
Impact de la morphologie florale de la tomate sur l'attractivité des pollinisateurs : comparaison entre *Solanum lycopersicum*, *Solanum chilense* et leurs intermédiaires résultants

Delbecq Vianney

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

Promotrice : Muriel Quinet (Université catholique de Louvain)
Encadrante : Pauline Moreels (Université catholique de Louvain)

Année académique 2023-2024

Remerciements

Dans un premier temps, mes remerciements chaleureux vont à ma promotrice, Muriel Quinet, pour m'avoir guidé tout au long de ce mémoire durant nos nombreuses entrevues. Merci pour sa disponibilité, sa réactivité au moindre souci rencontré, ses conseils éclairés ainsi que pour son temps accordé aux relectures. Je me sens chanceux d'avoir pu réaliser mon mémoire dans ces conditions.

Ensuite, je souhaite remercier Pauline Moreels pour son encadrement, sa gentillesse, ses explications claires et précises lors des expériences à réaliser mais également pour la qualité de ses propositions de correction.

Merci aux membres du GRPV pour leur bonne humeur, leur aide ainsi que pour leurs conseils de tout instant durant mes passages au laboratoire. Merci en particulier à Marie-Eve pour sa bienveillance, ses explications et son expertise dans le domaine de la biologie moléculaire. Merci également à Brigitte et Paul pour avoir pris le relais de l'arrosage de mes plantes lors des sessions d'examens.

Merci à mon jury, composé de Muriel Quinet, Renate Wesselingh, André Lejeune et Valentin Couvreur pour la lecture de ce mémoire.

Merci à ma copine, Clara, pour m'avoir soutenu durant les moments de doute.

Enfin, merci à mes parents de m'avoir donné la chance de pouvoir faire des études, et en particulier à ma maman pour la relecture de ce mémoire.

Résumé

La tomate cultivée, *Solanum lycopersicum* L., est l'une des cultures maraichères les plus importantes au monde. En revanche, sa faible variabilité génétique rend cette espèce sensible à un nombre important de stress biotiques et abiotiques. Son espèce parente halophyte *Solanum chilense*, est quant à elle capable de vivre dans des conditions extrêmophiles grâce à ses gènes de résistance à divers stress. Une solution pourrait donc être l'introgession des résistances de *S. chilense* chez la tomate cultivée dans un objectif d'amélioration végétale.

Cependant, des mécanismes d'incompatibilité intra- et interspécifiques existent lors des croisements dans le clade de la tomate. En effet, *S. chilense* présente une auto-incompatibilité gamétophytique (AI) alors que *S. lycopersicum* est auto-compatible (AC). De plus, la barrière prézygotique qu'est l'incompatibilité unilatérale (IU) ne permet le croisement entre ces deux espèces que dans le sens *S. lycopersicum* X *S. chilense*. Les hybrides de première génération (F1) formés par ce croisement ont par la suite donné naissance à d'autres intermédiaires résultants, étudiés dans ce mémoire.

L'objectif de cette étude était de se porter sur les liens existants entre auto-incompatibilité, traits floraux et pollinisation chez nos plantes. Le but était ainsi d'observer de potentiels traits floraux plus attractifs pour les pollinisateurs chez nos plantes auto-incompatibles comparativement aux plantes auto-compatibles.

Des comparaisons morphologiques et reproductives ont été réalisées entre les parents et les intermédiaires résultants afin d'observer de potentielles différences significatives entre les traits floraux. De plus, la présence d'allèles d'auto-incompatibilité (S-RNases) a pu être vérifiée chez nos hybrides de seconde génération (F2) et backcross formés. L'étude de la morphologie des organes floraux a montré que toutes les plantes présentant une exsertion du style (importante pour la reproduction croisée) aussi bien chez *S. chilense* que chez nos intermédiaires résultants possédaient au moins un S-allèle fonctionnel de l'auto-incompatibilité. Enfin, c'est chez *S. lycopersicum*, qui est une espèce auto-compatible et donc capable de donner des fruits et des graines sans intervention extérieure que le nombre d'observations de pollinisateurs le plus faible a été comptabilisé.

Abstract

The cultivated tomato, *Solanum lycopersicum* L., is one of the most important vegetable crops in the world. However, its low genetic variability makes this species sensitive to a large number of biotic and abiotic stresses. On the other hand, its halophytic wild relative *S. chilense* is able to live in extremophilic conditions thanks to its resistance genes to various stresses. One solution could therefore be to introgress *S. chilense* resistances into cultivated tomatoes for crop improvement purposes.

However, intra- and interspecific incompatibility mechanisms exist during crosses in the tomato clade. *S. chilense* shows gametophytic self-incompatibility (SI), whereas *S. lycopersicum* is self-compatible (SC). Moreover, the prezygotic reproductive barrier of unilateral incompatibility (UI) means that these two species can only cross in the direction *S. lycopersicum* X *S. chilense*. This cross resulted in the formation of first-generation hybrids (F1), which subsequently gave rise to other resulting intermediates studied in this thesis.

The aim of this study was to investigate the links between self-incompatibility, floral traits and pollination in our plants. The goal was thus to observe potential floral traits more attractive to pollinators in our self-incompatible plants compared with self-compatible plants.

The presence of self-incompatibility alleles (S-RNases) was verified in our second-generation (F2) and backcross hybrids. In addition, morphological and reproductive comparisons were carried out between parents and resulting intermediates to observe potential significant differences in floral traits. The study of floral organ morphology showed that all plants with style exsertion (important for cross-breeding) in both *S. chilense* and our resulting intermediates possessed at least one functional S-allele of self-incompatibility. Finally, the lowest number of observations was recorded in *S. lycopersicum*, a self-compatible species capable of producing fruit and seeds without external intervention.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	2
RÉSUMÉ.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCTION GENERALE	7
REVUE DE LA LITTERATURE	9
Impacts du changement climatique sur les relations plantes-pollinisateurs.....	9
Aspect temporel	9
Aspect spatial	10
Conséquences diverses du changement climatique	10
Avantages des espèces généralistes face aux changements climatiques	12
La pollinisation.....	13
Définition et modes de pollinisation	13
Facteurs floraux affectant les pollinisateurs	14
Principaux insectes pollinisateurs	15
La tomate	16
Solanum lycopersicum L.	17
Solanum chilense	19
Pollinisation de la tomate	20
Les barrières de reproduction	21
L'auto-incompatibilité (AI)	22
L'incompatibilité unilatérale (IU).....	25
MATÉRIEL & MÉTHODES	27
Matériel végétal	27
Conditions de culture.....	28
Germination	28
Repiquage et croissance des plantes	29
Biologie moléculaire : confirmation des génotypes et identification des S-allèles	29
Mesures morphologiques : comparaison des différents génotypes.....	32
Croissance végétative et reproductive.....	32
Morphologie des organes floraux	32

Réceptivité stigmatique	33
Comptage du nombre de grains de pollen	34
Viabilité pollinique	35
Suivi de la pollinisation par les insectes et analyse de la reproduction	36
Analyses statistiques	37
RÉSULTATS	38
Partie 1 : Vérification des génotypes	39
Vérification génétique des plantes hybrides et des backcross	39
Vérification des allèles d'auto-incompatibilité S10/S16	40
Partie 2 : Comparaison morphologique	41
Croissance végétative	41
Nombre de feuilles	41
Ramifications	42
Croissance reproductive	45
Temps de floraison	45
Nombre d'inflorescences	46
Nombre de fleurs	48
Morphologie des organes floraux	49
Fertilité des fleurs	51
Analyse en composantes principales (ACP) des différentes plantes en fonction des données florales	52
Partie 3 : Pollinisation	54
Paramètres inflorescentiels et floraux	54
Paramètres de rendement	56
Comportement de visite des insectes	58
DISCUSSION	62
Comparaison phénotypique des espèces parentes, des hybrides et des backcross	62
Auto-incompatibilité et exsertion du style chez la tomate	65
Morphologie florale et attractivité des pollinisateurs chez la tomate	69
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	72
BIBLIOGRAPHIE	74
ANNEXES	88

Introduction générale

L'augmentation actuelle de la demande alimentaire due à la croissance exponentielle de la population mondiale nécessite un perfectionnement de notre production agricole (Bailes et al., 2015 ; Gu et al., 2021 ; Klatt et al., 2013). 75% des cultures mondiales bénéficient d'un meilleur rendement lorsqu'elles sont pollinisées par des insectes. Comprendre les relations plantes-pollinisateurs est donc nécessaire à l'amélioration de notre sécurité alimentaire mais aussi au maintien des populations de pollinisateurs et de leur biodiversité (Deprá et al., 2014 ; Dingley et al., 2022 ; Ganie et al., 2024 ; Klatt et al., 2013).

La tomate cultivée, *Solanum lycopersicum* L., est une des cultures maraichères les plus consommées dans le monde avec une production estimée à plus de 186 millions de tonnes en 2022 (FAOSTAT, 2024). En plus de son intérêt économique, la tomate est bénéfique pour la santé humaine. Elle contient de nombreux nutriments importants tels que des acides aminés (comme les acides aspartique et glutamique), la vitamine A, la vitamine C ou encore le lycopène et le bêta-carotène (Bergounoux., 2014 ; Dorais et al., 2008 ; Okunev., 2019 ; Toni et al., 2021). Cependant, sa faible variabilité génétique rend cette espèce sensible à un nombre important de stress biotiques et abiotiques (Bigot et al., 2023).

Grâce à des gènes de résistance à divers stress, *Solanum chilense* est, quant à elle, capable de vivre dans des conditions extrêmophiles. Originaire du Chili et du Pérou, cette espèce est une des sources de gènes les plus prometteuses face aux différents stress grâce à son haut niveau de variabilité génétique (Blanchard-Gros et al., 2021). Pour améliorer la résistance au stress de la tomate cultivée, une solution pourrait être d'augmenter sa variabilité génétique en la croisant avec des espèces sauvages proches, comme *S. chilense*, grâce à l'introgession de gènes de résistance (Bigot et al., 2023).

Cependant, *S. chilense* est une espèce auto-incompatible qui nécessite une pollinisation par les insectes contrairement à la tomate cultivée. De plus, de nombreuses barrières de reproduction existent dans le clade de la tomate et peuvent rendre les croisements compliqués. En empêchant l'auto-fécondation et en réduisant la consanguinité en reconnaissant et rejetant son propre pollen, l'auto-incompatibilité apporte des avantages non négligeables à certaines espèces. La reproduction croisée

permet ainsi un maintien de la diversité génétique dans la population (Chen et al., 2004). Bien que l'auto-incompatibilité soit assez fréquente dans le règne végétal (présente chez ~40% des Angiospermes), une transition vers l'auto-compatibilité peut se dérouler (Markova et al., 2017 ; Zhao et al., 2022). L'évolution des espèces vers l'auto-compatibilité est certainement due à l'assurance de reproduction lorsque le pollen compatible est limité dans l'environnement, potentiellement suite à une densité de plantes trop faible ou un nombre de pollinisateurs trop restreint. (Markova et al., 2017 ; Wheelwright et al., 2006). Mieux comprendre les barrières de reproduction intra- et interspécifiques chez la tomate et leurs liens avec la morphologie florale et la pollinisation est donc crucial.

L'objectif de ce travail est de comprendre le lien entre auto-incompatibilité, morphologie florale et attractivité des pollinisateurs chez la tomate en comparant la tomate cultivée auto-compatibile, *S. chilense* auto-incompatible et leurs hybrides. Nous avons comparé les deux espèces parentes, des hybrides F2 et des backcross entre les hybrides F1 et leurs parents afin d'avoir un continuum de morphologies entre les deux espèces parentes. Ce travail vise à répondre aux questions suivantes : 1) Les hybrides F2 et les plantes issues des backcross sont-elles auto-incompatibles ou auto-compatibles ? 2) Observe-t-on un continuum morphologique entre les deux espèces parentes et leurs hybrides tant au niveau végétatif que reproducteur, en particulier concernant la morphologie florale ? 3) Certains traits floraux sont-ils liés à l'auto-incompatibilité chez la tomate ? 4) L'auto-incompatibilité et les éventuels traits floraux associés ont-ils un impact sur l'attractivité des pollinisateurs ? Mon hypothèse est que les plantes auto-incompatibles produiront plus de fleurs ainsi que des traits et ressources florales rendant les fleurs plus attractives pour les pollinisateurs comparativement aux plantes auto-compatibles.

Revue de la littérature

Impacts du changement climatique sur les relations plantes-pollinisateurs

En réponse aux changements environnementaux, les décalages dans les interactions plantes-pollinisateurs résultent d'une réduction de la co-occurrence des partenaires dans un même habitat, que ce soit lié à l'aspect temporel, ou spatial. Selon le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), le changement climatique a débuté dans les années 50' et, en fonction des efforts fournis et de la réduction des émissions de gaz à effet de serre, une augmentation de 2,1 à 3,4 °C est prévue pour 2100 (IPCC., 2024). Les catastrophes naturelles ainsi que les pics de température extrême risquent d'être de plus en plus fréquents et peuvent être extrêmement néfastes pour la reproduction des plantes en impactant le développement floral et la floraison (Settele et al., 2016). Une augmentation de la température, qui joue un rôle de régulateur dans le développement des plantes et des insectes, impactera inévitablement le comportement de visite du pollinisateur ainsi que l'attractivité de la plante en affectant la qualité et la quantité de ses ressources florales (Gérard et al., 2020). Le changement climatique impacte aussi bien la phénologie de la plante que celle du pollinisateur et place donc la relation mutualiste existante entre la plante et son pollinisateur sous la pression de menaces temporelles et spatiales (Gómez-Ruiz et al., 2019).

Aspect temporel

La floraison des plantes et l'éclosion des insectes se déroulent de plus en plus tôt dans l'année et la probabilité des décalages temporels risquent d'augmenter. Une plante fleurissant plus tôt dans l'année pourrait donc manquer une partie de la période d'activité de son pollinisateur principal ce qui conduirait à une diminution de la production de graines (Gérard et al., 2020). Une réduction de la disponibilité en ressources pour le pollinisateur le mènerait à réduire son taux de visite sur des plantes qui dépendent de lui (Settele et al., 2016). L'émergence précoce des insectes serait basée principalement sur un besoin spécifique en termes de chaleur par jour plutôt que par un seuil de température (Willmer et al., 2012).

Aspect spatial

Concernant l'aspect spatial, le climat est un des facteurs essentiels de la répartition des espèces autour du globe et un réchauffement entraînerait donc des répercussions inquiétantes sur leur taux d'extinction, leur aire de distribution ainsi que sur les processus écologiques résultant des interactions entre individus. En effet, de nombreuses études analysant l'impact du réchauffement climatique ont montré une tendance générale de la variation de l'aire de répartition des espèces en taille, en latitude mais également en altitude (Gérard et al., 2020 ; Hughes., 2000 ; Scaven et al., 2013). L'interaction entre partenaires dans un espace donné pourra augmenter ou diminuer sous l'effet du réchauffement climatique en fonction de la plasticité, de la capacité d'adaptation et des traits d'histoire de vie des espèces en question (Gérard et al., 2020 ; Scaven et al., 2013). L'extinction d'une seule espèce de pollinisateurs pourrait ainsi impacter tout le réseau de pollinisation en affectant les schémas de spécialisation et de fidélité des autres insectes (Gómez-Ruiz et al., 2019). Cependant, dans l'ensemble, les réseaux plantes-pollinisateurs sont reconnus comme ayant une certaine résistance aux variations de l'environnement, et cela est en particulier dû à la plasticité des pollinisateurs généralistes (Gérard et al., 2020).

Conséquences diverses du changement climatique

En addition des décalages spatiaux et temporels, le changement climatique peut également avoir un impact sur les relations morphologiques ou physiologiques existantes entre les plantes et leurs pollinisateurs (Gérard et al., 2020). En effet, une morphologie adaptée du pollinisateur est essentielle afin d'assurer l'accès aux parties sexuelles de la fleur. La morphologie de la fleur est ainsi liée au taxon des pollinisateurs qu'elle attire. Certaines relations entre plantes et pollinisateurs étant médiées par des traits morphologiques essentiels, l'impact négatif de l'augmentation de la température sur la taille des individus pourrait conduire à complexifier l'interaction (Gérard et al., 2020).

La température est un facteur essentiel au développement des plantes et des pollinisateurs. Les variations de températures peuvent créer un décalage phénologique nocif pour l'interaction mutualiste, réduisant la qualité du service écosystémique fourni

(Hoover et al., 2012). Ce décalage phénologique peut réduire la valeur adaptative du partenaire de l'interaction si les ressources fournies sont insuffisantes (Gérard et al., 2020 ; Hoover et al., 2012 ; Settele et al., 2016).

Les températures extrêmes ($> 34^{\circ}\text{C}$) peuvent aussi limiter la fertilité de la plante. Dans ces conditions, la translocation du saccharose dans la plante est altérée et impacte négativement la microsporogénèse avec une réduction de la viabilité et du nombre de grains de pollen produits (Dingley et al., 2022). Une hausse de température peut également réduire la survie des pollinisateurs, leur taille à maturité et modifier leur comportement lors de la recherche de nourriture en perturbant leur système nerveux et endocrinien (Gérard et al., 2020 ; Scaven et al., 2013). En effet, en plus des stimuli visuels émis par les plantes, les pollinisateurs nécessitent également la présence d'indices olfactifs comme les composés organiques volatiles (COV) pour se repérer dans l'espace et repérer leurs plantes hôtes. La modification de ces composés organiques volatiles liée à la hausse des températures compliquera donc l'interaction et la prise de repères par les pollinisateurs en altérant la qualité du signal perçu (*Figure 1*) (Gérard et al., 2020).

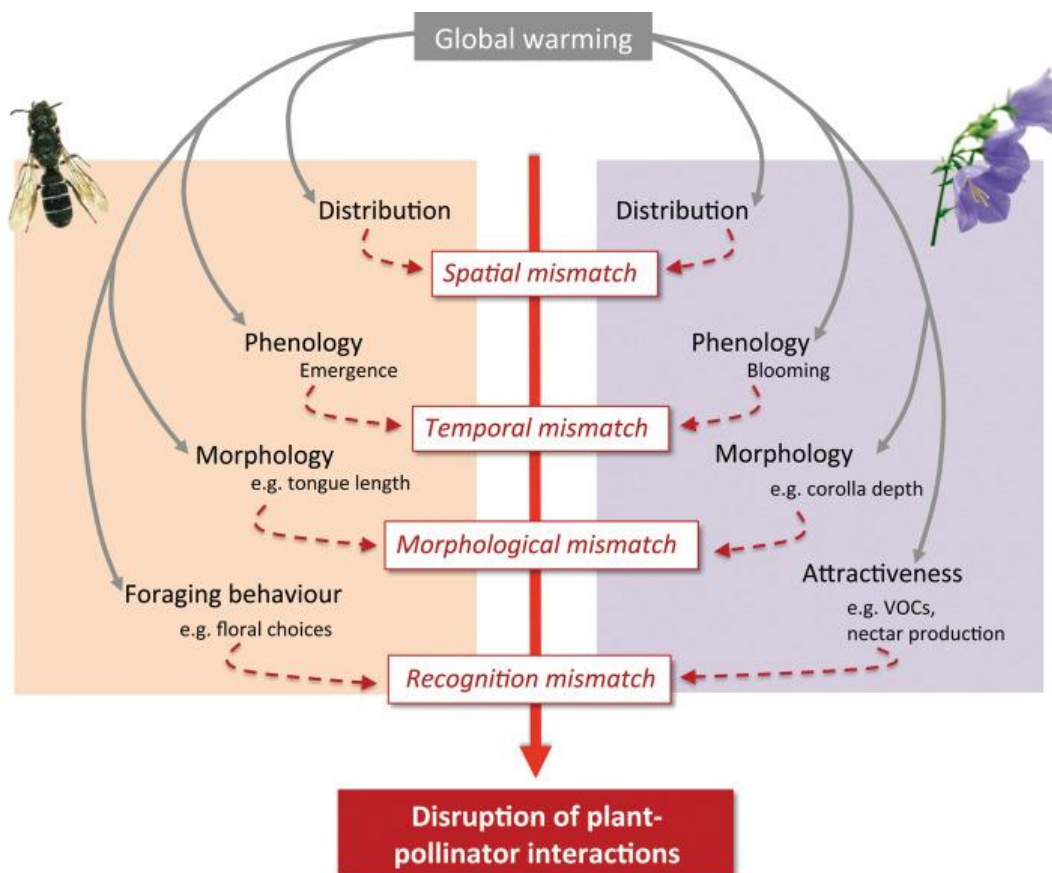


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différents impacts qu'engendrent le réchauffement climatique sur les plantes et les pollinisateurs, et donc in fine, sur leurs interactions (Gérard et al., 2020).

En plus du réchauffement climatique, la réduction des relations entre plantes et pollinisateurs est également causée par d'autres facteurs comme l'application de pesticides, la propagation d'espèces non indigènes et d'agents pathogènes ainsi qu'aux pratiques agricoles intensives qui mènent à la destruction et à la fragmentation des habitats (Burkle et al., 2011 ; Dingley et al., 2022 ; Hoover et al., 2012 ; Knight et al., 2018 ; Settele et al., 2016 ; Viana et al., 2012 ; Willmer et al., 2012). Il a ainsi été prouvé que les perturbations du paysage avaient un impact négatif sur le succès reproducteur des angiospermes et sur les environnements disponibles pour la recherche de nourriture et le cycle de vie des pollinisateurs sauvages (Bailes et al., 2015 ; Knight et al., 2018).

Avantages des espèces généralistes face aux changements climatiques

Dans la nature, alors que certaines espèces d'insectes généralistes prospèrent dans des habitats divers et variés grâce à une large tolérance environnementale, d'autres espèces spécialistes sont adaptées uniquement à certains habitats en particulier (Büchi et al., 2014). Les espèces spécialistes dominent de manière générale dans les habitats de haute qualité (Ramiadantsoa et al., 2018). L'avantage des espèces généralistes est leur capacité à ne pas être liées à la phénologie d'une seule espèce de plantes. Ceci permet aux espèces généralistes de s'adapter en cas d'extinction de celle-ci en variant de plantes hôtes en fonction du cycle de développement des dernières (Settele et al., 2016 ; Willmer et al., 2012). Les espèces généralistes ont la capacité d'être plus flexibles et de résister aux changements environnementaux grâce à leur plasticité comportementale (Doré et al., 2021 ; Gérard et al., 2020). Une réduction de la connectivité entre habitats et les changements climatiques pourraient donc conduire à une diminution des populations d'insectes, avec un risque accru pour la survie des espèces spécialistes (Settele et al., 2016). Vu la variation spatiale de la qualité de l'habitat, ce sont principalement les espèces spécialistes qui en subiront les conséquences (Ramiadantsoa et al., 2018).

La pollinisation

Définition et modes de pollinisation

La pollinisation se définit comme le transfert de pollen d'une fleur à l'autre, et est essentielle à la production de fruits et de graines (Ingram et al., 1996). Le pollen se déplace des structures reproductives mâles, les anthères, vers la structure réceptive femelle, le stigmate (Morse., 2009).

La pollinisation est assurée majoritairement par les insectes en quête de ressources florales. La pollinisation entomophile est responsable de la fécondation de 90% des angiospermes dans le monde (Ingram et al., 1996). Dans une moindre mesure, le vent et l'eau contribuent au transport du pollen (Rech et al., 2016). Ce passage préférentiel de la pollinisation par le vent ou par l'eau vers la pollinisation entomophile est un événement marquant de l'histoire évolutive des angiospermes (Gao MF et al., 2015). Des études ont montré qu'une pollinisation abiotique par le vent conduisait de manière générale à une production de fruits plus susceptibles d'avorter et de taille et qualité moindres que lors de l'intervention de pollinisateurs (Cooley et al., 2021).

Plusieurs espèces ont mis en place des mécanismes favorisant l'allogamie, c'est à dire le transport du pollen d'une plante à l'autre, ce qui nécessite un vecteur de pollinisation abiotique ou biotique (Rech et al., 2016). Cependant, certaines espèces d'angiospermes utilisent l'autogamie, lors de laquelle le pollen d'une plante va polliniser les organes femelles de la même plante, voire de la même fleur. L'autopollinisation ne nécessite pas de vecteurs de pollinisation lorsqu'elle est intraflorale (Benoit., 2021).

Lors du phénomène de pollinisation, les grains de pollen sont libérés des microsporanges présents à l'intérieur de l'anthère déhiscente par rupture mécanique une fois l'anthère mature. Ensuite, ils se déposeront sur le stigmate de la même fleur en cas d'autopollinisation, ou seront transportés par un vecteur de pollinisation (De Luca et al., 2013). Lorsque le pollen adhère au stigmate, un tube pollinique se forme et se développe jusqu'à l'ovaire, où les ovules seront fécondés pour devenir des graines (Dingley et al., 2022 ; Morse., 2009). Généralement, la fécondation aura lieu 24 à 48h après la pollinisation (Dingley et al., 2022).

Facteurs floraux affectant les pollinisateurs

Le taux de visite d'un pollinisateur, correspondant à la fréquence à laquelle il visite les fleurs d'une plante dans un certain laps de temps, dépend de nombreux facteurs en fonction de la caractérisation florale de la plante (Bauer et al., 2017). Le pattern d'un insecte peut ainsi être modulé par la coloration des éléments floraux, la taille de la fleur, la production de nectar ou encore la position des anthères et le nombre de grains de pollen produits (Bauer et al., 2017). La disposition spatiale et temporelle des fleurs dans l'exposition florale peut également affecter la fréquence de passage des pollinisateurs dans l'environnement proche (Bauer et al., 2017 ; Thompson., 2001). Les pollinisateurs doivent choisir dans leur milieu entre différentes plantes qui diffèrent toutes par leur couleur, leur motif ou encore leur parfum. Ils doivent viser les inflorescences les plus avantageuses en termes de nectar et de récompense pollinique (Bauer et al., 2017 ; Meijer et al., 2023).

Les pollinisateurs préfèrent aussi certains coloris floraux (Bauer et al., 2017). Cette coloration dépend de la composition et de la teneur en pigments de la fleur, tels que les caroténoïdes, les anthocyanes ou encore les bétalaïnes (Gao M et al., 2015). La perception de ces couleurs par les insectes varie en fonction de la réflexion spectrale de la fleur, et des photorécepteurs liés au système nerveux du pollinisateur. La majorité des hyménoptères apocrites possèdent une perception trichromatique grâce à des photorécepteurs sensibles aux UV, au bleu et au vert, qui diffèrent par leur sensibilité spectrale et qui vont leur permettre de dissocier les informations chromatiques de leur environnement (Bauer et al., 2017).

Bien que la structure de la fleur et ses caractéristiques visuelles, chimiques et nutritives soient importantes pour attirer les pollinisateurs, le parfum floral et les composés organiques volatils (COVs) restent des facteurs clés dans leur prise de décision (Klatt et al., 2013; Erickson et al., 2022). En plus d'attirer les insectes, ces COVs synthétisés et libérés par la plante permettent de se protéger face aux pathogènes, parasites et herbivores. Grâce à leur propriété lipophile et leur faible poids moléculaire, ces composés pourront facilement traverser les membranes cellulaires afin d'être libérés dans l'environnement (Dudareva et al., 2013).

Le choix des insectes de polliniser telle ou telle fleur impactera indirectement le futur d'une espèce végétale étant donné la pression de sélection établie sur les fleurs les plus attractives. Pour repérer ces indices floraux attractifs, les yeux des arthropodes sont composés de plusieurs milliers d'unités fonctionnelles nommées ommatidies (Chittka et al., 2006). Ces unités comprennent chacune une lentille et un ensemble de photorécepteurs leur permettant une résolution environ 100x plus faible que chez l'Humain. Pour la plupart des insectes, le nombre d'informations perçues par les systèmes sensoriels périphériques est tellement plus important que la capacité de traitement du cerveau, que l'individu sera obligé de porter sa concentration spécifiquement sur certains aspects de son environnement (Chittka et al., 2006).

Chez la tomate en particulier, les résultats obtenus d'HPLC (pour « High Performance Liquid Chromatography ») ou encore de RT-PCR quantitative (pour « Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ») ont prouvé que la couleur des fleurs de tomate provenait principalement de l'accumulation de caroténoïdes stockés dans les chromoplastes dont l'expression est régulée par des gènes associés à la biosynthèse des caroténoïdes (Gao M et al., 2015).

Principaux insectes pollinisateurs

En Europe, 85% des cultures bénéficient de la pollinisation animale. Cette pollinisation est assurée majoritairement par les insectes et en minorité par les mammifères, reptiles et oiseaux (Bugin et al., 2022). Les insectes pollinisateurs se retrouvent principalement dans quatre ordres majeurs : les Lépidoptères, les Coléoptères, les Hyménoptères et les Diptères (Frankie et al., 2009 ; Katumo et al., 2022).

Les pollinisateurs les plus abondants et importants sont les abeilles. Il existe 20 000 espèces d'abeilles toutes appartenant à l'ordre des Hyménoptères. Avec les bourdons, ces espèces sont essentielles pour la reproduction d'espèces sauvages et cultivées en Europe et en Amérique du Nord (Bugin et al., 2022). L'abeille est très fidèle et exige peu de ressources florales (Baijot., 2016). Cependant, les préférences alimentaires diffèrent entre les différentes espèces. Le butinage peut-être monolectique (limité à une seule espèce végétale) ou polylectique (sur diverses espèces) (Bugin et al., 2022). Le pollen est important pour le développement et la croissance des progénitures des abeilles. La diversification des sources de pollen est très utile, car les valeurs nutritives varient selon l'espèce de plante butinée (Bugin et al., 2022).

Dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, le bourdon commun, *Bombus terrestris* (L.), est généralement choisi comme pollinisateur modèle, car c'est un des visiteurs les plus communs de nombreuses cultures et fleurs sauvages (Cooley et al., 2021). En moyenne, un bourdon visite 500 plantes par jour. Il possède le meilleur rapport coût-bénéfice des pollinisateurs (Dingley et al., 2022).

En plus de ces Hyménoptères, les Syrphidae ont aussi un rôle majeur dans la pollinisation. Cette famille appartient à l'ordre des Diptères et 320 espèces sont répertoriées en Belgique. Leur régime alimentaire est composé de nectar et de pollen. Ils sont abondants dans les milieux ouverts et ensoleillés toute la durée de leur vie adulte (Baijot., 2016).

La tomate

La tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) est omniprésente dans notre alimentation. Elle est la 2^{ème} culture maraîchère mondiale la plus produite juste derrière la pomme de terre, *Solanum tuberosum* L. (Fernandes et al., 2018 ; Quinet et al., 2019). Le marché de la tomate est évalué aux alentours de 10,8 milliards de dollars (Gerszberg et al., 2015).

D'un point de vue nutritif, la tomate est intéressante pour ses apports riches en flavonoïdes, en vitamine C, en dérivés de l'acide coumarique ou encore en lycopène, reconnu comme anti-oxydant et anti-cancéreux (Beecher., 1998 ; Gerszberg et al., 2015 ; Quinet et al., 2019). De plus, une étude a montré une corrélation négative entre la consommation de tomates et les risques de maladies cardiovasculaire ou de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Dorais et al., 2008).

A côté de la tomate cultivée, il existe de nombreuses espèces de tomates sauvages. Le clade de la tomate est un groupe monophylétique ayant divergé d'un ancêtre commun il y a 2 à 2,5 millions d'années (Barnett et al., 2023). Ce clade, composé de 13 espèces congénériques, inclut la tomate cultivée, *S. lycopersicum*, ainsi que *S. pimpinellifolium* et deux espèces endémiques des îles Galápagos, *S. galapagense* et *S. cheesmaniae* dans la catégorie des espèces à « fruits rouges » à maturité (nommée de cette façon bien que les fruits puissent être de couleur orange ou jaunâtre également). Chez les espèces à « fruits verts », on retrouve *S. chilense*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum*, *S. corneliomulleri*, *S. arcanum*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chmielewskii* et *S. neorickii* (Baek et al., 2015 ; Barnett et al., 2023). Le genre *Solanum*, caractérisé par une remarquable diversité morphologique et

écologique, est abondamment présent sur le continent sud-américain (Bergounoux., 2014).

Solanum lycopersicum L.

La tomate cultivée, nommée *Solanum lycopersicum L.* pour la première fois par Carl von Linné en 1753, est l'une des espèces de tomate les plus étudiées par les scientifiques (Bergounoux., 2014). Bien que sa période et son lieu de domestication ne soient pas reconnus de manière unanime par les experts, il semblerait que les premières cultures aient été commencées par les premiers Aztèques de Mésio-Amérique en 700 après J-C (Bai et al., 2007 ; Cooley et al., 2021). Originale des Andes, la tomate est introduite au reste du monde entre le 15^{-ème} et le 16^{-ème} siècle par les colons espagnols (Bai et al., 2007 ; Bergounoux., 2014 ; Cooley et al., 2021 ; Gerszberg et al., 2015). Lors de son arrivée en Europe, le nombre limité de génotypes a causé un goulot d'étranglement génétique de l'espèce et a réduit sa variabilité génétique (Caliskan., 2012 ; Faraone et al., 2021).

Faisant partie de la famille des Solanaceae, comptant pas moins de 3000 espèces, *Solanum lycopersicum* est une excellente espèce modèle pour plusieurs raisons. Elle est principalement étudiée pour son importance agronomique, avec une production ayant augmenté de 14,1% lors du siècle écoulé (Ribeiro et al., 2021). Ensuite, le séquençage complet de son génome, ses différents marqueurs moléculaires, son court cycle de vie, sa croissance adaptable à différents milieux et son taux élevé de reproduction sont autant de facteurs qui favorise son statut d'espèce modèle (Gerszberg et al., 2015 ; Kashyap et al., 2021 ; Quinet et al., 2019 ; Saito et al., 2011).

Solanum lycopersicum possède une croissance sympodiale. Lorsque 8-12 feuilles sont formées, une première inflorescence se développe sur la tige végétative principale. Ensuite, une nouvelle inflorescence se forme toutes les trois feuilles après le développement d'une tige à partir du bourgeon axillaire de la feuille en-dessous de l'inflorescence terminale. La particularité de la croissance sympodiale est que la 1^{ère} inflorescence est rejetée sur le côté, afin de poursuivre la croissance en hauteur et que le cycle est répété de nombreuses fois (Figure 2) (Quinet et Kinet, 2007).

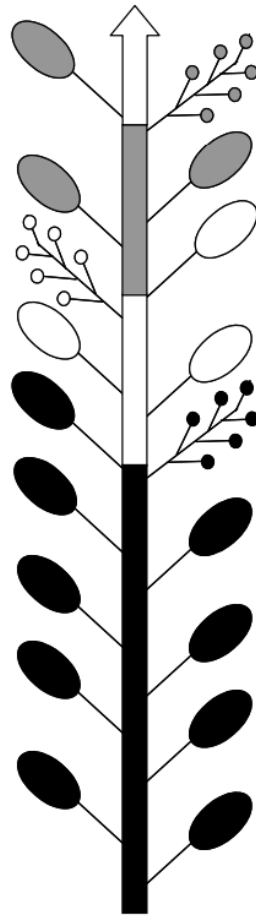


Figure 2 : Développement de la croissance sympodiale chez Solanum lycopersicum. Le segment noir représente le segment initial du méristème apical alors que les segments blanc et gris représentent les segments sympodiaux initiés par les méristèmes sympodiaux (Quinet et Kinet., 2007).

Les fleurs de la tomate sont petites (1-2cm de diamètre), hermaphrodites et actinomorphes. Elles sont constituées de 5 à 6 sépales proche de la corolle, 5 à 6 pétales, 5 à 6 anthères fusionnés par le filet en forme de cône et un pistil formé par deux à plusieurs carpelles avec un long style (Deprá et al., 2014). L'espèce est auto-compatible. Le pollen est la seule ressource florale disponible pour les pollinisateurs car il n'y a pas de production de nectar (Cooley et al., 2021 ; Deprá et al., 2014 ; Quinet et Kinet., 2007 ; Riccini et al., 2021 ; Toni et al., 2021).

Solanum chilense

Solanum chilense est une espèce sauvage originaire du désert de l'Atacama au nord du Chili. Ce désert est une des régions les plus salées et arides du monde avec des conditions favorables aux organismes extrémophiles (Blanchard-Gros et al., 2021). Au cours de l'évolution, la pubescence et un système racinaire profond ont été des adaptations nécessaires à la survie de la plante aux conditions hostiles de cet environnement (Blanchard-Gros et al., 2021).

Cette espèce est auto-incompatible et a une forte capacité de résistance aux stress biotiques et abiotiques (Gharbi et al., 2017 ; Peralta et al., 2008). Bien qu'il fasse partie du même clade de la tomate, *Solanum chilense*, parent sauvage de la tomate cultivée, ne fait pas partie du même sous-groupe et en est phylogénétiquement éloigné (Gao MF et al., 2015). Chez *Solanum chilense*, chaque inflorescence est composée de 10-12 fleurs. Cependant, son port buissonnant avec de nombreuses tiges a tendance à augmenter considérablement le nombre de fleurs produites (Peralta et al., 2008). Chaque fleur possède respectivement un calice de 5 sépales, une corolle de 5 pétales, un cône de 5 anthères et un pistil long dépassant du cône, comme on peut l'apercevoir sur la Figure 3 (Gao MF et al., 2015). L'exsertion du style est une adaptation morphologique permettant à *S.chilense* d'attirer des pollinisateurs pour la pollinisation croisée et d'accroître sa diversité génétique intraspécifique (Gao MF et al., 2015).

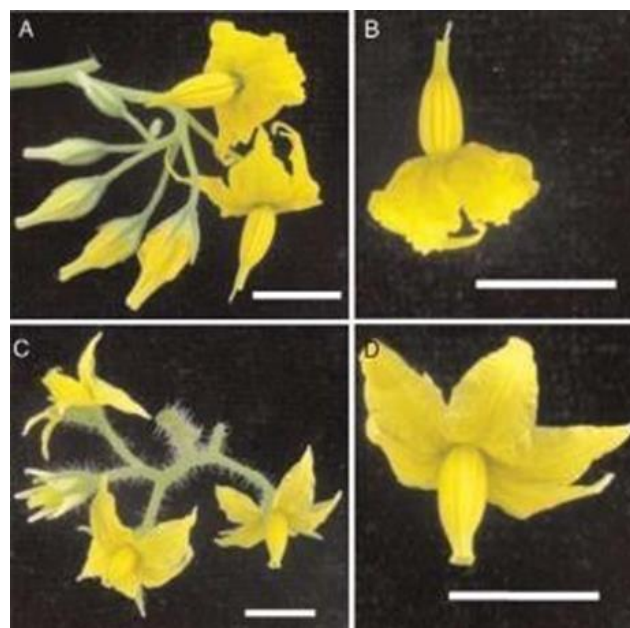


Figure 3 : Comparaison entre les inflorescences (A, C) et les fleurs (B, D) de *Solanum chilense* (A_B) et *Solanum lycopersicum* (C-D) (Gao MF et al., 2015).

Pollinisation de la tomate

Nommée pollinisation vibratile ou « buzz pollination » en anglais, la pollinisation de la fleur de la tomate par les insectes implique des vibrations physiques et acoustiques (De Luca et al., 2013 ; Toni et al., 2021 ; Vallejo-Marín., 2019). Ce comportement typique des abeilles et des bourdons est utilisé sur une large gamme d'angiospermes (Dingley et al., 2022 ; Vallejo-Marín., 2019). Lors de la visite, le pollinisateur se pose sur la fleur en enroulant la face ventrale de son corps au niveau des anthères de la fleur tout en saisissant la base avec ses mandibules. En contractant rapidement ses muscles thoraciques, les vibrations résultantes de cette position conduisent à la libération des grains de pollen (De Luca et al., 2013). Chez la plupart des fleurs poricides, dont les grains de pollen sont enfermés dans des anthères, le pollen est l'unique récompense offerte aux visiteurs (Delgado et al., 2023 ; Vallejo-Marín., 2022). Durant leur évolution, les tomates ont acquis des adaptations en matière de restriction du pollen pour être en adéquation avec les pollinisateurs visés et ainsi maximiser les chances de réussite de la fécondation (Dingley et al., 2022).

Plus de 20 000 espèces présentes dans différentes familles ont évolué avec un développement important de leurs structures tubulaires pour maintenir les grains de pollen enfermés à l'intérieur de la fleur (Vallejo-Marín., 2022). Les anthères de la tomate nécessitent une vibration par les pollinisateurs pour donner une inertie aux grains de pollen à l'intérieur du locule et faciliter leur sortie par le pore apical en surmontant les forces d'adhésion. Le mécanisme d'extraction des grains de pollen résulterait d'une combinaison de forces centrifuges, cinétiques et électrostatiques. Le résonnement des vibrations dans l'anthère par le pollinisateur transmettrait de l'énergie cinétique aux grains de pollen permettant une éjection de l'anthère par collisions élastiques (Dingley et al., 2022 ; Vallejo-Marín., 2019). Une fois éjectés, les grains de pollen sont emportés jusqu'à la ruche ou transportés jusqu'au stigmate d'une autre fleur pour initier la fécondation (De Luca et al., 2013).

Des stimulations vibratoires optimales sont un des critères de sélection des pollinisateurs de la tomate cultivée. Que ce soit dans un contexte de communication, de défense ou de recueil de grains de pollen, les abeilles produisent des vibrations qui sont générées par la contraction des muscles thoraciques de l'animal. Ces muscles sont responsables de la puissance nécessaire au battement des ailes et à la production de tous les autres types de bourdonnement (Vallejo-Marín., 2019 ; Vallejo-Marín M., 2022).

Les barrières de reproduction

Le genre *Solanum* présente divers systèmes de reproduction qui conduisent à des barrières de reproduction interspécifiques complexes maintenant l'isolation spécifique (Baek et al., 2016 ; Bedinger et al., 2011). Les barrières reproductives peuvent se marquer soit avant soit après la pollinisation. De plus, les barrières post-pollinisation peuvent encore être divisées en barrières pré- ou postzygotiques (Baek et al., 2016).

Les barrières pré-pollinisation concernent les isolements géographiques, la morphologie des fleurs, la période de floraison ou encore les préférences florales du pollinisateur liées à la couleur ou à l'odeur qui peuvent conduire à l'impossibilité du phénomène de pollinisation (Baek et al., 2016 ; Broz et al., 2021). Le système de reproduction peut être considéré comme une barrière pré-pollinisation en fonction des traits floraux mais également comme barrière post-pollinisation suivant les interactions pollen-pistil. Lors de ces interactions, le gamétophyte mâle rencontre différentes barrières constituant les trois composantes du pistil : le stigmate, le style et l'ovaire. Il s'agit dans ce cas de barrières post-pollinisation mais prézygotiques. Sur le stigmate, les papilles stigmatiques bloquent la pénétration des tubes polliniques hétérospécifiques (Broz et al., 2021). Lors du rejet du pollen par le stigmate, l'hydratation du pollen et la croissance du tube pollinique sont inhibés à cause de la mauvaise adhésion entre les deux organes (Baek et al., 2016 ; Tonosaki et al., 2016). Le rejet est soit actif soit passif par absence d'interactions entre les facteurs du pollen et le pistil lors de divergence génétique (Broz et al., 2021). Dans le style, la croissance du tube pollinique peut être inhibée par production d'enzymes modifiant la paroi cellulaire ainsi que par la présence de cytotoxines (Broz et al., 2021).

Concernant les barrières postzygotiques, elles agissent au moment du développement et de la germination des graines et peuvent induire la stérilité de la descendance. En effet, après germination du pollen et fécondation effectuée, les barrières post-zygotiques peuvent mener à un avortement de l'embryon ou à une croissance anormale de l'endosperme. Mais si formation d'un hybride il y a, sa stérilité est probable lors des incompatibilités génétiques ou cytonucléaires entre les deux parents (Baek et al., 2016 ; Broz et al., 2021 ; Tonosaki et al., 2016).

Enfin, malgré les nombreuses exceptions, les barrières prézygotiques ont tendance à être plus fortes que les barrières postzygotiques (Broz et al., 2021). Etant donné qu'elles agissent plus tôt, elles ont un rôle plus important à jouer dans la limitation des flux de gènes entre espèces étroitement apparentées (Broz et al., 2021 ; Jewell et al., 2020). Dans le clade de la tomate, les espèces sauvages présentent une variété de systèmes de reproduction, pouvant aller de l'auto-compatibilité totale à l'auto-compatibilité facultative jusqu'à l'auto-incompatibilité (Baek et al., 2016 ; Shang et al., 2021). Cette auto-incompatibilité retrouvée chez certaines espèces est elle-même considérée comme une barrière de reproduction et peut mener à un isolement reproductif lors du croisement avec une espèce auto-compatible, conduisant à ce que l'on nomme l'incompatibilité unilatérale (Baek et al., 2016).

L'auto-incompatibilité (AI)

L'auto-incompatibilité (AI) se définit comme l'incapacité de certaines espèces à produire un zygote après auto-pollinisation (Moreels et al., 2023). Cette barrière prézygotique est un mécanisme largement répandu chez les Angiospermes afin de conserver une certaine diversité génétique. La transition de l'auto-incompatibilité vers l'auto-compatibilité au cours de l'évolution est généralement considérée comme étant irréversible (Chen et al., 2007 ; Fujii et al., 2016 ; Markova et al., 2017 ; Tovar-Méndez et al., 2014 ; Zhao et al., 2022). Dans le règne végétal, le phénomène d'auto-incompatibilité peut être d'ordre gamétophytique ou sporophytique. L'auto-incompatibilité est dite sporophytique lorsque c'est le génotype du tissu diploïde donneur qui va déterminer la S-spécificité du pollen. Le pollen est rejeté lorsqu'un tube pollinique haploïde portera un S-haplotype correspondant à l'un des S-haplotypes du pistil (Igic et al., 2007 ; Jewell et al., 2020 ; Moreels et al., 2023). Cela signifie que si la plante d'où provient le pollen possède un S-allèle en commun avec la plante réceptrice, le pollen sera rejeté (Moreels et al., 2023). Dans le cas d'une auto-incompatibilité gamétophytique, c'est le génotype haploïde du grain de pollen qui détermine s'il y a rejet ou non (Moreels et al., 2023).

Dans le genre *Solanum* l'auto-incompatibilité est d'ordre gamétophytique et est déterminée et contrôlée par un S-locus hautement polyallélique responsable de la reconnaissance du soi ou du non-soi (Broz et al. 2021, Jewell et al., 2020, Moreels et al., 2023). Ce S-locus code pour un déterminant femelle, la S-RNase, une glycoprotéine à activité ribonucléase, et pour plusieurs déterminants mâles, les protéines F-box

(Bergougnoux et al., 2014 ; Fujii et al., 2016 ; Markova et al., 2017). Ces protéines F-Box font partie des ubiquitines E3 ligases de type SCF (Skp1-Cullin1-F-box) qui vont cibler spécifiquement des protéines pour qu'elles soient dégradées par le protéasome 26S (Markova et al., 2017). Lors d'un croisement incompatible, les S-RNases produites dans le style rentreront dans le tube pollinique et arrêteront sa croissance suite à leur activité ribonucléase tandis que lors d'un croisement compatible, les S-RNases seront reconnues à l'intérieur du tube pollinique par les protéines F-box, ce qui mènera à leur dégradation par le protéasome et la croissance du tube pollinique pourra continuer (Figure 4) (Igic et al., 2008 ; Moreels et al., 2023).

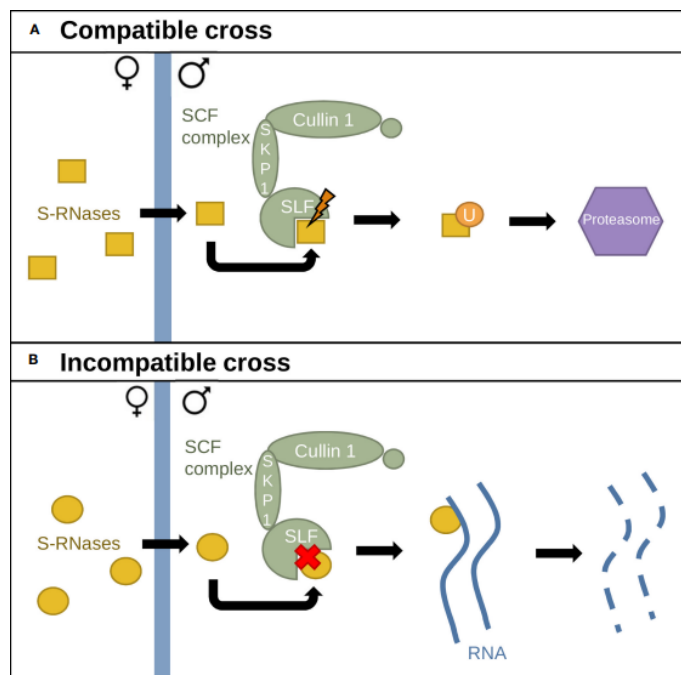


Figure 4 : Modèle représentant la reconnaissance du non-soi. Lors d'un croisement compatible, les S-RNases vont rentrer dans le tube pollinique pour être reconnues et ubiquitinées par le complexe SCF avant d'être dégradées par le protéasome 26S (A). Dans le cas d'un croisement incompatible, la présence de S-allèles identiques va conduire à une absence de reconnaissance entre la protéine SLF du complexe SCF et les S-RNases, qui vont ensuite dégrader l'ARN du pollen (B) (Moreels et al., 2023).

La perte de l'auto-incompatibilité dans le clade de la tomate est associée à des mutations au niveau du S-locus produisant des S-RNases non fonctionnelles ainsi qu'à la perte de fonction des protéines HT (Jewell et al., 2020). En effet, la tomate cultivée, *S. lycopersicum*, est devenue auto-compatible suite à des mutations conduisant à la perte de fonction de ses gènes *S-RNase*, *HT-A* et *HT-B*. Les protéines HT-A et HT-B ne sont pas codées par le S-locus et sont des protéines du style intervenant dans l'auto-incompatibilité mais dont le rôle exact reste méconnu (Broz et al., 2021 ; Leclef., 2021 ; Moreels et al., 2023 ; Tonosaki et al., 2016).

Concernant les fleurs allogames chez la tomate, celles-ci sont caractérisées par une exsertion du style afin de faciliter l'apport de pollen venant des fleurs voisines (Pan et al., 2017). Cinq gènes étroitement liés ont ainsi été découverts par les scientifiques comme essentiels dans ce mécanisme : le gène « *STYLE 2.1* » est responsable du contrôle de la longueur du style ; trois d'entre eux sont impliqués dans le contrôle de la longueur des étamines (« *STAMEN 2.1* », « *STAMEN 2.2* » et « *STAMEN 2.3* ») ; le dernier gène affecte l'architecture des étamines, « *DEHISCENCE 2.1* ». En régulant l'élongation des cellules du pistil, le gène « *STYLE 2.1* » est donc le principal responsable de l'exsertion du style qui a conduit au cours de l'évolution à la transition des fleurs allogames vers les fleurs autogames (Chen et al., 2007 ; Pan et al., 2017). Ces cinq gènes ont pu être localisés au niveau du locus de caractères quantitatifs (LCQ) « *SE 2.1* » (pour « *Stigma Exsertion 2.1* ») sur le chromosome 2 (Benoit., 2021 ; Chen et al., 2007 ; Pan et al., 2017 ; Vosters et al., 2014). Cependant, plus récemment, les scientifiques ont découvert l'importance d'un autre gène nommé « *SE 3.1* » (pour « *Stigma Exsertion 3.1* ») et impliqué dans la régulation de l'exsertion du stigmate. Ainsi, il a été prouvé qu'aussi bien « *SE 3.1* » que « *STYLE 2.1* » contribuent à la transition de l'exsertion du stigmate vers son insertion. Il semblerait que « *STYLE 2.1* » soit le gène responsable du contrôle de la première étape de la conversion du stigmate exserté vers le stade « flush » (correspondant au stade intermédiaire) alors que « *SE 3.1* » régule la seconde lors du passage d'un stigmate au stade « flush » vers son insertion (*Figure 5*) (Shang et al., 2021).



Figure 5 : Exemple d'insertion du stigmate chez *S. lycopersicum* (A) et d'exsertion du stigmate en dehors du cône d'anthers chez *S. habrochaites* (B) (Vosters et al., 2014).

La transition de la pollinisation croisée à l'auto-pollinisation au cours de l'histoire s'explique donc en partie par une mutation au niveau du promoteur du gène « *STYLE 2.1* », qui a conduit à une régulation négative de son expression durant le développement floral (Chen et al., 2007). Cette transition s'expliquerait par une délétion de 450 pb au niveau de la séquence promotrice de « *STYLE 2.1* » (Chen et al., 2007 ; Shang et al., 2021). Selon diverses études menées, la perte de l'auto-incompatibilité serait survenue en premier au cours de l'histoire, suivie par la perte de l'exsertion du stigmate (Chen et al., 2007 ; Wu et al., 2024). En effet, l'ordre inverse aurait conduit les plantes à une incapacité de réaliser aussi bien la reproduction croisée que l'auto-pollinisation, ce qui aurait entraîné un désavantage sélectif. L'étude de l'arbre phylogénétique du clade de la tomate confirme également cette théorie avec l'auto-incompatibilité qui aurait été perdue au niveau de la branche des espèces auto-compatibles, alors que l'allèle codant pour un style court (récessif par rapport à l'allèle codant pour un style long) serait apparu plus tard au niveau de la branche menant à la tomate cultivée, *S. lycopersicum* (Chen et al., 2007).

L'incompatibilité unilatérale (IU)

L'incompatibilité unilatérale (IU) est une barrière prézygotique interspécifique fréquente dans les familles telles que les Brassicaceae ou les Solanaceae où le pollen d'une espèce est rejeté par le pistil d'une autre espèce tandis que le croisement contraire est autorisé (Baek et al., 2016 ; Bedinger et al., 2011 ; Jewell et al., 2020 ; Moreels et al., 2023). Ce phénomène suit de manière générale la règle « SI X SC » (en français AI X AC). Ce qui signifie que les espèces génétiquement auto-incompatibles (AI) vont rejeter le pollen des espèces auto-compatibles (AC) (*Figures 6 et 7*) (Baek et al., 2015). Dans le clade de la tomate, il a été démontré que les espèces à fruits rouges étaient auto-compatibles alors que celles à fruits verts montraient généralement de l'auto-incompatibilité, bien que *S. chmielewskii* et *S. neorickii* soient auto-compatibles. *S. chmielewskii* et *S. neorickii* sont deux espèces faisant partie du sous-groupe Arcanum, phylogénétiquement très proche du sous-groupe Esculentum comprenant les autres espèces auto-compatibles, mais à fruits rouges (Baek et al., 2015). Le croisement doit donc se faire de telle manière que ce soit l'espèce à fruits rouges qui soit utilisée comme parent femelle, et non l'inverse (Moreels et al., 2023). Dans le cas précis de notre sujet d'étude, cela implique que l'hybridation entre *S. lycopersicum* (AC) et *S. chilense* (AI) pourra uniquement se dérouler lorsque

l'individu de l'espèce auto-compatible, dépourvu de S-RNases et de protéines HT fonctionnelles est utilisé comme parent femelle : *S. lycopersicum* X *S. chilense* (Bigot et al., 2023 ; Moreels et al., 2023).

Female	Male									
	<i>S. lyc</i>	<i>S. pim</i>	<i>S. che</i>	<i>S. neo</i>	<i>S. chm</i>	<i>S. hab g</i>	<i>S. hab</i>	<i>S. pen</i>	<i>S. chi</i>	<i>S. per</i>
<i>S. lyc</i>	SC	C	C	C	C	C	C	C	C*	C*
<i>S. pim</i>	C	SC	C	C	C	C	C	C	F	F
<i>S. che</i>	C	C	SC	C	C	C	C	C	F	F
<i>S. neo</i>	I	I	I	SC	C	C	C	C	F	F
<i>S. chm</i>	I	I	I	C	SC	I	I	I	F	F
<i>S. hab</i>	I	I	I	I	I	I	SI/SC	C	F	F
<i>S. pen</i>	I	I	I	I	I	I	I	SI/SC	I	I
<i>S. chi</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	SI	var
<i>S. per</i>	I	I	I	I	I	I	I	var	var	SI/SC

Figure 6 : Représentation des possibilités de croisement au sein du clade des tomates. Pour la légende : *S. lyc*, *S. lycopersicum*; *S. pim*, *S. pimpinellifolium*; *S. che*, *S. cheesmaniae*; *S. neo*, *S. neorickii*; *S. chm*, *S. chmielewskii*; *S. hab*, *S. habrochaetes*; *S. pen*, *S. pennellii*; *S. chi*, *S. chilense*; *S. per*, *S. peruvianum*. Ensuite, SC = « self-compatible », SI = « self-incompatible », C = « successful cross », I = « unsuccessful cross », C* = « embryo rescue needed », F = « fruit with no viable seed », var = « variable » (Bedinger et al., 2011).

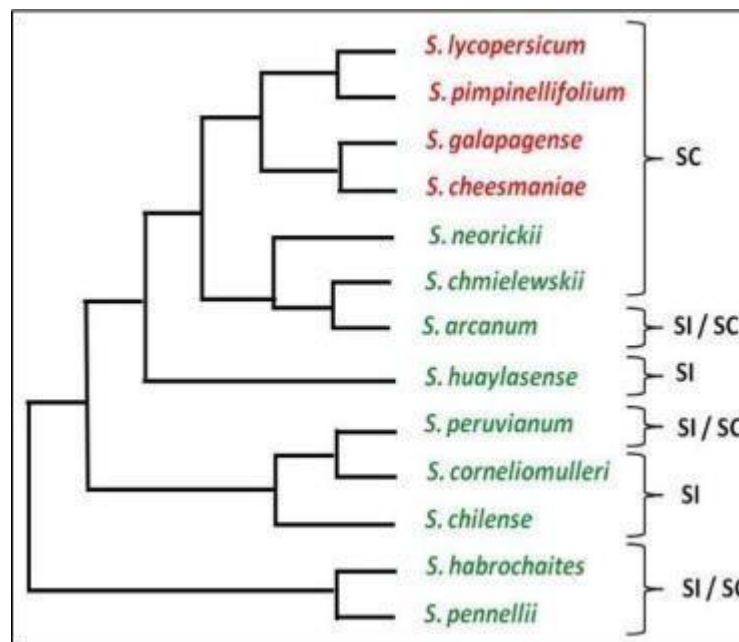


Figure 7 : Arbre phylogénétique des espèces du clade des tomates. La coloration rouge représente les espèces produisant des fruits de couleur rouge/orange alors que la couleur verte indique les espèces à fruits vert. SC = « Self-compatible », SI = « Self-incompatible » (Bedinger et al., 2011).

Matériel & Méthodes

Matériel végétal

Lors de cette étude, deux espèces végétales ont été utilisées dans un premier temps pour la formation des croisements. D'un côté, la tomate cultivée (*S. lycopersicum*, cv. Ailsa Craig, TGRC, accession LA2838A), de l'autre, son espèce parente halophyte *S. chilense* (TGRC, accession LA4107). Les graines de *S. chilense* et *S. lycopersicum* ont été fournies par le TGRC (Tomato Genetics Ressource Center, UC Davis, CA, USA) et multipliées au laboratoire.

Le croisement *S. lycopersicum* X *S. chilense* a permis l'obtention d'hybrides de 1^{ère} génération (F1). Un croisement manuel a été réalisé par dépôt de pollen d'une plante de *S. chilense* (appelée SC2) sur le stigmate de fleurs de plantes de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig préalablement émasculées avant l'anthèse de la fleur. C'est donc une même plante (SC2) qui a permis la formation de tous les hybrides.

Une plante hybride de 1^{ère} génération a ensuite été croisée avec chacun des parents dans le but d'obtenir des backcross SC2 (*hybride* X *S. chilense* SC2) et des backcross AC (*S. lycopersicum* cv. *Ailsa Craig* X *hybride*). La plante hybride a été utilisée comme parent femelle dans le croisement avec SC2 et comme parent mâle dans le croisement avec Ailsa Craig afin de respecter les règles de l'IU. Comme mentionné précédemment, les fleurs utilisées comme parent femelle ont préalablement été émasculées et le pollen du parent mâle a été déposé à l'aide d'une aiguille montée sur le stigmate des fleurs du parent femelle.

Finalement, des hybrides de 2^e génération (F2) ont été obtenus par croisement de deux hybrides de 1^{ère} génération compatibles (ayant des S-allèles différents) étant donné l'auto-incompatibilité des hybrides de 1^{ère} génération. Les mêmes parents F1 ont été utilisés pour l'obtention des hybrides F2 et les croisements ont été réalisés comme décrit précédemment.

Ces différents croisements ont été réalisés avant le début de mon mémoire et j'ai utilisé les graines obtenues dans le cadre de ce travail. La pulpe des fruits a été enlevée et a été mélangée avec une solution de Na₂CO₃ 10% sous agitation afin de détacher les graines de la pulpe. Ces dernières ont été rincées à l'eau puis séchées et stockées. Les différents groupes de plantes (*S. chilense*, *S. lycopersicum*, backcross SC2, backcross AC, hybrides F2) seront mentionnés comme différents

« génotypes » dans la suite de ce travail par facilité même si nous sommes bien conscients qu'il ne s'agit pas de génotypes différents à proprement parler et qu'une variabilité génétique existe au sein de chaque groupe.

Conditions de culture

Germination

La culture a débuté le 23 février 2023 par la germination des différentes graines sélectionnées. Deux modalités de semis ont été utilisées : 1) une germination en boîtes de Petri dans la chambre de culture du GRPV (Groupe de Recherche en Physiologie Végétale), 2) une germination en terreau en terrine de semis dans une logette des serres de Louvain-la-Neuve.

La germination des graines en boîte de Petri a uniquement été utilisée pour les backcross et les hybrides F2 afin de s'assurer de leur germination et faciliter l'observation de leur développement (*Annexe S1*). La préparation des boîtes de Petri s'est réalisée sous hotte à flux laminaire afin de limiter la contamination. Après avoir placé deux filtres au fond de la boîte dans le but de maintenir une certaine humidité, 6 à 7 mL d'H₂O distillée ont été ajoutés avant de venir y placer nos graines à des distances suffisamment éloignées que pour limiter l'entremêlement des racines par la suite. Finalement, les boîtes ont été refermées à l'aide de parafilm jusqu'à germination de la graine. Une fois les graines germées après deux semaines environ, elles ont été repiquées en serres au fur et à mesure de leur rythme de germination afin de poursuivre leur développement.

Pour les graines de *S.chilense* et de *S.lycopersicum*, la germination s'est déroulée de manière classique en terreau étant donné que ces graines avaient bien germé de cette façon par le passé. Les graines ont été semées en terrines de semis dans du terreau pour semis contenant de la perlite, facilitant le drainage de la terre (*Annexe S1*), suivi d'un arrosage conséquent et de la mise en place d'une plaque en verre juste au-dessus pour éviter l'évaporation de l'eau. Les semis ont ensuite été placés dans une logette des serres de Louvain-la-Neuve.

Le *Tableau 1* reprend le nombre de graines semées et le taux de germination. Un minimum de 10 graines ont été semées par génotype quand le stock le permettait.

Génotype	Nombre initial de graines	Conditions de germination	Taux de germination	Nombre de plantes repotées
<i>S.lycopersicum</i>	15	Serres de LLN	100%	15
<i>S.chilense</i>	12	Serres de LLN	50%	6
Hybride F2	7	Boîte de Petri	71,4%	5
Backcross SC2	10	Boîte de Petri	30%	3

Tableau 1 : Résumé du matériel végétal à disposition.

Repiquage et croissance des plantes

Quinze jours après la germination des graines, un premier repiquage des plantules a été réalisé en pots de 7 cm de côté dans du terreau à raison d'une plante par pot. Quinze jours plus tard, un deuxième repiquage a été réalisé en pots de 1,5L dans le même terreau. Les plantes ont été arrosées 3 fois par semaine.

Les plantes ont été cultivées dans une logette tempérée des serres de Louvain-la-Neuve à une température moyenne de 22,6°C le jour et de 20,8°C la nuit (en tenant compte des horaires classiques de nuit, ce qui correspond à 21h-6h). Ces mesures des conditions dans les serres ont été prises entre la date du 23 février 2023, date de la mise en place des graines dans une logette, et celle du 20 juin 2023, date de la sortie des plantes. Concernant l'humidité relative moyenne présente dans la logette, elle fut de 61,01%. La photopériode était de 16h.

Biologie moléculaire : confirmation des génotypes et identification des S-allèles

Afin de vérifier le profil génétique de chaque plante, une extraction d'ADN à partir d'une foliole de chacune a été réalisée en utilisant le protocole de Fulton et al. (1995). Chaque foliole a été placée dans de l'aluminium, plongée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C. Après broyage sous azote liquide, chaque broyat a été transféré dans un tube Eppendorf de 2mL et 750µL de tampon d'extraction ont été ajoutés afin de lyser les cellules. Le tampon d'extraction était composé de 0,35 mol/L de sorbitol, 0,1 mol/L de tris base et 5 mmol/L de EDTA-Na₂. Après 30 minutes d'incubation à 60°C, 750 µL d'un mélange chloroforme : alcool isoamylique (24 :1) ont été ajoutés par eppendorf afin de récupérer la phase aqueuse après mélange et centrifugation 5 minutes à 10000 rpm. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube et 750 µL d'isopropanol ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN. Après centrifugation 5 minutes à 10000rpm, lavage du culot à

l'éthanol 70% et séchage du culot, l'ADN a été dissout dans 50 µL d'eau DEPC. La quantité et la qualité de l'ADN obtenu ont été vérifiées au nanodrop.

L'ADN ainsi obtenu a servi d'une part à vérifier le génotype des plantes en utilisant des marqueurs génétiques donnant des profils différents pour *S. lycopersicum* et *S. chilense* (Gharbi., 2017) et d'autre part pour identifier les S-allèles des hybrides de 2^e génération.

Pour vérifier le génotype des plantes, 4 marqueurs génétiques de type CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) ont été utilisés : C2_AT4G04955, C2_AT1G28530, C2_AT3G08760 et T0386A (*Tableau 2*). Pour la réalisation de la PCR, un mix à base de 868,75 µL d'eau stérile, de 250µL de tampon 5X Green GoTaq Reaction Buffer-Promega, de 25 µL de Primer Forward (10µM) et de 25µL de Primer Reverse (10µM) dilués respectivement 10X au préalable ainsi que 25µL de dNTP (5mM) et 6,25µL de GoTag polymérase a été réalisé. Dans chaque tube Eppendorf, 48µL de ce mix ont été versés et 2 µL d'ADN dilué 10x ont été ajoutés. Un témoin négatif contenant uniquement les 48µL du mix mais pas d'ADN a été créé afin de vérifier l'absence de contamination. L'ADN des parents *S. lycopersicum* et *S. chilense* a été utilisé comme témoins positifs afin de les comparer aux bandes obtenues pour les autres plantes. Les cycles de PCR consistaient en un cycle à 94°C pendant 3min, 35 cycles comprenant une étape à 94°C pendant 30 sec, une étape à 60°C pendant 30 sec, une étape à 72°C pendant 45 sec avant un dernier cycle à 72°C pendant 7 min. Après la PCR, des digestions enzymatiques ont été réalisées. Pour ce faire, 0,25 µL d'enzyme de restriction (Hinf1, Dra1, ou Alu1), 2,5 µL de tampon correspondant et 2,25 µL d'H2O Milli-Q ont été ajoutés à 20µL de produit PCR puis incubés à 37°C pendant la nuit. Les produits de restriction ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5%. Quatre PCR ont ainsi été réalisées en testant quatre primers différents et des enzymes de restriction spécifiques (PCR_1 : C2_AT4G04955 et Hinf1, PCR_2 : C2_AT1G28530 et Dra1, PCR_3 : C2_AT3G08760 et Alu1, PCR_4 : T0386A et Hinf1). À noter qu'uniquement les deux PCR avec l'enzyme de restriction Hinf1 (PCR_1 et PCR_4) seront présentées dans la section des résultats étant donné de potentiels problèmes lors de la digestion enzymatique avec les autres enzymes de restriction.

Marqueur	Primer F	Primer R	T° d'hybridation	Enzyme de restriction
C2_AT4G04955	TTGCTGTGGGGAAC CAAGCAGATATAG	TCCCAGAGAGTCTT GATCCCATGTATGC	60°C	Hinf1
C2_AT1G28530	ATTATGAAGATGTCT ATACACTTCCCTAC	AGAGATTGCTTTTGA CATAGAAATGCTT	60°C	Dra1
C2_AT3G08760	TCTCCAGAACGTTG TGTGTCAGAAGG	TCCTCATGTAGAAAT GTAAGACCTTG	60°C	Alu1
T0386A	ATGCTGATGAAAGAT TGGGCGCTG	TTAGGCTTTGGCTT CTCGACCACT	60°C	Hinf1

Tableau 2 : Marqueurs génétiques utilisés.

Afin de vérifier les S-allèles présents chez nos plantes hybrides F2 et backcross SC2, deux PCR ont été réalisées à partir de deux paires de primers dessinées sur les deux S-allèles (S10 et S16) présents chez le parent *S. chilense* et les hybrides F1 (Tableau 3). Un mix comprenant les mêmes proportions de produits que pour la PCR de vérification des génotypes a été réalisé. 48 µL de mix et 2 µL d'ADN ont été ajoutés dans des eppendorfs. De l'ADN de *S. chilense* et *S. lycopersicum* a été utilisé comme témoin positif et de l'eau comme témoin négatif. Les cycles PCR étaient les même que ceux détaillés précédemment, excepté la deuxième étape, qui s'est déroulée à 56° et non 60°.

S-allèle	Primer F	Primer R	Temperature d'hybridation
S10	GACCTTTTGACAACTCTCCGG	CCCGATGCAACAAAGGTGAT	56°C
S16	ACGCAATCATGACCGTTACG	TGCTTTCAATTGACCTCGGC	56°C

Tableau 3 : Primers utilisés dans la PCR de vérification des S-allèles.

Mesures morphologiques : comparaison des différents génotypes

Les 10 et 24 mai 2023, différents critères morphologiques ont été mesurés sur l'ensemble des plantes (maximum 10 plantes par génotype).

Croissance végétative et reproductive

En ce qui concerne l'aspect végétatif des plantes, le nombre de feuilles sur la tige principale et sur les ramifications (et le nombre de feuilles total), le nombre de ramifications et la taille des ramifications ont été relevés pour chaque plante.

Pour la croissance reproductive des plantes, le nombre d'inflorescences sur la tige principale et sur les ramifications (et le nombre d'inflorescences total), ainsi que le nombre de fleurs par inflorescence ont été calculés pour chaque plante.

Morphologie des organes floraux

Afin d'étudier la superficie et la longueur des différents organes floraux, le logiciel Fiji a été utilisé (Version Java 1.8.0_322 (64-bit)). Au préalable, trois fleurs par plante ont été prélevées au stade anthèse afin de les disséquer. Les fleurs ont été délicatement séparées en sépales, pétales, étamines, styles, et ovaires puis collées sur une feuille (*Figure 8*). En plus de la superficie des différents organes, la longueur des étamines et du style a également été mesurée afin d'étudier ultérieurement une potentielle exsertion du style.



Figure 8 : Photographie de la dissection des fleurs en sépales, pétales, étamines, styles et ovaires chez la plante backcross SC2-2.

Après avoir ajouté une échelle grâce à une règle placée, notre feuille composée des différentes fleurs disséquées a été scannée avant que l'image ne soit ouverte sur le logiciel Fiji. L'image a ensuite été convertie en 8-bit avant d'établir l'échelle en zoomant sur la règle et en y traçant une ligne de 1cm. Une fois la ligne tracée, les onglets « analyze », « set scale », et « know distance » à la suite ont permis d'insérer la valeur de notre ligne dessinée ainsi que l'unité de mesure utilisée. Les sections de l'image dont on veut connaître l'aire ont ensuite été sélectionnées jusqu'à la formation d'une fenêtre séparée avec les valeurs finales. La même méthodologie a été utilisée pour connaître la longueur des étamines et du style.

Réceptivité stigmatique

La réceptivité stigmatique a également été analysée. Pour ce faire, 10 fleurs en anthèse par génotype ont été prélevées et les stigmates ont été immergés durant 5min dans une solution composée de 12,5mg de 3-amino-9-ethylcarbazole dilué dans 1mL de N-N-diméthylformamide auxquels on a ajouté 25mL de tampon acétate, 16,5mg de CaCl_2 et 0,125mL d' H_2O_2 à 3%. La coloration brune des stigmates observée après 5min signifie que les stigmates étaient bel et bien réceptifs (*Figure 9*). Une coloration atténuée des stigmates aurait signifié une réceptivité amoindrie.

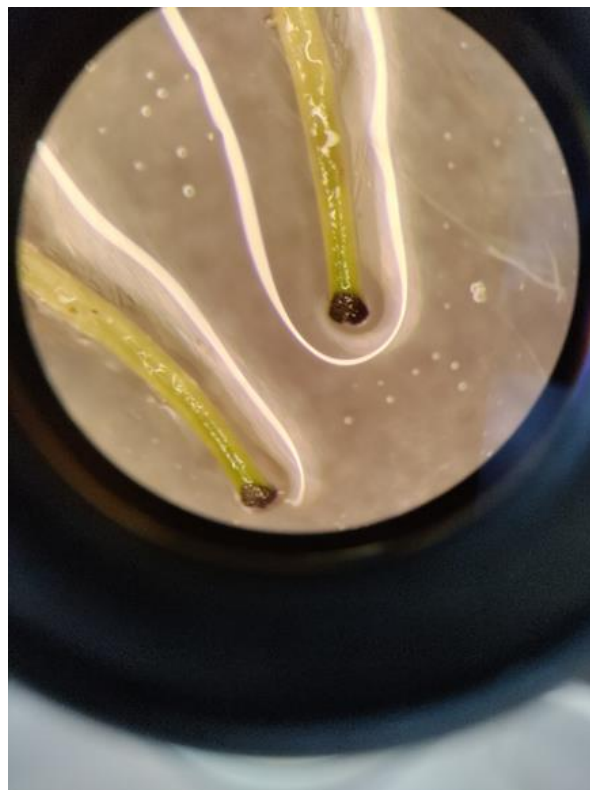


Figure 9 : Observation au microscope d'une coloration brunâtre/noire du stigmate signifiant l'existence d'une réceptivité stigmatique.

Comptage du nombre de grains de pollen

Afin de pouvoir compter le nombre de grains de pollen par anthère, 3 fleurs par plante ont été récupérées au stade J15-16 de Brukhin (Brukhin et al., 2003), c'est-à-dire juste avant l'anthèse, lorsque le bouton floral est encore vert. Ces fleurs ont ensuite été conservées dans des tubes Falcon contenant une solution FAA (*Tableau 4*).

Réactifs	Volumes
Formaldéhyde	5 mL
Acide acétique	5 mL
Ethanol à 70%	90 mL

Tableau 4 : Composition du FAA (Formalin Acid Alcohol) pour 100mL de solution.

Une fois prélevées de la solution de FAA, les fleurs ont été placées sous microscope afin de pouvoir accéder aux étamines. Deux étamines par fleur ont ensuite été placées dans un tube Eppendorf de 1,5mL et 40µL de colorant Alexander y a été ajouté (*Tableau 5*).

Réactifs	Quantité
Alcool à 95%	10 mL
Vert de malachite	10 mg
Eau distillée	50 mL
Glycérol	25 mL
Phénol	5 mg
Chloral hydraté	5 mg
Acide fuschine	50 mg
Orange G	5 mg
Acide acétique glacial	2 mL

Tableau 5 : Composition du colorant Alexander pour 100 mL de solution.

Le scalpel a ensuite permis d'ouvrir les sacs polliniques pour la propagation des grains de pollen dans la solution. Après utilisation du vortex afin d'éviter les agglomérats, 10µl de la solution ont été déposés de chaque côté d'une lame porte-objet avant d'être recouverte d'une lame couvre-objet. Après observation au microscope Reichert Polyvar au grossissement 40 X, 9 photos ont été prises par lame (donc 18 photos par fleur) (*Figure 10*).

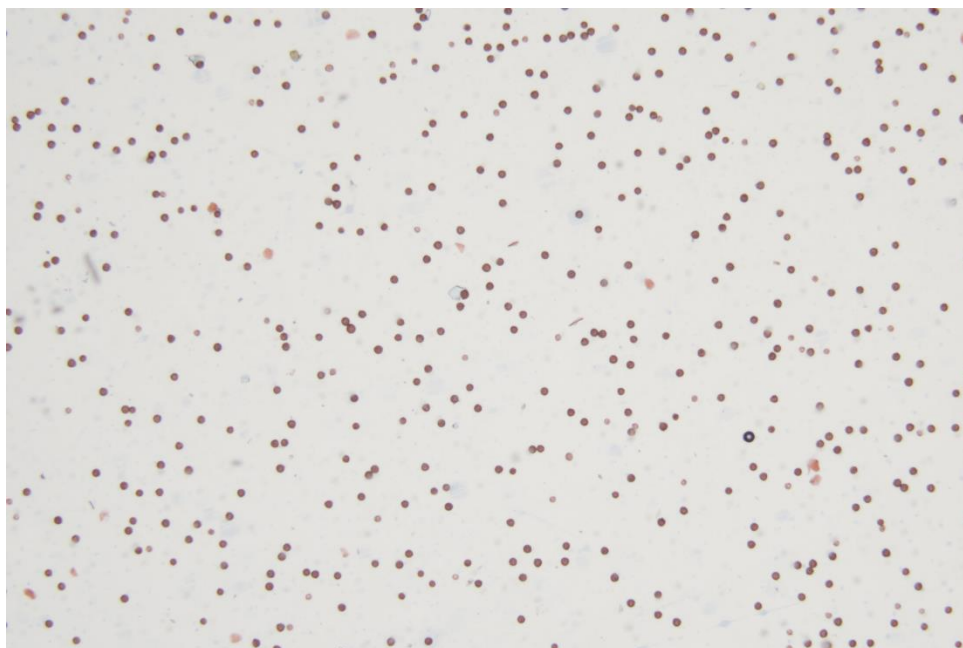


Figure 10 : Photographie de grains de pollen prise grâce au logiciel « Image Focus Alpha » sur le microscope Reichert Polyvar.

Une fois les photos obtenues, le logiciel Fiji (Version Java 1.8.0_322 (64-bit)) a été utilisé pour calculer le nombre de grains de pollen par photo grâce au script R repris à l'Annexe S2. En partant du postulat qu'une photo est égale à $0,0685\mu\text{L}$, nos 9 photos prises par lame représentaient $0,06165\mu\text{L}$. En réalisant une simple règle de 3, on a ainsi obtenu le nombre de grains de pollen présent dans les $10\mu\text{L}$ de la solution initiale déposée sur la lame. Enfin, en multipliant le nombre obtenu par 4 (car $40\mu\text{L}$ de solution de départ), on a obtenu notre nombre total de grains de pollen par anthère.

Viabilité pollinique

Pour faire suite au comptage du nombre de grains de pollen, la viabilité pollinique a également été étudiée sur des fleurs 1-2j avant l'anthèse. Pour ce faire, 2 étamines par fleur des 3 fleurs prélevées par plante ont été conservées dans un tube Eppendorf contenant la solution FAA (Tableau 4). Ensuite, la viabilité pollinique a été évaluée en utilisant à nouveau le colorant Alexander (Tableau 5). Chaque étamine a ainsi été écrasée sur lame porte-objet et $10\mu\text{L}$ de la solution Alexander a été ajouté avant l'observation au microscope. Le pollen était considéré comme viable lorsqu'il présentait une coloration rouge alors qu'il était considéré non-viable lors d'une coloration bleue. Un minimum de 200 grains de pollen ont été observés par lame et le pourcentage de viabilité pollinique a été calculé comme le ratio entre le nombre de grains viables et le nombre de grains total.

Suivi de la pollinisation par les insectes et analyse de la reproduction

Une fois l'ensemble des mesures végétatives et reproductives prises, les trois plantes les plus développées par génotype ont été sorties à l'extérieur de la logette afin d'observer le comportement des pollinisateurs. Une première ruche à bourdons (*Bombus terrestris*) en provenance de la firme Biobest® composée de 200-250 individus nés en élevage a été positionnée à la date du 20 juin 2023. Cette firme produit et élève des insectes pollinisateurs utilisés entre autres pour le développement de ruche censée être effective pour six à huit semaines. Etant donné le peu d'activité observé dans la ruche lors du premier mois d'observation, une seconde ruche à bourdons a été utilisée lors de cette étude (Annexe S3). Les ruches sont nourries à l'aide d'une solution alimentaire dénommée BIOGLUC® de 1,4 litre, ce qui représente une quantité suffisante pour alimenter la ruche durant l'entièreté de l'activité de la colonie. Lors de l'expérience, de la cellophane a été positionnée au niveau de cette source de nourriture afin d'espérer un regain d'activité dans la ruche. Ces ruches ont été placées à moins de trois mètres des différentes plantes organisées le long d'un grillage.

Lors de la mise en place des plantes en extérieur, celles-ci ont été regroupées par génotype en plaçant de gauche à droite : hybrides F2 - « backcross AC » - *S.chilense* - *S.lycopersicum* - backcross SC2 (Annexe S4). À noter que le choix de cet ordre s'est fait de manière aléatoire. Pour chaque plante, le nombre d'inflorescences et de fleurs en anthèse a été mesuré avant chaque session d'observation des insectes pollinisateurs. Chaque session d'observation a duré 10 minutes. Les conditions environnementales ont également été notées lors de chaque observation (Vent : faible/moyen/fort, T° : 10-15°C/15-20°C/20-25°C, Nébulosité : faible/forte). Différentes sessions d'observations ont été réalisées entre le 20 juin 2023 et le 2 octobre 2023. Lors de chaque session, on observait les insectes visitant les fleurs en prenant note de la plante visitée, du temps de visite par fleur et par plante, du nombre de fleurs visitées par inflorescence et par plante et du groupe d'insectes visiteurs. Le taux de visite a finalement été calculé en observant le nombre de fleurs visitées sur les plantes d'un même génotype lors d'un relevé en fonction du nombre total de fleurs en anthèse et sur un laps de temps défini.

Etant donné le faible nombre d'insectes observés, on a aussi approximé la pollinisation via la reproduction des plantes. En fin d'observation le nombre de fruits produits par inflorescence et le taux de mise à fruit a été calculé pour chaque inflorescence. Dix fruits par plante (sauf chez les hybrides F2 où le nombre de tomates était trop restreint lors de l'expérience) ont été récupérés et

coupés à l'aide d'un scalpel afin de calculer le nombre de graines par fruit. Dans le cas où il y avait énormément de tomates, toutes les tomates ont été ouvertes pour vérifier la présence potentielle de fruits parthénocarpiques.

Analyses statistiques

Les tests statistiques de la section des résultats ont été réalisés grâce au logiciel RStudio (Version R 4.3.1). Lors des nombreux tests d'analyse de la variance (ANOVA) effectués, la normalité ainsi que l'homoscédasticité des variances ont été vérifiées au préalable grâce aux tests de Shapiro et de Fligner-Killeen, respectivement. Lorsque les conditions d'application n'étaient pas respectées, la variable réponse a été transformée via une transformation logarithmique ou racine carrée. Sans amélioration des conditions d'application même après les transformations sur la variable réponse, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Cependant, si les conditions étaient remplies, l'ANOVA 1 a été réalisée lors de l'étude d'une seule variable explicative, et l'ANOVA 2 lors des mesures prises aux deux dates. Des analyses post-hoc avec le test de Tukey ont ensuite été réalisées afin de comparer les valeurs obtenues pour les relations entre génotypes et observer de potentielles différences significatives. Tous les résultats sont représentés en moyenne avec leurs écarts-types respectifs.

Une analyse en composante principale (ACP) basée sur les données florales des différentes plantes a également été réalisée afin d'observer les principales variables responsables des différences entre groupements. Le logiciel Microsoft® Excel® pour Microsoft 365 MSO (Version 2406 Build 16.0.17726.20078, 32 bits) a été utilisé pour la création des différentes figures.

Résultats

Cette section scindée en trois parties abordera les différents résultats obtenus lors de ce travail concernant la comparaison des plantes de *Solanum lycopersicum*, de *Solanum chilense*, de leurs hybrides F2, et des backcross entre les hybrides F1 et leurs parents. Malheureusement nous n'avons pas pu comparer les hybrides F1 vu le manque de graines comme expliqué précédemment.

Dans le premier point, le génotype des plantes étudiées a été comparé à l'aide de marqueurs moléculaires pour vérifier qu'il s'agit bien des plantes attendues. Par la suite, la présence des S-allèles impliqués dans la régulation de l'auto-incompatibilité a été analysée. Dans le second point, une comparaison morphologique des plantes a été réalisée tant au niveau végétatif que reproductif afin de voir s'il existe un continuum morphologique entre les deux espèces parentes et leurs hybrides. Une attention particulière a été portée sur la morphologie des fleurs afin de voir s'il existe un lien entre celle-ci et l'auto-incompatibilité. La dernière section présente les résultats liés à la pollinisation et à la reproduction des plantes et se base sur les observations réalisées lors de la mise en extérieur des plantes en s'intéressant plus particulièrement aux interactions survenues avec les pollinisateurs. Cette dernière partie a pour but de voir le lien entre auto-incompatibilité, morphologie florale et attractivité des pollinisateurs.

Partie 1 : Vérification des génotypes

Vérification génétique des plantes hybrides et des backcross

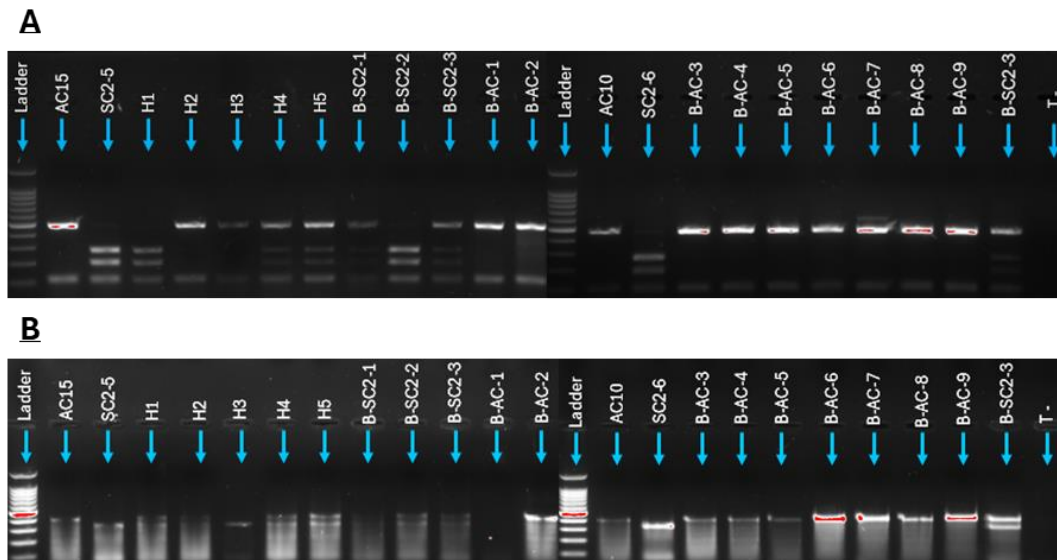


Figure 11 : Gel d'électrophorèse permettant de visualiser les produits d'amplification PCR des différentes plantes étudiées à l'aide des marqueurs T0386A (A) et C2AT4G04955 (B) et de l'enzyme de restriction *Hinf*I. À noter que l'ADN de la plante B-SC2-3 a été positionné à deux emplacements distincts afin d'obtenir un nombre d'échantillons pair et pour prévenir d'un potentiel mauvais pipetage lors du premier dépôt.

Les hybrides F2 (H) ont été obtenus suite aux croisements entre les hybrides F1, alors que les backcross ont quant à eux été obtenus par croisement des hybrides F1 avec leurs parents AC ou SC2, pour les backcross AC (B-AC) et SC2 (B-SC2), respectivement. Nous avons analysé les plantes issues de ces croisements avec deux marqueurs génétiques (T0386A et C2AT4G04955) afin de vérifier le succès de ces croisements. Les deux marqueurs ont montré des profils PCR différents pour *S. lycopersicum* (AC) et *S. chilense* (SC2) (Figures 11A et 11B). Les cinq hybrides F2 avaient des profils génétiques variés selon les plantes : soit similaire à AC (homozygote AC), soit similaire à SC2 (homozygote SC2), soit présentant la combinaison des deux profils (hétérozygote) ; ces résultats confirment qu'il s'agit bien d'hybrides F2. Concernant le profil génétique des trois plantes backcross SC2, il était soit similaire à SC2 (homozygote SC2), soit hétérozygote selon les plantes et les marqueurs, ce qui correspond aux génotypes attendus pour des plantes issues du backcross SC2. En revanche, l'amplification de l'ADN à l'aide de différents marqueurs a permis de se rendre compte que les plantes identifiées à l'origine comme backcross AC n'en étaient finalement pas. En effet, les figures 11A et 11B montrent pour les neuf plantes de backcross AC un profil génétique unanimement identique à notre plante contrôle AC-15. Il est donc fort probable que ces plantes soient issues d'une autopolinisation AC plutôt que d'un croisement entre AC et les hybrides F1. Dans la suite de ce travail, nous avons donc fait le choix d'abandonner la poursuite de l'étude de ces plantes.

Vérification des allèles d'auto-incompatibilité S10/S16

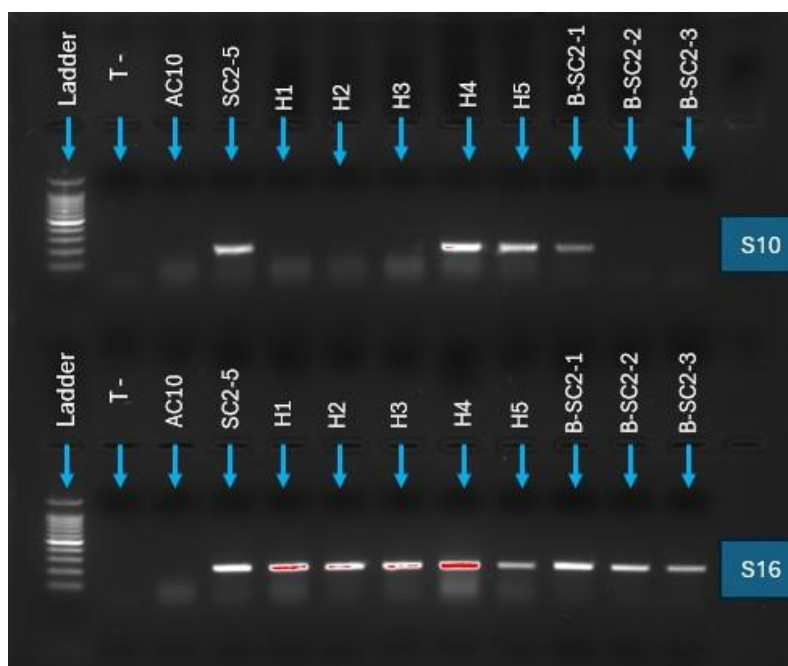


Figure 12 : Gel d'électrophorèse pour la vérification des allèles S10/S16 S-RNase sur les plantes de seconde génération.

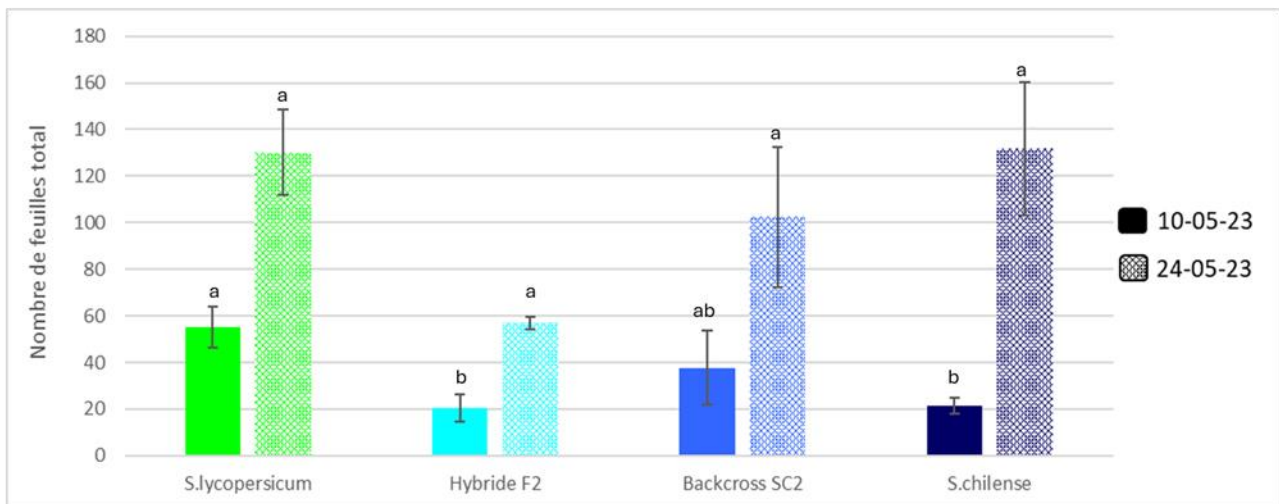
Comme mentionné précédemment, *S. lycopersicum* (AC) est auto-compatible et ne présente pas de S-allèles fonctionnels tandis que *S. chilense* (SC2) est auto-incompatible et présente les S-allèles S10 et S16 (Figure 12). Nous avons donc vérifié la présence d'allèles d'auto-incompatibilité chez les hybrides F2 et les backcross SC2. L'électrophorèse a montré que trois de nos hybrides F2 portaient l'allèle S16 uniquement (H1, H2 et H3) alors que les deux derniers étaient hétérozygotes et portaient les allèles S10 et S16 (H4, H5). Concernant les backcross SC2, la première plante B-SC2-1 était hétérozygote S10/S16, alors que les plantes B-SC2-2 et B-SC2-3 ne portaient que l'allèle S16. Aucune plante ne présentait que l'allèle S10.

Partie 2 : Comparaison morphologique

Croissance végétative

Nombre de feuilles

A



B

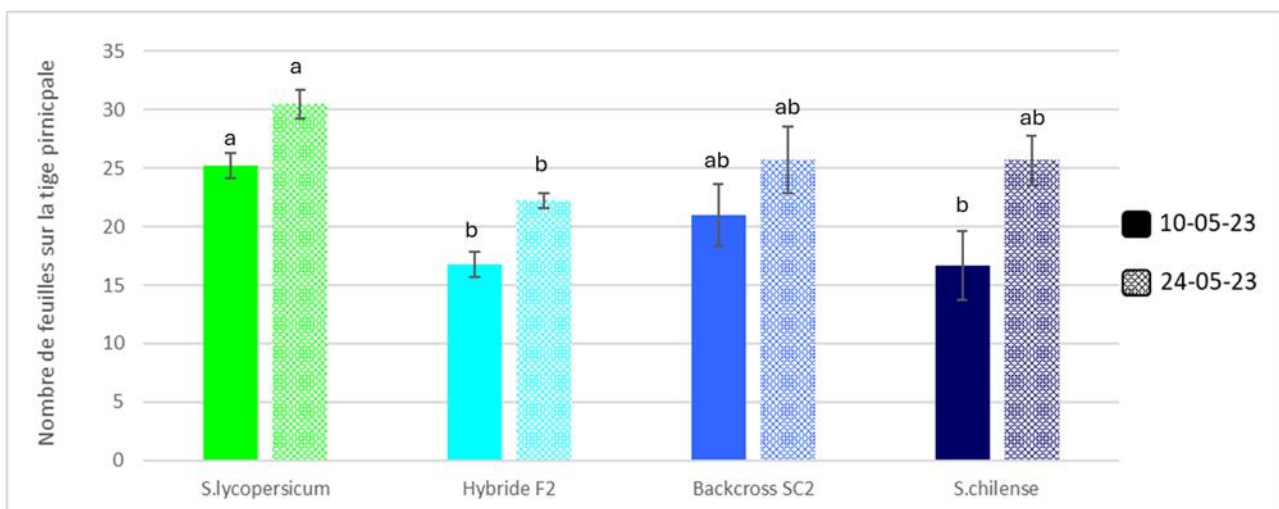


Figure 13 : Nombre de feuilles total (A) sur la plante et sur la tige principale (B) chez les quatre génotypes à deux dates (10 mai 2023 et 24 mai 2023). Les génotypes partageant une même lettre à la même date ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Le nombre de feuilles total sur la plante et sur la tige principale a été relevé à deux dates (10 mai 2023 et 24 mai 2023).

Le nombre total de feuilles ne variait pas de manière significative entre les génotypes ($F_{3,36} = 1,767$, $p\text{-val} = 0,171$) mais bien en fonction du temps ($F_{1,36} = 11,55$, $p\text{-val} = 0,00167$) avec une absence d'effet significatif de l'interaction ($F_{3,32} = 1,518$, $p\text{-val} = 0,2287$) lors de l'analyse de l'ensemble du jeu de données. Ce nombre a plus que doublé en à peine deux semaines chez les différents

génotypes (Figure 13A), à l'exception des hybrides F2 pour lesquels aucune différence significative n'a été observée entre les deux périodes d'observation ($t = -3,8344$, $p\text{-val} = 0,06178$). Le 10 mai, les plantes *S. lycopersicum* présentaient un nombre de feuilles plus élevé que les hybrides F2 et les plantes *S. chilense* ($F_{3,16} = 5,015$, $p\text{-val} = 0,0122$) alors que cette différence n'était plus significative le 24 mai ($F_{3,16} = 2,58$, $p\text{-val} = 0,0897$).

Le nombre de feuilles sur la tige principale a aussi augmenté avec le temps ($F_{1,36} = 4,644$, $p\text{-val} = 0,0379$) mais de façon moins importante que le nombre total de feuilles et n'a pas montré d'effet d'interaction entre le temps et les génotypes ($F_{3,32} = 0,584$, $p\text{-val} = 0,63$) (Figure 13B). Pour les deux dates d'observation, le nombre de feuilles sur la tige principale variait entre les génotypes ($F_{3,16} = 8,678$, $p\text{-val} = 0,0012$; $F_{3,16} = 7,406$, $p\text{-val} = 0,00249$) : les plantes *S. lycopersicum* en produisaient plus que les autres génotypes aux deux dates, avec une moyenne atteignant respectivement 25,2 et 30,5 aux deux dates.

La différence observée entre le nombre total de feuilles et le nombre de feuilles sur la tige principale peut s'expliquer par l'aspect plus ou moins buissonnant des plantes en fonction des génotypes et donc par le nombre de ramifications qui est présenté ci-dessous.

Ramifications

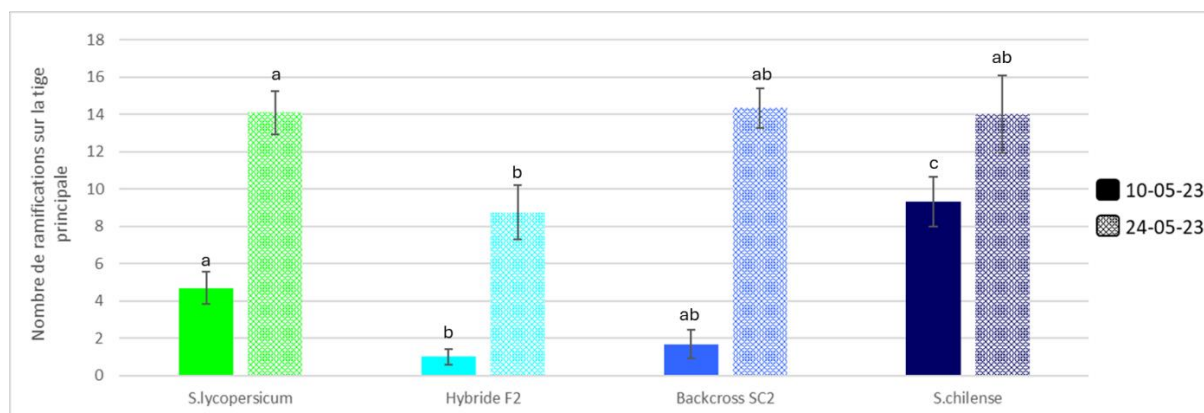


Figure 14 : Nombre de ramifications sur la tige principale chez les quatre génotypes à deux dates (10 mai 2023 et 24 mai 2023). Les génotypes partageant une même lettre à la même date ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Comme pour le nombre de feuilles, le nombre de ramifications sur la tige principale (Figure 14) a fortement augmenté entre le 10 et le 24 mai ($F_{1,9} = 399,1$, $p\text{-val} = 9,17 \times 10^{-9}$) et statistiquement, aucun effet significatif de l'interaction entre la date et les génotypes n'a pu être identifié ($F_{3,34} = 2,687$, $p\text{-val} = 0,0619$). Les plantes backcross SC2 en particulier ont montré un développement important des ramifications avec une moyenne passant de 1,67 à 14,33 ramifications en à peine

deux semaines. Au contraire, *S. chilense* était le seul génotype dont le nombre de ramifications n'a pas augmenté significativement en fonction du temps ($t = -2,796$, $p\text{-val} = 0,06808$). Concernant les différences entre génotypes, on observe une différence significative que ce soit lors de la première ($F_{3,17} = 13,1$, $p\text{-val} = 0,000112$) ou de la seconde observation ($F_{3,17} = 3,944$, $p\text{-val} = 0,0264$). À noter un nombre particulièrement restreint de ramifications lors de la 1^{ère} observation réalisée le 10 mai 2023 chez les hybrides F2 et les backcross SC2 comparativement aux plantes *S. chilense*. Le 24 mai, toutes les plantes avaient en moyenne 14 ramifications sur la tige principale mis à part les hybrides F2 qui en possédaient 9.

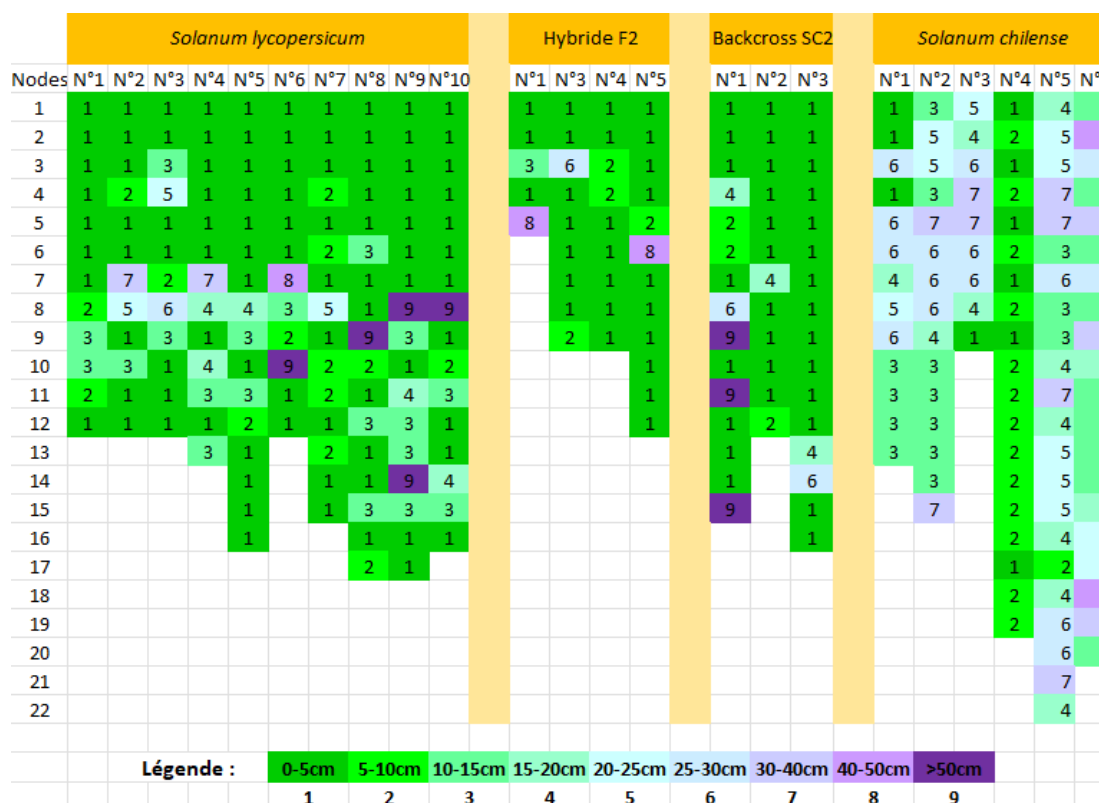


Figure 15 : Représentation de la la taille des ramifications chez les plantes des différents génotypes en fonction des nœuds. Le code couleur faisant référence à la légende ci-dessus.

La taille des ramifications différait également entre génotypes. Les différentes ramifications ont été mesurées selon une échelle liée à un code couleur afin de faciliter la représentation (Figure 15). Ces mesures ont été prises sur les ramifications de chaque plante des différents génotypes. On observe ainsi une proportion plus importante de ramifications de grande taille chez *S. chilense*, mis à part chez la plante n°4 faisant office d'exception. Chez les trois autres génotypes, les ramifications mesuraient de manière générale moins de 5cm, et cela, de manière encore plus prononcée pour les premiers nœuds de la plante.

A

10-05-23												
Numéro de ramification	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11	N°12
<i>S.lycopersicum</i>	3,9	5,8	4,2	6	1,6	1	1,1	0,4	0	0	0	0
Hybride F2	4,5	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Backcross SC2	4	3,333	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.chilense</i>	3	4,5	3,167	3,5	4,667	2,833	4,5	1,833	2,333	1,667	2,167	1,5

B

24-05-23																		
Numéro de ramification	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11	N°12	N°13	N°14	N°15	N°16	N°17	N°18
<i>S.lycopersicum</i>	3,2	3,1	4,1	5,5	4,3	5	6,9	8,7	7	5,6	6,6	4,222	4,833	6,8	4,8	2,75	4	0
Hybride F2	2	2,5	5,5	2,75	4,5	4,333	3	2,667	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0
Backcross SC2	2,667	2	3,333	4,333	3,667	4	3,667	4,333	6	2,333	5,667	3	6	5,5	7	3	0	0
<i>S.chilense</i>	6	6,25	8	6	8,5	9	9	7,25	6,5	6,333	7	7,333	7,333	5,5	9	6	5	7

Figure 16 : Représentation du nombre de feuilles moyen par ramification en fonction du génotype à la date du 10 mai 2023 (A) et du 24 mai 2023 (B). La coloration tend du rouge vers le vert en suivant l'augmentation du nombre de feuilles par ramification.

Le nombre moyen de feuilles par ramification a été calculé et est présenté sur les figures 16A et 16B à l'aide d'un nuancier de couleur afin d'en faciliter la lisibilité. Les hybrides F2 et les backcross SC2 avaient moins de ramifications avec feuilles que les autres génotypes, et cela, principalement lors de la 1^{ère} prise de mesure datant du 10 mai. Au contraire, *S. chilense* avait un port plus buissonnant avec le nombre de feuilles par ramification le plus élevé avec une moyenne de 7,4 feuilles par ramification à la date du 24 mai 2023.

Croissance reproductive

Temps de floraison

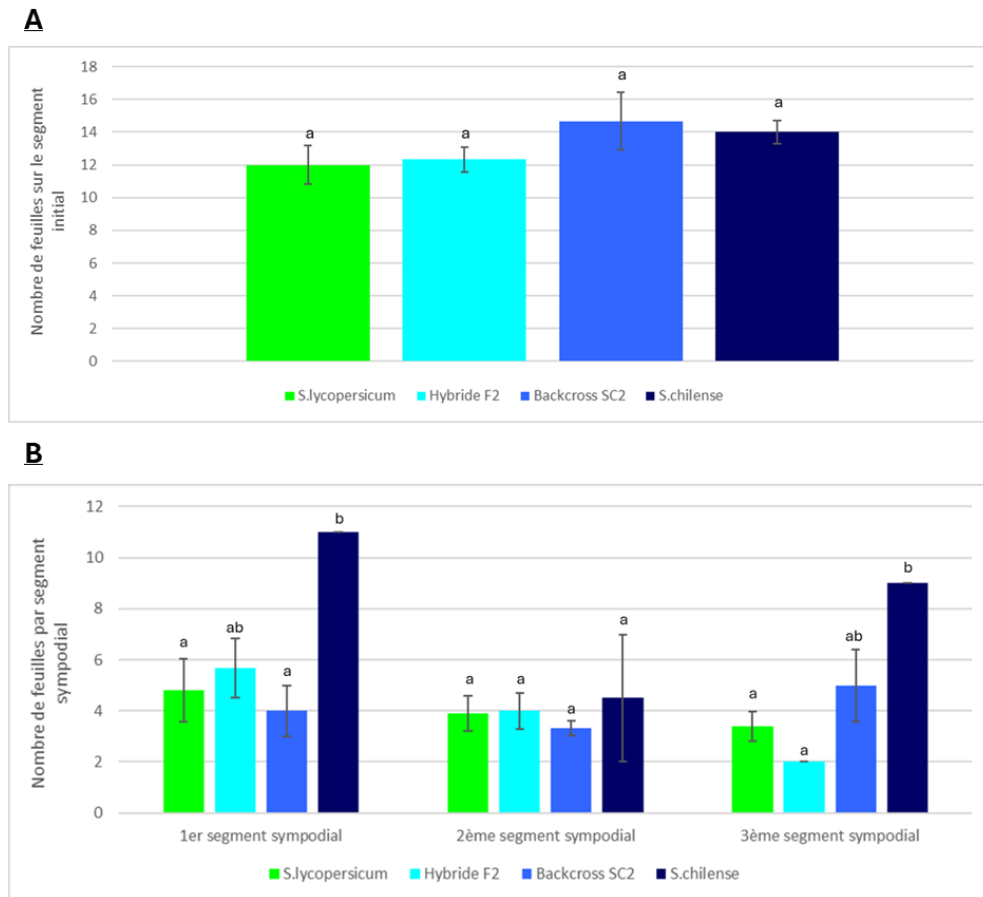


Figure 17 : Temps de floraison du segment initial (A) et des trois premiers segments sympodiaux (B) chez les quatre génotypes à la date du 24 mai 2023. Les génotypes partageant une même lettre pour un même segment ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Le temps de floraison du segment initial (Figure 17A) était statistiquement similaire entre les différents génotypes ($\chi^2 = 5,4353$, p-valeur = 0,1426) et les plantes avaient produit entre 12 et 15 feuilles avant leur première inflorescence. On a ainsi en moyenne 14,67 feuilles sur le segment initial des plantes backcross SC2 et 12 chez les *S.lycopersicum*, ce qui représente les moyennes maximum et minimum observées.

En ce qui concerne le temps de floraison des segments sympodiaux (Figure 17B), aucune différence significative n'a été observée entre génotypes pour aucun des segments, malgré la variabilité observée au niveau du 3^{ème} segment sympodial (1^{er} segment : $\chi^2 = 5,971$, p-valeur = 0,113 ; 2^{ème} segment : $\chi^2 = 0,473$, p-valeur = 0,925 ; 3^{ème} segment : $\chi^2 = 7,4694$, p-valeur = 0,058). Les plantes de *S.chilense* avaient un nombre de feuilles entre les inflorescences généralement plus élevé que les autres génotypes, avec des valeurs moyennes atteignant respectivement 11,

4,5 et 9 feuilles en fonction du segment sympodial. Etant donné que le nombre de feuilles par segment sympodial n'est pas impacté par la position sur la plante, uniquement les trois premiers segments sympodiaux ont été étudiés.

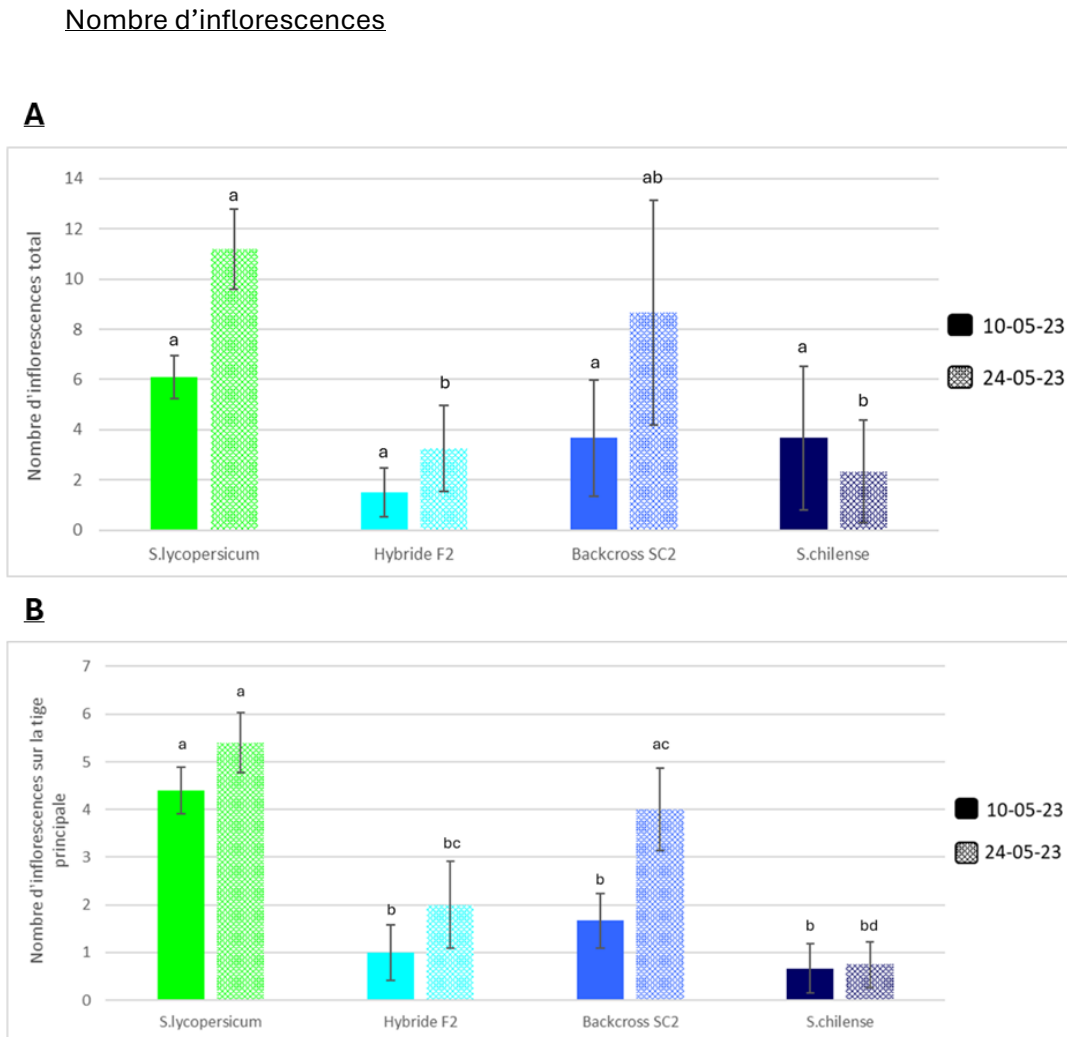


Figure 18 : Nombre d'inflorescences total (A) sur la plante et sur la tige principale (B) chez les quatre génotypes à deux dates (10 mai 2023 et 24 mai 2023). Les génotypes partageant une même lettre à la même date ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

En général, le nombre total d'inflorescences par plante (Figure 18A) était plus important chez *S. lycopersicum* et les backcross SC2 que chez les deux autres génotypes ($\chi^2 = 15,09$, p-valeur = 0,001742), avec une légère différence au cours du temps ($\chi^2 = 4,4266$, p-valeur = 0,03538). Une interaction importante entre les génotypes et le temps a été observée ($\chi^2 = 20,449$, p-valeur = 0,004678). *Solanum lycopersicum* était le seul génotype à montrer une augmentation significative du nombre d'inflorescences avec le temps ($t = -5,1315$, p-valeur = 0,0006184). La comparaison entre génotypes date par date montre que le nombre d'inflorescences total était globalement similaire lors de la 1^{ère} observation ($\chi^2 = 5,7315$, p-valeur = 0,1254) mais qu'il était plus faible chez *S. chilense* et les hybrides F2 comparativement à *S. lycopersicum* le 24 mai 2023 ($\chi^2 = 10,204$, p-

valeur = 0.01691). L'écart-type important chez les backcross SC2 indiquait une grande variabilité. Par ailleurs, le nombre d'inflorescences par plante a légèrement diminué avec le temps chez *S.chilense*, ce qui s'explique par la mauvaise forme des plantes *S.chilense*-5 & 6 en fin de culture suite à un manque d'arrosage.

Concernant le nombre d'inflorescences sur la tige principale (*Figure 18B*), on avait une situation similaire à celle observée sur les plantes entières avec une différence significative du nombre d'inflorescences entre génotypes ($\chi^2 = 29,759$, p-valeur = $1,551 \times 10^{-6}$). En revanche, bien qu'il n'y ait pas eu de différence significative entre les deux dates ($\chi^2 = 2,925$, p-valeur = 0,08722), il y avait bien un effet de l'interaction ($\chi^2 = 32,548$, p-valeur = $3,214 \times 10^{-5}$). Les différences entre génotypes étaient cette fois valables pour les deux dates d'observation ($\chi^2 = 16,929$, p-valeur = 0,000731 ; $\chi^2 = 13,745$, p-valeur = 0,003274) avec des valeurs significativement plus élevées chez *S. lycopersicum* que chez *S. chilense* et des valeurs intermédiaires pour les backcross SC2 et les hybrides F2. Les plantes *S.lycopersicum* possédaient en moyenne 5,4 inflorescences sur la tige principale à la date du 24 mai 2023 contre moins de 1 inflorescence chez *S. chilense*.

24-05-23																			
Numéro de ramification	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11	N°12	N°13	N°14	N°15	N°16	N°17	N°18	N°19
<i>S.lycopersicum</i>	0	0	0,1	0,2	0	0,1	0,8	1,3	0,7	0,6	0,4	0,3333	0,5	1	0,8	0	0,5	0	0
Hybride F2	0	0	0	0	1	0,3333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Backcross SC2	0	0	0	0,3333	0	0,3333	0	0,3333	1,3333	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>S.chilense</i>	0	0	0,25	0	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0	0,3333	0,3333	0,3333	0	1	0	0	0	0

Figure 19 : Représentation du nombre d'inflorescences moyen par ramification en fonction du génotype à la date du 24 mai 2023. La coloration tend du rouge vers le vert en suivant l'augmentation du nombre d'inflorescences par ramification.

Au niveau des ramifications, les observations ont montré une absence d'inflorescence sur les premières ramifications ainsi que sur les dernières (*Figure 19*). Les inflorescences semblaient ainsi plus nombreuses au niveau des ramifications centrales de la plante plutôt qu'aux extrémités. Cependant, ce nombre d'inflorescences était très limité, et cela particulièrement chez les plantes hybrides F2 comme on peut l'observer à la coloration principalement rouge de la ligne correspondante.

Nombre de fleurs

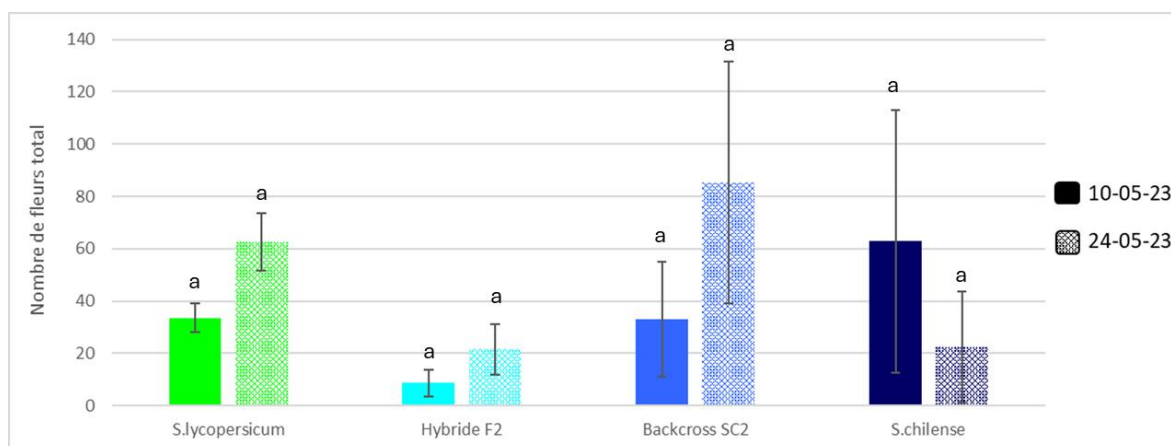


Figure 20 : Nombre de fleurs total par plante chez les quatre génotypes à deux dates (10 mai 2023 et 24 mai 2023). Les génotypes partageant une même lettre à la même date ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Le nombre de fleurs par plante était similaire entre génotypes que ce soit lors de la première observation ($\chi^2 = 5,4353$, p-valeur = 0,1426) ou la seconde ($\chi^2 = 7,5957$, p-valeur = 0,05515) (Figure 20). Cependant, il y a eu une légère évolution en termes de nombre de fleurs par plante durant le laps de temps de deux semaines ($\chi^2 = 4,168$, p-valeur = 0,04119), et un effet de l'interaction ($\chi^2 = 14,73$, p-valeur = 0,03962). Comme mentionné précédemment, la mauvaise forme de plantes *S. chilense*-5 et *S. chilense*-6 a conduit à une diminution du nombre total de fleurs chez ce génotype en passant de 62,83 à 33,75 fleurs par plante à la date du 24 mai. Malgré le nombre de fleurs moyen le plus élevé, il est à noter que les backcross SC2 possédaient une variance énorme avec des valeurs pouvant osciller entre 16 et 190 fleurs par plante. Quant aux hybride F2, on a remarqué une quantité de fleurs particulièrement restreinte.

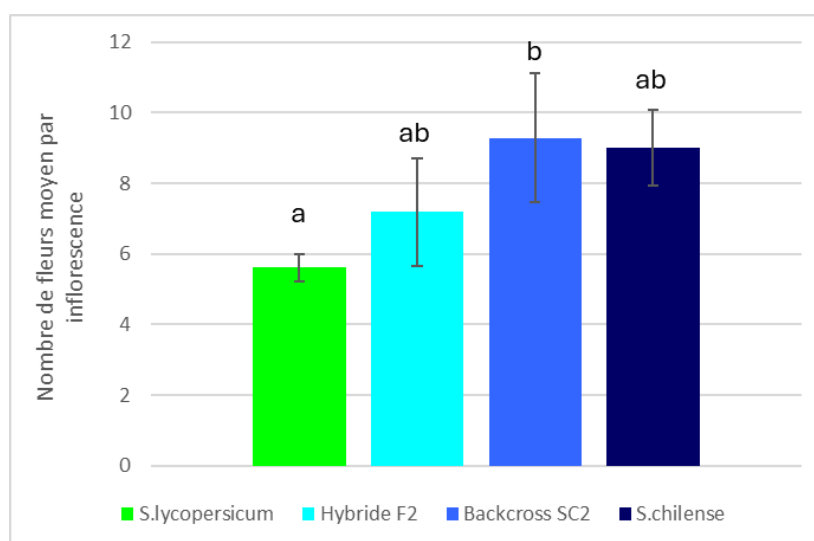


Figure 21 : Nombre de fleurs moyen par inflorescence chez les quatre génotypes à la date du 24 mai 2023. Les génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Par contre, le nombre de fleurs par inflorescence variait entre les génotypes ($F_{3,14} = 3,638$, $p\text{-val} = 0,0396$) avec un nombre moyen minimal de 5,6 chez *S. lycopersicum* et un nombre maximal de 9,3 chez les backcross SC2 (Figure 21).

Morphologie des organes floraux

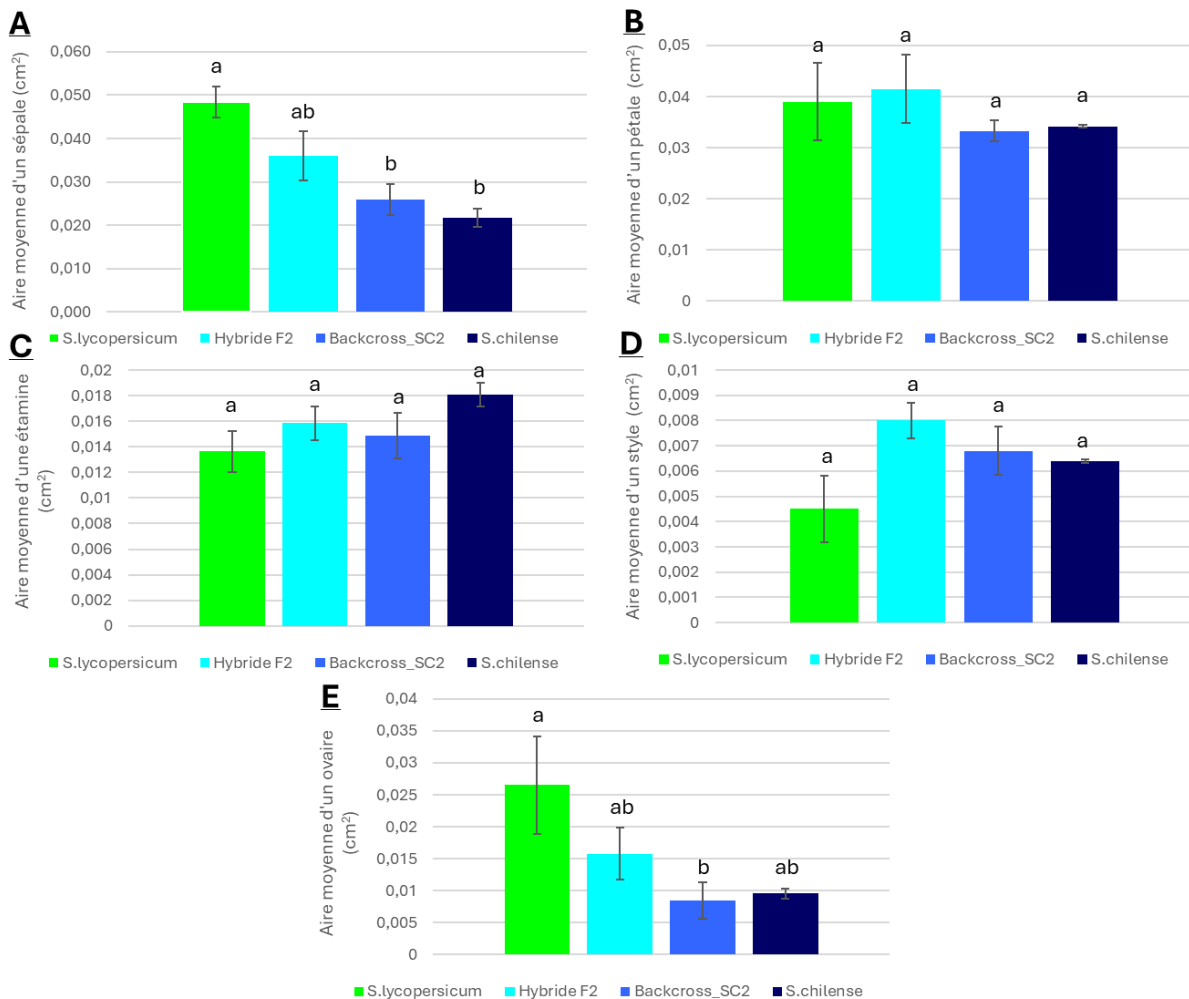


Figure 22 : Aire moyenne d'un sépale (A), pétale (B), étamine (C), style (D), et ovaire (E) en cm² chez les différents génotypes. Les génotypes partageant une même lettre pour un même organe floral ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Contrairement aux autres organes floraux, les surfaces moyennes d'un sépale (Figure 22A) et d'un ovaire (Figure 22E) se sont avérées différentes entre les génotypes ($F_{3,16} = 7,776$, $p\text{-val} = 0,0125$; $F_{3,16} = 3,763$, $p\text{-val} = 0,0322$). L'aire d'un sépale variait ainsi de 0,02165 cm² chez *S. chilense* à 0,049 cm² chez *S. lycopersicum*. Les plantes de *S. lycopersicum* possédaient également les ovaires avec la surface la plus importante avec une valeur moyenne de 0,0265 cm². Aucune différence significative n'a en revanche été observée pour la surface d'un pétale ($F_{3,16} = 0,29$, $p\text{-val} = 0,832$, Figure 22B), d'une étamine ($F_{3,16} = 0,966$, $p\text{-val} = 0,46$, Figure 22C), ou encore d'un style ($F_{3,16} = 2,526$, $p\text{-val} = 0,0942$, Figure 22D).

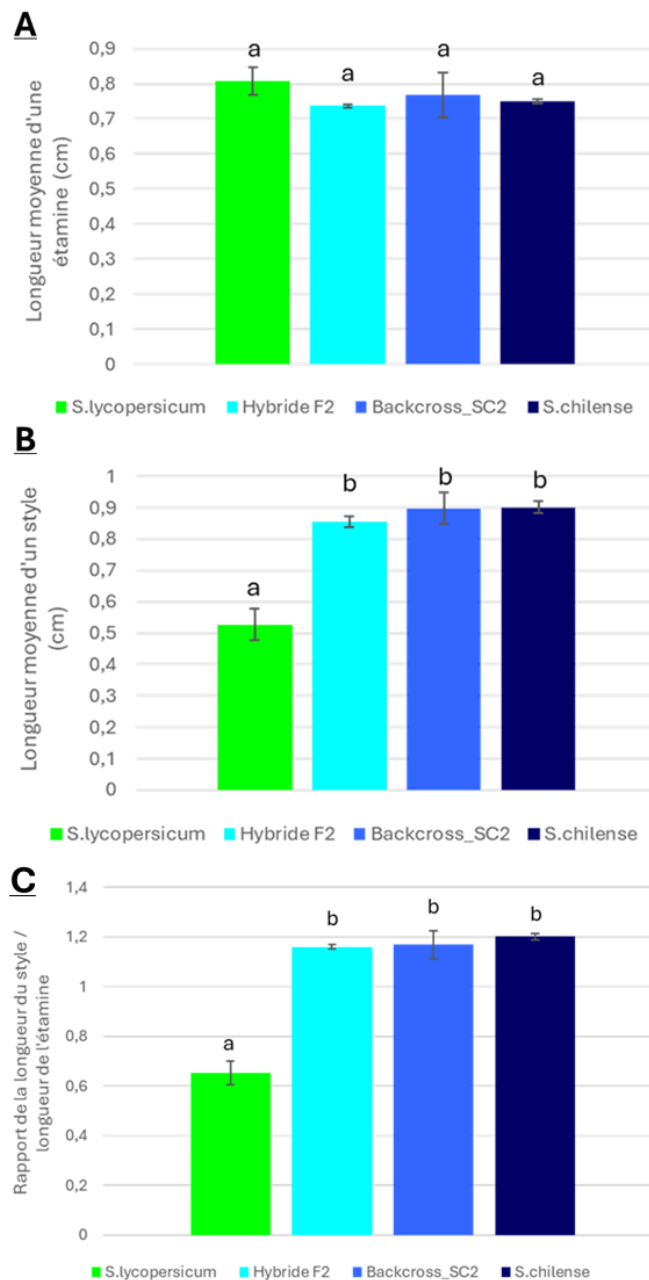


Figure 23 : Longueur moyenne d'une étamine (A), d'un style (B) en cm et étude de l'exsertion du style (rapport de la longueur du style / longueur de l'étamine) (C) chez les différents génotypes. Les génotypes partageant une même lettre pour un même organe floral ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

En ce qui concerne la longueur des organes floraux, aucune différence significative n'a été observée entre génotypes pour la longueur d'une étamine ($F_{3,16} = 0,376$, p-val = 0,773, Figure 23A), mais la longueur du style était significativement plus faible chez *S. lycopersicum* que chez les autres génotypes qui montraient des tailles de style semblables ($F_{3,16} = 14,98$, p-val = 0,00198, Figure 23B). Il en résulte une exsertion du style plus importante chez *S. chilense*, les hybrides F2 et les backcross SC2 que chez *S. lycopersicum*. Le rapport de la longueur du style sur celle de l'étamine avoisinait 0,65 chez *S. lycopersicum* alors qu'il était plutôt aux alentours de 1,2 chez les autres génotypes ($F_{3,16} = 20,84$, p-val = 0,000724, Figure 23C).

Fertilité des fleurs

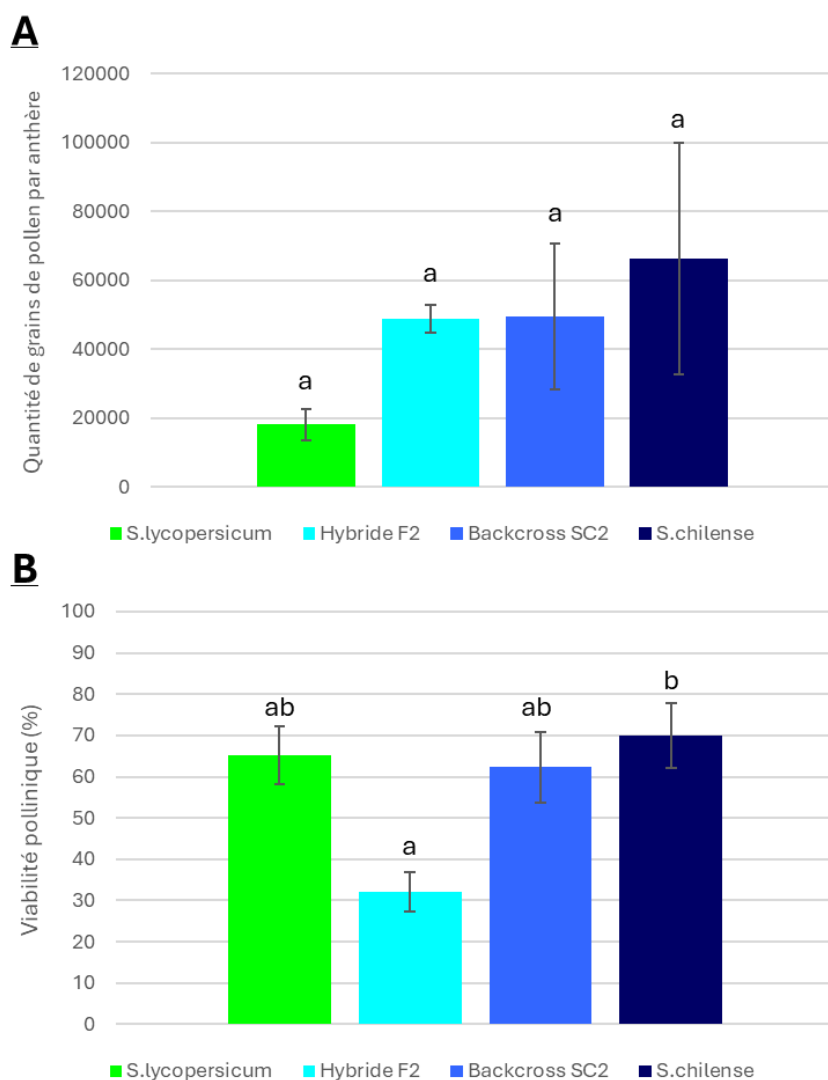


Figure 24 : Quantité de grains de pollen par anthère (A) et pourcentage de viabilité pollinique (B) chez les différents génotypes. Les génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

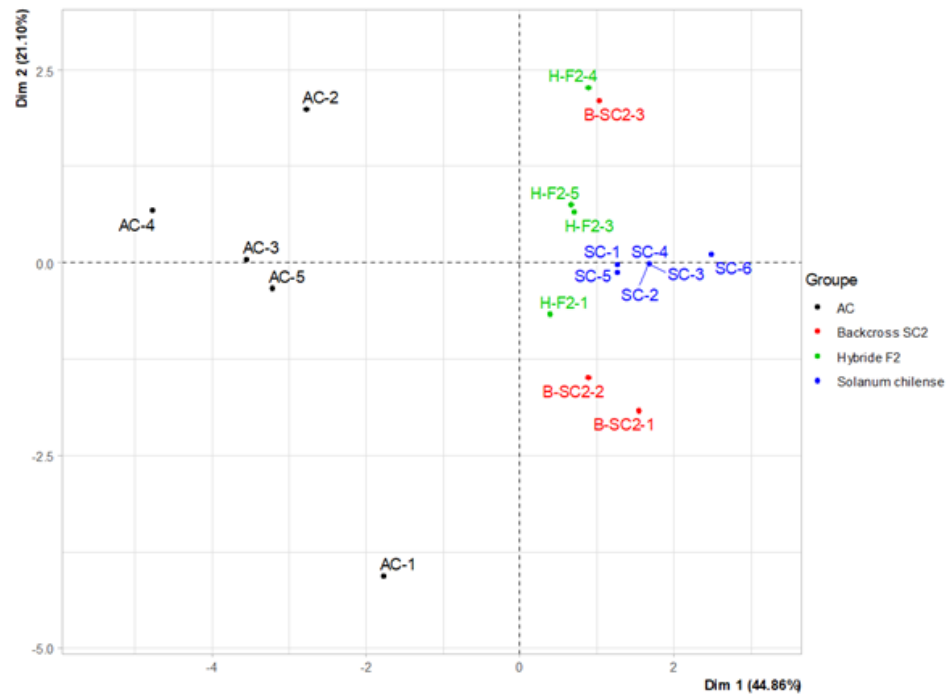
Le nombre de grains de pollen par anthère était similaire entre les génotypes ($F_{3,10} = 1,255$, $p\text{-val} = 0,341$, Figure 24A). Cependant, avec quelques 18060 grains de pollen par anthère chez *S. lycopersicum*, on était bien en-deçà des 66261 grains de pollen en moyenne observés chez *S. chilense*. La grande variabilité observée pour le nombre de grains de pollen par anthère pour *S. chilense* et les backcross SC2 peut expliquer que la différence ne soit pas statistiquement significative.

Par contre, la viabilité pollinique variait entre génotypes ($F_{3,8} = 4,658$, $p\text{-val} = 0,0364$, Figure 24B). Elle était de 32% chez les hybrides F2 et de plus de 60% pour les autres génotypes.

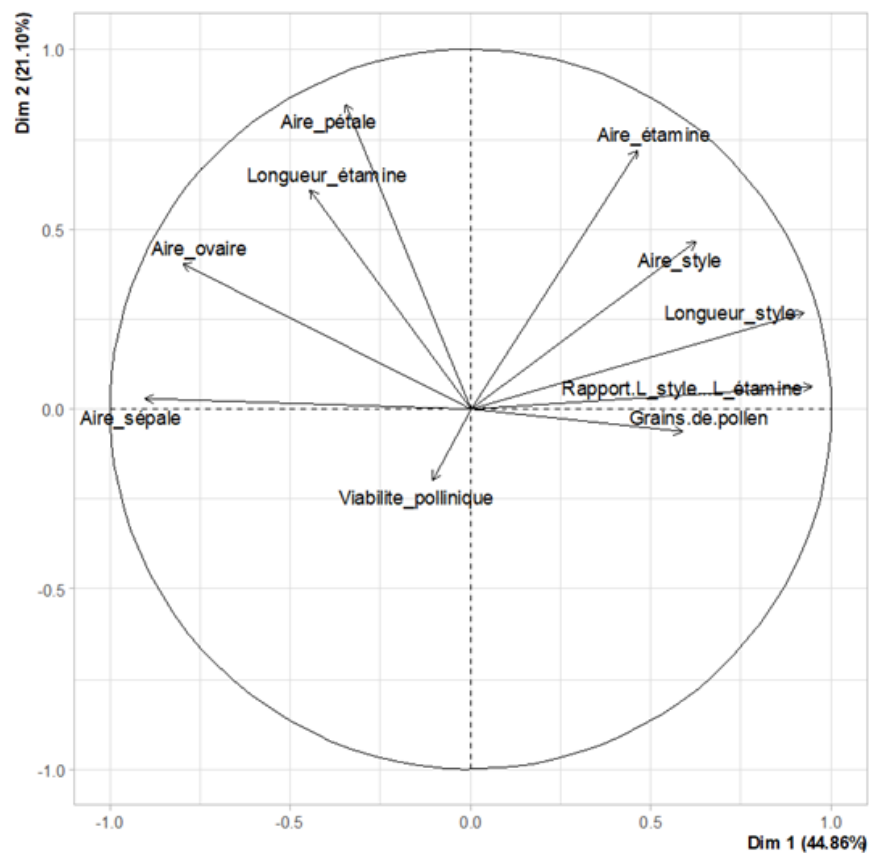
En ce qui concerne la réceptivité stigmatique, elle était de 100% sur toutes les plantes étudiées.

Analyse en composantes principales (ACP) des différentes plantes en fonction des données florales

A



B



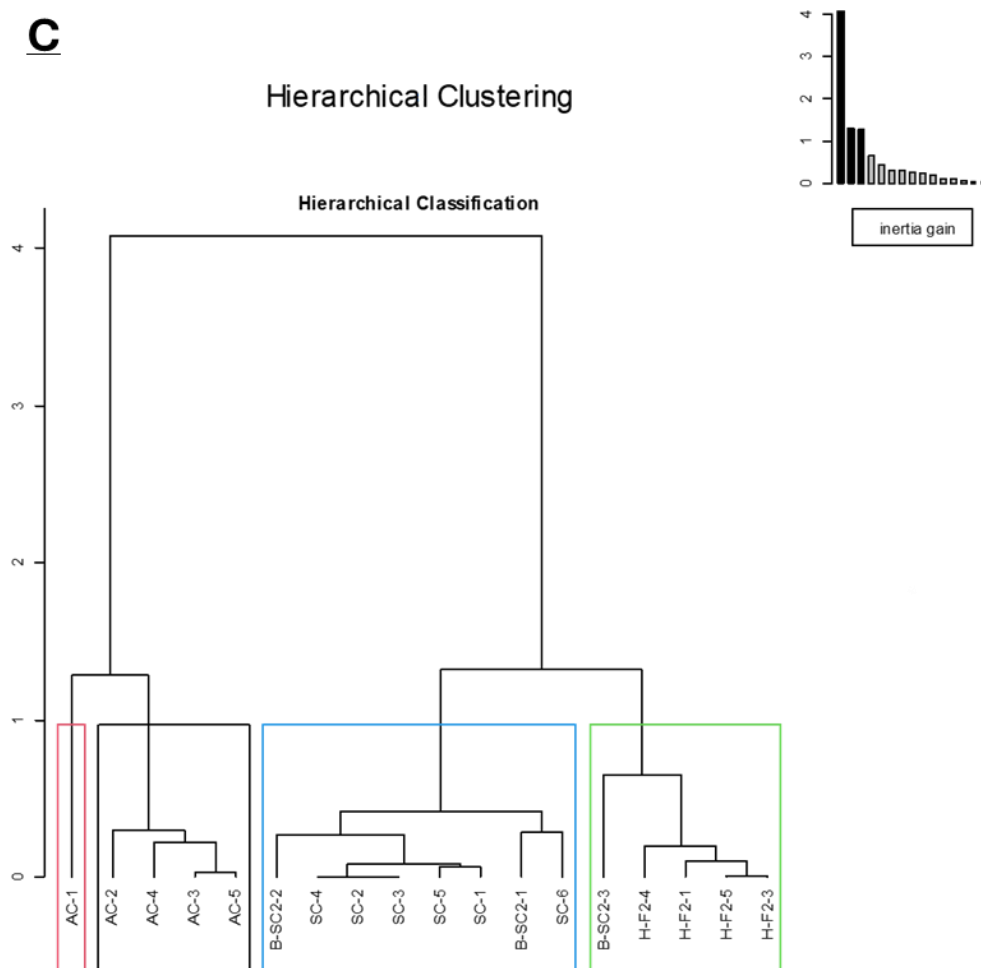


Figure 25 : ACP des paramètres de morphologie et de fertilité des fleurs en fonction des génotypes. Graphe des individus (A).
Graphe des variables (B). Arbre et groupements issus de l'ACP (C).

Afin de mettre en évidence les différences entre plantes concernant la morphologie et la fertilité florale, une ACP a été réalisée suivie de la construction d'un arbre basé sur les résultats de l'ACP. Les deux premiers axes de l'ACP expliquent respectivement 45% et 21% de la variabilité (Figure 25). Comme le montre le graphe des individus (Figure 25A), les plantes de *S. lycopersicum* sont groupées d'un côté et les plantes *S. chilense*, backcross SC2 et hybrides F2 sont groupées de l'autre le long de l'axe 1. Une variabilité importante est également observée entre les plantes de ces deux derniers génotypes le long de l'axe 2. Les variables expliquant les différences le long de l'axe 1 sont l'aire des sépales et des ovaires d'un côté et la longueur du style, l'exsertion du style et la viabilité pollinique de l'autre. Les différences le long de l'axe 2 sont principalement expliquées par l'aire des pétales et des étamines (Figure 25B). Des regroupements ont été réalisés sur base d'un arbre après l'ACP et 4 groupes ont été formés (Figure 25C). Une première division sépare les plantes de *S. lycopersicum* des autres. Les deux premiers groupes contiennent des plantes de *S. lycopersicum* et les deux autres regroupent d'un côté les plantes *S. chilense* avec deux backcross SC2 et de l'autre les hybrides F2 et un backcross SC2.

Partie 3 : Pollinisation

Après avoir comparé les croissances végétative et reproductive des plantes en serres, trois plantes ont été sélectionnées pour chaque génotype afin d'étudier en extérieur leur reproduction et leur attractivité pour les pollinisateurs. Des paramètres floraux comme le nombre d'inflorescences et de fleurs ont été mesurés afin de voir leur influence sur le comportement de visite des pollinisateurs. Le succès de la pollinisation et de la reproduction a aussi été observé en analysant des paramètres de rendement au niveau des fruits et des graines. Il est à noter que les hybrides F2 sont le seul génotype à ne posséder que deux plantes dans la suite de ce travail étant donné le mauvais état de santé de l'Hybride F2-3 sur la fin des observations. Les données sont présentées plante par plante quand c'est possible étant donné la variabilité mise en évidence précédemment pour les hybrides F2 et les backcross SC2 ainsi que le fait que les plantes diffèrent par leur S-allèles.

Paramètres inflorescentiels et floraux

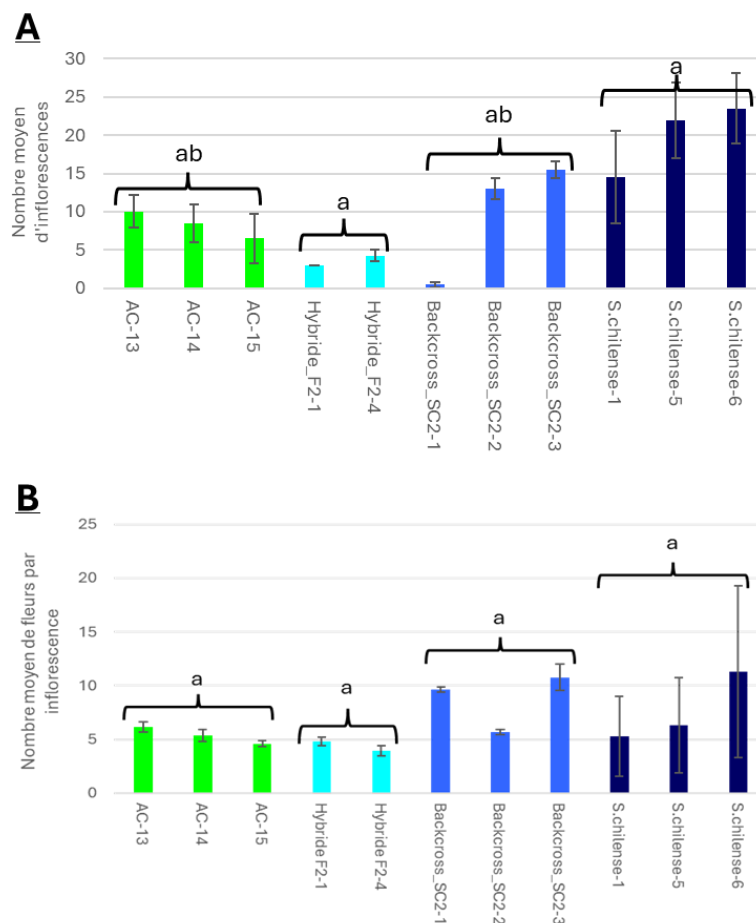


Figure 26 : Nombre moyen d'inflorescences par plante (A) et de fleurs par inflorescence (B) pour chaque plante des quatre génotypes. Les génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Au total 45 observations et suivis d'insectes ont été réalisés et le nombre d'inflorescences par plante ainsi que le nombre de fleurs par inflorescence ont été mesurés pour chaque plante lors de chaque observation. La figure 26 présente le résultat de ces comptages. Le nombre d'inflorescences par plante variait entre génotypes ($F_{3,7} = 4,832$, p-val = 0,0396) mais aussi entre plantes d'un même génotype, particulièrement pour les backcross SC2. *S. chilense*-5 et *S. chilense*-6 étaient les deux plantes possédant le nombre d'inflorescences le plus élevé avec respectivement 22 et 23,5 inflorescences en moyenne. On a remarqué un contraste important avec les valeurs obtenues chez les hybrides F2 qui ne dépassaient pas 4,27 inflorescences par plante.

En ce qui concerne le nombre moyen de fleurs par inflorescence, on a observé des valeurs similaires entre les génotypes ($F_{3,7} = 1,928$, p-val = 0,214). Toutes les plantes possédaient entre 3,96 et 11,3 fleurs par inflorescence. Une variabilité entre plantes d'un même génotype a été observée pour *S. chilense* et les backcross SC2.

Paramètres de rendement

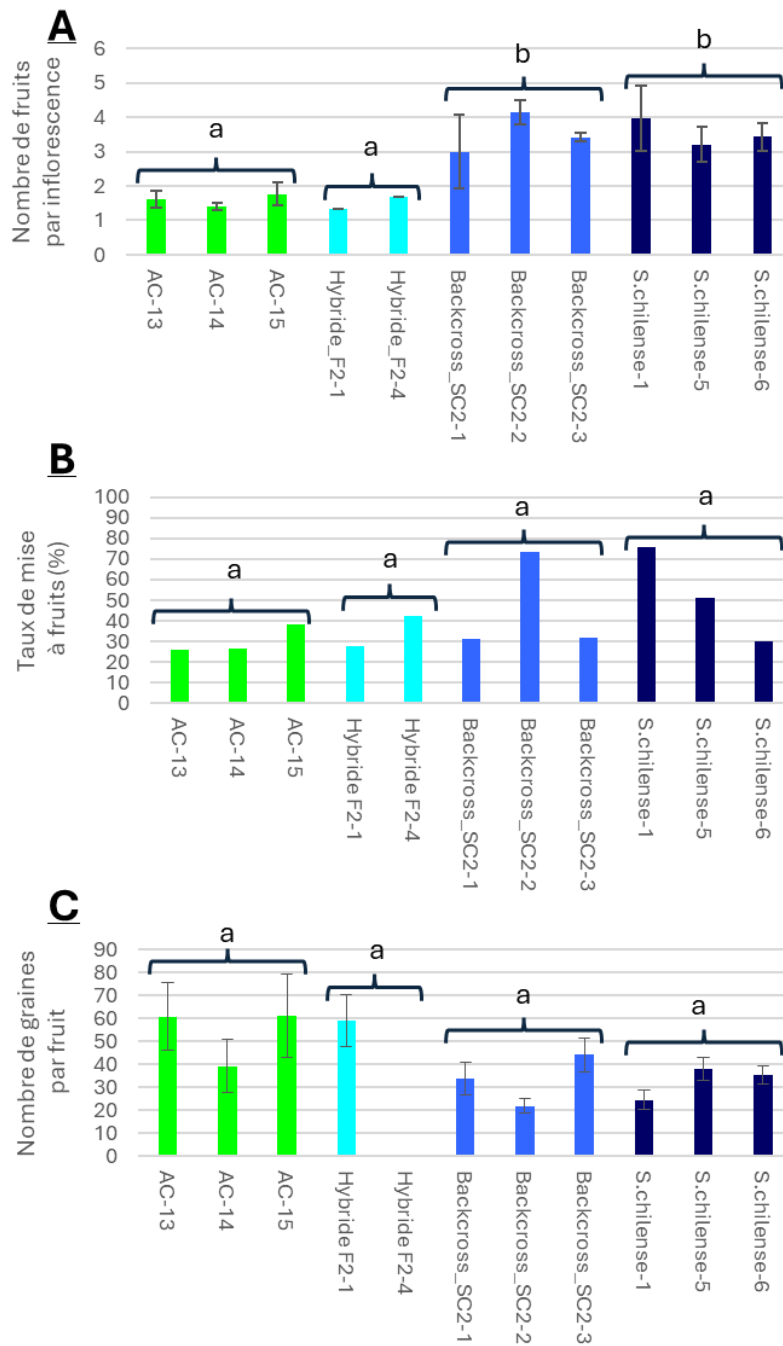


Figure 27 : Nombre de fruits par inflorescence (A), taux de mise à fruits (%) (B), nombre de graines par fruit (C) pour chaque plante des quatre génotypes. Les génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Le nombre de fruits par inflorescence variait entre génotypes et était plus élevé chez les backcross SC2 et les plantes de *S.chilense* en comparaison avec les plantes *S. lycopersicum* et les hybrides F2 ($F_{3,7} = 22,35$, $p\text{-val} = 0,000582$). La plante backcross SC2-2 était la plante possédant en moyenne le nombre de tomates par inflorescence le plus élevé avec une valeur de 4,15, suivi de près par la plante *S. chilense*-1 et ses 3,96 tomates par inflorescence (Figure 27A).

Cependant, le taux de mise à fruits était similaire pour les différents génotypes ($F_{3,7} = 0,834$, $p\text{-val} = 0,516$). Les plantes backcross SC2-2 et *S. chilense*-1 étaient les deux seules plantes à atteindre des taux de mise à fruits supérieurs à 70% (Figure 27B).

Le nombre de graines par fruit ne variait pas significativement entre génotypes ($F_{3,6} = 3,605$, $p\text{-val} = 0,085$). À noter que lors de la période de prise de mesure du nombre de graines par fruit, aucune tomate n'était présente à cet instant chez l'hybride F2-4 ce qui explique l'absence de données pour cette plante. Pour les tomates contenant des graines, entre 20 et 60 graines ont été observées par fruit. Les plantes contenant le plus de graines par fruit étaient les plantes *S. lycopersicum* AC-13 et AC-15 qui contenaient respectivement 60,8 et 61,2 graines par fruit, ainsi que la plante hybride F2-1 et ses 59 graines en moyenne par fruit (Figure 27C).



Figure 28 : Morphologie des fruits des différents génotypes.

La figure 28 représente la morphologie des fruits en fonction du génotype avec un continuum de la taille des tomates chez les hybrides F2 en comparaison des morphologies observées chez *S.chilense* et *S.lycopersicum*.

Comportement de visite des insectes

Les insectes visitant les fleurs ont été observés durant de nombreuses heures entre la fin du mois de mai et le début du mois d'octobre 2023. Au total, 45 insectes ont été observés dont 16 *Bombus terrestris* et 29 diptères, essentiellement des syrphes.

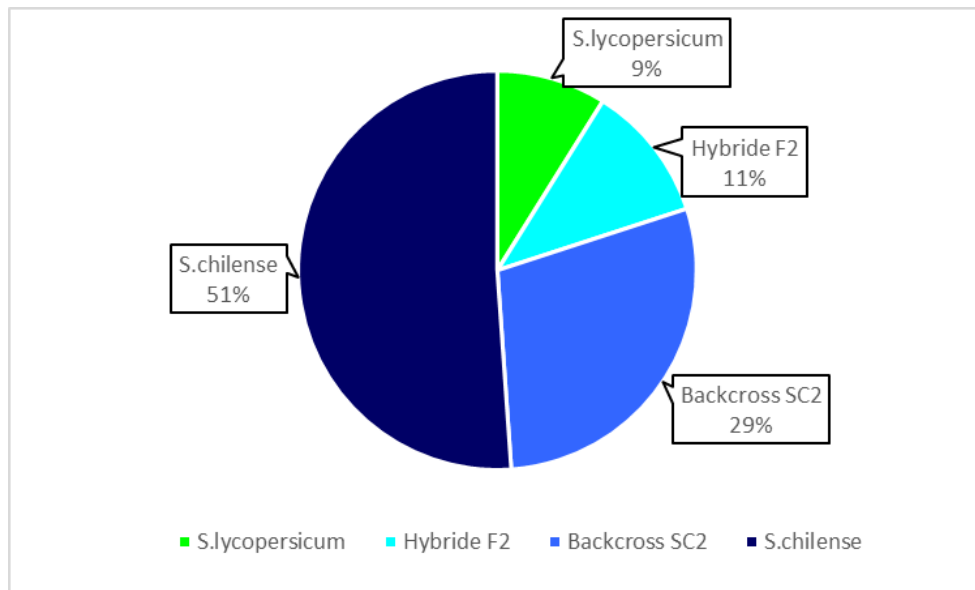


Figure 29 : Proportion du nombre de pollinisateurs observé chez chaque génotype.

Sur un total de 45 insectes visiteurs, plus de la moitié ont été observés sur des fleurs de *S.chilense*, près de 30% sur des fleurs des backcross SC2, 11% sur des fleurs d'hybrides F2 tandis que seuls 9% des insectes visiteurs ont été observés sur des fleurs de *S. lycopersicum* (Figure 29).

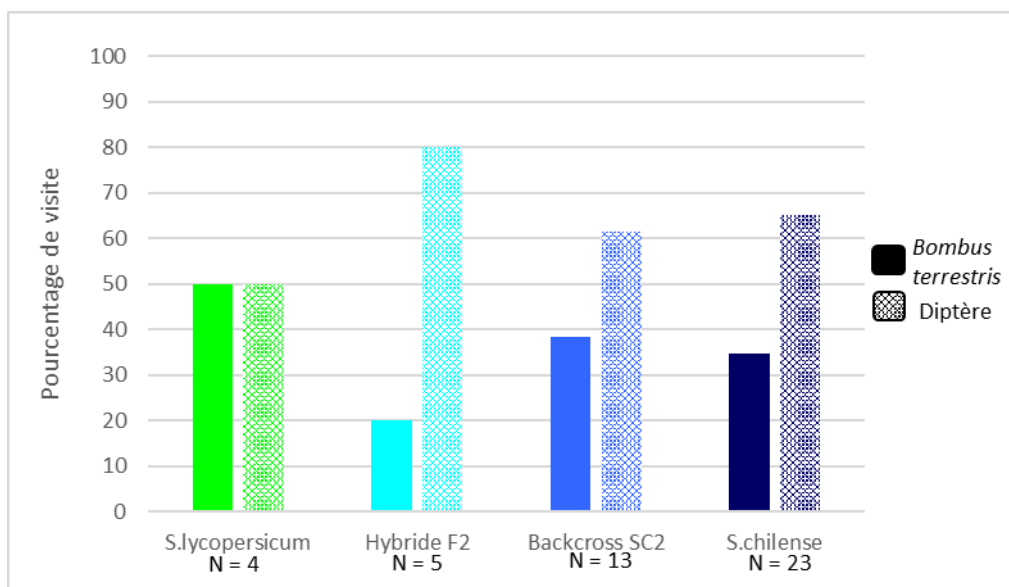


Figure 30 : Pourcentage de visite des deux types de pollinisateurs que sont *Bombus terrestris* et les diptères en fonction du génotype.

Les diptères représentaient 64,5% des insectes observés et les bourdons 35,5%. Concernant la répartition en fonction des génotypes, les observations ont montré un pourcentage de visite par des diptères plus important que par des bourdons, mis à part chez les plantes de *S. lycopersicum* (Figure 30). Bien que 80% des insectes visitant les fleurs des hybrides F2 étaient des diptères, il est important de préciser que ce résultat est basé uniquement sur cinq observations. Les diptères représentaient 60% des visites des fleurs des backcross SC2 et *S.chilense*.

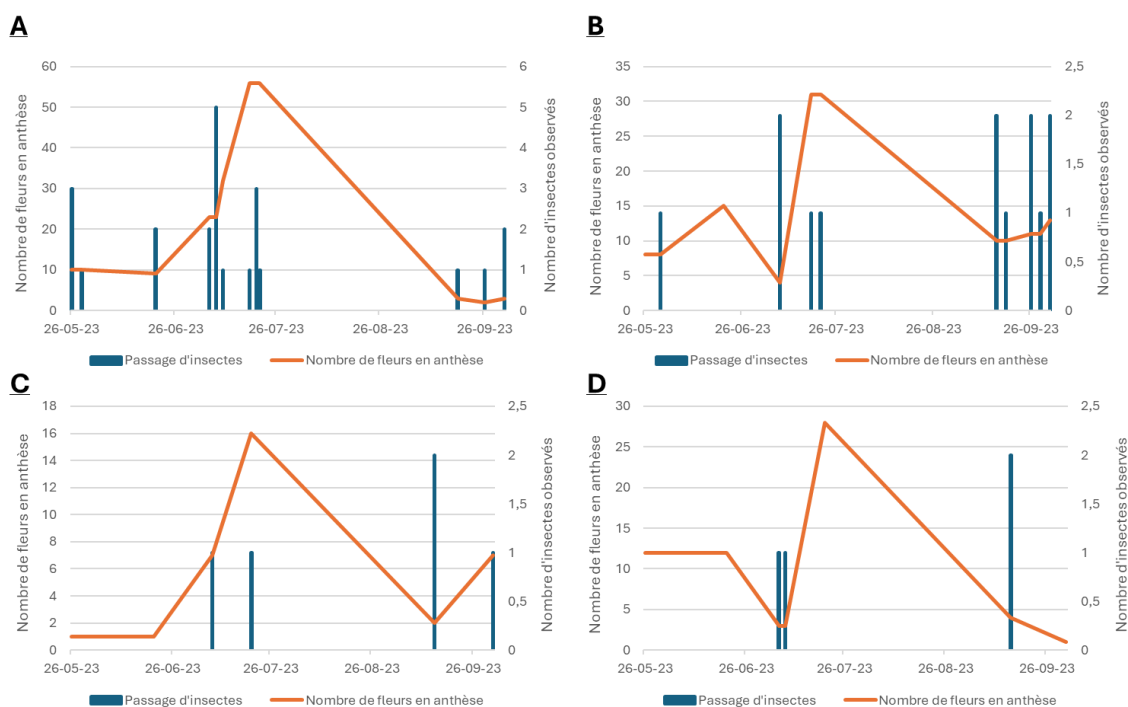


Figure 31 : Suivi du passage des pollinisateurs en fonction des fleurs en anthèse pour chaque génotype. *S.chilense* (A), backcross SC2 (B), hybrides F2 (C), *S.lycopersicum* (D).

La figure 31 présente les visites d'insectes en fonction du nombre de fleurs en anthèse. Chez *S. chilense* (Figure 31A), le pic d'anthèse a débuté le 23 juin, a atteint son apogée le 21 juillet avec 56 fleurs ouvertes et puis a diminué jusqu'au 15 septembre. Le 8 juillet 2023, un pic d'insectes observés a eu lieu avec 5 individus aperçus. C'est donc lors du début du pic de floraison que ce maximum d'insectes sur ces fleurs a été observé.

En ce qui concerne les plantes de backcross SC2 (Figure 31B), les résultats peuvent paraître surprenants avec un décalage observé entre les pics de fleurs en anthèse et les passages d'insectes (hormis les 18 et 21 juillet où deux insectes ont été aperçus alors qu'on atteignait le pic de fleurs en anthèse). En effet, le nombre de fleurs en anthèse a diminué entre début juin et début juillet suivi d'un pic de floraison avec 31 fleurs en anthèse le 21 juillet et puis une diminution jusque début septembre et une stabilisation autour de 10 fleurs en anthèse par la suite. Les pics d'observation d'insectes visiteurs ont eu lieu les 8 juillet, 15 septembre, 26 septembre et 2 octobre.

Une tendance similaire avec un pic de visite d'insecte inverse du pic de floraison a été observée chez les hybrides F2 (Figure 31C) avec cependant cette fois-ci beaucoup moins d'individus observés, et donc une interprétation des résultats plus risquée avec une situation représentant certainement très peu la réalité. Un premier pic de floraison a été observé le 20 juillet avec 16 fleurs en anthèse et un deuxième le 2 octobre avec 7 fleurs en anthèse. Le maximum d'insectes a été observé le 14 septembre.

Enfin, en ce qui concerne les quatre observations réalisées chez les plantes de *S.lycopersicum* (Figure 31D), la présence d'insectes était plus importante lorsque le nombre de fleurs en anthèse allait seulement augmenter. En effet, les deux observations réalisées les 6 et 8 juillet se sont donc déroulées juste avant qu'un pic de fleurs ouvertes ne soit atteint le 20 juillet avec 28 fleurs en anthèse.

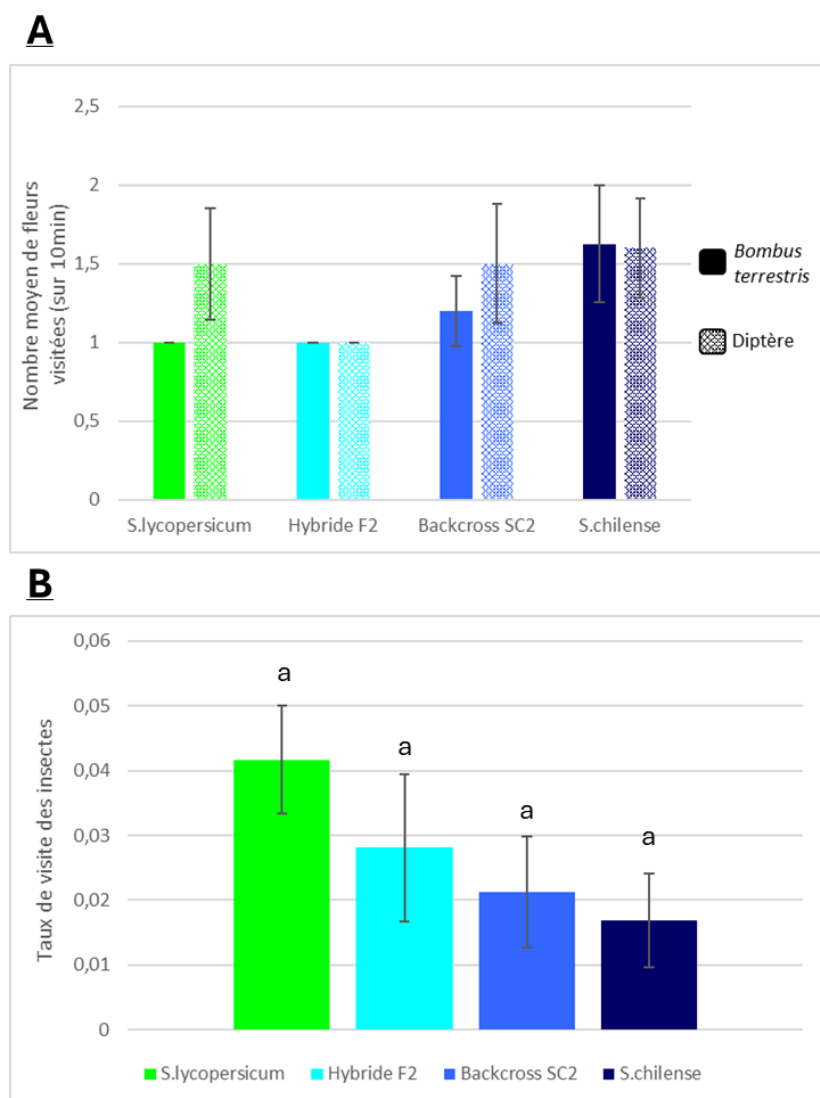


Figure 32 : Nombre moyen de fleurs visitées lors du passage d'un des deux types de pollinisateurs en fonction du génotype (A) et taux de visite des insectes en fonction des génotypes (B). Les génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Quand on s'intéresse au comportement de visite des insectes, on constate que les diptères visitaient en général plus de fleurs par visite que les bourdons mais que ce nombre reste faible (entre 1 et 1,5 fleurs), et cela, quel que soit l'insecte (*Figure 32A*). Le nombre de fleurs visitées par visite était plus important chez les plantes de *S. chilense* et plus faible chez les hybrides F2.

Le taux de visite était quant à lui similaire entre les génotypes ($F_{3,34} = 2,664$, p-val = 0,0635) et variait entre 0,0168 chez *S. chilense* et 0,0417 chez *S. lycopersicum* (*Figure 32B*).

Discussion

Comparaison phénotypique des espèces parentes, des hybrides et des backcross

La comparaison morphologique montre que *S. lycopersicum* et *S. chilense* diffèrent au niveau de leur croissance végétative. Même si le nombre de feuilles total sur la plante était similaire chez les deux espèces, les plantes de *S. lycopersicum* ont cependant montré un nombre de feuilles plus important au niveau de la tige principale tandis que *S. chilense* avait un port plus buissonnant avec des ramifications plus nombreuses et de grande taille. Ces différences morphologiques entre les deux espèces confirment les observations précédentes de Bigot et al. (2023) et Leclef. (2021). Bien que nous n'ayons pas pu analyser la morphologie des hybrides F1 dans ce travail par manque de graines, les travaux réalisés par Bigot et al. (2023) et Leclef (2021) ont permis d'en apprendre davantage sur leur morphologie. Issus du croisement entre *S. lycopersicum* (AC) X *S. chilense* (SC2) avec un taux de germination relativement faible (40%), les hybrides obtenus ont montré de manière générale des paramètres morphologiques intermédiaires à ceux des parents. Cependant, l'apparence globale des hybrides F1 s'approchait plus de celle de *S. lycopersicum* avec un nombre de feuilles et de ramifications semblable mais une taille encore plus importante (Bigot., 2023 ; Bigot et al., 2023 ; Leclef., 2021). Ces hybrides de première génération ont ensuite été soit croisés entre eux pour former des hybrides de seconde génération (hybride X hybride), soit croisés avec le parent SC2 pour former des backcross SC2 (hybride X *S. chilense*). En ce qui concerne la croissance végétative de ces hybrides F2 et backcross SC2 étudiés dans le cadre de ce mémoire, les plantes ont montré un nombre de feuilles plus restreint que les espèces parentes, et ce, en particulier chez les hybrides F2. Concernant les ramifications, les backcross SC2 en possédaient un nombre équivalent aux parents, contrairement aux hybrides F2, et de plus petite taille. Cependant, si les backcross SC2 avaient un nombre de ramifications similaire à *S. chilense*, leur taille était plus proche de celles de *S. lycopersicum*. Nos résultats montrent donc que les hybrides et les backcross SC2 ont un phénotype végétatif intermédiaire entre les deux espèces parentes mais avec un port ressemblant plus à *S. lycopersicum*. Lors d'autres croisements entre espèces du clade *Lycopersicum*, Ghani et al (2020) observent aussi que les hybrides ont un phénotype végétatif intermédiaire entre les deux parents (Ghani et al., 2020).

La tomate possède une croissance sympodiale lors de laquelle le développement de la tige principale va être stoppé par l'initiation de la première inflorescence après formation d'un nombre limité de feuilles. Cette inflorescence sera ensuite déplacée latéralement suite à la formation du bourgeon axillaire situé à l'aisselle de la dernière feuille formée. De ce bourgeon débutera un segment sympodial formé de quelques feuilles qui conduira à la formation d'une nouvelle inflorescence, avant que ce processus ne se poursuive indéfiniment (Quinet et al., 2006 ; Quinet et Kinet., 2007). La croissance végétative et le développement reproductif vont ainsi alterner régulièrement tout au long de l'existence de la plante (Quinet., 2005). Ce type de développement sympodial est observé tant chez *S. lycopersicum* que chez *S. chilense*. Par contre, nous avons observé que le nombre de feuilles par segment sympodial était plus élevé chez *S. chilense* que chez *S. lycopersicum* bien que le nombre de feuilles dans le segment initial soit similaire. Bigot et al. (2023) ont aussi observé un nombre plus important de feuilles par segment sympodial chez *S. chilense* avec également une différence non significative. Le nombre d'inflorescences sur la tige principale était plus faible chez *S. chilense* que chez *S. lycopersicum*, ce qui a été observé tant dans notre étude que dans celle de Bigot et al. (2023). Par contre, le nombre de feuilles par segment sympodial était soit similaire à *S. lycopersicum*, soit intermédiaire entre les deux parents pour les hybrides F2 et les backcross SC2. Concernant le nombre d'inflorescences sur la tige principale, Bigot et al. (2023) et Leclef (2021) ont montré qu'il était intermédiaire entre les deux parents pour les hybrides F1 et une observation similaire a été faite dans le cadre de ce mémoire pour les hybrides F2 et les backcross SC2.

Les deux espèces parentes diffèrent également par le nombre de fleurs par inflorescence, qui est plus élevé chez *S. chilense* que chez *S. lycopersicum*, étant donné que les inflorescences sont plus ramifiées chez la première (Peralta et al. 2008). Nous avons en effet observé que *S. chilense* et les backcross SC2 avaient un nombre de fleurs par inflorescence nettement plus important que *S. lycopersicum* alors que les hybrides F2 avaient un nombre de fleurs par inflorescence intermédiaire, comme observé chez les hybrides F1 (Bigot., 2023 ; Leclef., 2021). Concernant la morphologie des organes floraux, bien que l'aire des sépales et des ovaires soit plus importante chez la tomate cultivée que chez *S. chilense*, la situation inverse a été observée pour l'aire et la longueur des styles. La taille des sépales était intermédiaire entre les deux espèces parentes pour les hybrides F1 (Bigot., 2023 ; Leclef., 2021) et F2 mais similaire à celle de *S. chilense* pour les backcross SC2. Par contre, la longueur du style était similaire à celle de *S. chilense* tant chez les backcross SC2 que chez les hybrides F1 (Bigot., 2023 ; Leclef., 2021) et F2. Il en résulte une

exsertion du style hors du cône d'étamines pour ces 4 génotypes contrairement à *S. lycopersicum*, comme observé précédemment pour *S. chilense* (Moreels., 2022). Une exsertion du style est observée chez plusieurs espèces de tomate allogames (Shang et al., 2021). En plus de l'exsertion du style, les deux espèces parentes diffèrent par la quantité de pollen produit. Comme lors de l'étude menée par Bigot (2023), nos résultats ont montré un nombre de grains de pollen par anthère plus faible chez *S. lycopersicum* que chez *S. chilense*. Bigot et al. (2023) ont aussi observé que les hybrides F1 possédaient un nombre de grains de pollen par anthère plus proche de celui du parent *S. chilense* (Bigot., 2023). Dans notre étude, les hybrides F2 ainsi que les backcross SC2 ont montré un nombre de grains de pollen intermédiaire aux parents avec cependant une viabilité pollinique très faible chez les hybrides F2.

Concernant les fruits, *S. lycopersicum* produit de gros fruits rouges tandis que *S. chilense* produit de petits fruits verts à pourpres (Bigot et al., 2023, Peralta et al., 2008). D'après Bigot et al. (2023) et Leclef (2021), ceux des hybrides F1 étaient semblables à ceux de *S. chilense* de par leur petite taille et leur couleur verte. Nous avons observé que les fruits des backcross SC2 étaient aussi similaires à ceux de *S. chilense* tandis que ceux des hybrides F2 avaient une taille intermédiaire entre les deux espèces parentes. Cependant, le nombre de graines par fruit chez les hybrides F1 était réduit comparé aux plantes parentes (Bigot et al., 2023 ; Quinet et al., 2019). Cette réduction des graines malgré une fertilité florale semblable à celle des parents pourrait être due à une dépression endogamique ou aux barrières de reproduction présentes dans le clade des tomates (Bigot et al., 2023). Lors de mon étude, c'est dans les imposants fruits rouges de *S. lycopersicum* que le nombre de graines le plus important a été trouvé, même si la différence n'était pas significative. Les plantes auto-compatibles ont donc montré un nombre de graines par fruit supérieur à celui obtenu chez les plantes réalisant la pollinisation croisée, ce qui est contredit dans la littérature de par l'effet bénéfique des pollinisateurs (Ahmad et al., 2015 ; Toni et al., 2021). Il est à noter que la pollinisation par les insectes n'a peut-être pas été optimale dans notre étude étant donné le faible nombre d'insectes observés visitant les fleurs.

En utilisant les données florales dans la confection d'une ACP, nous nous sommes rendu compte d'une distinction assez nette entre les plantes de *S. lycopersicum* et les autres génotypes. Cette absence de continuum avec les intermédiaires résultants s'explique majoritairement par la forte corrélation des variables de l'exsertion du style, du nombre de grains de pollen et de l'aire des sépales par rapport à la première dimension. La différenciation entre les plantes backcross SC2

et les hybrides F2 s'explique quant à elle principalement par la viabilité pollinique et l'aire des pétales. L'arbre phylogénétique construit permet de souligner à nouveau l'isolement des plantes auto-compatibles de *S. lycopersicum* des autres génotypes. Par contre, les plantes backcross SC2 sont plus proches des hybrides F2 ou des *S. chilense* selon les plantes. Cette distinction collerait avec la théorie évolutive indiquant que le passage de l'allogamie à l'autogamie se serait déroulé dans un premier temps par la perte de l'auto-incompatibilité, suivie par l'exsertion du style dans le clade de la tomate (Chen et al., 2007). De plus, comme indiqué par Vosters et al. (2014), on retrouve une variabilité des traits floraux plus importante chez les plantes auto-compatibles que chez les plantes auto-incompatibles au sein des espèces de tomates sauvages. Cela pourrait s'expliquer par une diversité de stratégies reproductives plus importante chez les plantes auto-compatibles. Nos résultats montrent donc clairement une différence morphologique au niveau des fleurs entre les plantes auto-compatibles de *S. lycopersicum* et les plantes auto-incompatibles *S. chilense*, les hybrides et les backcross SC2 et le rôle clé de l'exsertion du style dans ce contexte. En effet, la stratégie de reproduction des espèces de tomates dépend du degré d'exsertion du stigmate (Shang et al., 2021).

Auto-incompatibilité et exsertion du style chez la tomate

L'auto-incompatibilité dans le clade de la tomate est de type gamétophytique et est contrôlée par le locus S (Broz et al. 2021, Jewell et al., 2020). Il est connu que l'auto-compatibilité chez *S. lycopersicum* est due notamment à une mutation dans le déterminant femelle, la S-RNase, rendant la protéine non fonctionnelle (Bigot et al., 2023 ; Moreels et al., 2023). Par contre, chaque plante de *S. chilense* a deux S-allèles fonctionnels, ce qui conduit à son auto-incompatibilité (Moreels., 2023). Dans le cadre de son mémoire, Moreels (2022) a identifié les deux S-allèles de la plante *S. chilense* SC2 utilisée comme parent dans nos expériences. Il s'agit des S-allèles S10 et S16. Par la suite, Defalque (2023) a dessiné des primers spécifiques pour ces deux S-allèles qui ont été utilisés dans le cadre de ce mémoire pour identifier les allèles d'auto-incompatibilité des backcross SC2 et des hybrides F2 (Defalque., 2023). Nos résultats ont montré que 3 hybrides F2 (hybrides F2-1 & 2 & 3) portaient uniquement l'allèle S16, alors que les plantes hybrides F2-4 & 5, étaient quant à elles hétérozygotes S10/S16. Ceci signifie que les trois premières plantes n'avaient qu'un allèle d'auto-incompatibilité, l'autre allèle venant de *S. lycopersicum* et codant pour une S-RNase non fonctionnelle tandis que les deux autres hybrides F2 avaient deux allèles d'auto-incompatibilité venant de leur parent *S. chilense* SC2. Concernant

les backcross SC2, la plante backcross SC2-1 a été identifiée comme hétérozygote S10/S16, portant les deux allèles du parent *S. chilense* SC2, alors que les deux autres plantes (backcross SC2-2 & 3) portaient uniquement l'allèle S16 hérité de *S. chilense*, l'autre allèle étant celui non fonctionnel de *S. lycopersicum*. Ceci suggère que tous les hybrides F2 et backcross SC2 analysés dans le cadre de ce travail étaient auto-incompatibles. En effet aucun hybride F2 portant les deux allèles non fonctionnels de *S. lycopersicum* n'a été identifié. La présence d'un seul S-allèle fonctionnel est suffisant pour induire une auto-incompatibilité chez le clade de la tomate, comme observé chez les hybrides F1 dans le cadre des mémoires de Moreels (2022) et Defalque (2023). Nous n'avons cependant pas vérifié l'auto-incompatibilité des hybrides F2 et des backcross SC2 par croisement dans le cadre de ce mémoire mais aucun fruit n'a été produit en serres avant de sortir les plantes alors que les plantes *S. lycopersicum* avaient déjà développé des fruits.

Bigot (2023) et Leclef (2021) ont démontré l'auto-incompatibilité chez les hybrides F1. En effet, lors de l'étude menée par Bigot (2023), l'auto-pollinisation des hybrides F1 avait mené à un arrêt du développement du tube pollinique dans le style, suggérant une auto-incompatibilité. L'analyse génétique a montré que les hybrides possédaient chacun un des S-allèles de *S. chilense* (S10 ou S16) et un allèle non fonctionnel venant de *S. lycopersicum* (Moreels 2022, Defalque 2023). Par contre le croisement entre des plantes hybrides F1 portant des S-allèles différents était possible et a permis d'obtenir les hybrides F2 étudiés dans ce mémoire. De même, les backcross entre les hybrides F1 et *S. chilense* SC2 n'étaient possibles qu'en utilisant les hybrides comme parent femelle et seuls les grains de pollen possédant un S-allèle différent de l'hybride ont pu développer un tube pollinique. Il serait intéressant d'étudier la croissance des tubes polliniques lors de croisements entre hybrides F2 et lors de backcross avec les espèces parentes pour mieux caractériser leur degré de compatibilité et les mécanismes sous-jacents. En effet, les expériences réalisées par Bigot (2023) ont montré qu'en considérant le mécanisme d'incompatibilité unilatérale, le tube pollinique n'était pas toujours rejeté à la même position dans le style (Bigot., 2023). Ceci rend compte du fait que la force de rejet du pollen est dépendante de l'espèce et des différents facteurs génétiques impliqués (Bigot., 2023). Le fait que la croissance du tube pollinique soit inhibée à des stades de développement variés dans le style lors de croisements liés à l'auto-incompatibilité gamétophytique ou d'incompatibilité unilatérale signifie que le contrôle de l'IU n'est pas uniquement lié aux S-RNases. Le mécanisme d'incompatibilité unilatérale est donc gouverné par d'autres mécanismes qu'uniquement le S-locus (Bigot., 2023).

Un lien étroit entre auto-incompatibilité et exsertion du style a été mis en évidence chez le clade de la tomate (Shang et al., 2021). Les résultats obtenus lors de ce mémoire et lors des mémoires antérieurs au laboratoire (Leclef, 2021 ; Moreels, 2022 ; Defalque 2023) montrent en effet que toutes les plantes présentant une exsertion du style tant chez *S. chilense* que chez les hybrides F1, F2 et les backcross SC2 possédaient au moins un S-allèle fonctionnel et seraient auto-incompatibles. Le passage de l'allogamie à l'autogamie chez la tomate s'explique généralement dans un premier temps par la perte de l'auto-incompatibilité lors de la mutation du S-locus, suivi de la réduction de l'exsertion du stigmate (Chen et al., 2007 ; Vosters et al., 2014). De manière générale, ce passage de la reproduction croisée à l'auto-pollinisation va nécessiter des changements morphologiques floraux en plus de la perte de l'auto-incompatibilité (Vosters et al., 2014). Le locus à caractère quantitatif nommé *SE 2.1* (*STYLE 2.1*) et localisé sur le chromosome 2 serait ainsi responsable des principaux changements structuraux chez la fleur provoquant le passage des fleurs allogames aux fleurs autogames (Chen et al., 2004 et 2007). Ce gène est à l'origine de la régulation de l'élongation des cellules dans les styles en développement (Chen et al., 2007 ; Vosters et al., 2014). En effet, les études menées par Chen et al. (2007), ont montré qu'il ne s'agissait pas d'un nombre de cellules plus important qui était responsable de l'exsertion, mais plutôt d'une élongation des cellules du style entre la 91^{ème} et la 130^{ème} cellule (Chen et al., 2007). Shang et al. (2021) ont découvert un autre gène impliqué dans l'exsertion du stigmate, nommé *SE3.1* et responsable de la conversion des stigmates de taille moyenne en stigmates insérés. La découverte d'un contrôle de l'exsertion du style par différents gènes a pu être réalisée en montrant qu'une mutation au niveau du gène *STYLE 2.1* pouvait conduire à un rétrécissement du stigmate, alors qu'une surexpression du gène ne conduisait pas à son élongation (Chen et al., 2007). Ainsi, aussi bien *SE3.1* que *STYLE 2.1* sont responsables de la transition vers l'insertion du stigmate au cours de l'histoire. *STYLE 2.1* régulerait la première étape de la transition, alors que *SE3.1* régulerait la seconde (Cheng et al., 2021). Cela signifierait que la région régulatrice de 12 kb du locus *STYLE 2.1* serait responsable dans un premier temps de la variation allélique de la longueur du style. Les plantes avec un allèle de délétion à ce locus possèderaient donc des styles significativement plus courts (Vosters et al., 2014). Ainsi, pour les plantes auto-incompatibles avec une exsertion du stigmate réduite (comme pour la plante backcross SC2-1), on pourrait penser qu'un allèle de délétion impacte la régulation de *SE3.1*, responsable de la première étape vers l'insertion des stigmates. Cependant, il n'est pas à exclure que d'autres gènes interviendraient dans la régulation de l'exsertion du style et/ou dans la morphologie florale chez la tomate.

Bernacchi et Tanksley (1997) ont identifié que le S-locus était positionné sur le chromosome 1 chez la tomate et que cette région abrite également la plupart des LCQ majeurs pour plusieurs caractères floraux importants pour la biologie de la pollinisation (par exemple, le nombre et la taille des fleurs), ce qui suggère l'existence d'un complexe de gènes contrôlant à la fois les mécanismes génétiques et morphologiques du contrôle de la reproduction sur le chromosome 1 (Bernacchi et Tanksley., 1997). Quinet (2005) a aussi suggéré l'existence d'un complexe de gènes régulant la morphologie florale autour du S-locus chez la tomate mais l'exsertion du style ne semble pas en faire partie. Par contre, cette région contrôlerait le nombre de fleurs par inflorescence et la taille des sépales et des pétales ainsi que des étamines et de l'ovaire (Quinet, 2005). De plus amples études sont donc nécessaires pour mieux comprendre le lien entre la perte d'auto-incompatibilité et la perte de l'exsertion du style.

Les variations dans la morphologie florale impactent inévitablement le système de reproduction de la plante. Un stigmate exserté au-dessus du cône d'étamines facilite la réception de pollen provenant de plantes voisines. Dans le cas d'un stigmate inséré dans le cône d'étamines, l'auto-pollinisation sera favorisée. Chez la tomate cultivée, trois gènes homéodomaine-leucine zipper IV (*HD-Zip IV*) ont été identifiés comme étant actifs dans le phénomène de cléistogamie. Lors de ce type d'auto-pollinisation, un cône d'anthères va être formé autour du stigmate (Wu et al., 2024). *Wo*, *HD7* et *HDL7* vont ainsi faciliter la formation de trichomes permettant l'imbrication des anthères les unes aux autres (Gao Y et al., 2015 ; Wu et al., 2024).

Ces gènes *HD-Zip* contrôlent également la régulation de la longueur du style. En effet, il a été prouvé qu'une surexpression de *MTR1* qui est un répresseur des gènes *HD-Zip IV* conduisait à un raccourcissement du style. Selon Wu et al. (2024), le mécanisme de cléistogamie présent chez la tomate cultivée lui permettrait d'augmenter considérablement son taux de mise à fruits en comparaison de la reproduction croisée (Wu et al., 2024). Le phénomène inverse a cependant été observé dans nos résultats, potentiellement dû à un nombre de réplicats trop faible compliquant l'observation d'une tendance. Bien que le taux de mise à fruits fût limité, le nombre de graines par fruit était quant à lui supérieur chez la tomate cultivée que chez les autres génotypes, ce qui est également contredit par la littérature. En effet, selon Toni et al. (2021), la présence des insectes impacte positivement le nombre de graines par fruit (Toni et al., 2021). Le manque de relation existant entre ces deux facteurs pourrait laisser penser que le développement des fruits et des graines dépend en partie de mécanismes différents (Moreels., 2022). Malgré que les fleurs de

tomates aient une dépendance modérée aux insectes pollinisateurs (10 à 40%), leur absence conduit à une réduction non négligeable du rendement (Toni et al., 2021). Bien que la majorité des études menées aient montré un taux de mise à fruits supérieur chez les plantes pollinisées par les insectes, Estay et al. (2001) et Nunes-Silva et al. (2013) n'y ont cependant pas vu d'effet significatif (Toni et al., 2021). Ces résultats laissent croire que l'impact des pollinisateurs est fort dépendant des conditions environnementales et du contexte. En effet, des plantes non protégées du vent pourraient montrer une réduction de l'effet des pollinisateurs sur le taux de mise à fruits (Toni et al., 2021). Bien que les conditions météorologiques aient été prises en compte durant mes observations, il est compliqué de déterminer à quel point le vent a pu avoir un impact sur les résultats observés.

Morphologie florale et attractivité des pollinisateurs chez la tomate

La principale ressource florale des tomates est le pollen, étant donné son absence de production de nectar. Le pollinisateur majeur est le bourdon qui réalise une pollinisation vibratile. Lors de la pollinisation, les bourdons s'accrochent aux fleurs et les font vibrer afin de faire tomber le pollen (De Luca et al., 2013 ; Toni et al., 2021 ; Vallejo-Marín., 2019). Nous avons observé, comme Bigot et al. (2023), que la production de pollen par anthère était généralement plus importante chez *S. chilense* que chez *S. lycopersicum* et que les hybrides et les backcross produisaient une quantité de pollen similaire à *S. chilense*. Le nombre de fleurs par inflorescence était également plus élevé chez *S. chilense* que chez *S. lycopersicum*, ce qui peut aussi être plus attractif pour les pollinisateurs. Le nombre de fleurs par inflorescence chez les hybrides et les backcross était intermédiaire entre les deux espèces parentes et/ou plus proches du nombre observé chez *S. chilense*. Ces différences suggèreraient que les plantes auto-incompatibles seraient plus attractives pour les pollinisateurs que *S. lycopersicum*. En effet, la quantité de ressources florales et le nombre, la position et la couleur des fleurs sont des paramètres qui affectent le comportement de visite des pollinisateurs (Morse et al., 2012). Nos observations d'insectes ont en effet mis en évidence que plus d'insectes étaient observés sur *S. chilense*, dans une moindre mesure sur les backcross SC2 et les hybrides F2 et que les plantes de *S. lycopersicum* étaient les moins visitées. Cependant, le faible nombre d'insectes observé montre que les résultats doivent être interprétés avec prudence et que des observations supplémentaires seraient nécessaires pour tirer des conclusions claires.

Lors de l'observation du comportement des pollinisateurs, une faible activité des bourdons (*Bombus terrestris* L.) a été enregistrée. Il se pourrait que le positionnement des plantes à l'extérieur des serres ait impacté les résultats vu la présence d'Angiospermes potentiellement plus attirantes en termes de ressources nutritives aux alentours. La disponibilité d'autres ressources alimentaires pourrait ainsi impacter fortement la fidélité des pollinisateurs (Quinet et Jacquemart., 2017). Du fait de leur capacité d'exploration qui pouvait dépasser en moyenne 500 m de diamètre autour de leur ruche, les bourdons ont pu être attirés par d'autres plantes plus intéressantes en termes de ressources énergétiques (Walther-Hellwig et al., 2000 ; Wolf et al., 2008). En effet, Walther-Hellwig et al. (2000), ont prouvé que des vols plus lointains pouvaient être favorisés par l'espèce lorsque la récompense nutritive en valait la peine (Walther-Hellwig et al., 2000).

Le positionnement aléatoire des plantes en début d'expérience a également pu jouer sur les observations faites. En effet, il a été prouvé qu'après une première visite, les pollinisateurs avaient tendance à visiter les fleurs de la même plante ou des plantes voisines (Quinet et Jacquemart., 2017). Ce constat amène à se demander si certaines plantes possédant des traits floraux peu attractifs auraient pu augmenter leur taux de visite de par leur positionnement adéquat, à proximité des plantes de *S. chilense* sensées être plus attractives par exemple.

Contrairement aux abeilles qui possèdent un système de communication poussé, les bourdons ne sont quant à eux pas capables de communiquer sur la localisation des ressources les plus avantageuses mais bien sur le type de ressource (Molet et al., 2009 ; Wolf et al., 2008). En plus de l'attractivité liée au nombre de fleurs et aux ressources, les différents cultivars de tomates sont capables d'émettre des odeurs florales variées que les insectes peuvent sentir et communiquer (Ahmad et al., 2015 ; Molet et al., 2009). Morse et al. (2012) ont mis en évidence une préférence de pollinisation chez les bourdons pour les tomates produisant moins de phellandrène et de 2-carène (Morse et al., 2012). Le choix du bourdon peut également dépendre de sa détection des fleurs, ses préférences innées ou encore sa capacité d'apprentissage (Jambrek., 2019). Suite à l'expérience acquise lors du butinage effectué, le pollinisateur aura acquis de nouvelles connaissances. Grâce à leur grande capacité de mémorisation et d'apprentissage, les bourdons vont rapidement faire leur choix en fonction des préférences acquises et non des éléments sensoriels (Jambrek., 2019). Leur comportement d'exploration se base donc sur une première expérience individuelle qui va conduire à une zone de butinage plus importante (Wolf et al., 2008). En fonction des pics de floraison de nos plantes, il a pu y avoir une variation temporelle dans les distances de butinage

parcourues par les bourdons. La variabilité intergénomique du moment de floraison a également pu affecter mes résultats. Il aurait été intéressant de conserver un nombre de fleurs en anthèse similaires entre génotypes afin de pouvoir supprimer le facteur lié au nombre de fleurs par plante pouvant impacter l'attractivité des insectes. Cependant, même s'il aurait été possible de couper certaines fleurs chez les plantes les plus productives pour atteindre des nombres équivalents, il aurait été difficilement réalisable sur un laps de temps plus long de gérer ce facteur.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, le nombre de fleurs en anthèse n'était pas nécessairement corrélé à un nombre d'observations d'insectes plus élevé. En effet, chez les backcross SC2 et les hybrides F2, on a pu observer un décalage temporel entre le pic de floraison et le passage des insectes, avec cependant peu d'observations réalisées. Bien que le manque d'activité des bourdons ne permette de tirer de conclusions claires, c'est bien le génotype de *S. lycopersicum* qui a reçu le moins de visites d'insectes. Le fait que cette espèce auto-compatible capable donc de donner des fruits et des graines sans intervention extérieure n'ait pas attiré de nombreux pollinisateurs pourrait être lié à ses traits morphologiques (Gerszberg et al., 2015). Au contraire, c'est par *S. chilense*, qui nécessite une pollinisation croisée pour former des fruits et des graines que les insectes ont été attirés. Nos résultats suggèrent donc que les plantes nécessitant une pollinisation par les insectes ont des traits floraux et des ressources florales plus attractifs chez le clade de la tomate, bien que des études plus approfondies soient nécessaires pour vérifier un lien entre auto-incompatibilité, traits floraux et pollinisation chez nos plantes.

Conclusion et perspectives

En conclusion, ce mémoire aura permis dans un premier temps d'étendre les connaissances existantes sur les morphologies végétatives et reproductives des espèces fortement étudiées que sont *S. lycopersicum* et *S. chilense*. En effet, par l'étude des ramifications et des feuilles, l'existence d'un port buissonnant chez *S. chilense* aura pu être confirmée. De son côté, la tomate cultivée a montré des surfaces de sépales et d'ovaires supérieures à celles retrouvées chez *S. chilense*, mais également, une insertion du style. L'étude des différents traits floraux chez nos parents ainsi que chez les intermédiaires résultants aura permis de mieux cerner le comportement des pollinisateurs. Les analyses moléculaires réalisées ont confirmé l'héritabilité du caractère de l'auto-incompatibilité au vu des S-allèles S10/S16 retrouvées chez nos hybrides F2 et backcross SC2. Ce qui aura permis, dans une certaine mesure au vu du peu d'observations réalisées, de mieux comprendre les liens existants entre auto-incompatibilité, traits floraux et pollinisation chez nos plantes. Nos résultats ont montré que les plantes auto-incompatibles et nécessitant une pollinisation par les insectes possédaient une exsertion du style et des ressources florales plus attractives que *S. lycopersicum*, qui est auto-compatible et qui aura été la moins visitée par les pollinisateurs. Par la suite, il serait intéressant de poursuivre les recherches liées à l'existence du complexe de gènes régulant la morphologie florale autour du S-locus chez la tomate (Bernacchi et Tanksley., 1997 ; Quinet., 2005). Cela permettrait de mieux comprendre comment la tomate cultivée peut développer une insertion du style, mais avoir certains traits floraux intéressants pour la pollinisation.

Dans un objectif d'amélioration de cette étude, il aurait pu être intéressant d'effectuer la dernière section de mon travail sur la pollinisation dans une chambre de vol. En effet, cet espace clos permettrait d'empêcher la tentation pour les bourdons de se diriger vers des plantes plus attractives en termes de ressources nutritives et donc de mieux comprendre la réalité de nos résultats avec un taux de visite supérieur. Ensuite, pour aller plus loin dans la compréhension du comportement de pollinisation, prendre en compte l'effet de l'identité du pollinisateur observé aurait pu être une solution. En effet, à l'aide d'un marquage sur les bourdons, les observations auraient permis de confirmer la capacité de mémorisation du pollinisateur dans le cas où il effectuerait plusieurs passages sur une plante intéressante en termes de ressource pollinique. Cette étude aurait pu être davantage complète en ayant l'occasion d'étudier le comportement des pollinisateurs sur les hybrides F1 et les backcross AC. En effet, la vérification des S-allèles chez

les backcross AC avec la possibilité d'avoir des plantes auto-compatibles et d'autres auto-incompatibles aurait rendu l'étude du comportement des pollinisateurs sur ces plantes plus intéressante en comparant leurs traits floraux et leur attractivité. Enfin, de manière générale, augmenter le nombre de réplicats chez les hybrides et les backcross aurait permis une interprétation des résultats plus fiable. En augmentant l'effectif de la population des hybrides, on aurait pu avoir plusieurs lignées et ainsi comparer plusieurs clones.

Bibliographie

1. Ahmad M, Bodlah I, Mehmood K, Sheikh UAA, Aziz MA. Pollination and Foraging Potential of European Bumblebee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) on Tomato Crop under Greenhouse System. *Pak J Zool.* 2015;47.
2. Baek YS, Covey PA, Petersen JJ, Chetelat RT, McClure B, Bedinger PA. Testing the SI × SC rule: Pollen–pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum* section *Lycopersicon*, *Solanaceae*). *Am J Bot.* 2015;102(2):302-11.
3. Baek YS, Royer SM, Broz AK, Covey PA, López-Casado G, Nuñez R, et al. Interspecific reproductive barriers between sympatric populations of wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Am J Bot.* 2016;103(11):1964-78.
4. Bai Y, Lindhout P. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Ann Bot.* 2007;100(5):1085-94.
5. Baijot A. Etude des impacts du stress hydrique et de hausses de températures sur les ressources florales de la bourrache (*Borago officinalis*) et des répercussions possibles sur les relations plantes-pollinisateurs. Faculté des bioingénieurs, Université catholique de Louvain, 2016. Prom. : Jacquemart A-L.
6. Bailes EJ, Ollerton J, Pattrick JG, Glover BJ. How can an understanding of plant–pollinator interactions contribute to global food security? *Curr Opin Plant Biol.* 2015;26:72-9.
7. Barnett JR, Sharma R, Buonauro G, Gillis IM, Rashidzade M, Caicedo AL. Evidence of fruit syndromes in the recently diverged wild tomato clade opens new possibilities for the study of fleshy fruit evolution. *PLANTS PEOPLE PLANET.* 2023;5(6):948-62.

8. Bauer AA, Clayton MK, Brunet J. Floral traits influencing plant attractiveness to three bee species: Consequences for plant reproductive success. *Am J Bot.* 2017;104(5):772-81.
9. Bedinger PA, Chetelat RT, McClure B, Moyle LC, Rose JKC, Stack SM, et al. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod.* 2011;24(3):171-87.
10. Beecher GR. Nutrient Content of Tomatoes and Tomato Products. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;218(2):98-100.
11. Benoit M. From non-self to self: stepwise mutations in transcription factors promote the transition to self-pollination in tomato. *Plant Cell.* 2021;33(10):3183-4.
12. Bergougnoux V. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol Adv.* 2014;32(1):170-89.
13. Bernacchi D, Tanksley SD. An Interspecific Backcross of *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum*: Linkage Analysis and a QTL Study of Sexual Compatibility Factors and Floral Traits. *Genetics.* 1997;147(2):861-77.
14. Bigot S. Salinity impact on flowering and reproduction of *Solanum lycopersicum* and its wild halophyte relative *Solanum chilense*. UCL - Université Catholique de Louvain; 2023.
15. Bigot S, Leclef C, Rosales C, Martínez JP, Lutts S, Quinet M. Comparison of the salt resistance of *Solanum lycopersicum* x *Solanum chilense* hybrids and their parents. *Front Hortic.* 2023;2.

16. Blanchard-Gros R, Bigot S, Martinez JP, Lutts S, Guerriero G, Quinet M. Comparison of Drought and Heat Resistance Strategies among Six Populations of *Solanum chilense* and Two Cultivars of *Solanum lycopersicum*. *Plants*. 2021;10(8):1720.

17. Broz AK, Bedinger PA. Pollen-Pistil Interactions as Reproductive Barriers. *Annu Rev Plant Biol*. 2021;72(1):615-39.

18. Brukhin, V., Hernould, M., Gonzalez, N., Chevalier, C., & Mouras, A. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. Sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*. 2003 ;15(6), 311-320.

19. Büchi L, Vuilleumier S. Coexistence of Specialist and Generalist Species Is Shaped by Dispersal and Environmental Factors. *Am Nat*. 2014.

20. Bugin G, Lenzi L, Ranzani G, Barisan L, Porrini C, Zanella A, et al. Agriculture and Pollinating Insects, No Longer a Choice but a Need: EU Agriculture's Dependence on Pollinators in the 2007–2019 Period. *Sustainability*. 2022;14(6):3644.

21. Burkle LA, Alarcón R. The future of plant–pollinator diversity: Understanding interaction networks across time, space, and global change. *Am J Bot*. 2011;98(3):528-38.

22. Caliskan M. Genetic Diversity in Plants. BoD – Books on Demand; 2012. 514 p.

23. Chen KY, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD. Changes in Regulation of a Transcription Factor Lead to Autogamy in Cultivated Tomatoes. *Science*. 2007;318(5850):643-5.

24. Chen KY, Tanksley SD. 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*. 2004;168(3):1563-73.

25. Cheng M zhen, Gong C, Zhang B, Qu W, Qi H nan, Chen X ling, et al. Morphological and anatomical characteristics of exserted stigma sterility and the location and function of SLst (*Solanum lycopersicum* Long styles) gene in tomato. *Theor Appl Genet*. 2021;134(2):505-18.

26. Chittka L, Raine NE. Recognition of flowers by pollinators. *Curr Opin Plant Biol*. 2006;9(4):428-35.

27. Cooley H, Vallejo-Marín M. Buzz-Pollinated Crops: A Global Review and Meta- analysis of the Effects of Supplemental Bee Pollination in Tomato. Strange J, éditeur. *JEcon Entomol*. 2021;114(2):505-19.

28. Defalque C. Contrôle génétique de l'auto-incompatibilité et de l'incompatibilité unilatérale chez la tomate. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2023. Prom. : Quinet M.

29. Delgado T, Leal LC, El Ottra JHL, Brito VLG, Nogueira A. Flower size affects bee species visitation pattern on flowers with poricidal anthers across pollination studies. *Flora*. 2023;299:152198.

30. De Luca PA, Vallejo-Marín M. What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Curr Opin Plant Biol*. 2013;16(4):429-35.

31. Deprá MS, Delaqua GG, Freitas L, Gaglianone MC. Pollination deficit in open-field tomato crops (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) in Rio de Janeiro state, Southeast Brazil. *J Pollinat Ecol*. 2014;12:1-8.

32. Dingley A, Anwar S, Kristiansen P, Warwick NWM, Wang CH, Sindel BM, et al. Precision Pollination Strategies for Advancing Horticultural Tomato Crop Production. *Agronomy*. 2022;12(2):518.
33. Dorais M, Ehret DL, Papadopoulos AP. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem Rev*. 2008;7(2):231-50.
34. Doré M, Fontaine C, Thébault E. Relative effects of anthropogenic pressures, climate, and sampling design on the structure of pollination networks at the global scale. *GlobChange Biol*. 2021;27(6):1266-80.
35. Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol*. 2013;198(1):16-32.
36. Erickson E, Junker RR, Ali JG, McCartney N, Patch HM, Grozinger CM. Complex floral traits shape pollinator attraction to ornamental plants. *Ann Bot*. 2022;130(4):561-77.
37. FAOSTAT. Consulté le 13 août 2024, à l'adresse <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL>.
38. Faraone I, Russo D, Ponticelli M, Candido V, Castronuovo D, Cardone L, et al. Preserving Biodiversity as Source of Health Promoting Compounds: Phenolic Profile and Biological Activity of Four Varieties of *Solanum lycopersicum* L. *Plants*. 2021;10(3):447.
39. Fernandes M de O, Bianchi PA, Silva LRA da, Vianna LS, Santos EA, Moulin MM. Morpho-agronomic characterization and analysis of genetic divergence among accessions of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Ciênc Rural*. 2018;48:20180433.

40. Frankie G, Thorp R. Pollination and Pollinators. *Encycl Insects*. 2009;813-9.
41. Fujii S, Kubo K ichi, Takayama S. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nat Plants*. 2016;2(9):1-9.
42. Fulton T.M., Chunwongse J. & Tanksley S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Bio.* 1995 ; Reporter 13: 207-9.
43. Ganie SA, Nisar T, Rehman SA, John A, Paray MA, Lone JA, et al. Impact of climate change on insect pollinators and its implication for food security: A review. *SKUAST J Res*. 2024;26(1):1-14.
44. Gao M, Qu H, Gao L, Chen L, Sebastian RSJ, Zhao L. Dissecting the mechanism of *Solanum lycopersicum* and *Solanum chilense* flower colour formation. Leiss K, éditeur. *Plant Biol*. 2015;17(1):1-8.
45. Gao MF, Peng HZ, Li SS, Wang XL, Gao L, Wang MH, et al. Insight into flower diversity in *Solanum lycopersicum* and *Solanum chilense* using comparative biological approaches. *Can J Plant Sci*. 2015;95(3):467-78.
46. Gao Y, Gao S, Xiong C, Yu G, Chang J, Ye Z, et al. Comprehensive analysis and expression profile of the homeodomain leucine zipper IV transcription factor family in tomato. *Plant Physiol Biochem*. 2015;96:141-53.
47. Gérard M, Vanderplanck M, Wood T, Michez D. Global warming and plant–pollinator mismatches. *Emerg Top Life Sci*. 2020;4(1):77-86.

48. Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, Kononowicz AK. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*. 2015;120(3):881-902.
49. Ghani M. A., Abbas M. M., Amjad M., Ziaf K., Ali B., Shaheen T., et al. Production and characterisation of tomato derived from interspecific hybridisation between cultivated tomato and its wild relatives. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2020 ;95, 506–520.
50. Gharbi E. Interactions entre l'acide salicylique, les polyamines et l'éthylène chez *Solanum lycopersicum* et sa parente sauvage *Solanum chilense* exposées à la toxicité saline. UCL - Université Catholique de Louvain; 2017.
51. Gharbi E, Martínez JP, Benahmed H, Hichri I, Dobrev PI, Motyka V, et al. 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 Sci.* 2017;258:77-89.
52. Gómez-Ruiz EP, Lacher Jr. TE. Climate change, range shifts, and the disruption of a pollinator-plant complex. *Sci Rep.* 2019;9(1):14048.
53. Gu D, Andreev K, Dupre ME. Major Trends in Population Growth Around the World. *ChinaCDC Wkly.* 2021;3(28):604-13.
54. Hoover SER, Ladley JJ, Shchepetkina AA, Tisch M, Giese SP, Tylianakis JM. Warming, CO₂, and nitrogen deposition interactively affect a plant-pollinator mutualism. *Ecol Lett.* 2012;15(3):227-34.
55. Hughes I. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol Evol.* 2000;15(2):56-61.

56. Igic B, Lande R, Kohn JR. Loss of Self-Incompatibility and Its Evolutionary Consequences. *Int J Plant Sci.* 2008;169(1):93-104.
57. Igic B, Smith WA, Robertson KA, Schaal BA, Kohn JR. Studies of self-incompatibility in wild tomatoes: I. S-allele diversity in *Solanum chilense* Dun. (Solanaceae). *Heredity.* 2007;99(5):553-61.
58. Ingram, M., Nabhan, G., & Buchmann, S. L. Our forgotten pollinators : Protecting the birds and bees. *Global Pesticide Campaigner.* 1996 ; 6 (4), 1–8.
59. IPCC. Consulté le 1^{er} mai 2024 à l'adresse <https://www.ipcc.ch/languages-2/francais/>.
60. Jambrek A. L'IMPACT D'UNE ÉLEVATION DES TEMPÉRATURES SUR LES RELATIONS PLANTES-POLLINISATEURS Avec pour modèle d'étude les relations existant entre *Borago officinalis* et *Bombus terrestris*. Faculté des bioingénieurs, Université catholique de Louvain, 2019. Prom : Jacquemart A-L.
61. Jewell CP, Zhang SV, Gibson MJS, Tovar-Méndez A, McClure B, Moyle LC. Intraspecific Genetic Variation Underlying Postmating Reproductive Barriers between Species in the Wild Tomato Clade (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *J Hered.* 2020;111(2):216-26.
62. Kashyap SP, Kumari N, Mishra P, Moharana DP, Aamir M. Tapping the potential of *Solanum lycopersicum* L. pertaining to salinity tolerance: perspectives and challenges. *Genet Resour Crop Evol.* 2021;68(6):2207-33.
63. Katumo DM, Liang H, Ochola AC, Lv M, Wang QF, Yang CF. Pollinator diversity benefits natural and agricultural ecosystems, environmental health, and human welfare. *Plant Divers.* 2022;44(5):429-35.

64. Klatt BK, Burmeister C, Westphal C, Tschardt T, Fragstein M von. Flower Volatiles, Crop Varieties and Bee Responses. PLOS ONE.2013;8(8):e72724.
65. Knight TM, Ashman TL, Bennett JM, Burns JH, Passonneau S, Steets JA. Reflections on, and visions for, the changing field of pollination ecology. Ecol Lett. 2018;21(8):1282-95.
66. Leclef C. Impact d'un stress salin sur la croissance, la reproduction et la physiologie d'hybrides de tomates entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum*. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2021. Prom. : Quinet M.
67. Markova DN, Petersen JJ, Yam SE, Corral A, Valle MJ, Li W, et al. Evolutionary history of two pollen self-incompatibility factors reveals alternate routes to self-compatibility within *Solanum*. Am J Bot. 2017;104(12):1904-19.
68. Meijer D, Doesburg F van, Jungerling L, Weldegergis BT, Kappers IF, Oystaeyen AV, et al. Supplemental far-red light influences flowering traits and interactions with a pollinator in tomato crops. Environ Exp Bot. 2023;213:105438.
69. Molet M, Chittka L, Raine NE. How floral odours are learned inside the bumblebee (*Bombus terrestris*) nest. Naturwissenschaften. 2009;96(2):213-9.
70. Moreels P. Etude des barrières de reproduction entre *Solanum chilense* et *Solanum lycopersicum*. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2022. Prom. : Quinet M.
71. Moreels P, Bigot S, Defalque C, Correa F, Martinez JP, Lutts S, et al. Intra- and inter-specific reproductive barriers in the tomato clade. Front Plant Sci. 2023.

72. Morse A. Floral scent and pollination of greenhouse tomatoes. The Faculty of Graduate Studies, University of Guelph. 2009.
73. Morse A, Kevan P, Shipp L, Khosla S, McGarvey B. The Impact of Greenhouse Tomato (Solanales: Solanaceae) Floral Volatiles on Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae) Pollination. *Environ Entomol.* 2012;41(4):855-64.
74. Okunev RV. Free Amino Acid Accumulation in Soil and Tomato Plants (*Solanum lycopersicum* L.) Associated with Arsenic Stress. *Water Air Soil Pollut.* 2019;230(11):253.
75. Pan C, Ye L, Zheng Y, Wang Y, Yang D, Liu X, et al. Identification and expression profiling of microRNAs involved in the stigma exertion under high-temperature stress in tomato. *BMC Genomics.* 2017;18(1):843.
76. Peralta IE, Spooner D, Knapp S. Taxonomy of Wild Tomatoes and Their Relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst Bot Monogr.* 2008;84:1-186.
77. Quinet M. Genetical control of flowering in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a case study of some key genes regulating flowering time and morphogenesis of reproductive structures. 2005.
78. Quinet M, Angosto T, Yuste-Lisbona FJ, Blanchard-Gros R, Bigot S, Martinez JP, et al. Tomato Fruit Development and Metabolism. *Front Plant Sci.* 2019;10:1554.
79. Quinet M, Dielen V, Batoko H, Boutry M, Havelange A, Kinet JM. Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytol.* 2006;170(4):701-10.

80. Quinet M, Jacquemart AL. Cultivar placement affects pollination efficiency and fruit production in European pear (*Pyrus communis*) orchards. *Eur J Agron.* 2017;91:84-92.
81. Quinet M, Kinet JM. Transition to Flowering and Morphogenesis of Reproductive Structures in Tomato. *Int J Plant Dev Biol.* 2007;1(1):64.
82. Ramiadantsoa T, Hanski I, Ovaskainen O. Responses of generalist and specialist species to fragmented landscapes. *Theor Popul Biol.* 2018;124:31-40.
83. Rech AR, Dalsgaard B, Sandel B, Sonne J, Svenning JC, Holmes N, et al. The macroecology of animal versus wind pollination: ecological factors are more important than historical climate stability. *Plant Ecol Divers.* 2016;9(3):253-62.
84. Ribeiro AP, Silva NFF da, Mesquita FN, Araújo P de CS, Rosa TC, Mesquita-Neto JN. Machine learning approach for automatic recognition of tomato-pollinating bees based on their buzzing-sounds. *PLOS Comput Biol.* 2021;17(9):e1009426.
85. Riccini A, Picarella ME, De Angelis F, Mazzucato A. Bulk RNA-Seq analysis to dissect the regulation of stigma position in tomato. *Plant Mol Biol.* 2021;105(3):263-85.
86. Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa-Tanase K, Fukuda N, et al. TOMATOMA: A Novel Tomato Mutant Database Distributing Micro-Tom Mutant Collections. *Plant Cell Physiol.* 2011;52(2):283-96.
87. Settele J, Bishop J, Potts SG. Climate change impacts on pollination. *Nat Plants.* 2016;2(7):16092.

88. Scaven VL, Rafferty NE. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Curr Zool.* 2013;59(3):418-26.
89. Shang L, Song J, Yu H, Wang X, Yu C, Wang Y, et al. A mutation in a C2H₂-type zinc finger transcription factor contributed to the transition toward self-pollination in cultivated tomato. *Plant Cell.* 2021;33(10):3293-308.
90. Tello J, Montemayor MI, Forneck A, Ibáñez J. A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: evaluation of inter- and intra-cultivar diversity in grapevine. *Plant Methods.* 2018;14(1):3.
91. Thompson JD. How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system? *Oecologia.* 2001;126(3):386-94.
92. Tonosaki K, Osabe K, Kawanabe T, Fujimoto R. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breed Sci.* 2016;66(3):333-49.
93. Toni HC, Djossa BA, Ayenan MAT, Teka O. Tomato (*Solanum lycopersicum*) pollinators and their effect on fruit set and quality. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2021;96(1):1-13.
94. Tovar-Méndez A, Kumar A, Kondo K, Ashford A, Baek YS, Welch L, et al. Restoring pistil-side self-incompatibility factors recapitulates an interspecific reproductive barrier between tomato species. *Plant J.* 2014;77(5):727-36.
95. Vallejo-Marín M. Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers. *New Phytol.* 2019;224(3):1068-74.

96. Vallejo-Marín M. How and why do bees buzz? Implications for buzz pollination. Bauer U, éditeur. *J Exp Bot.* 2022;73(4):1080-92.
97. Viana BF, Boscolo D, Neto E M, Lopes L, Lopes A, Ferreira P, et al. How well do we understand landscape effects on pollinators and pollination services? *J Pollinat Ecol.* 2012;7.
98. Vosters SL, Jewell CP, Sherman NA, Einterz F, Blackman BK, Moyle LC. The timing of molecular and morphological changes underlying reproductive transitions in wild tomatoes (*Solanum sect. Lycopersicon*). *Mol Ecol.* 2014;23(8):1965-78.
99. Walther-Hellwig K, Frankl R. Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *J Appl Entomol.* 2000;124(7-8):299-306.
100. Wheelwright NT, Dukeshire EE, Fontaine JB, Gutow SH, Moeller DA, Schuetz JG, et al. Pollinator Limitation, Autogamy and Minimal Inbreeding Depression in Insect-pollinated Plants on a Boreal Island. *Am Midl Nat.* 2006;155(1):19-38.
101. Willmer P. Ecology: Pollinator–Plant Synchrony Tested by Climate Change. *Curr Biol.* 2012;22(4):R131-2.
102. Wolf S, Moritz RFA. Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie.* 2008;39(4):419-27.
103. Wu M, Bian X, Huang B, Du Y, Hu S, Wang Y, et al. HD-Zip proteins modify floral structures for self-pollination in tomato. *Science.* 2024;384(6691):124-30.

104. Zhao H, Zhang Y, Zhang H, Song Y, Zhao F, Zhang Y, et al. Origin, loss, and regain of self-incompatibility in angiosperms. *Plant Cell*. 2022;34(1):579-96.

Annexes

Annexe S1 : Comparaison des deux conditions de germination utilisées



Annexe S2 : Script Rstudio utilisé pour le comptage des grains de pollen sur le logiciel FIJI (Tello et al., 2018)

//Supplementary material 2_Scenario 0 (S0). PollenCounter Fiji-compatible macro (Tello et al., 2018).

```
dir1 = getDirectory("path to the images"); //Indicate the path to folder containing the image//
format="jpeg";
dir2=dir1;
print(dir1);
list = getFileList(dir1);
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++) {
  showProgress(i+1, list.length);
  open(dir1+list[i]);
  run("Subtract Background...", "rolling=50 light");
  imgName=getTitle();
  imageCalculator("add", imgName, imgName);
  run("Split Channels");
  selectWindow(list[i] + " (red)");
  setAutoThreshold("Default");
  //run("Threshold...");
  call("ij.plugin.frame.ThresholdAdjuster.setMode", "B&W");
  setOption("BlackBackground", false);
  run("Convert to Mask");
  iterations = 5;
  run("Options...", "iterations="+iterations+" count=1 edm=Overwrite do=Nothing");
  run("Dilate");
  run("Fill Holes");
  run("Erode");
  run("Watershed");
  run("Analyze Particles...", "size=60-800 circularity=0.40-1.00 show=[Overlay Masks] display exclude clear include summarize");
  saveAs(format, dir2+list[i] + " (red).jpg");
  selectWindow(list[i] + " (green)");
  setAutoThreshold("Default");
  call("ij.plugin.frame.ThresholdAdjuster.setMode", "B&W");
  setOption("BlackBackground", false);
  run("Convert to Mask");
  iterations = 5;
  run("Options...", "iterations="+iterations+" count=1 edm=Overwrite do=Nothing");
  run("Dilate");
  run("Fill Holes");
  run("Erode");
  run("Watershed");
  run("Analyze Particles...", "size=100-800 circularity=0.40-1.00 show=[Overlay Masks] display exclude clear include summarize");
  saveAs(format, dir2+list[i] + " (green).jpg");
  run("Close All");
}
saveAs("Results", dir1 + "Pollen count.csv");
```

Annexe S3 : Organisation des ruches à bourdons à l'extérieur



Annexe S4 : Organisation des plantes à l'extérieur

