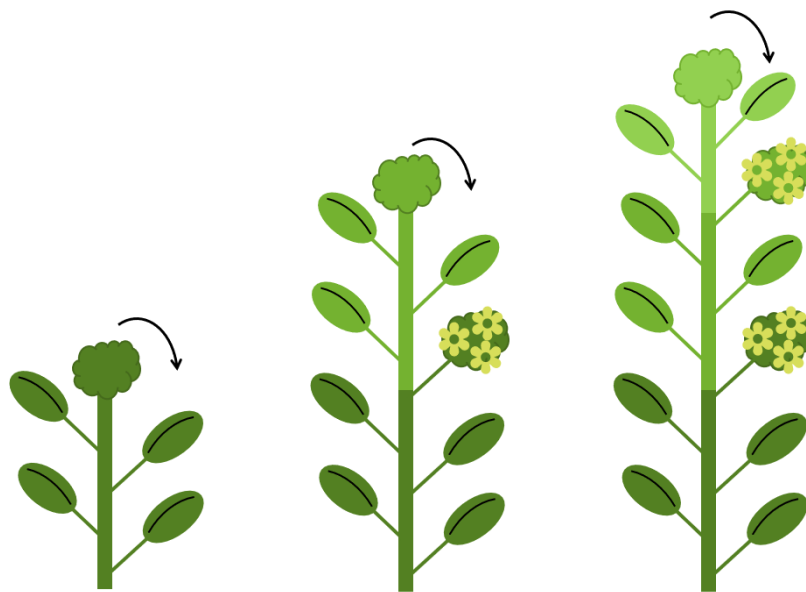


Figure 5 : Croissance sympodiale. Une fois le bourgeon floral (nuage) développé, sur la tige végétative principale, le méristème apical arrête son activité et un bourgeon axillaire reprend le développement de la plante. Le segment vert foncé représente le segment initial du méristème apical et les segments vert plus clair représentent les segments initiés par les méristèmes sympodiaux.

Sa tige (**Figure 6.A**) présente un diamètre de 8 à 12 mm et est densément fournie de trichomes. Elle possède des feuilles alternes, pétiolées et imparipennées (Peralta et al., 2008) (**Figure 6.F**). Ces feuilles d'une longueur de 5 à 20 cm et d'une largeur de 2,5 à 10 cm sont composées de 5 à 7 folioles et recouvertes de trichomes blancs (Peralta et al., 2008).

L'inflorescence de *Solanum chilense* mesure entre 6 et 30 cm de long. Elle est généralement constituée d'une seule tige, régulièrement divisée en deux branches. Elle peut porter jusqu'à 12 fleurs. Ces fleurs jaunes (**Figure 6.C, D, E**) présentent une symétrie radiaire, sont hermaphrodites et pentamères. Le calice est composé de 5 sépales soudés, la corolle de 5 pétales soudés en étoile et l'androcée de 5 anthères soudées en cône (Peralta et al., 2008). Chaque fleur passe d'une couleur vert clair à jaune avant l'anthèse (Gao et al., 2015). Le pistil

sort régulièrement du cône de l'androcée à l'anthèse et l'ovaire est supère. Les grains de pollen sont arrondis, tricolpés et ont un diamètre d'environ 13 μm (Gao et al., 2015).

Les fruits (**Figure 6.B**) sont des baies vert pâle parfois striées de mauve d'un diamètre variant entre 1 et 1,5 cm et sont recouverts de trichomes (Peralta et al., 2008). Les graines font 2,2 à 3,2 mm de long (Peralta et al., 2008) et le nombre de graines par fruit varie grandement entre 0 et 80 (Raduski & Igić, 2021). Ce nombre est plus faible pour les fruits issus d'un croisement entre une plante côtière et une plante de l'intérieur des terres. (Raduski & Igić, 2021).



Figure 6 : Organes végétatifs et reproducteurs de *Solanum chilense* Dun. (A) Tige et inflorescences, (B) Fruit, (C) Vue abaxiale de la fleur, (D) Vue adaxiale de la fleur, (E) Vue latérale de la fleur, (F) Feuille (Peralta et al., 2008).

VIII. Caractéristiques génétiques et physiologiques de *S. chilense*

Étant exposé à des conditions environnementales extrêmes et variables, *Solanum chilense* possède des gènes de résistance aux stress abiotiques (Böndel et al., 2018; Molitor et al., 2024; Rezk et al., 2021). Elle est notamment capable de survivre dans des environnements arides (Tapia et al., 2016), et très salin (Bigot et al., 2023; Gharbi et al., 2017). Cette espèce est aussi résistante à certains stress biotiques, comme les attaques du *Begomovirus*, responsable de la maladie d'enroulement feuilles jaunes chez la tomate cultivée (Dhaliwal et al., 2020). *Solanum chilense* est donc une source prometteuse de gènes de résistance aux stress pour la sélection de la tomate cultivée. Cependant, *Solanum chilense* possède des barrières de reproduction intraspécifique et interspécifique (Bedinger et al., 2011; Igit et al., 2007; Moreels et al., 2023).

B. LES BARRIÈRES DE REPRODUCTION

Les barrières de reproduction, ou barrières d'isolement reproducteur, regroupent les mécanismes empêchant un individu de s'autoféconder (autogamie), caractérisant une barrière de reproduction **intraspécifique**, ainsi que les mécanismes empêchant une espèce de s'hybrider avec une autre, caractérisant une barrière de reproduction **interspécifique**.

Chez les plantes, les barrières de reproduction se distinguent en fonction du moment où elles agissent, elles se classent en barrières pré- et post-pollinisation. (Baack et al., 2015; Broz & Bedinger, 2021). Les barrières pré-pollinisation se produisent avant la pollinisation. Elles incluent des facteurs comme l'adaptation à différents habitats, la saison de reproduction, la structure florale, la préférence des pollinisateurs et le système d'accouplement (Baack et al., 2015; Broz & Bedinger, 2021). Les barrières post-pollinisation se produisent après la pollinisation et peuvent être soit prézygotiques (avant la fécondation, la formation du zygote), soit postzygotiques (après la fécondation, la formation du zygote). Elles incluent des aspects comme le nombre et développement des graines, la non-viabilité ou la stérilité des hybrides. Elles sont souvent causées par des incompatibilités génétiques ou des différences chromosomiques (Baack et al., 2015; Broz & Bedinger, 2021).

I. Barrières de reproduction intraspécifiques et auto-incompatibilité

a. Généralité

De nombreuses plantes ont développé des mécanismes empêchant l'autofécondation et favorisant l'allofécondation. Ces mécanismes permettent ainsi de conserver la diversité génétique au sein de la population, en diminuant la consanguinité et en augmentant la capacité d'adaptation à différents environnements (Taiz et al., 2014; Takayama & Isogai, 2005).

Certaines espèces possèdent des adaptations morphologiques favorisant l'allofécondation : la dichogamie, l'hétérostylie et l'herkogamie. En cas de dichogamie, les étamines et les pistils ne mûrissent pas simultanément et ne sont donc pas fonctionnels en même temps (Taiz et al., 2014). En cas d'hétérostylie, il y a des différences morphologiques entre les étamines et les pistils. Il existe deux ou trois types de morphologies florales au sein d'une même population : chez certains individus, les étamines sont courtes et les pistils sont longs et inversement chez d'autres. (Taiz et al., 2014). Enfin, en cas d'herkogamie, il y a une séparation spatiale entre les organes reproducteurs mâles (étamines) et femelles (stigmates) au sein de la même fleur, l'exsertion du stigmate est une forme d'herkogamie (Opedal, 2018). De plus, l'incapacité de production de pollen fonctionnel et viable est aussi un mécanisme répandu chez

les plantes pour empêcher l'autopollinisation, ce phénomène est retrouvé à l'état sauvage et il est d'une grande utilité en agriculture (Taiz et al., 2014). Ces mécanismes sont des barrières pré-pollinisation.

b. L'auto-incompatibilité

Outre ces barrières pré-pollinisation, l'auto-incompatibilité (AI) est le principal mécanisme favorisant l'allofécondation chez les angiospermes (Taiz et al., 2014). C'est une barrière post-pollinisation prézygotique. Elle est présente au sein de plus de cents familles et chez environ 40% des espèces (Igic et al., 2008). L'AI se définit par l'incapacité d'une plante hermaphrodite fertile à produire un zygote après autopollinisation (de Nettancourt, 2001). L'AI implique un processus de reconnaissance du « soi » ou du « non-soi » entre le pollen et le pistil, suivi d'une inhibition du développement du pollen en cas d'incompatibilité. Chez la plupart des espèces, ce mécanisme de reconnaissance est contrôlé par un seul locus multi-allélique, le S-locus, qui possède plusieurs S-haplotypes. Ce locus serait composé au minimum de 2 unités transcriptionnelles, la première agissant comme déterminant mâle et la seconde comme déterminant femelle (Takayama & Isogai, 2005). Chaque S-haploporte les déterminants mâle et femelle, et la discrimination du « soi » ou du « non-soi » est rendue possible par une interaction moléculaire spécifique entre ces déterminants (Fujii et al., 2016).

Les angiospermes possèdent deux types d'auto-incompatibilité : l'auto-incompatibilité sporophytique (AIS) notamment présente chez les Brassicacées, et l'auto-incompatibilité gamétophytique (AIG), notamment présente chez les Solanacées, Rosacées et Plantaginacées (Fujii et al., 2016; Moreels et al., 2023).

Dans l'AIS, la reconnaissance du « soi » dépend du génome diploïde des tissus donneurs parentaux (l'anthere ou le pistil) et l'inhibition du développement du pollen se produit via l'inhibition de sa germination sur le stigmate. Dans l'AIG, la reconnaissance du « soi » dépend du S-haploporte (génome haploïde) portée par le pollen, du génome diploïde du le pistil et l'inhibition du développement du pollen se produit, après sa germination, via l'arrêt de la croissance des tubes polliniques dans le style (**Figure 7**) (Takayama & Isogai, 2005).

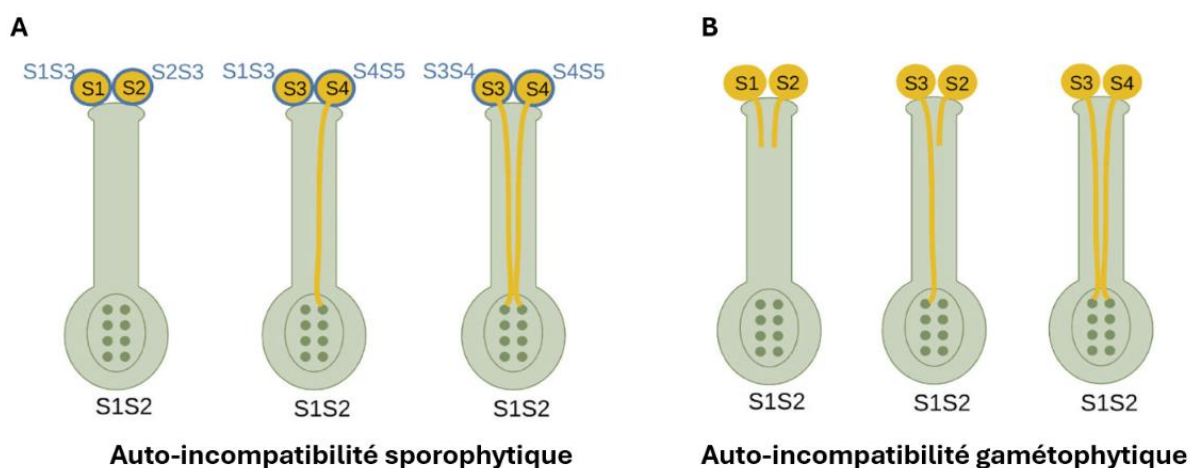


Figure 7 : Mécanismes d'auto-incompatibilité. (A) Auto-incompatibilité sporophytique. La présence d'un S-allèle commun entre le génome diploïde du parent mâle et le génome diploïde du parent femelle conduit empêcher la germination du grain de pollen. (B) Auto-incompatibilité gaméphytique. La présence de S-allèles identiques dans le pollen haploïde et le pistil diploïde conduit à l'arrêt de la croissance du tube pollinique, mais la présence de différents S-allèles conduit à la fécondation. (Moreels et al., 2023).

c. L'auto-incompatibilité gaméphytique des Solanacées

Chez les Solanacées, l'AIG est contrôlée par le S-locus, qui comprend comme déterminant femelle : une glycoprotéine ribonucléase de ~30kDa (S-RNase), et comme déterminant mâle : de multiples protéines F-box, appelées protéines SLF pour S-locus F-box (Fujii et al., 2016; Takayama & Isogai, 2005).

Les S-RNases sont présentes de manière abondante dans les tissus du style (Luu et al., 2000). Les protéines F-box font partie du complexe E3 ubiquitine ligase (SCF) composé de trois parties : Skp1, Cullin1, F-box. Ce complexe reconnaît des protéines cibles pour l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S. Bien qu'intervenant dans l'AI, les protéines Skp1 et Cullin1 ne font pas partie du S-locus (Fujii et al., 2016; Moreels et al., 2023; Takayama & Isogai, 2005).

Deux modèles permettent d'expliquer l'AIG : le modèle « collaborative non-self-recognition » (Kubo et al., 2010) et le modèle « compartmentalization » (Goldraij et al., 2006). Même si le premier modèle est plus largement accepté chez le genre *Solanum*, il existe très peu d'études concentrées spécifiquement sur les mécanismes d'AI chez ce genre, en comparaison aux genres *Nicotiana* et *Petunia*. De plus, les deux modèles d'AIG ne sont pas mutuellement exclusifs (Moreels et al., 2023).

Dans le modèle « collaborative non-self-recognition » (**Figure 8**), la réaction d'incompatibilité (lorsque les S-allèles sont identiques) est engendrée par l'entrée des S-RNases dans l'autopollen, provoquant ainsi la dégradation et la décomposition de l'ARN de l'autopollen via leur activité de ribonucléase. Ceci provoque l'arrêt de la croissance des tubes polliniques dans le style. À l'opposé, lors de la réaction d'auto-compatibilité (lorsque les S-allèles sont différents), les S-RNases « non-soi » sont reconnues par le complexe SCF, elles sont polyubiquitinées puis dégradées. En l'absence de S-RNase, l'ARN du pollen n'est pas dégradé et la croissance des tubes polliniques n'est pas arrêtée. (Fujii et al., 2016; Kubo et al., 2010; Moreels et al., 2023; Takayama & Isogai, 2005).

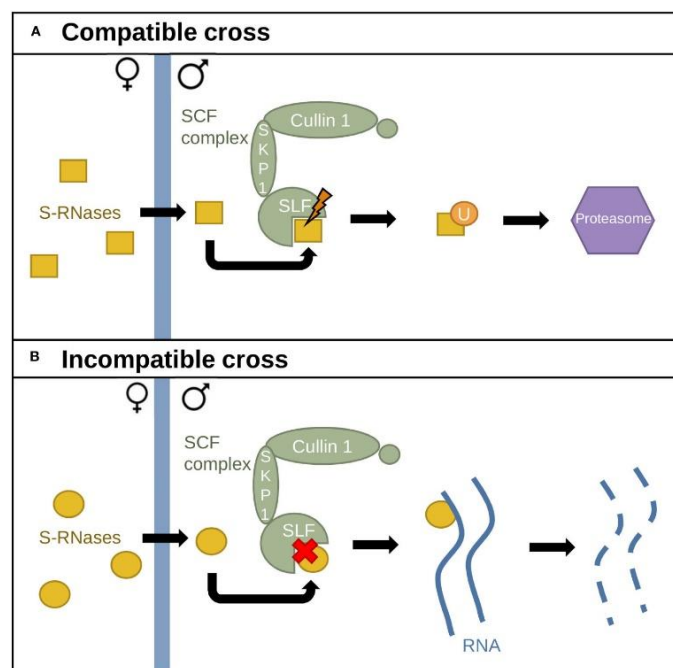


Figure 8 : Modèle « collaborative non-self-recognition ». (A) Interaction entre différents S-allèles. Les S-RNases (jaunes) pénètrent dans le tube pollinique et interagissent avec les protéines SLF. Les S-RNases sont ensuite ubiquitinées par le complexe SCF et envoyées au protéasome 26S pour être dégradées. (B) Interaction entre des S-allèles identiques. L'absence de reconnaissance entre les protéines SLF et les S-RNases conduit à la dégradation de l'ARN par les S-RNases. (Moreels et al. 2023).

D'autres gènes, indépendants du S-locus, appelés gènes modificateurs, participent également à l'AIG des Solanacées. Ces gènes modificateurs ont surtout été étudiés au sein du genre *Nicotiana*. On retrouve : (1) le gène *HT-B*, codant une petite protéine riche en asparagine impliquée dans le rejet du pollen spécifique (B. McClure et al., 1999), (2) le gène *HT-A*, identifié chez les espèces du genre *Solanum* (Kondo et al., 2002), (3) *NaStEP*, codant pour un inhibiteur de protéase qui protège HT-B de la dégradation dans le tube pollinique (Jiménez-Durán et al., 2013), (4) *NaSIPP*, codant pour une protéine interagissant avec NaStEP et déclenchant une crise énergétique au niveau des mitochondries et une interruption de la croissance des tubes

polliniques (García-Valencia et al., 2017), (5) *120K* codant pour une glycoprotéine de 120 kDa (Nathan Hancock et al., 2005), (6) *NaThrx*, codant pour une thioredoxine réduisant les ponts disulfures des S-RNases (Torres-Rodríguez et al., 2020). Lorsque ces gènes sont non fonctionnels, l'AI ne semble plus pouvoir opérer. La manière dont ces gènes modificateurs intègrent spécifiquement le modèle « collaborative non-self-recognition » reste à découvrir (Moreels et al., 2023).

Cependant, le modèle de l'AIG « compartmentalization », proposé chez *Nicotiana alata* (**Figure 9**), comprend plusieurs gènes modificateurs. Ce modèle propose que les S-RNases soient séquestrées dans les vacuoles pour limiter leur activité cytotoxique. Lors de la réaction d'auto-incompatibilité, une petite partie des S-RNases arrive à interagir avec le complexe SCF, ce qui stabilise NaStEP et protège HT-B de la dégradation. HT-B interagit par la suite avec les vacuoles induisant leur rupture et la libération des S-RNases et, par conséquent, la dégradation des ARNs. NaStEP interagit également avec SIPP, déstabilisant les mitochondries. La dégradation d'ARN et la déstabilisation des mitochondries provoquent l'arrêt de la croissance du tube pollinique. Lors de croisement compatible, la reconnaissance entre SLF et S-RNase inhibe NaStEP, provoquant la dégradation de HT-B. Les vacuoles restent intactes, séquestrent les S-RNase et les mitochondries ne sont pas déstabilisées. La croissance des tubes polliniques est maintenue (Goldraj et al., 2006; B. McClure et al., 2011; Moreels et al., 2023).

Étant donné que le S-locus des membres de la famille des Solanacées comprend un déterminant femelle et plusieurs déterminants mâles, l'identification du S-haplotype repose principalement sur la caractérisation des S-RNases (Igic et al., 2007; Moreels et al., 2023). Ces S-RNases sont sécrétées par le style et absorbées par les tubes polliniques pendant leur croissance (Luu et al., 2000). Les S-RNases des Solanacées appartiennent à la famille des T2-RNases et leurs séquences contiennent un peptide signal, cinq régions conservées et deux régions hypervariables (Silva & Goring, 2001). Bien que le rôle précis de ces différentes régions reste flou, la S-spécificité pourrait être partiellement liée à la variation des séquences des régions hypervariables (Brisolara-Corrêa et al., 2015; Ioerger et al., 1991; Moreels et al., 2023).

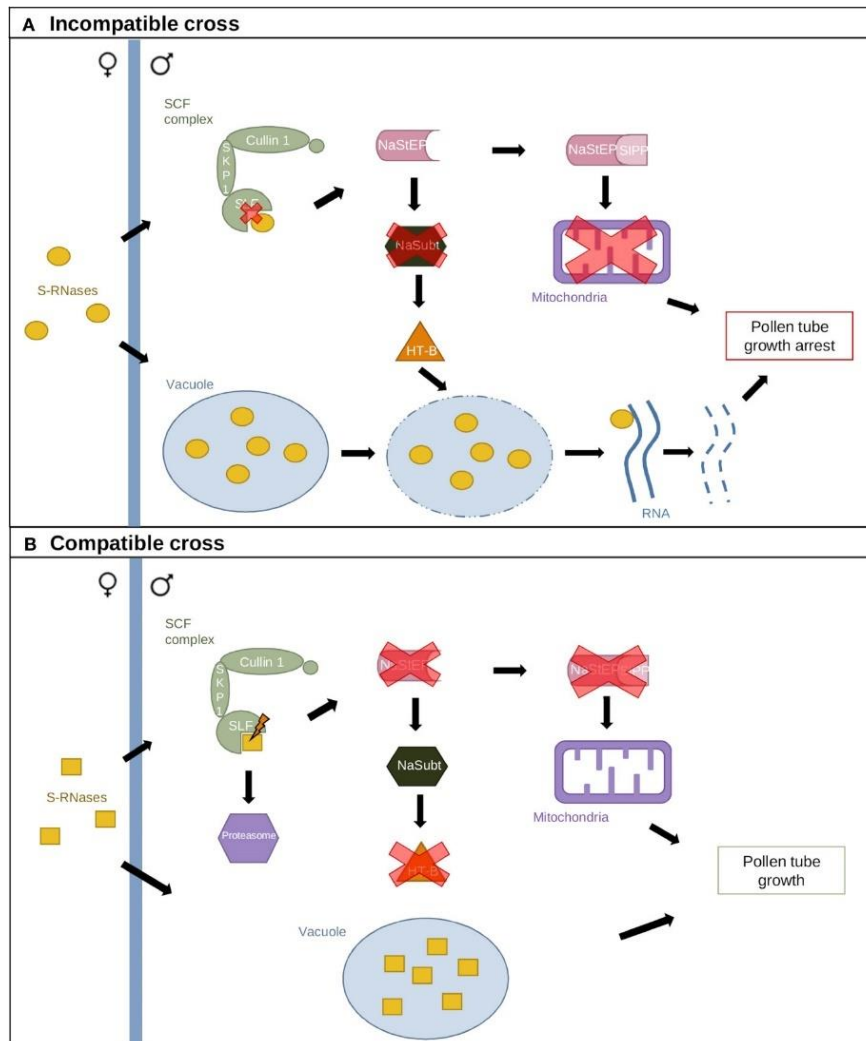


Figure 9 : Modèle « compartmentalization ». (A) Interaction entre *S*-allèles identiques. Les *S*-RNases sont séquestrées dans une vacuole, tandis qu'une petite partie interagit avec le complexe SCF. Le manque de reconnaissance entre SLF et *S*-RNase conduit au maintien de NaStEP, qui inhibe un composant de type subtilisine (NaSubt) et maintient HT-B. L'interaction entre la vacuole et HT-B conduit à la rupture de la membrane vacuolaire et à la libération de *S*-RNase. NaStEP interagit également avec SIPP, déstabilisant les mitochondries. (B) Interaction entre différents *S*-allèles. La reconnaissance entre SLF et *S*-RNase inhibe NaStEP, permettant la répression de HT-B médiée par NaSubt. La vacuole et les mitochondries restent intactes et la croissance du tube pollinique est maintenue (Moreels et al. 2023).

d. L'auto-incompatibilité chez *Lycopersicon*

L'auto-incompatibilité n'est pas présente chez toutes les espèces de tomates. Sur les 13 espèces du clade *Lycopersicon*, 3 espèces sont strictement auto-incompatibles : *S. chilense*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri* (Bedinger et al., 2011). D'autres espèces sont auto-incompatibles de manière prédominante, mais certaines accessions ou populations sont auto-compatibles. C'est le cas pour *S. pennelli*, *S. peruvianum* et *S. habrochaites* (Bedinger et al., 2011). La tomate cultivée *Solanum lycopersicum* ainsi que les autres espèces du clade sont auto-compatibles (Bedinger et al., 2011). Empiriquement, on observe un lien entre la couleur du fruit de la tomate et l'auto-compatibilité. Les espèces de tomates à fruits de couleur vert sont

strictement ou partiellement auto-incompatibles alors que les espèces à fruits de couleur orange/rouge sont auto-compatibles (Peralta et al., 2008).

Une transition de l'auto-incompatibilité (AI) vers l'auto-compatibilité (AC) peut être déclenchée par plusieurs facteurs qui entraînent une perte d'AI ou un gain d'AC (Fujii et al., 2016; Markova et al., 2017; Zhao et al., 2022). Ceci peut être déclenché par : (1) des mutations menant à une perte de fonction des *S-RNases*, provoquant l'acceptation de pollen provenant de n'importe quel individu dont de lui-même (Fujii et al., 2016), (2) des mutations chez les gènes modificateurs *HT-A* et/ou *HT-B* provoquent aussi la rupture de l'AI (Tovar-Méndez et al., 2014). C'est notamment le cas chez *Solanum lycopersicum* et des autres espèces de tomates « à fruit rouge » qui ont perdu l'activité des S-RNases et qui ne possèdent pas de gène *HT* fonctionnels (Baek et al., 2015; Covey et al., 2010; Kondo et al., 2002; Tovar-Méndez et al., 2014). D'autres mutations peuvent entraîner le gain de reconnaissance du « soi », c'est-à-dire la reconnaissance par les SLF des S-RNases du même S-haplotype (Fujii et al., 2016; Markova et al., 2017). Enfin, il est possible de renverser ce processus évolutif et de réintroduire l'AI dans des populations de tomate auto-compatibles, bien que ce mécanisme soit rare, via des mutations inverses ou de nouvelles insertions (Fujii et al., 2016).

Solanum chilense possède une barrière post-pollinisation prézygotique, une auto-incompatibilité gamétophytique (Bedinger et al., 2011; Moreels et al., 2023; Takayama & Isogai, 2005). La diversité de S-allèle au sein du clade *Lycopersicon* est estimée entre 10 et 50 S-haplotypes. À ce jour, on compte 36 S-allèles chez *S. chilense*, dont 34 identifiés par Igic et al. (2007) et 2 identifiés par Moreels (2022). Ces S-allèles ont été identifiés à partir des séquences des S-RNases, et montrent une très grande variabilité (**Figure 10**). L'allogamie chez *S. chilense* semble être uniquement due à l'auto-incompatibilité gamétophytique et à l'exsertion du stigmate (Gao et al., 2015; Moreels, 2022).

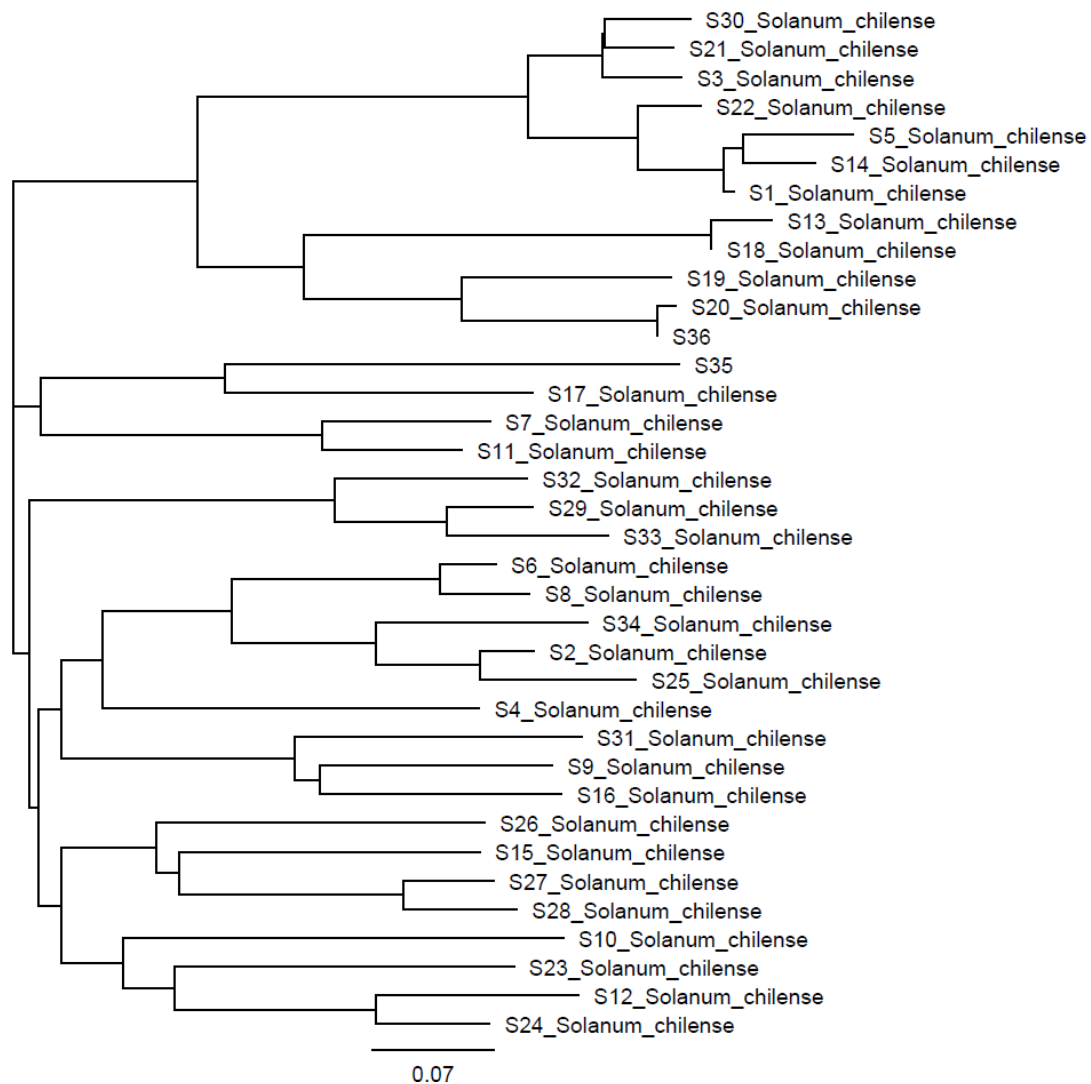


Figure 10 : Arbre phylogénétique des S-allèle de *Solanum chilense*, identifié à partir des séquences des S-RNases (Communication orale)

e. L'exsertion du stigmate et lien avec l'auto-incompatibilité

L'exsertion du stigmate est un mécanisme menant à une séparation spatiale entre les organes femelles (pistils) et organes mâles (étamines) d'une fleur dans laquelle le style sort du cône des anthères rendant l'autopollinisation impossible et favorisant l'allopollinisation (Figure 11). C'est une forme d'herkogamie (Opedal, 2018; Taiz et al., 2014). Le degré d'exsertion du stigmate est donc principalement déterminé par les longueurs relatives des anthères, des ovaires et des styles (Shang et al., 2021).

Chez *Lycopersicon*, l'exsertion du stigmate varie en fonction de facteurs environnementaux et génétiques. Une température élevée (moyenne de 42 à 45°C) provoque un allongement du style de 25% à 55% chez différents génotypes de *S. lycopersicum* (Saeed et

al., 2007). Une température modérément élevée (32/26°C jour/nuit) entraîne un raccourcissement de l'anthere chez *S. lycopersicum* (Sato et al., 2006).



Figure 11 : Fleur à stigmate inséré (A) et d'une fleur à stigmate exercé (B). ST = stigmate, ET = étamine, SY = style, PT = pétale, SP = sépale, OV = ovule.

L'exsertion du stigmate est contrôlée par un grand nombre de gènes. Bernacchi & Tanksley (1997) et Fulton et ses collègues (1997) ont identifié un locus *se2.1*, associé au style long, sur le chromosome 2 de *Solanum lycopersicum*, via une analyse QTL (« Quantitative Trait Loci » ou Loci de Caractère Quantitatifs) d'une population rétrocroisée d'accession de tomates auto-compatibles et auto-incompatibles sauvages. Sur ce locus, on retrouve plusieurs gènes : le gène *STYLES2.1* associé à la longueur du style, trois gènes impliqués dans la longueur des étamines (*STAMEN2.1*, *STAMEN2.2* et *STAMEN2.3*) et un gène associé à l'architecture de l'anthere (*DEHISCENCE2.2*) (Chen & Tanksley, 2004). Parmi ces cinq gènes, *STYLE2.1* est le QTL principal responsable d'une variation dominante dans l'exsertion du stigmate, tandis que les fonctions des gènes *STAMEN* restent inconnues (Chen et al., 2007). Une mutation de *STYLE2.1* provoque un raccourcissement des stigmates, cependant, sa surexpression n'allonge pas le stigmate, suggérant que *STYLE2.1* n'est pas le gène principal pour ce phénotype (Chen et al., 2007). D'ailleurs, la présence de délétions dans la région régulatrice de *STYLE2.1* montre que des gènes impliqués dans l'exsertion du stigmate pourraient se trouver dans un autre locus, lié à la région régulatrice de *STYLE2.1* (Vosters et al., 2014). Une mutation du gène *SE3.1* conduit aussi au développement de stigmates insérés en agissant en aval de *STYLE2.1* (Shang et al., 2021). Le gène *SLLST* est impliqué dans l'exsertion du stigmate en ciblant le noyau et la membrane cellulaire des cellules du style (Cheng et al., 2021). Les gènes *HD-ZIP IV* impliqués dans la formation des trichomes semblent aussi réguler la longueur du style, en aval de *STYLE2.1* (Wu et al., 2024). D'autres études ont localisé des gènes liés à la longueur du style sur les chromosomes 5 (*SE5.1*) chez *S. habrochaites* (Gorguet et al., 2008) et 8 (*STY8.1*) chez *S. pimpinellifolium* (Georgiady et al., 2002). En somme, la régulation de l'exsertion du stigmate

est complexe. Ce phénotype est donc contrôlé par différents gènes, situés sur différents chromosomes.

Un lien entre auto-incompatibilité et la morphologie florale est étudié depuis longtemps. Un degré plus élevé d'exsertion du stigmate est observé chez les espèces auto-incompatibles, probablement pour favoriser l'allofécondation (Peralta et al., 2008; Rick, 1988). La longueur du style, la longueur des étamines et la taille des grains de pollen sont les caractères morphologiques les plus importants liés au S-locus chez les plantes hétéromorphes auto-incompatibles (de Nettancourt, 1977). Des QTL majeurs pour plusieurs caractères floraux, comme la taille et le nombre de fleurs, sont situés sur le chromosome 1 et liés au S-locus, étudiés chez les plantes issues de rétrocroisements entre la tomate cultivée auto-compatible et son parent sauvage auto-incompatible (*S. habrochaites*) (Bernacchi & Tanksley, 1997; Quinet, 2005). Bernacchi & Tanksley (1997) et Quinet (2005) suggèrent donc l'existence d'un complexe de gènes régulant la morphologie florale autour du S-locus chez la tomate. Cependant, il semble que l'exsertion du style ne fasse pas partie de ce complexe (Quinet, 2005).

Solanum chilense possède une barrière intraspécifique pré-pollinisation, une exsertion du stigmate en dehors du cône d'anthères empêche le contact entre le pollen et le stigmate (Igic et al., 2007; Peralta et al., 2008). Une fécondation croisée est donc nécessaire pour permettre la formation des fruits et des graines chez cette espèce (Chetelat et al., 2009). Les organes mâles et femelles semblent présenter une maturité codominante (absence de dichogamie) et il n'existe pas de phase mâle ou de phase femelle chez *S. chilense* (Moreels, 2022). Les hybrides issus de croisements entre *S. lycopersicum* et *S. chilense* sont aussi auto-incompatibles et possèdent une exsertion du stigmate (Bigot, 2023; Defalque, 2023; Leclef, 2021; Moreels, 2022). Ces hybrides portent d'ailleurs un S-allèle fonctionnel venant du parent *S. chilense* (Defalque, 2023; Moreels, 2022). Il semble donc intéressant de comprendre comment l'auto-incompatibilité est liée à l'exsertion du style.

II. Barrières de reproduction interspécifiques et incompatibilité unilatérale

a. *Généralité*

La définition d'une espèce végétale a longtemps posé problème en raison des hybrides interspécifiques fréquents et des variations phénotypiques difficiles à catégoriser (Rieseberg et al., 2006; Rieseberg & Willis, 2007). Cependant, la plupart des lignées sexuelles forment des groupes morphologiquement distincts, souvent isolés reproductivement (Morjan & Rieseberg, 2004). Bien que certaines plantes se reproduisent de manière asexuée ou par autofécondation,

ce qui complique la définition d'espèce, la plupart des espèces de plantes se maintiennent ensemble via un flux génétique et sont isolées des autres espèces via des barrières de reproduction interspécifique (Clausen et al., 1939; Rieseberg et al., 2006). Cet isolement reproducteur peut toutefois être incomplet, permettant un certain flux génétique entre espèces proches (Baack et al., 2015). De plus, l'hybridation entre différentes espèces peut engendrer une progéniture mal adaptée ou non viable en raison d'incompatibilités génétiques entre espèces divergentes (Wang & Filatov, 2023). L'étude des barrières de reproduction interspécifique permet donc de mieux comprendre l'établissement de l'isolement reproductif, un aspect crucial de la spéciation (Bedinger et al., 2011). Elle permet aussi d'améliorer les techniques de sélection végétale, car ses barrières entravent l'accès à un matériel génétique sauvage inutilisable (Hausmann et al., 2004; Muñoz-Sanz et al., 2020).

Les barrières de reproduction interspécifique peuvent être passives, engendrées par l'inadéquation des systèmes génétiques entre partenaires (incongruité), ou actives, engendrées par le rejet du pollen (incompatibilité) (de Nettancourt, 2001; Hogenboom et al., 1997).

b. L'incompatibilité unilatérale chez *Lycopersicon*

Le clade des tomates possède une barrière de reproduction interspécifique appelée incompatibilité unilatérale (IU). L'incompatibilité unilatérale est un type d'incompatibilité interspécifique dans laquelle le pollen d'une espèce est rejeté par le pistil d'une autre espèce, tandis que le croisement opposé est fertile (de Nettancourt, 2001).

L'incompatibilité unilatérale est liée à l'auto-incompatibilité, en d'autres termes, les barrières d'auto-incompatibilité sont aussi impliquées dans les mécanismes d'incompatibilité interspécifique (Broz & Bedinger, 2021; Lewis & Crowe, 1958; Li & Chetelat, 2015). En effet, l'incompatibilité unilatérale suit souvent la règle AI x AC, selon laquelle le pollen d'une espèce auto-incompatible est accepté par le pistil d'une espèce auto-compatible, tandis que le croisement opposé est rejeté (Lewis & Crowe, 1958).

Dans le clade des tomates, la règle AI x AC est observée : les espèces de tomates à fruits rouges - qui sont auto-compatibles - peuvent se croiser avec les espèces de tomates à fruits verts – qui sont auto-incompatibles – pour autant que les premières soient utilisées comme parents femelles (**Figure 12**) (Grandillo et al., 2011; Moreels et al., 2023; Tovar-Méndez et al., 2014). Cependant, bien que la règle AI x AC explique la majorité des relations de compatibilité dans ce clade, des exceptions existent, particulièrement parmi les espèces et accessions auto-

compatibles, où des variations dans la force des interactions entre le pistil et le pollen peuvent être constatées (Baek et al., 2015; Bedinger et al., 2011).

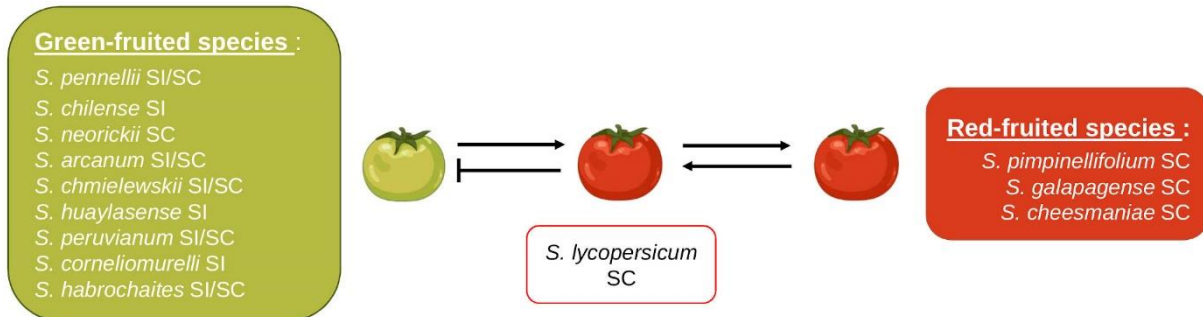


Figure 12 : Compatibilité entre les espèces du groupe *Lycopersicon*. Les espèces en rouge sont des espèces à fruits rouges (Red-fruited species) et les espèces en vert sont des espèces à fruits verts (Green-fruited species). Les flèches indiquent les croisements compatibles tandis que les lignes barrées indiquent un croisement incompatible.

Les études sur les membres du clade *Lycopersicon* ont mis en évidence à la fois des mécanismes d'IU dépendants des S-RNases et de l'auto-incompatibilité, ainsi que des mécanismes d'IU indépendants de ces deux facteurs. Ces études concernent principalement *Solanum pennellii*, une espèce qui possède des accessions à faible expression de *S-RNases*, facilitant l'exploration des voies indépendantes des S-RNases (Moreels et al., 2023; Muñoz-Sanz et al., 2020; Tovar-Méndez et al., 2014).

Dans la voie dépendante des S-RNases et de l'AI, il a été montré que l'expression combinée de *S-RNases* et des gènes *HT-A* ou *HT-B* pouvait restaurer les barrières de reproductions interspécifiques chez *S. lycopersicum* lorsqu'elle est croisée avec d'autres espèces à fruits rouges (Tovar-Méndez et al., 2014). Outre les *S-RNases* et les *HT*, d'autres facteurs impliqués dans l'AI comme *SLF-23* et *Cullin1* jouent aussi un rôle crucial dans l'IU. Ces facteurs semblent essentiels pour la reconnaissance et le rejet du pollen dans le cadre de l'IU (Li & Chetelat, 2010, 2015).

Cependant, des études montrant des voies d'IU indépendantes des S-RNases et de l'AI ont été décrites récemment, mettant en évidence la présence d'autres facteurs impliqués dans l'IU (Broz et al., 2017; Covey et al., 2010; Defalque, 2023; Muñoz-Sanz et al., 2021; Qin et al., 2018; Qin & Chetelat, 2021; Tovar-Méndez et al., 2017).

L'incompatibilité unilatérale est liée à l'auto-incompatibilité à travers les mécanismes dépendants des S-RNases, donc une meilleure compréhension de l'AI éclaire également celle

de l'IU. Toutefois, les mécanismes indépendants des S-RNases révèlent la complexité de l'IU, impliquant diverses interactions entre le pollen et le pistil. Une compréhension complète de cette barrière interspécifique reste encore à approfondir (Moreels et al., 2023).

La barrière de reproduction interspécifique de *S. chilense*, surtout étudiée avec *Solanum lycopersicum*, est qualifiée d'incompatibilité unilatérale (Fujii et al., 2016; Martin, 1961; Moreels et al., 2023). *S. chilense* possède des copies des gènes *HT-A*, *HT-B* qui pourraient être impliquées dans l'IU (Moreels, 2022). Bigot (2023) et Defalque (2023) ont approfondi l'étude de IU et AI au niveau prézygotique en examinant la croissance des tubes polliniques lors de croisements intraspécifiques et interspécifiques avec *Solanum lycopersicum*. Ils ont démontré que le rejet des tubes polliniques dans les croisements interspécifiques dépend de l'espèce et qu'il intervient à un niveau différent du style, pour un croisement auto-incompatible. Cette différence suggère que le contrôle de l'IU ne dépend pas uniquement des S-RNases, mais qu'il est régi par d'autres facteurs que le S-locus (Bigot, 2023).

PROBLÉMATIQUE, QUESTION DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DU MÉMOIRE

Ce mémoire s'inscrit dans la thèse de doctorat de Pauline Moreels, dont l'objectif général est d'améliorer nos connaissances sur les barrières de reproduction entre la tomate cultivée *Solanum lycopersicum* et une espèce de tomate sauvage prometteuse, *Solanum chilense*, en vue d'améliorer la tomate cultivée. Plusieurs études précédentes au laboratoire du groupe de recherche en physiologie végétale (GRPV) ont déjà permis d'obtenir des informations sur ces barrières de reproduction, les S-allèles et les croisements inter/intrasécifiques. Ce mémoire continue ces recherches en se concentrant particulièrement sur la barrière de reproduction intrasécifique au sein d'une population de *Solanum chilense*.

Le **premier objectif** du mémoire est d'étudier la morphologie florale chez *S. chilense* afin de déterminer si des différences morphologiques, telles que l'exsertion du stigmate, sont corrélées à la compatibilité des plantes, notamment à leur expression de S-allèles et de gènes impliqués dans l'AI, qui sont étudiés par la suite.

Le **deuxième objectif** est de comparer la compatibilité théorique avec la compatibilité réelle entre les individus de la population de *S. chilense*. Cela permettra de déterminer s'il existe un gradient de compatibilité dans les croisements. Un tel gradient suggérerait la présence de relations de dominance parmi les S-allèles. Il viserait donc à identifier si un S-allèle particulier rend les plantes hautement compatibles ou incompatibles. Le S-locus est en effet hautement polymorphique et il est possible que le niveau de rejet ne soit pas le même entre des S-allèles éloignés ou des S-allèles proches comme cela a été suggéré chez le poirier (Claessen, 2021). De plus, il a également été suggéré que certaines plantes de *S. chilense* soient auto-compatibles dans certaines populations (TGRC, 2024), bien qu'aucune étude n'ait clairement vérifié cela à ce jour.

La compatibilité réelle est étudiée à plusieurs niveaux : au niveau prézygotique par l'analyse du taux de germination des grains de pollen et de la croissance des tubes et au niveau postzygotique par l'analyse du taux de mise à fruit et du nombre de graines par fruit. Cette analyse à plusieurs niveaux aura pour **troisième objectif** d'étudier la présence d'autres barrières de reproduction ou l'importance de celle déjà connue.

Le **quatrième objectif** est d'étudier lien entre la compatibilité des croisements et l'expression relative des S-allèle et des gènes modificateurs non régi par le S-locus, mais

impliqué dans les barrières d'auto-incompatibilité, tel que les gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B*.

Enfin, le maintien des populations de *S. chilense* reste complexe. Le **cinquième objectif** de ce mémoire portera sur la compréhension des moyens d'initier le développement racinaire chez cette espèce, afin de cloner et multiplier rapidement les individus par bouturage, étant donné l'impossibilité de le faire par reproduction sexuée en raison de son auto-incompatibilité.

L'analyse et les manipulations se divisent en plusieurs parties : la première consiste en l'étude de la morphologie florale de plusieurs individus de *S. chilense*, la deuxième en l'identification des S-allèles afin d'obtenir la compatibilité théorique, la troisième en la réalisation de croisements entre individus afin d'obtenir la compatibilité réelle à plusieurs niveaux, la quatrième en l'analyse de l'expression génétique des S-allèles et des gènes modificateurs, et la dernière par l'analyse du développement des racines dans différentes solutions de bouturage.

De manière générale, une meilleure compréhension des barrières d'auto-incompatibilité chez *S. chilense* permettrait d'approfondir notre connaissance de l'incompatibilité unilatérale entre *S. chilense* et *S. lycopersicum*, ces barrières étant régies par certains facteurs génétiques similaires. Cela améliorerait ainsi la compréhension globale des barrières de reproduction au sein du genre *Solanum* et permettrait une optimisation des techniques de sélection et d'amélioration végétale de la tomate cultivée via l'introgession de gènes provenant des espèces sauvages apparentées. La **Figure 13** présente un schéma des problématiques et des objectifs de ce mémoire.

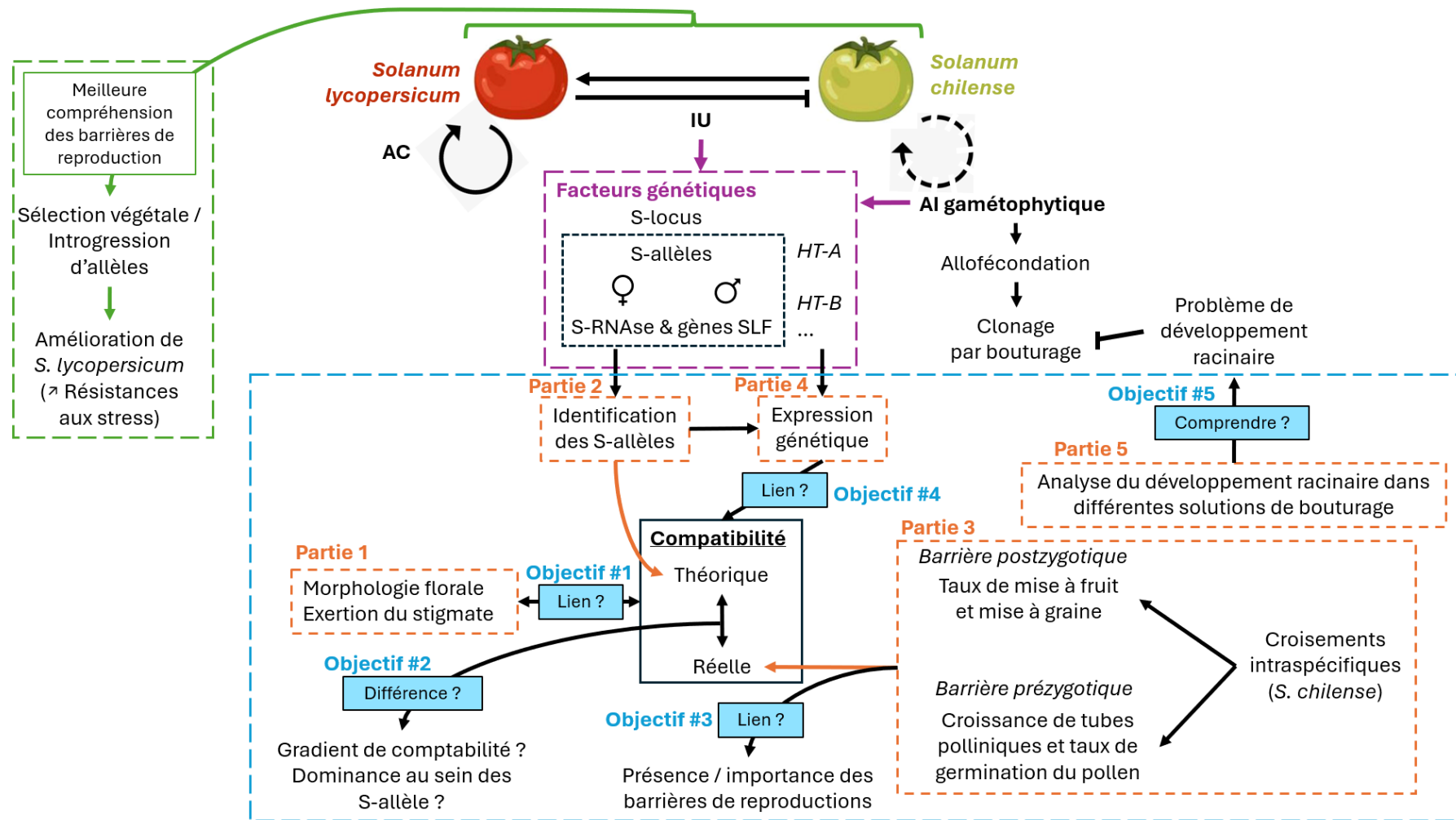


Figure 13 : Schéma représentant les objectifs et la problématique de ce mémoire. En haut : représentation des barrières de reproduction entre *S. chilense* (tomate verte) et *S. lycopersicum* (tomate rouge). L'auto-incompatibilité (AI) gamétophytique est indiquée par une flèche en pointillé circulaire, l'incompatibilité unilatérale (IU) par les deux flèches entre les deux fruits, et l'auto-compatibilité (AC) par une flèche circulaire continue. Au centre, dans le cadre magenta : représentation non exhaustive des facteurs génétiques impliqués dans les mécanismes d'incompatibilité (AI et IU). À en bas, dans le cadre bleu : description des travaux réalisés dans ce mémoire et des objectifs. Les cadres orange représentent les différentes parties de ce mémoire. À gauche, dans le cadre vert : présentation de l'objectif principal sous-jacent à ce mémoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITION DE CULTURE

Solanum chilense (accession LA4107) est l'espèce de tomate sauvage originaire du désert de l'Atacama au Chili utilisée pour ce mémoire. Les graines ont été fournies par le Dr. Juan Pablo Martinez (INIA, Chili) et sont multipliées au sein du laboratoire. Dix individus différents sont cultivés et dupliqués par bouturage, ils sont appelés PIS10, PIS14, PIS19, PIS31, PIS33, PIS34, PIS36, PIS38, PIS40, SC2.

Les plantes sont cultivées en serres à Louvain-la-Neuve avec une photopériode de 16h, une température moyenne de $26^{\circ}\text{C}\pm 2,34$ le jour et $22,2^{\circ}\text{C}\pm 1,93$ la nuit et à une humidité relative de $51\%\pm 0,095$ en moyenne. De l'engrais pour tomates (Engrais organo--minérales tomates, DE CEUSTER MESTSTOFFEN N.V/S.A, Grobbendonk, Belgique) a été appliqué, une fois toutes les deux semaines dans les pots de chaque plante.

B. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET MESURE DE L'EXSERTION DU STIGMATE

Dix fleurs de chaque individu (sauf PIS34 et PIS38 par manque de fleurs) sont prélevées au stade d'anthèse (stade de 20 selon Brukhin et al. (2003)) et sont disséquées. Les organes floraux sont délicatement séparés en corolle, sépales, étamines et style et collés sur une feuille. Une fois la feuille scannée, la superficie des différents organes floraux ainsi que la longueur des étamines et du style sont calculées à l'aide du logiciel Fiji ImageJ (Version Java: 1.8.0_322, 32-bit). La fleur de *S. chilense* ayant un ovaire supère, et la taille de l'ovaire n'ayant pas été mesurée, l'exsertion du stigmate est estimée pour chaque fleur en calculant le rapport entre la taille du style et la longueur moyenne des cinq étamines.

Pour calculer la superficie des organes floraux, le protocole suivant est suivi : (1) Conversion de l'image en 8-bit (Image>Type>8-bit). (2). Sélection de 1 cm sur l'échelle, avec l'outil ligne et réglage l'échelle (Analyse>Set Scale). Dans la fenêtre changement de « Know distance » par 1 et « Unit of length » par cm. (3) Sélection de la zone de calcul avec l'outil rectangle et duplication de la zone souhaitée. (4) Ajustement du seuil (Image>Ajust>Threshold). (5) Calcul de la superficie (Analyze>Analyze particles)

Pour calculer la longueur des étamines et des styles, le protocole suivant est suivi : (1) Conversion de l'image en 8-bit (Image>Type>8-bit). (2) Sélection de 1 cm sur l'échelle, avec l'outil ligne et réglage l'échelle (Analyse>Set Scale). Dans la fenêtre changement de « Know distance » par 1 et « Unit of length » par cm. (3) Sélection de la zone de calcul avec l'outil

rectangle et calcul de la longueur à l'aide de la macro disponible au lien Github suivant : https://github.com/SchreiberRo/memory_thesis_data.git

C. CROISEMENTS INTRASPÉCIFIQUE DE *S. CHILENSE*

I. Taux de mise à fruit et nombre de graines par fruit

Afin de déterminer la compatibilité au niveau postzygotique, des croisements entre les dix différents individus de *S. chilense* sont réalisés. Les pollinisations sont effectuées manuellement sur des fleurs en anthèse (stade de 20 selon Brukhin et al. (2003)) durant la période du 29 février 2024 au 20 juin 2024. Le pollen d'une fleur de la plante utilisée comme parent mâle est récolté à l'aide d'une aiguille montée et est déposé sur le stigmate d'une fleur de la plante utilisée comme parent femelle. Chaque fleur pollinisée est identifiée par une étiquette indiquant le type de croisement réalisé. Toutes les fleurs en anthèse d'une même inflorescence sont pollinisées avec le même pollen et les fleurs non ouvertes ou fanées sont retirées. Environ vingt fleurs sont pollinisées par type de croisement. Toutes les combinaisons de croisements n'ont pas pu être réalisées par manque de fleurs.

Le taux de mise à fruit de chaque type de croisement est déterminé en calculant le pourcentage de pollinisation menant à la formation d'un fruit. Lorsque le fruit arrive à maturité, les graines sont récoltées et comptées après avoir été placées pendant quelques heures dans une solution de Na₂CO₃ à 10 % afin de dissoudre le gel entourant les graines. Le nombre de graines par fruit est ensuite calculé.

II. Germination du pollen et croissance des tubes polliniques

Pour déterminer la compatibilité, au niveau prézygotique, six types de croisements différents sont réalisés, avec un total de 10 pollinisations par types de croisements. Les pollinisations sont effectuées manuellement sur des fleurs avant anthèse (stade de 15-18 selon Brukhin et al. (2003)), préalablement émasculées, durant la période du 17 septembre 2024 au 1^{er} octobre 2024. Comme précédemment, le pollen d'une fleur de la plante utilisée comme parent mâle est récolté à l'aide d'une aiguille montée et est déposé sur le stigmate d'une fleur de la plante utilisée comme parent femelle. Chaque fleur pollinisée est identifiée par une étiquette indiquant le type de croisement réalisé. L'émasculation des fleurs, avant chaque pollinisation, permet d'éviter un mélange d'auto-pollen et de pollen du parent mâle.

Deux jours après l'émasculation et la pollinisation, les fleurs sont récoltées et stockées dans du FAA pour conservation (90% d'éthanol 70%, 5% d'acide acétique glacial et 5% de formaldéhyde 5%).

Avant l'observation au microscope, les fleurs sont immergées dans une solution de NaOH 0,1M pendant environ une heure afin de ramollir les tissus. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau. À l'aide d'une pince, le pistil est séparé de la fleur. Les pistils sont séchés, puis montés entre lame et lamelle dans 10 µl de bleu d'aniline (0,1 g de bleu d'aniline + 0,87 g de KH₂PO₄ dans 100 ml d'eau, pH 9) et écrasés afin de visualiser les tubes polliniques. Les échantillons sont ensuite observés au microscope à fluorescence (Polyvar, Reichert, filtre d'excitation BP330-380, filtre d'arrêt LP418), où le pollen et les tubes polliniques apparaissent avec une fluorescence bleue/verte.

Lors de l'observation des différentes coupes, le taux de germination du pollen est évalué en comptant le nombre de grains de pollen germés par rapport au nombre total de grains de pollen. La croissance des tubes polliniques des grains germés est également analysée en observant leur répartition dans le premier, deuxième ou troisième tiers du style.

D. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

I. Extraction d'ARN

Des styles des individus sont récoltés sur fleurs en anthèse + 2 jours, puis plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

L'ARN est extrait à l'aide du RNAeasy Plant Mini Kit (50) (Qiagen, Germany) selon le protocole du fabricant. Les styles sont broyés plante par plante dans l'azote liquide, puis chaque broyat est pesé et ajouté dans un tube Eppendorf de 2 mL. Dans chaque tube 450 µL de tampon RTL est ajouté afin de lyser les cellules. Après mélange au vortex, le lysat de chaque tube a été transféré dans une colonne QIAshredder placée dans un tube collecteur de 2 mL, puis centrifugé pendant 2 minutes à 10 000 RPM. L'éluat est transféré dans un nouveau tube de centrifugation auquel 225 µL d'éthanol 96 % sont ajoutés et mélangés par pipetage. L'échantillon est directement transféré dans une colonne placée dans un tube de collection de 2 mL. Après centrifugation (15 secondes, 10 000 RPM), l'éluat est éliminé et 700 µL de tampon RW1 sont ajoutés, suivis d'une nouvelle centrifugation (15 secondes, 10 000 RPM). Une fois l'éluat éliminé, 500 µL de tampon RPE sont ajoutés à la colonne afin de laver l'ARN, qui est centrifugé pendant 15 secondes à 10 000 RPM. Un second lavage avec 500 µL de tampon RPE est effectué avec une centrifugation de 2 minutes. La colonne est ensuite placée dans un nouveau tube collecteur et est centrifugée durant 1 minute à 10 000 RPM afin de sécher la membrane. Après transfert dans un nouveau tube collecteur et ajout de 30 µL d'eau RNase-free, la colonne est

centrifugée (1 minute, 10 000 RPM) afin d'éluer l'ARN. L'opération est répétée sur la même colonne avec 20 µL d'eau RNase-free.

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

II. Synthèse de cDNA et PCR

Chaque échantillon d'ARN est rétro-transcrit en cDNA selon deux méthodes : la méthode oligo(dT) et la méthode 3'RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends).

a. *Méthode oligo(dT)*

La méthode oligo(dT) (**Figure 14**) repose sur l'utilisation d'une amorce dotée d'une séquence poly(T) qui se lie à la queue poly(A) des ARN messagers. Elle est peu spécifique et a été employée pour rétrotranscrire l'ensemble des ARN messagers. Une PCR est ensuite réalisée à l'aide d'amorces du de gène contrôle constitutif (*LeEF1a*), , afin de vérifier si la rétrotranscription en cDNA a bien fonctionné.

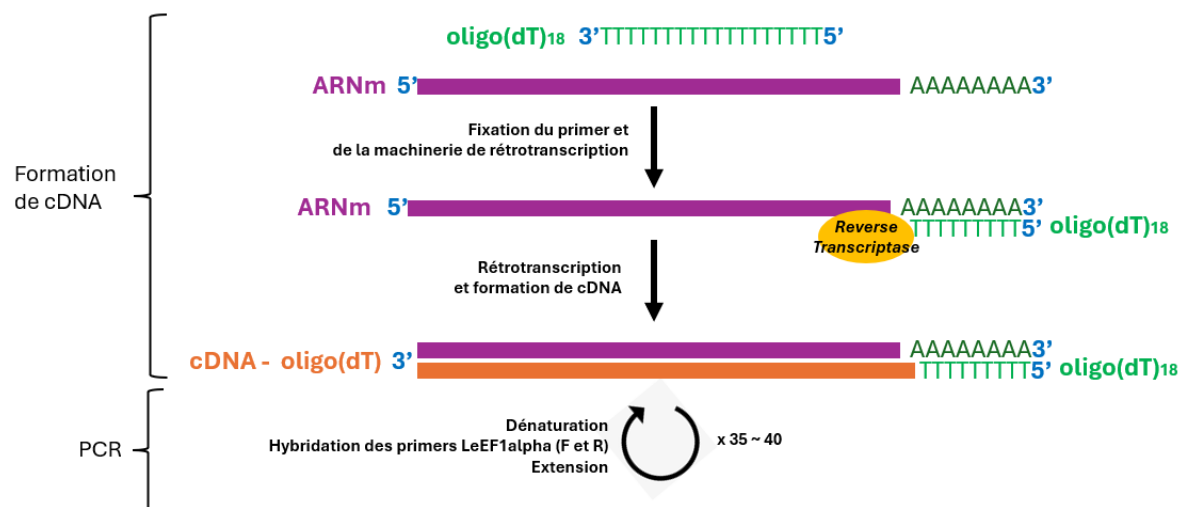


Figure 14 : Formation de cDNA via la méthode oligo(dT) et PCR vérificative. Premièrement, l'amorce oligo(dT) (en vert) vient s'hybrider à la queue de poly(A) de l'ARNm, permettant ensuite sa rétrotranscription en cDNA (en orange). Deuxièmement, une PCR vérificative de la formation de cDNA est réalisée à l'aide d'amorces conservées (ici *LeEF1 a*).

La synthèse de cDNA via la méthode oligo(dT) est effectuée en utilisant le kit Thermofisher Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Pour chaque ARN, 500 ng d'ARN ont été prélevés et mis dans un tube PCR 0,5 mL. En fonction de la concentration de l'échantillon d'ARN, le volume restant est complété par de l'eau DEPC milliQ pour arriver à 11µL dans chaque tube. À ce volume est ajouté, 1 µL d'amorce

oligo-(dT)₁₈. Après un passage à 65°C pendant 5 min, les échantillons sont disposés dans la glace. Chaque tube reçoit un mélange composé de : (1) 4 µl de tampon (x5), (2) 1µL Ribolock RNase inhibitor (20 unités/µl), (3) 2 µl de dNTP (10 mM) et (4) 1 µL de ReverseAid H minus M-MuLV RT (200 unités/µl), pour arriver à un volume final de 20 µL. Les échantillons sont ensuite incubés à 42°C pendant 1 heure, puis à 70°C pendant 15 minutes.

Afin de vérifier la bonne rétrotranscription des cDNA, une PCR qualitative (mix décrit au Tableau 1) est réalisée (à l'aide du kit Go Taq G2 DNA Polymerase, Promega 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, É.-U.) sur chacun des échantillons avec un gène contrôle *LeEF1α* (Elongation factor 1-alpha, GenBank: X14449.1), avec 2 µL de cDNA dilué 10x (séquence des amorces décrite au Tableau 3). Les conditions de la PCR étaient : 3 minutes de dénaturation initiale à 94°C, 35 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 45 secondes d'élongation à 72°C et une élongation finale à 72°C pendant 12 minutes. L'amplification a été visualisée par électrophorèse (20 µL d'échantillon PCR, gel d'agarose à 1,8%).

Pour chaque gel d'électrophorèse, une échelle moléculaire (BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega, 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA), a été ajouté dans le premier puits du gel (Annexe 2).

Tableau 1 : Détail du mix utilisé pour la PCR qualitative de la méthode oligo(dT). La séquence des amorces est décrite au Tableau 3.

Réactifs	Volumes
Eau Milli-Q	16,375 µL
Buffer Green GoTaq 5x	5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
Amorce Forward <i>LeEF1α</i> (10µM)	0,5 µL
Amorce Reverse <i>LeEF1α</i> (10µM)	0,5 µL
Go Taq Polymérase	0,125 µL

b. Méthode RACE

La méthode 3'RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) (**Figure 15**) repose sur la formation de cDNA et l'amplification de séquences spécifiques d'ARNm. Elle est souvent utilisée dans le cadre du séquençage des S-RNases. Le processus se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, on utilise une amorce RaceA, composée d'une queue poly(T) et d'une séquence connue. La queue poly(T) se lie à la queue poly(A) des ARNm, permettant ainsi leur rétrotranscription en cDNA, qui inclut alors une séquence terminale connue. Dans un second temps, une PCR est réalisée à l'aide d'une amorce PR1, qui se fixe sur les séquences conservées

des S-RNases du cDNA nouvellement rétrotranscrit, permettant ainsi la réplication de ce cDNA. Une fois dénaturé, un troisième amorce, RaceB, ayant une séquence identique à la séquence connue de RaceA, se fixe sur la séquence répliquée, permettant ainsi la réplication de la séquence spécifique. La PCR continue alors pour amplifier le cDNA spécifique à l'aide des amorces PR1 et RaceB (séquences décrites au Tableau 3).

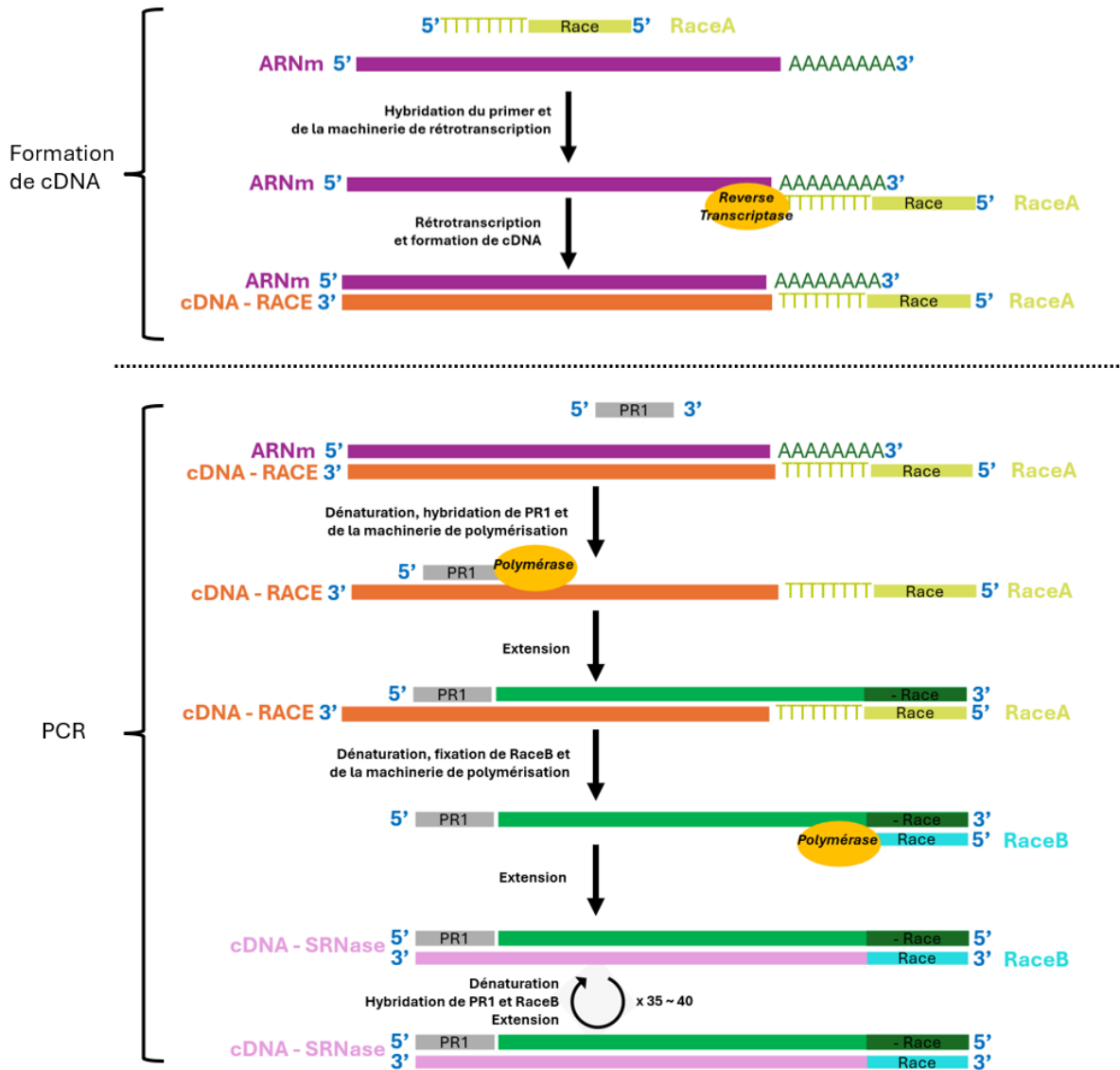


Figure 15 : Synthèse de cDNA via la méthode RACE. Premièrement, formation de cDNA-Race (orange) via l'hybridation du primer RaceA (jaune) sur la queue de poly(A) des ARNm, permet la rétrotranscription en cDNA avec une séquence terminale connue (Race). Deuxièmement, PCR via l'hybridation de l'amorce PR1 (spécifique aux séquences conservées des S-RNases) et répliquation du brin de cDNA (vert) contenant la séquence connue « - Race » (vert foncé). Hybridation de Race B (bleu) à la séquence « - Race » afin de répliquer le second brin de cDNA, contenant la séquence de S-RNase (rose). Enfin, répétitions des étapes afin d'amplifier les cDNA.

La synthèse de cDNA via la méthode RACE est réalisée selon l'article de Igc et al., 2007 et en utilisant le même kit Thermofisher Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Pour chaque ARN, 100 ng d'ARN est prélevé pour

arriver à 11µL dans chaque tube, comme précédemment. A ce volume est ajouté, 2 µL d'une amorce RaceA (Tableau 3). Après un passage à 65°C pendant 5 min, les échantillons sont disposés dans la glace. Chaque tube reçoit un mélange composé de : (1) 4 µl de tampon (x5), (2) 1µL Ribolock RNase inhibitor (20 unités/µl), (3) 1 µl de dNTP (10 mM) et (4) 1 µl de ReverseAid H minus M-MuLV RT (200 unités/µl), pour arriver à un volume total de 20µL. Les échantillons sont ensuite incubés à 42°C pendant 1 heure, puis à 70°C pendant 15 minutes.

Une fois la synthèse du cDNA terminée, plusieurs PCR qualitatives ont été effectuées pour chaque échantillon (mix général décrit au Tableau 2). Pour l'amplification des échantillons de cDNA, le protocole de PCR comprend une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles avec 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C ou 48°C selon les PCR, et 1 minute d'élongation à 72°C. Enfin, une élongation finale de 8 minutes est réalisée à 72°C.

L'amplification est visualisée par électrophorèse avec 15 µL d'échantillon PCR, sur un gel d'agarose à 1,8 %. À la suite des échecs de la méthode RACE, plusieurs autres PCR ont été effectuées afin d'identifier les causes du dysfonctionnement. Les détails de ces PCR sont présentés dans les résultats.

Tableau 2 : Détail du mix standard utilisé pour la PCR de la méthode Race. La séquence des amorces est décrite au Tableau 3.

Réactifs	Volumes
Eau Milli-Q	34,5 µL
Buffer GoTaq 5x Green	10 µL
dNTP (10mM)	1 µL
Amorce Forward PR1 (10µM)	1 µL
Amorce Reverse RaceB (10µM)	1 µL
Go Taq Polymérase	0,25 µL

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour les synthèses de cDNA et les PCR, des méthodes oligo(dT) et Race.

Amorce	Séquence (5'-3')	Sens	T° d'hybridation
LeEF1 α	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	F	60°C
LeEF1 α	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	R	60°C
RaceA	GCGCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	R	48°C
RaceB	GCGCACGCGTCGACTAGTAC	R	48°C
PR1	GAATTCAYGGNYTNTGGCCNGA	F	60°C
S10	GACCTTTTGACAACTCTCCGG	F	56°C
S10	CCCGATGCAACAAAGGTGAT	R	56°C
S35	ACGCAATCATGACCGTTACG	F	56°C
S35	TGCTTTCAATTGACCTCGGC	R	56°C
S36	TCCTGATCTCAAGTGCGTCA	F	56°C
S36	GGGTAGTTGCGCATCTTGTT	R	56°C

III. Identification de S-allèles

À partir des cDNA obtenus via la méthode oligo(dT), plusieurs PCR (mix décrit au Tableau 4) sont réalisées en utilisant des amorces (séquences décrites au Tableau 5) de S-allèles déjà connus au laboratoire (*S10*, *S35* et *S36*) avec 2 μ L de cDNA dilué 10x. Le protocole de PCR comprend une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C, 45 secondes d'élongation à 72°C, et une élongation finale de 12 minutes à 72°C. L'amplification est visualisée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,8 % avec 20 μ L d'échantillon PCR.

Afin d'identifier de nouveaux S-allèle, des amorces « Groupe » communes à différentes S-RNases proches ont été dessinées sur base d'un arbre phylogénétiquement proche et d'alignement de séquences (Defalque, 2023; Igit et al., 2007; Moreels, 2022) (**Figure 16**, Tableau 6). Pour ce faire, premièrement, des PCR de prétest (mixe décrit au Tableau 4) sont réalisées sur 2 μ L cDNA issu de la méthode oligo(dT) contrôle (dilué 20x) afin de vérifier l'efficacité de ces amorces. Deux protocoles de PCR différents ont été utilisés l'un avec une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 50°C, 45 secondes d'élongation à 72°C, et une élongation finale de 12 minutes à 72°C, l'autre avec 40 cycles et une température d'hybridation de 53°C. Ensuite, des PCR (mix décrit au Tableau 4) sont réalisées sur le cDNA issu de la méthode oligo(dT), avec des amorces « Groupe Chiffre » 1 à 7 avec 2 μ L de cDNA dilué 10x selon les PCR. Le protocole de PCR comprend une dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, suivis de 35 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à différentes T° selon les amorces utilisées (50°C pour les amorces « Groupe » 1 à 6 et 53°C

pour les amorces « Groupe » 7), 45 secondes d'élongation à 72°C, et une élongation finale de 12 minutes à 72°C. L'amplification est visualisée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,8 % avec 15 µL d'échantillon PCR.

Tableau 4 : Détail du mix utilisé pour les PCR d'identification des S-allèle avec les amorces S10, S35 et S36 ainsi que les amorces « Groupe ». Les séquences des amorces sont décrites aux Tableaux 5 et 6.

Réactifs	Volumes
Eau Milli-Q	16,375 µL
Buffer GoTaq 5x Green	5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
Amorce Forward (10µM)	0,5 µL
Amorce Reverse (10µM)	0,5 µL
Go Taq Polymérase	0,125 µL

Tableau 5 : Séquences des amorces spécifiques aux S-allèle S10, S35 et S36, utilisé pour l'identification de S-allèle .

Amorce	Séquence (5'-3')	Sens	T° d'hybridation
S10	GACCTTTTGACAACCTCTCCGG	F	56°C
S10	CCCGATGCAACAAAGGTGAT	R	56°C
S35	ACGCAATCATGACCGTTACG	F	56°C
S35	TGCTTTCAATTGACCTCGGC	R	56°C
S36	TCCTGATCTCAAGTGCGTCA	F	56°C
S36	GGGTAGTTGCGCATCTTGTT	R	56°C

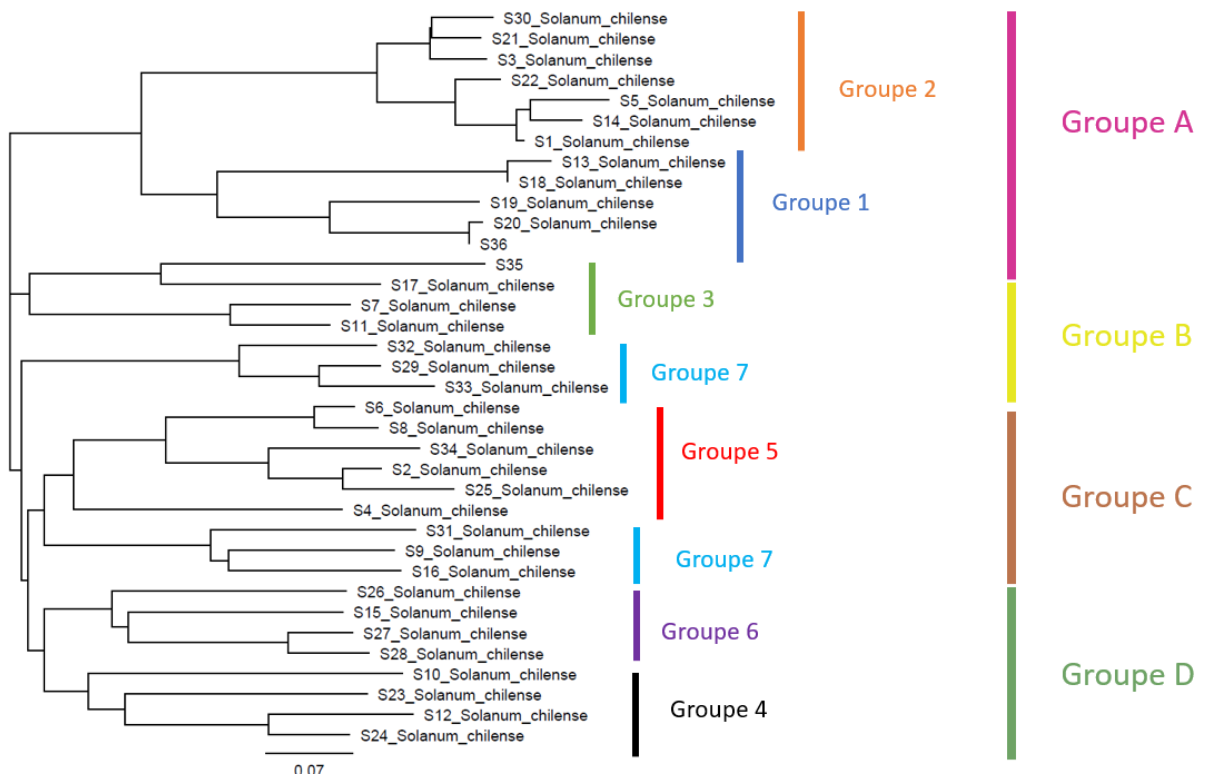


Figure 16 : Arbre phylogénétique des S-allèle et repartitions des S-allèle dans les différents groupes d'amorces « Groupe ».

Tableau 6 : Séquences des amorces « Groupe » utilisées pour l'identification de S-allèle.

Amorce	Séquence (5'-3')	Sens	T° d'hybridation
Groupe A	TGCCGYTRAAAGAHARRTTWGA	F	53,4°C
Groupe A	TTKAGTRRCKGTCTTRAYRGC	R	55,1°C
Groupe B	CCGCTGGCCTCAAYTVAVWH	F	57,7°C
Groupe B	TTDYACAACASRTTCCATGKTT	R	52,6°C
Groupe C	NANCRYTGGCCTRACTTGAY	F	55,1°C
Groupe C	YTTSATYRAAGATCTGAACAACA	R	50,8°C
Groupe D	HMAAHCTGGASGMTCRCTGGCCTG	F	63,1°C
Groupe D	TCAAACCTTGTCTTTYAAWTYCAKRGY	R	53,9°C
Groupe 1	TACAMAARRCATGGAABGTG	F	51,1°C
Groupe 1	TGTHCCDGGRTAATTCATG	R	54,8°C
Groupe 2	GATCTTGACAARMACTGGATT	F	50,6°C
Groupe 2	ATAYTTGAWCCAGGAAMAAT	R	46,7°C
Groupe 3	CTDGACAARCGMTGGCCTCA	F	58,4°C
Groupe 3	TTCATRGCYARATCAAARTAT	R	47,1°C
Groupe 4	ACGATCGSTGGCMWGACTIONTGA	F	60,0°C
Groupe 4	ATCCAGGAHYAATTCYATG	R	47,3°C
Groupe 5	GAAAYAAGCACTGGCCTGACT	F	58,6°C
Groupe 5	AACTGWYCKGATRGTTTTTT	R	48,6°C
Groupe 6	CATGGRCTWTGGCCWGATA	F	53,1°C
Groupe 6	AGATCRAACTKSTYTTTTAA	R	45,8°C
Groupe 7	ATHCATGGVBKTGGCCDGAT	F	58,1°C
Groupe 7	TDVACAACAHRDTCCATGCTT	R	53,1°C

IV. Étude d'expression de *HT-A*, *HT-B*, *S10* et *S35* par RT-qPCR

L'expression des gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B* ainsi que des allèles des S-RNases *S10* et *S35* est analysée par qPCR en utilisant les gènes *LeEF1 α* (Elongation factor 1-alpha) et *TIP41* (TIP41-like protein) comme gènes de référence, sélectionnés pour leur qualité en tant que gènes contrôles (Blanchard-Gros et al., 2021; Leelatanawit et al., 2017).

Les qPCR (mix décrit au Tableau 7) sont réalisées en triplica avec le kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, 2800 Woods Hollow Road, États-Unis) sur les cDNA des 10 individus *S. chilense* obtenus via la rétrotranscription par la méthode oligo(dT), décrite précédemment. Les amorces utilisées sont reprises dans le Tableau 8 et les cDNA sont versés dans une plaque qPCR (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction plate with bar code, Life Technologies Corporation 5781 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008). Les échantillons sont mis dans une machine à qPCR (StepOnePlus Real-Time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pour être amplifiés. Les conditions de la qPCR étaient les suivantes : 10 minutes de dénaturation à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Les résultats des échantillons sont analysés à l'aide du logiciel StepOne 2.3.

Afin que les résultats de RT-qPCR soient fiables et comparables, il est essentiel que l'efficacité d'amplification soit proche de 100%, indiquant que le nombre de molécules de la séquence cible double à chaque cycle. Le calcul de l'efficacité d'amplification des amorces se fait via une série de dilutions de cDNA contenant le gène d'intérêt. Les CT (Treshold cycle, mesure relative de la concentration de la séquence d'intérêt dans la réaction) et les concentrations correspondantes sont ensuite représentés sur une échelle logarithmique. Une régression linéaire est appliquée aux points et la pente de la ligne permet de calculer l'efficacité des amorces, selon la formule indiquée dans l'Équation 1. Afin de vérifier que les amorces ne dimérisent pas, il est également possible de vérifier la courbe de fusion (melt-curve) issue de la RT-qPCR. La présence de plusieurs pics sur la courbe de fusion indique une dimérisation des amorces. Toutes les amorces utilisées pour l'expression des gènes d'intérêt ont été vérifiées via des tests d'efficacité et l'analyse de leur courbe de fusion et ont été jugées conformes aux critères.

$$Efficacité = -1 + 10^{-1/pente} \text{ (Équation 1)}$$

L'expression des différents gènes a été calculée selon la méthode « standard curve » en tenant compte de l'efficacité d'amplification et en utilisant les gènes *LeEF1a* et *TIP41* comme gènes de références et l'individu PIS10 comme échantillon de référence. La méthode détaillée de calcul est disponible à l'annexe 1.

Tableau 7 : Détail du mix PCR utilisées pour la RT-qPCR. Les séquences des amorces sont décrites au Tableau 8.

Réactifs	Volumes
Sybr Green	5 µL
Eau nuclease-free	1,9 µL
Amorce Forward (10µM)	0,5 µL
Amorce Reverse (10µM)	0,5 µL
CRX	0,1 µL
cDNA	2 µL

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.

Amorce	Séquence (5'-3')	Sens	T° d'hybridation
LeEF1 α	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	F	60°C
LeEF1 α	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	R	60°C
S10	GACCTTTTGACAACCTCTCCGG	F	56°C
S10	CCCGATGCAACAAAGGTGAT	R	56°C
S35	ACGCAATCATGACCGTTACG	F	56°C
S35	TGCTTTCAATTGACCTCGGC	R	56°C
HT-A	TGCAAGGGAAATAGTTGAGGCA	F	60°C
HT-A	CTGTCATCATCATCATCGTCATCG	R	60°C
HT-B	GAGCTGAACAATCCAACACT	F	60°C
HT-B	TTGGACAAGGGCAACGTGAAC	R	60°C
TIP41	CGAAAGCAATGTCGAGTGTG	F	60°C
TIP41	GGTTCTTTAGACGCCAATGC	R	60°C

E. ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT RACINAIRE PAR BOUTURAGE

Dans le but de multiplier les plantes par bouturage, différentes solutions de bouturage sont utilisées pour stimuler le développement racinaire chez *S. chilense*, le développement racinaire de cinq individus, choisi aléatoirement (PIS10, PIS19, PIS33, PIS38, PIS40) est analysé dans quatre solutions différentes avec cinq boutures (ou répliques) par individu. Les solutions de bouturage sont les suivantes : (1) eau déminéralisée à 20mM de NaCl, (2) eau déminéralisée avec hormones de bouturage (Rootone, N.V. Edialux - Formulex S.A, Rijksweg 28, 2880 Bornem, Nederland) (3) eau déminéralisée à 20mM de NaCl avec hormones de bouturage, (4) eau déminéralisée comme contrôle (**Figure 17**). L'expérience a été réalisée en serre, et a débuté le 6 juin 2024. En début et en fin d'expérience, la conductivité électrique (en mS/cm) des solutions a été mesurée avec l'appareil (DiST® 6 EC/TDS/Temperature Tester, HI98312, HANNA Instruments, Maurice). Après une semaine, puis deux fois par semaine, la présence de racines et le nombre de racines, de chacune des boutures est mesuré. La prise de mesure s'est arrêtée après deux semaines due à la mort et l'assèchement de la presque totalité des boutures.

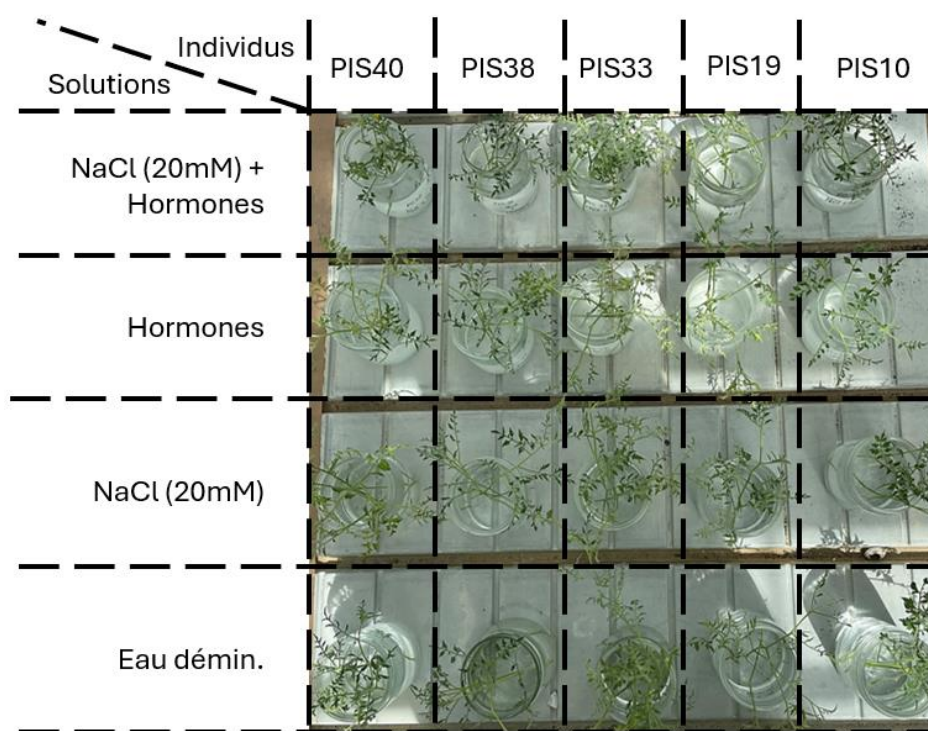


Figure 17 : Design expérimental de l'analyse de développement racinaire par bouturage

F. ANALYSES STATISTIQUES

Les données des différentes expériences sont encodées sur le logiciel Microsoft® Excel® pour Microsoft 365 MSO (Version 2409 Build 16.0.18025.20030) 64 bits. Les tests statistiques et les graphiques sont réalisés à l'aide du langage de programmation R (version 4.4.1) sur l'environnement de développement RStudio (version 2024.9.0.375).

Des tests ANOVA1, avec la fonction `aov()`, et comparaisons multiple via la méthode Tukey, avec le package `emmeans`, sont utilisés pour déterminer les différences de morphologie florale, les différences d'expression des gènes *HT-A*, *HT-B*, *S10* et *S35*, entre les différents individus. Des analyses en composante principale (ACP) sont réalisées afin de décrire les corrélations entre les traits de morphologie florales et l'expression relative des gènes entre les individus avec la fonction `prcomp()`, le nombre de composantes principales est choisi en explorant différentes méthodes de sélection (Jackson, 1993; Peres-Neto et al., 2005). Des tests de corrélation (de Pearson) sont réalisés entre les données de taux de mise à fruit, nombre moyen de graines, taux de germination du pollen, pourcentage de tubes polliniques atteignant les différents tier du style et aussi avec l'expression relatives gène, avec la fonction `cor.mtest()` du package `corrplot`. Des régressions logistiques binomiales (GLM) avec la fonction `lien logit`, avec la fonction `glm()`, sont utilisées pour déterminer les différences de taux de germination du

pollen et de proportions de tubes polliniques traversant les différents tiers du style (Douma & Weedon, 2019; Warton & Hui, 2011). Des test Chi² sont réalisés, avec la fonction `chisq.test()`, pour déterminer les différences de mortalité des boutures entre les différentes solutions du bouturage et entre les individus. Des tests Exact de Fisher sont réalisés, avec la fonction `fisher.test()`, pour déterminer les différences de présence/absence de racine entre les différentes solutions du bouturage et entre les individus, étant donné de faibles (>4) effectifs attendus. Les conditions d'applications des différents tests statistiques ont été vérifiées. L'ensemble des données utilisées et des codes R sont disponibles au lien GitHub suivant : https://github.com/SchreiberRo/memory_thesis_data.git.

RÉSULTATS

A. PARTIE 1 – MORPHOLOGIE FLORALE ET EXERTION DU STIGMATE

Dans cette première partie, une comparaison de la morphologie florale des individus de *S. chilense* a été réalisée. L'objectif étant d'étudier la relation entre la compatibilité des plantes (étudié dans les parties 2 et 3) et leur morphologie florale.

La surface des pétales, des sépales et des étamines variait de manière significative entre les individus (**Figure 18**). Les différences étaient plus marquées pour les pétales et les sépales que pour les étamines. La surface moyenne des pétales variait entre 0.2 cm² chez PIS33 et 0.49 cm² chez PIS19, celle des sépales entre 0.052 cm² chez PIS31 et 0.078 cm² chez PIS14 et celle des étamines entre 0.07 cm² chez PIS33 et à 0.086 cm² chez SC2. La longueur des étamines et des styles variait également entre individus (**Figure 19**). La différence entre les étamines les plus longues (PIS19) et les plus courtes (PIS33) était de 18,1% tandis que celle entre les styles les plus longs (PIS19 et SC2) et les plus courts (PIS40) était de 31,6%.

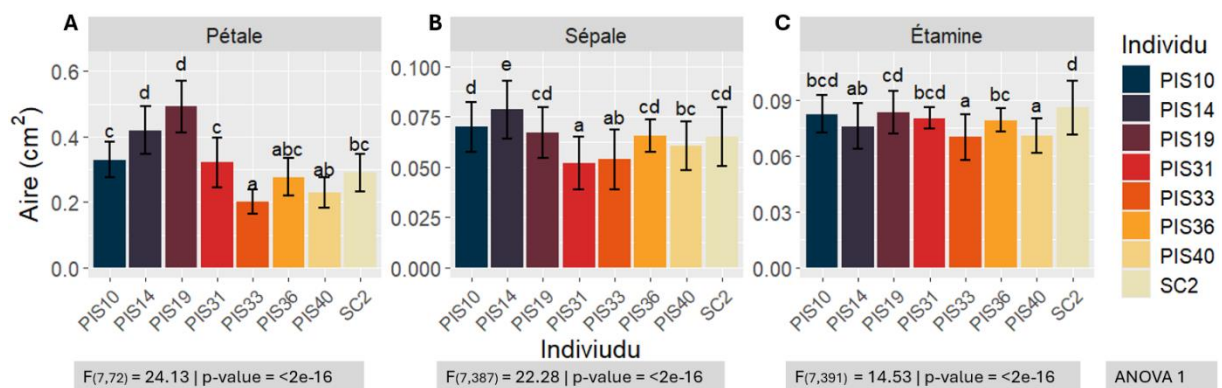


Figure 18 : Aire moyenne des organes floraux des différents individus de *S. chilense*. (A) Pétale, (B) Sépale, (C) Étamine. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type autour de la moyenne. Les valeurs partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes selon les comparaisons multiples avec la méthode Tukey ($\alpha = 0,05$). La cellule en dessous présente la F value, les degrés de liberté, et la p-value issus de l'ANOVA 1 (Aire Organe ~ Individu).

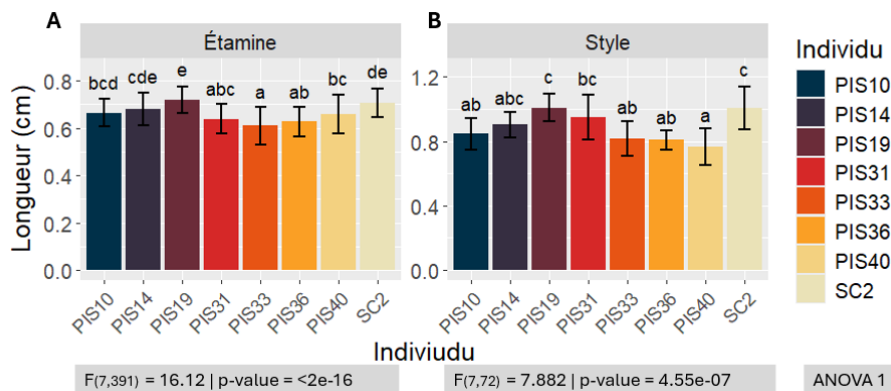


Figure 19 : Longueur moyenne des organes floraux des différents individus de *S. chilense*. (A) Étamine, (B) Style. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type autour de la moyenne. Les valeurs partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes selon les comparaisons multiples avec la méthode Tukey ($\alpha = 0,05$). La cellule en dessous présente la F value, les degrés de liberté, et la p-value issus de l'ANOVA 1 (Longueur Organe ~ Individu).

L'exertion du stigmate a été estimée en calculant le rapport entre la longueur du style et la longueur moyenne des cinq étamines. Elle était la plus élevée chez les individus PIS31, PIS19 et SC2 et la plus faible chez PIS40 (**Figure 20**).

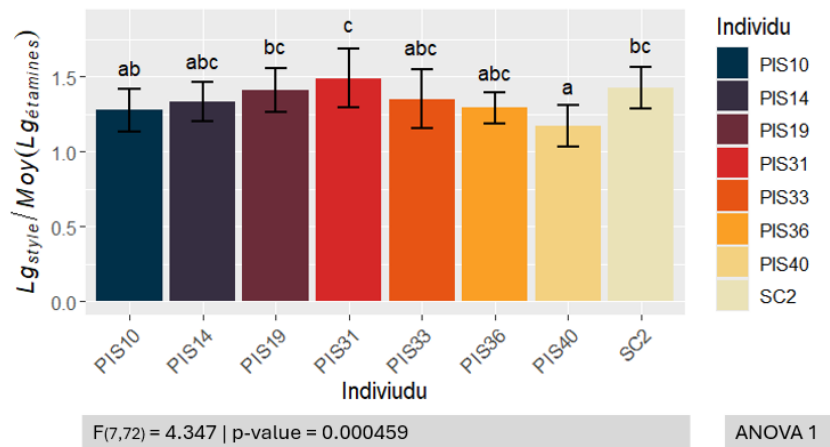


Figure 20 : Exertion moyenne des stigmates des différents individus de *S. chilense*, calculé via le rapport entre la longueur du style et la longueur moyennes des étamines. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type autour de la moyenne. Les valeurs partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes selon les comparaisons multiples avec la méthode Tukey ($\alpha = 0,05$). La cellule en dessous présente la F value, les degrés de liberté, et la p-value issus de l'ANOVA 1 (Rapport ~ Individu).

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour identifier les relations entre les individus et entre les variables d'aire moyenne des pétales, sépales et étamines, ainsi que de longueurs des étamines et du style. L'axe 1 explique 52,1 % de la variance totale et est influencé par les cinq variables. L'axe 2, quant à lui, explique 25,9 % de la variance totale et est positivement corrélé avec les longueurs des étamines et du style, mais négativement corrélé avec l'aire des sépales et des étamines. La longueur du style et l'aire des sépales ne sont pas corrélées entre elles (**Figure 21.B**).

Les fleurs des différents individus ne formaient pas de groupes parfaitement distincts, mais certaines tendaient à se regrouper en fonction de morphologies similaires. Les fleurs de PIS19, caractérisées par des morphologies florales plus grandes, se situaient principalement dans la partie gauche du graphique. En revanche, les fleurs de PIS33 se trouvaient plutôt dans la partie droite du graphique montrant ainsi que leur style et leurs étamines sont plus courts (**Figure 21.A**).

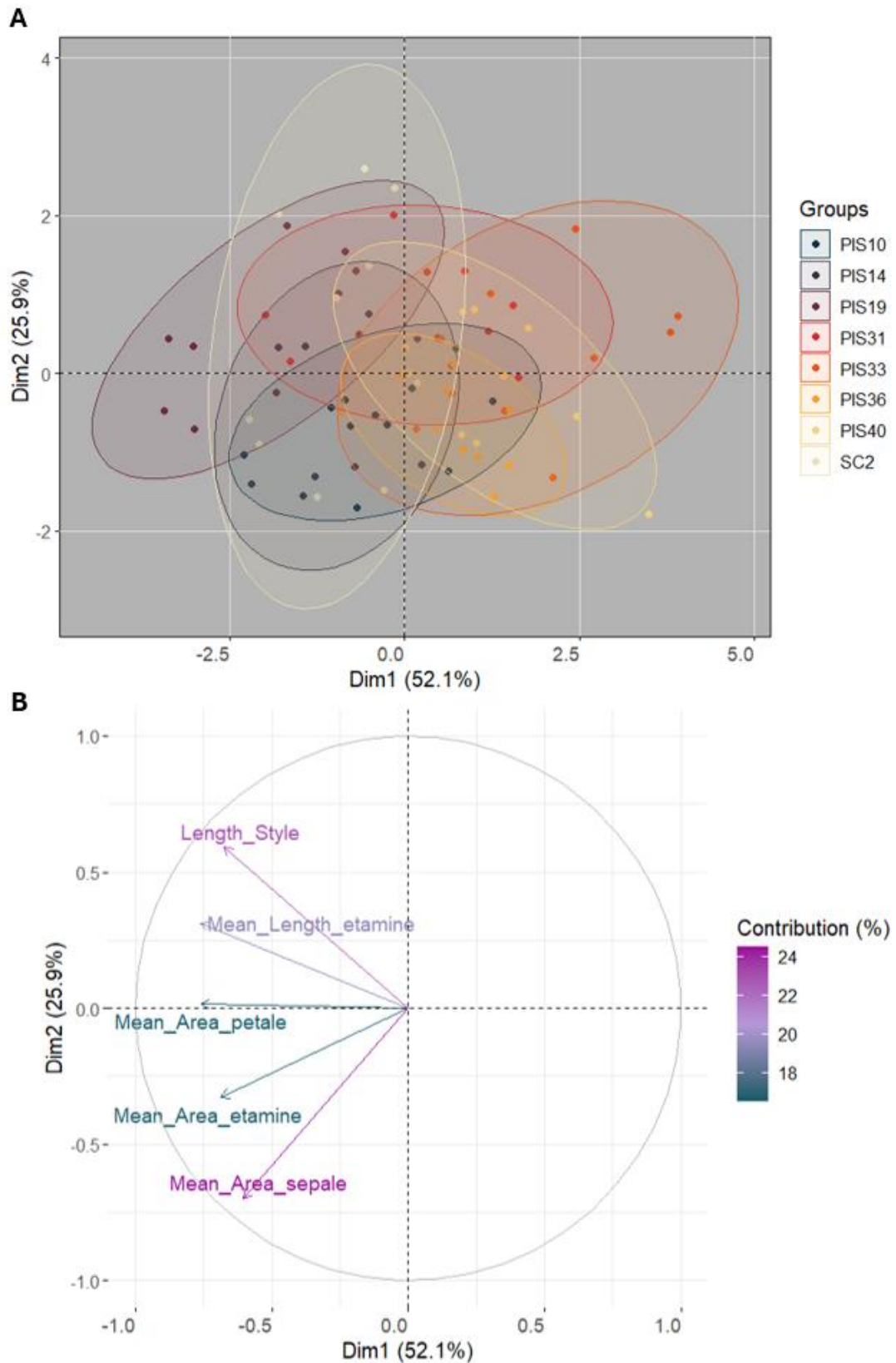


Figure 21 : Analyse en composante principale (ACP) de la surface et de la taille des organes floraux des individus de *S. chilense*. (A) Graphique des individus de *S. chilense*. Les points représentent les fleurs individuelles. (B) Graphique des variables, avec la contribution pour les composantes principales (Dim 1 et Dim 2) représentée par l'orientation des flèches et le gradient de couleurs.

B. PARTIE 2 – IDENTIFICATION DES S-ALLÈLES

Dans cette deuxième partie, l'objectif a été d'identifier les allèles des S-RNases des individus de *S. chilense*, dans le but d'obtenir la comptabilité théorique des croisements entre ces individus.

Nous avons d'abord utilisé la méthode RACE, souvent utilisée pour le séquençage des S-RNases (Igc et al., 2007). Cependant, des difficultés sont apparues lors de l'utilisation de cette méthode. Nous avons donc employé une approche alternative, basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques à des S-allèles déjà caractérisés au GRPV. Grâce à cette méthode, nous avons pu identifier une partie des S-allèles présents chez nos individus de *S. chilense*. Nous avons, par la suite, essayé d'identifier quelles étapes de la méthode RACE ont posé problème, en utilisant les S-allèles identifiés comme référence et les individus comme contrôle. Enfin, nous avons utilisé de nouvelles amorces appelées amorces « Groupe », communes à différentes S-RNases proches, afin de restreindre l'identification à des groupes de S-allèles.

I. Méthode RACE

Nous avons utilisé la méthode 3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) afin d'identifier les S-allèles inconnus dans notre population. Cette méthode a été effectuée à partir des ARN des pistils des plantes PIS10, PIS14, PIS30, PIS33, PIS40.

L'ARN a été transformé en cDNA Race, et plusieurs PCR ont été effectuées avec ce cDNA. Tout d'abord, 2 μ L de cDNA ont été utilisés pour l'amplification avec les amorces PR1 et RaceB . Comme le montre la **Figure 22**, seules de doubles amplifications de taille inattendue et des smears ont été observées. Il n'est pas à exclure que les bandes de tailles élevées correspondaient à de l'ADN. Supposant que le cDNA était peut-être trop concentré, une nouvelle PCR a été réalisée avec du cDNA dilué 10 fois, mais aucune amplification n'a été observée (**Figure 22**). Étant donné que les PCR ont été effectuées à très basse température d'hybridation, il est possible que l'amplification ait été très faible et donc peu visible. Une nouvelle PCR a donc été effectuée en partant de 2 μ L de produits PCR précédents à une température plus élevée afin de vérifier si une amplification avait eu lieu. De nouveau, la taille des bandes obtenues n'était pas celle attendue pour l'amplification des S-allèles (500-800 bp) ou représentait des smears qui correspondent sans doute à des amplifications non spécifiques (**Figure 22**).

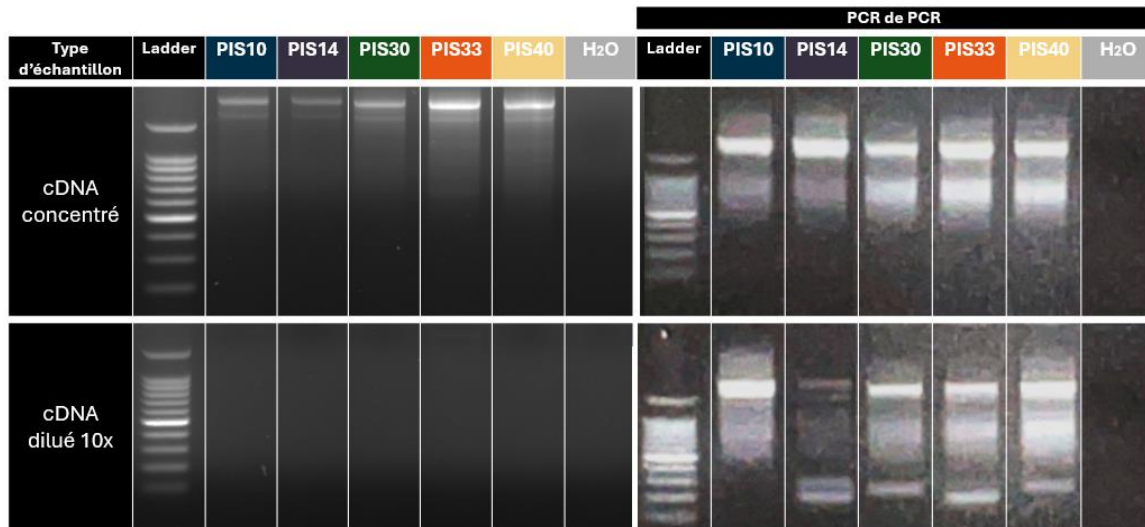


Figure 22 : Amplification des S-allèles par la méthode RACE chez 5 individus de *S. chilense* après rétrotranscriptions. À gauche, amplifications des cDNA RACE (concentré et dilué 10x). À droite, amplifications des produits de la PCR initiale (de gauche). Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O). La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

II. Méthode oligo(dT) avec amorces S10, S35, S36

La méthode RACE n'ayant rien donnée, nous avons ensuite employé la méthode oligo(dT) avec des amorces spécifiques aux allèles de S-RNases S10, S35 et S36 déjà caractérisées au laboratoire afin de vérifier si d'autres individus partageaient les S-allèles identifiés précédemment.

Le cDNA des styles des individus PIS31, PIS34, PIS36, PIS38 et SC2 était déjà disponible au laboratoire et l'ARN des styles des individus PIS10, PIS14, PIS19, PIS30, PIS33 et PIS40 a été extrait et la synthèse de cDNA a été réalisée selon la méthode oligo(dT). L'amplification du gène contrôle *LeEF1α* chez les 6 individus montre que la rétrotranscription a bien été effectuée (Figure 23).

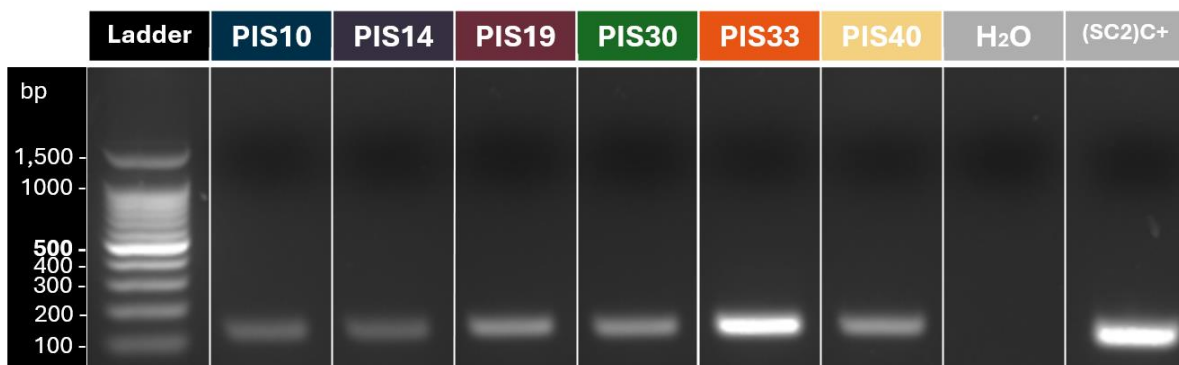


Figure 23 : Amplification du gène contrôle *LeEF1α* chez 6 individus de *S. chilense* après rétrotranscription par oligo(dT). Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O) et le contrôle positif est une amplification avec du cDNA d'un individu SC2 précédemment rétrotranscrit.

Des PCR ont ensuite été réalisées avec les amorces spécifiques des S-allèles S10, S35 et S36 pour l'ensemble des individus. La **Figure 24** montre des amplifications de taille attendue avec les amorces S10 pour les individus PIS10, PIS33, PIS36, PIS38 et PIS40 ; avec les amorces S35 pour les individus PIS10, PIS14, PIS19, PIS30, PIS33, PIS36, PIS38 et PIS40 ; et avec les amorces S36 pour l'individu PIS30. Enfin, d'après les recherches précédemment menées au GRPV, nous savons aussi que SC2 possède les allèles S10 et S35 et cela a été révérifié ici (**Figure 24**).

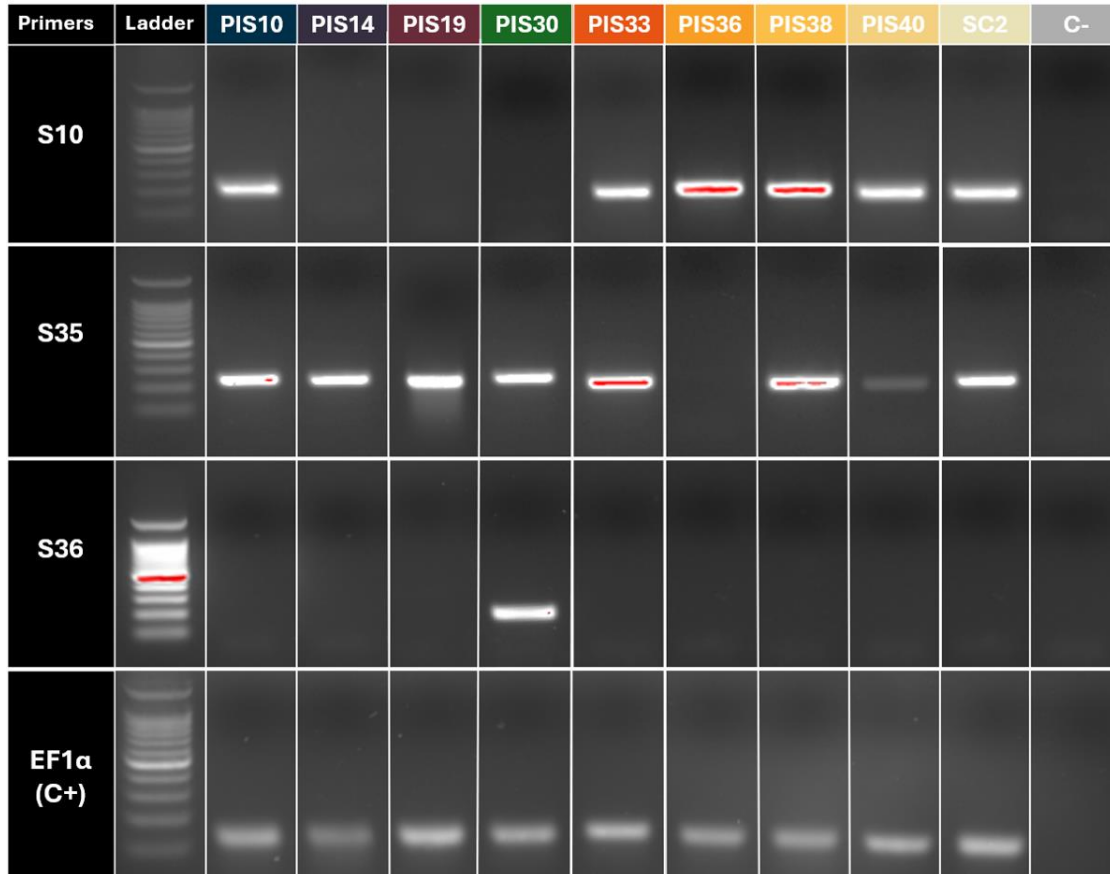


Figure 24 : Amplification des S-allèles S10, S35 et S36 chez 9 individus de S. chilense après rétrotranscription par oligo(dT). Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (C-). L'amplification du gène contrôle LeEF1α a été utilisé comme contrôle positif de la présence de cDNA. La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

Le séquençage Sanger (Microsynth Seqlab GmbH, Göttingen, Germany) des amplifications des échantillons PIS10, PIS30, PIS33, PIS38 ont permis de vérifier que les séquences amplifiées correspondaient bien aux séquences attendues des S-allèles. Les alignements des séquences sont disponibles à l'annexe 3.

III. Vérification des étapes de la méthode RACE

La transformation des ARN en cDNA et amplification des S-RNases via la méthode RACE n'ayant donné aucun échantillon fiable susceptible d'être cloné, puis séquencé et ayant

réussi à identifier quelques S-allèles via la méthode oligo(dT). Nous avons essayé de déterminer quelle étape de la méthode RACE a posé problème.

Nous avons effectué plusieurs PCR afin d'identifier l'étape potentiellement défaillante. Premièrement, afin de tester l'amorce RACE A ainsi que la synthèse du cDNA Race, nous avons réalisé une amplification des cDNA Race (concentré et dilué 10x) d'individus porteurs des S-allèles S35 ou S36, en utilisant les amorces spécifiques de ces allèles disponibles au laboratoire. Les cDNA oligo(dT) des mêmes individus ont été utilisés comme contrôle positif.

Certains échantillons de cDNA dilué 10x ont montré une amplification faible ou non visible, mais tous les échantillons de cDNA concentré ont montré une amplification de taille attendue, montrant que le problème avec la méthode RACE ne venait pas des amorces RaceA ni de la synthèse de cDNA. Certains échantillons de cDNA dilué 10x montrent une amplification plus faible ou pas visible (**Figure 25, Figure 26**).

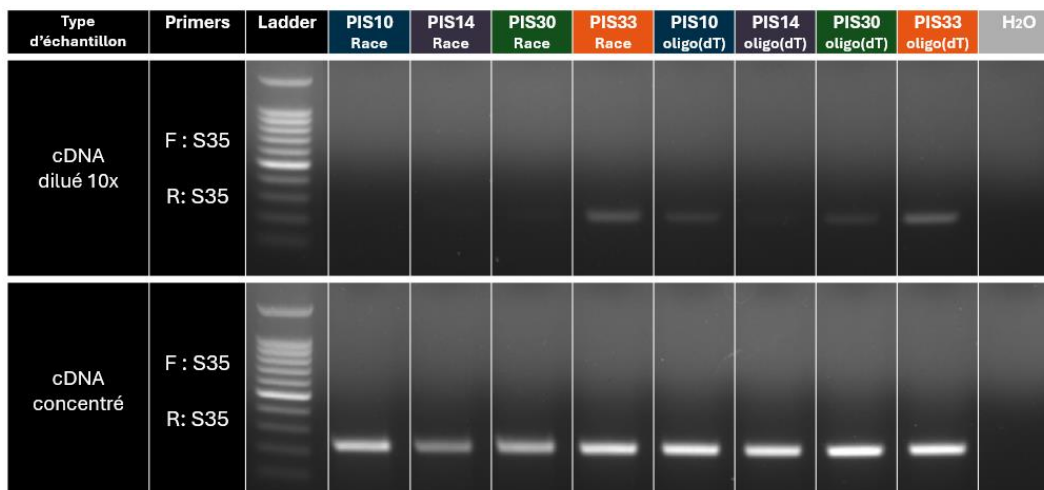


Figure 26 : Amplification du S-allèle S35 de cDNA (dilué ou concentré) de 4 individus de *S. chilense* rétro-transcrit par RaceA (Race) et par oligo(dT). Les contrôles positifs sont les échantillons de cDNA oligo(dT). Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O). La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

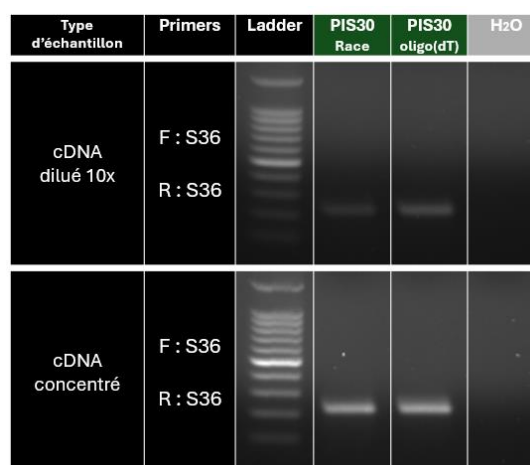


Figure 25 : Amplification du S-allèle S36 de cDNA (dilué ou concentré) de l'individu PIS30 rétro-transcrit par RaceA (Race) et par oligo(dT). Les contrôles positifs sont les échantillons de cDNA oligo(dT). Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O). La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

Deuxièmement, afin de tester les amorces PR1 et RaceB, nous avons réalisé une amplification des cDNA Race des individus porteurs du S-allèle S35, en substituant l'amorce PR1 par l'amorce S35 plus conservée et spécifique au S-allèle S35. En remplaçant l'amorce PR1 par S35, tous les cDNA Race montraient une amplification, ce qui suggère que le problème de la méthode RACE viendrait de cette amorce PR1 (**Figure 27**).

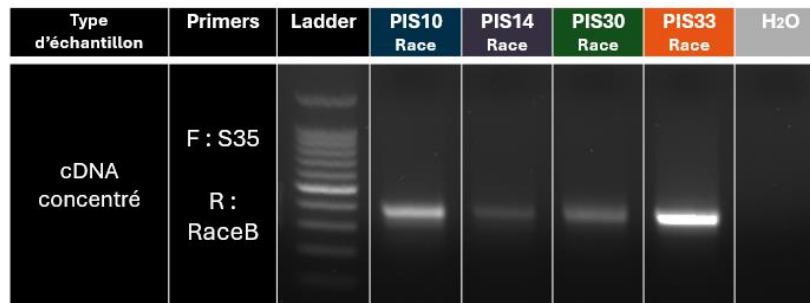


Figure 27 : Amplification du S-allèle S35 de cDNA (dilué ou concentré) de 4 individus de *S. chilense* rétro-transcrit par RaceA (Race) avec les amorces S35 et RaceB. Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O). La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

IV. Méthode oligo(dT) et amorces « Groupe »

L'amorce dégénérée PR1 ne fonctionnant pas, nous avons essayé enfin, afin d'identifier de nouveaux S-allèles, de nouvelles amorces, appelés amorces « Groupe », ont été utilisées. Celles-ci sont communes à différentes S-RNases proches et ont été dessinées sur base de l'arbre phylogénétique des S-RNases connues de *S. chilense* (Defalque, 2023; Igc et al., 2007; Moreels, 2022) et d'alignement de séquences. En effet, l'amorce dégénérée PR1 ne fonctionnant pas, nous avons essayé par ce biais de tester des amorces moins dégénérées. Les amorces « Groupe Lettre » A,B,C,D sont communes pour amplifier entre 6 et 12 S-allèles, alors que les amorces « Groupe Chiffre » 1 à 7 sont communes pour l'amplification de 4 à 7 S-allèles (**Figure 16**, Tableau 6).

Afin de tester l'efficacité de ces nouvelles amorces « Groupe », différentes PCR de prétest ont été réalisées sur des échantillons de cDNA oligo(dT) contrôles. Les contrôles utilisés sont les suivants : (1) PIS30 portant les S-allèles S35 et S36 (**Figure 24**), utilisé comme contrôle positif pour l'amplification avec les amorces A, D, 1 et 4, (2) HS10 (issu d'un croisement hybride entre *S. chilense* et *S. lycopersicum*), portant le S-allèle S10, utilisé comme contrôle positif pour l'amplification avec les amorces B et 3, (3) HS35, (issu d'un croisement hybride entre *S. chilense* et *S. lycopersicum*) et portant le S-allèle S35, utilisé comme contrôle positif

pour l'amplification avec les amorces D et 4, (4) SC2 portant les S-allèles S10 et S35, utilisés comme contrôle positif pour l'amplification avec les amorces B, D, 3 et 4.

Les PCR de prétest ont donc été effectuées avec les amorces « Groupe » A, B, D, 1, 3 et 4, ainsi qu'avec les amorces du gène contrôle *LeEF1 α* . Les autres amorces « Groupe » n'ont pas été testées vu l'absence d'échantillons possédant des S-allèles connus permettant de tester ces séquences.

La **Figure 28** montre les gels issus de ces PCR de prétest, ainsi que les résultats attendus. Les PCR avec les amorces « Groupe » A, B et 1 ne donnaient aucune amplification à l'exception d'une faible bande pour l'échantillon HS35 (pour la PCR à 35 cycles avec une température d'hybridation de 50°C) . La PCR avec les amorces « Groupe » D ne permettait qu'une faible amplification pour les échantillons HS10 et HS35 (pour la PCR de 35 cycles à une t° d'hybridation de 50°C) (**Figure 28**). De plus, la PCR avec les amorces « Groupe » 3 ne montrait qu'une faible amplification pour les échantillons HS35 et SC2 pour la PCR à 35 cycles (**Figure 28**). La PCR avec les amorces « Groupe » 4 ne permettait qu'une faible amplification pour les échantillons HS10, HS35 et SC2 (pour la PCR à 35 cycles) et montrait les amplifications attendues pour les échantillons HS10 et SC2 (pour la PCR à 40 cycles). La PCR avec les amorces du gène contrôle *LeEF1 α* montrait les amplifications attendues pour les quatre échantillons de cDNA (**Figure 28**).



Figure 28 : Amplifications des S-allèles encadrés par les amorces « Groupes » A, B, D, 1, 3 et 4 sur les individus PIS30, HS10, HS35, SC2 après rétrotranscriptions par oligo(dT) et amplifications attendues. À gauche, amplifications à 35 cycles avec t° d'hybridation de 50°C. Au centre, amplification à 40 cycle avec t° d'hybridation de 53°C. À droite, représentation des amplifications attendues. Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O). L'amplification du gène contrôle LeEF1α a été utilisé comme contrôle positif de la présence de cDNA. La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

Les amorces « Groupe Chiffre » ayant relativement mieux fonctionné lors de ces prétests, nous avons utilisé ces amorces afin d'amplifier les séquences des S-allèles sur nos échantillons de cDNA oligo(dT) de nos 10 individus de *S. chilense*.

Aucune amplification n'était observée avec les amorces « Groupe » 1,2,5,6,7. Une faible amplification était observée avec les amorces « Groupe » 3 pour l'échantillon PIS19 et le contrôle positif HS35. La PCR avec les amorces « Groupe » 4 montrait une très faible amplification pour les échantillons PIS33, PIS36, PIS38, PIS40, SC2 et une amplification plus forte pour le contrôle positif HS10 (Figure 29). Vu les résultats obtenus, nous n'avons pas

persévéré pour identifier les S-allèles encore inconnus dans notre population dans le cadre de ce mémoire. Le Tableau 9 montre les S-allèles ayant été identifiés chez les individus de *S. chilense* utilisés lors de ce mémoire.

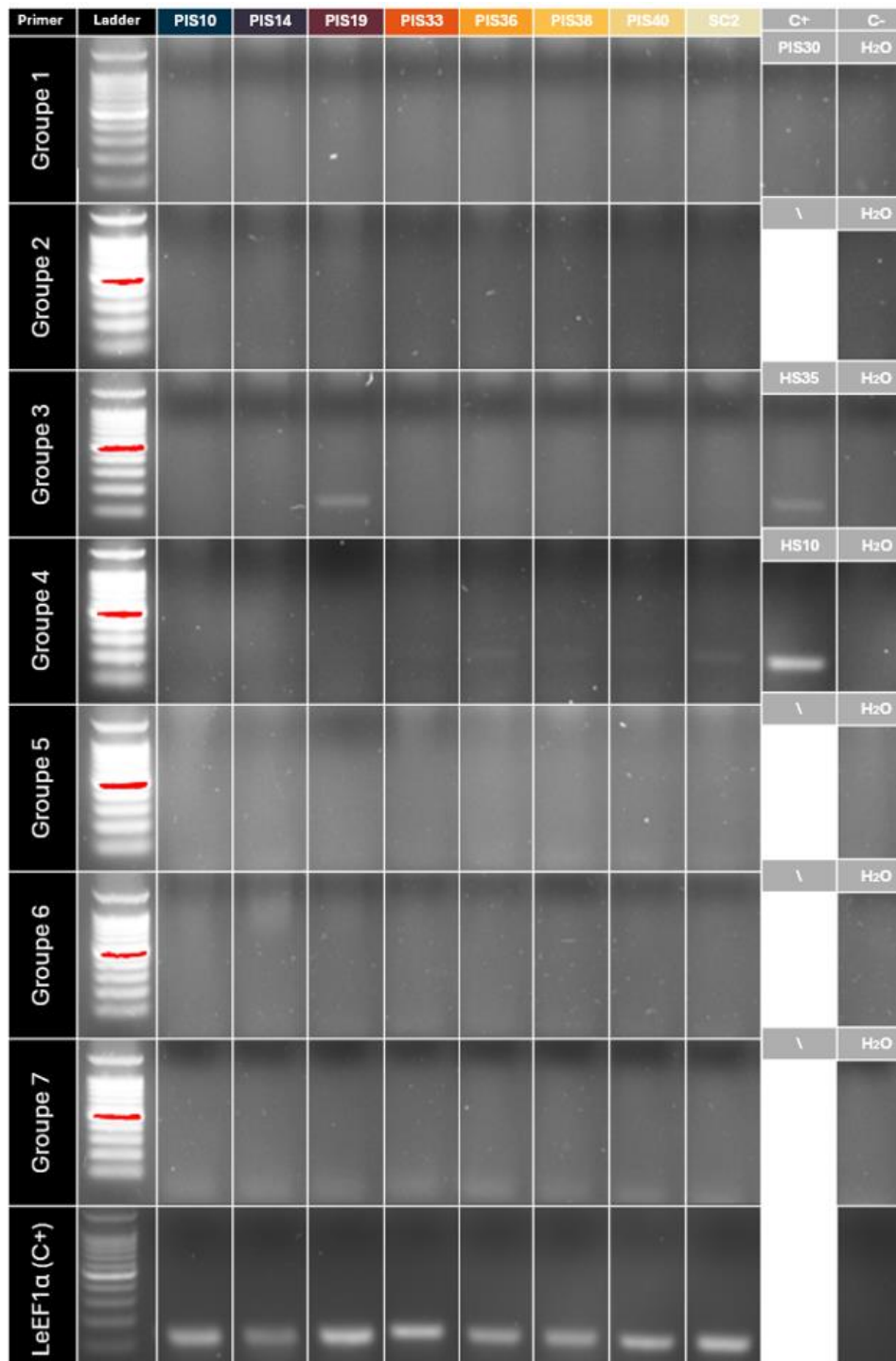


Figure 29 : Amplifications des S-allèles encadrés par les amorces « Groupes Chiffre » sur les individus 11 individus de *S. chilense* après rétrotranscriptions par oligo(dT). Les contrôles positifs utilisés ; pour l'amorce «Groupe 1» le cDNA oligo(dT) de l'individu PI30 (S-allèles S10 - S36) ; pour l'amorce «Groupe 2» le cDNA oligo(dT) de l'individu HS35 (S-allèle S35) ; pour l'amorce «Groupe 4» le cDNA oligo(dT) de l'individu HS10 (S-allèle S10). L'amplification du gène contrôle LeEF1α a été utilisé comme contrôle positif de la présence de cDNA. Le contrôle négatif est une amplification sans cDNA (H₂O). La graduation de l'échelle moléculaire (Ladder) est disponible à l'annexe 2.

Tableau 9 : Résumé des S-allèles identifiés chez les individus utilisés lors de ce mémoire. L'étoile (*) indique le S-allèle est différent S10, S35 ou S36.

Individu	S-allèle 1	S-allèle 2
PIS10	S10	S35
PIS14	S35	Inconnu*
PIS19	S35	Inconnu*
PIS30	S35	S36
PIS31	Inconnu	Inconnu
PIS33	S10	S35
PIS34	Inconnu	Inconnu
PIS36	S10	Inconnu*
PIS38	S10	S35
PIS40	S10	S35
SC2	S10	S35

C. PARTIE 3 – CROISEMENTS INTRASPECIFIQUES DE *S. CHILENSE*

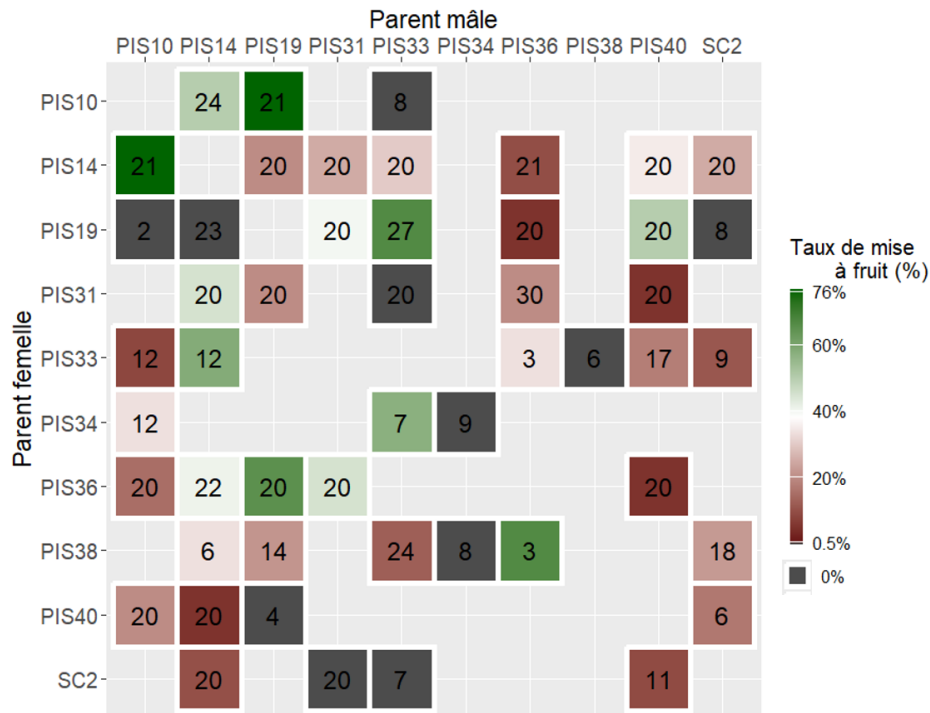
Dans cette troisième partie, l'objectif a été de croiser manuellement les individus de *S. chilense*, dans le but d'obtenir la comptabilité réelle de ces croisements. Cette compatibilité réelle a été calculé à deux niveaux, premièrement au niveau post zygotique, par l'analyse du taux de mise à fruit et nombre moyen de graines par fruit et deuxièmement au niveau prézygotique par l'analyse des taux de germination des grains de pollen sur le stigmate et par l'analyse de la croissance des tubes polliniques dans le style. Dans la suite du travail, on entend par « type de croisement » un type spécifique de croisement entre deux individus de *S. chilense*, et par « pollinisation », un dépôt de pollen sur une fleur, représentant une réplication d'un type de croisement.

I. Taux de mise à fruit et nombre moyen de graines par fruit

Un total de 795 pollinisations, dont 50 types de croisements différents, ont été réalisés dans toute la population de *S. chilense*.

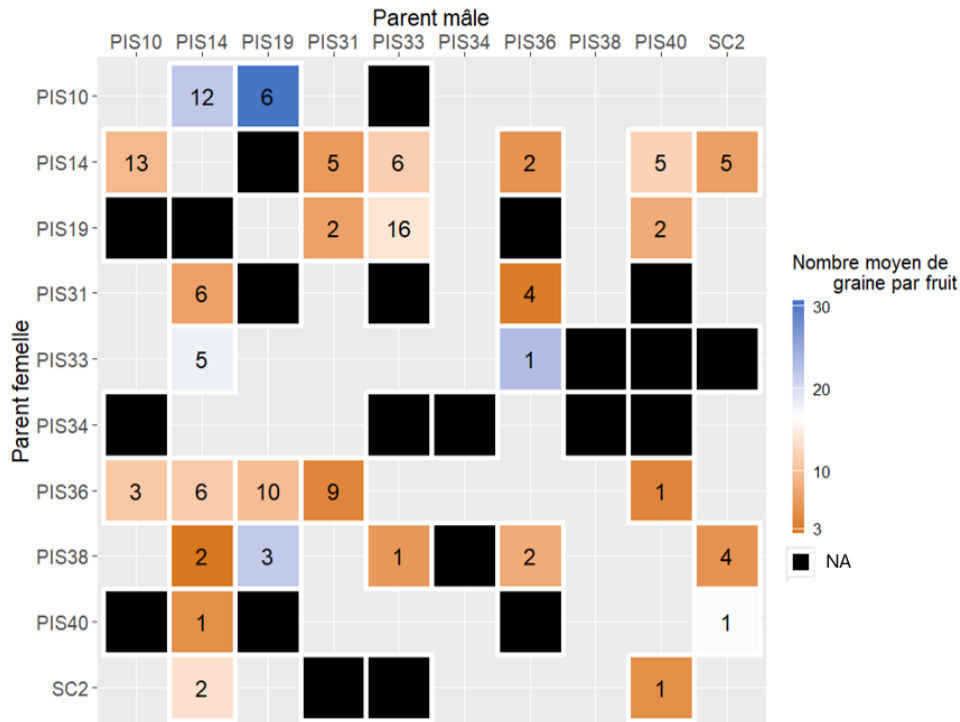
Seuls deux types de croisements avaient un taux de mise à fruit supérieur à 75%. Ce sont les croisements PIS10 x PIS19 et PIS14 x PIS10. Certains types de croisements avaient un taux de mise à fruit entre 75 et 50%. Ce sont les types de croisements PIS10 x PIS14, PIS19 x PIS33, PIS19 x PIS40, PIS33 x PIS14, PIS34 x PIS33, PIS36 x PIS19 et PIS38 x PIS36. Les autres types croisements avaient un taux de mise à fruit inférieur à 50%. Certains types de croisements n'ont donné aucun fruit. Ce sont les types de croisements PIS10 x PIS33, PIS19 x PIS10, PIS19 x PIS14, PIS19 x SC2, PIS31 x PIS33, PIS33 x PIS36, PIS38 x PIS34, PIS 40 x PIS19, SC2 x PIS31 et SC2 x PIS33 (Tableau 10).

Tableau 10 : Synthèse des croisements réalisés entre dix individus de *S. chilense* et taux de mise à fruit. Le nombre dans la cellule indique le nombre de pollinisations réalisé et la couleur de la cellule indique le taux de mise à fruit. Le tableau des données est disponible à l'annexe 4.



Lorsque les fruits étaient viables et assez mûrs, les graines ont été comptées et le nombre de graines par fruit a été calculé. Le type de croisement ayant le nombre de graines par fruit le plus élevé était le type de croisement PIS10 x PIS19 avec en moyenne 30,67 graines par fruit. D'autres types de croisements avaient en moyenne plus de 15 graines par fruit, ce sont les types de croisement PIS10 x PIS14, PIS33 x PIS14 et PIS38 x PIS19. Les autres types de croisement avaient moins de 15 graines par fruit (Tableau 11).

Tableau 11 : Synthèse du nombre fruits disséqués issus des entre dix individus de *S. chilense*. Le nombre dans la cellule indique le nombre de fruits disséqués (dont le nombre de graines a été compté) issus du type de croisement et la couleur de la cellule indique le nombre moyen de graines par fruit. Une cellule de couleur noire indique que le type croisement n'a produit pas de fruit ou n'a pas donné de fruit viable ou mûr susceptible d'être disséqué. Le tableau des données est disponible à l'annexe 4.



Afin d'étudier la corrélation entre le taux de mise à fruit et le nombre moyen de graines par fruit, nous avons sélectionné les données de manière à garantir une analyse robuste. En retenant uniquement les croisements réalisés au moins 18 fois et pour lesquels au moins 1 fruit ou au moins 4 fruits ont été disséqués (dont les graines ont été compté), nous nous assurons que chaque estimation repose sur un nombre suffisant de données. Pour les deux critères de sélection, nous observons une corrélation positive modérée et significative, indiquant une tendance modérée entre le taux de mise à fruit et le nombre moyen de graines par fruit (Tableau 12).

Tableau 12 : Tests de corrélation entre le taux de mise à fruit et le nombre moyen de graines par fruit.

Critère de sélection		Nombre de croisements différent	Test de corrélation			
Nombre de replica par croisement	Nombre de fruit disséqué		Coefficient de corrélation (R)	IC inf	IC sup	P-valeur
18	4	14	0.597	0.096	0.856	0.0243
18	1	22	0.550	0.167	0.788	0.0081

II. Germination du pollen et croissance des tubes polliniques

Six types de croisement ont été étudiés, avec au total, dix pollinisations par type de croisement. Ces types de croisements ont été choisis car ils possèdent majoritairement un S-allèle en commun maximum, et qu'ils ont des taux de mise à fruit, parmi 20 pollinisations, assez variables allant de 5 à plus de 75%. Ils représentent donc une zone d'ombre à explorer, une zone dans laquelle les croisements sont « semi-compatibles ». Les types de croisement réalisés sont repris dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Types de croisements réalisés et leur taux de mise à fruit, nombre d'allèles en commun respectif, pour l'analyse de la croissance des tubes polliniques.

Type de croisement (♀ x ♂)	Taux de mise à fruit	Allèle en commun
PIS10 x PIS19	76,19%	1 (S35)
PIS36 x PIS19	65%	0 ou 1
PIS10 x PIS14	50%	1 (S35)
PIS14 x PIS40	35%	1 (S35)
PIS14 x SC2	25%	1 (S35)
PIS40 x PIS14	5%	1 (S35)

Premièrement, le pourcentage de tubes polliniques atteignant l'ovaire était différent selon les croisements, il était de $22,05 \pm 0.14\%$ pour le croisement PIS10 x PIS19, de $31,41 \pm 0.24\%$ pour le croisement PIS36 x PIS19, de $16,17 \pm 0.17\%$ pour le croisement PIS10 x PIS14, de $24,57 \pm 0.19\%$ pour le croisement PIS14 x PIS40, de $4,29 \pm 0.07\%$ pour le croisement PIS4 x SC2 et de $6,8 \pm 0.11\%$ pour le croisement PIS40 x PIS14.

Afin d'étudier dans quelle partie du style, le pollen était le plus souvent arrêté, nous avons calculé le taux de germination du pollen et les pourcentages de tubes polliniques traversant les différents tiers du style pour les différents types de croisements. Tout d'abord, le rapport entre le nombre de grains de pollen germé et le nombre total de grains de pollen observés sur le stigmate (taux de germination du pollen) a été calculé. Ensuite, le rapport entre le nombre de tubes polliniques traversant le 1^{er} tiers du style et le nombre de grains de pollen germés (pourcentage de tubes polliniques traversant le 1^{er} tiers du style), le rapport entre le nombre de tubes polliniques traversant le 2^e tiers du style et le nombre de tubes polliniques traversant le 1^{er} tiers du style (pourcentage de tubes polliniques traversant le 2^e tiers du style), et enfin le rapport entre le nombre de tubes polliniques traversant le 3^e tiers du style et le nombre de tubes polliniques traversant le 2^e tiers du style (pourcentage de tube pollinique traversant le 3^e tiers du style) ont été calculés.

Globalement, l'arrêt du pollen se manifestait soit au niveau du stigmate, via l'absence de germination, soit dans le premier ou deuxième tiers du style via l'arrêt de la croissance du tube pollinique. La croissance des tubes polliniques était rarement ou jamais inhibée, dans le troisième tiers du style (**Figure 30**). L'absence de germination était plus marquée pour le type de croisement PIS40 x PIS14, comparé aux autres. L'arrêt de la croissance des tubes polliniques dans le premier tiers du style était plus marqué pour les croisements PIS14 x SC2 et PIS10 x PIS14 que pour les autres. Tandis qu'un arrêt de la croissance de certains tubes polliniques était observé pour les croisements dans le deuxième tiers du style. Enfin, dans le troisième tiers, la majorité des tubes polliniques ayant atteint ce niveau ont poursuivi leur croissance jusqu'au bout du style (**Figure 30**).

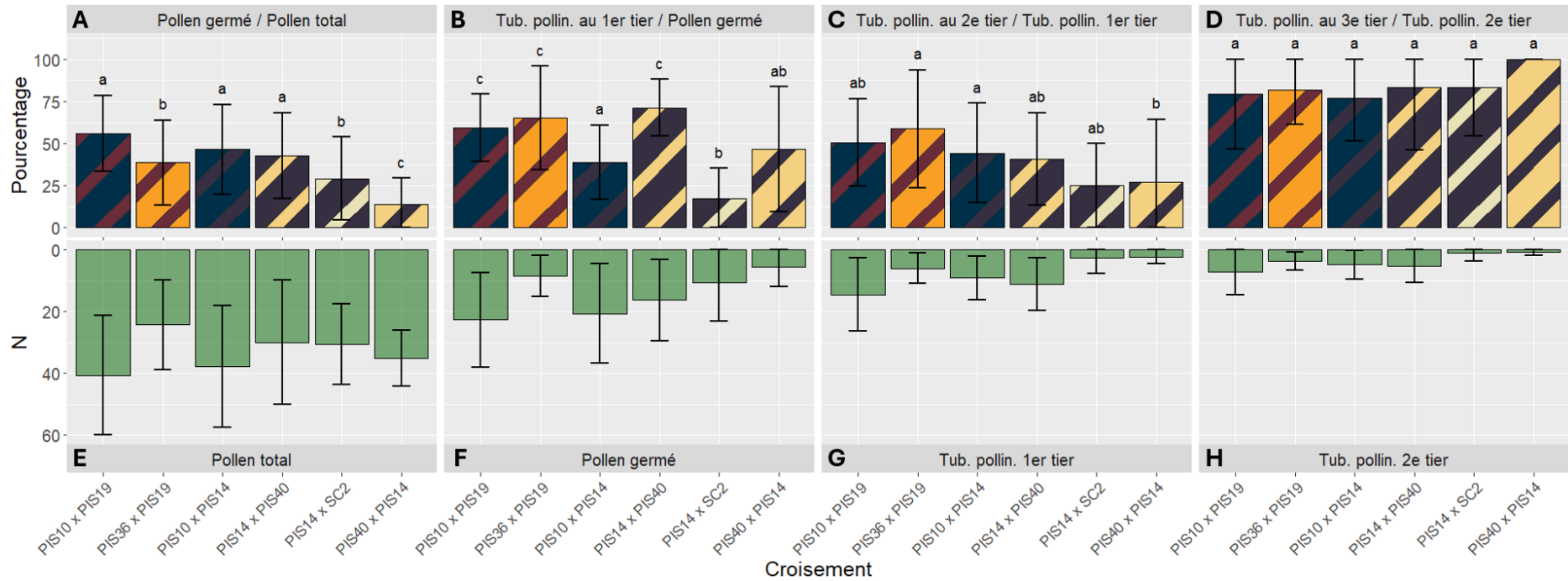


Figure 30 : Germination du pollen et croissance des tubes polliniques à travers le style pour six types de croisements entre individus de *S. chilense*. (A) Taux de germination, (B) Pourcentage de tube pollinique traversant le 1^{er} tiers, (C) Pourcentage de tube pollinique traversant le 2^e tiers, (D) Pourcentage de tube pollinique traversant le 3^e tiers. (E) Nombre de grains de pollen sur le stigmate, (F) Nombre de grains de pollen germé, (G) Nombre de tubes polliniques traversant le 1^{er} tiers du style, (H) Nombre de tubes polliniques traversant le 2^e tiers du style. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type autour de la moyenne. Les valeurs partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes selon les modèles de régression logistique binomiale ($\alpha = 0,05$). Le détail des p-valeurs issus de ces modèles est présenté à l'annexe 5.

Un test de corrélation a été réalisé sur les taux de mise à fruit, les nombres moyens de graines par fruit, les taux moyens de germination des grains de pollen et les pourcentages moyens de tubes polliniques traversants les différents tiers du style des six types de croisements de *S. chilense*, afin d'identifier les relations entre les facteurs prézygotiques et les facteurs postzygotiques.

Le taux de mise à fruit présentait une corrélation positive avec le taux moyen de germination du pollen et avec le pourcentage moyen de tubes polliniques traversant le deuxième tiers du style (**Figure 31**). De plus, le nombre moyen de graines par fruit était également corrélé positivement avec le taux moyen de germination du pollen. Il convient toutefois de souligner que ces résultats doivent être interprétés avec prudence. Ils reposaient sur des données issues de seulement six types de croisements, pour lesquels il y avait majoritairement un S-allèle en commun, et donc les taux de mise à fruit variaient entre 5 à 75%.

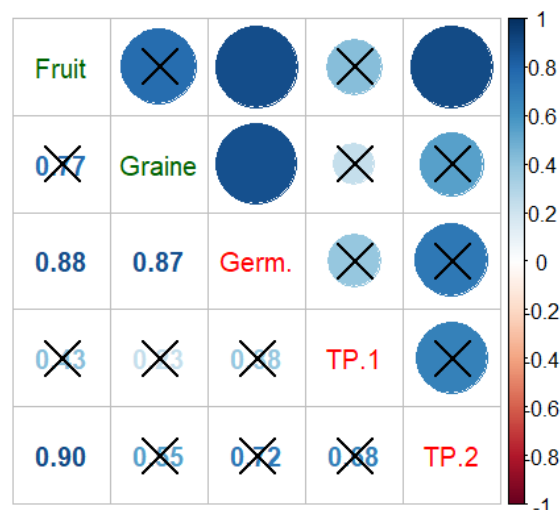


Figure 31 : Graphique de corrélation entre le taux de mise fruit (Fruit), le nombre moyen de graines par fruit (Graine), le taux moyen de germination (Germ.) et les pourcentages moyens de tube pollinique traversant le 1^{er} ou 2^e tiers du style (TP.1, TP.2) de six types de croisements de *S. chilense*. Les types de croisement utilisé sont présentés au Tableau 12. Les valeurs, couleurs et tailles des ronds représentent le coefficient de corrélation (R). Les "X" indiquent que le test de corrélation a une p-valeur non-significative (>0.05).

D. PARTIE 4 – EXPRESSION RELATIVE DES GÈNES *HT-A*, *HT-B*, *S10* ET *S35*

Dans le but d'étudier le potentiel lien entre l'auto-incompatibilité et l'expression des gènes modificateurs et la morphologie florale. Nous avons analysé l'expression relative des gènes *HT-A* et *HT-B* dans notre population de *S. chilense*.

L'expression des gènes *HT-A* et *HT-B* variait fortement entre les individus, dans les fleurs anthèse + 2 jours. L'expression de *HT-A* chez PIS36 et PIS38 était démesurément plus élevée que chez les autres individus (**Figure 32**). L'expression de *HT-B* était démesurément plus grande chez PIS36 et elle était plus grande chez PIS19 et chez SC2 que chez les autres individus. L'expression de *HT-B* était plus élevée chez PIS10 et PIS38 que chez PIS14, PIS33 et PIS40 (**Figure 32**).

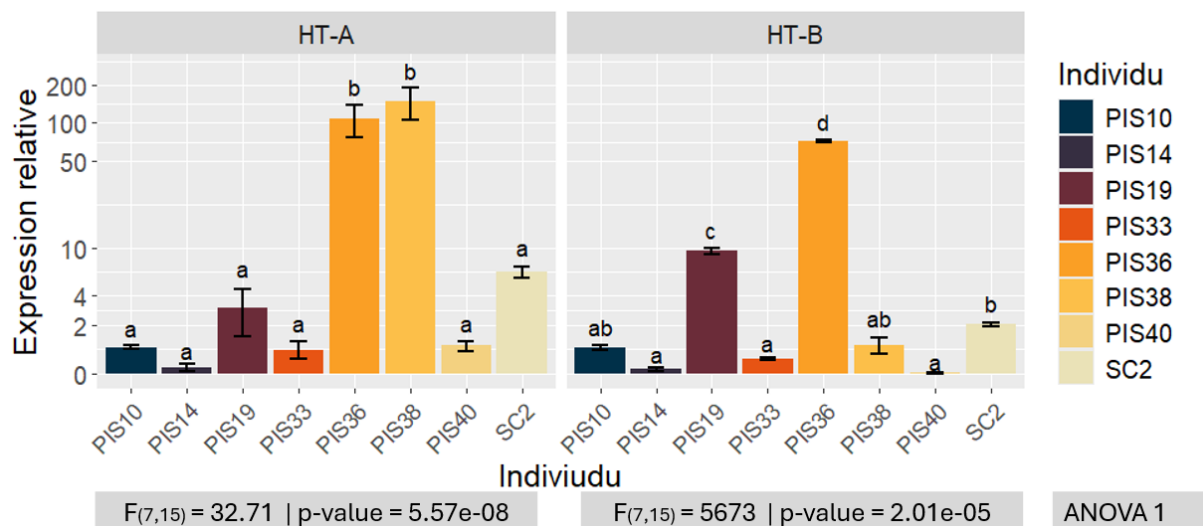


Figure 32 : Expression de *HT-A* et *HT-B* normalisée aux pistils de *PIS10* avec *LeEF1a* et *TIP41* comme gènes de référence dans les pistils de 8 individus de *S. chilense*. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type autour de la moyenne. Les valeurs partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes selon les comparaisons multiples avec la méthode Tukey ($\alpha = 0,05$). La cellule en dessous présente la valeur *F*, les degrés de liberté et la *p*-value issus de l'ANOVA 1 (*Expression ~ Ind*).

Afin de savoir si le degré d'auto-incompatibilité serait lié au degré d'expression des S-allèles, nous avons aussi analysé l'expression des S-allèle *S10* et *S35* chez les individus possédant ces allèles.

L'expression des S-allèle variait également entre les individus. L'expression de l'allèle *S10* était plus grande chez *PIS36* et *PIS40* que chez les autres individus, et l'expression était aussi plus grande chez *PIS38* et *SC2* que chez *PIS0* et *PIS33* (**Figure 33**). L'expression de l'allèle *S10* était plus élevée chez *PIS19* et *SC2* que chez les autres individus. Elle était plus faible chez *PIS10* et *PIS14* et presque nulle chez *PIS40* (**Figure 33**).

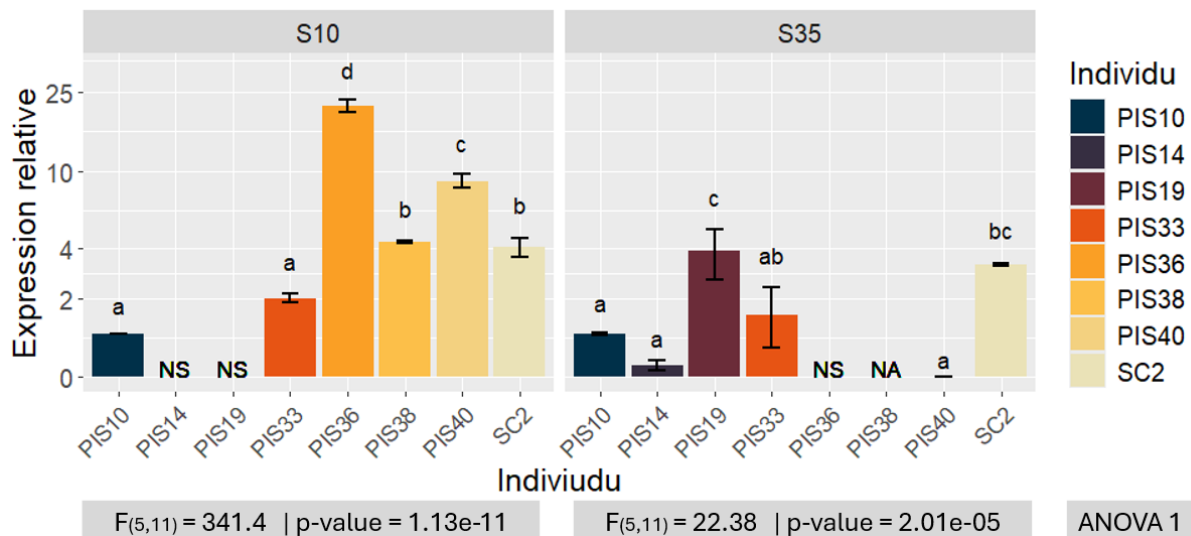


Figure 33 : Expression des allèles S10 et S35 normalisée aux pistils de PIS10 avec LeEF1 α et TIP41 comme gènes de référence dans les pistils de 8 individus de *S. chilense*. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type autour de la moyenne. Les valeurs partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes selon les comparaisons multiples avec la méthode Tukey ($\alpha = 0,05$). La cellule en dessous présente la valeur F, les degrés de liberté et la p-value issus de l'ANOVA 1 (Expression ~ Ind). NS indique que l'expression n'a pas été calculée, car l'individu ne possède pas le S-allèle. NA indique que l'expression n'a pas été calculée chez cet individu.

L'expression relative des gènes modificateurs HT-A, HT-B et des S-allèles dans les fleurs en anthèse + 2 jours, des individus de *S. chilense* n'était pas corrélée aux taux de mise à fruit, au nombre moyen de graines par fruit, ni au pourcentage de tubes polliniques atteignant l'ovaire dans les croisements où ces individus étaient le parent femelle (Figure 34)

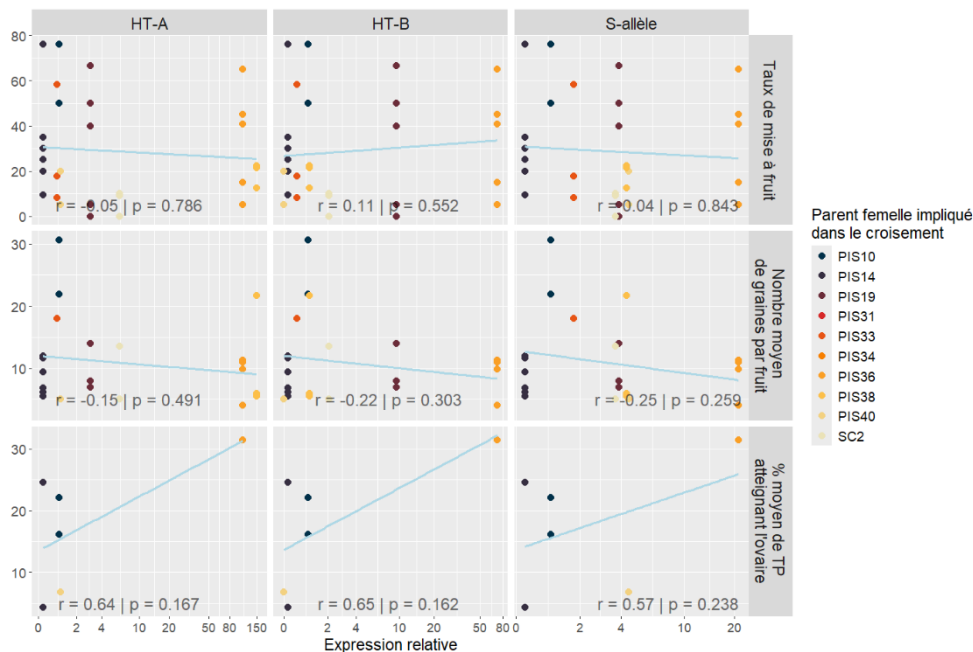


Figure 34 : Compatibilité réelle des croisements en fonction de l'expression relative des gènes HT-A, HT-B et de l'expression relative de S-allèle(s) des parents femelle impliquée dans ces croisements. Ligne de graphiques du haut : Taux de mise à fruit en fonction de l'expression relative des gènes et S-allèle(s). Ligne de graphiques du milieu : Nombre de graines par fruit en fonction de l'expression relative des gènes et S-allèle(s). Lignes de graphique du dessous : Pourcentage de tube pollinique atteignant l'ovaire en fonction de l'expression relative des gènes et S-allèle(s). L'expression relative de S-allèle est calculée comme la moyenne de l'expression des S-allèle (lorsqu'ils ont été analysés) ou d'un S-allèle (lorsqu'un seul était analysé). La couleur des points indique le parent femelle impliqué dans le croisement. La droite bleue représente la meilleure droite passant par les points selon la méthode des moindres carrés. « r » indique le coefficient de corrélation de Pearson et « p » la p-valeur associée au test de corrélation ($\alpha = 0,05$).

E. PARTIE 5 – ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT RACINAIRE PAR BOUTURAGE

Le maintien des populations de *S. chilense* reste complexe. Dans le but de cloner et multiplier rapidement les individus par bouturage, nous avons étudié les moyens d'initier le développement racinaire chez cinq individus de *S. chilense*, en cultivant des boutures de ces individus dans différentes solutions. Il s'agissait de solutions d'eau distillée seule, d'eau distillée avec des hormones de bouturage, d'une solution de NaCl 20 mM et d'une solution combinant NaCl (20mM) et hormones de bouturage. Le but était d'identifier si les boutures développeraient plus de racines dans des conditions salées, semblables à leur environnement salin naturel.

La conductivité électrique des solutions d'eau distillée et d'eau distillée avec hormones de bouturages était de 0 mS/cm en début d'expérience. En fin d'expérience, elle était respectivement de 0,364 mS/cm ($\pm 0,029$) et de 0,308 mS/cm ($\pm 0,024$). La conductivité des solutions de NaCl (20 mM) était de 3,180mS/cm en début d'expérience et de 4,632 mS/cm ($\pm 0,143$) en fin d'expérience, et celle des solutions de NaCl (20 mM) avec hormones de bouturage était de 2,930 mS/cm en début d'expérience et 4,442 mS/cm ($\pm 0,421$) en fin d'expérience.

Au bout de neuf jours d'expérience, plusieurs boutures des différents individus étaient mortes, principalement dans les solutions contenant du NaCl et celles avec du NaCl et des hormones, et dans une moindre mesure pour la solution avec des hormones de bouturage. Les boutures cultivées dans l'eau distillée simple présentaient moins de mortalité (**Figure 35**). Le taux de mortalité des boutures en fin d'expérience différait entre les solutions de bouturages ($\chi^2 = 66,558$, dl = 3, p-val = 2.328×10^{-14}) et ne variait pas entre les individus ($\chi^2 = 1,0999$, dl = 4, p-val = 0.8943). Après la mort de la totalité des boutures présentes dans les solutions NaCl et NaCl + hormones, nous avons décidé d'arrêter l'expérience.

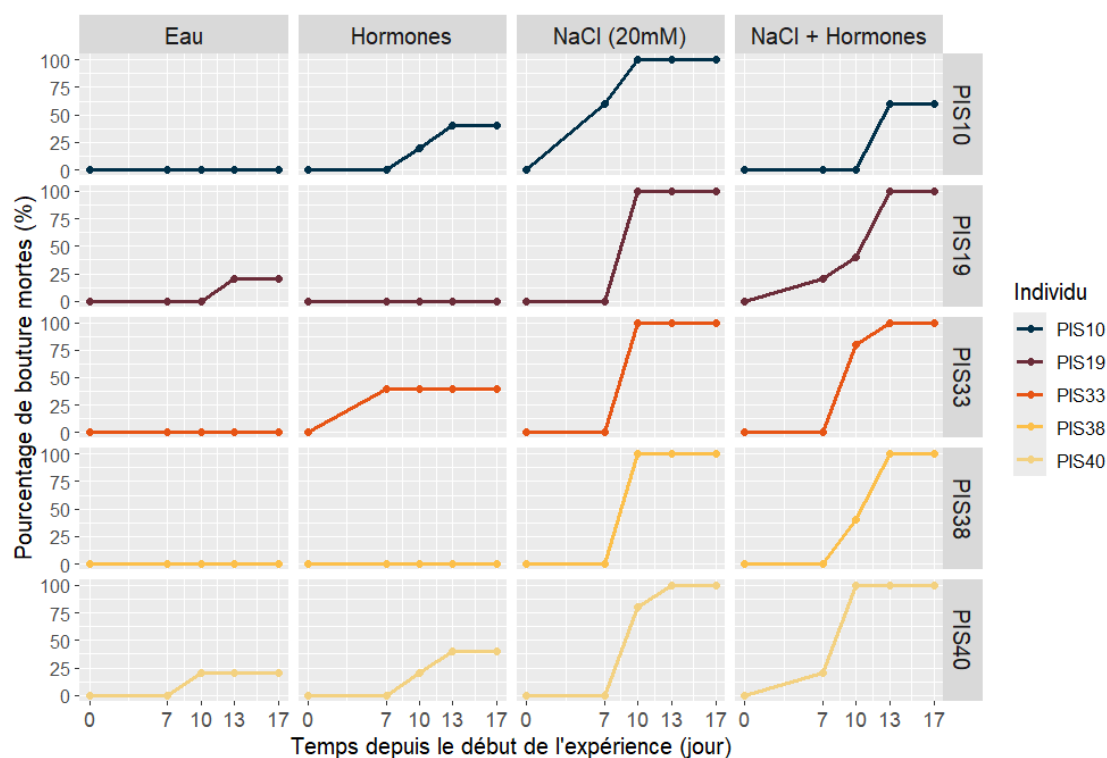


Figure 35 : Évolution du taux de mortalité des boutures de 5 individus de *S. chilense* dans différentes solutions.

En fin d'expérience (jour 17), sur les 25 boutures différentes par solution, six boutures cultivées dans l'eau distillée présentaient des racines, quatre pour les boutures cultivées avec des hormones de bouturage et une seule pour les boutures cultivées dans la solution NaCl + hormones de bouturage. Aucune bouture cultivée dans les solutions de NaCl ne présentait des racines. Toutes les boutures avec racines possédaient de petites racines jeunes, encore peu développées, et l'évolution du nombre de racines par bouture est présentée à l'annexe 6. Un test exact de Fisher a été réalisé afin de savoir si la présence de boutures avec des racines était influencée par les solutions, ce dernier montre que les solutions semblent avoir un effet sur la présence ou absence de racine. La présence de racine différait entre les solutions (*Test Exact de Fisher*, $p\text{-val} = 0,02138$) et variait aussi entre les individus (*Test Exact de Fisher*, $p\text{-val} = 0,01701$). Cependant, ces résultats sont à prendre avec délicatesse, étant donné le fort taux de mortalité des boutures.

DISCUSSION

A. PRÉAMBULE - COMPLEXITÉ DE L'ÉTUDE DES BARRIÈRES DE REPRODUCTION

Dans ce mémoire, nous avons exploré les barrières de reproduction intraspécifiques chez *Solanum chilense*. L'analyse de ces barrières a été réalisée à différents niveaux : au niveau pré-pollinisation, via l'étude de l'exsertion du stigmate ; au niveau post-pollinisation prézygotique, par l'analyse des taux de germination des grains de pollen sur le stigmate et des taux de croissance des tubes polliniques dans le style ; au niveau postzygotique, par l'étude du taux de mise à fruit et du nombre moyen de graines par fruit (**Figure 36**).

Les barrières de reproduction agissent séquentiellement, et sont classées en fonction du moment auquel elles agissent. Les barrières agissant tôt, comme les barrières pré-pollinisation ou prézygotique, ont un impact plus grandement sur la compatibilité et sur l'isolement reproducteur, comme chaque barrière ne peut empêcher que le flux génétique potentiel qui n'a pas déjà été éliminé par les barrières agissant précédemment (Baack et al., 2015; Coyne et al., 2004; Widmer et al., 2009). Ce n'est donc qu'en examinant la contribution relative des barrières dans leur globalité que l'on peut identifier à quel niveau elles sont les plus importantes. A l'inverse, étudier les barrières de reproduction à un seul de ces niveaux ne permettrait pas de déterminer s'il existe une barrière à ce niveau précis. Ainsi, le taux de germination des grains de pollen sur le stigmate est une mesure ambiguë de la présence de barrières post-pollinisation prézygotiques, car l'absence de germination pourrait résulter d'une barrière antérieure, au niveau de la viabilité pollinique ou de la réceptivité stigmatique. De même, le taux de mise à fruit et le nombre moyen de graines par fruit ne constituent pas des indicateurs directs de la présence (ou non) de barrières post-pollinisation postzygotiques. Par exemple, l'absence de fruit pourrait être la conséquence d'une barrière antérieure, comme l'arrêt de la croissance des tubes polliniques ou la non-germination des grains de pollen. L'analyse de la croissance des tubes polliniques représente une mesure plus directe de la présence de barrière prézygotique et d'auto-incompatibilité gaméophytique (Takayama & Isogai, 2005). Chez *S. chilense*, on s'attend à ce que les barrières de reproduction soient particulièrement marquées au niveau de la croissance des tubes polliniques, étant donné la présence d'auto-incompatibilité gaméophytique (Gao et al., 2015; Li & Chetelat, 2015).

Par conséquent, dans ce mémoire, nous nous sommes concentrés sur l'analyse de quelques barrières de reproduction. Cependant, il aurait été pertinent d'en examiner d'autres afin d'obtenir une vue complète et globale des barrières de reproduction intraspécifiques chez

S. chilense. Par exemple, il aurait été intéressant d'analyser la viabilité des gamétophytes (pollen et ovules), d'étudier les caractéristiques des fruits et des graines (taille, forme, couleur). De plus, chez *S. lycopersicum* la taille des fruits est d'ailleurs liée à la fécondation des ovules (Quinet et al., 2019). L'étude de la viabilité et fertilité des plants issus de ces graines aurait aussi pu nous communiquer des données sur la présence d'autres barrières prézygotiques (Figure 36).

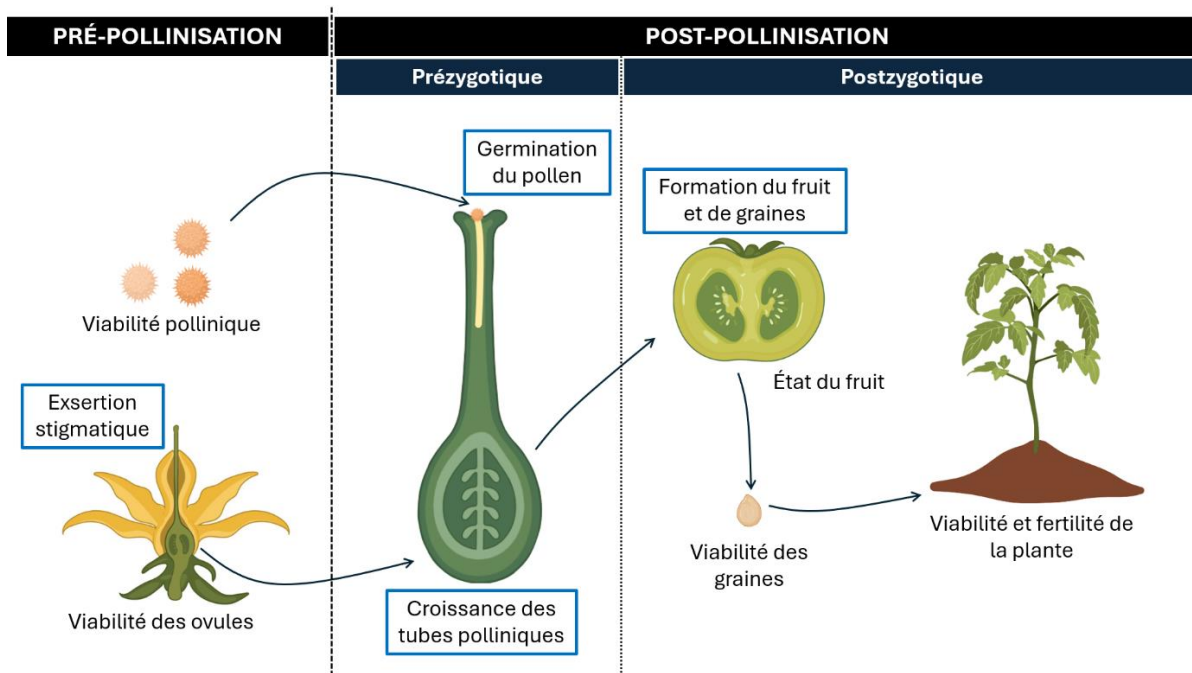


Figure 36 : Schéma des éventuelles barrières de reproduction intraspécifique. Les cadres bleus représentent les barrières de reproductions étudiées chez *S. chilense* pour ce mémoire.

B. OBJECTIF 1 - LIEN ENTRE LA MORPHOLOGIE FLORALE ET LA COMPATIBILITÉ

Le premier objectif de ce mémoire était d'analyser l'existence d'une relation entre la morphologie florale, notamment l'exsertion du stigmate, et la compatibilité des plantes, en particulier l'auto-incompatibilité chez *S. chilense*. En effet, des études ont montré que des gènes contrôlant la morphologie florale étaient proches du S-locus chez la tomate et qu'il pouvait donc y avoir une région chromosomique contrôlant différents paramètres floraux et reproducteurs (Bernacchi & Tanksley, 1997; Quinet, 2005).

Pour cela, nous avons étudié la morphologie florale de différents individus de *S. chilense*. L'aire des pétales, des sépales et des étamines, ainsi que la longueur des étamines et du pistil, variait significativement entre certains individus (Figure 18, Figure 19). Toutes les fleurs analysées présentaient une exsertion du stigmate, avec un degré d'exsertion également variable selon les individus (Figure 20). Par ailleurs, nous avons évalué l'expression des S-

allèles et des gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B*. L'expression de S-allèles et de ces gènes variait fortement entre les individus (**Figure 32**, **Figure 33**).

L'analyse en composantes principales ne relevait pas de relation entre les données de morphologie florale et les données d'expression des gènes d'auto-incompatibilité gamétophytique (**Figure 37**). Cependant, il est important de souligner que cette analyse repose sur un échantillon restreint de données, issu de seulement sept individus de *S. chilense* appartenant à une même population. Par conséquent, ces conclusions ne peuvent être généralisées. Il serait donc pertinent, dans des études futures, d'explorer ces relations sur un jeu de données plus large, incluant un plus grand nombre d'individus provenant de populations variées (côtières et andines) (Raduski & Igić, 2021). Par ailleurs, une variation du taux de mise à fruit et du nombre de graines par fruit a été observée en fonction du parent femelle impliqué dans le croisement. Toutefois, ces données ne montrent pas de corrélations avec la morphologie florale du parent femelle.

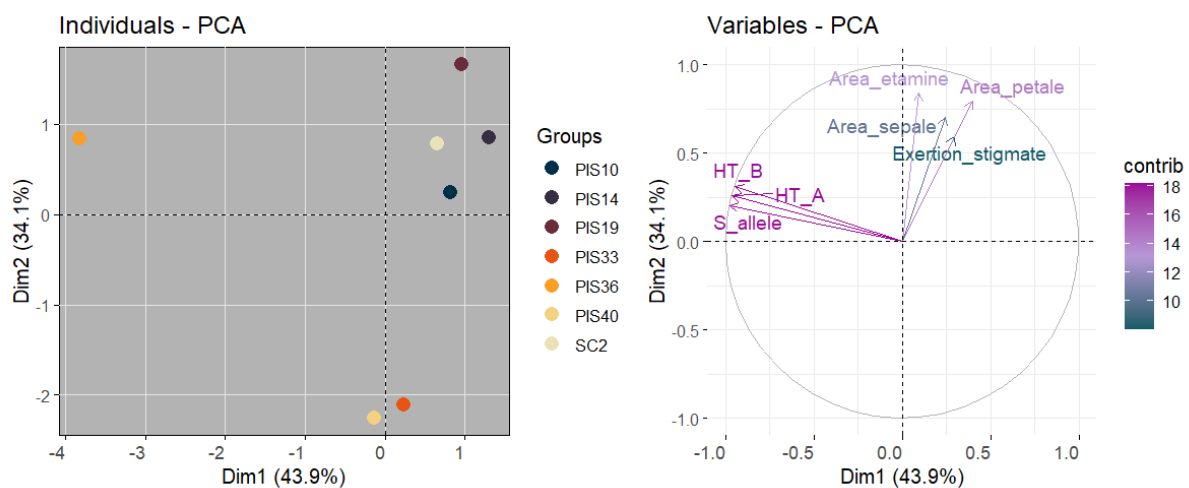


Figure 37 : Analyse en composante principale (ACP) de la surface des organes floraux et des expressions de gène et allèle d'AI de 7 individus de *S. chilense*. (A) Graphique des individus de *S. chilense*. (B) Graphique des variables, avec la contribution pour les composantes principales (Dim 1 et Dim 2) représentée par l'orientation des flèches et le gradient de couleurs.

Les études analysant les liens entre la morphologie florale et l'auto-incompatibilité ont montré que cette relation peut être présente au sein du genre *Solanum*. Les espèces auto-incompatibles montrent un degré d'exsertion stigmatique plus important que les espèces auto-compatibles (Peralta et al., 2008; Rick, 1988). Bernacchi & Tanksley (1997) et Quinet (2005) ont suggéré l'existence d'un complexe de gènes régulant la morphologie florale autour du S-locus sur le chromosome 1, chez la tomate, ces traits comprennent la taille des fleurs, le nombre de fleurs par inflorescence et la longueur du rachis de l'inflorescence. Le contrôle de la taille des sépales, des pétales, des étamines, du stigmate et de l'ovaire semble être réalisé dans d'autres loci de la tomate. De plus, l'exsertion du stigmate ne semble pas être régie par le S-

locus, le contrôle de l'exsertion du stigmate mobilise plusieurs gènes sur différents chromosomes, soulignant sa nature polygénique et complexe (Chen & Tanksley, 2004; Fulton et al., 1997; Georgiady et al., 2002; Vosters et al., 2014). La plupart de ces études, explorant les liens entre morphologie florale et auto-incompatibilité, ont été menées en comparant soit deux (ou plusieurs) espèces de tomates apparentées et leurs hybrides, soit différentes populations d'une même espèce. En revanche, très peu d'études, comme celle-ci, ont examiné cette relation entre plusieurs individus d'une même espèce d'une seule population. Ainsi, l'absence de cette relation pourrait s'expliquer par la taille limitée de l'échantillon (seulement 7 individus) ou par le niveau taxonomique étudié. En d'autres termes, le lien entre morphologie florale et auto-incompatibilité pourrait être davantage perceptible entre différentes populations ou entre espèces distinctes et leurs hybrides qu'entre individus d'une même population.

Bien qu'il existe des variations morphologiques florales intraspécifiques, aucun individu n'affichait une morphologie clairement distincte. Certes, certains, comme PIS19, présentaient des traits floraux plus grands, mais il était impossible d'identifier un individu uniquement sur la base de ces traits floraux. La morphologie des fleurs variait donc non seulement entre les individus de *S. chilense*, mais également au sein d'un même individu. Ces variations, qui ne semblent pas liées à l'auto-incompatibilité, pourraient être associées à d'autres facteurs, tels que l'environnement (même en culture sous serre), le moment de prélèvement ou encore la position de l'inflorescence sur la plante et de la fleur au sein de l'inflorescence. En effet, il est connu que l'environnement peut affecter la morphologie et la taille des fleurs. Par exemple, chez *S. lycopersicum*, de basses températures perturbent le développement floral (Lozano et al., 1998; Sawhney, 1983) et des élévations de température provoquent un allongement du style et un raccourcissement des anthères (Saeed et al., 2007; Sato et al., 2006).

C. OBJECTIF 2 – DIFFÉRENCES ENTRE COMPATIBILITÉ THÉORIQUE ET RÉELLE

Le deuxième objectif de ce mémoire visait à identifier des différences entre l'auto-incompatibilité théorique, obtenue via l'identification des S-allèles, et la compatibilité réelle obtenue de deux manières : via l'analyse des taux de croissance des tubes polliniques dans le style et via l'analyse des taux de mise à fruit et du nombre moyen de graines par fruit.

Nous n'avons pas pu identifier de nouveau S-allèles dans la population de *S. chilense*. Premièrement, la méthode RACE ne semble pas avoir fonctionné en raison d'un problème lié à l'amorce PR1 utilisée. En effet, en substituant l'amorce PR1 par une amorce plus conservée spécifique à un S-allèle particulier, nous avons réussi à amplifier les séquences de cet allèle

(Figure 27). Cela suggère que l'amorce PR1 est trop dégénérée pour s'attacher correctement aux séquences des S-RNases dans notre population. Cette difficulté est liée au fait que le S-locus est particulièrement polymorphique, comme le démontre la diversité des S-allèles identifiés à partir des S-RNases chez *S. chilense* (Igic et al., 2007).

Le caractère hautement polymorphique du S-locus s'explique par une sélection négative dépendante de la fréquence des S-allèles (Wright, 1939). En effet, les S-allèles rares au sein d'une population ont une plus grande probabilité de contribuer à la reproduction que les S-allèles communs. Ces allèles rares sont donc fortement favorisés par sélection (Paape & Kohn, 2011). Une autre conséquence de ce polymorphisme, observée dans ce mémoire, est la difficulté de concevoir des amorces adaptées aux S-RNases. Bien que l'amorce PR1 semble inappropriée, les autres amorces « Groupe », moins dégénérées, n'ont pas non plus donné de résultats concluants. Le haut polymorphisme du S-locus et le grand nombre de S-allèles par espèce rend le design d'amorces communes très compliqué, même dans les régions conservées des S-RNases, et pose problème pour l'identification des S-allèles non seulement chez la tomate, mais également chez d'autres espèces auto-incompatibles, comme chez les arbres fruitiers de la famille des Rosacées (Quinet et al., 2014). En effet, les séquences d'un même S-allèle d'espèces proches sont plus similaires que celles de S-allèles différents d'une même espèce (Vieira et al., 2010).

Sur les 10 individus cultivés en serres, 13 des 20 S-allèles ont été identifiés à partir des séquences des *S-RNases*, mais ils correspondaient seulement à 2 S-allèles différents, précédemment identifiés au laboratoire. Les S-allèles nous donnent l'information théorique de l'auto-incompatibilité gamétophytique, donc la proportion de rejet des tubes polliniques théorique, à savoir : auto-incompatible si les deux S-allèles sont communs entre les parents, semi-compatibles si les parents ont un S-allèle en commun et pleinement compatibles si les parents diffèrent par leurs deux S-allèles (B. A. McClure & Franklin-Tong, 2006). À première vue, on peut obtenir l'information théorique du taux de rejet des tubes polliniques dans le style et donc indirectement des taux de mise à fruit et nombre moyen de graines par fruit, en se basant sur le nombre de S-allèles en commun entre les parents (Tableau 14). En effet, quand le croisement est compatible (aucun S-allèles en commun), tous les tubes polliniques devraient en théorie atteindre l'ovaire et assurer la fécondation des ovules, ce qui induira la formation du fruit et des graines. Dans le cas d'un croisement semi-compatible (1 S-allèle en commun), la moitié des tubes polliniques (ceux portant le S-allèle commun) seront arrêtés dans le style et donc seule la moitié des tubes polliniques atteindront l'ovaire et le nombre d'ovules fécondés

sera réduit, mais le développement du fruit sera malgré tout assuré, même s'il contiendra moins de graines. Dans le cas d'un croisement incompatible, tous les tubes polliniques seront arrêtés dans le style, aucune fécondation n'aura lieu et donc aucun fruit ne se développera à moins que cela ne soit un fruit parthénocarpique (Tableau 14).

Tableau 14 : Pourcentages théoriques de tubes polliniques atteignant l'ovaire, taux de mise à fruit théorique et nombre de graines par fruit théorique en fonction du nombre de S-allèle commun entre les parents, dans le cas d'auto-incompatibilité gamétophytique.

Nombre de S-allèle en commun entre les parents	Pourcentage de tubes polliniques atteignant l'ovaire	Taux de mise à fruit	Graines par fruit
0 (Compatible)	100%	100%	++
1 (Semi-compatible)	50%	<100%	+
2 (Incompatible)	0%	0%	<i>pas de fruit</i>

Cependant, lors de ce mémoire, un gradient de compatibilité est observé dans les croisements étudiés : les pourcentages réels de tubes polliniques atteignant l'ovaire variaient entre 4 et 31 %, les taux de mise à fruit variaient entre 0 et 76 % (Tableau 10, Annexe 4), le nombre moyen de graines par fruit variait aussi entre 5 et 30 (Tableau 11, Annexe 4).

Concernant la croissance des tubes polliniques, tous les croisements réalisés avaient un pourcentage de tubes polliniques atteignant l'ovaire inférieur à la valeur attendue sur base des S-allèles, avec une différence entre 18% et 68% par rapport à la valeur attendue en fonction des croisements (Tableau 15). Les croisements réalisés étaient au mieux semi-compatibles, car la plupart des plantes avaient 1 S-allèle en commun. On remarque aussi que, pour un même parent femelle, le pourcentage de tubes polliniques atteignant l'ovaire variait en fonction du parent mâle, ce qui suggère que l'AIG est plus complexe que ce que prédit la compatibilité entre S-allèles.

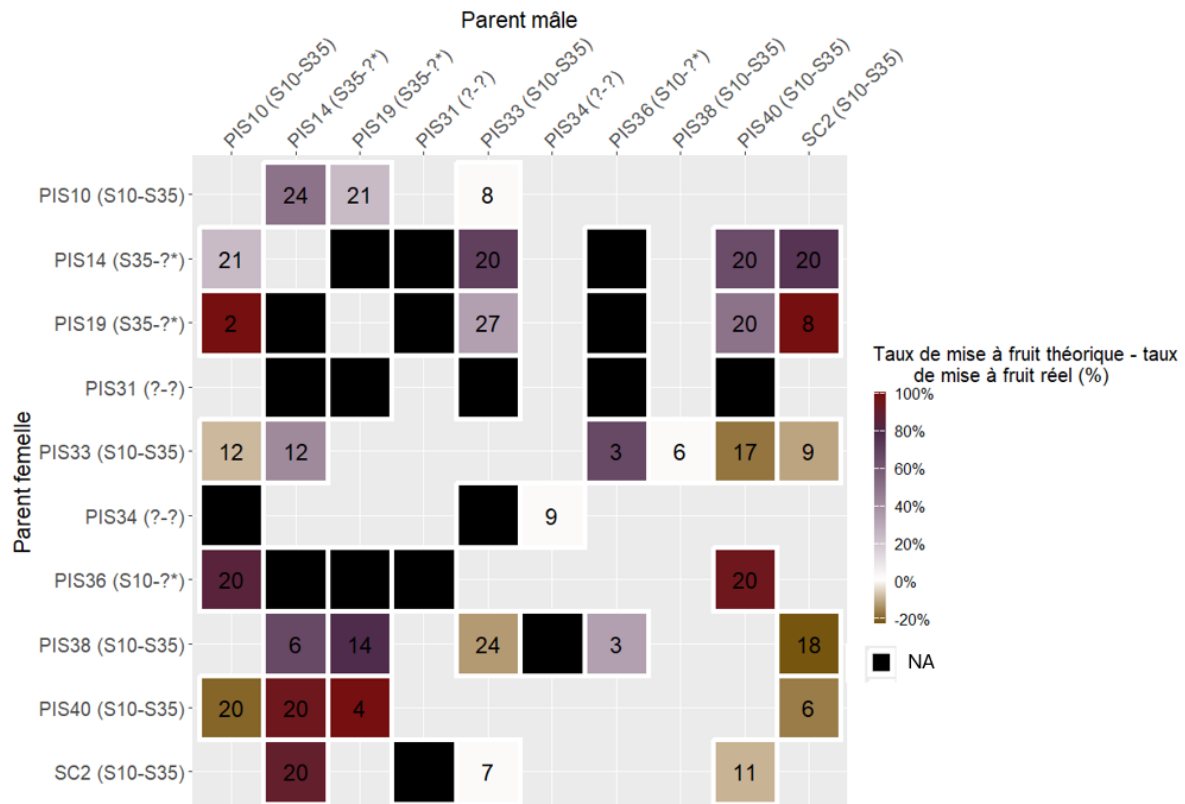
Tableau 15 : Synthèse des six croisements réalisés entre individus de *S. chilense* et différence pourcentage théorique de tubes polliniques atteignant l'ovaire établi sur base de leurs S-allèles et le pourcentage réel de tubes polliniques atteignant l'ovaire.

Type de croisement (♀ x ♂)	Allèle en commun	Pourcentage théorique de tubes polliniques atteignant l'ovaire (%)	Pourcentage réel de tubes polliniques atteignant l'ovaire (%)	Différence
PIS10 x PIS19	1 (S35)	50	22,05 ±0.14	27,95
PIS36 x PIS19	0 ou 1	100 ou 50	31,41 ±0.24	68,59 ou 18,59
PIS10 x PIS14	1 (S35)	50	16,17 ±0.17	33,83
PIS14 x PIS40	1 (S35)	50	24,57 ±0.19	25,43
PIS14 x SC2	1 (S35)	50	4,29 ±0.07	45,71
PIS40 x PIS14	1 (S35)	50	6,8 ±0.11	43,2

Concernant le taux de mise à fruit, celui-ci variait également entre croisements et ne correspondait pas toujours au taux de mise à fruit attendu (Tableau 16). Certains croisements incompatibles n'ont donné aucun fruit comme attendu (2 S-allèles en commun); il s'agissait des croisements PIS10 x PIS33, PIS33 x PIS38, PIS34 x PIS34 et SC2 x PIS33. Cependant, certains des croisements théoriquement incompatibles (2 S-allèles en commun) ont donné des fruits : il s'agissait des croisements PIS33 x PIS10, PIS33 x PIS40, PIS33 x SC2, PIS38 x PIS33, PIS38 x SC2, PIS40 x PIS10, PIS40 x SC2 et SC2 x PIS40. Ceci peut s'expliquer soit par le développement de fruits parthénocarpiques sans graines, même si c'est rare chez *S. chilense* (Quinet, communication personnelle), soit par le dépôt involontaire de pollen compatible lors de la pollinisation, soit par le fait que l'auto-incompatibilité n'était pas complète et que tous les tubes polliniques n'ont pas été arrêtés dans le style. La première hypothèse ne peut être complètement exclue, car, bien que tous les fruits analysés contiennent des graines, certains fruits n'ont pas été analysés, car ils étaient non mûrs ou étaient tombés en cours de murissement. Bien que nous ayons réalisé les croisements avec soin, nous ne pouvons totalement exclure la deuxième hypothèse. La dernière hypothèse n'a pas pu être testée, car nous n'avons pas comparé la croissance de tubes polliniques lors de croisements théoriquement auto-incompatibles.

En revanche, aucun croisement n'a donné de taux de mise à fruit réel de 100 %, alors qu'on aurait pu théoriquement attendre que tous les croisements, ayant minimum 1 S-allèle en commun, forment un fruit, car la fécondation de quelques ovules suffit à déclencher la formation du fruit (Quinet et al., 2019). Le nombre d'ovules par fruit est élevé chez les espèces de tomate, même chez *S. chilense* (Bigot, 2023) et donc même un nombre réduit de tubes polliniques atteignant l'ovaire et fécondant quelques ovules devraient déclencher le développement du fruit. Les croisements montrant la plus grande différence entre le taux de mise à fruit attendu et réel étaient : PIS19 x PIS10, PIS19 x SC2, PIS36 x PIS40, PIS40 x PIS19, et PIS40 x PIS19. Il faut des conditions idéales pour avoir un taux de mise à fruit de 100% chez les croisements compatibilité et semi-compatible. L'auto-incompatibilité gamétophytique n'agit pas directement sur le développement du fruit, mais sur des étapes antérieures. Le processus de nouaison est régi par un nombre immense de facteurs à la fois, environnementaux (lumière, quantité de CO₂, humidité), nutritionnels et internes (quantité de pollen viable, germination des grains de pollen, production d'ovule, nombre de tubes polliniques fécondant les ovules) (Chaplin & Westwood, 1980; Harel et al., 2014; Picken, 1984; Visser & Marcucci, 1984). Il faut donc faire attention à ne pas surinterpréter ces résultats.

Tableau 16 : Synthèse des croisements réalisés entre dix individus de *S. chilense* et différence entre le taux de mise à fruit théorique (0% ou 100%) établi sur base de leur S-allèles et le taux de mise à fruit réel (Tableau 10). Les S-allèle des parents sont indiqués entre parenthèses. « ? » indique que le S-allèle est inconnu. « ?* » indique que le S-allèle est différent de S10, S35 ou S36. Le nombre dans la cellule indique le nombre de pollinisations réalisées et la couleur de la cellule indique la différence entre taux de mise à fruit théorique et réel. Une case noire indique que la différence n'a pu être calculée par manque d'information sur les S-allèle des parents impliqués dans le croisement.



Nos résultats montrent cependant clairement qu'une différence a été mise en évidence entre les attentes théoriques, basées sur l'identification des S-allèles, et les observations empiriques issues des croisements, notamment au niveau de la croissance des tubes polliniques, montrant que les croisements ne peuvent pas être classés selon les catégories classiques : incompatibles, semi-compatibles ou compatibles. Nos résultats ne permettent pas d'identifier les causes de ces différences. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour les expliquer.

Premièrement, il est possible que d'autres barrières reproductives, non régies par les S-allèles et liées au développement du fruit, soient en jeu. Cette hypothèse est développée dans la section suivante de la discussion.

Deuxièmement, l'auto-incompatibilité gamétophytique n'est pas un mécanisme binaire. Il s'agit d'une cascade complexe d'interactions moléculaires et protéiques qui entraînent l'arrêt du tube pollinique, et non d'un simple processus impliquant uniquement les S-RNases. Chez les Solanacées, le S-locus comprend plusieurs SLF (déterminants mâles) associés à une S-

RNase (déterminant femelle) (Takayama & Isogai, 2005), une S-RNase peut être reconnue par plusieurs SLF, ce qui rend les interactions plus complexes (Ashkani & Rees, 2016; Williams et al., 2015). Chez les Papavéracées et les Drupacées, les grains de pollen possèdent des protéines SLF sachant chacune interagir avec une seule S-RNase spécifique (Takayama & Isogai, 2005). Si une mutation intervient dans un gène SLF, cela rendra la protéine inactive et donc la S-RNase correspondante ne pourra plus être désactivée, les tubes polliniques seront donc plus vulnérables aux S-RNases. Chez les Solanacées, les protéines SLF sont capables d'interagir avec plusieurs S-RNases (Takayama & Isogai, 2005). La présence de mutations dans un gène SLF n'éliminerait pas totalement la capacité des protéines SLF à neutraliser les S-RNases. Cela réduirait donc les risques de rejet des tubes polliniques. La robustesse du système est renforcée par une redondance fonctionnelle (Ashkani & Rees, 2016; Williams et al., 2015). Les disparités entre les taux de compatibilité réels et théoriques peuvent être en partie attribuées aux variations dans le nombre d'interactions des SLF. De plus, certains types de croisement ont des taux de mise à fruit et des pourcentages de tubes polliniques atteignant l'ovaire différent lorsqu'ils sont réalisés dans un sens (pollen d'individu A x stigmate d'individu B) ou dans l'autre sens (pollen d'individu B x stigmate d'individu A). C'est le cas notamment pour les croisements entre les individus PIS14 et PIS40 et entre les individus PIS10 et PIS33. Cette différence pourrait aussi être expliquée par l'asymétrie des relations entre les SLF et les S-RNases. Il se pourrait que, chez l'un des parents, une gène SLF ait subi une mutation augmentant la probabilité de rejet du tube pollinique dans un sens plutôt que dans un autre.

En outre, d'autres acteurs externes au S-locus, comme expliqué dans l'introduction, des gènes modificateurs peuvent également jouer un rôle dans l'auto-incompatibilité (Goldraij et al., 2006; Jiménez-Durán et al., 2013; Kondo et al., 2002; B. McClure et al., 1999; Moreels et al., 2023; Tovar-Méndez et al., 2017; Williams et al., 2015). Ainsi, l'auto-incompatibilité gamétophytique est beaucoup plus complexe que ce que les modèles théoriques simplifiés envisagent, le système chez les Solanacées pourrait être donc plus modulable.

Enfin, la nature hautement polymorphique du S-locus soulève des questions importantes sur la manière dont les mutations influencent la compatibilité ou sur le degré de compatibilité entre S-allèles. Claessen (2021) a montré l'existence de variations intra-alléliques au sein de plusieurs S-allèles chez le poirier. Autrement dit, pour un S-allèle connu, un variant de celui-ci a été identifié. Ces variants différaient des S-allèles connus par la présence de, soit une ou plusieurs mutations, situées dans des introns, soit par un ou plusieurs polymorphismes dans la séquence codante. Certains variants de S-allèles étaient neutres (c'est-à-dire fonctionnellement

identiques au S-allèle connu), tandis que d'autres étaient fonctionnellement divergents. Le degré de divergence entre deux S-allèles (ou entre un S-allèle et ses variants) pourrait influencer le fonctionnement de l'auto-incompatibilité gaméophytique. Par exemple, des parents possédant des S-allèles aux séquences proches pourraient présenter un niveau de rejet différent de ceux ayant des S-allèles plus éloignés, ce qui pourrait entraîner un gradient de dominance des S-allèles au sein d'une population. Cela n'a pas encore été étudié à ce jour, mais pourrait constituer une hypothèse expliquant les variations observées entre la compatibilité réelle et théorique.

D. OBJECTIF 3 – ÉTAT ET IMPORTANCE DES BARRIÈRES DE REPRODUCTION

La compatibilité réelle est étudiée au niveau prézygotique par l'analyse du taux de germination des grains de pollen et de la croissance des tubes polliniques et au niveau postzygotique par l'analyse du taux de mise à fruit et du nombre moyen de graines par fruit. Cette analyse à plusieurs niveaux a pour troisième objectif de déterminer à quel niveau les barrières de reproduction sont les plus importantes. L'auto-incompatibilité gaméophytique est, à ce jour, le seul mécanisme post-pollinisation connu empêchant l'autofécondation chez *S. chilense* (Moreels, 2022), on s'attend alors que les barrières de reproduction soient présentes au niveau de la croissance des tubes polliniques dans le style.

Pour six types de croisements, la germination des grains de pollen sur le stigmate et la croissance des tubes polliniques ont été analysées (Tableau 13). L'arrêt du pollen se manifestait premièrement par l'absence de la germination des grains de pollen (**Figure 30**). Le taux moyen de germination des grains de pollen était, d'ailleurs, positivement corrélé avec le taux de mise à fruit ainsi qu'avec le nombre moyen de graines par fruit (**Figure 31**). S'il est connu que la régulation de l'auto-incompatibilité sporophytique se manifeste au niveau de la germination du pollen chez plusieurs espèces (Takayama & Isogai, 2005), ceci n'est pas attendu dans le cas de l'auto-incompatibilité gaméophytique des Solanacées (Moreels, 2022). Il serait plus vraisemblable que le faible taux de germination des grains de pollen soit expliqué par une faible viabilité pollinique ou par des stigmates non réceptifs. Nous n'avons malheureusement pas analysé la viabilité pollinique et la réceptivité stigmatique de chaque individu de *S. chilense* dans ce mémoire, mais de précédentes études au laboratoire ont examiné la viabilité pollinique de la même population de *S. chilense*. Cette viabilité variait fortement entre 50 et 86% selon les études et les plantes (Bigot et al., 2022, 2023; Delbecq, 2024; Moreels, 2022), renforçant la probabilité de présence d'une barrière reproductrice pré-pollinisation à ce niveau-là. Les hypothèses concernant la présence de barrières post-pollinisation empêchant la reconnaissance

entre les grains de pollen viable et le stigmate ne sont tout de même pas à exclure et nécessiteraient l'étude de la réceptivité stigmatique et de la morphologie des papilles stigmatiques et des grains de pollen.

En cas d'auto-incompatibilité gamétophytique, comme c'est le cas chez *S. chilense*, on s'attend à ce que l'arrêt de la croissance des tubes polliniques ne se produise que dans la partie supérieure du style (Takayama & Isogai, 2005). Nos résultats confirment cela, en précisant que l'arrêt de la croissance des tubes polliniques se manifestait principalement dans les premier et deuxième tiers du style et jamais dans le troisième chez *S. chilense* (**Figure 30**). La proportion de tubes polliniques atteignant le deuxième tiers du style était également positivement corrélée avec le taux de mise à fruit (**Figure 31**). Cela suggère que le développement des fruits pourrait être influencé par l'arrêt des tubes polliniques dans le deuxième tiers du style, et donc que l'auto-incompatibilité gamétophytique pourrait être la seule barrière de reproduction post-pollinisation. En effet le développement du fruit dépend de la fécondation des ovules et du développement des graines (Quinet et al., 2019). Cependant, les corrélations n'étant pas parfaites, elles pourraient aussi indiquer la présence de barrières de reproduction postzygotique, menant à un avortement du développement du fruit ou des graines. Bien que l'existence de barrières de reproduction postzygotiques est peu étudiée chez les espèces de tomates, l'hypothèse concernant la présence de barrières postzygotiques interspécifique fait l'objet d'un intérêt croissant dans les recherches actuelles (Baek et al., 2016; Bedinger et al., 2011; Morimoto et al., 2019; Roth et al., 2018).

Il est cependant important de prendre ces conclusions avec précaution pour deux raisons principales, déjà évoquées. La première est que ces résultats ne reposent que sur six croisements semi-compatibles (dont les parents n'ont qu'un seul S-allèle en commun), et la deuxième est que l'analyse des barrières de reproduction nécessite une approche globale à différents niveaux pour identifier où ces barrières sont les plus présentes et les plus importantes (voir préambule p. 68). Cela souligne la nécessité d'une analyse plus approfondie et globale des barrières reproductives à différents niveaux pour mieux comprendre leur importance, en prenant en compte une diversité plus grande de croisements (compatible, semi-compatible et incompatible) issus de différentes populations de *S. chilense* pour obtenir des résultats plus représentatifs.

Enfin, une faible corrélation positive est observée entre le taux de mise à fruit et le nombre moyen de graines par fruit (Tableau 12). Le nombre de graines par fruit est très variable chez *S. chilense*, pouvant atteindre jusqu'à 80 graines (Raduski & Igić, 2021). Nos résultats contredisent les travaux précédents qui n'avaient pas trouvé de relation entre le développement

des graines et des fruits chez *S. chilense* (Moreels, 2022). Cette corrélation suggère que les mécanismes de développement du fruit et des graines ne sont pas nécessairement indépendants, d'autant plus que presque aucun fruit parthénocarpique n'a été observé ici et dans les recherches précédentes au laboratoire, chez *S. chilense*.

Chez la tomate cultivée, les graines sont importantes dans le développement du fruit et inversement. C'est, en partie, la fécondation des ovules qui initie le développement du fruit (Quinet et al., 2019). Le nombre de graines influence la taille finale du fruit en modulant les hormones qui régulent son activité mitotique (Kataoka et al., 2009). De plus, même si des différences mineures ont été observées dans les taux de sucre, la présence de graines influence l'expression d'enzymes impliqués dans le métabolisme des glucides chez les fruits (Rounis et al., 2015). Enfin, à l'inverse, la photosynthèse des fruits semble essentielle au développement des graines (Lytovchenko et al., 2011).

E. OBJECTIF 4 – LIEN ENTRE EXPRESSION GÉNÉTIQUE ET COMPATIBILITÉ

Nous avons mesuré l'expression relative des S-allèles S10 et S35 ainsi que des gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B* dans les pistils en anthèse + 2 jours, des différents individus de *S. chilense*. L'objectif était d'étudier le lien entre l'expression relative de ces S-allèles et de ces gènes avec la compatibilité. Pour rappel, les gènes *HT* pourraient jouer un rôle dans la séquestration des S-RNases lors de croisements incompatibles. Selon le modèle de « compartmentalization », les S-RNases sont séquestrées dans des vacuoles lors de croisements compatibles, et leur libération serait engendrée par la présence de protéines HT-B lors de croisements incompatibles (Goldraij et al., 2006; Moreels et al., 2023). Moreels (2022) a montré que l'expression de *HT-B* dans les pistils était plus élevée chez *S. chilense* que chez *S. lycopersicum* et leurs hybrides, mais qu'il n'y avait pas de différence d'expression pour *HT-A* entre ces génotypes. Le gène *HT-B* serait principalement associé à l'auto-incompatibilité, tandis que *HT-A* serait plutôt impliqué dans l'incompatibilité unilatérale (Covey et al., 2010; Goldraij et al., 2006). La suppression de l'expression de *HT-B* dans le pistil, ainsi que les mutations dans les gènes *HT-A* et *HT-B*, empêche le rejet du pollen S-spécifique (B. McClure et al., 1999; Tovar-Méndez et al., 2017). Une expression relative plus importante de ces gènes *HT* pourrait donc renforcer les effets des barrières d'auto-incompatibilité. De la même manière, des mutations entraînant une perte de fonction des S-RNases peuvent lever l'auto-incompatibilité (Fujii et al., 2016). Une expression accrue des S-RNases pourrait donc, dans l'autre sens, renforcer ces barrières. L'objectif était donc d'analyser si une expression plus élevée de ces

gènes augmenterait les proportions de tubes polliniques rejetés dans le style et diminuerait les taux de mise à fruits ainsi que le nombre de graines par fruit.

L'expression des gènes *HT* variait considérablement entre les individus de *S. chilense*. Certains individus, comme PIS36 et PIS38, présentaient une expression relative de *HT-A* et *HT-B* beaucoup plus élevée que les autres (**Figure 32**). L'expression des S-allèles S10 et S35 variait également entre les individus (**Figure 33**). Cependant, ces variations dans l'expression des gènes n'étaient pas corrélées avec le taux de mise à fruit, le nombre moyen de graines par fruit ni avec le pourcentage de tubes polliniques atteignant l'ovaire (**Figure 33**). Ainsi, bien que la suppression ou les mutations des gènes *HT* ainsi que les mutations ou l'absence de S-RNase entraînent une perte de la barrière d'auto-incompatibilité (Fujii et al., 2016; McClure et al., 1999; Tovar-Méndez et al., 2017), il ne semble pas qu'une augmentation de leur expression renforce l'auto-incompatibilité dans cette étude. Il n'y aurait donc pas de relation évidente entre le taux de mise à fruit, le nombre moyen de graines par fruit et l'expression de ces gènes chez *S. chilense*. Concernant la proportion de tubes polliniques atteignant l'ovaire, celle-ci ne semble pas non plus corrélée, bien que cette analyse repose encore sur seulement six croisements.

Une transcription plus élevée d'un gène n'indique pas toujours une plus grande présence ou traduction de protéines ou une plus grande activité de ces dernières (Greenbaum et al., 2003). La variabilité inter-individuelle dans l'expression de gènes, comme ici, pourrait ne pas avoir de conséquence sur la quantité de protéines HT ou de S-RNases produites, et donc ne pas avoir de conséquences au niveau de l'auto-incompatibilité, comme nos résultats le suggèrent. De plus, la faible (quasi nulle) expression de S35 chez PIS40 peut être due soit à une faible expression naturelle, soit à un faux positif. Il se pourrait que PIS40 ne possède pas ce S-allèle et que l'identification réalisée avec la méthode oligo(dT) ait montré un faux positif d'amplification, cette dernière présentant une intensité plus faible (**Figure 24**). L'expression importante des gènes *HT* chez PIS36 et PIS38 est, enfin, assez étonnante et difficilement explicable. Il serait intéressant d'approfondir ces recherches afin de comprendre d'où cela pourrait provenir, par exemple en analysant ces niveaux d'expression au sein d'un même individu, ou avec d'autre technique d'analyse d'abondance et d'activité protéique (Greenbaum et al., 2003).

F. OBJECTIF 5 – ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT RACINAIRE PAR BOUTURAGE

Le dernier objectif de ce mémoire porte sur la compréhension des moyens d'initier le développement racinaire par bouturage, afin de multiplier et de cloner rapidement les individus. En effet, certains individus de *S. chilense* ont du mal à s'enraciner et se multiplier par bouturage

alors que cette technique peut facilement être utilisée chez *S. lycopersicum* (Quinet et Moreels, communication personnelle). *Solanum chilense* étant une plante halophyte, nous avons donc voulu déterminer si le développement racinaire de cette espèce pouvait être amélioré en cultivant les boutures dans des solutions de NaCl (20 mM) et d'hormones de bouturage.

En effet, le sel facilite le développement racinaire chez certaines plantes halophytes. Certains génotypes de *S. lycopersicum* et certaines tomates sauvages, comme *S. peruvianum* et *S. pimpinellifolium*, qui sont également intéressants pour leur résistance à la salinité (Biswas et al., 2017; Khaliluev et al., 2022; Tapia et al., 2016; Zaki & Yokoi, 2016), peuvent développer des racines en présence de NaCl. Par exemple, des études sur la culture de cals *in vitro* ont montré que *S. peruvianum* et *S. pimpinellifolium* développaient des racines à des concentrations de NaCl allant de 100 à 300 mM (Zaki & Yokoi, 2016). D'autres ont montré que les cals de certains génotypes de *S. lycopersicum* montraient une tolérance à des concentrations de NaCl allant jusqu'à 50 mM (Biswas et al., 2017). De plus, Khaliluev et al. (2022) ont montré que la genèse des racines restait stable jusqu'à 100 mM de NaCl chez *S. lycopersicum*, et que leur longueur et leur nombre étaient favorisés jusqu'à 25 mM de NaCl chez les cals de deux génotypes de *S. lycopersicum*. Enfin, chez l'Amaranthacée halophyte *Salicornia europaea* L., le développement racinaire par bouturage peut être optimisé lorsque ces boutures sont cultivées avec 1,5 % de NaCl et des solutions nutritives (Koshida et al., 2024).

Dans notre étude, contrairement à ce qui était attendu, les boutures immergées dans des solutions contenant du NaCl présentaient un taux de mortalité plus élevé que celles placées dans de l'eau distillée ou dans des solutions avec uniquement des hormones de bouturage (**Figure 35**). La formation de racines variait également en fonction des solutions, certainement car les boutures mortes ne pouvaient pas développer de racines. De plus, cette formation différait entre les individus, certains n'ayant jamais produit de racines. Il est possible que la concentration en NaCl de 20 mM fût trop élevée pour le développement des racines par bouturage chez *S. chilense*, ce qui impacterait négativement la viabilité des boutures. De même, les hormones de bouturage ne semblaient pas avoir d'impact sur la formation des racines. De plus, l'expérience ayant été réalisée début juin, les températures en serres étaient plus élevées, ce qui a pu mener à une évaporation plus importante de l'eau dans les solutions de bouturage, entraînant une plus grande concentration de NaCl. Cela se remarque par l'augmentation de la conductivité électrique des solutions de NaCl en fin d'expérience. Cette situation aurait eu pour conséquence de rendre plus difficile l'absorption d'eau par les boutures, augmentant le stress hydrique et osmotique, et donc leur mortalité.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce mémoire a permis d'approfondir nos connaissances sur les barrières de reproduction intraspécifiques, notamment l'auto-incompatibilité gamétophytique, chez *Solanum chilense*.

Nous avons montré qu'il existait des différences de morphologie florale entre individus de *S. chilense*, notamment des différences d'exsertion du stigmate, et que ces différences n'étaient pas corrélées aux différences d'expression des S-allèles et des gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B*. Bien que plusieurs études suggèrent un lien entre les traits floraux et le contrôle génétique de l'auto-incompatibilité (Bernacchi & Tanksley, 1997; Quinet, 2005), celui-ci ne n'est pas directement influencée par l'expression des *S-RNases*, de *HT-A* et de *HT-B*.

Nous avons identifié une partie des S-allèles jusqu'ici encore inconnus dans notre population de *S. chilense* et mis en évidence que la plupart des individus ont des S-allèles en commun, notamment les S-allèles S10 et S35 dont les séquences ont été décrites précédemment (Igic et al., 2007; Moreels, 2022). Cela nous a permis d'identifier une partie des croisements compatibles, semi-compatibles et incompatibles sur base des S-allèles (compatibilité théorique) au sein de notre population et de comparer la compatibilité théorique à la compatibilité réelle obtenue suite aux croisements réalisés. La compatibilité réelle a été suivie au niveau prézygotique (germination du pollen et croissance des tubes polliniques) et postzygotique (taux de mise à fruits et à graines). Nous avons mis en évidence des différences entre la compatibilité théorique et réelle, ainsi que la présence d'un gradient de compatibilité chez *S. chilense* au niveau du pourcentage d'arrêt de la croissance des tubes polliniques, du taux de mise à fruit, et du nombre de graines par fruit. Cependant, ce gradient de compatibilité ne semble pas lié au niveau d'expression des S-allèles et des gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B*. Ces résultats ont permis de mettre en évidence la complexité de l'auto-incompatibilité gamétophytique chez *S. chilense* et de formuler des hypothèses explicatives.

Par ailleurs, nos résultats nous ont permis de confirmer que les barrières reproductrices chez *S. chilense* étaient essentiellement prézygotiques avec un arrêt des tubes polliniques dans le 1^{er} et 2^e tiers du style. Cependant, les résultats sur la germination des grains de pollen suggèrent aussi que la présence d'une barrière pré-pollinisation peut être due à une faible viabilité pollinique ou faible réceptivité stigmatique. La corrélation observée entre l'arrêt de la croissance des tubes polliniques dans le 2^e tiers du style et le taux de mise à fruit suggère l'absence de barrières de reproduction postzygotiques chez *S. chilense*. Cependant, ces hypothèses doivent être explorées davantage avec des croisements ayant deux S-allèles ou

aucun S-allèle en commun, et entre des populations différentes. Enfin, une relation entre le taux de mise à fruit et le nombre moyen de graines par fruit, nous a permis d'indiquer que le développement des fruits n'est pas forcément indépendant de celui des graines, chez *S. chilense*.

À l'issue de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être proposées.

Étudier la morphologie florale, les S-allèles et les barrières de reproduction chez un plus grand nombre d'individus de *S. chilense*, issus de plusieurs populations, permettrait d'obtenir une vue d'ensemble plus précise et exhaustive sur les liens entre ces différentes composantes. Dans la même optique, il serait intéressant d'analyser davantage de barrières de reproductions et de phénomènes favorisant l'allofécondation, tels que la viabilité des gamétophytes, la formation des zygotes, la taille des fruits, ainsi que la taille et la viabilité des graines issues des croisements.

Identifier et séquencer de nouveaux S-allèles permettrait, comme cela a été observé chez le poirier (Claessen, 2021), de détecter la présence éventuelle de variants de S-allèle ou de mettre en évidence un lien entre la proximité phylogénétique des S-allèles et l'auto-incompatibilité.

Il serait également pertinent d'explorer plus en profondeur les différences importantes d'expression des gènes modificateurs *HT-A* et *HT-B* à l'aide de techniques d'analyse complémentaire et sur un plus grand nombre d'individus. Le rôle de ces gènes modificateurs n'a pas encore été étudié chez *S. chilense*. De même, d'autres gènes modificateurs, tels que *NaStEP* et *NaThrx*, demeurent peu étudiés chez cette espèce.

Dans notre étude, nous avons exploré les mécanismes de l'auto-incompatibilité gamétophytique (AIG) en identifiant les S-allèles grâce au séquençage des S-RNases et en analysant l'expression de ces S-allèles ainsi que celle de deux gènes modificateurs dans l'organe femelle. Cependant, il pourrait être également intéressant d'approfondir l'étude du S-locus et de l'expression génétique du côté mâle, en quantifiant l'expression des gènes du complexe SCF (SLFs, *Cullin1*, *Spk1*).

Enfin, il serait pertinent d'étudier l'enracinement de *S. chilense* par bouturage dans une gamme de solutions de NaCl allant de 0 à 100 mM, dans des conditions environnementales plus stables, en serre ou en chambre de culture. Cela permettrait d'identifier un éventuel optimum de concentration en NaCl pour améliorer l'enracinement et réduire la mortalité des boutures.

Pour conclure, nous espérons que les résultats obtenus, ainsi que les hypothèses formulées, contribueront à une meilleure compréhension globale des barrières de reproduction, entre *S. chilense* et *S. lycopersicum* ainsi qu'au sein du genre *Solanum*. Cela pourrait notamment permettre d'optimiser les techniques de sélection végétale en vue d'améliorer la tomate cultivée grâce à l'introgession de gènes de résistance aux stress biotiques et abiotiques issus d'espèces sauvages apparentées comme *S. chilense*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ali, M. Y., Sina, A. A. I., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E. M., Kabir, A., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2021). Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Tomatoes and Their Impact on Human Health and Disease : A Review. *Foods*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods10010045>
- Ashkani, J., & Rees, D. J. G. (2016). A Comprehensive Study of Molecular Evolution at the Self-Incompatibility Locus of Rosaceae. *Journal of Molecular Evolution*, *82*(2), 128-145. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9726-4>
- Baack, E., Melo, M. C., Rieseberg, L. H., & Ortiz-Barrientos, D. (2015). The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist*, *207*(4), 968-984. <https://doi.org/10.1111/nph.13424>
- 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>
- Baek, Y. S., Royer, S. M., Broz, A. K., Covey, P. A., López-Casado, G., Nuñez, R., Kear, P. J., Bonierbale, M., Orillo, M., van der Knaap, E., Stack, S. M., McClure, B., Chetelat, R. T., & Bedinger, P. A. (2016). Interspecific reproductive barriers between sympatric populations of wild tomato species (Solanum section Lycopersicon). *American Journal of Botany*, *103*(11), 1964-1978. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600356>
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes : What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany*, *100*(5), 1085-1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>
- 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>
- Bernacchi, D., & Tanksley, S. D. (1997). An Interspecific Backcross of Lycopersicon Esculentum X L. Hirsutum : Linkage Analysis and a Qtl Study of Sexual Compatibility Factors and Floral Traits. *Genetics*, *147*(2), 861-877. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.861>
- Bigot, S. (2023). *Salinity impact on flowering and reproduction of Solanum lycopersicum and its wild halophyte relative Solanum chilense* [UCL - Université Catholique de Louvain]. <https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:277202>
- Bigot, S., Leclef, C., Rosales, C., Martínez, J.-P., Lutts, S., & Quinet, M. (2023). Comparison of the salt resistance of Solanum lycopersicum x Solanum chilense hybrids and their parents. *Frontiers in Horticulture*, *2*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fhort.2023.1130702>
- Bigot, S., Pongrac, P., Šala, M., van Elteren, J. T., Martínez, J.-P., Lutts, S., & Quinet, M. (2022). The Halophyte Species Solanum chilense Dun. Maintains Its Reproduction despite Sodium Accumulation in Its Floral Organs. *Plants*, *11*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/plants11050672>

- Biswas, A., Islam, M. R., Rashed, M. R. U., & Zeba, N. (2017). In Vitro Selection of Calli for Salt Tolerance in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(6), Article 6. <https://ijeab.com/detail/in-vitro-selection-of-calli-for-salt-tolerance-in-tomato-solanum-lycopersicum-l/>
- Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J.-P., Lutts, S., Guerriero, G., & Quinet, M. (2021). Comparison of Drought and Heat Resistance Strategies among Six Populations of *Solanum chilense* and Two Cultivars of *Solanum lycopersicum*. *Plants*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/plants10081720>
- 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>
- Böndel, K. B., Nosenko, T., & Stephan, W. (2018). Signatures of natural selection in abiotic stress-responsive genes of *Solanum chilense*. *Royal Society Open Science*, 5(1), 171198. <https://doi.org/10.1098/rsos.171198>
- 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>
- Broz, A. K., & Bedinger, P. A. (2021). Pollen-Pistil Interactions as Reproductive Barriers. *Annual Review of Plant Biology*, 72(Volume 72, 2021), 615-639. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-080620-102159>
- Broz, A. K., Guerrero, R. F., Randle, A. M., Baek, Y. S., Hahn, M. W., & Bedinger, P. A. (2017). Transcriptomic analysis links gene expression to unilateral pollen-pistil reproductive barriers. *BMC Plant Biology*, 17(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1032-4>
- 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>
- Calafiore, R., Aliberti, A., Ruggieri, V., Olivieri, F., Rigano, M. M., & Barone, A. (2019). Phenotypic and Molecular Selection of a Superior *Solanum pennellii* Introgression Sub-Line Suitable for Improving Quality Traits of Cultivated Tomatoes. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00190>
- Cammarano, D., Jamshidi, S., Hoogenboom, G., Ruane, A. C., Niyogi, D., & Ronga, D. (2022). Processing tomato production is expected to decrease by 2050 due to the projected increase in temperature. *Nature Food*, 3(6), 437-444. <https://doi.org/10.1038/s43016-022-00521-y>
- Chaplin, M. H., & Westwood, M. N. (1980). Relationship of nutritional factors to fruit set. *Journal of Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/01904168009362791>
- Chen, K.-Y., Cong, B., Wing, R., Vrebalov, J., & Tanksley, S. D. (2007). Changes in Regulation of a Transcription Factor Lead to Autogamy in Cultivated Tomatoes. *Science*, 318(5850), 643-645. <https://doi.org/10.1126/science.1148428>
- Chen, K.-Y., & Tanksley, S. D. (2004). High-Resolution Mapping and Functional Analysis of *se2.1*: A Major Stigma Exsertion Quantitative Trait Locus Associated With the

- Evolution From Allogamy to Autogamy in the Genus *Lycopersicon*. *Genetics*, 168(3), 1563-1573. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.022558>
- Cheng, M., Gong, C., Zhang, B., Qu, W., Qi, H., Chen, X., Wang, X., Zhang, Y., Liu, J., Ding, X., Qiu, Y., & Wang, A. (2021). Morphological and anatomical characteristics of exerted stigma sterility and the location and function of SILst (*Solanum lycopersicum* Long styles) gene in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 134(2), 505-518. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03710-0>
- 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>
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W., & Orozco-Cárdenas, M. L. (2013). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, 32(2), 239-247. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1358-1>
- Claessen, H. (2021). *Self-incompatibility and the use of gibberellins in pear fruit production (Pyrus communis L.)*. KU Leuven.
- Clausen, J., Keck, D. D., & Hiesey, W. M. (1939). The Concept of Species Based on Experiment. *American Journal of Botany*, 26(2), 103-106. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1939.tb12875.x>
- 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>
- Coyne, J. A., Coyne, H. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Oxford University Press, Incorporated.
- Defalque, C. (2023). *Contrôle génétique de l'auto-incompatibilité et de l'incompatibilité unilatérale chez la tomate*. UCL - Université Catholique de Louvain.
- Delbecq, V. (2024). *Impact de la morphologie florale de la tomate sur l'attractivité des pollinisateurs : Comparaison entre Solanum lycopersicum, Solanum chilense et leurs intermédiaires résultants*. UCL - Université Catholique de Louvain.
- de Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms* (Vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-12051-4>
- de Nettancourt, D. (2001). The Basic Features of Self-Incompatibility. In D. de Nettancourt (Éd.), *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants* (p. 1-24). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04502-2_1
- Dhaliwal, M. S., Jindal, S. K., Sharma, A., & Prasanna, H. C. (2020). Tomato yellow leaf curl virus disease of tomato and its management through resistance breeding : A review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(4), 425-444. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1691060>
- Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127(7), 1309-1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.006>

- Dorais, M., Ehret, D. L., & Papadopoulos, A. P. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components : From the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 231-250. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>
- Douma, J. C., & Weedon, J. T. (2019). Analysing continuous proportions in ecology and evolution : A practical introduction to beta and Dirichlet regression. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(9), 1412-1430. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13234>
- Eshed, Y., & Zamir, D. (1994). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum* : A tool for fine mapping of genes. *Euphytica*, 79(3), 175-179. <https://doi.org/10.1007/BF00022516>
- FAOSTAT. (2024). <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
- 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, 20180433. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180433>
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Teclé, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A., & Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)—From genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D1036-1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>
- Frodin, D. G. (2004). History and concepts of big plant genera. *TAXON*, 53(3), 753-776. <https://doi.org/10.2307/4135449>
- Fujii, S., Kubo, K., & Takayama, S. (2016). Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nature Plants*, 2(9), 1-9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.130>
- Fulton, T. M., Beck-Bunn, T., Emmatty, D., Eshed, Y., Lopez, J., Petiard, V., Uhlig, J., Zamir, D., & Tanksley, S. D. (1997). QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5), 881-894. <https://doi.org/10.1007/s001220050639>
- Gao, M.-F., Peng, H.-Z., Li, S.-S., Wang, X.-L., Gao, L., Wang, M.-H., Zhao, P.-F., & Zhao, L.-X. (2015). Insight into flower diversity in *Solanum lycopersicum* and *Solanum chilense* using comparative biological approaches. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(3), 467-478. <https://doi.org/10.4141/cjps-2014-237>
- García-Valencia, L. E., Bravo-Alberto, C. E., Wu, H.-M., Rodríguez-Sotres, R., Cheung, A. Y., & Cruz-García, F. (2017). SIPP, a Novel Mitochondrial Phosphate Carrier, Mediates in Self-Incompatibility1[OPEN]. *Plant Physiology*, 175(3), 1105-1120. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01884>
- Georgiady, M. S., Whitkus, R. W., & Lord, E. M. (2002). Genetic Analysis of Traits Distinguishing Outcrossing and Self-Pollinating Forms of Currant Tomato, *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. *Genetics*, 161(1), 333-344. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.1.333>
- 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., 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>
- Goldraj, 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>
- Gorguet, B., Eggink, P. M., Ocaña, J., Tiwari, A., Schipper, D., Finkers, R., Visser, R. G. F., & van Heusden, A. W. (2008). Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 116(6), 755-767. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0708-9>
- Grandillo, S., Chetelat, R., Knapp, S., Spooner, D., Peralta, I., Cammareri, M., Perez, O., Termolino, P., Tripodi, P., Chiusano, M. L., Ercolano, M. R., Frusciante, L., Monti, L., & Pignone, D. (2011). *Solanum* sect. *Lycopersicon*. In C. Kole (Éd.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Vegetables* (p. 129-215). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20450-0_9
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4(9), 117. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193646/>
- Harel, D., Fadida, H., Slepoy, A., Gantz, S., & Shilo, K. (2014). The Effect of Mean Daily Temperature and Relative Humidity on Pollen, Fruit Set and Yield of Tomato Grown in Commercial Protected Cultivation. *Agronomy*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy4010167>
- Harrison, R. G., & Larson, E. L. (2014). Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu033>
- Hausmann, B., Parzies, H., Presterl, T., & Miedaner, T. (2004). Plant genetic resources in crop improvement (Review). *Plant Genetic Resources*, 2, 3-21. <https://doi.org/10.1079/PGR200430>
- Hogenboom, N. G., Mather, K., Heslop-Harrison, J., & Lewis, D. (1997). Incompatibility and incongruity: Two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 188(1092), 361-375. <https://doi.org/10.1098/rspb.1975.0025>
- Igic, B., Lande, R., & Kohn, J. R. (2008). Loss of Self-Incompatibility and Its Evolutionary Consequences. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1), 93-104. <https://doi.org/10.1086/523362>
- 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>
- Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., & Kao, T.-H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, 4(2), 81-87. <https://doi.org/10.1007/BF00196492>

- Jackson, D. A. (1993). Stopping Rules in Principal Components Analysis : A Comparison of Heuristical and Statistical Approaches. *Ecology*, 74(8), 2204-2214. <https://doi.org/10.2307/1939574>
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., & Cruz-García, F. (2013). NaStEP : A Proteinase Inhibitor Essential to Self-Incompatibility and a Positive Regulator of HT-B Stability in *Nicotiana glauca* Pollen Tubes. *Plant Physiology*, 161(1), 97-107. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198440>
- Kataoka, K., Yashiro, Y., Habu, T., Sunamoto, K., & Kitajima, A. (2009). The addition of gibberellic acid to auxin solutions increases sugar accumulation and sink strength in developing auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, 123(2), 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.001>
- Khaliluev, M. R., Bogoutdinova, L. R., Raldugina, G. N., & Baranova, E. N. (2022). A Simple and Effective Bioassay Method Suitable to Comparative In Vitro Study of Tomato Salt Tolerance at Early Development Stages. *Methods and Protocols*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/mps5010011>
- 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>
- Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. In M. Causse, J. Giovannoni, M. Bouzayen, & M. Zouine (Éds.), *The Tomato Genome* (p. 7-21). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2
- 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>
- Koshida, K., Kawagishi, K., & Ito, Y. (2024). Cutting propagation of *Salicornia europaea* L. and the optimum NaCl and nutrient solution levels for its rooting and growth. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 0(0), 1-7. <https://doi.org/10.1080/14620316.2024.2396004>
- Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S., Ando, T., Isogai, A., Kao, T., & Takayama, S. (2010). Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Science*, 330(6005), 796-799. <https://doi.org/10.1126/science.1195243>
- Leclef, C. (2021). *Impact d'un stress salin sur la croissance, la reproduction et la physiologie d'hybrides de tomates entre Solanum chilense et Solanum lycopersicum*. UCL - Université Catholique de Louvain.
- 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>
- Lewis, D., & Crowe, L. K. (1958). Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity*, 12(2), 233-256. <https://doi.org/10.1038/hdy.1958.26>

- 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>
- Litskas, V. D., Migeon, A., Navajas, M., Tixier, M.-S., & Stavriniades, M. C. (2019). Impacts of climate change on tomato, a notorious pest and its natural enemy: Small scale agriculture at higher risk. *Environmental Research Letters*, *14*(8), 084041. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab3313>
- Louwaars, N., & Jochemsen, H. (2021). An Ethical and Societal Analysis for Biotechnological Methods in Plant Breeding. *Agronomy*, *11*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061183>
- Lozano, R., Angosto, T., Gómez, P., Payán, C., Capel, J., Huijser, P., Salinas, J., & Martínez-Zapater, J. M. (1998). Tomato Flower Abnormalities Induced by Low Temperatures Are Associated with Changes of Expression of MADS-Box Genes. *Plant Physiology*, *117*(1), 91-100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC35026/>
- Luu, D.-T., Qin, X., Morse, D., & Cappadocia, M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, *407*(6804), 649-651. <https://doi.org/10.1038/35036623>
- Lytovchenko, A., Eickmeier, I., Pons, C., Osorio, S., Szecowka, M., Lehmborg, K., Arrivault, S., Tohge, T., Pineda, B., Anton, M. T., Hedtke, B., Lu, Y., Fisahn, J., Bock, R., Stitt, M., Grimm, B., Granell, A., & Fernie, A. R. (2011). Tomato Fruit Photosynthesis Is Seemingly Unimportant in Primary Metabolism and Ripening But Plays a Considerable Role in Seed Development. *Plant Physiology*, *157*(4), 1650-1663. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186874>
- Markova, D. N., Petersen, J. J., Yam, S. E., Corral, A., Valle, M. J., Li, W., & Chetelat, R. T. (2017). Evolutionary history of two pollen self-incompatibility factors reveals alternate routes to self-compatibility within *Solanum*. *American Journal of Botany*, *104*(12), 1904-1919. <https://doi.org/10.3732/ajb.1700196>
- Martin, F. W. (1961). The Inheritance of Self-Incompatibility in Hybrids of *Lycopersicon Esculentum* Mill. X *L. Chilense* Dun. *Genetics*, *46*(11), 1443-1454. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1210155/>
- Mata-Nicolás, E., Montero-Pau, J., Gimeno-Paez, E., Garcia-Carpintero, V., Ziarsolo, P., Menda, N., Mueller, L. A., Blanca, J., Cañizares, J., van der Knaap, E., & Díez, M. J. (2020). Exploiting the diversity of tomato: The development of a phenotypically and genetically detailed germplasm collection. *Horticulture Research*, *7*, 66. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0291-7>
- McClure, B. A., & Franklin-Tong, V. (2006). Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, *224*(2), 233-245. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0284-2>
- McClure, B., Cruz-García, F., & Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of Botany*, *108*(4), 647-658. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr179>

- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., & Bernatzky, R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(23), 13548-13553. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13548>
- Miller, J. C., & Tanksley, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, *80*(4), 437-448. <https://doi.org/10.1007/BF00226743>
- Molitor, C., Kurowski, T. J., Fidalgo de Almeida, P. M., Kevei, Z., Spindlow, D. J., Chacko Kaitholil, S. R., Iheanyichi, J. U., Prasanna, H. C., Thompson, A. J., & Mohareb, F. R. (2024). A chromosome-level genome assembly of *Solanum chilense*, a tomato wild relative associated with resistance to salinity and drought. *Frontiers in Plant Science*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1342739>
- Moreels, P. (2022). *Etude des barrières de reproduction entre Solanum chilense et Solanum lycopersicum*. UCL - Université Catholique de Louvain.
- Moreels, P., Bigot, S., Defalque, C., Correa, F., Martinez, J.-P., Lutts, S., & Quinet, M. (2023). Intra- and inter-specific reproductive barriers in the tomato clade. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1326689>
- Morimoto, T., Kitamura, Y., Numaguchi, K., Akagi, T., & Tao, R. (2019). Characterization of post-mating interspecific cross-compatibility in *Prunus* (Rosaceae). *Scientia Horticulturae*, *246*, 693-699. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.045>
- Morjan, C. L., & Rieseberg, L. H. (2004). How species evolve collectively : Implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular Ecology*, *13*(6), 1341-1356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02164.x>
- 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), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms222313067>
- Muñoz-Sanz, J. V., Zuriaga, E., Cruz-García, F., McClure, B., & Romero, C. (2020). Self-(In)compatibility Systems : Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00195>
- Nakazato, T., Warren, D. L., & Moyle, L. C. (2010). Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany*, *97*(4), 680-693. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900216>
- Nathan Hancock, C., Kent, L., & McClure, B. A. (2005). The stilar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal*, *43*(5), 716-723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02490.x>
- Opedal, Ø. H. (2018). Herkogamy, a Principal Functional Trait of Plant Reproductive Biology. *International Journal of Plant Sciences*, *179*(9), 677-687. <https://doi.org/10.1086/700314>
- 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>

- Pease, J. B., Haak, D. C., Hahn, M. W., & Moyle, L. C. (2016). Phylogenomics Reveals Three Sources of Adaptive Variation during a Rapid Radiation. *PLOS Biology*, *14*(2), e1002379. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002379>
- Peralta, I. E., Spooner, D., & Knapp, S. (2008). *Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae)*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomy-of-wild-tomatoes-and-their-relatives-sect.-Peralta-Spooner/4b9e752084ae9aaa10d859db2c4bbd9217a9717d>
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2006). History, Origin and Early Cultivation of Tomato (Solanaceae). In *Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2*. CRC Press.
- Peres-Neto, P. R., Jackson, D. A., & Somers, K. M. (2005). How many principal components? Stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited. *Computational Statistics & Data Analysis*, *49*(4), 974-997. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2004.06.015>
- Picken, A. J. F. (1984). A review of pollination and fruit set in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Horticultural Science*. <https://doi.org/10.1080/00221589.1984.11515163>
- 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. *The Plant Journal*, *93*(3), 417-430. <https://doi.org/10.1111/tpj.13796>
- Quinet, M. (2005). *Genetic control of flowering in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) : A case study of some key gene regulating flowering time and morphogenesis of reproductive structures*. UCL - Université Catholique de Louvain.
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F. J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J.-P., & Lutts, S. (2019). Tomato Fruit Development and Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01554>
- Quinet, M., Kelecom, S., Raspé, O., & Jacquemart, A.-L. (2014). S-genotype characterization of 13 North Western European pear (*Pyrus communis*) cultivars. *Scientia Horticulturae*, *165*, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.023>
- 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>
- Rezk, A., Abhary, M., & Akhka, A. (2021). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Breeding Strategies for Biotic and Abiotic Stresses. In J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, & D. V. Johnson (Éds.), *Advances in Plant Breeding Strategies : Vegetable Crops : Volume 9 : Fruits and Young Shoots* (p. 363-405). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66961-4_10
- Rick, C. M. (1988). Evolution of mating systems in cultivated plants. In *Gottlieb LD, Jain SK, eds, Plant Evolutionary Biology* (p. 133-147). https://books.google.be/books?hl=fr&lr=&id=wUrtCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&ots=zSYQ7gO304&sig=OCIo1OP9xCjmtA63hbGRNTfo8-4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Rieseberg, L. H., & Willis, J. H. (2007). Plant Speciation. *Science*, *317*(5840), 910-914. <https://doi.org/10.1126/science.1137729>

- Rieseberg, L. H., Wood, T. E., & Baack, E. J. (2006). The nature of plant species. *Nature*, 440(7083), 524-527. <https://doi.org/10.1038/nature04402>
- Roth, M., Florez-Rueda, A. M., Griesser, S., Paris, M., & Städler, T. (2018). Incidence and developmental timing of endosperm failure in post-zygotic isolation between wild tomato lineages. *Annals of Botany*, 121(1), 107-118. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx133>
- Rounis, V., Skarmoutsos, K., Tsaniklidis, G., Nikoloudakis, N., Delis, C., Karapanos, I., & Aivalakis, G. (2015). Seeded and Parthenocarpic Cherry Tomato Fruits Exhibit Similar Sucrose, Glucose, and Fructose Levels, Despite Dissimilarities in UGPase and SPS Gene Expression and Enzyme Activity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(1), 47-56. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9441-1>
- Saeed, A., Bhatti, K., Khan, A., & IQBAL, S. (2007). Heat Tolerance Studies in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Int J Agric Biol*, 9.
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K., & Ezura, H. (2011). TOMATOMA : A Novel Tomato Mutant Database Distributing Micro-Tom Mutant Collections. *Plant and Cell Physiology*, 52(2), 283-296. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr004>
- Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H., & Ikeda, H. (2006). Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany*, 97(5), 731-738. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl037>
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Shibata, D., Aoki, K., Egholm, M., Knight, J., Bogden, R., Li, C., Shuang, Y., Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Liu, X., ... Universitat Pompeu Fabra. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Sawhney, V. K. (1983). Temperature control of male sterility in a tomato mutant. *Journal of Heredity*, 74(1), 51-54. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109718>
- Shang, L., Song, J., Yu, H., Wang, X., Yu, C., Wang, Y., Li, F., Lu, Y., Wang, T., Ouyang, B., Zhang, J., Larkin, R. M., Ye, Z., & Zhang, Y. (2021). A mutation in a C2H2-type zinc finger transcription factor contributed to the transition toward self-pollination in cultivated tomato. *The Plant Cell*, 33(10), 3293-3308. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab201>
- Silva, N. F., & Goring, D. R. (2001). Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(14), 1988-2007. <https://doi.org/10.1007/PL00000832>
- Surówka, E., Rapacz, M., & Janowiak, F. (2020). Climate Change Influences the Interactive Effects of Simultaneous Impact of Abiotic and Biotic Stresses on Plants. In M. Hasanuzzaman (Éd.), *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change : Mechanisms and Perspectives I: General Consequences and Plant Responses* (p. 1-50). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0_1
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2014). Gametophytes, Pollination, Seeds, and Fruits. In *Plant Physiology and Development* (6th éd.). Sinauer.

- Takayama, S., & Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56(Volume 56, 2005), 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>
- TGRC. (2024). <https://tgrc-mvc.plantsciences.ucdavis.edu/Accession/search>
- Torres-Rodríguez, M. D., Cruz-Zamora, Y., Juárez-Díaz, J. A., Mooney, B., McClure, B. A., & Cruz-García, F. (2020). NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity. *The Plant Journal*, 103(4), 1304-1317. <https://doi.org/10.1111/tpj.14802>
- 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>
- Turnbull, C., Lillemo, M., & Hvoslef-Eide, T. A. K. (2021). Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630396>
- Vieira, J., Ferreira, P. G., Aguiar, B., Fonseca, N. A., & Vieira, C. P. (2010). Evolutionary patterns at the RNase based gametophytic self—Incompatibility system in two divergent Rosaceae groups (Maloideae and Prunus). *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-200>
- 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>
- Vitale, L., Francesca, S., Arena, C., D'Agostino, N., Principio, L., Vitale, E., Cirillo, V., de Pinto, M. C., Barone, A., & Rigano, M. M. (2023). Multitraits evaluation of a *Solanum pennellii* introgression tomato line challenged by combined abiotic stress. *Plant Biology*, 25(4), 518-528. <https://doi.org/10.1111/plb.13518>
- Vosters, S. L., Jewell, C. P., Sherman, N. A., Einterz, F., Blackman, B. K., & Moyle, L. C. (2014). The timing of molecular and morphological changes underlying reproductive transitions in wild tomatoes (*Solanum* sect. *Ycopersicon*). *Molecular Ecology*, 23(8), 1965-1978. <https://doi.org/10.1111/mec.12708>
- Wang, L., & Filatov, D. A. (2023). Mechanisms of prezygotic post-pollination reproductive barriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1230278>
- Warton, D. I., & Hui, F. K. C. (2011). The arcsine is asinine : The analysis of proportions in ecology. *Ecology*, 92(1), 3-10. <https://doi.org/10.1890/10-0340.1>
- Widmer, A., Lexer, C., & Cozzolino, S. (2009). Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, 102(1), 31-38. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.69>

- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00041>
- Wright, S. (1939). The Distribution of Self-Sterility Alleles in Populations. *Genetics*, 24(4), 538-552. <https://doi.org/10.1093/genetics/24.4.538>
- Wu, M., Bian, X., Huang, B., Du, Y., Hu, S., Wang, Y., Shen, J., & Wu, S. (2024). HD-Zip proteins modify floral structures for self-pollination in tomato. *Science*, 384(6691), 124-130. <https://doi.org/10.1126/science.adl1982>
- Yin, Y.-G., Tominaga, T., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., Nishimura, S., Ezura, H., & Matsukura, C. (2010). Metabolic Alterations in Organic Acids and γ -Aminobutyric Acid in Developing Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Fruits. *Plant and Cell Physiology*, 51(8), 1300-1314. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq090>
- Zaki, H. E. M., & Yokoi, S. (2016). A comparative in vitro study of salt tolerance in cultivated tomato and related wild species. *Plant Biotechnology*, 33(5), 361-372. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.16.1006a>
- Zhao, H., Zhang, Y., Zhang, H., Song, Y., Zhao, F., Zhang, Y., Zhu, S., Zhang, H., Zhou, Z., Guo, H., Li, M., Li, J., Gao, Q., Han, Q., Huang, H., Copsey, L., Li, Q., Chen, H., Coen, E., ... Xue, Y. (2022). Origin, loss, and regain of self-incompatibility in angiosperms. *The Plant Cell*, 34(1), 579-596. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab266>
- Zuriaga, E., Blanca, J., & Nuez, F. (2009). Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(5), 663-678. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9392-0>

ANNEXES

Annexe 1 – Détail du calcul d'expression des gènes d'intérêt via RT-qPCR

L'expression de chaque gène *HT-A*, *HT-B* et des allèles des S-RNases *S10* et *S35* a été calculée via la méthode « standard curve ». Celle-ci s'est appliquée comme suit. Tout d'abord, une régression a été calculée comprenant le CT de chaque réplica et les variables précédemment obtenues par la droite d'efficacité d'amplification du primer (Équation 2). La quantité d'ADN a ensuite été calculée en appliquant l'équation 3.

$$y = (CT - b)/a \text{ (Équation 2)}$$

$$\text{Quantité d'ADN} = 10^y \text{ (Équation 3)}$$

Ensuite, la moyenne de chaque triplica d'échantillon des gènes contrôle a été calculée pour chaque gène contrôle (Équation 4 a et b). Chaque réplica d'échantillon de gène cible a été divisée par la moyenne d'échantillons du gène contrôle (Équation 5a et b). Les expressions ont été ensuite normalisées à l'aide d'un échantillon de référence du gène d'intérêt (Équation 6a et b), ici PIS10 a été choisi arbitrairement. Finalement, la moyenne de chaque rapport avec les deux gènes contrôles a été calculée (Équation 7).

$$\text{Moyenne EF1}\alpha = (Qt\ ADN_{LeEF1\alpha,1} + Qt\ ADN_{LeEF1\alpha,2} + Qt\ ADN_{LeEF1\alpha,3})/3 \text{ (Équation 4a)}$$

$$\text{Moyenne TIP41} = (Qt\ ADN_{TIP41,1} + Qt\ ADN_{TIP41,2} + Qt\ ADN_{TIP41,3})/3 \text{ (Équation 4b)}$$

$$\text{Rapport gène intérêt sur EF1}\alpha = Qt\ ADN_{intérêt,1}/\text{Moyenne EF1}\alpha \text{ (Équation 5a)}$$

$$\text{Rapport gène intérêt sur TIP41} = Qt\ ADN_{intérêt,1}/\text{Moyenne EF1}\alpha \text{ (Équation 5a)}$$

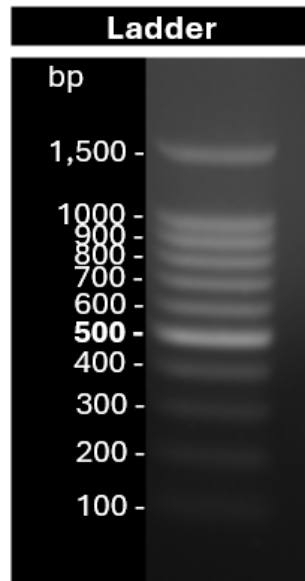
$$\text{Expression normalisée EF1}\alpha = \frac{\text{Rapport gène intérêt sur EF1}\alpha_{ech\ intérêt}}{\text{Rapport gène intérêt sur EF1}\alpha_{ech\ référence}} \text{ (Équation 6a)}$$

$$\text{Expression normalisée TIP41} = \frac{\text{Rapport gène intérêt sur TIP41}_{ech\ intérêt}}{\text{Rapport gène intérêt sur TIP41}_{ech\ référence}} \text{ (Équation 6a)}$$

$$\text{Expression finale} = (\text{Exp normalisée EF1}\alpha + \text{Exp normalisée TIP41})/2 \text{ (Équation 7)}$$

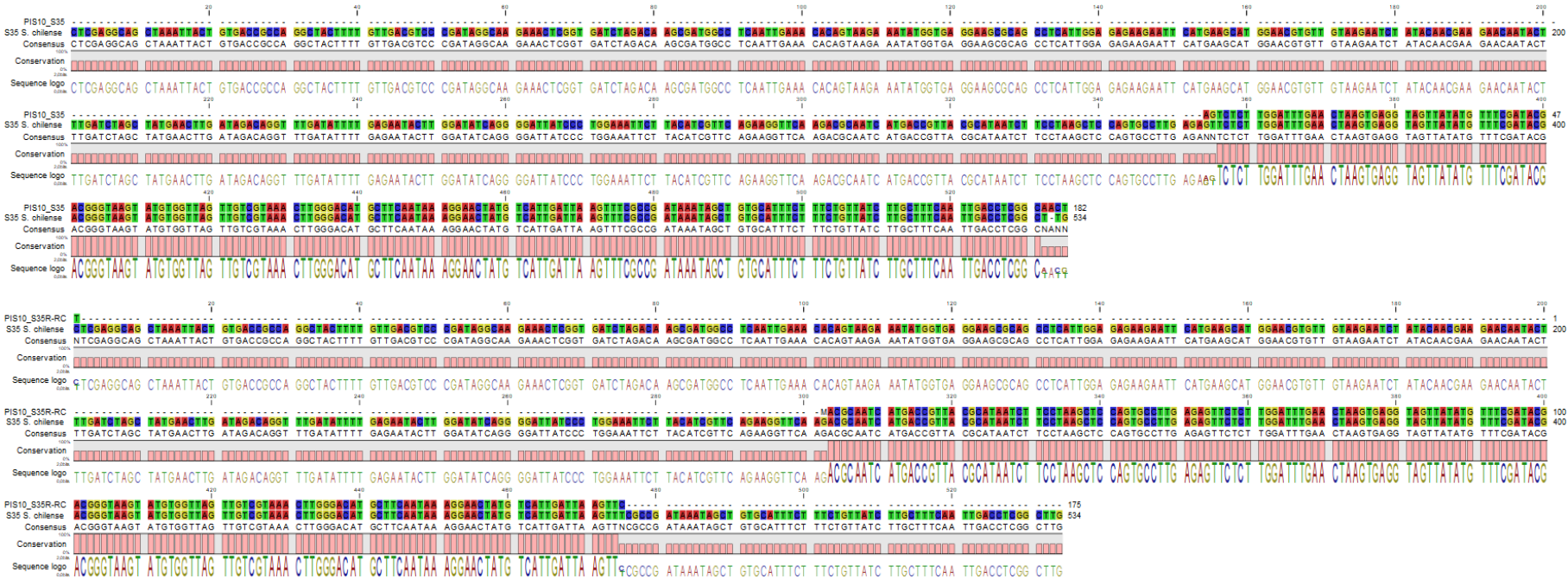
Annexe 2 – Échelle moléculaire

Graduation de l'échelle moléculaire BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega, 3800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA) utilisé pour tous les gel d'électrophorèse.

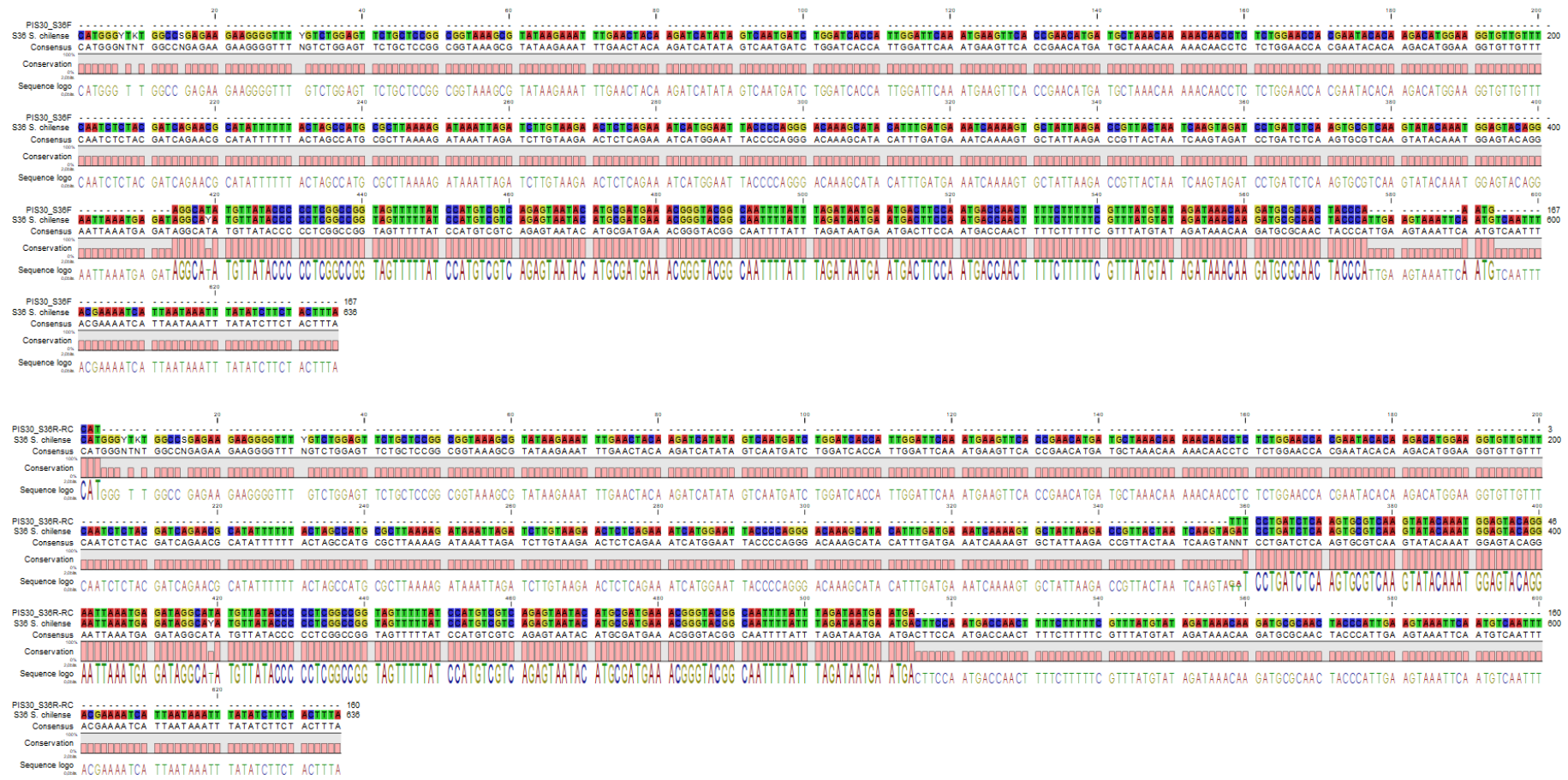


Annexe 3 – Alignements des séquences de S-allèles

Alignements des séquences de PIS10 avec les séquences du S-allèle S35.



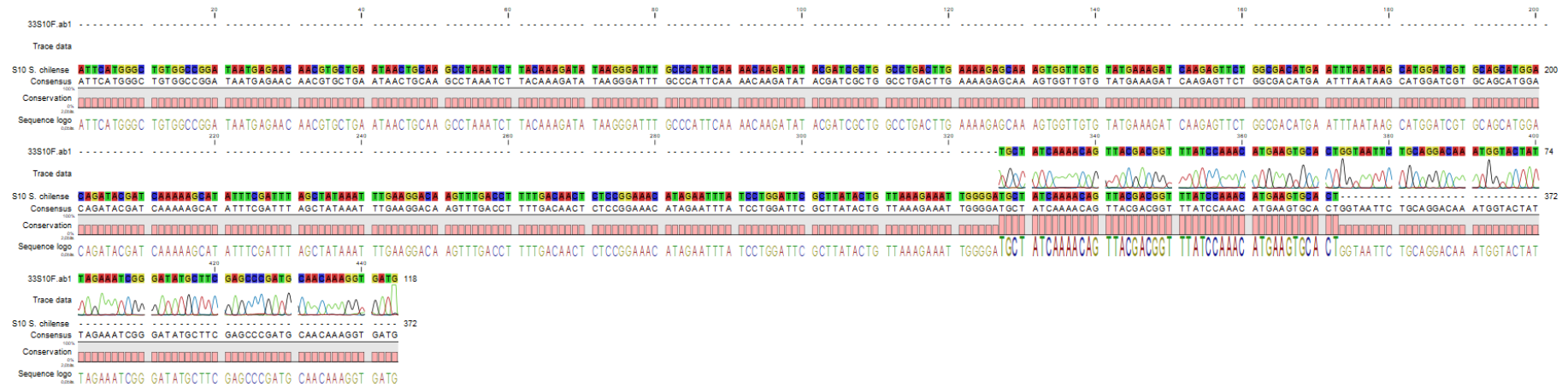
Alignement des séquences de PIS30 avec les séquences du S-allèles S36



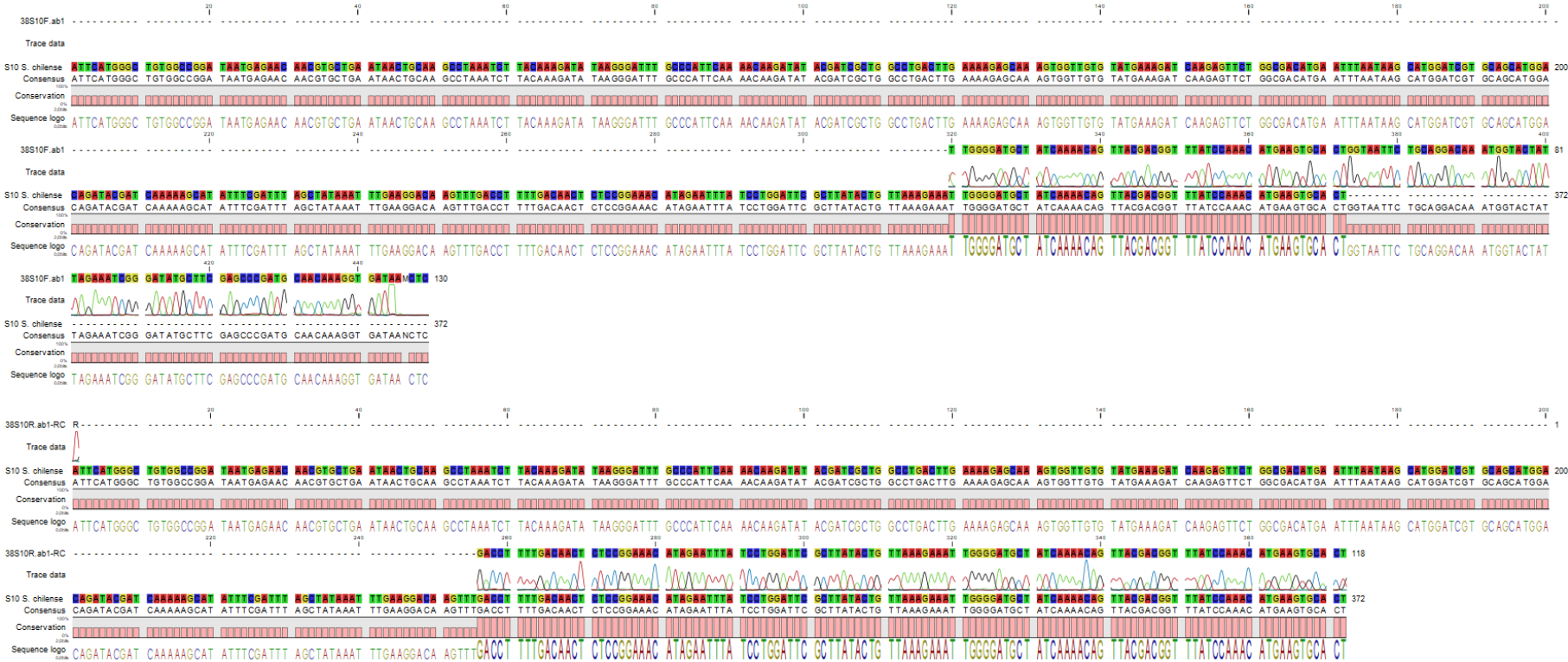
Alignement des séquences de PIS30 (F) avec les séquences du S-allèle S35



Alignement des séquences de PIS33 (F) avec les séquences du S-allèles S10



Alignement des séquences de PIS38 avec les séquences du S-allèle S35



Annexe 4 – Données des croisements de *S. chilense*

Donnée des croisements interspécifique de <i>S. chilense</i>						
Croisement ♀ x ♂	Tableau 9			Tableau 10		
	Nombre de croisement réalisé	Nombre de fruit	Taux de mise à fruit	Nombre de fruit disséqué	Nombre de graine	Nombre moyen de graine par fruit
PIS10 x PIS14	24	12	50.00	12	263	21.92
PIS10 x PIS19	21	16	76.19	6	184	30.67
PIS10 x PIS33	8	0	0.00	0	NA	NA
PIS14 x PIS10	21	16	76.19	13	123	9.46
PIS14 x PIS19	20	4	20.00	0	NA	NA
PIS14 x PIS31	20	5	25.00	5	31	6.20
PIS14 x PIS33	20	6	30.00	6	70	11.67
PIS14 x PIS36	21	2	9.52	2	11	5.50
PIS14 x PIS40	20	7	35.00	5	60	12.00
PIS14 x SC2	20	5	25.00	5	34	6.80
PIS19 x PIS10	2	0	0.00	0	NA	NA
PIS19 x PIS14	23	0	0.00	0	NA	NA
PIS19 x PIS31	20	8	40.00	2	14	7.00
PIS19 x PIS33	27	18	66.67	16	223	13.94
PIS19 x PIS36	20	1	5.00	0	NA	NA
PIS19 x PIS40	20	10	50.00	2	16	8.00
PIS19 x SC2	8	0	0.00	NA	NA	NA
PIS31 x PIS14	20	9	45.00	6	42	7.00
PIS31 x PIS19	20	4	20.00	0	NA	NA
PIS31 x PIS33	20	0	0.00	0	NA	NA
PIS31 x PIS36	30	6	20.00	4	12	3.00
PIS31 x PIS40	20	1	5.00	0	NA	NA
PIS33 x PIS10	12	1	8.33	NA	NA	NA
PIS33 x PIS14	12	7	58.33	5	90	18.00
PIS33 x PIS36	3	1	33.33	1	23	23.00
PIS33 x PIS38	6	0	0.00	0	NA	NA
PIS33 x PIS40	17	3	17.65	0	NA	NA
PIS33 x SC2	9	1	11.11	0	NA	NA
PIS34 x PIS10	12	4	33.33	0	NA	NA
PIS34 x PIS33	7	4	57.14	0	NA	NA
PIS34 x PIS34	9	0	0.00	0	NA	NA
PIS36 x PIS10	20	3	15.00	3	33	11.00
PIS36 x PIS14	22	9	40.91	6	68	11.33
PIS36 x PIS19	20	13	65.00	10	99	9.90
PIS36 x PIS31	20	9	45.00	9	36	4.00
PIS36 x PIS40	20	1	5.00	1	4	4.00
PIS38 x PIS14	6	2	33.33	2	5	2.50
PIS38 x PIS19	14	3	21.43	3	65	21.67
PIS38 x PIS33	24	3	12.50	1	6	6.00
PIS38 x PIS34	8	0	0.00	0	NA	NA
PIS38 x PIS36	3	2	66.67	2	16	8.00
PIS38 x SC2	18	4	22.22	4	22	5.50
PIS40 x PIS10	20	4	20.00	0	NA	NA
PIS40 x PIS14	20	1	5.00	1	5	5.00
PIS40 x PIS19	4	0	0.00	0	NA	NA
PIS40 x SC2	6	1	16.67	1	17	17.00
SC2 x PIS14	20	2	10.00	2	27	13.50
SC2 x PIS31	20	0	0.00	0	NA	NA
SC2 x PIS33	7	0	0.00	0	NA	NA
SC2 x PIS40	11	1	9.09	1	5	5.00

Annexe 5 – Tableaux des p-valeurs issus des modèles de régression logistique binomiale pour l’analyse statistiques des taux germinations du pollen et des croissances des tubes polliniques dans les différents tiers du style, chez six croisements de *S. chilense*.

Les autres coefficients des modèles (*Estimate, Erreurs Standard, Z-values*), ainsi que les données de déviance nulle et déviance résiduels sont disponible via le code R, au lien suivant : https://github.com/SchreiberRo/memory_thesis_data.git.

$$\text{Taux de germination du pollen} = \frac{N \text{ de grains de pollen germé (Germe)}}{N \text{ de grains de pollen sur le stigmate (Pollen)}}$$

P-values issus des GLM binomiales, en changeant le niveau de référence

Formule : cbind(Germe, Pollen - Germe) ~ Croisement

Référence	PIS10 x PIS19	PIS36 x PIS19	PIS10 x PIS14	PIS14 x PIS40	PIS14 x SC2	PIS40 x PIS14
PIS10 x PIS19		3.650e-07*	7.193e-01	7.035e-01	2.854e-08*	3.180e-27*
PIS36 x PIS19	3.650e-07*		2.369e-06*	7.819e-06*	9.340e-01	8.496e-08*
PIS10 x PIS14	7.193e-01	2.369e-06*		9.660e-01	2.666e-07*	2.469e-25*
PIS14 x PIS40	7.035e-01	7.819e-06*	9.660e-01		1.272e-06*	2.640e-23*
PIS14 x SC2	2.854e-08*	9.340e-01	2.666e-07*	1.272e-06*		2.968e-08*
PIS40 x PIS14	3.180e-27*	8.496e-08*	2.469e-25*	2.640e-23*	2.968e-08*	

% de tube polliniques traversant le 1er tiers du style

$$= \frac{N \text{ de tubes polliniques traversant le 1er tiers du style (Prolongation1)}}{N \text{ de grains de pollen germé (Germe)}}$$

P-values issus des GLM binomiales, en changeant le niveau de référence

Formule : cbind(Prolongation1, Germe - Prolongation1) ~ Croisement

Référence	PIS10 x PIS19	PIS36 x PIS19	PIS10 x PIS14	PIS14 x PIS40	PIS14 x SC2	PIS40 x PIS14
PIS10 x PIS19		3.608e-01	2.903e-05*	3.868e-01	1.553e-10*	1.538e-03*
PIS36 x PIS19	3.608e-01		9.035e-05*	8.325e-01	2.545e-09*	7.193e-04*
PIS10 x PIS14	2.903e-05*	9.035e-05*		3.823e-06*	1.065e-03*	6.235e-01
PIS14 x PIS40	3.868e-01	8.325e-01	3.823e-06*		2.261e-11*	3.078e-04*
PIS14 x SC2	1.553e-10*	2.545e-09*	1.065e-03*	2.261e-11*		4.356e-02*
PIS40 x PIS14	1.538e-03*	7.193e-04*	6.235e-01	3.078e-04*	4.356e-02*	

% de tube polliniques traversant le 2e tiers du style

$$= \frac{N \text{ de tubes polliniques traversant le 2e tiers du style (Prolongation2)}}{N \text{ de tubes polliniques traversant le 1er tiers du style (Prolongation1)}}$$

P-values issus des GLM binomiales, en changeant le niveau de référence

Formule : cbind(Prolongation2, Prolongation1 - Prolongation2) ~ Croisement

Référence	PIS10 x PIS19	PIS36 x PIS19	PIS10 x PIS14	PIS14 x PIS40	PIS14 x SC2	PIS40 x PIS14
PIS10 x PIS19		1.196e-01	5.152e-01	8.468e-01	3.256e-01	6.374e-02
PIS36 x PIS19	1.196e-01		3.556e-01	1.005e-01	5.759e-02	9.137e-03*
PIS10 x PIS14	5.152e-01	3.556e-01		4.312e-01	1.848e-01	3.320e-02*
PIS14 x PIS40	8.468e-01	1.005e-01	4.312e-01		3.940e-01	8.375e-02
PIS14 x SC2	3.256e-01	5.759e-02	1.848e-01	3.940e-01		4.144e-01
PIS40 x PIS14	6.374e-02	9.137e-03*	3.320e-02*	8.375e-02	4.144e-01	

% de tube polliniques traversant le 3e tiers du style

$$= \frac{N \text{ de tubes polliniques traversant le 3e tiers du style (Prolongation3)}}{N \text{ de tubes polliniques traversant le 2e tiers du style (Prolongation2)}}$$

P-values issus des GLM binomiales, en changeant le niveau de référence

Formule : cbind(Prolongation3, Prolongation2 - Prolongation3) ~ Croisement

Référence	PIS10 x PIS19	PIS36 x PIS19	PIS10 x PIS14	PIS14 x PIS40	PIS14 x SC2	PIS40 x PIS14
PIS10 x PIS19		8.869e-01	9.516e-01	9.437e-02	1.272e-01	9.939e-01
PIS36 x PIS19	8.869e-01		9.361e-01	1.052e-01	1.875e-01	9.939e-01
PIS10 x PIS14	9.516e-01	9.361e-01		1.034e-01	1.539e-01	9.939e-01
PIS14 x PIS40	9.437e-02	1.052e-01	1.034e-01		1.129e-02*	9.943e-01
PIS14 x SC2	1.272e-01	1.875e-01	1.539e-01	1.129e-02*		9.935e-01
PIS40 x PIS14	9.939e-01	9.939e-01	9.939e-01	9.943e-01	9.935e-01	

Annexe 6 – Évolution du nombre de Racine pour les différentes bouture de 5 individus de *S. chilense* dans différentes solutions

