

Sheh May Tam, Mireille Faurobert, Tomasz Pawlowski, Cecile Garchery, Helene Burck, Corinne C. Mhiri, Mathilde M. Causse, Marie Angele M. A. Grandbastien

# ► To cite this version:

Sheh May Tam, Mireille Faurobert, Tomasz Pawlowski, Cecile Garchery, Helene Burck, et al.. Caractérisation de la diversité génétique chez la tomate. 6. Colloque National du BRG, Oct 2006, La Rochelle, France. hal-02758106

# HAL Id: hal-02758106 https://hal.inrae.fr/hal-02758106

Submitted on 4 Jun2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés. Les Actes du BRG, 6 (2006) 81-96 © BRG, 2006

Article original

# Caractérisation de la diversité génétique chez la tomate

Sheh May TAM<sup>(1, 3)</sup>, Mireille FAUROBERT<sup>(2)</sup>, Tomasz PAWLOWSKI<sup>(2)</sup>, Cécile GARCHERY<sup>(2)</sup>, Hélène BURCK<sup>(2)</sup>, Corinne MHIRI<sup>(1)</sup>, Mathilde CAUSSE<sup>(2)</sup>, Marie-Angèle GRANDBASTIEN<sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup> INRA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Institut Jean-Pierre Bourgin, 78026 Versailles Cedex, France

<sup>(2)</sup> INRA, Domaine Saint-Maurice, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, BP 94, 84143 Montfavet Cedex, France

<sup>(3)</sup> present adress: Department of Plant Sciences, One Shields Avenue, University of California, Davis, 95616, USA

Abstract: Characterisation of tomato genetic diversity. In the period of agricultural intensification, modern plant breeding techniques have often resulted in drastic reduction of plant genetic diversity. Conservation of biodiversity is recognised as an important issue as many plant breeding programs routinely rely on germplasms as sources to develop agronomic traits of interest. Constant evaluation of plant genetic resources happens via the development of functional tools which accurately reflect existing diversity. Molecular markers are widely used to assay genetic diversity due to relative ease of utility, high polymorphism levels and furthermore, may be combined with other data, e.g. physiological approaches to facilitate direct targeting of interesting traits. In the framework of the French Solanaceae Biological Resources Center (CRB) to maintain diverse genetic resources, the Research Unit for Genetic Improvement of Fruit and Vegetables at INRA-Montfavet (UGAFL) holds a large collection of tomato (Solanum lycopersicum) and related wild species (Solanum subsection Lycopersicon). High phenotypic variation is displayed by the tomato fruit, especially in fruit size owing to domestication. UGAFL has accrued many accessions differing for fruit type, size and composition, well representing the natural variation observed for this genus. This collection thus provides the material basis for a number of breeding programs involved in improving pathogen resistance, nutritional and organoleptic qualities of tomato. Our project, in collaboration between UGAFL and the Laboratory of Cell Biology at INRA-Versailles, intended to characterise the genetic diversity of the collection comprising of 85 accessions, including 53 tomato lines/cultivars and 32 accessions of related wild species using different tools. We developed novel markers based on SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphisms) analysis of insertion polymorphisms from three distinct families of copia-type retrotransposons (Tnt1, ToRTL1 and T135). Results show that combined SSAP insertion profiles of Tnt1, ToRTL1 and T135 are congruent and useful for inferring host-species phylogeny. Groups of species accessions were recovered,

<sup>\*</sup> Correspondance et tirés à part : gbastien@versailles.inra.fr

while the tree topology is in agreement with other previous phylogenetic analyses, distinguishing groups of red and green fruited species, self compatible and self incompatible species. This also demonstrates a strong association between host-species phylogeny and the distribution of retrotransposon insertions. Diversity within the tomato collection is much lower compared to wild species. Nonetheless, SSAP insertion profiles reflect the genetic background of the lines and several clear groupings according to fruit types were recovered, such as clusters of round or fleshy types with large fruits, as well as clusters of industrial-long self-pruning types. Most cherry and small-fruited types occupy less derived positions than larger-fruited tomatoes, agreeing with the hypothesis of small fruit size being an ancestral character. Altogether, our results show that retrotransposon insertion polymorphisms proved highly useful for diversity analyses by successfully genotyping all accessions and reflecting underlying genetic divergences of host genomes. Subsequent integration of SSAP markers with other physiological markers, such as proteomic markers, or with neutral markers, will be performed.

# tomato/ Solanum subsection Lycopersicon/ retrotransposon/ insertion polymorphisms/ diversity

Résumé : La conservation et l'évaluation de la diversité génétique passe par la recherche d'outils capables de la traduire fidèlement. Pour cela, des approches génétiques, comme les marqueurs moléculaires, et physiologiques, comme les analyses protéomiques, peuvent être combinées. Dans le cadre du CRB Solanacées, l'INRA conserve et caractérise de larges collections de tomates (Solanum lycopersicum) et de plusieurs espèces sauvages apparentées, sur lesquelles s'appuient les programmes de recherche sur les résistances aux bioagresseurs et sur la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits. Nous avons développé des analyses de la diversité génétique de ces collections, en particulier pour la taille du fruit. Nous avons utilisé de nouveaux types de marqueurs moléculaires basés sur les polymorphismes d'insertion de rétrotransposons, séquences mobiles capables de s'amplifier dans le génome et de créer de la diversité génétique. Ces polymorphismes d'insertion se sont révélés informatifs pour l'étude de la diversité génétique au sein de collections de tomate et reflètent les types de fruits et les généalogies. En outre, les relations interspécifiques révélées au sein du genre sont en accord avec les analyses phylogénétiques antérieures. Ces informations sont en cours de confrontation avec celles apportées par des marqueurs neutres et par des approches protéomiques.

# tomate/ Solanum subsection Lycopersicon/ rétrotransposon/ polymorphismes d'insertion/ diversité

## 1. INTRODUCTION

L'intensification de l'agriculture a engendré une réduction significative de la diversité des espèces végétales. La conservation de cette diversité, qui passe par son évaluation, est devenue un enjeu important pour la plupart des

programmes d'amélioration des plantes, qui puisent la variabilité nécessaire pour l'introduction de nombreux caractères d'intérêt agronomique au sein des collections de ressources génétiques existantes. L'évaluation de la diversité génétique disponible passe par la recherche d'outils susceptibles de la traduire fidèlement. Parmi ceux-ci, les marqueurs moléculaires, qui révèlent directement les modifications du patrimoine génétique, sont devenus les indicateurs de variabilité les plus fréquemment utilisés, en raison de leur facilité d'utilisation et de leurs hauts niveaux de polymorphisme. Leur informativité peut cependant être renforcée par des combinaisons avec des marqueurs physiologiques, comme ceux générés par les approches protéomiques, qui permettent de mieux cibler les caractères recherchés, notamment lorsqu'ils concernent des caractères quantitatifs tels que le rendement ou la qualité.

Dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques Solanacées, l'Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes de l'INRA-Montfavet (UGAFL) conserve et caractérise une collection de plus de 500 accessions de tomate (Solanum lycopersicum) et maintient une cinquantaine d'accessions des huit espèces sauvages du genre Solanum section Lycopersicon. C'est sur cette diversité génétique que s'appuient notamment les programmes de recherche sur les déterminants génétiques de résistances aux bioagresseurs et sur les bases génétiques de la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits de tomate [4]. Chez la tomate il existe une très grande variabilité au niveau phénotypique en particulier en ce qui concerne les caractéristiques du fruit [3], [5]. La domestication a conduit, par exemple, à l'augmentation du poids du fruit, celui-ci passant de quelques grammes à un poids supérieur à 500g pour certaines variétés. Elle a également affecté de manière très importante la couleur du fruit, sa composition et ses caractéristiques de maturation. L'UGAFL a ainsi constitué une collection de travail qui comporte des accessions de type, de taille et de composition du fruit variables, représentatives de la variabilité existante pour ces caractères. Dans le cadre d'une collaboration avec l'INRA de Bordeaux (IBVM) cette collection est finement caractérisée au niveau phénotypique (cinétiques de croissance du fruit, profils métaboliques par RMN,...).

Le projet en cours représente une collaboration entre l'UGAFL et le Laboratoire de Biologie Cellulaire de l'INRA-Versailles, afin de caractériser la diversité génétique de cette collection à l'aide de différents outils. Nous avons utilisé de nouveaux types de marqueurs moléculaires basés sur l'activité de séquences d'ADN mobiles connues sous le nom de rétrotransposons. Les rétrotransposons, comme tous les éléments transposables, sont capables de se déplacer dans le génome et de s'y insérer à di fférents endroits. Leur spécificité est de transposer par transcription inverse d'une matrice ARN, et de s'amplifier en générant des insertions stables. Ils sont une composante majeure des

génomes eucaryotes, puisqu'ils peuvent représenter jusqu'à 60 % du génome de certaines plantes, ce qui implique qu'ils forment l'une des bases moléculaires les plus importantes de la diversité génétique végétale.

L'activité transpositionnelle des rétrotransposons se traduit par des polymorphismes d'insertion, qui peuvent être révélés par des stratégies comme la SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) [22], qui mesure la distance entre chaque copie insérée au sein d'un génome et un site de restriction adjacent. Bien que la SSAP génère, comme l'AFLP, des marqueurs dominants, l'analyse de ces polymorphismes d'insertion s'est révélée extrêmement utile pour la structuration de collections génétiques végétales, notamment en raison du fait que, contrairement à la majorité des autres marqueurs moléculaires, les insertions de rétrotransposons fournissent des marqueurs orientés, l'état « vide » d'un locus (absence d'une insertion) étant en théorie antérieur à l'état « plein » du même locus (présente d'une insertion).

Nos travaux antérieurs avaient en outre démontré que la SSAP était plus informative que l'AFLP pour l'analyse de collections industrielles de tomate et de poivron [20]. Dans le cadre du projet en cours, nous avons analysé les polymorphismes d'insertion de plusieurs rétrotransposons au sein de collections de tomate et d'espèces apparentées maintenues à l'UGAFL. Ces informations seront ensuite confrontées avec celles apportées par des marqueurs neutres classiques et par des approches protéomiques.

# 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Matériel végétal

Nous avons caractérisé 85 accessions (tabl. I et II), comportant 53 lignées et cultivars de tomate et 32 accessions des huit espèces sauvages du genre *Solanum* section *Lycopersicon*. L'ADN a été extrait de feuilles séchées en suivant le protocole de Qiagen DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France). L'ADN de cinq plantes a été rassemblé pour chaque accession.

N°	Nom	Туре	Type de fruit*	Poids du	Commentaires
				fruit (g)	
01	Cervil	lignée Vilmorin	cerise	5,5	
02	Levovil	lignée Vilmorin	rond	140	
03	Ferum	lignée INRA	rond	16	
04	M-82	cultivar	long	70	type industrie, port déterminé
05	Mospomorist	lignée INRA	rond	80	rétrocroisement sur 32 (Ve,
	±				1, Sm, Frl, 1m-2 2, Sw5)
06	Apeline	lignée INRA	charnu (rond aplati)	200	
	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				

Tableau I : Lignées et cultivars de tomate (S. lycopersicum).

07	Apedice	lignée INRA	charnu (rond aplati)	90	
08	Gardener's Delight	cultivar	petit fruit	27	
11	Rodade	cultivar	rond	120	proche de Flora Dade (15), Ve, I2
12	Saint Pierre	cultivar	rond	228	
13	Claudine	cultivar	rond	187	
14	Clémentine	lignée	cerise	5	fruit jaune, mutant multiflor
15	Flora Dade	cultivar	rond	120	
16	Leningradskij skorope- lij	cultivar	charnu (aplati)	100	
17	Philippino nº2	cultivar	charnu (aplati)	140	fruit rose, origine asiatique
18	Poncette	cultivar	charnu (aplati)	>140	
19	Platense	cultivar	charnu (aplati)	197	
20	San Marzano	cultivar	long	61	
21	Rio Grande	cultivar	long	100	type industrie, port déterminé
22	Marmande	cultivar	charnu (aplati)	140	
23	Supermarmande	cultivar	charnu (aplati)	140	
24	Vendor	cultivar	rond	150	
25	VF145-7879	cultivar	rond	120	type industrie, port déterminé
·····			charnu (rond		
26	Wva 63	cultivar	aplati)	220	
27	Plovdivska Konserva	cultivar	petit fruit	20-60	dérivé de S. pimpinellifolium
28	Plovdiv XXIVa	cultivar	petit fruit	42	dérivé de S. pimpinellifolium
29	Justar	cultivar	long	100-140	type industrie, port déterminé
30	Severianin	cultivar	charnu (aplati)	140	mutant parthénocarpique
31	Micro-Tom	cultivar	cerise	<5	
32	Moneymaker	cultivar	rond	100	
33	Monalbo	lignée INRA	rond	82	rétrocroisement sur 32 (Ve)
					rétrocroisement sur 32 (Ve
34	Motelle	lignée INRA	rond	80	I. I-2. Sm. Mi)
25	26.1 1	1. ( T) ID A	1	70	rétrocroisement sur 32 (Ve,
35	Mobogian	lignee INRA	rond	/0	pyl)
36	Momor	lionée INR A	rond	80	rétrocroisement sur 32 (Ve,
	momor	inglice if there	Tond		Frl, Tm2-2)
	N	1. ( T) TD 4		0.0	rétrocroisement sur 32 (Ve,
37	Mogéor	lignée INRA	rond	80	I, 1-2, Frl, pyl, Tm2-2, Mi,
20	Distant	16	1	65 75	aa)
20	C' 1	cultivar	long		type industrie, port determine
39	Cigalou	cultivar	long	102	type industrie, port determine
40	Coudoulet	cultivar	long	102	type industrie, port determine
41	Caraibo	cultivar	rond	160	port determine
.42	Blanche	cultivar	rond (aplati)	100	truit blanc
43	Gold Nugget	cultivar	cerise	12	truit jaune, port déterminé
44	High Crimson	cultivar	rond	120	mutant riche en lycopène
45	Jaune Demi Lisse	cultivar	charnu (aplati)	170	fruit jaune
46	Nagcarlan	cultivar	petit fruit	22	fruit rose
47	Pêche	cultivar	rond	87	mutant à fruit velu
48	Yellow Pear	cultivar	petit fruit	22	fruit jaune en forme de poire
49	Red Pear	cultivar	petit fruit	20-60	fruit en forme de poire
51	Vesuvio	cultivar	long	43	fruit petit, origine italienne

52	Sweetie	cultivar	cerise	12	
53	Poivron des Andes	cultivar	long	211	fruit cordiforme
54	Purple Kalabash	cultivar	charnu (aplati)	140	fruit rose
55	Ailsa Craig	cultivar	rond	65	
58	Wva 106	cultivar	cerise	7	

• charnu = plus de 5 loges; rond = entre 3 et 5 loges.

Tableau II : Accessions des espèces sauvages de Solanum section Lycopersicon.

E · N	N°	Nom ou	
Espece		identifiant	Origine*
S. pimpinellifolium	56	Wva 700	nd
	57	L3708 (LA 1269	) Pérou
	59	Hirsute	nd
	60	LA0121	Pérou
	61	LA1582	Pérou
	62	LA1478	Pérou
	63	63280	nd
	64	66063	nd
	65	64316	nd
S. cheesmaniae f. minor	66	LA1401	Equateur, Galap <i>a</i> gos
S. habrochaites	67	PI247087	Equateur
	69	LA1777	Pérou
	70	H2	nd
	71	G1 15.60	nd
	72	PI 390660	nd
	73	В	nd
	74	10496	nd
S. habrochaites f. glabratum	68	PI134417	Equateur
S. chmielewski	77	LA1327	Pérou
	78	LA1316	Pérou
	81	LA2678	Pérou
S. chilense	82	LA1969	Pérou
	83	LA1971	Pérou
S. pennellii	84	LA0716	Pérou
	85	Clayberg	nd
S. peruvianum	86	PI128660	Pérou (sud)
	87	CMV INRA	nd
	88	D4x05	nd
	89	PI129146	Pérou (sud)
	90	PI127832	Pérou (sud)
	93	LA0444	Pérou (sud)
S. neorickii	94	CNPH945	Brésil

\* nd = donnée non disponible; les accessions de *S. peruvianum* ont été classifiées selon leur origine géographique (nord ou sud de la latitude10°S), comme décrit dans Peralta and Spooner (2001).

# 2.2. Sequence-Specific Amplification Polymorphism (SSAP)

Les profils d'insertion SSAP ont été obtenus pour trois retrotransposons de type *copia*, Tnt1 [7], ToRTL1 [6], et T135 [20]. La SSAP est apparentée à

l'AFLP et révèle des fragments amplifiés entre la LTR (Long Terminal Repeat, fig. 1A) du rétrotransposon et un site de restriction adjacent. Les amplifications et les profils SSAP ont été réalisés suivant le protocole de Waugh *et al.* [22] légèrement modifié comme décrit dans Tam *et al.* [20]. L'ADN génomique a été digéré par une enzyme de restriction (*EcoRI* pour ToRTL1 et T135, et *Csp6*I pour Tnt1), ligué à des adaptateurs et amplifié avec une amorce non marquée correspondant à l'adaptateur et une amorce correspondant à la LTR, marquée au <sup>33</sup>P de façon à révéler les jonctions entre l'ADN génomique flanquant et la LTR (fig. 1B).



**Figure 1 :** Structure des rétrotransposons de type *copia* et stratégie d'analyse SSAP des polymorphismes d'insertion. (A) Les rétrotransposons sont des éléments génétiques de plusieurs kb, bordés de deux longues répétitions terminales (LTR) entre lesquelles se trouvent une ou plusieurs phases codant pour les protéines nécessaires à la rétrotransposition. Un ARN matrice, produit par une copie transcriptionnellement active, est encapsidé dans une pseudo-particule virale cytoplasmique (Virus-Like Particle ou VLP), dont le coeur est formé de protéines GAG, et où il est réverse transcrit en une copie fille ADN par la fonction RT (transcriptase inverse). La copie fille pénètre dans le noyau et s'insère dans le génome à l'aide de la fonction ENDO (endonucléase). (B) La SSAP révèle des fragments amplifiés entre un rétrotransposon et un site de restriction adjacent (SR). L'ADN génomique est digéré, ligué à des adaptateurs et amplifié avec une amorce non marquée correspondant à l'adaptateur et une amorce correspondant à la LTR du rétrotransposon, marquée au <sup>33</sup>P de façon à ne révéler que les fragments ancrés dans le rétrotransposon. Les

fragments amplifiés sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide à haute résolution afin d'identifier les bandes SSAP polymorphes. Celles-ci peuvent ensuite être recensées pour leur présence/absence à travers les accessions testées.

Les amorces adaptateur utilisées ne contiennent pas de base sélective additionnelle. Pour Tnt1, l'amorce utilisée correspond à une région de la LTR très conservée chez les Solanacées [1], [20]. Les fragments amplifiés ont été déposés sur gel d'acrylamide à haute résolution et les bandes SSAP ont été notées manuellement pour leur présence (1) ou absence (0) pour chaque accession. Des matrices binaires des 85 accessions ont été construites pour chaque jeu d'amorce. Les bandes de même taille ont été considérées comme correspondant à la même insertion et les bandes de tailles différentes comme correspondant à des insertions indépendantes.

### 2.3. Analyses phylogénétiques

Les distances génétiques ont été utilisées comme mesure des apparentements entre accessions. Les matrices binaires ont été analysées avec le programme PAUP\* 4,10 [19] en utilisant l'option de distance Nei-Li, l'option « évolution minimale » de l'algorithme NJ (Neighbor-Joining [16]), et 1 000 répétitions de bootstrap. L'arbre NJ a été enraciné sur *S. pennellii*, en accord avec les travaux de Marshall *et al.* [11] et de Nesbitt et Tanksley [10]. Pour évaluer les corrélations deux-à-deux entre les données obtenues à partir des trois jeux de rétrotransposons, un test de Mantel [9] a été utilisé en utilisant les matrices de distance et un test statistique sur 1 000 permutations aléatoires.

# 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

## 3.1. Relations interspécifiques au sein de Solanum section Lycopersicon

Les trois jeux d'amorces SSAP ToRTL1-E00, T135-E00 et Tnt1-C00 ont été testés sur les 85 accessions des neuf espèces. Un total de 76 à 105 bandes polymorphes par élément a été recensé à travers la collection (entre 15 et 40 bandes en moyenne par profil), avec des niveaux de polymorphismes variant de 96,2 % à 98,9 %. Le test de Mantel a révélé des corrélations très significatives entre couples de jeux d'amorces SSAP, et les données des trois jeux d'amorces ont été combinées pour l'analyse des relations interspécifiques et de la diversité génétique au sein de la section *Lympersicon*.

L'arbre NJ enraciné sur *S. pennellii* (fig. 2) montre des regroupements très clairs et bien soutenus des accessions correspondant à chacune des espèces analysées, à l'exception de deux accessions de *S. pimpinellifolium* qui sont retrouvées en position proche de la racine au sein des accessions de tomate.

En outre, la topologie de l'arbre reflète les relations interspécifiques définies antérieurement par des marqueurs classiques comme les RFLPs, les micros atellites, les ITS, les polymorphismes nucléotidiques géniques et les AFLPs (réévalués par Spooner *et al.* [18]). Le groupe G1 comprend les espèces autogames à fruit rouge *S. lycopersicum, S. pimpinellifolium* et *S. cheesmaniae* et forme un groupe frère avec le groupe G2 qui regroupe les espèces autogames à fruits verts *S. chmielewskii* et *S. neorickii*. Les groupes G1 et G2 rassemblés forment un groupe frère avec les espèces allogames à fruits verts *S. peruvianum* et *S. chilense* (G3), tandis que *S. habrochaites* représente le groupe le plus proche de la racine après *S. pennellii*. Les groupes G1 et G2 rassemblés et le groupe G3 correspondent respectivement, dans leurs compositions et dans leurs topologies respectives, aux clades « *esculentum* » et « *peruvianum* » définis dans une étude antérieure qui regroupait *S. pennellii* et *S. habrochaites*, également allogames à fruits verts, dans un clade « *hirsutum* » à la racine du genre [11].

Il été récemment démontré que *S. peruvianum* est en réalité un taxon hétérogène artificiel, et que la plupart des accessions originaires de zones géographiques situées au sud de la latitude 10°S ("southern geographical range") sont basales à *S. chmielewskii* et *S. neorickii* tandis que les accessions originaires de zones géographiques au nord de cette latitude 10°S ("northern geographical range") se regroupent à proximité des espèces à fruit rouge [13], [18]. L'origine géographique de nos accessions *S. peruvianum* n'a pas pu être retracée pour toutes, mais quatre d'entre elles sont originaires de zones géographiques au sud de la latitude 10°S (tabl. 2), et leur position dans l'arbre, à la racine du groupe G2, est donc en accord avec leur origine. En outre, les deux autres accessions de *S. peruvianum* étant retrouvées en positions similaires, il est fort probable qu'elles soient également de même origine géographique.



**Figure 2 :** Arbre NJ des 85 accessions de *Solanum* section *Lycopersicon*, basé sur la combinaison des données SSAP des trois jeux d'amorce Tnt1-C00, ToRTL1-E00 et T135-E00. G1 = groupe 1, G2 = groupe 2, G3 = Groupe 3. CE = clade « *esculentum* », PC = clade « *peruvianum* ». Les accessions ont été codées par chiffres, et le détail de chaque accession est donné dans les tableaux 1 et 2. Les chiffres indiqués au-dessus des branches représentent les valeurs de bootstrap.

Ces résultats démontrent une forte association entre la phylogénie des espèces hôtes et les polymorphismes d'insertions de Tnt1, ToRTL1 et T135, qui reflètent les divergences génétiques existant entre les espèces hôtes. Des déliminations interspécifiques similaires, avec des topologies intraspécifiques légèrement différentes, reflétant une histoire évolutive propre à chaque élément au sein des mêmes hôtes, sont également observées lors de l'analyse individuelle de chacun des trois jeux d'amorces (données non présentées).

# 3.2. Diversité génétique au sein de la collection de variétés de tomate (S. lycopersicum)

Bien que la diversité génétique au sein de *S. lycopersicum* soit très sensiblement inférieure à celle observée au sein des espèces sauvages (fig. 2), la SSAP génère suffisamment de polymorphisme pour génotyper les 53 lignées et cultivars de tomate (fig. 3). En outre, l'analyse SSAP met en évidence plusieurs regroupements, qui reflètent assez bien les types et poids de fruit, ainsi que dans certains cas les ascendances généalogiques.

Une première observation est la position, proche de la racine, de la plupart des accessions de type cerise (Ba), qui conforte l'hypothèse du caractère ancestral de la très petite taille du fruit. Deux lignées de *S. pimpinellifolium* Wva700 (56) et 66064 (64), séparées du groupe *S. pimpinellifolium*, se retrouvent également en position proche des tomates de types cerise, confortant ainsi l'hypothèse de l'origine de ces dernières par hybridation interspécifique avec *S. pimpinellifolium*. Les lignées à petit fruit Plovdiska Konserva (27) et Plovdiv XXIV(28), toutes deux dérivées de *S. pimpinellifolium*, se groupent également avec les types cerise. Cependant, quelques types cerise, comme Clémentine (14) ou Gold Nugget (43), sont retrouvés dispersés parmi des accessions à gros fruits, ce qui suggère des introgressions récurrentes des génotypes cerise au sein des pools génétiques de tomates à plus gros fruit. Par exemple, Gold Nugget (43) contient dans sa généalogie un croisement entre une tomate cerise et Yellow Plum, une tomate à fruit long [2], ce qui explique sa position proche de tomates à fruit long (groupe G5, voir plus bas).

Des groupes clairs sont observés en fonction des types et poids de fruit. Le groupe G1 ne comporte que des tomates à fruit rond de poids moyen, à l'exception de Levovil (02), une accession à gros poids. Le groupe G2 rassemble des tomates à fruit rond de poids élevé, tandis que le groupe G3 comporte essentiellement des variétés anciennes à fruits charnu aplati de poids très élevé. Les groupes G4 et G5 contiennent pour l'essentiel des variétés destinées à la transformation industrielle, à port déterminé (sp), et séparent les tomates à fruit long et poids élevé (G4) des tomates à fruit long et poids assez faible (G5), ces dernières étant groupées avec d es types rond à

poids élevé. Enfin, en positions proches de la racine, mais plus éloignées de celle-ci que les tomates cerise, on retrouve curieusement une série de cultivars disparates qui n'ont en commun que de porter une mutation de la couleur ou de l'aspect du fruit.





**Figure 3 :** Détail de l'arbre NJ de la figure 2, représentant les accessions de tomate (*S. lycopersicum*) et leur classification en fonction des caractéristiques de type (A) et de poids (B) de fruit.

De nombreux regroupements reflètent également les ascendances généalogiques des accessions. Les lignées Apeline (06) et Apedice (07), par exemple, sont issues du même croisement [14]. Le groupe G1, de son côté, rassemble

le cultivar Moneymaker (32) avec six autres lignées (Mospomorist, 05, Momor, 36, Mogéor, 37, Moboglan, 35, Motelle, 34 et Monalbo, 33) qui dérivent toutes de Moneymaker après introduction de gènes de résistances variés par des croisements interspécifiques [8]. Il est intéressant de noter que Mospomorist (05), Momor (36) et Mogéor (37), seules à contenir les gènes Frl et Tm-2 parmi ces dérivés de Moneymaker, se positionnent au sein d'un même sous-groupe, ce qui pourrait refléter l'introgression d'un même fragment chromosomique. En effet, le locus Tm-2 contrôlant la résistance au Tobacco Mosaic Virus [23] et le locus Frl contrôlant la résistance à Fusarium oxysporum sont tous deux situés à proximité du centromère du chromosome 9 [12]. Les régions centromériques de la tomate, et en particulier celle du chromosome 9, sont particulièrement riches en insertions des trois rétrotransposons Tnt1, ToRTL1 et T135 [21], et les regroupements observés traduisent vraisemblablement la présence d'insertions communes près du centromère du chromosome 9. Ceci pourrait également expliquer la présence dans le même sous-cluster de la seule accession du groupe G1 qui ne dérive pas de Moneymaker, la lignée Levovil (L02) qui contient également le gène de résistance Tm-2 [17].

### 4. CONCLUSION

Les profils d'insertion combinés des trois rétrotransposons Tnt1, ToRTL1, T135 se révèlent utiles, pour l'établissement des relations interspécifiques au sein du genre Solanum section Lycopersicon, comme pour l'analyse de la diversité et des apparentements génétiques au sein de collections de tomates cultivées, malgré la très faible variabilité existant chez S. lycopersicum. Ce manque de diversité a été attribué à trois goulots d'étranglement successifs à l'origine des cultivars modernes, la domestication d'origine, le transfert des variétés du Nouveau Monde vers l'Europe et les programmes modernes d'amélioration des plantes [15], [10]. En dépit de cette faible variabilité, la SSAP génère suffisamment de polymorphisme pour génotyper les 53 lignées et cultivars de tomate, et renforce l'efficacité et la fiabilité de l'estimation des relations génétiques au sein de cette collection. Nous avons observé une association entre les relations génétiques décrites par SSAP et les données généalogiques connues, suggérant que les polymorphismes d'insertion des trois éléments utilisés reflètent le fond génétique des accessions. Nous avons également observé des groupes phénotypiques cohérents, associés à la fois aux poids et types de fruits, ainsi qu'à d'autres caractéristiques telles que le port déterminé des lignées de tomate sélectionnées pour des usages industriels.

Les informations apportées par cette étude seront complétées pour d'autres lignées présentant une variation phénotypique pour les poids du fruit, et confrontées ensuite avec des informations complémentaires apportées par

des marqueurs neutres classiques et par des profils d'expression protéiques du fruit. La confrontation des informations apportées par chaque niveau aux données phénotypiques enrichira les outils de structuration de la diversité et aidera à définir les outils utiles pour une caractérisation plus systématique de la collection conservée à l'INRA. De manière plus générale, les résultats pourront intéresser d'autres espèces pour lesquelles le polymorphisme moléculaire est faible par rapport aux variations phénotypiques.

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le projet n° 21 du Bureau des Ressources Génétiques (AP 2003-2004) et par le projet européen EC-QLRT-1999-31502 (TEGERM) du 6<sup>e</sup> PCRD. Une partie de cette analyse (notamment relations interspécifiques) a été incorporée dans un article actuellement en révision [21].

# **RÉFÉRENCES**

- Araujo P.G., Casacuberta J.M., Costa A.P.P., Hashimoto R.Y., Grandbastien M.-A., Van Sluys M.-A., Retrolyc1 subfamilies defined by different U3 regulatory regions in the *Lycopersicon* genus. Mol. Gen. Genom. 266 (2001) 35-41.
- Baggett J.R., Kean D., "Gold Nugget" Tomato. Hort. Science 20 (1985) 957-958.
- [3] Causse M., Caranta C., Saliba-Colombani V., Moretti A., Damidaux R., Rousselle P., Valorisation des ressources génétiques de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaires. Cahiers Agricultures 9 (2000) 197-210.
- [4] Causse M., Saliba-Colombani V., Lecomte L., Duffé P., Rousselle P., Buret M., Genetic analysis of fruit quality attributes in fresh market tomato. J. Exp. Bot. 53 (2002) 2089-2098
- [5] Causse M., Buret M., Robini K., Verschave P. (2003) Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. J. Food Sci. 68 (2003) 2342-2350.
- [6] Daraselia N.D., Tarchevskaya S., Narita J.O., The promoter for tomato 3hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression. Plant Physiol. 112 (1996) 727-733.
- [7] Grandbastien M.-A., Spielmann A., Caboche M., Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. Nature 337(1989) 376-380.
- [8] Laterrot H., Twenty near isogenic lines in Moneymaker type with different genes for disease resistance. Tomato Genetics Report 46 (1996) 34.
- [9] Liedloff A., Mantel Nonparametric Test Calculator, Version 2.0. Queensland University of Technology, Brisbane, Australia, 1999.

- [10] Nesbitt T.C., Tanksley D., Comparative sequencing in the genus Lycopersicon. implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. Genetics 162 (2002) 365-379.
- [11] Marshall J.A., Knapp S., Davey M.R., Power J.B., Cocking E.C., Bennett M.D., Cox A.V., Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using nuclear ITS rDNA region. Theor. Appl. Genet. 103 (2001) 1216-1222.
- [12] Pan Q., Liu Y.-S., Budai-Hadrian O., Sela M., Carmel-Goren L., Zamir D., Fluhr R., Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. Genetics 155 (2000) 309-322.
- [13] Peralta I.E., Spooner D.M., Granule bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Miller) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). Am. J. Bot. 88 (2001) 1888-1902.
- [14] Philouze, J., Ferline: la qualité en plein champ. Fruits et Légumes 30 (1986) 56-59.
- [15] Rick C.M., 1976 Tomato, in: Simmonds N.W. (éd.), Evolution of crop plants, Longman Group, London, UK., 1976, pp. 268-273.
- [16] Saitou N., M. Nei M., The Neighbor Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4 (1987) 406-425.
- [17] Saliba-Colombani V., Causse M., Gervais L., Philouze J., Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. Genome 43 (2000) 29-40.
- [18] Spooner D.M., Peralta I.E., Knapp S., Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes (*Solanum L. section Lycopersicon* (Mill.) Wettst.). Taxon 54 (2005) 43-61.
- [19] Swofford D.L., PAUP\* 4.0 beta 10. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 2002.
- [20] Tam S.M., Mhiri C., Vogelaar A., Kerkveld M., Pearce S., Grandbastien M.A., Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. Theor. Appl. Genet. 110 (2005) 819-831.
- [21] Tam S.M., Causse M., Garchery C., Burck H., Mhiri C., Grandbastien M.A. The distribution of copia-type retrotransposons and the evolutionary history of tomato and related wild species, J. Evolution. Biol., en révision.
- [22] Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B.T., Powel W., Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol. Gen. Genet. 253 (1997) 687-694.
- [23] Young N.D., Tanksley S.D., RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. Theor. Appl. Genet. 77 (1989) 353-359.