



**HAL**  
open science

# Caractérisation des déterminants génétiques et moléculaires de composantes de la texture du fruit de tomate

Jamila Chaïb

► **To cite this version:**

Jamila Chaïb. Caractérisation des déterminants génétiques et moléculaires de composantes de la texture du fruit de tomate. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2007. Français. NNT: . tel-02824941

**HAL Id: tel-02824941**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02824941>**

Submitted on 6 Jun 2020

**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.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THESE

Pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE  
DE MONTPELLIER**

Formation Doctorale: Développement et Adaptation des Plantes  
Ecole Doctorale: Biologie des Systèmes Intégrés, Agronomie – Environnement

Présentée par

**Jamila CHAÏB**

**CARACTERISATION DES DETERMINANTS GENETIQUES ET MOLECULAIRES DE  
COMPOSANTES DE LA TEXTURE DU FRUIT DE TOMATE**

Soutenue le 6 février 2007 devant le jury composé de:

Gilles CHARMET	Directeur de recherche, INRA Clermont-Ferrand	Rapporteur
Christophe ROTHAN	Directeur de recherche, INRA Bordeaux	Rapporteur
Marc LAHAYE	Directeur de recherche, INRA Nantes	Examineur
Dominique De VIENNE	Professeur, Université Paris Sud-Orsay	Examineur
Bruno TOURAINE	Professeur, Université Montpellier 2	Président
Mathilde CAUSSE	Directrice de recherche, INRA Avignon	Directrice de thèse
Isabelle MARTY	Chargée de recherche, INRA Avignon	Codirectrice de thèse

## REMERCIEMENTS

---

Ces trois années de thèse et, plus largement ces cinq dernières années passées sur le domaine Saint Maurice, ont été très riches, bien évidemment au niveau scientifique, mais tout autant sur le plan humain.

Mes tous premiers remerciements iront à Mathilde pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et à Antonio pour m'avoir fortement encouragé à l'accepter.

Mathilde, par où commencer? Tout d'abord, en te remerciant de m'avoir fait confiance pour conduire ce projet. Je te rassure, je ne regrette absolument pas de m'être engagée dans cette aventure, pas très périlleuse (sauf peut-être en phase finale) et j'espère juste qu'il en est de même pour toi. Je voulais aussi te remercier pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes côtés sur les différentes facettes de la recherche, pour l'autonomie que tu m'as laissée, pour tes conseils, pour ta disponibilité malgré tes responsabilités (des occasions pour faire de la Science!), pour ta tranquillité rassurante (apparente ?) pendant les dernières semaines de rédaction et ... pour les cafés du samedi matin!! Un grand MERCI, M'dame !

Antonio, tu as su m'encourager, me conseiller et supporter l'épreuve ultime de la rédaction avec mes retours tardifs pas toujours très accueillants. Merci pour ça et pour tout le reste ...

Ce travail est le fruit de la collaboration de nombreuses personnes dont l'efficacité, la disponibilité et la bonne humeur ont constitué des conditions de travail très agréables.

Merci à Isabelle d'avoir co-encadré ce travail et d'avoir été disponible malgré l'arrivée du petit dernier. Merci à David, toujours partant, qui a su prendre le relais et à Maggy et Marie-Françoise pour nos échanges si agréables.

Mireille (co-encadrante bis), je voulais te remercier pour tout le travail que nous avons réalisé ensemble, même si le temps nous a manqué pour aller encore plus loin. Merci pour ton dynamisme et pour ton rire, qui concurrence un peu trop le mien !

Spéciale dédicace à mes deux boulets, Manu et Stéphane. Stéphane, non seulement tu es le meilleur Passe-Partout que je connaisse (j'ai longtemps hésité avec le petit bonhomme en mousse), mais en plus, tu m'as beaucoup appris et dans de nombreux domaines. Merci pour ton aide et tes encouragements réguliers, et pour l'initiation au ballon ovale : Allez le Stade ! Manu, j'espère garder longtemps le record de l'essai en serre le plus ... "bourinasse" comme on dit. Merci pour les fous rires journaliers et la petite larme qui va avec, pour les p'tites clopes, pour les échanges musicaux, et tout ça, et tout ça... Merci à tous les deux, vous allez me manquer. Surtout, continuez à mettre le OAJE !!!

Philippe, tu m'as accompagné depuis mes premiers pas dans l'ex-équipe Tomate, je te dois beaucoup et tous les Cannelets du monde ne suffiraient pas à te remercier.

Jean-Paul, dit "Mister Bouchett", je te remercie pour les traductions en langage informatique de mes requêtes, pour les programmes magiques d'analyses haut débit et pour ton exubérance (Mais oui!) si bien maîtrisée.

Merci à Esther (Quelle belle équipe !), Cécile, Caroline, Line, Sylvie, Barbara, Marielle, Maryse, Yolande pour toute l'aide que vous m'avez apportée. Rebecca, je te remercie pour nos petites discussions, pour les corrections d'anglais et pour l'entraînement oral pour l'Australie, à quelques jours de l'arrivée de Théodore!

Merci à Gilles Charmet, Christophe Rothan, Marc Lahaye, Dominique de Vienne et Bruno Touraine pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Une pensée particulière pour Gilles Charmet et Christophe Rothan qui ont eu la charge d'être rapporteur, merci votre gentillesse, votre disponibilité et vos encouragements.

Je tenais également à remercier Christine Dillmann et Charles Romieu pour leurs conseils au cours des comités de thèse.

Mes remerciements à Karine Robini, Guy Jacquemin et Emilie Terrel pour avoir assuré le bon déroulement des analyses sensorielles, à Benoit Valot qui m'a initié à l'analyse des données de spectrométrie de masse, à Nancy Terrier pour la mise à disposition du scanner à puces à ADN et à Virginie Garcia, Johann Petit, et Christophe Rothan pour leur aide pour l'analyse des données de transcriptome.

Merci au trio de choc, Claudie, Astrid et Angélique pour tous les aspects administratifs et les demandes de dernière minute, à Chantal pour mes commandes biblio, plus urgentes les unes que les autres, à l'équipe des installations expérimentales sans qui nous n'aurions pas de plantes à étudier et à Vincent toujours disponible pour régler les bugs informatiques qui s'acharnent parfois sur certains.

MERCI à toutes les personnes des différents labos et des serres pour leur bonne humeur : Verane, Jean-mon-Jean, Vincent, Alexandre, les Bruno, les Vero, Laurent G., Anne, Patrick S., Nathalie, Christophe, Robert, Marie-Christine, Maurice et la liste est encore longue...

Et merci au Labo Melon de m'avoir accueillie pendant la rédaction, avec le forfait pauses Café-thé\_gateaux qui ponctuaient les longues journées en tête à tête avec mon ordinateur.

Julien, mon compagnon de Fortune (si, si !): nous avons commencé nos thèses ensemble, je te passe le flambeau maintenant, tu y es presque. Merci pour toutes les discussions que nous avons partagées, à nous motiver mutuellement et pour ta compagnie les soirs au labo et les WE de rédaction. Plein de courage aux thésards suivants : Carine, Sarah, Julien, Béranger, Marion et Nicolas.

Enfin, merci à TOÛTE ma famille, et plus particulièrement à mon frère, complice de toujours, merci à Jean et à Françoise, je n'oublierais jamais ce que vous avez fait pour moi, et merci à ma nouvelle et grande famille Avellaneda y Molina.

“Aux collègues” pour tous les bons moments, ensemble pour le pire et pour le meilleur:

Fred, Fred et Sandrine, Jacky, Pierre et Sandy, re-Manu et re-Stéphane, Raquel et Jean, Seb et Julie, Julien, Corinne, Aude et Renaud, les Fournesans Anne-Marie, Sly, Cosme, André et Delphine, José, Greg, Isa, Momo, Juanito, Marie-Claire, Tony et Sylvie ... et aux plus petits qui me font craquer : Lalou, Janèle, Guille, Lola, Maella, Nino et Julie.

Vive les apéros-grillades-pétanque au bord du Gardon !

# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS .....	- 1 -
SOMMAIRE .....	- 3 -
INTRODUCTION GENERALE .....	- 7 -
CHAPITRE 1 _ SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	- 10 -
I. La tomate .....	- 10 -
1.1. Taxonomie et ressources génétiques.....	- 10 -
1.2. Éléments de biologie .....	- 11 -
1.3. Caractéristiques du génome et ressources génomiques .....	- 11 -
1.4. Le développement du fruit de tomate.....	- 13 -
1.5. La qualité organoleptique du fruit de tomate .....	- 15 -
II. La texture du fruit .....	- 18 -
II.1. Présentation .....	- 18 -
II.2. Les méthodes d'évaluation de la texture .....	- 19 -
a/ L'analyse sensorielle .....	- 19 -
b/ Les mesures physiques.....	- 20 -
c/ Les mesures chimiques .....	- 23 -
d/ Corrélations entre méthodes sensorielles et méthodes instrumentales .....	- 23 -
II.3. Propriétés mécaniques et physiologiques associées à la texture du fruit.....	- 24 -
a/ Anatomie du fruit.....	- 24 -
b/ Structure cellulaire du péricarpe.....	- 24 -
c/ Propriétés mécaniques des cellules et évolution au cours de la maturation .....	- 25 -
II.4. Les déterminants génétiques de la texture.....	- 31 -
II.5. Les conditions de conservation.....	- 33 -
III. La caractérisation de QTL.....	- 34 -
III.1. La détection de QTL .....	- 34 -
III.2. Le déterminisme génétique .....	- 35 -
III.3. La cartographie fine .....	- 36 -
III.4. Le clonage de QTL.....	- 37 -
III.5. La recherche de gènes candidats.....	- 38 -
a/ Matériel végétal.....	- 38 -
b/ Etude du transcriptome .....	- 38 -
c/ Etude du protéome .....	- 40 -
III.6. La validation fonctionnelle.....	- 41 -
IV. Contexte et objectifs de l'étude .....	- 42 -

<b>CHAPITRE 2 _ MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>- 45 -</b>
<b>I. Le matériel végétal .....</b>	<b>- 45 -</b>
<i>I.1. Les lignées parentales .....</i>	<i>- 45 -</i>
<i>I.2. Les lignées introgressées .....</i>	<i>- 45 -</i>
<i>I.3. Les populations de cartographie fine .....</i>	<i>- 46 -</i>
<i>I.4. Les populations de cartographie .....</i>	<i>- 46 -</i>
<b>II. Les méthodes .....</b>	<b>- 47 -</b>
<i>II.1. Conduite culturale.....</i>	<i>- 47 -</i>
<i>II.2. Phénotypage .....</i>	<i>- 47 -</i>
a/ Mesures physiques .....	- 47 -
b/ Mesures chimiques.....	- 48 -
c/ Dosage du dégagement d'éthylène .....	- 48 -
d/ Analyses sensorielles .....	- 49 -
e/ Macroscopie et morphologie du fruit.....	- 49 -
f/ Macroscopie et structure cellulaire du péricarpe .....	- 49 -
<i>II.3. Etude du protéome .....</i>	<i>- 50 -</i>
a/ Matériel végétal.....	- 50 -
b/ Extraction des protéines .....	- 50 -
c/ Electrophorèse bi-dimensionnelle (E2D).....	- 50 -
d/ Acquisition et analyse d'image.....	- 51 -
e/ Identification des protéines par spectrométrie de masse .....	- 52 -
f/ Recherche de signaux d'adressage.....	- 52 -
<i>II.4. Etude du transcriptome.....</i>	<i>- 52 -</i>
a/ Puces à ADN .....	- 52 -
b/ RT-PCR quantitative.....	- 55 -
<i>II.5. Génotypage .....</i>	<i>- 57 -</i>
<i>II.6. Méthodes statistiques .....</i>	<i>- 58 -</i>
 <b>CHAPITRE 3 _ STABILITE DES EFFETS DES QTL .....</b>	 <b>- 59 -</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>- 60 -</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>- 61 -</b>
<b>II. Materials and methods.....</b>	<b>- 62 -</b>
<i>II.1. Plant material and introgression scheme.....</i>	<i>- 62 -</i>
<i>II.2. Plant genotyping .....</i>	<i>- 63 -</i>
<i>II.3. Phenotypic evaluation .....</i>	<i>- 63 -</i>
<i>II.4. Statistical analyses .....</i>	<i>- 64 -</i>
<b>III. Results and discussion .....</b>	<b>- 65 -</b>
<i>III.1. Phenotypic variation in RILs and BC3S1 populations.....</i>	<i>- 65 -</i>
<i>III.2. QTL detection in the three BC3S1 populations .....</i>	<i>- 66 -</i>

III.3. QTL detection in QTL-NILs.....	- 67 -
III.4. Consistency of QTLs over generations.....	- 67 -
III.5. Consistency of QTLs over genetic backgrounds .....	- 69 -
IV. Conclusion.....	- 70 -
<b>CHAPITRE 4 _ CARACTERISATION GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE DE LA TEXTURE DU FRUIT DE TOMATE ..</b>	<b>- 72 -</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>- 74 -</b>
<b>II. Materials and methods.....</b>	<b>- 75 -</b>
II.1. Plant material .....	- 75 -
II.2. Growth periods and design of trials.....	- 76 -
II.3. Physical and physiological measurements.....	- 76 -
II.4. Sensory profiling .....	- 77 -
II.5. Macroscopic study of fruit morphology.....	- 77 -
II.6. Analysis of the cellular structure of pericarp .....	- 77 -
II.7. Statistical tests.....	- 78 -
<b>III. Results.....</b>	<b>- 79 -</b>
III.1. Physical and sensory analysis of texture related traits.....	- 79 -
III.2. Morphological analysis at macroscopic and cellular levels.....	- 79 -
III.3. Evolution of texture traits during fruit development.....	- 80 -
III.4. Correlations between texture related traits .....	- 81 -
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>- 81 -</b>
IV.1. QTLs effects on texture traits.....	- 82 -
IV.2. Genetic background and environment effects on texture traits.....	- 83 -
IV.3. Correlations between texture traits .....	- 83 -
IV.4. Evolution of texture during fruit development .....	- 84 -
IV.5. Conclusion .....	- 84 -
<b>CHAPITRE 5 _ CARTOGRAPHIE FINE DE DEUX REGIONS D'INTERET LOCALISEES SUR LES CHROMOSOMES 4</b>	<b>ET 9 .....</b>
<b>I. Description des QTL de fermeté du fruit de tomate .....</b>	<b>- 87 -</b>
<b>II. Densification en marqueur des deux régions chromosomiques.....</b>	<b>- 87 -</b>
II.1. Région d'intérêt du chromosome 4.....	- 88 -
II.2. Région d'intérêt du chromosome 9.....	- 88 -
II.3. Efficacité de la densification en marqueurs des régions ciblées.....	- 89 -
<b>III. Sélection des familles recombinantes.....</b>	<b>- 89 -</b>
<b>IV. Analyse des phénotypes des lignées recombinantes .....</b>	<b>- 90 -</b>

IV.1. Région d'intérêt du chromosome 4 .....	- 90 -
IV.2. Région d'intérêt du chromosome 9 .....	- 91 -
V. Discussion et conclusion .....	- 92 -
<b>CHAPITRE 6 _ VERS LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES COMPOSANTES DE LA TEXTURE .....</b>	<b>- 94 -</b>
<b>I. Etude du protéome .....</b>	<b>- 95 -</b>
I.1. Description générale du protéome du péricarpe.....	- 95 -
I.2. Variations observées .....	- 95 -
I.3. Identification des fonctions.....	- 97 -
I.4. Protéines candidates fonctionnelles associées à la texture .....	- 98 -
<b>II. Etude du transcriptome .....</b>	<b>- 99 -</b>
II.1. Description des résultats obtenus .....	- 99 -
II.2. Gènes candidats associés à la texture du fruit.....	- 100 -
<b>III. Caractérisation des gènes candidats.....</b>	<b>- 101 -</b>
III.1. Cartographie génétique .....	- 101 -
a/ Cartographie génétique in silico .....	- 101 -
b/ Recherche de polymorphisme et cartographie génétique.....	- 102 -
III.2. Etude d'expression au cours du développement du fruit.....	- 103 -
a/ Reproductibilité des différentiels observés .....	- 103 -
b/ Effets des QTL et des fonds génétiques sur les profils d'expression .....	- 104 -
<b>IV. Discussion et conclusion .....</b>	<b>- 105 -</b>
IV.1. Efficacité des méthodes .....	- 105 -
IV.2. Effets de l'introgession et interactions génétiques .....	- 107 -
IV.3. Gènes candidats associés à la texture.....	- 108 -
IV.4. Conclusion .....	- 110 -
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>- 112 -</b>
<b>Une démarche intégrée pour la caractérisation des composantes de la texture et, plus largement, de la qualité organoleptique du fruit de tomate.....</b>	<b>- 112 -</b>
<b>De l'identification de gènes candidats au clonage de QTL .....</b>	<b>- 113 -</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>- 114 -</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>- 117 -</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>- 132 -</b>



**INTRODUCTION**  
**GENERALE**

---

## **INTRODUCTION GENERALE**

---

Avec une production mondiale de l'ordre de 120 millions de tonnes en 2005 (FAO, 2006), la tomate, classée parmi les fruits d'après la botanique, est un des légumes les plus consommés à travers le monde. Par conséquent, la tomate constitue l'une des premières sources en vitamines, anti-oxydants et minéraux de l'alimentation humaine. L'amélioration génétique de la tomate a longtemps privilégié des critères agronomiques tels que le rendement ou la résistance aux bioagresseurs. Face aux demandes des producteurs et de la distribution, les efforts des sélectionneurs se sont rapidement orientés vers des critères de qualité commerciale du fruit comme le calibre, la fermeté ou la durée de conservation, au détriment de la qualité gustative recherchée par les consommateurs. Par ailleurs, la sélection de variétés de tomate supportant de longues périodes de conservation a entraîné l'obtention de fruits très fermes. Un des enjeux des sélectionneurs est désormais de réussir à cumuler les critères de qualité commerciale et de qualité gustative.

Parmi les composantes de la qualité organoleptique du fruit de tomate, la texture s'est révélée être un des critères essentiels dans la perception des consommateurs. La prise en compte de tels caractères dans les programmes de création variétale est très difficile car la texture est un caractère complexe faisant intervenir de nombreuses composantes, les principales étant la fermeté en bouche, la farinosité, l'aspect peau gênante ou la jutosité. Or, aucune technique instrumentale ne permet de les mesurer et seules les analyses sensorielles réalisées par des dégustateurs entraînés permettent de les évaluer, ce qui n'est pas envisageable face aux effectifs des populations utilisées en sélection variétale. Il apparaît donc important d'approfondir la caractérisation génétique et physiologique des composantes de la texture du fruit de tomate afin d'identifier, à terme, des outils intéressants pour accélérer ou orienter la sélection de ces caractères.

De façon générale, les caractères quantitatifs sont décrits comme des caractères contrôlés par plusieurs gènes d'effet individuel variable et influencés par les conditions environnementales. L'étude de ces caractères est désormais souvent initiée par la recherche des régions du génome ayant des effets sur la variation du caractère ou QTL (Quantitative Trait Locus). Ces QTL sont utilisables en sélection variétale si les effets de chaque QTL sont stables, c'est-à-dire faiblement influencés par l'environnement et/ou par le fonds génétique, et, de préférence, non liés à des QTL contrôlant un caractère défavorable. Des allèles ou des combinaisons d'allèles favorables au caractère étudié peuvent ainsi être définis. Au niveau moléculaire, le gène responsable de ces variations peut être identifié le plus souvent par clonage positionnel, essentiellement dans le cas de QTL à effet fort ou QTL majeur. D'autres approches peuvent être utilisées pour la recherche de gènes candidats associés aux effets des QTL. Dans le cas de la tomate, de nombreuses ressources bibliographiques et génomiques sont disponibles et vont se développer, le séquençage du génome étant en cours. De nombreux mécanismes physiologiques sont étudiés, notamment en ce qui concerne le développement

et la maturation du fruit. De ce fait et grâce à ses caractéristiques biologiques (cycle court, génétique simple, génome relativement petit ...), la tomate s'est imposée comme l'espèce modèle pour les fruits charnus.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de recherche est de mieux comprendre les mécanismes génétiques et physiologiques contrôlant les variations de composantes de la qualité organoleptique et d'approfondir les caractéristiques de texture du fruit de tomate. Ceci sera abordé par la caractérisation de QTL associés à différentes composantes de la texture, et plus particulièrement de la fermeté du fruit. Deux approches complémentaires ont été utilisées: une approche génétique de l'effet individuel de QTL de qualité, de l'influence du fonds génétique et de l'environnement sur l'expression de ces QTL et une approche génomique visant à identifier des gènes candidats susceptibles de correspondre aux effets de ces QTL.

Le manuscrit est composé de sept chapitres.

La **synthèse bibliographique** (chapitre 1) rassemble les principales connaissances sur la tomate, en insistant sur la texture du fruit, et les stratégies et moyens disponibles pour approfondir l'étude de QTL. Une première partie sera consacrée à la présentation de l'espèce avec une description des différentes étapes du développement du fruit de tomate et la définition de la qualité organoleptique. Ensuite, la texture du fruit de tomate sera définie, les mécanismes physiologiques sous-jacents seront décrits et un bilan des connaissances sur le déterminisme génétique de ses composantes sera dressé. La dernière partie abordera les aspects méthodologiques de la caractérisation des QTL.

L'ensemble du matériel végétal et des méthodes utilisés est détaillé dans le **chapitre 2**.

Le **chapitre 3** présente, sous forme d'article publié dans la revue *Theoretical and Applied Genetics*, l'étude des effets individuels des QTL contrôlant six caractères de qualité du fruit de tomate, à travers deux types de populations, dans différents fonds génétiques et en fonction de l'environnement.

Au **chapitre 4**, également présenté sous forme d'article soumis à la revue *Journal of Experimental Botany*, la caractérisation de différentes composantes de la texture est abordée au niveau phénotypique, génétique et physiologique.

Le **chapitre 5** présente la cartographie fine de deux régions d'intérêt localisées sur les chromosomes 4 et 9 où ont été détectés des QTL associés à différentes composantes de la texture du fruit.

Le **chapitre 6** est divisé en trois parties décrivant la recherche de gènes candidats pour les QTL associés à la texture du fruit par une approche "protéome" (i), par une approche "transcriptome" (ii), et la validation de certains gènes candidats issus de ces deux approches (iii).

Enfin, une **discussion générale** (chapitre 7) permettra de relier les différents résultats obtenus par la combinaison d'approches génétique et génomique pour la caractérisation de la texture du fruit de tomate. Les perspectives de ces travaux de recherche seront présentées.

Cette thèse a été financée par l'Institut National de la Recherche Agronomique avec la participation des départements GAP (Génétique et Amélioration des Plantes) et CEPIA (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture). De plus, ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un programme de recherches sur les génomes des plantes associant la France, l'Espagne et l'Allemagne (ERA-PG).

Les différentes structures et unités de recherche ayant participé à ce programme sont:

L'Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes d'Avignon (INRA-GAP)

L'UMR de Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétales d'Avignon (INRA-CEPIA)

L'Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages de Nantes (INRA-CEPIA)

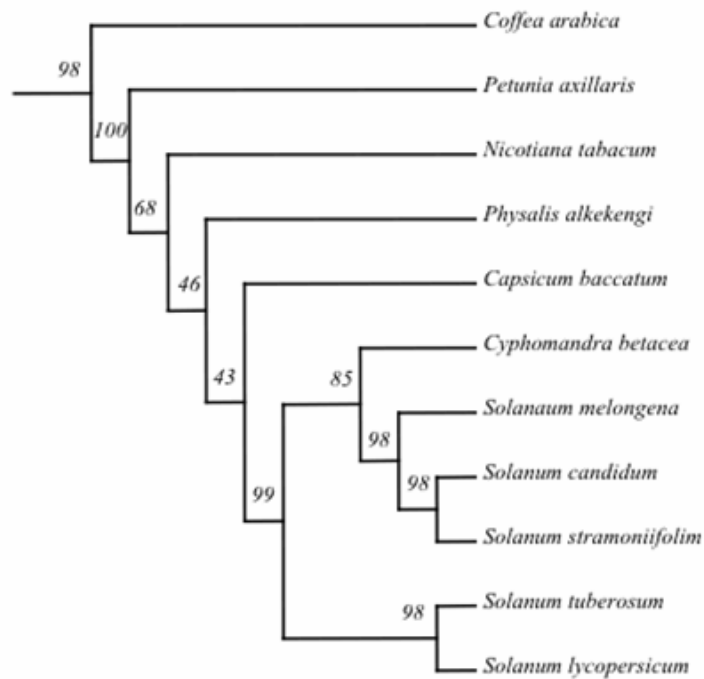
La Maison de l'Alimentation dépendant de la Chambre de Commerce et d'Industrie du  
Vaucluse

# **CHAPITRE I**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

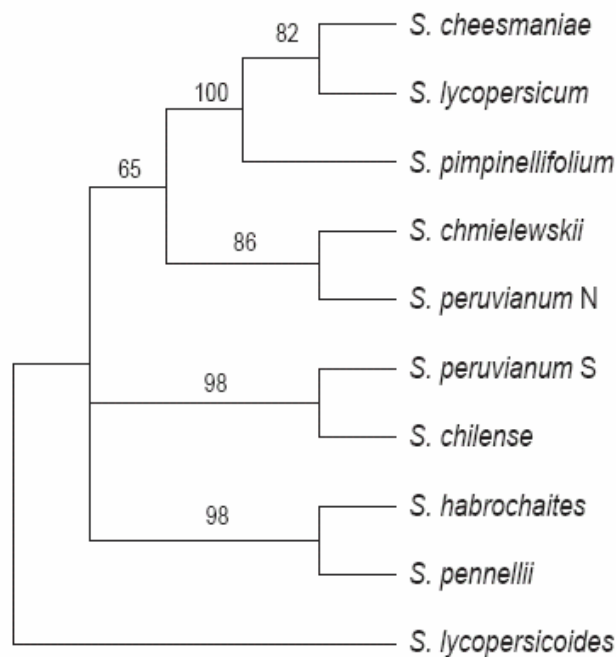
---

**Figure I.1: Classification phylogénétique de la famille des Solanacées d'après Bohs and Olmstead (1997), source [http://www.sgn.cornell.edu/about/about\\_solanaceae.pl](http://www.sgn.cornell.edu/about/about_solanaceae.pl).**



**Figure I.2: Classification phylogénétique des espèces sauvages de tomate, genre *Solanum* section *Lycopersicon* d'après Spooner *et al.* (2005)**

Les valeurs de bootstrap à 50% sont indiquées sur chaque branche.



## CHAPITRE 1 \_ SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### I. La tomate

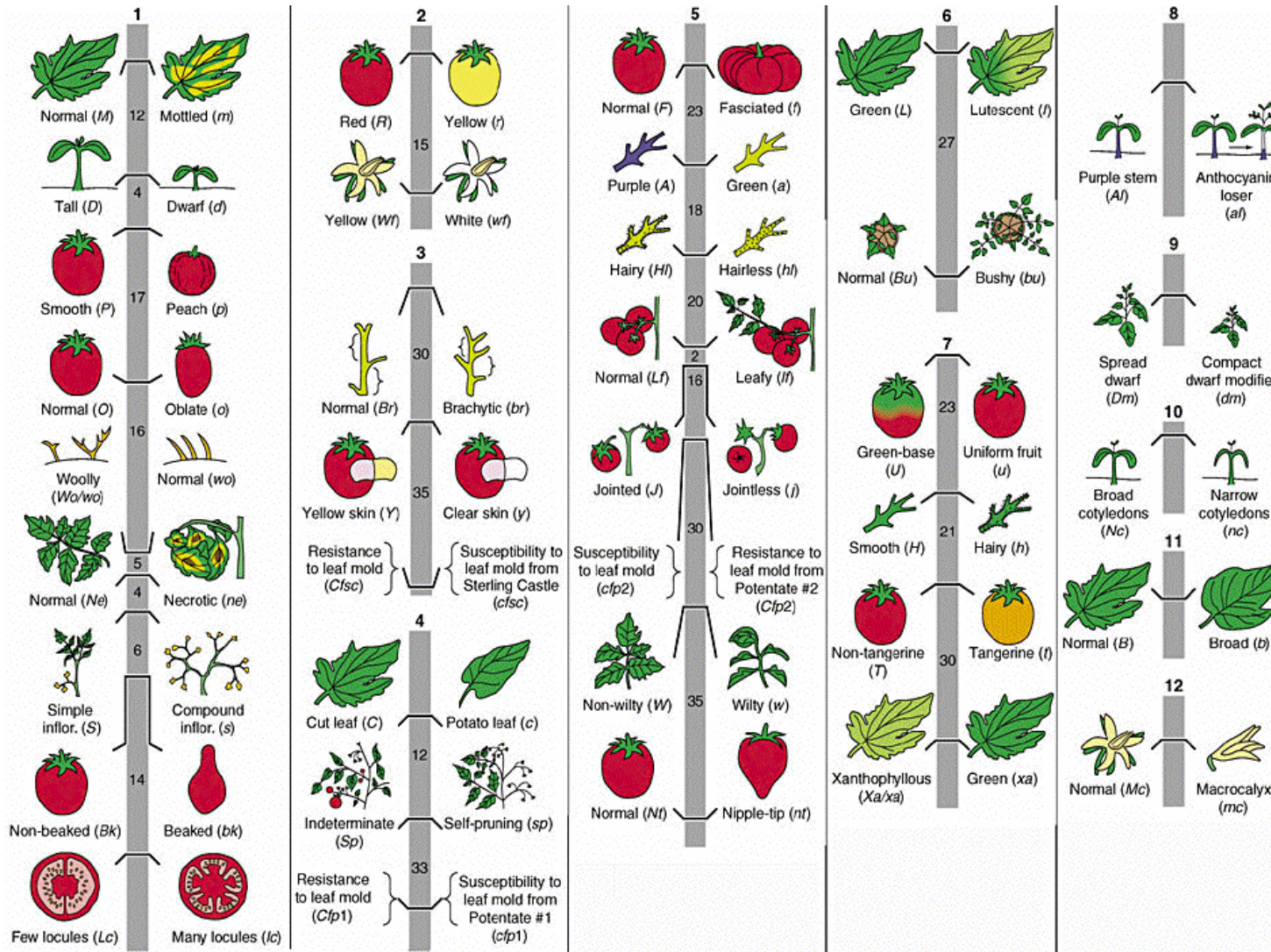
#### I.1. Taxonomie et ressources génétiques

La famille des Solanacées (Figure I.1) comprend plus de 3000 espèces originaires des Andes péruviennes en Amérique du Sud. Cette famille représente le 3<sup>ème</sup> taxon d'importance économique de par la diversité des espèces cultivées, dont la tomate, la pomme de terre, l'aubergine, le piment et le tabac. L'étendue de la biodiversité ainsi que les nombreuses ressources génomiques disponibles pour chacune de ces espèces, notamment chez la tomate, fait de la famille des Solanacées un outil de choix pour des études de génomique comparative. Ainsi, le projet international "Planetary Biodiversity Inventories (PBI) *Solanum*: a worldwide treatment" regroupe les compétences associées à l'étude des ressources génétiques et à l'étude des génomes pour la caractérisation taxonomique de 1500 espèces du genre *Solanum* afin de développer de nouvelles approches pour l'étude des Solanacées (Knapp *et al.*, 2004).

L'utilisation de critères morphologiques et/ou biologiques a longtemps été source de controverses autour de la systématique du genre auquel appartient la tomate. A l'origine classée dans le genre *Solanum*, le genre *Lycopersicon* a finalement été défini pour regrouper différentes espèces de tomate par Miller en 1754. En 1940, Muller a publié la première description complète des neuf espèces du genre *Lycopersicon* (Muller, 1940) mais, de nos jours, la classification de référence est celle proposée par Rick *et al.* (1990). Cette classification a évolué avec plusieurs études utilisant différents types de marqueurs moléculaires (Alvarez *et al.*, 2001; Miller and Tanksley, 1990; Tam *et al.*, 2005). Récemment, la découverte d'une nouvelle espèce endémique aux Iles Galapagos ainsi que l'étude combinant systématique phénotypique et moléculaire ont conduit à reclasser la tomate dans le genre *Solanum* (Spooner *et al.*, 2005). La nouvelle classification phylogénétique, composée de 10 espèces, est représentée à la figure I.2.

L'espèce de tomate cultivée, *Solanum lycopersicum* Mill. (ex *Lycopersicon esculentum*), est issue de la domestication de l'espèce sauvage *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, elle-même constituée d'hybrides entre *S. lycopersicum* et *S. pimpinellifolium*. Les croisements interspécifiques sont réalisables avec toutes les espèces sauvages bien que plus difficilement avec *S. peruvianum* et *S. chilense*. Toutes ces espèces constituent une source de variabilité pour la sélection variétale. En complément, plusieurs collections de mutants naturels ou induits sont disponibles et ont été à l'origine de nombreuses améliorations variétales.

Figure I.3: Carte génétique de la tomate basée sur des marqueurs morphologiques d'après Butler (1952).





### 1.2. Eléments de biologie

Adaptée à des zones et des conditions de culture très variables, la tomate cultivée est autogame, avec des fleurs hermaphrodites. De par la structure de la fleur et l'absence de nectar, la fécondation croisée par les insectes est rare. En climat tempéré, c'est une plante annuelle, indifférente à la photopériode, dont le cycle biologique est relativement court, 4 mois environ, réparti en 8 semaines de la graine à la fleur et 8 semaines de la fleur au fruit. Les variétés de tomate destinée à la consommation de frais sont à port indéterminé c'est-à-dire que la tige peut se développer indéfiniment, chaque bouquet floral étant séparé par 3 feuilles. Ces variétés nécessitent une culture tuteurée, majoritairement conduite sous abri. Pour les variétés de tomate dites d'industrie, essentiellement destinée à la transformation, la croissance de la plante est à port déterminé, conduisant au développement de quelques bouquets et permettant une récolte unique et mécanique en plein champ.

### 1.3. Caractéristiques du génome et ressources génomiques

La tomate est une espèce diploïde,  $2n = 2x = 24$  chromosomes. La première carte génétique basée sur des marqueurs morphologiques a été décrite par Butler (1952) (Figure 1.3). La carte génétique de référence (Tanksley *et al.*, 1992) a été construite à partir d'une population F2 de 80 individus issue du croisement interspécifique *S. lycopersicum* x *S. pennellii*. Sa taille est de 1300 cM et, à l'origine, un millier de marqueurs moléculaires, essentiellement RFLP, la composait. Aujourd'hui, plus de 2300 marqueurs sont cartographiés: des marqueurs microsatellites et surtout des marqueurs COS (Conserved Ortholog Set). Les marqueurs COS ont été développés par comparaison des séquences d'EST (Expressed Sequence Tags) de tomate aux séquences du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Fulton *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006). Ces marqueurs présentent de nombreux avantages: (i) ils permettent de déterminer le niveau de synténie entre la tomate et *A. thaliana*, (ii) beaucoup de ces marqueurs correspondent à des gènes de fonctions connues, (iii) et à une échelle supérieure, ce sont des outils puissants pour la génomique comparative.

La taille du génome de la tomate est de 950 Mb ( $2C = 1,90$  pg d'ADN), soit beaucoup plus grande que celle du génome d'*Arabidopsis thaliana* (130 Mb), mais relativement petite par rapport aux génomes d'autres espèces telles que le maïs 2500 Mb ou le blé 16000 Mb. Le génome de la tomate contient environ 23% d'euchromatine qui correspond aux régions riches en gènes (Peterson *et al.*, 1996). Une collection de plus de 162000 EST a été obtenue à partir de 27 banques d'ADNc de tomate (Moore *et al.*, 2002). La moitié de ces EST a été isolée de fruits et de fleurs à différents stades de développement, l'autre moitié correspond à différents organes de la plante: feuilles, tiges, racines, graines, cal. L'analyse de cette collection d'EST a abouti à la définition de 32000 unigènes, répartis à part égale en contigs et en singletons (Van der Hoeven *et al.*, 2002). De plus, cette analyse a permis

d'estimer plusieurs paramètres décrivant le génome de la tomate notamment en comparant les séquences d'EST à celles du génome d'*A. thaliana*:

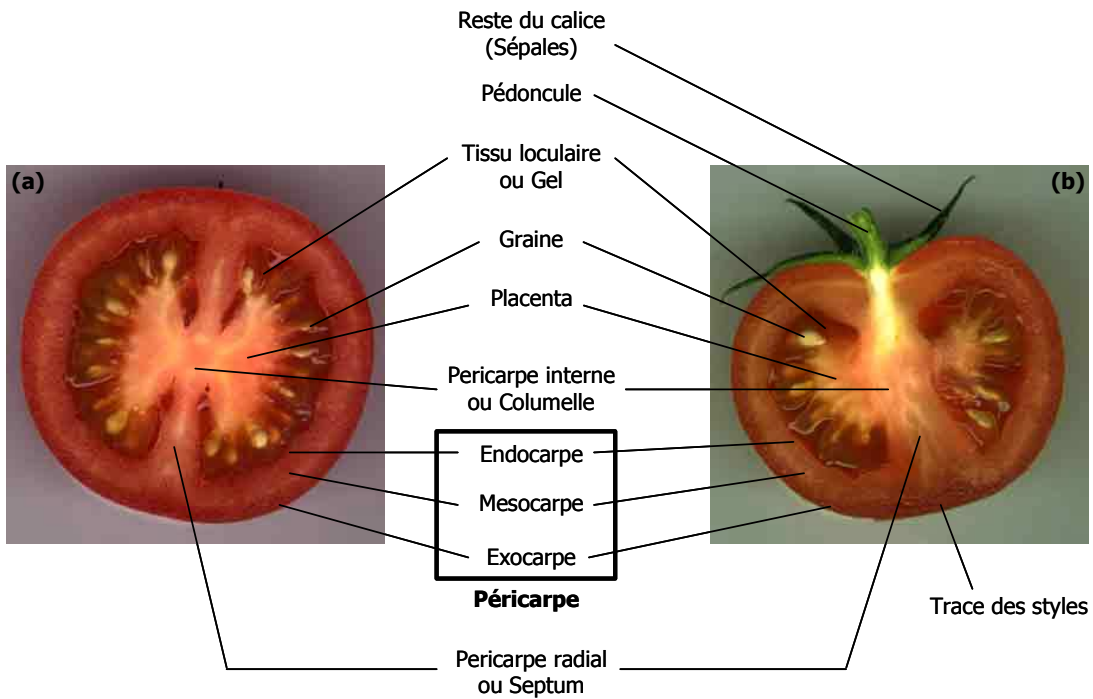
- le génome de la tomate est composé de 35000 gènes, contre 25500 chez *A. thaliana*, (soit environ 27 gènes par cM), dont 50% appartiennent à des familles multigéniques;
- la taille des gènes se situe entre 5 et 17 kb, avec une moyenne de 9,8 kb;
- l'ensemble des unigènes actuellement disponibles représente moins de la moitié des gènes de la tomate et 70% montrent une homologie avec des gènes d' *A. thaliana*.

Concernant la cartographie physique, deux banques BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ont été publiées. La première a été construite à partir de *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 et de l'enzyme de restriction *Hind* III. Elle est constituée de 129024 clones avec une taille moyenne des inserts de 117,5 kb et couvre l'équivalent de 15 génomes haploïdes (Budiman *et al.*, 2000). La seconde a été développée à partir de *S. lycopersicum* cv. TA496, en utilisant l'enzyme *Eco* RI couplée à une technique permettant de sélectionner des fragments non-méthylés, potentiellement plus riches en gènes (Wang *et al.*, 2005). Sur la base de la banque BAC *Hind* III et de deux autres banques non publiées (construites avec les enzymes *Eco* RI et *Mbo*I), le séquençage du génome de la tomate a été initié à travers une collaboration internationale à laquelle 10 pays participent, le chromosome 7 ayant été attribué à la France (Mueller *et al.*, 2005b). L'objectif est de couvrir les 220 Mb correspondant aux régions riches en gènes, ce qui représente un peu moins de 2300 clones BAC à séquencer. La carte génétique de référence mise à jour (Tanksley *et al.*, 1992) a permis l'ancrage de la carte physique. A ce jour, 650 points d'ancrage et plus de 402000 séquences de fins de BAC sont disponibles, 16% des BAC ont été séquencés et une homologie de séquence a été observée pour 5,87% des unigènes du SGN ([http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato\\_sequencing.pl](http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato_sequencing.pl)).

Trois bases de données rassemblant de nombreuses ressources génomiques sont consultables, deux sont spécifiques à la tomate et la 3<sup>ème</sup> est consacrée aux Solanacées:

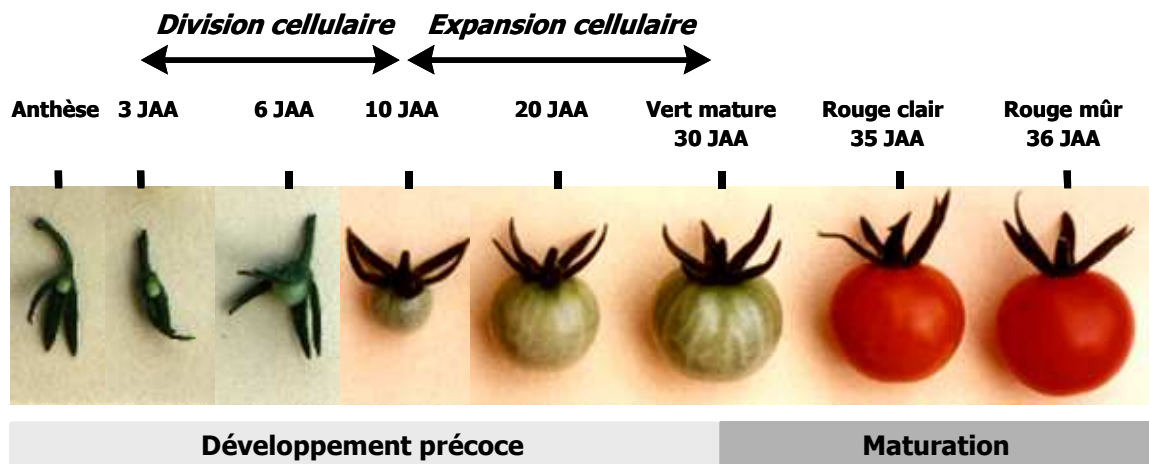
- DFCI Tomato Gene Index, LeGI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato>: représente une synthèse non-redondante de tous les unigènes identifiés chez la tomate avec les séquences consensus obtenues après assemblage des séquences d'EST, des données sur leurs fonctions et leurs profils d'expression. La dernière mise à jour de la base de données du 21 juin 2006 rescense 213947 EST et 41425 unigènes (version 11.0).
- Tomato Expression Database, TED, <http://ted.bti.cornell.edu/>: rassemble des données d'expression essentiellement obtenues à partir de puces à ADN spécifiques de la tomate (Fei *et al.*, 2006)
- Sol Genomics Network, SGN, <http://www.sgn.cornell.edu/>: réunit des informations sur la taxonomie, la génétique, et la génomique des espèces de la famille des Solanacées principalement (tomate, aubergine, pomme de terre, piment, pétunia) et du caféier de la famille des Rubiacées (Mueller *et al.*, 2005a)

**Figure I.4: Coupes transversale (a) et longitudinale (b) d'un fruit de tomate à maturité.**



**Figure I.5: Différentes phases du développement du fruit de tomate.**

Les stades de développement illustrés dans le cas d'une variété de type cerise sont repérés dans le temps d'après le nombre de jour après anthèse (JAA).



Enfin, il existe aussi une base de données recensant les métabolites du fruit de tomate obtenus par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS): Metabolome Tomato Database, MoTo DB, <http://appliedbioinformatics.wur.nl/moto/> (Moco *et al.*, 2006).

#### *1.4. Le développement du fruit de tomate*

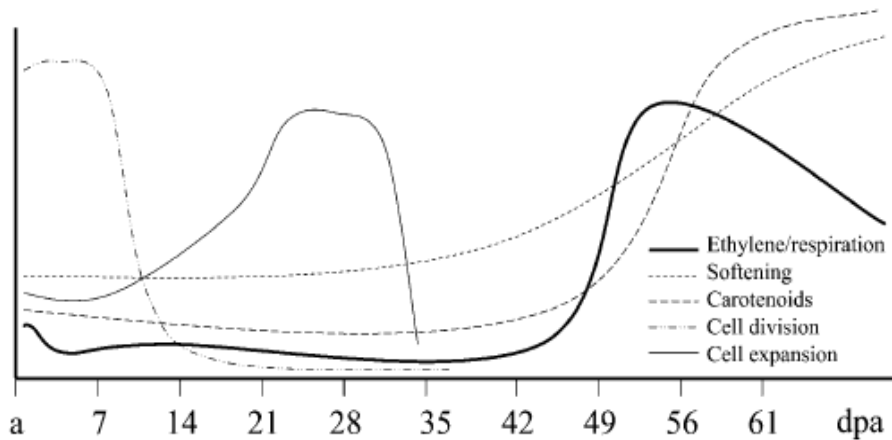
La tomate est un fruit déhiscent appartenant à la famille des baies qui est issu du développement accru de l'ovaire après fusion des parois des carpelles (Gillapsy *et al.*, 1993). Ainsi, le fruit de tomate se caractérise par une structure complexe associant différents tissus aux caractéristiques spécifiques, particulièrement à maturité (Figure I.4). Les cavités locales (loges) sont délimitées par le péricarpe externe, le septum ou péricarpe radial et la columelle ou péricarpe interne. Les graines portées par le placenta sont enveloppées dans le tissu local (gel) qui occupe dans des proportions variables la loge. Au niveau du péricarpe externe, trois parties se distinguent: la peau ou exocarpe protégée par une fine cuticule, le mésocarpe et l'endocarpe qui constituent la chair.

Quelques heures après anthèse, la fécondation a lieu (Ho and Hewitt, 1986) et la nouaison du fruit est activée au niveau de l'ovaire par les auxines (Gillapsy *et al.*, 1993). La première phase de croissance (Figures I.5 et I.6) se caractérise par une courte période de divisions mitotiques intensives au niveau des cellules du péricarpe (Gillapsy *et al.*, 1993; Mapelli *et al.*, 1978). Le nombre d'ovules fécondés détermine le taux de croissance de l'ovaire et le taux de divisions cellulaires (Varga and Bruisma, 1986) et le nombre de cellules présentes à la fin de la phase active de divisions mitotiques est en étroite relation avec la taille finale du fruit (Bohner and Bangerth, 1988; Tanksley, 2004).

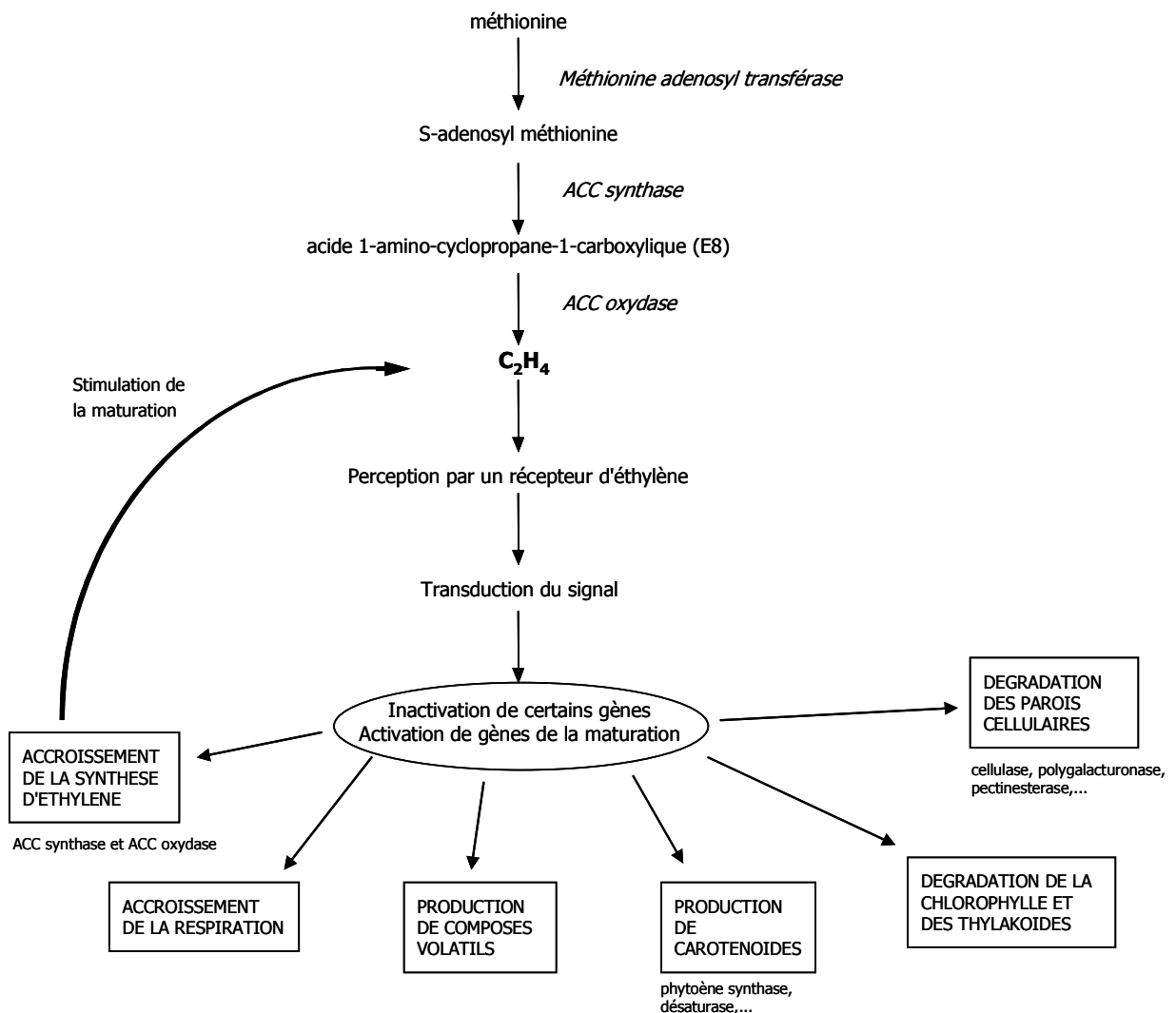
La deuxième étape du développement du fruit débute environ deux semaines après anthèse. Elle correspond à une phase d'expansion cellulaire au niveau du mésocarpe et du placenta (Varga and Bruisma, 1986) ainsi qu'au développement de l'embryon dans les graines. Les auxines seraient impliquées dans l'initiation de l'expansion cellulaire tandis que les gibbérellines permettraient la poursuite du processus (Catala *et al.*, 2000; Gillapsy *et al.*, 1993). Au cours des premières phases de l'expansion cellulaire, le taux de division cellulaire décroît. Dès ces stades précoces, l'accumulation symplastique d'amidon au niveau du péricarpe se produit et serait un facteur déterminant pour l'assimilation rapide des hexoses au niveau de l'apoplaste à maturité (Ruan and Patrick, 1995; Schaffer and Petreikov, 1997). La croissance des cellules peut atteindre des proportions équivalentes à 10 fois la taille initiale (Gillapsy *et al.*, 1993) et s'accompagne d'une augmentation du niveau de ploïdie qui passe de 2 à 256C (Bergervoet *et al.*, 1996; Joubès *et al.*, 1999). Ce phénomène d'endoréduplication des cellules du péricarpe est décrit pour de nombreux fruits charnus (Coombe, 1976) et concerne également les tissus locaux de la tomate (Joubès *et al.*, 1999).

**Figure I.6: Principales modifications intervenant au cours du développement et de la maturation du fruit de tomate, d'après Giovannoni (2004).**

L'évolution relative en terme de division cellulaire, d'expansion cellulaire, de respiration, de synthèse d'éthylène, d'accumulation de caroténoïdes et de maturation du fruit est illustrée dans le cas d'une tomate de gros calibre. L'échelle de temps utilisée est le nombre de jour après anthèse (dpa).



**Figure I.7: Synthèse et rôle de l'éthylène dans la maturation de la tomate d'après Hobson and Grierson (1993)**



A travers l'étude de 20 lignées de tomate représentatives de la diversité génétique et de la variabilité de taille du fruit, (Cheniclet *et al.*, 2005) ont pu définir un modèle général pour ces aspects du développement, confirmant que le nombre de cellules à l'issue de la phase de divisions cellulaires, ainsi que le niveau d'expansion et d'endoréduplication des cellules sont des facteurs déterminants pour la taille finale du fruit. Très peu de données concernant les gènes impliqués dans les stades de développement précoces du fruit sont disponibles. Une étude récente a permis d'identifier des gènes exprimés au niveau de l'exocarpe dont les fonctions seraient compatibles avec le rôle protecteur de la peau du fruit et décriraient une forte activité métabolique (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). De plus, des gènes contrôlant les flux d'eau, la synthèse des acides organiques et le stockage des sucres seraient exprimés durant la phase d'expansion cellulaire au niveau du tissu loculaire.

A l'issue de ces phases de différenciation cellulaire, le fruit au stade vert mature a atteint sa taille finale et les graines sont à maturité. Le péricarpe externe est composé de petites cellules au niveau de l'exocarpe et de cellules polyploïdes, allongées, présentant de grandes vacuoles au niveau du mésocarpe. Le tissu loculaire, également composé de cellules polyploïdes, prend un aspect gélatineux. La maturation du fruit commence alors (Figure I.5). La tomate est un fruit climactérique qui présente un pic de respiration associé à un pic de biosynthèse d'éthylène déclenchant la maturation du fruit (Figure I.6) (Giovannoni, 2004; Hobson and Grierson, 1993; Lelievre *et al.*, 1997). Ce processus se traduit par de rapides modifications aux niveaux biochimique, physiologique et structural se répercutant sur l'apparence du fruit, la texture, la saveur et les arômes du fruit (Figure I.7). Les quatre évolutions majeures sont:

- le changement de couleur du fruit suite à la dégradation de la chlorophylle et à l'accumulation de caroténoïdes après transformation des chloroplastes en chromoplastes (Schuch *et al.*, 1989);
- la modification de la texture du fruit suite à la perturbation du métabolisme des parois cellulaires (synthèse et dégradation) et l'altération des propriétés de turgescence des cellules (Barrett *et al.*, 1998; Harker *et al.*, 1997);
- l'évolution des teneurs en sucres, en acides et en composés volatils (Baldwin *et al.*, 1991; Miron *et al.*, 2002);
- l'augmentation de la sensibilité aux pathogènes (Sugar, 2002).

Si les phases de développement précoces sont relativement peu décrites, de nombreuses études décrivent la maturation du fruit, le plus souvent en relation avec la biosynthèse de l'éthylène, aussi bien d'un point de vue génétique (Brummell, 2005; Giovannoni, 2004; Seymour and Manning, 2002), biochimique (Bleecker and Kende, 2000; Tucker, 1993) que moléculaire (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Alexander and Grierson, 2002; Carrari and Fernie, 2006; Fei *et al.*, 2004; Watkins, 2002; White, 2002). Les approches utilisées pour isoler les gènes impliqués dans les différents mécanismes physiologiques mis en jeu au cours de la maturation se basent essentiellement sur le transfert des connaissances acquises chez *A. thaliana* et sur la caractérisation de mutants.

L'éthylène est l'hormone la plus étudiée du fruit de tomate ce qui a permis d'en décrire la voie de biosynthèse et d'obtenir des éléments sur les mécanismes de régulation. Les gènes de la voie de biosynthèse comme les ACC oxydases et ACC synthases (Barry *et al.*, 2000; Nakatsuka *et al.*, 1998) ont été identifiés ainsi que des récepteurs de l'éthylène (Klee and Tieman, 2002), des facteurs de transcription (Manning *et al.*, 2006; Vrebalov *et al.*, 2002) et des protéines de la voie de transduction (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Tieman *et al.*, 2001). De plus, les mutations étudiées ayant souvent des effets pléiotropes, de nombreux autres gènes régulés par l'éthylène ont pu être caractérisés, particulièrement ceux impliqués dans le métabolisme des parois cellulaires tel que l'endo-polygalacturonase, les pectines méthylestérases, les  $\beta$ -galactosidases, les cellulases ou les expansines (Redgwell and Fischer, 2002).

Concernant les voies métaboliques des caroténoïdes (Hirschberg, 2001), des sucres (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001) et des composés volatils (Buttery, 1993; Dudareva *et al.*, 2004), elles sont relativement bien caractérisées même si les voies de régulation le sont moins. Toutes les enzymes contrôlant la biosynthèse des caroténoïdes ont été clonées comme, par exemple, la phytoène synthase *Psy1* (Fray and Grierson, 1993), ainsi que certaines enzymes du métabolisme des sucres comme l'invertase apoplastique *Lin5* (Fridman *et al.*, 2000).

Malgré la masse de données acquises sur les différentes voies métaboliques et les mécanismes physiologiques associés, le développement et la maturation du fruit font intervenir des processus complexes, hautement régulés et impliquant des familles multigéniques qui rendent encore très difficile la compréhension du phénomène biologique dans son ensemble. Bien que les siliques d'*Arabidopsis thaliana* soient morphologiquement très éloignées du modèle des fruits charnus, le transfert des connaissances acquises chez cette espèce peut constituer le point de départ de la caractérisation des interactions entre les différentes cascades de régulation présumées intervenir au cours du développement et de la maturation des fruits (Liljegren *et al.*, 2004). Ceci s'est particulièrement vérifié dans le cas de l'étude de la voie de biosynthèse et des mécanismes de régulation de l'éthylène où le modèle général défini chez *A. thaliana* s'est avéré être conservé chez la tomate malgré quelques modifications concernant la composition des familles multigéniques et les profils d'expression de ces gènes (O'Malley *et al.*, 2005).

### 1.5. La qualité organoleptique du fruit de tomate

La qualité organoleptique d'un fruit réunit l'ensemble des composantes évaluées par quatre des cinq sens. La vue et le toucher seront sollicités au moment de l'achat où une attention particulière sera apportée à la couleur, la forme et la fermeté du fruit. L'odorat et le goût interviennent au moment de la consommation pour la perception des saveurs, sucrées et acides essentiellement, des arômes et de la texture en bouche (Janse and Schols, 1995; Stevens, 1972).

La flaveur (saveur et arômes) du fruit se caractérise majoritairement par des composantes chimiques associées à la teneur en sucres, en acides et à la composition en arômes. A maturité, le fruit de tomate est constitué d'environ 95% d'eau et de 5% de matière sèche composée de 50% de sucres (fructose et glucose), 25% d'acides organiques (acides citriques et maliques), 8% de minéraux, 2% d'acides aminés, de caroténoïdes et autres métabolites secondaires (Davies and Hobson, 1981; Hobson and Bedford, 1989). La perception des saveurs sucrées et acides est principalement associée aux teneurs en fructose (pouvoir sucrant supérieur au glucose) et en acide citrique (Stevens *et al.*, 1977). Concernant l'intensité aromatique, plus de 400 composés volatils ont été identifiés pour le fruit de tomate (Petro-Turza, 1986), mais seul un sous-ensemble est important dans la perception des arômes, le nombre variant d'une trentaine à une dizaine selon les études (Baldwin *et al.*, 2004; Buttery, 1993). Enfin, de nombreux attributs sont utilisés pour décrire la texture du fruit tels que la fermeté, la farinosité, la jutosité, la peau gênante, le fondant, le croquant.

De nombreuses méthodes sont disponibles pour évaluer la qualité organoleptique du fruit de tomate. L'analyse sensorielle, réalisée par un panel de dégustateurs entraînés, est la plus représentative de la perception des consommateurs et elle permet une description complète de la qualité gustative du fruit (saveur, arômes et texture). Cependant, ce sont des expérimentations lourdes et relativement chères, inutilisables à grande échelle. Pour certains caractères, des techniques instrumentales permettent de retranscrire de façon fiable l'évaluation sensorielle, de fortes corrélations ayant été observés notamment entre teneur en sucres et saveur sucrée, teneur en acides et acidité (Causse *et al.*, 2003; Georgelis *et al.*, 2004).

Quelques études décrivent la variabilité génétique de la qualité gustative du fruit de tomate en relation avec les préférences des consommateurs (Causse *et al.*, 2003; Hobson *et al.*, 1990; Serrano-Megias and Lopez-Nicolas, 2006). Les principales conclusions concernant les attentes des consommateurs vont toutes dans le même sens. A l'achat, la couleur du fruit est le facteur déterminant, vient ensuite la fermeté au toucher et en dernier lieu la forme et la taille. Du point de vue gustatif, l'attention est portée en priorité sur l'intensité aromatique globale, puis sur les saveurs sucrée et acide et enfin sur la texture en bouche. Bien que la nostalgie des variétés anciennes soit fréquemment évoquée par les consommateurs, des tests hédoniques en aveugle ont montré leur préférence pour les variétés hybrides entre des variétés modernes et anciennes (Causse *et al.*, 2003). Plus précisément, la préférence allait vers des fruits sucrés et juteux, pas trop fermes, ni trop mous, et non farineux.

L'élaboration de la qualité organoleptique est influencée par de nombreux facteurs à commencer par les caractéristiques génétiques de la variété (Langlois *et al.*, 1996), mais aussi par les pratiques culturales, les conditions de culture (Georgelis *et al.*, 2006; Thybo *et al.*, 2005), le stade de récolte (Baldwin *et al.*, 1991) et les conditions de conservation (Aguayo *et al.*, 2004; Artes *et al.*, 1999;



Ratanachinakorn *et al.*, 1997). L'amélioration génétique des composantes de la qualité organoleptique du fruit est donc un processus complexe qui demande de maîtriser ces différents paramètres.

La caractérisation du déterminisme génétique contrôlant la qualité du fruit de tomate a été abordée majoritairement par la recherche de QTL (Quantitative Trait Loci), le plus souvent à partir de croisements interspécifiques (Bernacchi and Tanksley, 1997; Doganlar *et al.*, 2002; Eshed and Zamir, 1995; Fulton *et al.*, 1997; Fulton *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 1988; Tanksley *et al.*, 1996). Les principales composantes étudiées sont le poids du fruit, les teneurs en sucres, en acides, en solides solubles et la fermeté pour lesquelles de nombreux QTL ont été détectés, certains expliquant une forte part de la variation phénotypique. Parallèlement, la cartographie de gènes spécifiques au développement et à la maturation du fruit fournit des informations susceptibles d'accélérer l'identification des gènes impliqués dans l'expression de ces caractères (Causse *et al.*, 2004; Giovannoni *et al.*, 1999; Tanksley *et al.*, 1992). La caractérisation de mutants naturels de la maturation (*rin*, *nor*, *Nr*, *Cnr*) est une approche complémentaire pour mieux comprendre le contrôle génétique de certains caractères, ainsi que les mécanismes physiologiques associés (Seymour and Manning, 2002).

Concernant les composantes de la qualité organoleptique du fruit de tomate, les voies de synthèse biochimiques ainsi que les gènes codant les enzymes en jeu sont bien décrits pour la couleur, le lycopène et les carotènes, (Fray and Grierson, 1993; Ronen *et al.*, 2000), pour les sucres (Kanayama *et al.*, 1998; Odanaka *et al.*, 2002) et les acides (Jeffery *et al.*, 1988) même si les voies de régulation ne sont pas toujours bien identifiées. Pour les arômes, bien que de nombreux composés volatils aient été identifiés, les voies de biosynthèse restent, dans l'ensemble, peu connues, notamment du fait de la diversité des voies métaboliques en jeu (Tieman *et al.*, 2006). Néanmoins, le rôle de certains gènes tel que la lipoxigénase ou l'alcool déshydrogénase a été démontré (Chen *et al.*, 2004; Prestage *et al.*, 1999). Les mécanismes physiologiques associés aux paramètres de texture seront détaillés dans la partie suivante consacrée à la texture du fruit.

## II. La texture du fruit

### II.1. Présentation

La texture se définit comme l'ensemble des "manifestations sensorielles et fonctionnelles des propriétés structurales, mécaniques et de surface d'un aliment détectées par le toucher, le goût, la vue et l'ouïe" (Szczeniak, 2002). Dans le cas des fruits et légumes, la définition de Bourne (1982) est plus appropriée et plus précise: "la texture est l'ensemble des caractères physiques résultant des éléments structuraux de l'aliment, évalués par la sensation au toucher dans la main ou dans la bouche, associés à la déformation, à la désintégration et à l'écoulement suite à l'application d'une force, mesurés en fonction de la force, de la distance et du temps". Ces deux définitions illustrent la complexité de ce caractère qui fait intervenir de nombreuses composantes, pas toujours facile à évaluer et spécifiques de l'aliment décrit. Pour les fruits charnus, les descripteurs généralement utilisés sont la fermeté, la farinosité, le fondant, le croquant, la peau épaisse et gênante, la jutosité (Abbott, 2004; Harker *et al.*, 1997).

Les propriétés texturales du fruit sont déterminées dès les stades précoces du développement du fruit et évoluent au cours de la maturation du fruit. De nombreux mécanismes biochimiques et physiologiques relatifs à la structure des tissus sont impliqués et concernent essentiellement la pression osmotique des cellules, l'adhésion cellulaire, la rigidité et l'élasticité des parois cellulaires (Harker *et al.*, 1997). L'action coordonnée de ces mécanismes hautement régulés sera déterminante pour la perception de la texture du fruit à maturité et a une incidence à la fois sur les propriétés des structures cellulaires au cours de la différenciation des tissus du fruit mais aussi sur l'évolution de ces tissus au cours de la maturation. Les modifications texturales se traduisant essentiellement par le ramollissement du fruit, la plupart des études concernant la texture du fruit se focalise sur la fermeté du fruit en relation avec la structure et l'évolution des parois cellulaires (Redgwell and Fischer, 2002; Waldron *et al.*, 2003).

Pour les consommateurs, la texture est un des critères essentiels de la qualité des fruits. Ce caractère intervient à la fois à l'achat, avec la perception au toucher de la fermeté commerciale du fruit, et au moment de la consommation avec les sensations perçues en bouche. Pour prendre en compte la texture dans les programmes de sélection variétale, il est nécessaire de pouvoir mesurer le caractère. Seule l'analyse sensorielle permet d'évaluer les différentes composantes simultanément. Pour certains paramètres comme la fermeté, des méthodes instrumentales sont disponibles mais permettent, le plus souvent, de ne décrire qu'une composante à la fois (Barrett *et al.*, 1998). De plus, les mesures physiques obtenues concernent généralement les caractères de texture associés à la perception au toucher ou à la mise en bouche mais ne retranscrivent pas les sensations perçues au cours de la mastication (Szczeniak, 2002). Autre difficulté pour l'amélioration variétale, la texture du fruit, en plus d'être un caractère complexe, difficile à évaluer, est influencée non seulement par les facteurs

génétiques, mais aussi par les conditions environnementales et par les conditions de conservation après récolte.

Cette présentation reflète les difficultés de la caractérisation de la texture de par la diversité des composantes concernées et des facteurs pouvant les influencer, la multitude des mécanismes biochimiques et physiologiques en jeu et enfin, l'aspect dynamique avec l'évolution du caractère au cours de la maturation et de la conservation du fruit. Cependant, de nombreuses données ont d'ores et déjà été acquises, principalement sur les modèles tomate et pomme, mais également sur le kiwi. Une synthèse des connaissances acquises sur les différentes approches utilisées afin de caractériser la texture du fruit est présentée dans les paragraphes suivants, en insistant sur les informations relatives au fruit de tomate.

## *II.2. Les méthodes d'évaluation de la texture*

Afin de pouvoir comprendre les mécanismes biochimiques, physiologiques et génétiques mis en jeu dans les modifications texturales, il est nécessaire d'être capable de mesurer les différentes composantes de la texture. Cependant, face à la diversité des propriétés sensorielles et physiques, la mesure de ce caractère se révèle compliquée. Ceci est particulièrement vrai pour le fruit de tomate qui est composé de plusieurs types de tissus aux caractéristiques spécifiques, comparé à l'homogénéité des tissus de la pomme, par exemple (Duprat *et al.*, 1991; Jackman and Stanley, 1995a). Différentes approches visant à évaluer la texture du fruit de tomate dans son ensemble ou ciblant certaines composantes ont été développées et se répartissent en trois catégories: l'analyse sensorielle, les analyses physiques et les analyses chimiques (Barrett *et al.*, 1998; Harker *et al.*, 1997).

### a/ L'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est l'examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens. Deux catégories d'analyse sensorielle se distinguent: (i) les tests hédoniques réalisés par des consommateurs non avertis, désignés de façon aléatoire qui notent des préférences et (ii) les analyses descriptives quantitatives réalisés par un panel de dégustateurs entraînés qui permettent d'obtenir un profil sensoriel spécifique de chacun des produits testés (Stone *et al.*, 1974). Le panel de dégustateurs est sélectionné par l'évaluation de leur pouvoir discriminant (sensibilité sensorielle) et la vérification de la reproductibilité de leur jugement, l'objectif étant de constituer un jury homogène.

Si pour certaines composantes de la qualité organoleptique du fruit, des techniques instrumentales sont corrélées à l'évaluation sensorielle (sucrosité, acidité), seul l'homme est capable de décrire les différents paramètres de la texture du fruit incluant les sensations au toucher et en bouche.

**Tableau I.1: Classification des descripteurs utilisées pour qualifier la texture d'un aliment, d'après Szczesniak (1963) et la norme ISO 11036 (1994).**

<i>➤ Propriétés mécaniques</i>		
Paramètres primaires	Paramètres secondaires	Descripteurs
Dureté		Mou, ferme, dur
Cohésion	Fragilité	Friable, croquant, cassant, craquant, croustillant
	Mâchement	Tendre, masticable, coriace
	Broyabilité	Sablé, farineux, pâteux, gommeux
Viscosité		Liquide, lié, onctueux, visqueux
Elasticité		Plastique, malléable, élastique, caoutchouteux
Adhérence		Collant, adhérent, gluant, poisseux
<i>➤ Propriétés géométriques</i>		
Type		Exemples
Taille et forme des particules	Granulosité	Lisse, crayeux, granuleux, grenu, grossier
Arrangement des particules	Conformation	Fibreux, cellulaire, cristallisé, soufflé, aéré
<i>➤ Propriétés de surface</i>		
Paramètres primaires	Paramètres secondaires	Descripteurs
Humidité		Sec, humide, mouillé, juteux
Lipidité	Caractère huileux	Huileux
	Caractère graisseux	Gras

**Tableau I.2: Liste des descripteurs utilisés pour définir le profil sensoriel de la texture du fruit de tomate.**

	DESCRIPTEUR	DEFINITION
<b>Texture en bouche</b>	<b>Juteuse</b>	Absence de liquide à forte quantité de jus en bouche après mastication
	<b>Ferme</b>	Résistance à la mastication
	<b>Charnue</b>	Une tomate charnue est une tomate compacte et pulpeuse, avec une faible proportion de graines et de vide et une chair très dense
	<b>Farineuse</b>	Représente la texture de la purée de pomme de terre; pâteuse
	<b>Peau épaisse</b>	Peau épaisse
	<b>Peau gênante</b>	Peau difficile à avaler, collant au palais

En analyse sensorielle, la texture se définit comme "l'ensemble des propriétés mécaniques, géométriques et de surface perceptibles par les mécano-récepteurs, les récepteurs tactiles et éventuellement, par les récepteurs visuels et auditifs" (norme ISO 11036:1994). Les propriétés mécaniques sont les propriétés liées à la réaction d'un produit à une contrainte et se traduisent en terme de dureté, cohésion, viscosité, élasticité et adhérence. Les propriétés géométriques sont les propriétés liées aux dimensions, à la forme et l'arrangement des particules dans un produit. Enfin, les propriétés de surface sont les propriétés liées aux sensations perçues en bouche, produites par l'eau, les matières grasses et par la façon dont ces constituants sont libérés. L'ensemble de ces propriétés ont été très largement étudié (Szczesniak, 2002). De plus, plusieurs normes officielles relatives aux différentes étapes de l'analyse sensorielle et à la nature du produit testé existent et sont gérées par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO):

- la norme ISO 11036 "Analyse sensorielle, Méthodologie, Profil de la texture" (1994);
- la norme ISO 5492 "Analyse sensorielle, Vocabulaire" (1994);
- la norme ISO 11035 "Recherche et Sélection de descripteurs pour l'élaboration d'un profil sensoriel par approche multifactorielle" (1994);
- la norme ISO 8586-1 "Sélection, Entraînement et Contrôle des sujets qualifiés" (1993).

Les analyses descriptives quantitatives demandent de définir une liste de termes descriptifs, spécifiques à chaque produit. Szczesniak (1963) a établi une classification des attributs permettant de qualifier précisément les sensations relatives à la texture des aliments solides (Tableau I.1) et a également publié un lexique décrivant le contexte dans lequel chaque attribut doit être utilisé pour décrire la texture (Szczesniak and Skinner, 1973). D'autres travaux ont permis d'enrichir cette classification de nouveaux descripteurs (Munoz, 1986). L'ensemble de ces données a permis l'élaboration d'un lexique qui sert de base à l'élaboration d'une liste de descripteurs adaptés à un produit donné (norme ISO 11036) afin de construire un profil sensoriel précis et objectif. Pour la description de la texture du fruit de tomate, les attributs utilisés concernent principalement la fermeté, la farinosité, la jutosité, l'épaisseur de la peau, le fondant, le croquant (Tableau I.2).

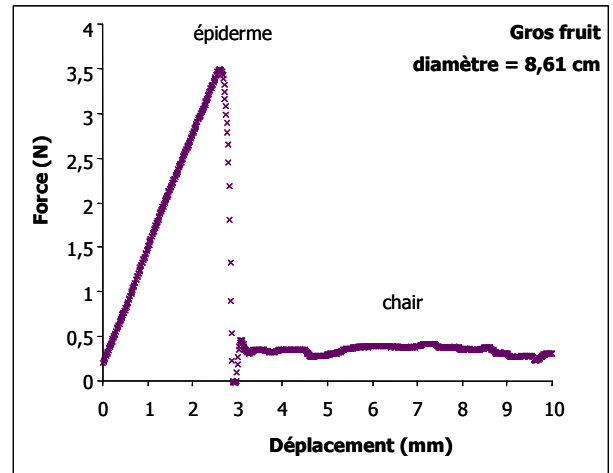
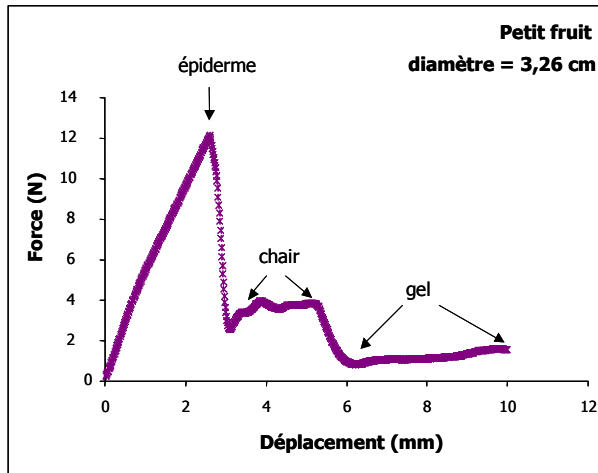
Bien que l'analyse sensorielle soit la façon la plus complète de caractériser la texture du fruit, face à la lourdeur et au coût des analyses descriptives quantitatives, cette méthode ne peut pas être utilisée en routine.

#### b/ Les mesures physiques

La rhéologie est l'étude de l'écoulement ou de la déformation des corps sous l'effet des contraintes qui leur sont appliquées, compte tenu de la vitesse d'application de ces contraintes ou plus généralement de leur variation au cours du temps. (Mohsenin, 1970). La rhéologie expérimentale consiste à déterminer expérimentalement les relations de comportement entre contrainte et déformation ou vitesse de déformation.

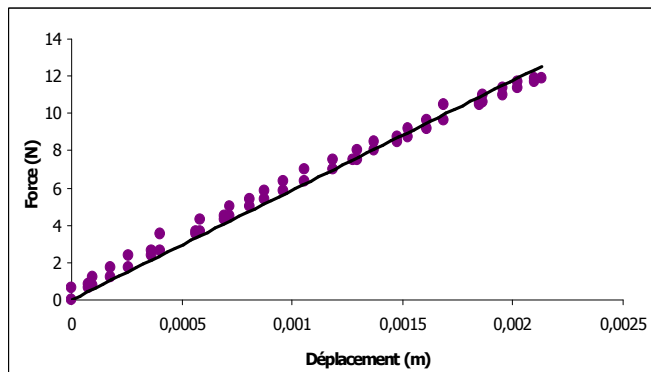
**Figure I.8: Exemples de courbes de poinçonnage (a), de compression (b) et de relaxation (c) obtenues à partir de mesures réalisées sur des fruits de tomate à maturité.**

(a) Profils des courbes de poinçonnage en relation avec l'anatomie du fruit de tomate.



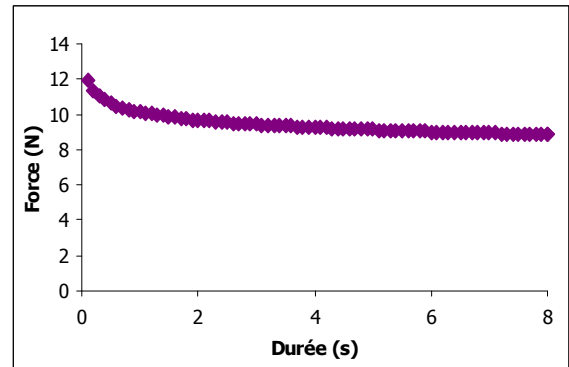
(b)

COMPRESSION



(c)

RELAXATION



Plusieurs techniques instrumentales ont été développées pour mesurer les propriétés mécaniques des fruits afin de caractériser objectivement leur fermeté. Les tests basés sur l'étude de stress mécaniques les plus répandus sont les tests imitatifs qui ont pour objectif de simuler les sensations perçues en bouche (Szczesniak, 1963). Certaines d'entre eux sont destructifs (poinçonnage, compression d'éprouvettes, traction, etc.) et d'autres peuvent s'avérer non destructifs en fonction des conditions opératoires (faible taux de compression, relaxation, etc.). Les paramètres mesurés lors des tests mécaniques sont la force et le déplacement (Abbott, 2004). D'autres paramètres mécaniques sont calculés à partir de ces mesures: force maximale appliquée, déplacement maximal, contrainte, pente de la courbe force/déplacement, travail, modules d'élasticité, etc. La technique à mettre en œuvre et les outils à utiliser dépendent du type de fruit ou de l'échantillon à analyser. Le plus souvent, la déformation est fixée et la force appliquée pour obtenir le niveau de déformation défini est mesurée (Abbott, 2004).

#### ✓ **Les méthodes destructives**

**Le test de poinçonnage**, adapté du testeur de pression Magness-Taylor (Magness and Taylor, 1925), est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour mesurer la fermeté du fruit. La méthode consiste à appliquer une sonde sur l'axe équatorial du fruit et à mesurer l'évolution de la force au cours de sa progression au travers de l'épiderme et dans le péricarpe jusqu'à une distance préalablement fixée. Divers types de sondes sont disponibles: cylindriques à extrémité plane ou hémisphérique, concaves, pyramidales (Kojima *et al.*, 1991). Pour la tomate, un embout à extrémité plane de 2 mm de diamètre est communément utilisé, la profondeur de pénétration étant fixée à 10 mm. Les caractéristiques déduites à partir des courbes force/déplacement sont la force nécessaire pour percer l'épiderme, le déplacement correspondant et la force moyenne de pénétration dans la chair. L'anatomie du fruit de tomate rend délicate l'interprétation des données obtenues par cette technique (Figure I.8a). Ces difficultés résultent de la résistance de l'épiderme à la rupture, de l'épaisseur du péricarpe qui est variable selon les génotypes mais également au sein du fruit, et de la localisation de la mesure (cavité loculaire, péricarpe radial).

**Le test de traction** consiste à soumettre un objet de forme définie, ou éprouvette, à un effort appliqué de façon continue jusqu'à la rupture de l'éprouvette. La force appliquée pour l'allongement de l'éprouvette est mesurée. Cette technique est peu utilisée pour les fruits de par les difficultés rencontrées pour la fixation de l'échantillon aux mâchoires fixes et mobiles de l'appareil. Cependant, l'analyse par microscopie de la zone de rupture a montré que, pour les fruits croquants comme la pomme la fracture a lieu au niveau des cellules alors que les fruits plus charnus comme la pêche, les cellules se séparent au niveau de la paroi, en particulier au niveau de la lamelle moyenne (Harker *et al.*, 1996; Lapsley *et al.*, 1992).

Différentes méthodes permettent d'estimer **la jutosité** du fruit. Dans la plupart des cas, un disque de tissu est prélevé, placé sur un papier absorbant et compressé (Paoletti *et al.*, 1993; Szczesniak and Ilker, 1988). Différents protocoles peuvent être appliqués: comparaison du poids du disque avant et après compression, pesée du papier absorbant avant et après compression, ou encore mesure après compression du diamètre de l'auréole laissée sur le papier absorbant. Les résultats de ces mesures ont été corrélés positivement à la farinosité et à la saveur sucrée de la tomate (Verkerke *et al.*, 1998) et à la jutosité sensorielle chez la pomme (Hard *et al.*, 1977).

#### ✓ **Les méthodes non destructives**

La méthode la plus classique est **le test de compression** qui consiste à exercer sur un fruit ou une éprouvette, des forces croissantes qui vont le déformer progressivement sans le rompre. Cette méthode suit le même principe que le test de poinçonnage, mais la sonde utilisée est un plateau circulaire qui est appliquée sur l'échantillon à une vitesse de déplacement prédéfinie. Dans le cas de la tomate, la mesure est localisée au niveau de l'axe équatorial et la déformation est limitée à 3% du diamètre initial du fruit (Figure I.8b). La force appliquée pour obtenir cette déformation est rapportée à la surface de contact entre la sonde et le fruit ce qui permet de comparer des fruits de calibres différents. Suite à cette mesure, une **relaxation** peut également être réalisée (Wu and Abbott, 2002). Le principe est de maintenir à l'issue de la compression, le plateau au seuil de déplacement prédéfini et de suivre l'évolution de la force en fonction du temps. Cette force traduit les réarrangements qui se produisent au niveau des tissus du fruit pour retrouver un état d'équilibre et informe sur la viscoélasticité du fruit (Figure I.8c).

D'autres méthodes non destructives sont disponibles telle que la détection par laser de la déformation du fruit consécutive à une courte application d'un **souffle d'air comprimé** (Prussia *et al.*, 1994). Cette méthode a été corrélée à la fermeté du fruit mais n'a, pour l'instant, été testée que sur des fruits tels que la pomme, la pêche, le kiwi ou la fraise (Hung *et al.*, 1998).

Enfin, les tests acoustiques, ou **sonométriques**, consistent à soumettre un objet à un choc ou à une vibration. L'amplitude des ondes sonores émises varie avec la fréquence de vibration. La fréquence d'amplitude maximum mesurée dépend de la forme, de la masse et de la masse volumique du fruit. Le coefficient d'élasticité calculé à partir de la fréquence de plus grande amplitude, de la masse et de la masse volumique diminue quand la maturité augmente (Jackman and Stanley, 1995b). Dans le cas des fruits, il peut varier en fonction de la pression de turgescence. Cette technique est particulièrement adaptée pour les fruits de structure homogène comme la pomme.



c/ Les mesures chimiques

Ces méthodes sont basées sur les propriétés biochimiques du fruit et visent à caractériser les constituants des parois et les activités enzymatiques associées. Trois types d'approches ont été développés, à l'origine pour l'étude de produits issus de la transformation du fruit tels que les tomates concassées, les sauces, les jus:

- la teneur en solides insolubles:

Les solides solubles rassemblent les sucres, les acides organiques, les acides aminés, les sels minéraux et certaines pectines tandis que les solides insolubles représentent majoritairement les macromolécules de la paroi cellulaire et de la lamelle moyenne dont la quantité pourrait être corrélée à la fermeté du fruit de tomate. Ainsi, la différence entre la quantité de matière sèche du fruit et la teneur en solides solubles permet d'évaluer la teneur en solides insolubles (Lamb, 1977). Ce paramètre a été corrélé à la consistance du jus de tomate (Marsh *et al.*, 1980).

- la teneur en pectine et en polymères pariétaux et le dosage d'activités enzymatiques associées:

Différentes méthodes biochimiques permettent de doser les composants de la paroi et de la lamelle moyenne. Après une étape d'extraction des parois cellulaires (Koch and Nevins, 1989), le dosage des pectines et de polymères tels que les acides galacturoniques et autres polyuronides est réalisé par chromatographie (Fishman *et al.*, 1991; Seymour *et al.*, 1987). Enfin, des méthodes ont été développées pour doser les activités enzymatiques des polygalacturonases (McFeeters, 1980; Pressey, 1986) et des pectines estérases (Hagerman and Austin, 1986).

- le dosage de solides insolubles dans l'alcool (AIS):

Pour le fruit de tomate, les solides insolubles dans l'alcool comprennent les protéines, les pectines, l'hémicellulose et la cellulose présentes dans la matière sèche (Davies and Hobson, 1981; Hobson and Bedford, 1989). Ce paramètre a été corrélé à la viscosité du jus de tomate (Janoria and Rhodes, 1974).

d/ Corrélations entre méthodes sensorielles et méthodes instrumentales

Malgré l'effort réalisé pour développer des méthodes permettant de mesurer les propriétés mécaniques ou biochimiques des tissus du fruit de tomate, peu d'études ont été réalisées pour analyser leur corrélation avec les analyses sensorielles. Quelques travaux décrivant la variabilité génétique pour des caractères de qualité du fruit à partir de différentes variétés de tomate ont permis de relier des mesures physiques de compression à la fermeté du fruit (Causse *et al.*, 2003; Hobson *et al.*, 1990; Serrano-Megias and Lopez-Nicolas, 2006). De plus, une étude récente sur la composition chimique et la structure des parois cellulaires de différentes lignées de tomate a permis d'associer des attributs sensoriels et des mesures biochimiques (Quéméner *et al.*, 2007). La farinosité en lien avec

les propriétés d'adhésion cellulaire a été associée à la structure du réseau pectique tandis que la fermeté serait plutôt en rapport avec la structure du réseau hémicellulosique.

Les méthodes chimiques décrites ci-dessus ont par contre été très utiles pour étudier les mécanismes physiologiques en relation avec la texture du fruit, et notamment l'impact des activités enzymatiques sur la structure des réseaux pariétaux et les conséquences sur la fermeté du fruit de tomate (Quéméner, 2007).

### *II.3. Propriétés mécaniques et physiologiques associées à la texture du fruit*

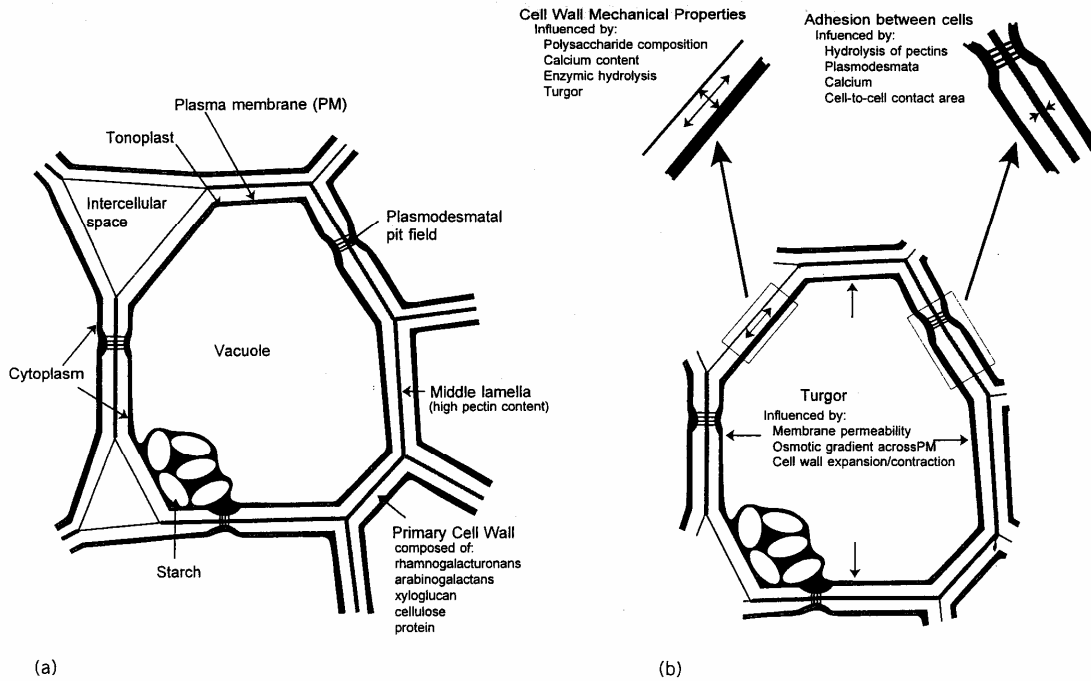
#### *a/ Anatomie du fruit*

L'anatomie du fruit de tomate a une structure hétérogène (Figure I.4) où la nature et l'agencement des différents tissus sont autant de facteurs qui peuvent être déterminants pour la perception de la texture. A maturité, l'épaisseur de la peau, l'aspect gélatinisé des tissus locaux, l'espace occupé par les cavités locales, l'épaisseur du péricarpe et des parois locales pourront influencer les sensations associées à la fermeté ou la jutosité du fruit. Cependant, la relation entre ces paramètres et la texture du fruit a très peu été étudiée et les études concernant les composantes de la texture se concentrent majoritairement sur les propriétés mécaniques du péricarpe. Chez la pomme, qui présente pourtant moins de variabilité morphologique, une hétérogénéité de structure a été observée avec des différences de fermeté de l'ordre de 15 à 20% selon la zone du fruit où la mesure était réalisée (Duprat *et al.*, 1991).

#### *b/ Structure cellulaire du péricarpe*

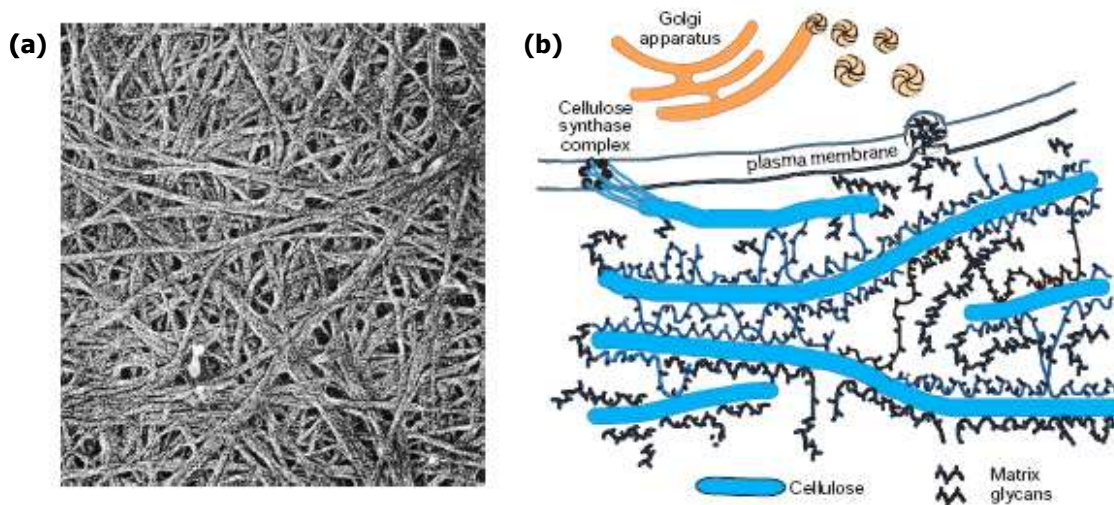
L'architecture tissulaire du péricarpe du fruit de tomate est organisée autour de trois entités: l'exocarpe recouvert d'une cuticule, le mésocarpe où se retrouvent les vaisseaux conducteurs et l'endocarpe. Chacune de ces structures se construit au cours du développement du fruit et notamment pendant la phase d'expansion cellulaire qui permet au fruit d'atteindre sa taille finale. Cette phase s'accompagne de la différenciation des cellules du mésocarpe et de l'endocarpe, non seulement pour leur taille mais aussi pour leur forme et leur contenu. Par contre, ce processus ne concerne pas les assises cellulaires situées au niveau de l'exocarpe. L'exocarpe est constitué de couches de petites cellules épidermiques recouvertes d'une couche cuticulaire. La chair du fruit, composée du mésocarpe et de l'endocarpe, est majoritairement constituée de cellules parenchymateuses possédant une large vacuole (Figure I.9a). Pour l'ensemble de ces tissus, les parois de chacune de ces cellules voisines sont séparées par une couche riche en pectine, appelée la lamelle moyenne. On retrouve également à intervalles plus ou moins réguliers des espaces intercellulaires. Les tissus vasculaires (phloème et xylème) sont constitués de cellules allongées, lignifiées dans le cas du xylème. Ils sont répartis au centre du mésocarpe, et au-delà du péricarpe, ils sont présents au niveau des parois locales et de la columelle.

**Figure I.9: Caractéristiques d'une cellule parenchymateuse (a) et représentation des propriétés physiques en relation avec les propriétés de texture du fruit (b), d'après Harker *et al.* (1997)**



**Figure I.10: Structure (a) et biogénèse (b) de la paroi primaire chez les végétaux, d'après Cosgrove (2000).**

(a) Cette image représente le réseau de microfibrilles de cellulose après extraction de la matrice polysaccharidique.



Ainsi la texture du fruit de tomate sera fonction, d'une part, des caractéristiques des cellules parenchymateuses (taille des cellules, épaisseur et rigidité des parois, turgescence des cellules) surtout pour la fermeté du fruit, et d'autre part, de l'agencement de ces cellules entre elles pour former des tissus (propriétés de la lamelle moyenne, adhésion cellulaire, forme des cellules et contenu vacuolaire) en particulier pour les paramètres de farinosité et de jutosité (Figure I.9b). Le ramollissement du fruit a également été associé à des modifications de la composition des hémicelluloses de la paroi cellulaire et des pectines de la lamelle moyenne (Jackman and Stanley, 1995b). Plus particulièrement, la sensation de farinosité serait en relation avec la façon dont les assises cellulaires se déstructurent au cours de la mastication (Devaux *et al.*, 2005).

En complément, les variations texturales seront très dépendantes des propriétés de l'épiderme, des vaisseaux du phloème et du xylème. L'aspect peau gênante, difficile à avaler d'un fruit sera fortement conditionné par l'épaisseur de l'exocarpe. Ce facteur sera également déterminant pour la perception de la fermeté du fruit. La quantité de vaisseaux et leur structure peuvent apporter une sensation de texture fibreuse. Enfin, le niveau de cohésion cellulaire autour des vaisseaux conducteurs ou entre les cellules de l'exocarpe et du mésocarpe peut renforcer les sensations de texture fibreuse et de peau gênante en cas de maintien des structures cellulaires après mastication.

#### c/ Propriétés mécaniques des cellules et évolution au cours de la maturation

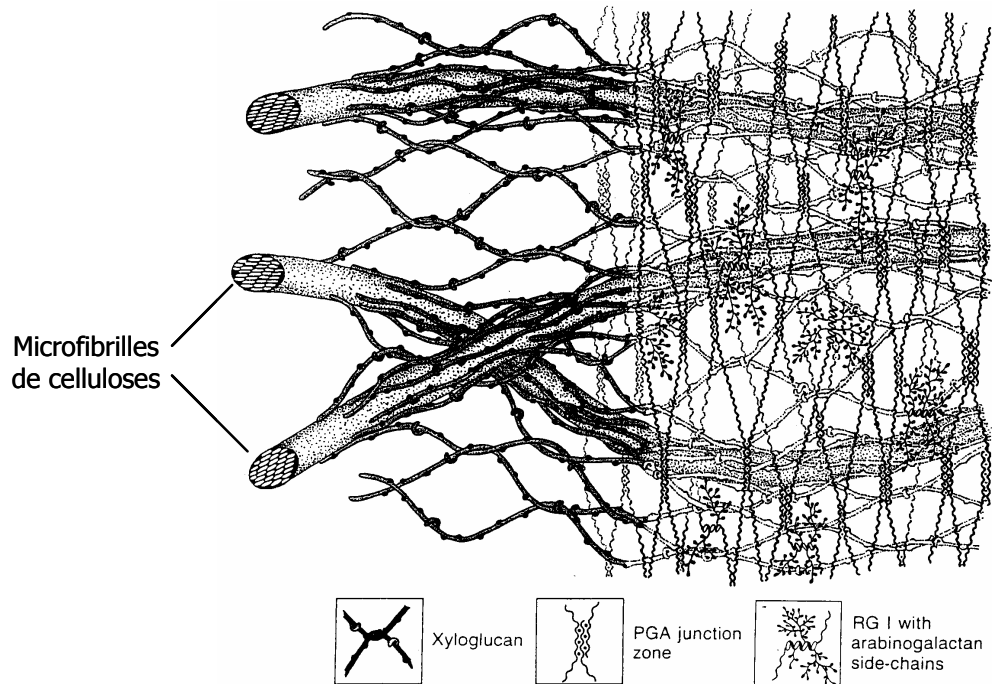
Les changements de texture des fruits charnus sont également dus à la perte du rôle de soutien des structures cellulaires des tissus du fruit au cours de la maturation. L'étude de ces processus s'est longtemps focalisée sur la structure et l'évolution des parois végétales. Cependant, comme décrit précédemment, de nombreux paramètres peuvent influencer la texture du fruit et notamment, les modifications pariétales et l'évolution de la turgescence des cellules semblent être en étroite relation. Par conséquent, il est difficile d'identifier un unique facteur déterminant responsable des variations de texture du fruit mais il est important de prendre en compte l'ensemble des connaissances acquises pour réussir à construire un modèle regroupant et reliant les différents mécanismes en jeu.

#### ✓ **Structure de la paroi cellulaire**

La paroi cellulaire est un assemblage complexe de macromolécules constitutives où trois réseaux s'imbriquent: le réseau hémicellulose-cellulose constituant la trame rigide, un réseau de polysaccharides matriciels (pectines) et un réseau de protéines structurales. L'agencement de ces différents réseaux détermine la rigidité et l'élasticité des parois et, en conséquence, les propriétés mécaniques des tissus. Cependant, cette structure n'est ni figée, ni imperméable. Sous l'action de protéines enzymatiques et d'expansines, elle est capable de croître, d'intégrer de nouveaux polysaccharides et d'assurer les échanges intercellulaires via les plasmodesmes et/ou l'apoplaste. Ainsi, les assemblages pariétaux évoluent au cours du développement et de la maturation des fruits.

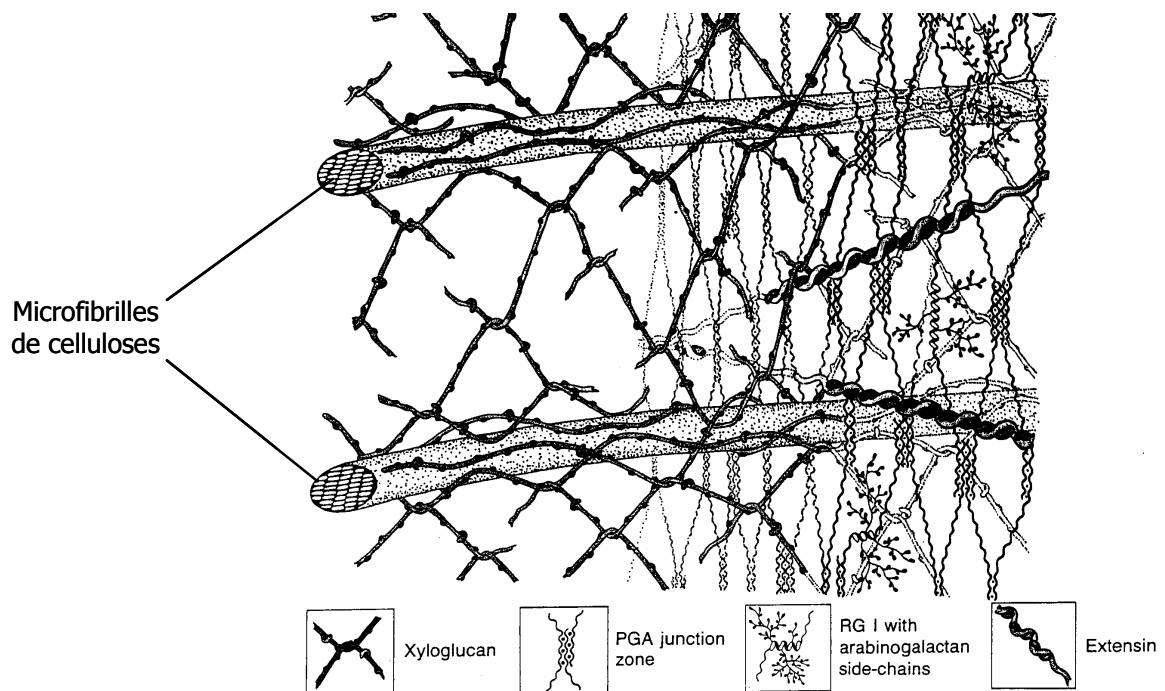
**Figure I.11: Représentation schématique de la structure de la paroi primaire de type I, d'après Carpita and Gibeaut (1993).**

PGA= Acide polygalacturonique, RGI= Rhamnogalacturonane I.



**Figure I.12: Représentation schématique de la structure de la paroi primaire de type I en phase d'extension cellulaire, d'après Carpita and Gibeaut (1993).**

PGA= Acide polygalacturonique, RGI= Rhamnogalacturonane I.



Les cellules parenchymateuses du fruit possèdent une paroi primaire peu épaisse et non lignifiée. Les polysaccharides pectiques et hémicellulosiques sont assemblés au niveau de l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases puis transportés par les vésicules golgiennes vers la membrane plasmique. Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées par de complexes localisés au niveau de la membrane plasmique (Figure I.10). Chez les fruits, la paroi primaire est de type I, c'est à dire essentiellement composée de polysaccharides pectiques et de xyloglucanes (Carpita and Gibeaut, 1993), contrairement aux parois lignifiées du bois, de type II, où l'on retrouve peu de pectines et beaucoup de cellulose.

➤ Les polysaccharides pariétaux

La paroi primaire de type I est structurée en couches où les microfibrilles de cellulose sont entrelacées avec les polymères de xyloglucanes, l'ensemble étant enchevêtré dans une matrice composée de polysaccharides pectiques, principalement acides polygalacturoniques (PGA) et rhamnogalacturonanes I (Figure I.11):

- Les polysaccharides pectiques ou **pectines** représentent 40 à 60% de la paroi primaire (Chapman *et al.*, 1987). Ce sont des polysaccharides riches en acide galacturonique et avec des teneurs élevées en rhamnose, arabinose et galactose. Ces polysaccharides sont constitués de familles de molécules variant dans la proportion de trois domaines structuraux que sont les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes I et les rhamnogalacturonanes II, les deux premiers domaines étant majoritaires. Ces derniers sont présents en faibles quantités dans certaines parois végétales (Carpita and Gibeaut, 1993). Le calcium ( $Ca^{2+}$ ) permet de relier ces polysaccharides entre eux et, selon le degré de déestérification des pectines, il définirait la taille des pores de la paroi cellulaire. En complément, les parois primaires contiennent quelques molécules libres, riches en sucres neutres tels que les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes (Waldron *et al.*, 2003).

- Les **hémicelluloses** qui constituent 20 à 25% de la paroi primaire (Bacic *et al.*, 1988) sont majoritairement des **xyloglucanes**. Selon les espèces et les tissus, on retrouve aussi des xylanes, des glucomannanes (parois secondaires), des mannanes, des galactomanannes et des glucuronomannanes (Waldron *et al.*, 2003). Dans le cas du fruit de tomate, les polysaccharides hémicellulosiques sont principalement des xyloglucomannanes (Seymour *et al.*, 1990). Les hémicelluloses peuvent interagir entre elles et sont également reliées aux microfibrilles de cellulose par des ponts hydrogènes.

- La **cellulose**, représentent également 20 à 25% de la paroi primaire. Elle est formée de plusieurs dizaines de longues chaînes linéaires de  $\beta(1-4)$ -D-glucose structurées en microfibrilles. Avec les hémicelluloses, le réseau cellulosique forme le squelette de la paroi primaire (Carpita and Gibeaut, 1993).

➤ Les protéines pariétales

Les parois primaires contiennent également des protéines qui se répartissent en deux classes: les **protéines de structure** et les **protéines enzymatiques**. Elles constituent environ 10% de la paroi primaire.

Les protéines de structure sont réparties en trois groupes: les protéines riches en glycine (GRP), les protéines riches en proline (PRP) et les protéines riches en hydroxyproline (HRPG). Parmi les HRPG, on retrouve les extensines, les arabinogalactanes-protéines (AGP) et les lectines des solanacées. Les HRPGs participent à la consolidation de la structure pariétale de part leur implication dans le réseau des polymères pariétaux grâce à leur forte teneur en tyrosine.

Les extensines sont les plus décrites. Elles interviennent notamment en fin d'élongation cellulaire, en s'insérant entre les microfibrilles de celluloses pour stopper leur étirement et figer la structure des parois, déterminant ainsi la forme des cellules (Smith *et al.*, 1986) (Figure I.12).

Différentes enzymes impliquées dans le remaniement et/ou la dégradation des composés pariétaux assurent les modifications structurales de la paroi au cours du développement puis durant la maturation des fruits. De nombreuses revues décrivent l'activité de ces enzymes chez les fruits (Brummell and Harpster, 2001; Redgwell and Fischer, 2002; Vicente *et al.*, 2006), et majoritairement en se basant sur des résultats obtenus chez la tomate. Une synthèse des données acquises ces dernières années sur les principales enzymes pariétales, décrites dans ces revues, est présentée ci-après.

Les **polygalacturonases** (PG) hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4-D-galacturonane des polysaccharides pectiques des parois et on distingue les endo-PG qui agissent aléatoirement sur l'ensemble du polymère et les exo-PG qui sont spécifiques des extrémités. Pour le fruit, le terme polygalacturonase est communément utilisé pour parler des endo-PG. Deux isoformes d'endo-PG existent: la PG1 est spécifique des phases précoces du développement tandis que la PG2 est accumulée à partir du stade tournant et son expression augmente au cours de la maturation du fruit. Un gène de la famille multigénique encode la PG2, mais, après modifications post-transcriptionnelles, deux isoformes sont obtenues la PG2A et la PG2B.

Les **pectinméthylestérases** (PME) catalysent la déestérification des pectines. L'isoforme *PME2* est exprimée tout au long du développement et de la maturation du fruit, avec un pic de l'activité enzymatique entre le stade tournant et rouge tandis que la *PME1* a un pic d'expression aux stades verts.

Les  **$\beta$ -galactosidases** interviennent dans la dégradation des polymères de galactoses reliés aux polysaccharides pectiques, majoritairement au squelette de rhamnogalacturonanes. Ce sont des

**Tableau I.3: Variations pour différents fruits de l'étendue des modifications pariétales au cours de la maturation, d'après Brummell (2006).**

Modifications pariétales	Niveau			
	Absent	faible	Modéré	Elevé
<b>Perte en arabinose</b>	Pastèque Abricot Prune	Piment <b>Tomate</b>	Avocat Pêche Kiwi	Poire Myrtille
<b>Perte en galactose</b>	Concombre Prune	Abricot Myrtille	Pêche Pomme Melon	Melon Piment <b>Tomate</b>
<b>Solubilisation des pectines</b>	Pastèque Pomme	Pomme	Prune Fraise <b>Tomate</b> Banane	Avocat Kiwi Mûre
<b>Depolymérisation des pectines</b>	Banane Fraise Pomme Piment	Melon Papaye Pastèque	Pêche <b>Tomate</b>	Avocat



enzymes constitutives, hautement régulées au cours de la maturation des fruits. Chez la tomate, trois isoformes sont identifiées, les  $\beta$ -galactosidases I, II et III et la famille des  $\beta$ -galactosidases est composée de 7 membres, tous exprimés au cours du développement du fruit (*TBG1-TBG7*). Les  $\beta$ -galactosidases I et III sont spécifiques des stades verts et les  $\beta$ -galactosidases II sont spécifiques de la maturation. Les isogènes *TBG4* et *TBG5* sont fortement exprimés au stade tournant puis moins aux stades rouges, tandis que le niveau d'expression des isogènes *TBG1* et *TBG3* est plutôt faible et constant depuis le stade tournant jusqu'à la sur-maturité.

Les **xyloglucanes endotransglycosylases** (XET) coupent les polymères de xyloglucanes et lient l'extrémité réduite obtenue à l'extrémité non réduite d'une autre molécule de xyloglucanes. Chez la tomate, l'activité des XET est très élevée pendant la phase d'expansion cellulaire, décroît puis augmente en fin de maturation. Le gène *LeEXGT1* est spécifique des phases précoces de développement et le gène *LeXETB1* est plutôt exprimé au stade tournant avancé puis son expression diminue dans les stades rouges.

Les **endo- $\beta$ -1,4-glucanases** (EGases) dégradent les xyloglucanes, les polymères de glucanes associés aux microfibrilles de cellulose. Les glucanases sont exprimées à tous les stades de développement avec une augmentation de l'activité en phase d'expansion cellulaire et pendant la maturation du fruit. Les isogènes *LeCel1*, *LeCel2*, *LeCel4* sont spécifiques des premières étapes de l'expansion et *LeCel7* des dernières étapes et du stade vert mature. Puis *LeCel1* et *LeCel2* sont également exprimés au cours de la maturation. Cependant, l'activité de *LeCel1* décroît rapidement tandis que celle de *LeCel2* augmente régulièrement.

Pendant la phase d'élongation cellulaire, le relâchement de la paroi cellulaire est nécessaire mais celle-ci doit rester malgré tout suffisamment résistante aux forces mécaniques générées par la pression de turgescence de la cellule. Pendant longtemps, l'action des hydrolases sur la matrice polysaccharidiques a été considérée comme étant le phénomène majeur contrôlant les réarrangements pariétaux. Les glucanases et endotransglycosylases permettent de dissocier les xyloglucanes des microfibrilles de cellulose. Ainsi, les microfibrilles se séparent et s'éloignent transversalement afin de favoriser l'expansion cellulaire (Carpita and Gibeaut, 1993) (Tableau I.3). Cependant, le rôle d'autres protéines, **les expansines**, serait déterminant (Cosgrove, 2000; Marga *et al.*, 2005). Les expansines se déplacent le long des microfibrilles de cellulose et rompraient les liaisons non covalentes entre les glucanes et les microfibrilles ou entre glucanes, pour permettre le mouvement et la relaxation du réseau héli-cellulosique. Deux superfamilles ont été identifiées, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -expansines, les  $\beta$ -expansines étant plus répandues chez les graminées (Sampedro and Cosgrove, 2005). Pour le fruit de tomate, six gènes ont été identifiés pour les phases précoces de développement *LeExp2*, *LeExp4*, *LeExp5* et *LeExp6*, et au moins trois dans les phases de maturation, *LeExp5*, *LeExp3* et *LeExp1*.

➤ Modifications pariétales au cours de la maturation

Les modifications texturales du fruit, et particulièrement, la perte de fermeté des fruits au cours de la maturation est en grande partie liée aux changements des structures pariétales (Brummell and Harpster, 2001; Redgwell and Fischer, 2002; Vicente *et al.*, 2006). Dans le cas du fruit de tomate, les principales modifications se traduisent par de fortes pertes en galactose, de faibles pertes en arabinose, et une solubilisation et une dépolymérisation des pectines modérées (Brummell, 2006) (Tableau I.12). La perte en galactanes et arabinanes interviendrait dès le début de la maturation, sous l'action des  $\beta$ -galactosidases et des  $\alpha$ -arabinosidases. Dans le même temps, la dépolymérisation des xyloglucanes commence. Une réorganisation du réseau hémicellulosique est observée au cours de la maturation sous l'action des XET (Huber, 1983). Les glucanases auraient quant à elles un faible impact sur le ramollissement et dépolymérisation de la matrice hémicellulosique. La dépolymérisation et la solubilisation des pectines se produit en cours de maturation sous l'action de la PG2 et de la PME. Les expansines stimuleraient indirectement la dépolymérisation des pectines. Le réseau cellulosique n'est quasiment pas modifié bien que les cellulases soient très répandues chez le fruit (Hobson, 1968). Enfin, le ramollissement du fruit de tomate serait fortement affecté par la dérégulation des  $\alpha$ -expansines qui facilitent l'accès des hémicellulases et pectinases aux parois cellulaires (Cosgrove, 2000; Salentijn *et al.*, 2003). Plus particulièrement, le gène *Le-EXP1* est spécifiquement exprimé dans les stades tardifs de la maturation et est activé par l'éthylène (Rose *et al.*, 1997).

De nombreuses études, utilisant la transformation génétique, ont eu pour objectif de tester l'effet individuel de ces enzymes modifiant la structure de la paroi cellulaire sur la texture du fruit (Brummell and Harpster, 2001; Brummell *et al.*, 1999). La suppression de l'activité de la PG ne modifie pas la fermeté du fruit, mais augmente l'aptitude à la conservation. De même, la surexpression de cette enzyme n'a pas d'effet sur la fermeté du fruit. Par contre, la sous-expression de la PG ou de la PME modifie la viscosité de la sauce tomate et l'absence d'activité des  $\beta$ -galactosidases dans les stades précoces du développement diminue fortement le ramollissement du fruit. Des plantes transformées sous- ou sur-exprimant ces gènes présentent, respectivement, des fruits plus mous et plus fermes. Néanmoins, le ramollissement du fruit se produit et n'est que retardé ou accéléré. Enfin, des plantes transformées sous-exprimant l'expansine *LeExp1* présentent des fruits plus fermes avec une réduction de la dépolymérisation des pectines certainement dû à un manque d'accessibilité des PG à leur substrat.

✓ **Cohésion entre les cellules**

La façon dont les cellules se séparent ou se cassent et déversent leur contenu est un des facteurs déterminants pour la perception de la texture du fruit (Pitt, 1982; Pitt and Chen, 1983). L'adhésion cellulaire a donc un rôle majeur et résulte de l'interaction de trois facteurs: la rigidité de la lamelle

moyenne, la proportion d'espaces intercellulaires (méats), la répartition des plasmodesmes (Harker *et al.*, 1997).

La lamelle moyenne, essentiellement constituée de pectine, est le principal ciment cellulaire qui sépare les parois primaires de cellules adjacentes (Figure I.9). Dans cette matrice, le calcium permet de condenser des chaînes de polysaccharides pectiques déestérifiés (Roy *et al.*, 1994).

Les espaces intercellulaires ont pour principale fonction d'assurer les échanges gazeux au sein de la plante (Jarvis *et al.*, 2003). La taille de ces méats serait hautement régulée et contrôlée, non seulement par la turgescence de trois cellules adjacentes, mais également par la présence de structures pectiques particulières aux angles des espaces intercellulaires (Kolloffel and Linssen, 1984; Willats *et al.*, 2006).

Enfin, les plasmodesmes relient les cytoplasmes de cellules contiguës et sont généralement concentrés sur quelques régions de la surface cellulaire (Lucas *et al.*, 1993). Ils modifient la structure des parois et, en conséquence, l'adhésion cellulaire. Ces ponts intercellulaires ne subissent aucune modification au cours de la maturation et la structure des parois adjacentes serait également peu modifiée (Roy *et al.*, 1997).

La maturation des fruits s'accompagne d'une diminution de l'adhésion cellulaire qui entraîne généralement une baisse de la jutosité et une augmentation de la farinosité (Harker *et al.*, 1997). Biochimiquement, la teneur en pectines solubles augmente et on observe une perte en sucres non-cellulosiques (galactose et arabinose) au niveau des chaînes de polysaccharides pectiques. Les enzymes impliquées dans la dissolution des pectines de la lamelle moyenne ont été identifiées. La PG permet l'hydrolyse des pectines, mais pour cela, la dé-estérification des polymères pectiques par la PME est préalablement nécessaire afin de faciliter l'accès de la PG (Giovannoni, 2001).

### ✓ **Turgescence et structure des membranes cellulaires**

Peu d'études abordent la texture du fruit en relation avec les caractéristiques de turgescence des cellules. Pourtant, la pression osmotique détermine l'équilibre hydrostatique des cellules ainsi que la structure et la rigidité des tissus et peut aussi influencer les propriétés des parois, mais ce sont des facteurs difficiles à mesurer. Dans ce contexte, le rôle de la membrane plasmique est essentiel dans le contrôle de l'état de turgescence des cellules à travers la régulation de l'équilibre ionique des solutions intra et intercellulaire. Les transports d'eau sont essentiellement assurés par des protéines de type aquaporines qui forment des canaux sélectifs et facilitent la diffusion de l'eau ou de petits solutés neutres à travers la membrane (Steudle *et al.* 1995). La structure de la membrane sera un facteur déterminant dans la gestion des échanges entre les cellules (Harker *et al.*, 1997).

Au cours de la maturation, la perte de fermeté peut être la conséquence de changements de la pression hydrostatique des cellules parenchymateuses du fruit. Chez la tomate, la turgescence des cellules décroît au cours de la maturation (Shackel *et al.*, 1991). Des modifications au niveau des membranes précèdent la diminution de la pression osmotique. L'intégrité membranaire de la cellule

**Tableau I.4: Caractéristiques phénotypiques, génétiques et moléculaires des mutants de la maturation du fruit de tomate.**

\* = semi-dominance.

<b>Nom</b>	<b>Phénotype</b>	<b>Fonction du gène</b>	<b>Localisation</b>	<b>Références</b>
<i>Nr</i> <i>Never-ripe</i>	Pas de maturation	récepteur de l'éthylène, homologue de <i>ETR1</i> chez <i>A. thaliana</i>	Chromosome 9 TG568-TG348	Wilkinson <i>et al.</i> , 1995
<i>rin*</i> <i>ripening-inhibitor</i>	Pas de maturation	MADS-Box ( <i>LeMADS-RIN</i> )	Chromosome 5 CT93-CT63A	Vrebalov <i>et al.</i> , 2002
<i>nor*</i> <i>non-ripening</i>	Pas de maturation	Facteur de transcription	Chromosome 10 TG395-CT16	Vrebalov <i>et al.</i> , non publié
<i>Cnr</i> <i>Colourless non-ripening</i>	Pas de synthèse de caroténoïdes Fruits fermes et farineux Faible adhésion intercellulaire	SBP-box (SQUAMOSA promoter binding protein-like)	Chromosome 2 CT277-TG14	Manning <i>et al.</i> , 2006
<i>Dfd</i> <i>Delayed fruit deterioration</i>	Fruits fermes Pas de phase de ramollissement	Non déterminée	Non déterminée	Saladie <i>et al.</i> , 2005

est donc un élément clé pour la qualité des fruits (Stanley, 1991). D'autant plus que le transport de composés pariétaux et d'enzymes à travers la membrane plasmique est également déterminant, à la fois pour la construction et la dégradation des parois. Les changements de turgescence des cellules résultent probablement de la combinaison d'événements dont (i) le changement de composition du contenu cellulaire qui perturbe les relations osmotiques symplaste/apoplaste, (ii) les pertes en eau provoquées par la transpiration du fruit (Shackel *et al.*, 1991). La redistribution des solutés, notamment vers l'apoplaste, entraîne la diminution de la pression osmotique des cellules pendant la phase de ramollissement du fruit. De plus, la diminution de la rigidité des parois entraîne une dilution des composants suite à l'augmentation du volume des cellules. Chez la tomate, peu de données sur ces aspects sont disponibles ou n'ont pas été approfondies. Au cours de la maturation, une augmentation de la perméabilité membranaire est classiquement observée mais ce phénomène n'a pas été mis en évidence pour le mutant *rin* dont la maturation est perturbée (Poovaiah *et al.*, 1975). Une autre étude a montré que des dommages au niveau des membranes plasmiques et la diminution de la turgescence des cellules semblent être impliqués dans le développement d'une texture farineuse après un stress froid (Jackman *et al.*, 1992; Jackman and Stanley, 1995a).

Au cours de la maturation, les changements au niveau de la membrane plasmique et de la paroi primaire des cellules peuvent se produire simultanément et influencent l'évolution de la texture du fruit. Cependant, il est encore difficile de distinguer la part de variation imputable à chacun de ces processus dans les modifications texturales du fruit.

#### II.4. Les déterminants génétiques de la texture

Le déterminisme génétique associé aux composantes de la texture du fruit a été relativement peu étudié ou indirectement dans des études générales sur la maturation ou sur la qualité du fruit. La caractérisation de mutants et la détection de QTL sont les deux principales approches qui ont été développées pour l'identification des facteurs génétiques contrôlant la texture du fruit de tomate.

Chez la tomate, il existe plusieurs mutants de la maturation du fruit dont l'événement de mutation ne concerne qu'un seul gène (Tableau I.4) (Giovannoni, 2004; Seymour *et al.*, 2002). Les plus étudiés sont les mutants *Nr*, *Never ripe* (Rick, 1956), *rin*, *ripening-inhibitor* (Robinson and Tomes, 1968), *nor*, *non-ripening* (Tigchelaar *et al.*, 1973), *Cnr*, *Colourless non-ripening* (Thompson *et al.*, 1999) dont les fruits ne mûrissent pas. La mutation *Nr* se traduit par une insensibilité à l'éthylène. Le gène *Nr* a été cloné (Wilkinson *et al.*, 1995) et code une protéine présentant une forte homologie avec un récepteur de l'éthylène d'*Arabidopsis thaliana* (ETR1). Les mutants *rin* et *nor* ne produisent pas d'éthylène et les gènes concernés correspondent à des facteurs de transcription de type MADS-Box (Vrebalov *et al.*, 2002). Enfin, la mutation *Cnr* dont les fruits sont fermes et farineux avec une faible adhésion cellulaire et l'absence de caroténoïdes dans le péricarpe concerne également un facteur de transcription

**Figure I.13: Carte de synthèse des QTL contrôlant la fermeté du fruit de tomate détectés dans différentes populations issues de croisement entre *S. lycopersicum* et *S. sp.***

La localisation des QTL et des mutations *Nr*, *rin*, *nor* et *Cnr* est représentée à droite de chaque chromosome. Les QTL sont soit positionnés dans un intervalle entre deux marqueurs, soit liés à un marqueur (marqueur en gras). La forme du symbole fait référence à la méthode de mesure et le remplissage à l'espèce croisée avec *S. lycopersicum*. Le type de population utilisée pour la détection de QTL est précisé (F2, RIL, BC, IL, NIL).

Fulton (2000), BC2  
*S. neorickii*  
(*L. parviflorum*)

Frary (2003), NIL  
*S. chmielewskii*

Causse (2002), RIL  
*S. lycopersicum*  
*cerasiforme*

Walley (2006), IL  
Frary (2004), F2  
Duffé (*comm. pers.*), IL  
*S. pennellii*

Fulton (1997), BC3  
*S. peruvianum*

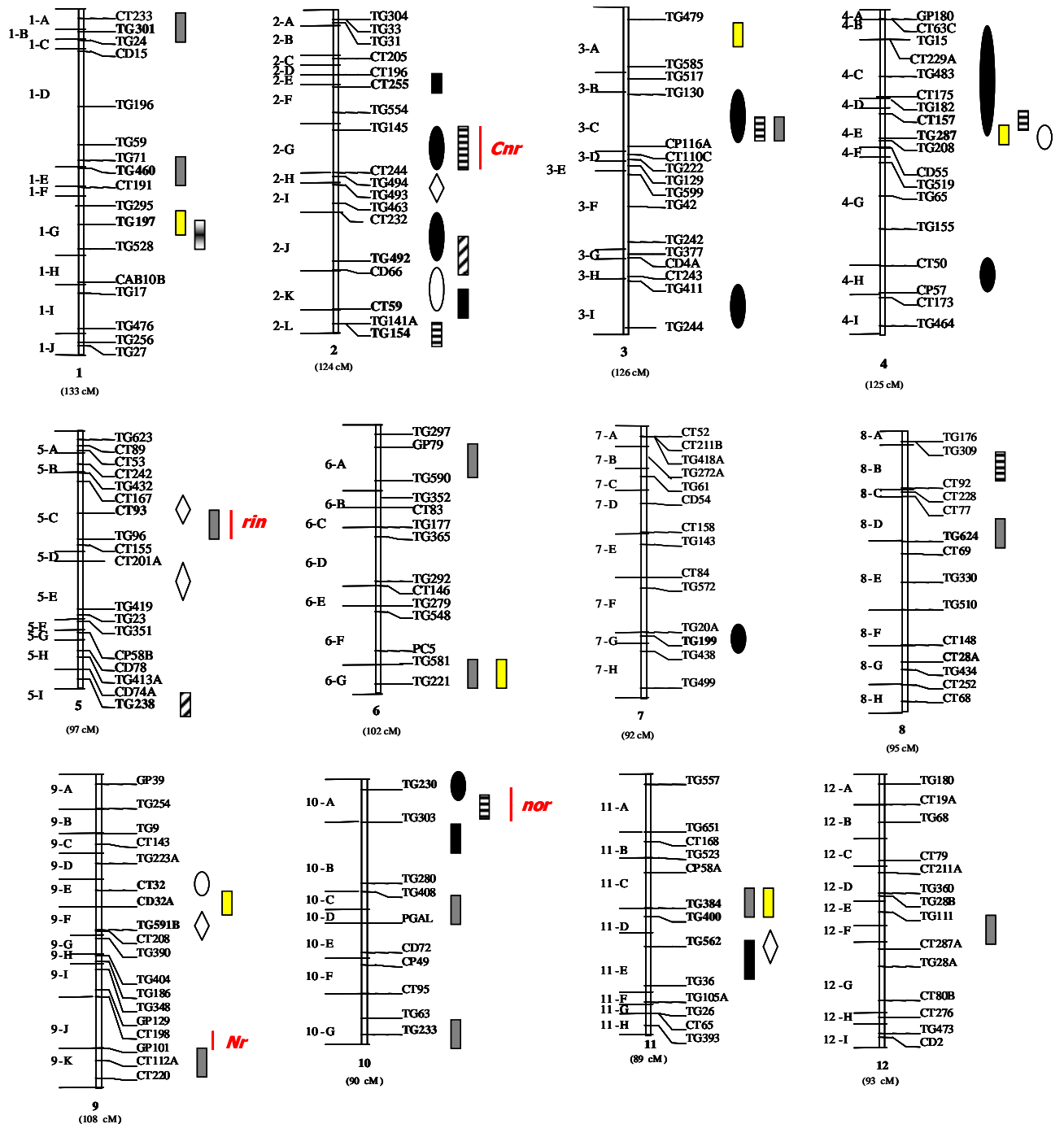
Doganlar (2002), BC2F1  
Tanksley (1996), BC2  
*S. pimpinellifolium*

Bernacchi (1998), AB-QTL  
*S. Habrochaites*  
(*L. peruvianum*)

Fermeté tactile

Fermeté instrumentale

Fermeté en bouche



(Manning *et al.*, 2006). Récemment, le mutant *Dfd* a été identifié et se caractérise par une maturation sans phase de ramollissement et, en conséquence, des fruits qui restent fermes (Saladie *et al.*, 2005).

La tomate est un fruit climactérique dont la maturation est déclenchée par la biosynthèse d'éthylène. La caractérisation des mutants *Nr*, *rin* et *nor* montre que l'éthylène est effectivement le facteur déclenchant de la maturation mais l'étude des mutants *Cnr* et *Dfd* démontre que d'autres mécanismes de régulation sont impliqués. Ces mutants pléiotropes présentent des phénotypes affectés pour plusieurs caractères et notamment pour la fermeté et/ou la farinosité du fruit. Bien que les gènes concernés par ces mutations aient été clonés, leur lien avec les gènes impliqués dans l'évolution de la texture du fruit au cours de la maturation n'a pas été identifié.

En complément de la caractérisation de ces mutants, l'étude des mécanismes biochimiques associés à la maturation du fruit a permis l'identification de nombreux gènes dont certains sont impliqués dans la construction de la texture du fruit (Giovannoni *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2002). Cependant, les interactions entre les mécanismes biochimiques, les systèmes de régulation hormonale et les voies de transduction contrôlant les caractères de texture et plus largement la maturation du fruit sont encore loin d'être élucidées.

Parallèlement, de nombreux travaux ont été réalisés pour identifier les régions du génome impliquées dans le contrôle de la fermeté de la tomate et une seule étude a pris en compte les différentes composantes de la texture du fruit (Causse *et al.*, 2002). La figure I.13 représente une synthèse des QTL détectés pour le caractère de fermeté (Bernacchi *et al.*, 1998; Causse *et al.*, 2002; Doganlar *et al.*, 2002; Frary *et al.*, 2003; Frary *et al.*, 2004; Fulton *et al.*, 1997; Fulton *et al.*, 2000; Tanksley *et al.*, 1996; Walley and Seymour, 2006). Différents types de populations, la plupart du temps issues d'un croisement interspécifique ont été utilisés. Dans la majorité des cas, la mesure de la fermeté a été réalisée par compression manuelle (fermeté tactile), les autres données phénotypiques ayant été obtenues par des méthodes instrumentales ou des analyses sensorielles. Trente QTL ont été détectés à partir de mesures de fermeté tactile (rectangle), 11 QTL à partir de mesures instrumentales (ovale) et 5 QTL à partir des analyses sensorielles (losange). Des colocalisations de ces trois classes de QTL sont observées. Ces QTL se répartissent sur l'ensemble des chromosomes, mais des clusters composés d'au moins trois QTL sont observés sur les chromosomes 1, 2, 4, 5, 9, 10 et 11. De plus, l'étude utilisant l'analyse sensorielle pour caractériser les différentes composantes de la texture du fruit (Causse, 2001) a montré qu'il existait également des colocalisations entre des QTL associés à la fermeté et à la farinosité sur les chromosomes 2, 4 et 9 (Figure I.16). Enfin, des colocalisations sont observées entre trois clusters de QTL et les mutations *rin*, *nor* et *Cnr* localisées respectivement sur les chromosomes 5, 10 et 2. Ces résultats montrent que les espèces sauvages peuvent être une source d'allèles favorables pour l'amélioration de caractères de qualité. De plus, des colocalisations sont observées pour des QTL détectés à partir de populations issues de différentes espèces et pourraient correspondre à des allèles communs impliqués dans la variation d'un même caractère.

La détection de QTL contrôlant les variations de texture du fruit est une approche qui a également été développée chez la pomme (King *et al.*, 2000; Maliepaard *et al.*, 1998). De la même façon, des QTL ont été localisés sur plusieurs chromosomes et souvent organisés en cluster. Des colocalisations entre QTL associés la fermeté instrumentale et la fermeté sensorielle ont été observées.

### II.5. Les conditions de conservation

L'activité métabolique du fruit se poursuivant après récolte, il est important de prendre en compte l'effet des conditions de conservation sur l'évolution de la texture du fruit. Différents paramètres ont un impact sur l'aptitude à la conservation des fruits tels que le stade de récolte (Ratanachinakorn *et al.*, 1997), les conditions culturales (Thybo *et al.*, 2005) et l'emballage (Aguayo *et al.*, 2004). Cependant, les conditions de stockage et les caractéristiques génétiques de la variété sont les facteurs les plus influents, ce qui a également été observé pour d'autres fruits comme la pomme (Johnston *et al.*, 2001).

Au niveau des processus technologiques, la majorité des efforts s'est concentrée sur le contrôle des températures (Lurie, 2002) et des conditions atmosphériques de stockage (Mir and Beaudry, 2002). Les basses températures de conservation permettent de diminuer les activités métaboliques du fruit dont la biosynthèse d'éthylène, ce qui a pour conséquence de ralentir la maturation du fruit. De plus, elles limitent le développement des maladies fongiques. Cependant, l'utilisation de températures trop basses peut induire un stress froid ("chilling injury") qui altère la qualité organoleptique du fruit, avec plus particulièrement une augmentation de la farinosité et la perte des arômes (Jackman *et al.*, 1992). Certaines pratiques permettent de limiter ces effets néfastes telles que la diminution progressive de la température de conservation et/ou l'optimisation de la température et de la durée de conservation (Lurie, 2002).

Pour les conditions atmosphériques, il est important de contrôler l'humidité relative afin de limiter les pertes en eau du fruit. De plus, il est possible de réduire l'activité respiratoire du fruit en réduisant les teneurs en oxygène de l'atmosphère à 2kPa et en augmentant celles en dioxyde de carbone autour de 3kPa (Fridman *et al.*, 2002). Comme pour l'utilisation de basses températures, ces procédés ralentissent la maturation du fruit et le développement des maladies fongiques et des insectes nuisibles (mouches du fruit).

Au niveau génétique, l'aptitude des fruits à résister à une longue durée de conservation a pu être améliorée, principalement en utilisant les mutations *rin* et *nor* (Seymour *et al.*, 2002). Dans la même optique, des travaux décrivent le potentiel du mutant *alc*, *alcobaça*, (Mutschler *et al.*, 1992) dont les fruits, très fermes avec des défauts de coloration, se conservent longtemps (Faria *et al.*, 2003). Cependant, ces mutations pléiotropes ont révélé un antagonisme très prononcé entre qualité organoleptique et longue durée de conservation. Des approches de génétique quantitative ont permis d'identifier l'intérêt des allèles de *S. pimpinellifolium* pour augmenter l'aptitude à la conservation



(Rodriguez and Pratta, 2006). De plus, (Goodstal *et al.*, 2005) ont identifié un QTL majeur pour lequel les allèles de *S. habrochaites*, confèrent une résistance du système racinaire au stress froid. Ce QTL a été localisé sur le chromosome 9, à proximité d'un QTL contrôlant la fermeté du fruit. Cependant, aucune information ne laisse supposer que la résistance au stress froid au niveau du fruit met en jeu les mêmes mécanismes qu'au niveau des racines.

Une meilleure gestion des conditions de conservation demande une meilleure compréhension des processus en jeu au cours de la maturation des fruits afin de développer des combinaisons génétiques ainsi que de nouvelles méthodes de conservation permettant de préserver la qualité organoleptique.

### III. La caractérisation de QTL

#### *III.1. La détection de QTL*

En opposition aux caractères présentant des variations qualitatives, le plus souvent contrôlées par un seul gène, les caractères quantitatifs présentent une distribution continue du phénotype, sont soumis à un déterminisme polygénique et sont sensibles aux effets environnementaux. Des approches statistiques ont été développées pour étudier la variation des facteurs mendéliens qui déterminent ces caractères complexes. La cartographie de QTL (*Quantitative Trait Loci*) permet de localiser sur le génome les locus impliqués dans le contrôle de caractères quantitatifs. Pour ce faire, il faut disposer d'une population en ségrégation, le plus fréquemment de type F2 ou RIL, de données phénotypiques et de données de génotypage. Le principe général est de rechercher une coségrégation des allèles au marqueur et au phénotype dans une descendance (de Vienne and Causse, 1998; Kearsey, 1998). Pour cela, trois méthodes sont utilisées:

- **la méthode marqueur par marqueur** basée sur l'analyse de la variance compare les moyennes phénotypiques des classes génotypiques identifiées à un marqueur. Une différence significative entre les moyennes phénotypiques indique une liaison entre le marqueur et le QTL.
- **la méthode de cartographie d'intervalle** ou Intervalle Mapping (IM) compare les moyennes phénotypiques de deux marqueurs adjacents et teste l'hypothèse qu'un QTL est présent dans cet intervalle, soit par le calcul de maximum de vraisemblance (LOD score) (Lander and Botstein, 1989), soit par régression linéaire (Knott and Haley, 1992).
- **la méthode de cartographie d'intervalle composite** ou Composite Intervalle Mapping (CIM) est une combinaison de l'IM et de la régression multiple. Elle utilise les marqueurs des autres QTL pour le caractère comme cofacteurs dans la régression afin de réduire la part de

variation résiduelle. Ainsi, le test statistique entre deux marqueurs donnés sera indépendant des effets des autres QTL (Jansen, 1993; Zeng, 1993).

En général, de 5 à 10 QTL ayant un effet important peuvent être détectés pour un caractère, chacun expliquant plus de 10% de la variation totale. Classiquement, les QTL sont positionnés dans un intervalle de confiance compris entre 10 et 30 cM (Hyne *et al.*, 1995).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la détection de QTL. Le nombre de QTL que l'on peut détecter dans une population est limité par la puissance du dispositif expérimental, en particulier par la taille de la population (Hyne *et al.*, 1995). D'autre part, l'échantillonnage et la précision des évaluations phénotypiques ainsi que la qualité des données de génotypage peuvent influencer fortement la détection et la localisation des QTL (Luby and Shaw, 2001). De plus, la localisation n'est pas très précise puisqu'elle correspond à un intervalle entre deux marqueurs qui peut potentiellement contenir plusieurs QTL associés en couplage ou en répulsion (Visscher and Haley, 1996). Enfin, pour s'affranchir des effets environnementaux, il est préférable de répéter les phénotypages afin d'identifier les QTL les moins influencés par le milieu. Ceci dit, il est possible d'optimiser la précision de la localisation des QTL et de diminuer la taille de l'intervalle de confiance autour de la position en utilisant une carte génétique où la distance moyenne entre deux marqueurs est inférieure à 10cM (Darvasi *et al.*, 1993).

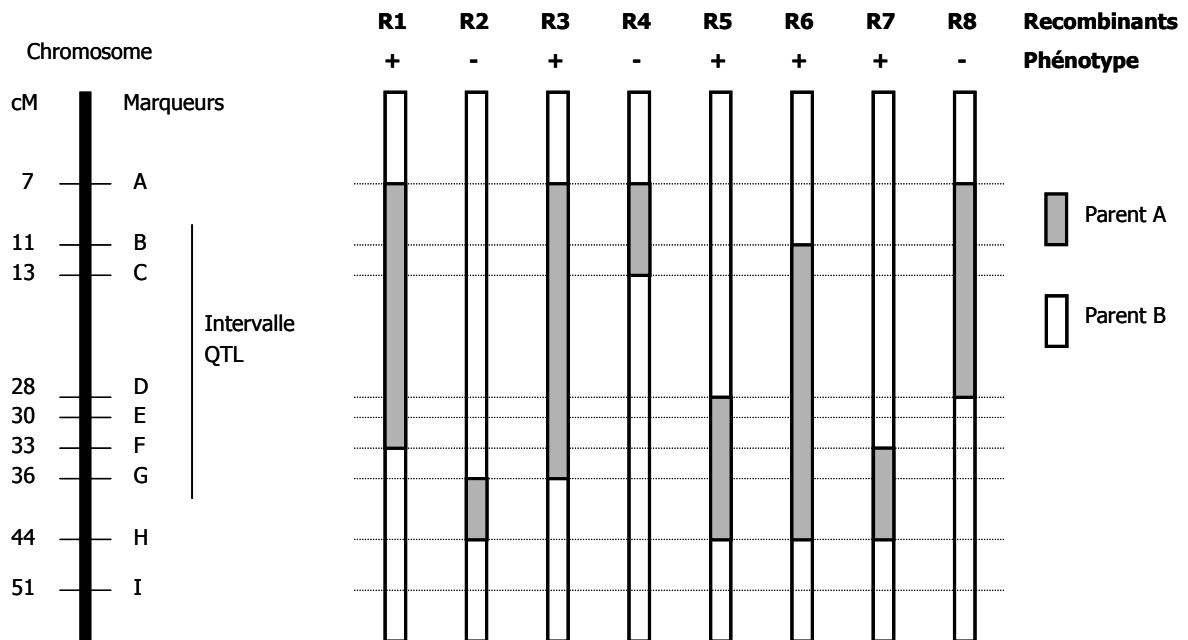
De nombreuses études ont été réalisées dans le but de détecter des QTL associés à la qualité organoleptique du fruit de tomate, majoritairement à partir de croisements interspécifiques. La synthèse de ces travaux a permis de recenser 95 QTL associés à la teneur en sucre, répartis sur 58 régions du génome dont la moitié présente des colocalisations entre des QTL détectés dans différentes populations qui pourraient correspondre au même locus (Causse, in press). Le même type d'observations a pu être fait pour les QTL contrôlant les variations de texture dans la section précédente (Figure I.13).

### ***III.2. Le déterminisme génétique***

La détection de QTL est une étape importante pour l'identification des régions du génome contrôlant un caractère quantitatif, mais il est ensuite indispensable de préciser le mode d'action de ces QTL. Le modèle génétique classiquement décrit est le modèle additif où les effets individuels sont stables et d'amplitude attendue pour chaque QTL. Cependant, plusieurs types d'effets sont à prendre en compte. La dominance correspond à des interactions entre allèles au même locus et l'épistasie décrit des interactions entre deux ou plusieurs locus. La caractérisation fine du déterminisme génétique d'un QTL est souvent abordée par la sélection de lignées quasi-isogéniques (QTL-NIL) qui ne diffèrent que pour la région chromosomique d'intérêt, afin de confirmer l'effet individuel du QTL (Van Berloo *et al.*, 2001). Dans le cas où l'effet observé au niveau des QTL-NIL est très différent de l'effet attendu, des interactions épistatiques et/ou un effet de l'environnement peuvent être en cause. Ces paramètres

**Figure I.14: Principe de la cartographie fine de QTL par la recherche de recombinants.**

Les marqueurs A et H limitant l'intervalle où a été localisé le QTL ont été utilisés pour rechercher des recombinants dans cette région. Le phénotype des recombinants et le génotypage de marqueurs intermédiaires permettent d'affiner la position du QTL à l'intervalle situé entre les marqueurs F et G.



d'interactions ne sont pas faciles à prendre en compte dans les modèles génétiques, notamment pour l'épistasie qui peut être la résultante aussi bien de l'interaction entre QTL que de l'interaction entre QTL et fonds génétique, voire des deux. Une étude récente propose l'utilisation de NIL hétérogènes pour le fonds génétique, Heterogeneous Inbred Family (HIF), pour vérifier l'effet d'un QTL sur un caractère (Loudet *et al.*, 2005). Ces lignées sont dérivées d'un individu de la population de RIL utilisée pour la détection de QTL pour lequel la région cible du QTL est encore à l'état hétérozygote. Après autofécondation, des lignées homozygotes pour chacun des allèles parentaux peuvent être sélectionnées. Les résultats obtenus après comparaison des phénotypes de ces lignées ont permis de confirmer l'effet du QTL sur les variations du caractère, mais le fonds génétique étant hétérogène, aucune hypothèse concernant l'existence d'interaction entre QTL ou entre QTL et fonds génétique ne peut être faite.

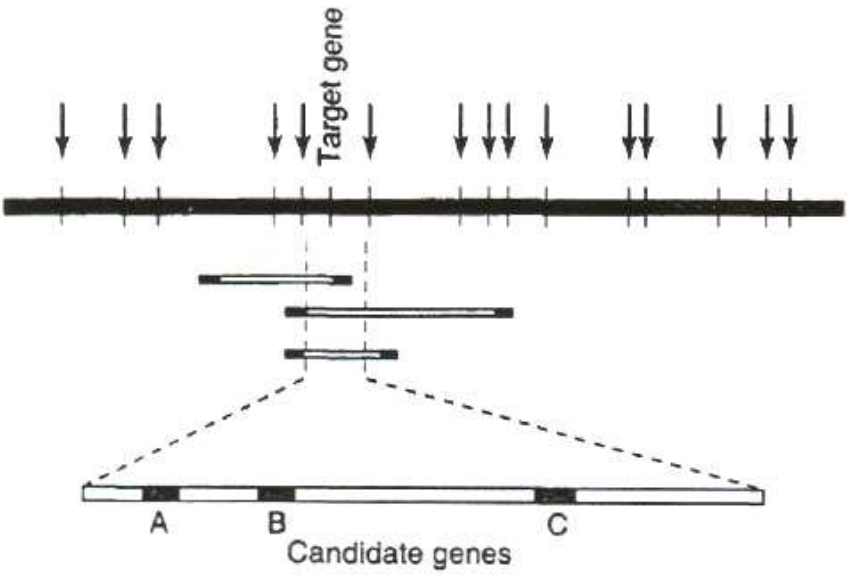
Chez la tomate, l'introgression d'un QTL contrôlant la teneur en sucres solubles dans deux fonds génétiques a permis de confirmer l'effet de ce QTL et a également abouti à la détection d'un nouveau QTL pléiotrope dans l'un des deux fonds (Fridman *et al.*, 2002). A l'inverse, la construction de génotypes cumulant plusieurs QTL associés à des caractères agronomiques a abouti à la détection d'effets épistatiques moins qu'additifs, l'effet observé étant inférieur à la somme des effets attendus (Eshed and Zamir, 1996).

### III.3. La cartographie fine

La détection de QTL permet d'identifier les locus du génome associés à l'expression d'un caractère quantitatif. Généralement, ces QTL sont localisés dans une région très imprécise allant de 10 à 30 cM (Hyne *et al.*, 1995). La cartographie fine ou cartographie de substitution (Paterson *et al.*, 1990) a pour objectif de réduire cet intervalle en recherchant des recombinants dans la région ciblée puis en déterminant les effets phénotypiques des différents fragments chromosomiques sélectionnés (Figure I.14). Cette méthode permet non seulement d'affiner la position des QTL, mais aussi de vérifier si un ou plusieurs QTL contrôlent le caractère étudié. De plus, dans le cas où des QTL associés à différents caractères co-localisent dans la même région, il sera possible de déterminer s'il s'agit d'une liaison génétique ou de l'effet pléiotrope d'un seul QTL. Ainsi, la cartographie fine d'une région localisée sur le chromosome 2 a permis de dissocier des QTL contrôlant les variations de poids, de teneurs en sucre et de nombre de loge du fruit de tomate (Lecomte *et al.*, 2004b). Cette étude a également montré que le QTL de poids du fruit initialement détecté correspondait à deux locus différents.

La recherche de recombinants nécessite de disposer d'un certain nombre de marqueurs dans la région du QTL. La densification en marqueurs est donc une étape indispensable. Pour cela, plusieurs stratégies peuvent être utilisées. La cartographie comparée peut permettre le transfert de marqueurs en ancrant la région étudiée à d'autres cartes génétiques, le plus souvent de la même espèce ou de la même famille (macrosynténie). Une autre stratégie appelée Bulk Segregant Analysis ou BSA (Michelmore *et al.*, 1991) est basée sur la recherche de marqueurs, essentiellement de type AFLP, en

Figure I.15: Principe du clonage positionnel de QTL par marche chromosomique et cartographie haute résolution, d'après Tanksley *et al.* (1995).



utilisant des mélanges de génotypes associés à un phénotype. Enfin, la microsyténie, notamment avec *Arabidopsis thaliana* dont le génome est entièrement séquencé, est une autre source de marqueurs, par comparaison des séquences des gènes orthologues. De plus, ces marqueurs correspondent souvent à des gènes de fonctions connues, ce qui peut être un moyen d'identifier des gènes candidats à la fois positionnels et fonctionnels (Oh *et al.*, 2002).

La cartographie fine est très largement utilisée aussi bien pour le clonage de gènes majeurs que pour le clonage de QTL (Price, 2006).

#### III.4. Le clonage de QTL

Le clonage de QTL consiste à identifier le gène au locus qui contrôle les variations du caractère d'intérêt. Pour y parvenir, différentes approches peuvent être envisagées.

**Le clonage positionnel** est la méthode la plus utilisée et a pour objectif d'isoler le gène expliquant l'effet d'un QTL sur un caractère à partir de sa position chromosomique (Tanksley *et al.*, 1995). Généralement, il est préférable de préciser au préalable la position du QTL de façon fine. Pour cela, une étape de cartographie fine est nécessaire afin d'identifier des marqueurs moléculaires flanquant le QTL dans un intervalle inférieur à 1 cM et de rechercher des événements de recombinaisons dans la région du QTL afin de construire une carte génétique haute résolution (Figure I.15). Ensuite, la marche chromosomique peut être engagée et consiste à cribler une banque génomique de gros fragments (YAC ou BAC) à l'aide de deux marqueurs encadrant le QTL. Les séquences des clones isolés sont utilisées pour rechercher de nouveaux clones jusqu'à ce que la région cible soit couverte. L'ensemble des clones isolés sont assemblés en contigs afin d'obtenir la carte physique de la région cible (Figure I.15). Les cadres ouverts de lecture (ORF) sont recherchés, leur polymorphisme est étudié en relation avec les variations du caractère et les différents gènes candidats obtenus sont testés afin de valider leur rôle dans le contrôle du caractère.

Le clonage positionnel a été la stratégie privilégiée pour le clonage du QTL *fw2.2* pour lequel un gène contrôlant la taille du fruit de tomate a été identifié (Frary *et al.*, 2000) et du QTL *lin5* contrôlant les variations de teneur en sucre, qui code une invertase pariétale (Fridman *et al.*, 2000).

Le clonage positionnel étant une démarche lourde et aléatoire, une autre stratégie est de plus en plus utilisée pour caractériser les QTL. L'**approche gène candidat** consiste à identifier et cartographier des gènes dont la fonction pourrait être relié à l'expression du caractère d'intérêt. A ce stade, on parle de gène candidat fonctionnel. Dans le cas où la cartographie de ce gène révèle une colocalisation avec la région du QTL, on parle alors de gène candidat positionnel (Pflieger *et al.*, 2001). Ce type d'approche a permis de cloner le gène responsable de la mutation Nr chez la tomate (Tableau I.4) mais, jusqu'à présent, aucun QTL n'a pu être caractérisé de la sorte. Malgré tout la démarche gène candidat peut se révéler complémentaire de la stratégie de clonage positionnel (Tanksley *et al.*, 1995)

et des colocalisations entre des gènes candidats fonctionnels et des QTL de qualité du fruit de tomate ont déjà été observées (Causse *et al.*, 2004).

### III.5. La recherche de gènes candidats

Cette partie a pour objectif de présenter les différentes stratégies disponibles pour identifier des gènes candidats d'après leur localisation génétique et sans *a priori* sur la fonction physiologique.

#### a/ Matériel végétal

Dans le cas de la recherche de gènes candidats associés à l'effet d'un QTL pour un caractère d'intérêt, le choix du matériel végétal est un facteur déterminant pour optimiser l'efficacité de la démarche. Il faut à la fois disposer de génotypes aux phénotypes contrastés et cibler l'intervalle du QTL. Pour cela, une stratégie envisageable consiste à rechercher des gènes différentiellement exprimés entre la lignée parentale et une lignée quasi-isogénique à l'exception de la région du QTL, afin d'isoler des gènes candidats pour le QTL étudié. Une étape de cartographie est cependant nécessaire pour vérifier que le gène identifié colocalise avec le QTL. Cependant, la sélection de QTL-NIL est une phase longue et lourde qui suppose que l'effet individuel du QTL sur le caractère est stable. Chez la tomate, une population de lignées d'introgression (IL) issue du croisement interspécifique *S. pennellii* x *S. esculentum* est disponible (Eshed and Zamir, 1994). Elle est constituée de 75 IL découpant le génome en 107 fragments (Annexe 1). Le phénotypage de cette population pour le caractère d'intérêt constitue une approche intéressante pour identifier des génotypes au phénotype contrasté et s'affranchir de l'étape de création de QTL-NIL.

#### b/ Etude du transcriptome

L'étude du transcriptome consiste à établir des profils d'expression des ARN messagers transcrits à un moment donné dans un tissu donné. Ce type d'approche a été initialement appliqué chez les espèces modèles mais s'est démocratisé grâce au développement de collections d'EST et de séquences génomiques, notamment chez la tomate, l'abricot ou la vigne pour les espèces fruitières. Plusieurs méthodes de criblage à haut et moyen débit sont utilisées pour la recherche de gènes candidats par l'étude du transcriptome.

La technique de **cdNA-AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) combine l'utilisation d'enzymes de restriction et l'amplification PCR appliquée à des populations d'ARN messagers pour identifier des gènes différentiellement exprimés. Une étude récente décrit l'utilisation de cette technique pour l'identification de gènes associés à la qualité de la baie de raisin (Tonutti and Bonghi, 2006).

L'utilisation de **banques soustractives ou SSH** (*Suppression Subtractive Hybridization*) permet d'identifier des gènes différentiellement exprimés, même faiblement représentés, en normalisant la population d'ADNc par amplification PCR et en éliminant par hybridation soustractive les transcrits communs aux deux modalités comparées. Ce type d'approche a été développé chez la tomate pour la caractérisation de la résistance à un virus (Collazo *et al.*, 2005). Concernant le fruit, des études utilisant cette technique ont été réalisées chez la vigne pour la caractérisation d'un mutant aux baies sans chair et pour l'identification de gènes contrôlant la couleur du fruit (Ageorges *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2006).

La technique **SAGE** (*Serial Analysis of Gene Expression*) consiste à isoler et séquencer des fragments d'ADNc en utilisant des étiquettes spécifiques d'un ARN messager afin d'identifier, de façon quantitative, l'ensemble des gènes transcrits dans un tissu. Cependant, cette technique nécessitant une bonne connaissance du génome (en termes de séquences) a surtout été utilisée chez la levure, l'homme et les animaux. Quelques travaux ont été réalisés chez les plantes (Lorenz and Dean, 2005) notamment chez le riz et *A. thaliana*, et récemment chez l'orge pour étudier les profils de transcription du grain au cours du processus de maltage (White *et al.*, 2006).

Enfin, le développement récent, chez plusieurs espèces, de techniques basées sur l'hybridation, utilisant des **puces nucléiques** (microarrays), permettent de comparer l'expression de plusieurs gènes simultanément. On distingue les **puces à ADN** où des produits PCR issus de clones d'ADNc sont déposés sur la lame de verre et les **puces à oligonucléotides** où de petits oligonucléotides sont synthétisés directement sur la lame de verre.

Chez la tomate, les deux types de filtres haute densité sont disponibles.

- Les puces à ADNc Tom-1 (<http://bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html>) ont été développées à partir des clones issus de 27 banques d'EST et sont composées de 12899 clones qui représentent 8500 gènes indépendants (Alba *et al.*, 2004). Ces puces ont été utilisées chez le fruit pour identifier les gènes impliqués dans les stades de développement précoces (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005), caractériser les gènes différentiellement exprimés au cours du développement chez le mutant de la maturation *Nr* (Alba *et al.*, 2005), rechercher des gènes candidats pour un QTL contrôlant les variations de teneur en solides solubles (Baxter *et al.*, 2005), et réaliser une étude comparative des gènes impliqués dans le développement et la maturation du fruit chez les Solanacées (Moore *et al.*, 2005).
- Les puces à oligonucléotides GeneChip® Tomato Genome Array utilisant la technologie Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara CA, Etats-Unis) sont composées de 10000 spots représentant au final de 9200 transcrits. L'avantage de cette technologie est que les sondes sont généralement spécifiques de l'isoforme d'un gène, limitant ainsi les hybridations croisées entre gènes de la même famille multigénique. A ce jour, aucun travail utilisant ces lames chez la tomate n'a été publié.



c/ Etude du protéome

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées par le génome à un instant donné selon la définition de Wasinger *et al.* (1995) "PROTein complement Expressed by a genOME". Généralement, on parle du protéome d'un tissu, d'une cellule ou d'un organelle. L'analyse par électrophorèse sur gels bidimensionnels (E2D) reste la technique la plus répandue pour la séparation des protéines et permet de visualiser les protéines les plus abondantes d'un tissu en les séparant selon leur masse et leur charge. Ensuite, l'analyse par spectrométrie de masse (SM) peut permettre d'identifier la fonction des protéines détectées.

Grâce à l'enrichissement des bases de données de séquences nucléiques suite à différents programmes de séquençage de génomes et au développement de nombreuses banques d'EST, l'identification des protéines a été facilitée ce qui a favorisé l'essor de la protéomique comme outil pour la caractérisation de protéines. Ce type d'approche s'est développé récemment et suscite un intérêt grandissant dans le monde végétal si l'on considère le nombre de revues consacrées à ce sujet, publiées ces dernières années (Barbier-Brygoo and Joyard, 2004; Cánovas, 2004; Kersten *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2004; Rossignol, 2001; Thiellement *et al.*, 1999; Zivy and de Vienne, 2000). La caractérisation du protéome est une approche complémentaire de l'étude du transcriptome. En effet, un transcrit peut être à l'origine de plusieurs protéines suite à l'épissage alternatif et la quantité de protéine ne correspond pas forcément à la quantité de transcrit. De plus, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui peuvent avoir des répercussions sur leur fonction, leur activité ou leur transport (Mann and Jensen, 2003). Enfin, le transcriptome n'apporte pas d'information quand à la localisation cellulaire des protéines qui seront traduites.

Jusqu'à présent, chez les végétaux, la plupart des travaux concernant le protéome était essentiellement descriptifs et consistait à énumérer les protéines présentes dans un tissu ou un organelle à un moment précis (Kieselbach and Schroder, 2003; Mechin *et al.*, 2004; Noir *et al.*, 2005). Désormais des approches quantitatives sont également développées par la recherche de différentiels d'expression de protéines (protéomique différentielle). Cependant, peu d'études sur le fruit ont été publiées. Ceci s'explique essentiellement par la difficulté d'obtenir des extraits protéiques ce qui a demandé la mise au point de protocoles spécifiques (Faurobert *et al.*, 2006; Saravanan and Rose, 2004). Ceci dit, quelques travaux ont été réalisés sur le mésocarpe du raisin (Sarry *et al.*, 2004) et sur l'abricot à différents stades de développement (Grimplet *et al.*, 2004). Chez la tomate, quelques études consacrées au protéome du fruit ont été publiées et concernent la comparaison de différentes variétés (Rocco *et al.*, 2006) et l'étude des variations protéiques au cours du développement du fruit (Faurobert *et al.*, in press). L'approche protéome en relation avec la caractérisation génétique de caractères quantitatifs a été décrite pour la première fois chez le maïs où les quantités de protéines ont été utilisées au même titre que des données phénotypiques pour la détection de QTL, renommés PQL pour *Protein Quantity Loci* (Damerval *et al.*, 1994). Des travaux concernant la recherche de PQL ont été réalisés pour caractériser la résistance au stress hydrique ou la qualité du grain chez le maïs

(Consoli *et al.*, 2002; de Vienne *et al.*, 1999), le caractère de dureté du grain chez le blé (Amiour *et al.*, 2003) et l'étude des protéines des aiguilles du pin maritime (Costa and Plomion, 1999).

### III.6. La validation fonctionnelle

La première étape dans le cadre de la recherche de gènes candidats associés à l'effet d'un QTL est la validation positionnelle, c'est à dire s'assurer de la colocalisation du gène et du QTL par cartographie génétique.

Plusieurs démarches sont ensuite envisageables pour confirmer le rôle physiologique du gène candidat dans le contrôle des variations du caractère. La plus classique est la transformation génétique dans le but de sur-exprimer, sous-exprimer ou éteindre l'expression du gène à étudier et d'observer le phénotype résultant. Cette méthode peut se révéler délicate dans le cas des QTL car ils n'expliquent qu'une part de la variation du caractère. Elle s'est cependant avérée concluante pour valider le rôle du gène isolé par clonage positionnel pour le QTL *fw2.2* contrôlant la taille du fruit de tomate (Frary *et al.*, 2000).

Dans le cas du QTL *lin5* contrôlant les variations de teneur en sucre du fruit de tomate, la complémentation fonctionnelle a été réalisée chez la levure, en transformant une souche déficiente pour l'invertase pariétale avec un plasmide contenant l'ADNc de chacun des deux allèles parentaux (Fridman *et al.*, 2000).

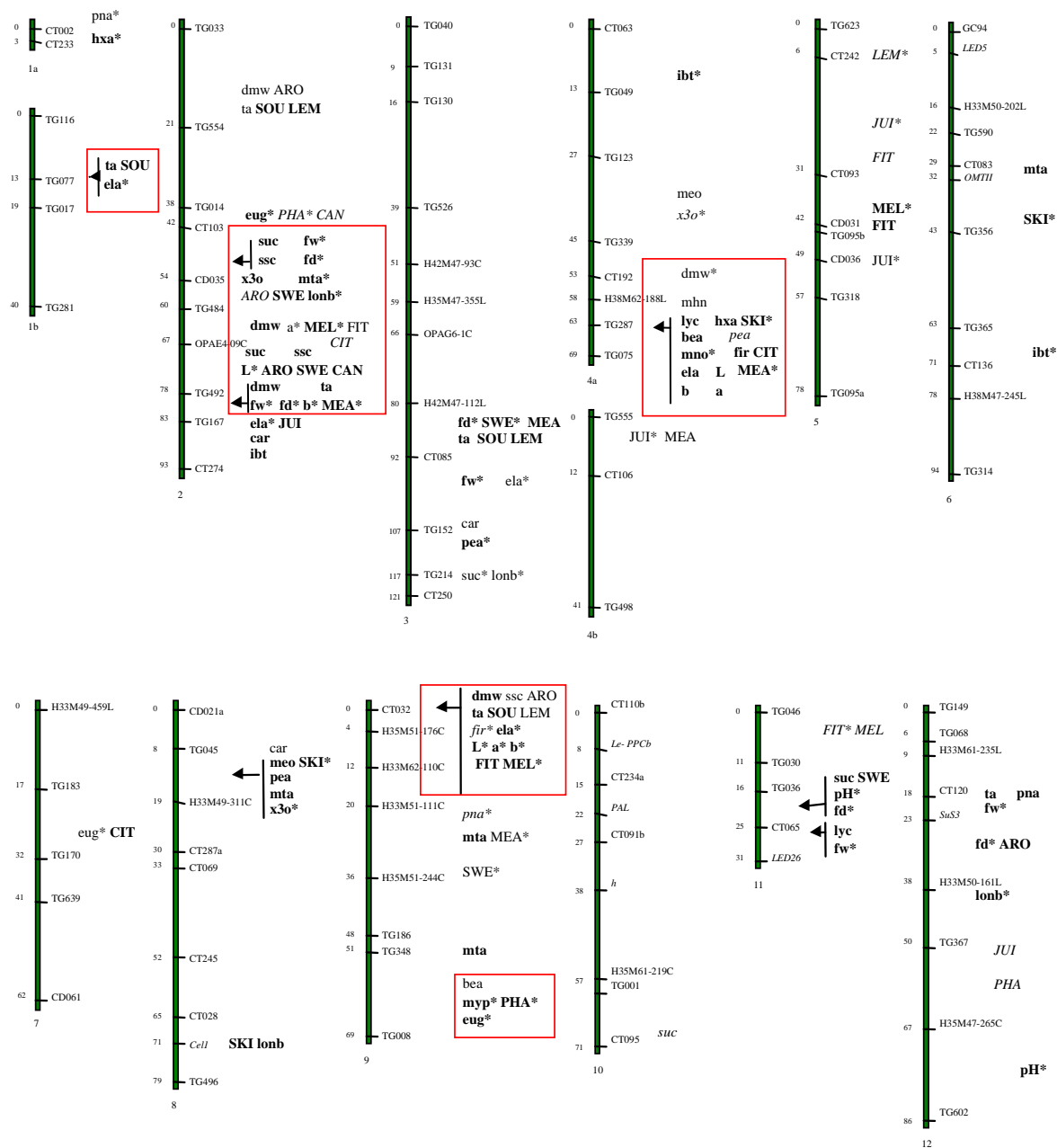
Une autre stratégie utilisable est la génétique d'association qui consiste à rechercher une corrélation statistique entre le polymorphisme du gène candidat et le phénotype observé, dans une collection d'accessions représentatives de la diversité de l'espèce étudiée.

Enfin, d'autres stratégies basées sur le criblage de collection de mutants EMS ou de collection de mutants d'insertion (ADN-t ou transposon) (Bouchez and Hofte, 1998) peuvent être envisagées. Dans les deux cas, le criblage se fait en utilisant des amorces spécifiques du gène candidat. Chez les mutants d'insertion, un polymorphisme de taille sera facilement identifiable. Chez les mutants EMS, les allèles mutés du gène candidat peuvent être isolés par TILLING, c'est-à-dire en utilisant des méthodes de détection haut débit de mutations ponctuelles qui recherchent les mésappariements entre deux bases nucléotidiques (Henikoff *et al.*, 2004). Chez la tomate, plusieurs collections de mutants EMS sont en cours de développement (Eshed Y. et Zamir D. Hebrew Univ., Israël; Rothan C., INRA, France et Levy A., Weizmann Inst., Israël) et une collection de mutant d'insertion est disponible (Meissner *et al.*, 2000).

**Figure I.16 : QTL de la qualité organoleptique détectés dans la population de lignées recombinantes issues du croisement Cervil x Levovil (Saliba-Colombani *et al.*, 2001 ; Causse *et al.*, 2001, Causse *et al.*, 2002).**

Les caractères étudiés sont des caractères physiques (nombre de loges *lonb*, poids *fw*, diamètre *fd*, couleur *L a b*, fermeté *fir* et élasticité *ela* du fruit), des caractères chimiques (teneurs en matière sèche *dmw*, solides solubles *ssc*, sucres *suc*, lycopène *lyc*, carotène *car*, *pH* et acidité titrable *ta*, teneur en composés volatils aromatiques *pna*, *hxa*, *eug*, *ibt*, *pea*, *meo*, *x3o*, *bea*, *myp*, *mno*, *mta*), et des composantes sensorielles (saveurs sucrée *SWE* et acide *SOU*, intensité de l'arôme *ARO*, des arômes citron *LEM*, agrume *CIT*, bonbon *CAN* et pharmaceutique *PHA*, texture ferme *FIT*, fondante *MEL*, juteuse *JUI*, farineuse *MEA*, peau difficile à avaler *SKI*). Les QTL détectés à la fois par composite interval mapping (CIM) et par interval mapping (IM) sont écrits en gras, ceux détectés par CIM uniquement sont écrits normalement et ceux détectés par IM uniquement sont écrits en italique. Les astérisques indiquent les QTL pour lesquels les allèles Levovil apportent les fortes valeurs au caractère.

Les cinq régions retenues pour le programme de backcross assisté par marqueurs sont encadrées.



## IV. Contexte et objectifs de l'étude

Au début des années 90, un programme de recherche visant à caractériser le déterminisme génétique des composantes de la qualité organoleptique de la tomate a été initié à l'INRA de Montfavet. Ce projet est basé sur un double constat:

- les consommateurs estiment que les tomates destinées à la consommation de frais sont trop fermes et dépourvues de saveur;
- les sociétés semencières ont du mal à prendre en considération la qualité gustative dans leurs programmes de sélection variétale car de nombreux caractères sont en jeu et leur évaluation phénotypique est lourde à mettre en oeuvre.

Dans ce contexte, l'analyse des critères de la qualité organoleptique du fruit de tomate important dans la perception du goût par les consommateurs a été réalisée. La première conclusion est qu'il n'y a pas un consommateur mais des consommateurs. Le prototype de la tomate idéale est donc difficile à définir. Cependant, différents caractères ont été identifiés comme essentiels dans la perception du goût. D'une façon générale, la préférence allait vers des fruits sucrés, juteux, avec beaucoup d'arômes, peu farineux et ni trop fermes, ni trop mous. Tout un programme! Face à ces conclusions, il apparaissait important d'identifier les facteurs génétiques contrôlant chacun de ces caractères et ainsi envisager la sélection de différentes variétés de tomates représentatives des attentes des différents groupes de consommateurs.

Afin d'identifier les régions du génome impliquées dans la construction de la qualité organoleptique du fruit de tomate, une carte génétique a été réalisée à partir d'une population de lignées recombinantes (RIL) issue du croisement intraspécifique entre une variété de type cerise, Cervil, aux qualités gustatives remarquables et une variété à fruit de calibre élevé, Levovil, de moindre qualité (Saliba-Colombani *et al.*, 2000). L'étude phénotypique des fruits de l'ensemble de ces lignées a permis de détecter de nombreux QTL associés à des composantes de la qualité organoleptique (Figure I.16), localisés en majorité sur huit régions du génome réparties sur sept chromosomes (Causse *et al.*, 2001a; Saliba-Colombani *et al.*, 2001). Ces QTL, rassemblés en cluster, contrôlent aussi bien la variation de composantes chimiques (sucres, acides, arômes, pigments), physiques (fermeté, couleur, poids) que sensorielles (saveurs, arômes, texture). Pour la majorité de ces QTL, les allèles de Cervil apportent les valeurs élevées au caractère, surtout pour les composantes chimiques. Pour le poids du fruit et certains QTL contrôlant la fermeté, l'élasticité du fruit ou la farinosité, ce sont les allèles de Levovil qui augmentent les valeurs du caractère.

**Tableau I.5: Tableau récapitulatifs des caractéristiques des différents QTL contrôlant des caractères de texture du fruit de tomate, localisés sur les cinq régions chromosomiques d'intérêt sélectionnées.**

Le marqueur le plus proche du QTL est précisé. La nature de l'allèle parental apportant les fortes valeurs au caractère est indiqué: C pour le parent Cervil et L pour le parent Levovil. Les méthodes d'Intervalle Mapping (IM) et de Composite Intervalle Mapping (CIM) ont été appliquées pour la détection des QTL. Le LOD est le log-likelihood à la position spécifiée et le PVE est le pourcentage de variation phénotypique expliqué par le QTL. La mention *ns* indique les LOD non significatifs.

Caractère	QTL	Marqueur	Allèle	IM		CIM		
				LOD	PVE	LOD	PVE	
<b>Chromosome 1</b>								
Elasticité	ela 1.1	TG077	L	3,03	10,3	3,03	10,2	
<b>Chromosome 2</b>								
Elasticité	ela 2.1	TG167	L	6,13	20,1	7,67	24,9	
Fermeté sensorielle	fit 2.1	TG484	C	1,03 <i>ns</i>	3,8	2,78	9,3	
Farinosité	mea 2.1	TG492	L	4,87	17,1	8,65	25,5	
<b>Chromosome 4</b>								
Fermeté instrumentale	fir 4.1	TG287	C	9,78	31,9	10,85	33,3	
Elasticité	ela 4.1	TG287	C	2,68	9,2	2,68	9,8	
Farinosité	mea 4.1	TG287	L	3,98	13,4	9,37	29,7	
<b>Chromosome 9</b>								
Fermeté instrumentale	fir 9.1	CT032	L	3,2	9,8	2,25 <i>ns</i>	10,35	
Elasticité	ela 9.1	CT032	L	2,88	10,3	4,17	13,9	
Fermeté sensorielle	fit 9.1	TG591	C	8,89	29	12,74	41,1	
Farinosité	mea 9.1	OPG12-2,5C	L	1,02 <i>ns</i>	6,1	3,72	22,1	

Ces résultats fournissent des informations importantes quant au déterminisme génétique des composantes de la qualité organoleptique du fruit de tomate mais illustrent aussi les difficultés relatives à l'utilisation des caractères quantitatifs complexes dans les programmes d'amélioration variétale. En effet, plusieurs composantes caractérisent la qualité organoleptique et pour chacune de nombreux QTL ont été détectés, parfois avec des relations antagonistes entre caractères. Le point positif est que ces QTL sont organisés en cluster et qu'il est donc envisageable de cibler quelques régions chromosomiques permettant l'amélioration de plusieurs caractères d'intérêt simultanément. Dans ce contexte, cinq régions localisées sur les chromosomes 1, 2, 4 et 9 ont été choisies selon deux critères:

- ces régions cumulaient des QTL contrôlant des caractères d'intérêt répondant aux exigences des consommateurs, souvent avec des effets forts.
- les régions présentant un antagonisme avec le poids du fruit n'ont pas été retenues à l'exception de celle du chromosome 2 qui possède de nombreux QTL majeurs pour plusieurs caractères chimiques et sensoriels.

A ce stade, l'objectif était de tester la faisabilité de la sélection assistée par marqueurs pour des composantes de la qualité organoleptique, d'étudier la stabilité des effets des QTL et d'évaluer l'influence du fonds génétique sur leur expression. Pour cela, un programme de sélection assistée par marqueur a été initié visant à introgresser de une à cinq de ces régions d'intérêt issues du génome de Cervil, dans trois lignées receveuses différant essentiellement pour des critères de fermeté du fruit et d'aptitude à la conservation. Ce travail a permis l'obtention de lignées quasi-isogéniques (QTL-NIL) et de lignées composites cumulant de deux à cinq régions d'intérêt dans trois fonds génétiques et la caractérisation des QTL contrôlant la qualité organoleptique du fruit de tomate (Lecomte *et al.*, 2004a). Les effets des QTL sont apparus relativement stables pour les lignées cumulant les cinq régions pour la majorité des caractères étudiés, surtout au niveau des évaluations sensorielles. L'impact du fonds génétique sur l'effet des QTL a été observé ainsi qu'un effet fort de QTL défavorables pour le poids du fruit. Au niveau des QTL-NIL, les effets individuels des QTL sont apparus beaucoup plus variables, notamment pour le caractère de fermeté, révélant l'existence d'interactions entre QTL et confirmant l'existence d'interactions entre QTL et fonds génétique.

Dans le prolongement de cette étude, mes travaux de thèse se focalisent sur la caractérisation des composantes de la texture du fruit de tomate aux niveaux génétique, phénotypique, physiologique et moléculaire. Les principales composantes de la texture du fruit sont la fermeté en bouche, la farinosité, l'aspect peau gênante ou la jutosité. L'évaluation de ces caractères se fait principalement par des analyses sensorielles réalisées par des dégustateurs entraînés ce qui n'est pas compatible avec les programmes de sélection variétale.

Dans un premier temps, nous avons poursuivi la caractérisation des QTL de qualité organoleptique afin de confirmer les résultats obtenus concernant la stabilité des effets individuels des QTL dans différents fonds génétiques et d'évaluer l'effet de l'environnement sur leur expression (Chapitre 3).

Puis, nous nous sommes focalisée sur les caractères de texture du fruit, en particulier la fermeté, l'élasticité du fruit et la farinosité. Les principaux QTL contrôlant ces composantes ont été détectés sur les régions des chromosomes 1, 2, 4 et 9 et ce sont aussi bien les allèles de Cervil ou ceux de Levovil qui apportent les valeurs élevées au caractère (Tableau I.5). Les QTL présentant les pourcentages de variation phénotypique les plus élevés pour la fermeté et la farinosité sont localisés sur les chromosomes 4 et 9. Les lignées quasi-isogéniques correspondantes à ces deux régions dans deux fonds génétiques à texture contrastée ont été utilisées pour étudier différents descripteurs de la morphologie du fruit, au niveau macroscopique et au niveau cellulaire (Chapitre 4). L'objectif était d'identifier de nouveaux paramètres permettant de décrire des caractères tels que la fermeté ou la farinosité. Enfin, ces lignées ont également permis de rechercher à quel stade du développement du fruit les différences de fermeté du fruit se mettent en place. Parallèlement, la cartographie fine de QTL relatifs aux caractères de fermeté, localisés sur les chromosomes 4 et 9, a été initiée en associant la densification en marqueurs de ces régions et la sélection de recombinants (Chapitre 5).

Au niveau moléculaire, l'identification de mécanismes physiologiques associés aux variations de texture a été abordée par la recherche de gènes candidats via l'étude du protéome et du transcriptome (Chapitre 6). La cartographie de ces gènes a commencé afin de rechercher d'éventuelles colocalisations avec les QTL d'intérêt et le niveau d'expression de certains gènes a été étudié au cours du développement du fruit.

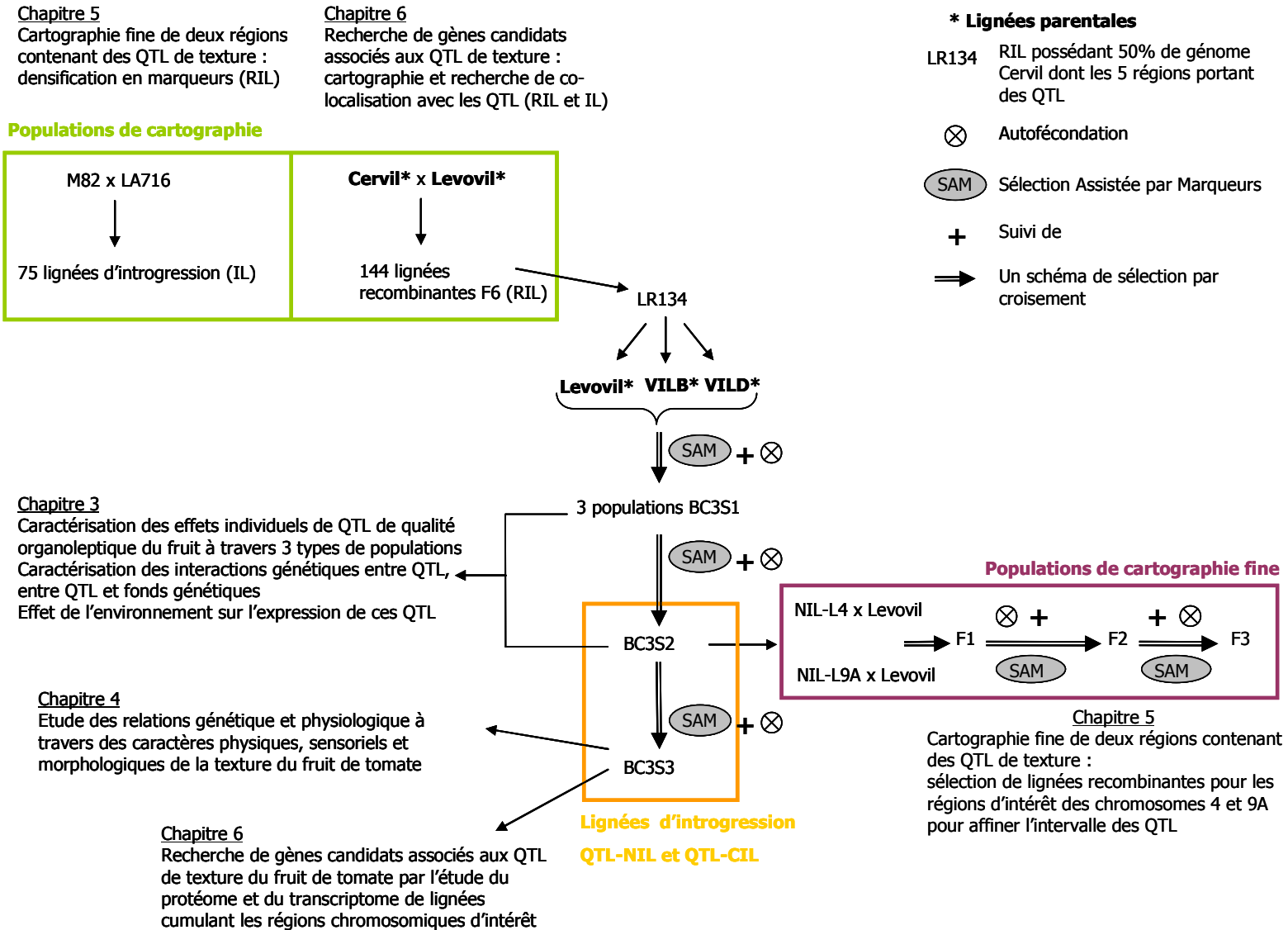
## **CHAPITRE II**

### **MATERIEL ET METHODES**

---



**Figure II.1: Synthèse schématique du matériel végétal utilisé en relation avec les questions de recherche posées.**



## CHAPITRE 2 \_ MATERIELS ET METHODES

---

### I. Le matériel végétal

La figure II.1 présente un schéma récapitulatif de l'ensemble du matériel végétal utilisé au cours de la thèse et les questions de recherche associée.

#### 1.1. Les lignées parentales

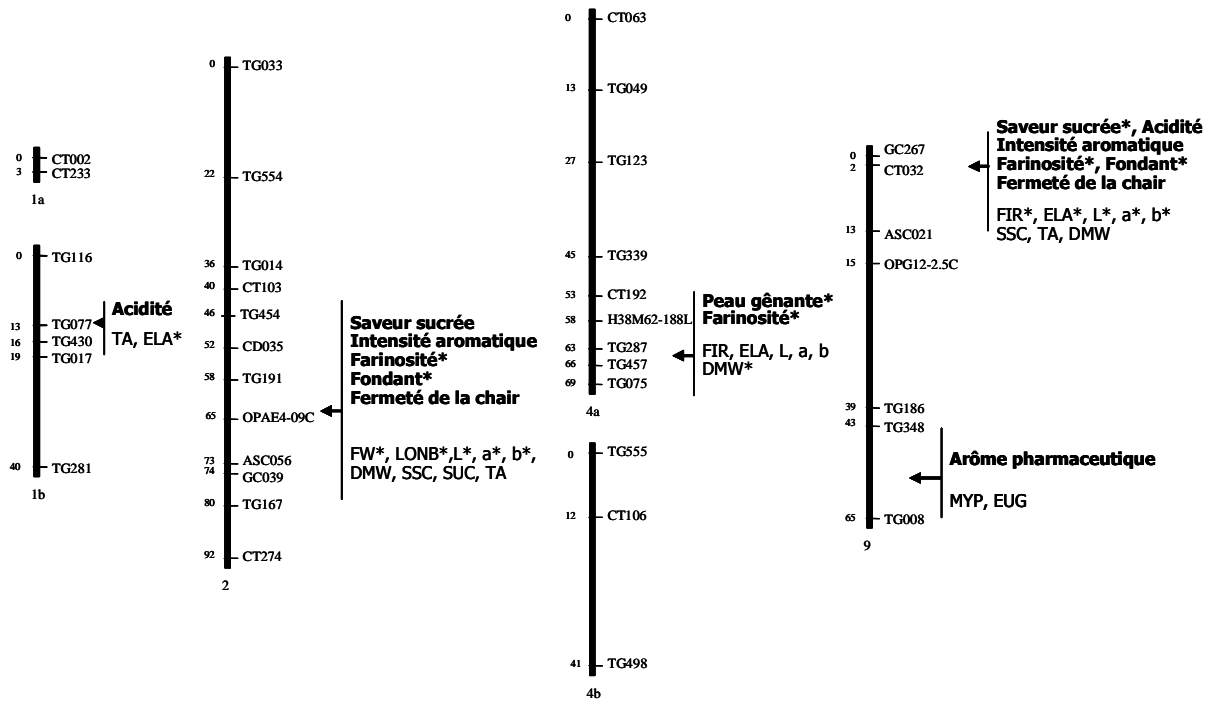
Les quatre lignées parentales utilisées au cours de ce travail ont été fournies par la société Vilmorin. Deux de ces lignées correspondent aux parents à l'origine de la population de lignées recombinantes (RIL) qui a permis la localisation de QTL impliqués dans la construction de la qualité organoleptique du fruit. **Cervil**, (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dun.)) est une lignée qui produit des fruits de type cerise aux qualités gustatives remarquables tandis que **Levovil** (*Solanum lycopersicum* Mill.) est une lignée à gros fruits sans caractéristique gustative particulière. Les deux autres lignées utilisées, **VILB** et **VILD** (*Solanum lycopersicum* Mill.), sont des lignées utilisées dans les programme de sélection de la société Vilmorin, qui se caractérisent par des fruits de gros calibre, fermes, avec une très bonne aptitude à la conservation. La lignée Cervil a été utilisée comme parent donneur puisqu'elle confère les allèles aux effets favorables à la majorité des QTL de qualité identifiés. Les trois autres lignées à gros fruits ont servi de parent receveur pour la construction des lignées introgressées.

#### 1.2. Les lignées introgressées

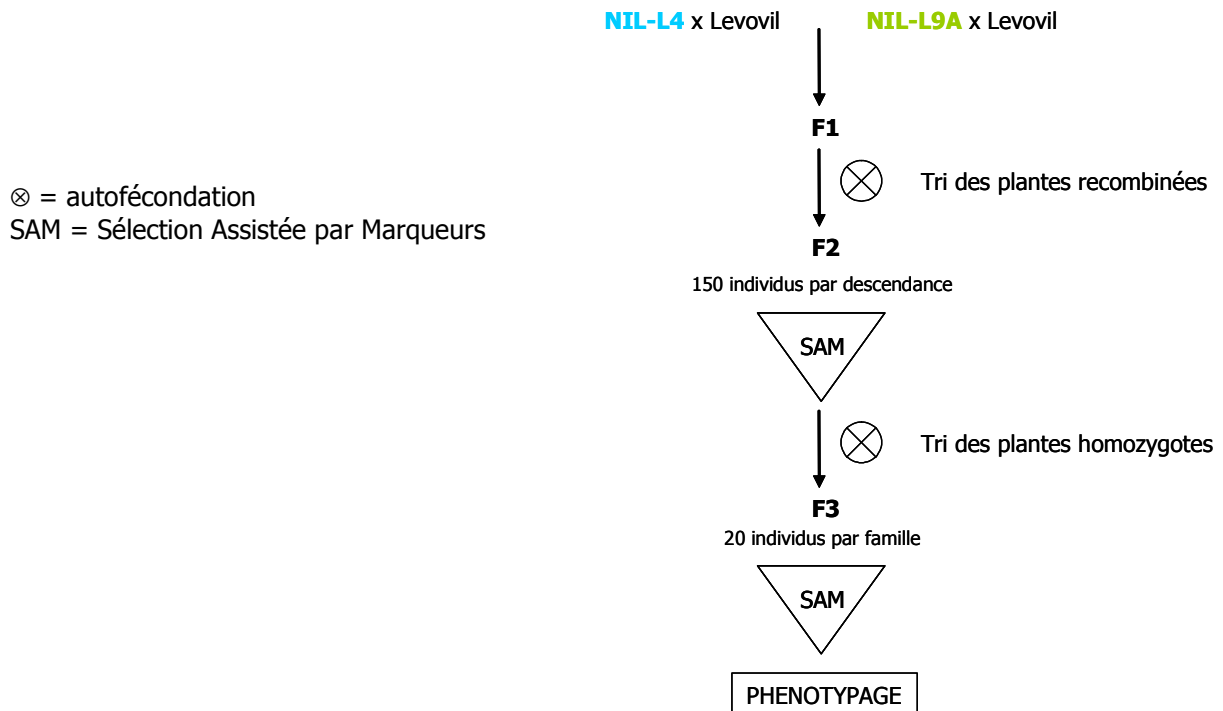
Suite au travail de cartographie et de phénotypage réalisé sur les RIL, de nombreux QTL ont été détectés contrôlant aussi bien la variation de composantes chimiques (acidité titrable TA, teneurs en solides solubles SSC, en sucres SUC, en matière sèche DMW, en composés volatils tels que l'orthomethoxyphenol et l'eugenol MYP et EUG), physiques (poids du fruit FW, nombre de loge LONB, fermeté FIR, élasticité ELA, couleur L a b) que sensorielles (fermeté, farinosité, jutosité, fondant, peau gênante) (Causse *et al.*, 2002; Saliba-Colombani *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas, les allèles favorables proviennent de Cervil. Ces QTL apparaissent regroupés en cluster sur huit régions réparties sur sept chromosomes, mais cinq de ces régions localisées sur les chromosomes 1, 2, 4, 9A et 9B (Figure II.2) se distinguent par le nombre élevé de caractères regroupés sur une même région ainsi que par l'absence de QTL à effet défavorable sur le poids du fruit (à l'exception de la région du chromosome 2). Ces cinq régions ont donc été choisies pour engager un programme de sélection assistée par marqueurs (SAM) afin d'introgresser ces fragments chromosomiques d'intérêt de la lignée Cervil, dans les trois lignées à gros fruits, Levovil, VILB et VILD (Lecomte *et al.*, 2004a).

**Figure II.2: Carte moléculaire représentant les 5 régions d'intérêt où sont localisés les QTL associés à des composantes de la qualité organoleptique du fruit.**

Les distances génétiques sont exprimées en Kosambi centiMorgans. Les QTL détectés pour les caractères sensoriels sont représentés en gras, les abréviations faisant références aux caractères physiques (poids du fruit FW, nombre de loge LONB, fermeté FIR, élasticité ELA, couleur L a et b) et chimiques mesurés (acidité titrable TA, teneurs en solides solubles SSC, en sucres SUC, en matière sèche DMW, en composés volatils orthomethoxyphenol et eugenol MYP et EUG). Les astérisques mentionnent les caractères pour lesquels les allèles de Levovil apportent des valeurs élevées.



**Figure II.3: Schéma de sélection utilisé pour la recherche de recombinants pour les régions des chromosomes 4 et 9.**



Trois backcross successifs suivis de deux autofécondations, ou trois si nécessaire, (génération BC3S2 ou BC3S3) associés à la SAM aussi bien pour les QTL que le fonds génétique ont permis d'aboutir à la construction de deux types de lignées: des lignées dites d'introgression ne possédant qu'une seule des régions d'intérêt, nommées **QTL-NIL**, et des lignées composites possédant de 2 à 5 de ces régions, nommées **QTL-CIL** (Tableau II.1). Pour la majeure partie des lignées, une 3<sup>ème</sup> étape d'autofécondation a été nécessaire pour fixer les zones du génome qui persistaient à l'état hétérozygote (génération BC3S3). Les lignées sont codées par une lettre, L, B ou D pour les fonds génétiques Levovil, VilB et VilD, suivie du ou des fragments chromosomiques d'origine Cervil introgressés. Pour les QTL-NIL, le code est complété par le préfixe NIL. Afin de simplifier la nomenclature, les lignées cumulant les cinq régions d'intérêt dans chacun des trois fonds génétiques seront respectivement nommées Lx, Bx et Dx.

L'ensemble de ces lignées sera utilisé dans le but de confirmer l'intérêt des régions sélectionnées à la fois dans le fonds génétique d'origine mais aussi dans des fonds génétiques différents. La caractérisation phénotypique, génétique et moléculaire de composantes de la texture du fruit sera approfondie en focalisant sur les QTL-NILs pour les régions des chromosomes 4 et 9A dans les fonds génétiques Levovil et VILB, ainsi que dans les QTL-CIL Lx et Bx.

### 1.3. Les populations de cartographie fine

Afin de disséquer les clusters de QTL et préciser le déterminisme génétique des différents caractères, la cartographie fine de deux régions chromosomiques portant des QTL associés à des composantes de texture du fruit de tomate, localisées sur les chromosomes 4 et 9, a été initiée sur la base de la cartographie de substitution (Paterson *et al.*, 1990). Cette stratégie combine deux approches complémentaires : la densification en marqueurs des régions chromosomiques ciblées ainsi que la sélection de lignées recombinantes associées. Le programme de recherche de recombinants a été engagé à partir des **croisements entre Levovil et NIL-L4 et entre Levovil et NIL-L9A** (Figure II.3) et a permis la caractérisation phénotypique de familles de recombinants en F3.

### 1.4. Les populations de cartographie

Au cours du projet de thèse les besoins de cartographie sont apparus à deux niveaux : la recherche de marqueurs pour densifier les régions chromosomiques étudiées en cartographie fine et la localisation de gènes candidats relatifs aux QTL des cinq régions d'intérêt. Dans les deux cas, nous avons utilisé la population de 144 **lignées recombinantes F7 (RIL)** issue du croisement intraspécifique entre Cervil et Levovil à l'origine de la carte génétique (Saliba-Colombani *et al.*, 2000) et de la détection de QTL associés aux composantes de la qualité organoleptique du fruit de tomate. Pour la cartographie des gènes candidats, le niveau de polymorphisme entre Cervil et Levovil étant relativement faible (10%), nous avons choisi, d'utiliser en complément la **population de lignées d'introgression (IL)** issue du croisement de M82 (*S. esculentum*) avec LA716 (*S. pennellii*) (Eshed and Zamir, 1994; Liu and Zamir,

**Tableau II.1: Présentation des lignées d'introgession disponibles dans trois fonds génétiques: Levovil, VILB, VILD.**

Toutes les lignées sont issues de BC3S3 sauf celles soulignées qui étaient fixées en BC2S2. Les lignées sont codées par une lettre, L, B ou D pour les fonds génétiques Levovil, ViLB et ViLD, suivie du fragment chromosomique d'origine Cervil introgressé (QTL des chromosomes 1, 2, 4, 9A et 9B). Les lignées Lx, Bx et Dx cumulent les 5 régions d'intérêt.

	Levovil	VILB	VILD
QTL-NIL	NIL-L1	NIL-B1	NIL-D1
	NIL-L2	NIL-B2	NIL-D2A
	NIL-L4	NIL-B4	NIL-D4
	NIL-L9A		NIL-D9A
	NIL-L9B	NIL-B9B	
QTL-CIL		B1/2B/9A	
	L1/2/9B	B1/2/9B	D1/2A/9B
	L1/4/9B		
	L1/9A/9B	B1/2B/9A/9B	D1/9A/9B
	L1/4/9A/9B		
		B1/2/9A/9B	
	L2/4/9B		
	L2A/9A/9B	B2/9A/9B	D2A/9A/9B
L4/9A/9B			
Lx	Bx	Dx	

1999). L'utilisation d'un croisement interspécifique permet d'atteindre un niveau de polymorphisme plus élevé. De plus, cette population est constituée de 75 IL découpant le génome en 107 fragments (Annexe 1) et permettant de localiser rapidement les gènes candidats sur un chromosome donné dans un intervalle moyen de 12 cM. Si la position du gène étudié colocalisait avec les régions ciblées portant les QTL, nous poursuivions la recherche de polymorphisme entre Cervil et Levovil afin d'obtenir une position précise en utilisant les RIL.

## II. Les méthodes

### II.1. Conduite culturale

Toutes les cultures se sont déroulées dans les serres de l'unité de recherche Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (UGAFL) de l'INRA d'Avignon. Deux sessions de cultures ont eu lieu par an, au printemps et à l'automne, ce qui correspond à des semis en janvier et en août et à des périodes de production de fruits à maturité échelonnées de mai à juin et d'octobre à novembre. Tous les essais se sont déroulés en serre chauffée sous ferti-irrigation contrôlée, les plantes étant cultivées en pleine terre dans la plupart des expérimentations ou en pots. Pour la plupart des essais, des lots de 4 à 6 plantes par génotype étaient cultivés et les récoltes étaient réparties entre le deuxième et le sixième bouquet de chaque plante. Le protocole spécifique de chaque essai est détaillé dans chacun des chapitres rédigés sous forme d'article.

### II.2. Phénotypage

Les mesures physiques (poids du fruit FW, nombre de loge LONB, fermeté FIR, élasticité ELA, couleur L a et b), chimiques (acidité titrable TA, teneurs en solides solubles SSC, en sucres SUC, en matière sèche DMW) et morphologiques (épaisseur du péricarpe et pourcentage de la surface des loges sur la surface totale) ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du plateau technique d'analyse de la qualité des fruits de l'UMR Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV) à l'INRA d'Avignon. Les analyses sensorielles ont été sous-traitées à la Maison de l'Alimentation de Montfavet. L'étude sur la structure cellulaire du péricarpe a été réalisée par l'unité de recherche Biopolymères, Interactions, Assemblages de l'INRA de Nantes.

#### a/ Mesures physiques

A chaque récolte, le **poids** du fruit (FW), la couleur (L, a, b), la fermeté (FIRd et FIRp) et l'élasticité totale (ELA) sont mesurés fruit à fruit.

La **couleur** est évaluée à l'aide d'un chromamètre Minolta CM-1000R (Minolta, Ramsey, N.J.), selon le système CIE L\*a\*b (luminosité/échelle vert-rouge/échelle bleu-jaune).

La **fermeté** du fruit est mesurée à l'aide du DUROFEL® (FIRd) (Planton, 1991) et d'un pénétromètre, le PENELAUP® (FIRp) (Abbal and Planton, 1990). Pour FIRd, une sonde amovible est appliquée à la surface du fruit et le déplacement de cette sonde est mesuré. Deux mesures sont effectuées sur deux faces opposées du fruit et la moyenne des deux valeurs est utilisée. Pour FIRp et ELA, le fruit est comprimé entre deux plaques horizontales, la force appliquée correspondant à celle nécessaire pour déformer le fruit de 3% de son diamètre initial. FIRp (en kiloPascal) correspond à la force par unité de surface nécessaire pour déformer le fruit et ELA (en Newton par mètre) mesure le niveau de déformation du fruit après compression. FIRd, FIRp and ELA ne sont pas mesurables pour la lignée parentale Cervil car les fruits sont trop petits et les mesures obtenues ne sont pas fiables.

Une coupe transversale du fruit permet de déterminer le nombre de loge.

#### b/ Mesures chimiques

Les mesures chimiques sont effectuées à partir d'une poudre, issue du broyage de 7 fruits dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille mécanique PM-400 Ball Grinder (Retsch GmbH, Haan, Allemagne). Les poudres sont conservées à - 80°C.

L'**acidité titrable** (TA) est obtenue par titration d'une aliquote de 5 g de poudre par de la soude 0,1 N jusqu'à pH 8,1 à l'aide d'un pHmètre (METROHM Combitrator, Suisse). Les résultats sont exprimés en méq pour 100g de matière fraîche.

La **teneur en solides solubles** (SSC) est évaluée à partir de l'indice réfractométrique qui est déterminé à l'aide d'un réfractomètre digital (ATAGO, PR-101) sur la poudre. Il représente le pourcentage de matière sèche soluble présente dans le jus et est en relation étroite avec la teneur en sucres. Les concentrations sont exprimées en °Brix à 20°C.

La **teneur en sucres** (SUC) est calculée après dosage par méthode enzymatique des deux sucres présents dans le fruit de tomate: le glucose et le fructose. Après homogénéisation d'une aliquote de 10 g de poudre avec 40 ml d'eau distillée, l'extrait est centrifugé 15 min à 5000 tr/min à 5°C. Le surnageant est filtré sur étamine (toile de nylon finement perforée), de nouveau centrifugé pendant 10 min à 10000 tr/min à 5°C et dosé à l'aide du coffret enzymatique D-glucose/D-fructose (Roche-Diagnostic, Mannheim, Allemagne), et d'un analyseur séquentiel (HITACHI 704). Les résultats sont exprimés en g pour 100g de matière fraîche.

#### c/ Dosage du dégagement d'éthylène

Le dosage du dégagement d'éthylène est réalisé en plaçant un fruit dans un bocal de volume connu pendant 1h30 (Chambroy *et al.*, 1995). L'éthylène émis à 23°C (nmol.kg.h-1) est dosé par chromatographie en phase gazeuse (IGC 121 FL) munie d'un détecteur à ionisation de flamme. Un étalon externe (10 ppm dans N<sub>2</sub>) permet de calculer la production d'éthylène qui est exprimée en nmole par kilogramme de fruit et par heure.

d/ Analyses sensorielles

Les fruits sont récoltés le matin de la journée de dégustation, des lots de fruits homogènes sont constitués et conservés à 20°C dans une pièce climatisée. Le panel de juge est composé de 15 sujets, entraînés pour évaluer de façon quantitative les attributs permettant de décrire le profil sensoriel du fruit de tomate. Ces sujets ont été sélectionnés selon un protocole issu des normes françaises ISO8586-1, AFNOR V09-003. Pour chaque génotype, les fruits sont dégustés deux fois par chaque juge, ce qui représente un total de 30 notes. Quinze séances ont eu lieu dans un laboratoire d'analyse sensorielle (AFNOR norm V09-105), deux fois par semaine et huit fruits par juge sont évalués à chaque séance. Les attributs choisis pour décrire la texture du fruit sont la fermeté, la farinosité, la jutosité et la peau gênante. Ces descripteurs sont notés selon une échelle continue allant de 0 à 10.

e/ Macroscopie et morphologie du fruit

La structure interne du fruit est évaluée sur cinq fruits par génotype. Une coupe transversale de 0,5 cm d'épaisseur est prélevée dans la partie équatoriale de chaque tomate. Le gel et les graines contenus dans les loges sont aspirés à l'aide d'une pompe à vide. La coupe est placée sur un support noir et un appareil photo CCD permet l'acquisition d'une image d'une résolution de 768x574 pixels. Trois types de calibration sont utilisés afin de conserver la surface minimale par rapport à la taille du fruit: La calibration 0 correspond à une prise de vue de 51,48 mm de côté, calibration 1 pour 86,16 mm et calibration 2 pour 130,20 mm. Un programme informatique développé par François Duprat à l'INRA de Montfavet a été utilisé pour automatiser la mesure du nombre de loge (LONB), du pourcentage de la surface des loges (%LO) et l'épaisseur relative du péricarpe (PERI) par rapport à la surface totale de la coupe transversale de tomate.

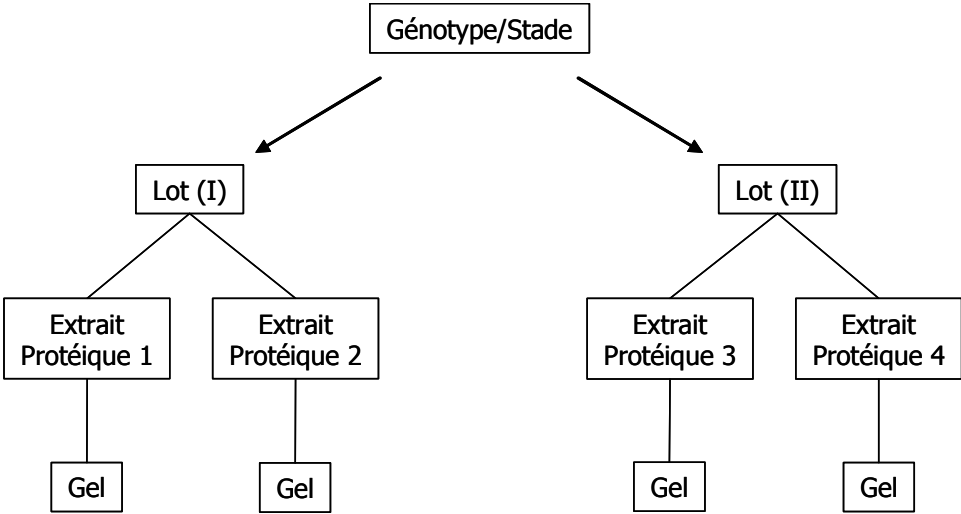
f/ Macroscopie et structure cellulaire du péricarpe

Huit fruits de tomate sont analysés et trois échantillons de péricarpe sont prélevés dans la partie équatoriale du fruit à l'aide d'un emporte-pièce. Des coupes de 200 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome à lame vibrante (Microm HM 650 V). L'acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une camera et d'un objectif photographique comme décrit par Devaux et al. (2005).

Dans le cas des images acquises dans ce travail, les cellules ne peuvent pas être facilement identifiées individuellement afin de mesurer leur taille. Une analyse de texture dite "visuelle" a donc été appliquée afin de quantifier les variations globales de niveaux de gris dans l'image dues à la présence des cellules. Le principe est basé sur le fait que lorsque les cellules sont petites, plus de variations sont observées que lorsque les cellules sont grandes. Plus précisément, la méthode de "granulométrie par morphologie mathématique" a permis d'extraire des "courbes granulométriques" comparables à un tamisage de l'image (Soille, 2003). Appliquée à des images en niveau de gris, ces courbes contiennent des informations à la fois sur la taille et le niveau de gris des objets. Dans ce travail, l'analyse



**Figure II.4: Plan d'expérience utilisé pour les comparaisons réalisées pour les études du protéome.** Pour chaque génotype à chaque stade de développement, deux échantillons biologiques ont été utilisés, ci-dessous (I) et (II) et deux extractions de protéines par échantillon ont été réalisées.



granulométrique a été appliquée de manière à caractériser l'allongement des cellules perpendiculairement à la cuticule.

### II.3. Etude du protéome

Ces analyses ont été effectuées à l'UGAFL de l'INRA d'Avignon. Le séquençage des protéines en LC-MS/MS a été effectué en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'UMR de Génétique Végétale de Gif-sur-Yvette.

#### a/ Matériel végétal

L'étude du protéome a été réalisée à partir d'extraits de protéines totales de péricarpe de fruit de tomate avec épiderme. Les génotypes Lx et Bx ont été comparés aux lignées parentales respectives, Levovil et VILB. Deux stades de développement ont été étudiés: 14 jours après anthèse (14JAA) c'est-à-dire pendant la phase d'élongation cellulaire et à maturité. Pour chaque génotype à chaque stade de développement, deux lots de 25 fruits ont été récoltés sur 6 plantes, répartis du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> bouquet. Les péricarpes ont été isolés et congelés à l'azote liquide, stockés à -80°C. Pour les fruits à maturité, seuls deux quartiers opposés ont été conservés. Chaque lot a été broyé dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille mécanique PM-400 Ball Grinder (Retsch GmbH, Haan, Allemagne), 250 rpm, 3 minutes. Les poudres obtenues sont conservées à -80°C. Ces poudres ont également été utilisées pour effectuer les mêmes comparaisons au niveau du transcriptome par puces à ADN.

#### b/ Extraction des protéines

Pour chaque lot de fruits, deux extractions protéiques indépendantes ont été réalisées (Figure II.4). La méthode d'extraction au phénol utilisée (Faurobert *et al.*, 2006) est particulièrement recommandée pour travailler sur des organes complexes comme les fruits (Saravanan and Rose, 2004) car elle permet d'éliminer les substances telles que les acides nucléiques, les polysaccharides et les résidus de paroi. Les protéines sont extraites en deux temps, à partir d'un tampon d'extraction Tris-EDTA contenant du  $\beta$ -mercaptoethanol puis spécifiquement solubilisée dans du phénol. Une étape de précipitation à l'acétate d'ammonium permet de récupérer un culot d'extrait protéique qui sera rincé successivement à l'eau et à l'éthanol, séché sous vide et resuspendu dans un tampon à base d'urée. Les extraits protéiques sont dosés selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les protocoles sont détaillés en Annexe 2.

#### c/ Electrophorèse bi-dimensionnelle (E2D)

Pour chaque lot de fruits, un gel est réalisé par extrait protéique (Figure II.4). Les protéines sont tout d'abord séparées selon leur charge électrique après la réhydratation passive à température ambiante

des strips de 24 cm pH 4-7 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suède), avec 100 µg de protéines resuspendues, 9 µl de tampon IPG pH 4-7 et du tampon de réhydratation (Urée 8 M, CHAPS 2% w/v, DTT 0.3% w/v, pharmalytes 2% v/v, pH 3-10) ajusté pour un volume final de 450 µl. La focalisation isoélectrique est réalisée à 12°C dans une cuve Pharmacia Biotech Multiphor II (Amersham Bioscience, Uppsala, Suède) en appliquant le programme suivant: 2 h à 150 V, 2 h à 400 V, une augmentation progressive du voltage de 400 V à 3500 V échelonnée sur 2 h, 18 h à 3500 V. Après la migration, les strips sont incubés dans un tampon d'équilibration sous agitation douce: 20 min dans la solution A (Urée 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glycérol 30% w/v, SDS 2% w/v, DTT 2% w/v) suivies de 20 min dans la solution B (Urée 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glycérol 30% w/v, SDS 2% w/v, iodoacétamine 2,5 % w/v). L'électrophorèse SDS-PAGE (45 min à 80 V, 15 h à 120 V) est réalisée en gel d'acrylamide 13% dans une cuve Hoefer ISO-Dalt Anderson-Electrophoresis System (Amersham Bioscience, Uppsala, Suède) contenant 19 l de tampon (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glycine 192 mM, SDS 1% w/v). Les gels d'acrylamide obtenus sont colorés au nitrate d'argent selon le protocole décrit par Heukeshoven and Dernick (1986) pour l'analyse d'image.

Pour le prélèvement et séquençage des spots en spectrométrie de masse, les gels sont chargés avec 600 µg d'extrait protéique et colorés au bleu colloïdal de Coomassie (Neuhoff *et al.*, 1988).

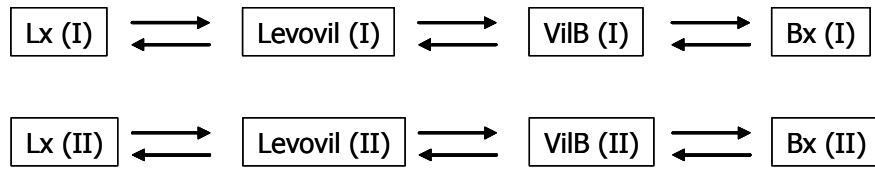
#### d/ Acquisition et analyse d'image

Le scanner ImageScanner (Amersham Bioscience, Uppsala, Suède) et le logiciel Labscan version 5.0 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suède) ont été utilisés pour l'acquisition d'image selon le mode transparent avec une résolution de 300 dpi. L'analyse d'image est réalisée à l'aide du logiciel ImageMaster 2D Platinum version 5.0 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suède). La quantification des spots est obtenue en utilisant le volume du spot déterminé d'après l'aire et l'intensité de chaque pixel de la surface. Les volumes sont pondérés en prenant en compte l'intensité de coloration générale du gel. Le volume de chaque spot est exprimé en pourcentage du volume de l'ensemble des spots du gel. Pour chaque génotype à chaque stade, quatre gels différents sont obtenus: 2 échantillons biologiques et pour chacun 2 répétitions techniques. Afin de pouvoir comparer tous les génotypes et tous les stades de développement entre eux, nous avons fait correspondre l'ensemble des gels à un gel synthétique de référence.

Pour obtenir ce gel synthétique, un premier gel synthétique de niveau 1 est réalisé à partir des 4 gels disponibles pour un génotype à un stade donné, en ne conservant que les spots présents au moins sur trois des quatre répétitions. Huit gels synthétiques ont ainsi été construits pour tous les génotypes au deux stades étudiés. La réalisation d'un gel synthétique de niveau 1 regroupant tous les spots présents sur les 8 gels synthétiques nous a permis d'avoir un identifiant pour un spot donné commun à l'ensemble des gels de l'étude et a servi de base aux comparaisons de génotypes et/ou de stade de développement.

**Figure II.5: Plan d'expérience utilisé pour les comparaisons réalisées pour les études d'expression par puces à ADN.**

Pour chaque comparaison à chaque stade de développement, deux échantillons biologiques ont été utilisés, ci-dessous (I) et (II) et un Dye swap a été réalisé par échantillon.



e/ Identification des protéines par spectrométrie de masse

L'identification des protéines est obtenue par LC-MS/MS selon le protocole de la plateforme de protéomique de l'UMR de Génétique Végétale de Gif-sur-Yvette.

Cette technique permet de mesurer la masse des peptides après hydrolyse enzymatique des protéines (MS simple) et fragmenter ces mêmes peptides (spectres MS-MS) pour obtenir la séquence de ces peptides. Après hydrolyse par la trypsine, les peptides sont préalablement séparés par l'intermédiaire d'une chaîne chromatographique liquide haute performance (HPLC) couplée au spectromètre de masse.

Le logiciel Bioworks<sup>TM</sup> version 3.1 a été utilisé pour l'identification des protéines à partir de la base de données du TIGR (LeGI, version 10.1, release october 2004). Les données de sortie sont triées sur la base de: la nature tryptique du peptide, un Xcorr respectivement supérieur à 1,5, 2,2 et 3,3 pour les peptides mono-, di-, ou tri-chargés (Eng *et al.*, 1994).

f/ Recherche de signaux d'adressage

Les logiciels TargetP version 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000), Psort Prediction version november 24, 1999 (<http://psort.hgc.jp/form.html>) et SecretomeP version 1.0b (Bendtsen *et al.*, 2004) ont été utilisés pour l'identification de peptides signaux dans les séquences protéiques.

## II.4. Etude du transcriptome

a/ Puces à ADN

Ces analyses ont été effectuées à l'UGAFL de l'INRA d'Avignon.

Les mêmes échantillons de fruits (mêmes génotypes aux mêmes stades de développement) que ceux choisis pour l'analyse du protéome ont été analysés au niveau du transcriptome en utilisant les puces à ADN Tom1 (Alba *et al.*, 2004), fournies par le laboratoire de J. Giovannoni à l'Université de Cornell, Etats-Unis. Le plan d'expérience choisi correspond au modèle de Dye swap répliqué (Churchill, 2002) c'est-à-dire que, pour chaque comparaison, deux échantillons biologiques ont été utilisés et une répétition par inversion de fluorochrome a été réalisé par échantillon biologique (Figure II.5). Ce plan d'expérience a été appliqué indépendamment aux stades de développement 14JAA et maturité.

### ✓ **Extraction des ARN totaux**

L'extraction d'ARN a été doublé pour les stades 14 JAA et quadruplé pour les stades mature afin d'obtenir la quantité suffisantes d'ARN totaux pour l'hybridation des puces à ADN. Toutes les solutions sont traitées au DEPC (diethylpyrocarbonate).

Un mélange composé de 5 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 25 mM, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, SDS 1%) et 5 ml de phénol est placé 10 min à 80°C. Cinq grammes de poudre congelée y sont

ensuite ajoutés, mélangés et placés à nouveau dans le bain à 80°C pendant 1 min. Après ajout de 5ml de chloroforme/acide isoamylique (v:v 24/1) et centrifugation pendant 15 min à 9000g à 4°C, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube contenant 5 ml de phénol/ chloroforme/acide isoamylique (25:24:1). Le tout est à nouveau centrifugé 15 min à 9000g à 4°C, la phase aqueuse est prélevée, ajoutée dans 5 ml de chloroforme/acide isoamylique (v:v 24/1) et centrifugée. La phase aqueuse est récupérée, mélangée à 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et un volume d'isopropanol. Après 2 h à -20°C, entre deux centrifugations de 40 min à 9000g à 4°C, le culot d'acides nucléiques est lavé avec 2 ml d'éthanol 70%. Après avoir été laissé à sécher pendant environ 1 h, le culot est resuspendu dans 3 ml d'eau ultra pure DEPC, réparti dans 3 tubes contenant 250 µl de chlorure de lithium 10 M et placé à 4°C une nuit. Un culot d'ARN totaux est obtenu après 40 min de centrifugation à 9000g à 4°C. De la même façon que précédemment, le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché, resuspendu dans 30 à 100 µl d'eau ultra pure DEPC. Le contenu des trois tubes est rassemblé et les ARN totaux sont dosés et stockés à -20°C.

### ✓ Synthèse d'ADNc

La préparation des ARN polyadénylés est réalisée à partir de 500 µg d'ARN totaux à l'aide du kit Qiagen Oligotex<sup>®</sup> mRNA Midi (Qiagen, Valencia CA, Etats-Unis) selon le protocole fourni par le fabricant. Pour la transcription reverse, 1 µg d'ARN polyA, 1 ng d'ARNm de luciférase Promega, 2 µg d'oligo(dT)21 et 2 µg de Random Hexamer Promega sont mélangés et placés 3 min à 65°C puis 10 min à température ambiante. Vingt µl contenant du tampon reverse transcriptase 2,5X, DTT 25 mM, 15 U de RNAsine, mélange AAdNTP 2,5X (aminoallyl-dUTP 4 mM, dATP, dCTP, dGTP 10 mM chacun, dTTP 6 mM) et 400 U Superscript II (Invitrogen, Carlsbad CA, Etats-Unis) sont ajoutés et incubés à 37°C pendant 2 h pour la synthèse du brin d'ADNc. Après ajout de 200 U de Superscript II (Invitrogen, Carlsbad CA, Etats-Unis), la synthèse se termine à 37°C pendant 2 h. La dégradation du brin d'ARN est obtenue par le traitement suivant: ajout de 20 µl de NaOH 1M, incubation 10 min à 70°C, 5 min à température ambiante et ajout de 20 µl de HCl 1M. Ensuite, la précipitation des brins d'ADN est réalisée en ajoutant de l'acétate de sodium 3M, 40 µg de glycogène et de l'éthanol pur. Après 1 h à -20°C et 20 min de centrifugation à 13500 rpm à 4°C, le culot est rincé avec de l'éthanol 70%. L'ensemble est centrifugé 20 min à 13500 rpm à 4°C et les culots sont séchés à température ambiante environ 20 min.

### ✓ Préparation des sondes d'ADNc marqués

Les culots d'ADNc sont resuspendus dans 10 µl de tampon carbonate de sodium 0,1 M pH 9,3, incubés 10 min à 37°C. La réaction de marquage des ADNc est réalisée après ajout des fluorochromes Cy3 et Cy5 préalablement dissous dans 10 µl de DMSO (dimethyl sulfoxide), en plaçant le mélange à 25°C pendant 1 h à l'obscurité. Le kit Qiagen QIAquick<sup>®</sup> PCR purification (Qiagen, Valencia CA, Etats-Unis) est utilisé selon le protocole fournis par le fabricant. Un spectre d'absorption de 200 nm à 700 nm

permet de doser les sondes marquées: 260 nm pour l'ADN, 550 nm pour le fluorochrome Cy3 qui émet dans le vert et 650 nm pour le fluorochrome Cy5 qui émet dans le rouge. Les ADNc marqués sont ensuite concentrés dans un volume final d'environ 10 µl à l'aide de colonne Microcon YM-30 (Millipore, Billerica MA, Etats-Unis).

#### ✓ **Hybridation des lames et acquisition d'image**

Les lames sont préhybridées 2 h à 42°C dans 50 ml de tampon formamide 1:1 v/v contenant du SSC 5X, SDS 0,2%, solution Denhart 5X et 0,5 µg d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 min à 100°C. Après deux lavages successifs dans de l'eau et de l'isopropanol, les lames sont séchées par centrifugation 1 min à 1500 rpm. Les ADNc marqués en Cy3 et en Cy5 sont mélangés avec la solution d'hybridation (formamide, SSC 5X, SDS 0,2%, solution Denhart 5X et 7 ng d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 min à 100°C). La chambre d'hybridation autocollante, Gene Frame® AB-1044 (ABgene, Epsom, Royaume-Uni), est positionnée sur la lame et les 75 µl de mélange d'hybridation dénaturé 1 min à 100°C y sont déposés et recouverts avec une lamelle en plastique. La lame est déposée dans une cuve en verre en atmosphère humide, scellée par un film en aluminium autocollant puis la cuve est placée dans un four à hybridation à 42°C durant la nuit. Les lames sont ensuite rincées dans 4 bains successifs à 42°C: 5 min SSC 1X/SDS 0,1%, 5 min SSC 0,1X/SDS 0,1%, 5 min SSC 1X et un aller-retour SDS 0,1%. Les lames sont séchées par centrifugation 1 min à 1500 rpm. Les puces à ADN hybridées et séchées sont conservées dans un tube à l'abri de la lumière.

L'acquisition d'image est réalisée avec le scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City CA, Etats-Unis) associé au logiciel GenePix Pro 3, mis à disposition par l'UMR Sciences Pour l'Oenologie de l'INRA de Montpellier. Les photomultiplicateurs (PMT) sont ajustés de façon à ce que (i) le ratio  $R_p$  PMT635/PMT532 soit proche de 1 pour quelques spots jaunes pris au hasard sur l'ensemble de la lame; (ii) les cumuls d'intensité de chaque fluorochrome sur l'ensemble de la lame soient comparables, sans atteindre la saturation. L'intensité de chaque spot et du bruit de fonds correspondant est quantifiée à 635 nm pour le fluorochrome Cy5 et à 532 nm pour le fluorochrome Cy3.

#### ✓ **Analyse d'image et traitement des données**

L'analyse d'image est réalisée à l'aide du logiciel GenePix Pro version 6.0. Une première analyse des images est faite visuellement afin de vérifier la qualité des signaux de chaque spot et leur attribuer une valeur de fiabilité. Cette valeur appelée poids du spot est de 0 pour les spots présentant un signal net, de -50 pour les spots moins réguliers, désignés manuellement, et de -100 pour les spots rejetés automatiquement par le logiciel d'après l'analyse des intensités des signaux. Un fichier contenant l'ensemble des données relatives à chaque spot est ensuite obtenu. Dans notre cas, chaque comparaison d'échantillons est réalisée avec 4 lames, nous avons donc 4 fichiers de sortie.

L'analyse des images est poursuivie grâce au logiciel R version 1.7.1 et du package Limma (Smyth, 2005; Smyth *et al.*, 2005). Une première étape de visualisation et d'exploration des données est réalisée à l'aide de différentes représentations graphiques permettant de juger de la qualité de l'hybridation de chaque lame. Cette étude descriptive des données brutes permet notamment de mettre en relation les intensités des signaux et du bruit de fonds, de voir si l'intensité du bruit de fonds est homogène sur l'ensemble de la lame et de détecter si un des deux fluorochromes est en excès. Le traitement des données est ensuite réalisé à partir des médianes des pixels du signal et du bruit de fonds pour les deux fluorochromes et une transformation logarithmique en base 2 est utilisée. La normalisation non linéaire des données est appliquée sans prendre en compte les valeurs de bruit de fonds. De plus, sur la base du poids des spots attribué précédemment, les spots identifiés -100 et ceux -50 dont l'intensité du signal est inférieure à deux fois le signal de bruit de fonds ne sont pas pris en compte. La normalisation utilise la régression locale de type LOWESS, locally weighted scatterplot smoothing, (Yang *et al.*, 2001) avec un span de 0,3 (pour chaque spot, 30% des données de la lame sont utilisées pour la régression locale) et selon la méthode print-tip prenant en compte les variations associées aux têtes du robot permettant de déposer les clones sur la lame. Une première normalisation lame à lame, normalisation within, est suivie d'une normalisation interlame sur les quatre lames de chaque comparaison, normalisation between. Chaque étape de la normalisation est contrôlée graphiquement (graphe MA, boxplot, densité des intensités des fluorochromes).

Le test *t* de Student a été appliqué pour rechercher les gènes présentant des différentiels d'expression significatifs ( $P < 0,005$ ) et les *P* value ajustées fdr (false discovery rate) ont également été calculées (Aubert *et al.*, 2004; Storey, 2002).

#### b/ RT-PCR quantitative

Ces analyses ont été effectuées à l'UMR SQPOV de l'INRA d'Avignon.

#### ✓ **Matériel végétal**

Les études d'expression des gènes candidats ont été réalisées par RT-PCR quantitative sur une cinétique de développement du fruit sur les lignées parentales Cervil, Levovil, VilB et les génotypes NIL-L9A, NIL-B9A, Lx et Bx. La cinétique de développement comprend sept stades: 7 jours après anthèse (7 JAA), 14 JAA, vert immature (21 JAA), vert mature, tournant, maturité et sur-maturité (7 jours après maturité). Pour chaque génotype à chaque stade de développement, 20 fruits répartis du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> bouquet ont été récoltés sur 6 plantes. Les péricarpes ont été isolés, congelés à l'azote liquide et stockés à -80°C. Chaque lot de fruit a été broyé dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille mécanique PM-400 Ball Grinder (Retsch GmbH, Haan, Allemagne) à 250 rpm pendant 3 minutes. Les poudres obtenues sont conservées à -80°C.



## Tableau II.2: Liste des séquences des amorces utilisées pour les études d'expression des gènes candidats en PCR quantitative

Les séquences des unigènes codés U et TC sont respectivement issues des bases de données du SOL Genomic Network (SGN) et du Tomato Gene Index (TIGR)

Code interne	Unigène SGN	Unigène TIGR	Fonction	Séquences amorces (5' – 3')	Taille (pb)	Température d'hybridation (°C)
/	U214567	<b>TC162599</b>	Similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	F: TGGCTTGGATTTAATTGGA R: GTAGCAATCAAACCTTGCTG	125	56
/	U238622	<b>AW644228</b>	Alpha-mannosidase	F1: GCGCTTGATCAATGATGATAG R1: GTTGAGTCTGTGGCCTAAA F2: ACATTTGAAGGAATTACAGTT R2: AAAAGTAACTTCCTTGACC	143	60
PG6	U312703	<b>TC153944</b>	Polygalacturonase 2A precursor	F1: AGATCTTCAATATATAGCAGA R1: AAAAGTTTGACGATTGTAC F2: AGATCTTCAATATATAGCAGA R2: GGATTGAAGTTTTAATAAG	148	52
Glucosidase 24 /		<b>NP000369</b>	Glucan 1-3 beta-glucosidase	F: AAGCATTTCGGACTATATTC R: GAAGCTGGAATGTTATTTCAG	143	50
Xylosidase 4	U329313	<b>TC158851</b>	Beta-xylosidase, LEXYL1	F: GAAAGTTGCATTAGGACCAC R: TTTTGAGAGAAATATGTTGAGG	100	58
Xylosidase 1 /		<b>TC116999</b>	Beta-D-xylosidase, LEXYL2	F: TAAAGAAATCCTCATGGTCTCT R: GTTACAATTGCCTCAACATATT	100	54
XET 4	U213455	<b>TC164317</b>	Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	F: CCTTCTCCTGAATGCAAAC R: GTGTAATTATTTGAGGAGCC	145	58
XET 4 bis	U312870	<b>TC153905</b>	Xyloglucan endo-transglucosylase-hydrolase XTH3	F: CCCTTAATTTCTGAATCATT R: CCCTTAATTTCTGAATCATT	112	55
XET 6	U312869	<b>TC153904</b>	Xyloglucan endo-transglucosylase-hydrolase XTH3	F: CACTGATTCAAAGCGATT R: TTTGTACCCATCAGAAGAAGA	140	54
/	/	<b>TC161872</b>	Annexine P34	F: GAGTTGGCATGTGTTTGA R: AGAGAACATTTTTAGACAGCA	112	50
/	U216469	<b>TC163406</b>	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6	F: CCCAAAACAATTGAGG R: GCTATGTTTTACGCTGTTT	137	53
/	/	<b>TC153761</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog	F: GAATGTCAATCACGTGCT R: CCACACTAGTTACCTCCATAA	142	56
Aquaporine 1 /		<b>TC115715</b>	Aquaporine	F: TGTCTACCACAGTACATT R: AAGCTCGATGCACGTTACATT	154	50
Aquaporine 5	U315821	<b>TC123718</b>	Aquaporine	F: GCTGCAGCTATTAAGGC R: ACAGATCCAAGGCTAAGATAA	182	50

### ✓ **Extraction d'ARN**

Pour chaque échantillon, 10 g de poudre sont mélangés avec 14 ml de tampon d'extraction (Tris 0,2 M, acide borique 0,2 M, EDTA 10mM pH 7, SDS 0,5%) et 1,4 ml de 2-mercaptoéthanol. Le mélange est centrifugé 20 min, à 10000 rpm et à 15°C. La phase aqueuse est récupérée, 7 ml de phénol/chloroforme v/v sont ajoutés et le mélange est agité et centrifugé 20 min, à 10000 rpm et à 15°C. La phase aqueuse est à nouveau prélevée, mélangée à 7 ml de chloroforme et centrifugé 20 min, à 10000 rpm et à 15°C. La précipitation des acides nucléiques totaux est réalisée en ajoutant à la phase aqueuse 3 volumes d'eau stérile, 1,6 volumes de 2-butoxyéthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 6. Après agitation, le mélange est placé dans de la glace pendant 2 h puis centrifugé 30 min, à 5000 rpm et à 4°C. Le surnageant est prélevé, mélangé à 0,6 volume de 2-butoxyéthanol, agité et laissé à précipiter une nuit à 4°C. Après centrifugation 30 min, à 5000 rpm et à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot mis à sécher pendant 1 h. Le culot est resuspendu dans 1 ml d'eau stérile, la précipitation des ARN totaux est obtenu en répartissant 500 µl dans 2 tubes auxquels sont ajoutés 500 µl d'acétate de sodium 6 M, l'ensemble étant laissé 2,5 h à température ambiante puis centrifugé 10 min, à 13000 rpm à 20°C. Le surnageant est mélangé avec 1ml d'éthanol 75% et conservé une nuit à -20°C. Après 10 min de centrifugation à 13000 rpm à 20°C, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 200 µl d'acétate de sodium 3 M et laissé 30 min dans de la glace. Une nouvelle centrifugation de 10 min, 13000 rpm à 20°C est réalisée. Le culot est rincé par 2 lavages successifs: 200 µl d'éthanol, 20 µl d'acétate de sodium 3M puis 200 µl d'éthanol pur. Les culots d'ARN totaux sont repris dans 25 à 50 µl d'eau ultra pure autoclavée, selon leur taille. Le contenu des deux tubes est rassemblé et les ARN totaux sont dosés et stockés à -80°C.

### ✓ **Synthèse du brin d'ADNc**

La synthèse du brin d'ADN complémentaire est réalisée sur les ARN totaux traités par une DNase. Ce traitement est réalisé à partir de 25 µg d'ARN totaux auxquels sont ajoutés 1 µl de DNase (Roche-Diagnostic, Mannheim, Allemagne), 2,5 µl de tampon DNase 10X (acétate de sodium 3M pH 5, sulfate de magnésium 1M pH 5). Le volume final est ajusté à 25 µl avec de l'eau et le mélange est incubé 30 minutes à 37°C puis 5 min à 65°C dans un thermocycleur.

Un µg d'ARN traité DNase est mélangé avec 1 µg de Random Primer P(dN)<sub>6</sub> (Roche-Diagnostic, Mannheim, Allemagne) et 2 µl d'eau, est dénaturé 10 min à 65°C puis refroidis immédiatement. La transcription reverse se déroule ensuite dans un volume final de 40 µl en ajoutant 31 µl de mélange réactionnel contenant 10 U de Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche-Diagnostic, Mannheim, Allemagne), DTT 10mM, dNTPs 1mM, tampon Transcriptor RTase 1X selon les conditions suivantes: 10 min à 30°C, 45 min à 42°C et 5 min à 75°C.

**Tableau II.3: Microsatellites polymorphes utilisés pour la cartographie fine des régions d'intérêt des chromosomes 4 et 9.**

Code Interne	Origine	Séquences des amorces (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Produit PCR (en pb)
<b>Chromosome 4</b>				
MS02	INRA-UGAFL	F : GAGATGATTCAATCAGACAACT R : CATATTTAACTGCTACAAGGCT	56	260-280
MS22	INRA-UGAFL	F : non disponible R : non disponible	50	90-120
MS30	STM3016, SCRI	F : TCAGAACACCGAATGGAAAAC R : GCTCCAACCTACTGGTCAAAT	56	150
MS49	ssr188, SGN	F : TGCAGTGAGTCTCGATTTGC R : GGTCTCATTGCAGATAGGGC	50	150
MS80	ssr86, SGN	F : AGGGCAACAAATCCCTCTTT R : GGAGACGAGGCTGCTTACAC	60	210
MS81	ssr94, SGN	F : AATGAAGAACCATTCCGCAC R : ACATGAGCCCAATGAACCTC	57	265
MS82	ssr450, SGN	F : AATCAGATCCTTGCCCTTGA R : AGCTGAGAAAGAGCAGCCAT	55	190
MS89	ssr310, SGN	F : GCGATGAGGATGACATTGAG R : TTTACAGGCTGTCGCTTCT	50	150
MS90	ssr555, SGN	F : TTGATATTAACCATGGCAGCAG R : TTGATGGGATTGCACAGAAA	50	220
<b>Chromosome 9</b>				
MS57	ssr19, SGN	F : CCGTTACCTTGGTCCATCAC R : GGGAGATGCCACATCACATA	54	200
MS83	ssr70, SGN	F : TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC R : GGAGTGCGCAGAGGATAGAG	55	120
MS91	ssr69, SGN	F : TTGGCTGGATTATTCCTGTTG R : GCATTTGATAGAAGGCCA GC	55	130

### ✓ PCR quantitative

Les échantillons d'ADNc obtenus précédemment sont dilués au 1/5<sup>ème</sup>. La PCR quantitative est réalisée à partir de 5 µl de cet ADNc à l'aide du Kit QuantiTect™ SYBR® Green I Qiagen, Valencia CA, Etats-Unis) et du système LightCycler® version 1 (Roche-Diagnostic, Mannheim, Allemagne). Les séquences des amorces définies dans la partie 3' non codantes, utilisées pour chacun des gènes étudiés, sont présentées dans le tableau II.2. Le programme utilisé pour la PCR en temps réel est composé de 6 min à 95°C, de 50 cycles de 15 s à 95°C, 15 s à la température d'hybridation des amorces et 5 s à 72°C.

La fluorescence est mesurée à chaque étape d'élongation et les données obtenues sont analysées avec le logiciel LightCycler Analysis Software version 3.5 (Roche-Diagnostic, Mannheim, Allemagne). Le cycle seuil (Ct) est déterminé pour chacune des réactions et correspond au nombre de cycles pour lequel la dérivée seconde, calculée dans la phase logarithmique de la courbe d'amplification, atteint son maximum. L'efficacité de la réaction d'amplification est vérifiée pour chacun des gènes à partir d'une gamme étalon réalisée sur une série de dilution d'un pool d'ARN (dilué aux 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80). L'obtention de valeurs de pentes comprises entre 3,3 et 3,5 correspond à 75 à 100% d'efficacité de la réaction. La quantité relative de transcripts amplifiés dans un échantillon est calculé à partir de cette gamme étalon et rapportée à la quantité d'ARN ribosomique 25S de l'échantillon (Accession Genbank X13557). La reproductibilité de l'amplification est validée par la réalisation de trois répétitions par réaction. Une analyse de la courbe de fusion permet de vérifier la spécificité du produit d'amplification.

### II.5. Génotypage

L'extraction d'ADN est réalisée soit en tube individuel à partir de 2 à 4 g de jeune feuille d'après le protocole de Bernatzky and Tanksley (1986) soit en microplaque à partir d'environ 50 mg de jeune feuille (Annexe 2). La macroextraction est utilisée pour les petits effectifs ou dans le cas de génotypage nécessitant de l'ADN de bonne qualité en grosse quantité. Les microextractions permettent de gérer un grand nombre d'individus mais le rendement et la qualité de l'ADN obtenu n'est adaptée que pour les marqueurs utilisant la PCR.

Pour l'étape de densification en marqueurs des régions d'intérêt localisées sur les chromosomes 4 et 9, trois types de marqueurs ont été génotypés: RFLP (Restriction Length Fragment Polymorphism), COS (Conserved Ortholog Sequence) et microsatellites (Tableau II.2). Le protocole utilisé pour les marqueurs RFLP et COS est celui décrit par Saliba-Colombani *et al.* (2000). Pour les marqueurs microsatellites, la PCR est réalisée à partir de 30ng d'ADN génomique selon les conditions d'amplification spécifiées dans le tableau II.3.

**Tableau II.4: Liste des marqueurs PCR spécifiques développés pour la cartographie de gènes candidats.**

Les unigènes dont le code commence par U sont issus du SGN et ceux commençant par TC proviennent du TIGR. La séquence des unigènes en gras a été utilisée pour la définition des amorces.

Code marqueur	Unigène SGN	Unigène TIGR	Fonction	Séquences amorces (5' – 3')	taille attendue (pb)	taille observée (pb)
z1098 PME 18	<b>U227174</b>	TC160782	Pectinesterase family protein	F: CACACAAAAGTCTTAGGCCA R: GGCTGCTGTATCTGCTGATA	545	2000
z1099 /	<b>U214567</b>	TC162599	Similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	F: GCTGTGCAAATGACATAGCACA R: TCCAGCTGACAAACAGCACCA	735	250 + 750 + 1000 Signaux très faibles
z1101 /	<b>U238622</b>	AW624228	Alpha-mannosidase	F: TGC GGGCTATGT CACA AAGA R: TCCCTCCCAT TAGAGTCAGT	473	1500
z1102 PG6	<b>U312703</b>	TC153944	Polygalacturonase 2A precursor	F: GCAACATCAAATTTCTGAATGTGGA R: GTGCAGTGTGGTGAACATGT	312	750
z1103 /	/	<b>TC154369</b>	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase precursor	F: ACGACTCTGCTGGTGATACT R: ACAACATCTGCTGGAGATGGT	250	250
z1235 /	<b>U319730</b>	TC161429	Endo-beta-1 4-glucanase putative	F: TAGCCTCTGCCTTCTTAGCT R: CCTTTATGGTTCAAGGAGCT	550	1000
z1104 Xylosidase 1	/	<b>TC154654</b>	Beta-D-xylosidase, LEXYL2	F: GTGAAGCTGCAAGACAAGGA R: GGACACCTTGACAAAATGAGATA	1244	1400
z1176 Xylosidase 4	<b>U329313</b>	TC158851	Beta-xylosidase, LEXYL1	F: GTCTAAATTCAGGGTGGACT R: CCAAGCTCATCATGTACTCA	1269	1400
z1097 XET4	<b>U213455</b>	TC164317	Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	F: TCCCCATACAAACGCGTTACA R: TCCCCCTGATATCCAGAACA	1155	1400
z1191 XET6	<b>U312870</b>	TC153905	Xyloglucan endo-transglucosylase-hydrolase XTH3	F: CCAAGTTTGATCAAGAATTCGACA R: CATGAATTGCTTGTGAAGTTGCA	831	800
z1192 /	<b>U312869</b>	TC153904	Xyloglucan endo-transglucosylase-hydrolase XTH3	F: CCTCCTTACTCTCACTTGA R: TGCGTTGTGGATTCCAAGTGA	322	250
z1100 /	<b>U216469</b>	TC163406	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6	F: ATTTGAGGTGTTGGGTATCGA R: CAGTATTCGCATTCTCTGGCA	365	400
z1105	/	<b>TC153761</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog (Protein E8)	F: GCCCTAGAGTTGAGGAGAGT R: GCAGAAGTTCCATCTAGGCCT	1062	1500
z1231 Aquaporine 5	<b>U315821</b>	TC113462	Aquaporine	F: CTCTGGTCTTCTACAGAGCT R: CCTTAATAGCTGCAGCTCTCA	718	900

Pour la cartographie fine, la sélection des recombinants a été réalisée à partir d'un marqueur PCR spécifique (ASC021) précédemment utilisé par Lecomte *et al.* (2004a) et de marqueurs microsatellites cités ci-dessus: MS02 et MS81 pour la région du chromosome 4 et MS91 et ASC021 pour celle du chromosome 9 (Figure V.2).

L'étude du protéome et du transcriptome ont permis d'identifier de nombreux gènes dont les fonctions pourraient être associées aux effets des QTL. Pour la cartographie d'une partie de ces gènes candidats, des marqueurs PCR spécifiques (Tableau II.4) ont été développés à partir des séquences des unigènes disponibles dans les bases de données du SOL Genomic Network, SGN (Mueller *et al.*, 2005a) et du Tomato Gene Index (TIGR). Les séquences des amorces de ces marqueurs sont détaillées dans le tableau II.3, la température d'hybridation utilisée est de 52°C.

### *II.6. Méthodes statistiques*

Le logiciel Mapmaker MAPMAKER/EXP version 3.0 (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1992) a été utilisé pour l'estimation des recombinaisons (Chapitre 3) et pour la construction des groupes de liaison correspondant aux chromosomes 4 et 9A dont les représentations graphiques ont été obtenues à l'aide du logiciel MapChart version 2.2 (Chapitre 5).

Les analyses de variances à un ou deux facteurs et les tests de comparaisons de moyennes (Test de Dunnett, Test de Duncan, Test *t* de Student) ont été réalisés avec les logiciels SAS (SAS Institute, 1988), Splus (Splus, 1993) ou R version 1.7.1. Les graphiques représentant les analyses en composantes principales (ACP) sont obtenus avec le logiciel R version 1.7.1 ou le logiciel Matlab (The Mathworks, France).

## **CHAPITRE III**

### **STABILITE DES EFFETS DES QTL**

---

## CHAPITRE 3 \_ STABILITE DES EFFETS DES QTL

---

Ce chapitre sous forme d'article présente l'étude de l'impact de différents facteurs sur l'expression des QTL. Cinq régions chromosomiques d'intérêt associées à la qualité organoleptique du fruit de tomate ont été choisies pour développer, par sélection assistée par marqueurs, des lignées quasi-isogéniques (QTL-NIL) dans trois fonds génétiques. L'évaluation phénotypique d'une population en cours de sélection (BC3S1) ainsi que des QTL-NIL (BC3S3) a permis d'étudier (i) la stabilité des effets individuels de QTL, (ii) la stabilité des effets dans trois générations (RIL, BC3S1 et BC3S3), trois fonds génétiques et deux années d'expérimentation (iii) les interactions épistatiques entre QTL.

L'article a été publié dans la revue *Theoretical and Applied Genetics* en 2006.



## Stability over Genetic Backgrounds, Generations and Years of QTLs for Organoleptic Quality in Tomato

J. Chaïb<sup>1</sup>, L. Lecomte<sup>1</sup>, M. Buret<sup>2</sup> & M. Causse<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint-Maurice, BP94, 84143 Montfavet Cedex, France; \*Author for correspondence (fax: +33 (0)4-32-72-27-02; email: Mathilde.Causse@avignon.inra.fr)

<sup>2</sup> INRA, UMR Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Domaine Saint-Paul, 84914 Avignon Cedex 9, France

### Abstract

The efficiency of marker-assisted backcross for the introgression of a QTL from a donor line into a recipient line depends on the stability of QTL expression. QTLs for six quality traits in tomato (fruit weight, firmness, locule number, soluble solid content, sugar content and titratable acidity) were studied in order to investigate their individual effect and their stability over years, generations and genetic backgrounds. Five chromosome regions carrying fruit quality QTLs were transferred following a marker-assisted backcross scheme from a cherry tomato line into three modern lines with larger fruits. Three sets of genotypes corresponding to three generations were compared: (1) a RIL population, which contained 50% of each parental genome, (2) three BC3S1 populations which segregated simultaneously for the five regions of interest but were almost fully homozygous for the recipient genome on the 8 chromosomes carrying no QTL and (3) three sets of QTL-NILs (BC3S3 lines) which differed from the recipient line only in one of the five regions. QTL detection was performed in each generation, in each genetic background and during two successive years for QTL-NILs. About half of the QTLs detected in QTL-NILs were detected in both years. Eight of the ten QTLs detected in RILs were recovered in the QTL-NILs with the genetic background used for the initial QTL mapping experiment, with the exception of two QTLs for fruit firmness. Several new QTLs were detected. In the two other genetic backgrounds, the number of QTLs in common with the RILs was lower, but several new QTLs were also detected in advanced generations.

**Key words:** fruit quality, quantitative trait locus (QTL), *Solanum lycopersicum*, genetic background, marker-assisted selection (MAS)

**Abbreviations:** Bgb – Vil B genetic background, Dgb – Vil D genetic background, EUG – eugenol, FW – fruit weight, Lgb – Levovil genetic background, LONB – locule number, MAS – marker-assisted selection, SSC – MYP – orthometoxyphenol, soluble solids content, SUC – sugar content, TA – titratable acidity

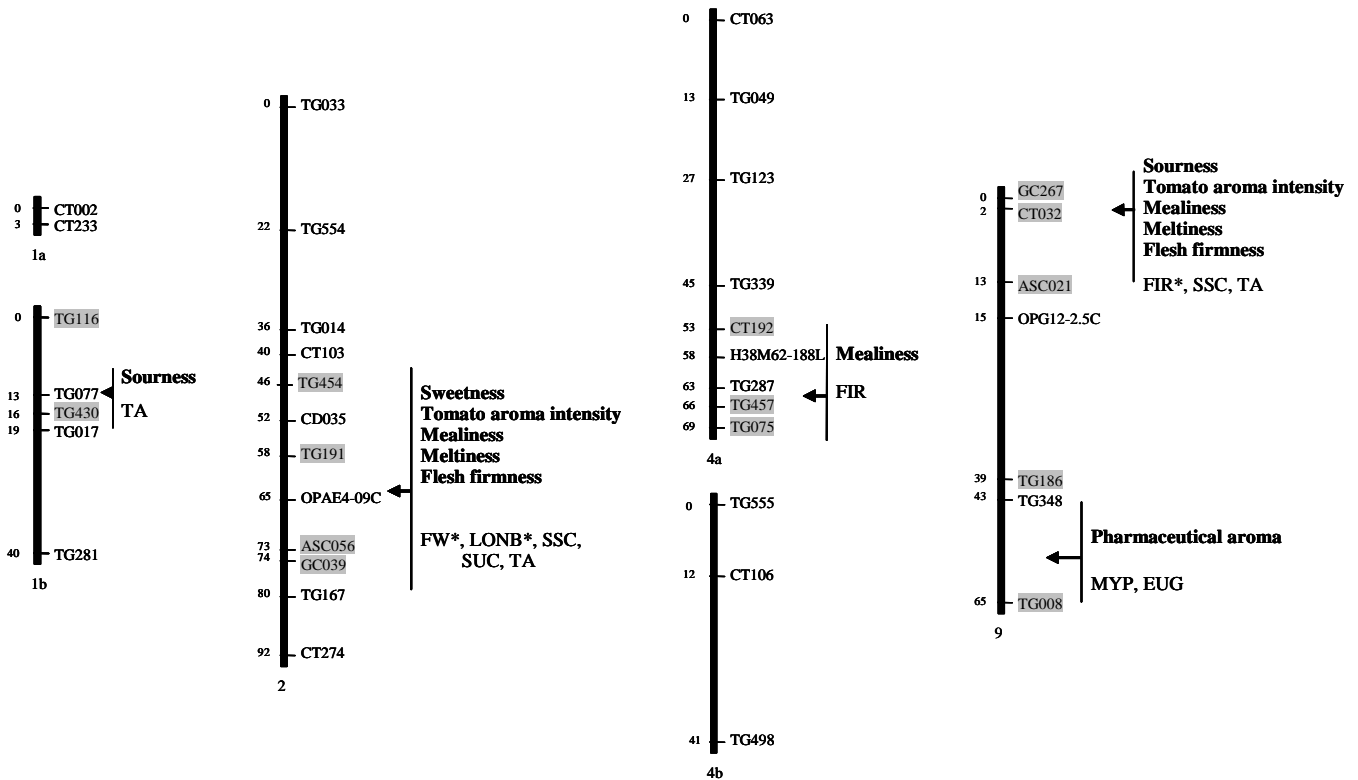
## I. Introduction

Thanks to the progress in molecular marker techniques and QTL (quantitative trait loci) analysis (Asins, 2002; Mohan *et al.*, 1997; Zeng, 1994), several studies have described the genetic basis of quantitatively inherited traits. Marker-assisted selection (MAS) is often mentioned as a perspective of these QTL studies, but few applied MAS programs are reported in the literature (Dekkers and Hospital, 2002). Most of the MAS experiments concern the introgression of QTLs for the improvement of a single trait in the genetic background that has been used for the QTL detection (Ahmadi *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2001; Stuber and Sisco, 1992; Van Berloo *et al.*, 2001). Such studies are still far from current breeding practices. Indeed, a breeder may have to (1) simultaneously select for several traits, (2) use several recipient parents, and (3) check that the selected QTLs are not linked to unfavorable alleles for major agronomic traits. These preoccupations have been progressively taken into account in MAS studies. On one hand, the simultaneous selection of several traits was not systematically followed by an increase in the phenotype for all the traits. For instance, the introgression of three QTLs for earliness and yield in a maize elite line proved successful in improving earliness, but important discrepancies were observed in the magnitude and sense of the yield QTL effects when compared to the predicted yield improvements (Bouchez *et al.*, 2002). On the other hand, the use of several recipient parents appeared essential in investigating the interest and the usefulness of QTLs detected in a given population when they are transferred into unrelated genetic backgrounds. Optimistic results were obtained when QTLs were introgressed into a single new genetic background (Li *et al.*, 2001; Toojinda *et al.*, 1998), but when several recipient parents were used, the consistency of the QTL effects in the different genetic backgrounds was less obvious (Sebolt *et al.*, 2000; Yousef and Juvik, 2002). Moreover, the introgressed QTLs may be linked to unfavorable effects for major agronomic traits (Robert *et al.*, 2001; Sebolt *et al.*, 2000), and interactions with the environment can strongly influence the MAS results (Romagosa *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1999).

In a previous study, QTL analysis of the progeny of a cherry tomato line (hereafter C) with a large fruited line (hereafter L), revealed that organoleptic quality of tomato fruit produced in a glasshouse was controlled by several QTLs (Causse *et al.*, 2001b; Saliba-Colombani *et al.*, 2001). By chance, most of the QTLs for physical, chemical and sensory traits were located in a few chromosome regions (Causse *et al.*, 2002) and most of the favorable alleles were provided by the C genotype, allowing a marker-assisted backcross scheme to be performed (Lecomte *et al.*, 2004a). Five QTL regions were thus introgressed into three recipient lines, the L line and two other lines (hereafter B and D) that were unrelated to the population used for QTL analysis. Fruit quality of the prototypes derived from the MAS scheme cumulating the five QTLs is described by Lecomte *et al.* (2004a). A positive improvement of quality components was shown for fruit composition in sugars, soluble solids and titratable acidity. The selection efficiency was confirmed by sensory profiles and hedonic assays of the improved lines and of hybrids between these lines and several large fruited lines. Nevertheless, the progress in fruit weight was much lower than expected based on the QTLs detected in RILs. Different effects of the simultaneous introgression of the five regions were observed according to the genetic

**Figure III.1: Molecular map showing the 5 regions of interest carrying QTLs for organoleptic quality, based on an intraspecific RIL population derived from a cross between a cherry tomato line (C) and a large fruit line (L).**

Distances in Kosambi centiMorgans are on the left of chromosomes and marker names are on the right. The markers used to check the introgression of the regions during marker assisted selection are underlined. Arrows determine the localisation of clusters of QTLs highly involved in the organoleptic quality. On the right of arrows, QTL detected for sensory traits (in bold) and for instrumental traits (see abbreviations) are mentioned. MYP and EUG (orthometoxyphenol and eugenol, respectively) correspond to quantified aroma volatiles related to the perception of pharmaceutical aroma (Causse et al. 2002). Stars indicate that the L allele provided higher value to the trait.



backgrounds: additive effects were detected for soluble solid and sugar contents in two genetic backgrounds. A partially dominant effect on titratable acidity was detected only in the L genetic background. In contrast, from additive to dominant unfavorable effects of the donor alleles were observed for fruit weight and locule number in the three genetic backgrounds, and an effect on firmness was only detected in the two firmest genetic backgrounds.

In the experiment described herein, we investigate the influence of various factors on QTL expression. QTLs for six traits of organoleptic quality in tomato were studied in order to characterize (1) their individual effect using QTL-NILs obtained from the MAS program previously described, (2) the stability of this effect over years, generations and genetic backgrounds and (3) the epistatic interactions between QTLs. The three BC3S1 populations segregating only for the four chromosomes carrying the five regions of interest, with only 30% of the donor genome, were evaluated and QTL mapping was performed in each of the three genetic backgrounds. Furthermore, QTL-NILs (BC3S3 lines) having favorable C alleles at only one region of interest, with approximately 10% of the introgressed genome, were evaluated during two successive years. Our objective was to assess QTL stability over three generations (RILs, BC3S1 populations, QTL-NILs), in three different genetic backgrounds and over years.

## II. Materials and methods

### II.1. Plant material and introgression scheme

The initial QTL analysis was performed (Causse *et al.*, 2001b; Saliba-Colombani *et al.*, 2001) using a population of 144 recombinant inbred lines (RILs) developed from an intraspecific cross, between Cervil (a cherry tomato, *Solanum lycopersicum*, var. *cerasiforme* (Dun.) Gray (hereafter C), with 7g fruits, a good taste and a high aroma intensity, and Levovil (a *S. lycopersicum* Mill. line) with 125g fruits and a common taste. QTLs controlling organoleptic quality traits for glasshouse production were detected (Causse *et al.*, 2002). Based on their involvement in sensory traits, five regions (hereafter 1, 2, 4, 9A and 9B, as they were located on chromosomes 1, 2, 4 and 9, respectively), were chosen to be introgressed in lines with bigger fruits. A QTL for sourness was detected in region 1, QTLs for sweetness, tomato aroma intensity, mealiness and meltiness were detected in region 2, a QTL for mealiness was detected in region 4, QTLs for sourness, tomato aroma intensity, mealiness, meltiness and flesh firmness were detected in region 9A and a QTL for pharmaceutical aroma was detected in region 9B. QTLs for physical and chemical traits were also detected in these regions (Figure III.1). The favorable alleles for fruit quality being conferred by the C parent in most of the cases, the cherry tomato alleles at the five regions were introgressed into large fruit genotypes in order to obtain QTL-NILs. A single RIL (LR134) with C alleles at the five regions was used as donor parent of the breeding program. The same marker-assisted backcross program was performed with three different recipient lines, kindly provided by Vilmorin: Levovil, VilB and VilD, hereafter L, B and D, respectively (Table

III.1). As the donor parent (LR134) contained 47% of recipient genome L, the first cross between LR134 and each recipient line was considered as a BC1. The BC1 progeny was genetically homogenous; it was thus backcrossed without any selection to the recipient line to produce a BC2 population. Almost 300 plants were grown, and after a marker-assisted selection step, one BC2 individual was selected and backcrossed again to produce a BC3 population. Similarly, one BC3 individual was selected and three selfing generations were performed. In each BC3S1 population (hereafter BC3S1-L, BC3S1-B and BC3S1-D), the segregation of markers in the five regions of interest was comparable to that of an F2 population. Then, BC3S3 lines with homozygous alleles at the five regions were selected and BC3S3 lines carrying C alleles at a single introgressed region were evaluated. These lines were nearly isogenic to their recipient line and were thus called QTL-NILs (Van Berloo *et al.*, 2001). The QTL-NILs were named with a letter corresponding to their genetic background and a number for the QTL region carried. For example, the line carrying a C allele at the region of interest on chromosome 2 with a genetic background L was noted NIL-L2. In each genetic background (hereafter Lgb, Bgb, Dgb), a line was obtained for each QTL region, with the exception of NIL-B9A and NIL-D9B that were not produced.

## II.2. Plant genotyping

DNA was extracted according to the DNA microprep protocol (Fulton *et al.*, 1995), and molecular markers were scored as recommended for the genetic map construction (Saliba-Colombani *et al.*, 2000). The three MAS programs were performed until BC3S1 generations, using ten markers (RFLP and RAPD) to check for the presence of donor type alleles on QTL segments (Lecomte *et al.*, 2004a). Several individuals had the alleles of interest for the five regions in BC2 and BC3 generations. Thus, a background selection on both carrier and non-carrier chromosomes was achieved with four to seven markers (RFLP and RAPD) to select, in each case, the individual with the genetic background the closest to the corresponding recurrent line. Three additional markers (RFLP) were scored in BC3S1 populations: one on chromosome 2 (GC039), one on chromosome 4 (TG457) and one located between regions 9A and 9B (TG186) in order to estimate the whole chromosome 9 genetic length (Figure III.1). To characterize the part of recipient genome, QTL-NILs were genotyped with 36 of the 84 RFLP markers spread over the genetic map (Saliba-Colombani *et al.* 2000).

## II.3. Phenotypic evaluation

QTLs were initially detected in a population of 143 recombinant inbred lines (RILs) as described in Saliba-Colombani *et al.* (2001). Five trials were then performed in a heated glasshouse, four at Montfavet and one at Ledenon (Southern France).

First, for each BC3S1 population, genotypic and phenotypic evaluations were performed with almost one hundred plants: 106 BC3S1-B and 103 BC3S1-L plants were evaluated from February to June 2001 and 83 BC3S1-D plants were evaluated from February to June 2002. The recipient lines, Cervil

and the hybrids between the recipient lines and Cervil were grown as control in each trial. The first 25 fruits of each plant were harvested when fully ripe. Five sets of 5 fruits each from successive harvests were gathered for each BC3S1 plant (5 independent repetitions). Fruit-by-fruit evaluations were performed for fruit weight (FW) and firmness (FIR). Fruit firmness was evaluated with a Durofel (a probe was applied at two points on the fruit equator, the movement of the probe was recorded and the average of the two measures was used). Then, fruits were cut to count the locule number (LONB) and frozen (-30°C). Chemical analyses were performed on fruit powder derived from simultaneously blending five fruits with liquid nitrogen. Soluble solids content (SSC), sugar content (SUC) and titratable acidity (TA) were evaluated as described by Saliba-Colombani *et al.* (2001) for QTL analysis. The last two trials were performed from February to June 2002 and from February to June 2003. In each trial, the recipient lines, Cervil, LR134 and thirteen QTL-NILs were evaluated, each one represented by a unique plot of six plants. Ripe fruits were harvested in bulk on the six plants of each plot twice a week for six weeks. For the first harvest of each week, seven fruits from the bulk were kept randomly per plot in order to obtain 6 sets per line (6 independent repetitions). A total of 42 fruits per plot were evaluated for the three physical and the three chemical traits as previously described. Chemical analyses were performed on frozen fruit powder derived from simultaneously blending the seven fruits of each crop with liquid nitrogen.

#### II.4. Statistical analyses

In each BC3S1 population, since all the plants were derived from a single BC3 plant, recombination was estimated in the regions of interest like with an F2 population, using MAPMAKER/EXP version 3.0 (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1992). The repeated control genotypes (Cervil, the recipient parents and the F1 hybrids) allowed line and trial effects and genotype\*trial interactions to be tested by analysis of variance. For each BC3S1 population, the conditional probability of being donor type at any given point of the introgressed regions, given the genotypes of the two markers flanking this point, was computed using the MDM program (Servin *et al.*, 2002). A linear regression between MDM genotype data and phenotype data was performed and a QTL effect was detected at a  $P < 0.01$  threshold. For all the traits, phenotypic data of the QTL-NILs were first compared together by analysis of variance, and then to their respective recipient line using a Dunnett test. For each genetic background, the additive effect  $a_i$  of region  $i$  was estimated:  $a_i = (R - R_i) / 2$ , where  $R$  and  $R_i$  are the values of the recipient parent and of the QTL-NIL carrying the region  $i$ , respectively. All the statistical analyses were performed using the SAS software (SAS Institute, 1988).

**Table III.1: Variation of physical and chemical traits within the four populations: RILs, BC3S1-L, BC3S1-B and BC3S1-D.**

Average values of the parent lines (based on the three trials) are shown, C=Cervil, L=Levovil, B=Vil B, D=Vil D. In each population, the minimum, the mean, the maximum values and the overall variance of each trait are mentioned.

Trait	C	LR134	L	B	D	RIL				BC3S1-L				BC3S1-B				BC3S1-D			
						Min	Mean	Max	Var	Min	Mean	Max	Var	Min	Mean	Max	Var	Min	Mean	Max	Var
FW (g)	7.0	20.7	125.1	133.0	119.0	10.8	27.0	71.3	125.0	31.7	64.9	127.9	313.6	37.2	69.8	108.4	221.3	37.6	82.8	116.8	226.0
LONB	2.35	2.12	4.01	2.88	3.87	2.00	2.97	5.2	0.6	2.00	2.94	5.35	0.4	2.04	2.36	3.04	0.1	2.00	2.61	3.64	0.2
FIR	54.1	64.9	64.6	84.6	80.2	NA	NA	NA	NA	55.2	64.1	73.5	14.4	65.3	74.4	89.6	21.7	67.8	75.1	86.2	16.2
SSC (°Brix)	10.33	7.78	5.58	7.09	6.09	4.38	7.13	9.38	0.8	6.00	7.51	8.9	0.4	6.02	7.59	8.78	0.4	5.14	6.26	7.52	0.3
SUC (g/100g fm)	4.21	4.07	3.11	3.40	3.40	2.85	4.02	5.26	0.3	2.77	3.8	4.74	0.1	2.76	3.76	4.7	0.2	2.8	3.48	4.3	0.1
TA (meq H+/100g fm)	11.11	6.64	4.92	6.68	6.15	4.17	7.78	11.72	1.7	4.58	5.75	7.06	0.3	5.4	7.16	8.72	0.4	4.27	5.37	6.87	0.4

NA=Non Available.

**Table III.2: Variation in genetic distances within the five introgressed regions among the four segregating populations.**

Marker names are detailed, and the genetic distance of the region is indicated for each population (in Kosambi centiMorgan). For chromosome 9, the length of region 9A is indicated with the whole chromosome length between parentheses.

Region	Markers	Genetic length (cM)			
		RIL	BC3S1-L	BC3S1-B	BC3S1-D
1	TG116-TG430	14.	14.	18.	13.
2	TG454-TG191-ASC056-GC039	27.	16.	22.	24.
4	CT192-TG457-TG075	13.	23.	18.	
9A (9)	CT032-ASC021-(TG186-TG008)	10.2 (55.8)	10.9 (56.5)	16.9 (62.7)	15.4 (54.8)

### III. Results and discussion

#### III.1. Phenotypic variation in RILs and BC3S1 populations

Phenotypic data for parental lines are presented in Table III.1. The C accession had a fruit weight of 7g, while the recipient lines had fruit weighing more than 120g (Table III.1). Fruits of C exhibited 2.3 locules on average, less than B (2.9 on average) and D and L (4 on average). The soluble solid content of C is much larger (10.3° Brix) than that of the recipient lines, which ranged from 5.6° Brix in L to 7.1° Brix in B. C was also much more acid (11.1 meq H+) than L (4.9 meq H+), the two other lines being intermediate with 6.1 and 6.7 meq H+ for D and B, respectively. Distributions of the phenotypic data in RILs (Saliba-Colombani *et al.*, 2001) were compared to the distributions of each BC3S1 population.

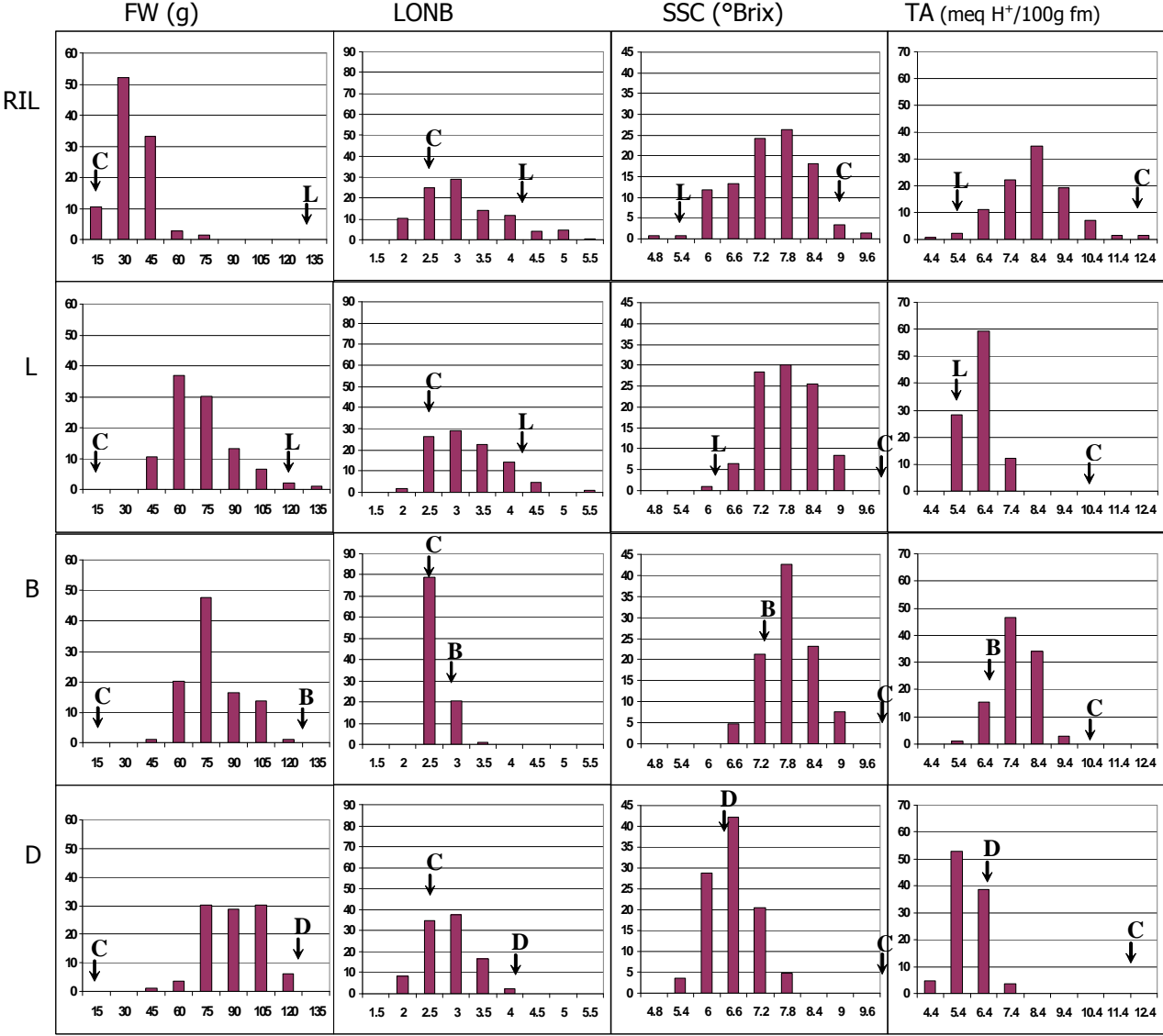
The comparison of the two populations having the same genetic background (RILs and BC3S1-L) revealed the influence of the five segregating regions and that of the fixation of the eight chromosomes homozygous in BC3S1. Indeed, due to the backcross and MAS process, in BC3S1 the eight chromosomes carrying no QTL were almost completely homozygous for the recipient genotype as confirmed by markers (data not shown). On the contrary, most of the four chromosomes carrying the regions of interest were still segregating. Differences between RIL and BC3S1 distributions may thus be caused either by the fixation of QTLs on non selected chromosomes, or by differences in allelic effects in B and D genotypes. Continuous phenotypic distribution was shown for each trait, suggesting the traits were under polygenic control (Figure III.2). The important variation still observed in BC3S1 populations confirmed the interest of the five selected regions for improving tomato fruit quality. Variance in the RILs was larger than in the BC3S1-L population for every trait, except for FW where BC3S1 was characterized by an increased variance, due to the increase in average FW in BC3S1 and to the relation between mean and variance, usually observed for FW (Table III.1). The increase in the FW mean in BC3S1 could be the consequence of the fixation of L alleles at the QTLs detected in RILs on chromosomes 3, 11 and 12. SSC and SUC in the RILs and in BC3S1-L ranged between the two parental values. For TA, BC3S1 were in average much closer to the recipient parent value. Two different methods were used to evaluate firmness: in the RIL population, firmness was measured with a penetrometer as the force by surface unit needed to deform the fruit by 5% of its initial diameter (Saliba-Colombani *et al.*, 2001), whereas it was measured using a Durofel in advanced generations. Firmness distribution in BC3S1-L was centered on the value of the L parental line (Table III.1).

The influence of the genetic background was investigated by comparing phenotypic data among the three BC3S1 populations, BC3S1-L, BC3S1-B and BC3S1-D. Distributions of FW in BC3S1-B and BC3S1-D were similar to BC3S1-L, and higher on average than for the RILs (Figure III.2). Favorable transgressions were observed for SUC and for FIR with each BC3S1 population and for LONB, only in BC3S1-L and BC3S1-B. As expected according to parental values, BC3S1-L displayed higher LONB values than BC3S1-B or BC3S1-D, probably because of the allelic substitution of L alleles by B or D



**Figure III.2: Distributions of the RILs and of the three BC3S1 populations with each genetic background (B, D, L) for fruit weight (FW), locule number (LONB), soluble solids contents (SSC) and titratable acidity (TA).**

The population is indicated on the left, the trait at the top of the graphs. The abscissa indicates the value of the trait and distributions are given in percentage of the whole population. The values of parental lines in each populations are indicated (C=Cervil, L=Levovil, B=ViLB, D=ViLD).



alleles at the QTLs. On average, a very low variation was observed in the BC3S1-B population for this trait, LONB of B and C being almost similar (Table III.1). In contrast, SSC and TA were on average higher than the recipient lines, except in BC3S1-D. For FW and FIR, BC3S1-D showed higher values than BC3S1-B and both were on average higher than BC3S1-L. On the contrary, for all chemical traits, BC3S1-D displayed the lowest average value, as if most of the QTLs segregating in L and B progeny were no longer segregating, or as if the D genetic background provided negative alleles. BC3S1-L and BC3S1-B showed the same range of variation for SSC and SUC, which were on average larger than the RILs. The increase in average was higher in BC3S1-B than in BC3S1-L, as expected based on the parental values. Distributions of TA were different in each genetic background. BC3S1-L values were lower than BC3S1-B values in average, and both were lower than the RIL one. Unfavorable QTL alleles must thus have been fixed in the genetic background for these BC3S1 populations.

### III.2. QTL detection in the three BC3S1 populations

Thirteen markers were scored in each of the three BC3S1 populations, in order to assess the genotype of the individuals within each of the five segregating regions. A marker located between the regions 9A and 9B was also scored to construct a genetic map of the whole chromosome 9. Thus, four linkage groups were constructed (Table III.2). No segregation bias was detected. The distances within these linkage groups were highly consistent with those obtained for the RIL population (Saliba-Colombani *et al.*, 2000). Indeed, locus order was the same in all the cases and genetic distances of BC3S1 linkage groups were equivalent for the chromosomes 1 and 9, slightly reduced for chromosome 2 and increased for chromosome 4. However, the changes were not very important, particularly when compared to the reductions observed in advanced generations of tomato crosses involving wild species (Monforte and Tanksley, 2000). Based on the multilocus genotype frequencies computed with the MDM program (Servin *et al.*, 2002), linear regressions with phenotypic data were performed for QTL analyses in BC3S1 populations. For regions where QTLs were detected, the additive effects of the QTLs were estimated (Table III.3). For FW, QTLs were detected in the 5 regions, but with differences according to genetic backgrounds. For LONB, QTLs were detected on chromosome 1 and on chromosome 2. For FIR, a QTL was detected on chromosome 4, but showing a positive effect in Lgb and a negative one in the two other genetic backgrounds. Other QTLs for FIR were detected on chromosome 2 and 4. For SSC, significant effects were detected in the five regions with BC3S1 populations and a QTL was detected in the region 9A. Other QTLs were detected in regions 1, 2, 4 and 9B, the favorable alleles being conferred by the recipient parent for the QTL detected in region 4 with BC3S1-D. As no QTL for SSC was detected on the 8 non carrier chromosomes in the RILs, the same set of QTLs is supposed to segregate in the RILs and in BC3S1. The difference between the three genetic backgrounds could thus be explained by epistatic interactions between QTLs and the genetic background. For SUC and TA, QTLs were detected in the five regions, but none of the QTL

**Table III.3: Additive effect of the QTLs detected for each region in (1) the RIL population (Saliba-Colombani et al, 2001), (2) each BC3S1 population and (3) each QTL-NIL.**

The percentage of phenotypic variation explained by the QTL detected by CIM in the RIL population is written between parentheses. Additive effects are underlined when significance was observed at  $P < 0.01$  but not at  $P < 0.001$ . For QTL-NILs, additive effects were obtained using the mean of the two years, 2002 and 2003, and significant effects were detected at  $P < 0.05$ .

For FIR, another method of measure was used, explaining the difference in effect with BC3S1 and QTL-NILs.

Trait	Chromosome segments	RIL	L		B		D	
			BC3S1	BC3S3	BC3S1	BC3S3	BC3S1	BC3S3
FW (g)	1	ns	ns	-22.29	ns	-18.8	<u>-7.4</u>	-8.77
	2	-9.2 (46.2)	-23.5	-33.52	-11.3	-18.27	ns	ns
	4	ns	ns	ns	-19.8	-14.92	ns	-6.71
	9a	ns	ns	-14.68	<u>-7.2</u>	NA	-15.0	-19.65
	9b	ns	ns	ns	-11.9	-8.94	ns	NA
LONB	1	ns	ns	ns	-0.15	-0.25	-0.22	-0.5
	2	-0.57 (37.3)	-0.96	-1.12	-0.19	-0.17	-0.51	-0.92
	4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	9a	ns	ns	ns	ns	NA	ns	-0.36
	9b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA
FIR	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	2	ns	ns	-3.69	-3.7	-3.47	-2.0	ns
	4	$2.8 \times 10^3$ (33.3)	1.8	ns	<u>-2.4</u>	ns	-2.8	-4.19
	9a	$-2.0 \times 10^3$ (10.3)	ns	ns	ns	NA	-2.2	ns
	9b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA
SSC (°Brix)	1	ns	ns	0.65	0.42	ns	0.36	ns
	2	0.42 (18.6)	ns	0.62	<u>0.26</u>	ns	ns	-0.37
	4	ns	ns	ns	ns	-0.49	-0.35	ns
	9a	0.26 (13.3)	0.40	0.52	0.48	NA	0.34	0.53
	9b	ns	ns	ns	0.43	ns	ns	NA
SUC (g/100g fm)	1	ns	ns	0.32	0.27	ns	<u>0.19</u>	ns
	2	0.27 (25.3)	<u>0.08</u>	0.32	ns	ns	ns	ns
	4	ns	ns	ns	0.27	ns	-0.21	ns
	9a	ns	0.15	0.26	0.23	NA	ns	0.45
	9b	ns	0.09	ns	ns	ns	ns	NA
TA (meq H+/100g fm)	1	0.50 (11.2)	ns	0.31	<u>0.28</u>	ns	<u>0.31</u>	ns
	2	0.49 (17.2)	ns	0.65	ns	ns	-0.49	-0.34
	4	ns	<u>-0.15</u>	ns	ns	ns	ns	ns
	9a	0.44 (22.4)	ns	0.32	0.35	NA	ns	ns
	9b	ns	ns	ns	0.56	ns	0.59	NA

was detected in one region simultaneously for the three populations. The BC3S1-L and BC3S1-B were evaluated in the same trial, one year before the BC3S1-D. Nevertheless there were many more QTLs in common (11) between BC3S1-B and BC3S1-D, than between L and B or L and D populations (5 and 3 common QTLs, respectively). Another consequence of the fixation of major QTLs in the genetic background is that the segregating regions in BC3S1 populations displayed stronger effects than in the RIL population and allowed the expression of minor QTLs to be detected.

### *III.3. QTL detection in QTL-NILs*

QTL-NILs were evaluated during two successive trials, in 2002 and 2003 and the additive effect of each introgressed region was estimated (Table III.4). Significant effects were detected in all the five regions for FW and in four regions for LONB. For the other traits, the effects were strongly dependent on the genetic background. A total of 31 QTLs were detected in 2002 and 23 in 2003. About half of the significant effects (19) were significant in the two trials, whatever the genetic background, 13 for physical traits and 6 for chemical traits. Eight of them were previously detected in the RILs, 5 concerned physical traits (FW, LONB and FIR) and 3 concerned chemical traits (SSC and TA). Eleven new QTLs were stable over years. For physical traits, more QTLs were detected in 2002 (21) than in 2003 (14). In some cases, strong differences in the additive effects between the two years were observed. Consequently, no significant effect was detected for the average of the two years. Additive effects for FIR were less consistent as only the QTL detected for NIL-D4 was stable over years. Stability of effects for chemical traits was comparable to those revealed for physical traits, but the number of QTLs detected in 2002 and in 2003 was similar. For SUC, two QTLs among three were only detected in 2003, and the opposite was observed for TA. Inconsistency of QTL or differences in the observed effect over years could be attributed to the interaction between QTL and environment.

Although the trials were all performed in the glasshouse in the same spring period, the climate could not be totally controlled and identical every year. Indeed, phenotype data of parental lines which were recorded during the four trials revealed significant differences between trials for every trait. Nevertheless, interactions between genotype and trial were only significant for FIR, SUC and TA (data not shown). When we pooled the phenotype data of the two years, 33 significant effects were detected.

### *III.4. Consistency of QTLs over generations*

Stability of the QTLs in advanced generations and over the genetic backgrounds was investigated by comparing the QTLs detected in the RIL population to those detected in the three BC3S1 populations and in QTL-NILs (Table III.3). RILs contained 50% of each parental genome (L and C), BC3S1 progeny segregated simultaneously for five regions of interest carried by four chromosomes and were fixed for the recipient genome over the 8 other chromosomes, and QTL-NILs carried approximately 10% of the C genome and differed from the recipient line in only one of the five regions. A negative

effect of C alleles was expected for all the physical traits, except for FIR in region 4 (Saliba-Colombani *et al.*, 2001). According to the QTL analysis performed with the RILs, among the five regions, a single QTL was expected on chromosome 2 for FW. This QTL was recovered in BC3S1 populations and in QTL-NILs except in Dgb. Three other QTLs were detected for FW in BC3S1-B and two in BC3S1-D. Moreover, two new QTLs were detected in Lgb. In Bgb and in Dgb, one new QTL was detected in QTL-NILs in region 1 and in region 4. For LONB, only one region of chromosome 2 was involved in the genetic control of the trait, according to RIL analysis. The involvement of region 2 was confirmed whatever the generation, the genetic background and the year (except in Bgb in 2003), but strong differences in allelic effects were detected between the genetic backgrounds. New QTLs for LONB were detected in region 1 and in region 9a. QTLs for FIR were detected in regions 4 and 9A in the RILs. The involvement of region 4 was confirmed in all the BC3S1 populations, with favorable effects provided in BC3S1-L by Cervil alleles, as in the RILs, and provided on the contrary, by the recipient type allele in BC3S1-B and BC3S1-D. At the QTL-NIL level, only NIL-D4 showed differences from the recipient line. The involvement of region 9A was only confirmed in BC3S1-D. A new QTL was detected in region 2. Surprisingly, this QTL was detected in NIL-L2 whereas none of the QTL detected in the RILs was confirmed in Lgb in the advanced generation.

Favorable alleles were provided by Cervil for all the QTLs controlling chemical traits (Saliba-Colombani *et al.*, 2001). For SSC, positive effects were detected in RILs in regions 2 and 9A. For region 2, in BC3S1, a single effect was detected in Bgb, whereas the QTL was detected with NIL-L2 and NIL-D2. For region 9A, the QTL was confirmed in each BC3S1 population and in all the corresponding QTL-NILs available. Moreover, additional QTLs were detected, two with a favorable effect in the region 1 and in the region 9B and one with an unfavorable effect in region 4. For SUC, although only a single QTL was detected in region 2 with the RILs, significant effects were detected in the five regions with BC3S1 populations, with different regions according to the genetic backgrounds. Significant effects were detected in QTL-NILs only in NIL-L2 and three new QTLs were detected for NIL-L1, NIL-L9A and NIL-D9A. For TA, according to the RILs, Cervil alleles provided favorable effects in regions 1, 2 and 9A. The involvement of those regions was confirmed at least in one generation and/or in one genetic background. Unexpected QTLs were detected in BC3S1-L in region 4 and in BC3S1-B and BC3S1-D in region 9B.

Discrepancy in QTL expression among generations could be attributed to biological and experimental reasons. Disappearance of QTLs in advanced generations may be due to actual interactions between QTL and the genetic background, even though the usual population types and sizes do not allow the detection of such interactions. New QTLs may appear because of the fixation of the previously segregating major QTLs. This fixation may also explain the variation in the effect of the QTLs. Indeed, several QTLs detected in RILs were fixed in the advanced generations with a recipient genotype, due to the backcross process (for FW on chromosomes 3, 11 and 12; for NBLO on chromosome 12; for SUC on chromosomes 3, 10 and 11 and for TA on chromosomes 3 and 12). The methods of QTL detection, which varied according to the populations, and the power of QTL detection, which is related

**Table III.4: Additive effect of the QTLs detected in QTL-NILs (BC3S3 lines) in each genetic background over 2 years, for six fruit traits.**

Mean corresponds to the average effect of the two years, 2002 and 2003.

ns, Dunnett test comparing the QTL-NIL to the corresponding recipient line not significant at P<0.05. NA, non available

Trait	Year	Chromosome segments														
		1			2			4			9A			9B		
		L	B	D	L	B	D	L	B	D	L	B	D	L	B	D
FW (g)	2002	-33.89	-10.4	-15.43	-43.95	-19.95	-14.94	ns	-12.9	-10.18	-24.42	NA	-24.25	ns	-12.32	NA
	2003	-9.58	-26.71	ns	-23.1	-16.1	ns	ns	-16.46	ns	ns	NA	-15.04	ns	ns	NA
	mean	-22.29	-18.8	-8.77	-33.52	-18.27	ns	ns	-14.92	-6.71	-14.68	NA	-19.65	ns	-8.94	NA
LONB	2002	-0.45	-0.25	-0.37	-1.27	-0.18	-0.78	ns	ns	0.27	ns	NA	-0.25	ns	ns	NA
	2003	ns	-0.25	-0.7	-0.89	ns	-1.1	ns	ns	-0.29	ns	NA	-0.52	ns	ns	NA
	mean	ns	-0.25	-0.5	-1.12	-0.17	-0.92	ns	ns	ns	ns	NA	-0.36	ns	ns	NA
FIR	2002	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-3.24	ns	NA	-3.07	ns	ns	NA
	2003	ns	ns	ns	-7.4	ns	ns	ns	ns	-5.14	ns	NA	ns	ns	ns	NA
	mean	ns	ns	ns	-3.69	-3.47	ns	ns	ns	-4.19	ns	NA	ns	ns	ns	NA
SSC (°Brix)	2002	0.78	ns	ns	0.55	ns	ns	ns	-0.64	ns	0.6	NA	0.79	ns	ns	NA
	2003	0.51	ns	ns	0.69	ns	-0.58	ns	-0.38	ns	0.45	NA	ns	ns	ns	NA
	mean	0.65	ns	ns	0.62	ns	-0.37	ns	-0.49	ns	0.52	NA	0.53	ns	ns	NA
SUC (g/100g fm)	2002	0.46	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	0.43	ns	ns	NA
	2003	ns	ns	ns	0.36	ns	ns	ns	ns	ns	0.23	NA	0.46	ns	ns	NA
	mean	0.32	ns	ns	0.32	ns	ns	ns	ns	ns	0.26	NA	0.45	ns	ns	NA
TA (meq H+/100g fm)	2002	ns	ns	ns	0.88	ns	-0.46	ns	ns	ns	0.53	NA	ns	ns	ns	NA
	2003	ns	ns	ns	0.42	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	NA
	mean	0.31	ns	ns	0.65	ns	-0.34	ns	ns	ns	0.32	NA	ns	ns	ns	NA

to the population structure, could be among the experimental reasons which might participate in the differences observed. The size of the population may influence the power of QTL detection: 144 RILs were analysed while about 100 plants was assessed per BC3S1 population. Nevertheless, only four chromosomes segregated in these populations, reducing the genetic variance and increasing consequently the power of QTL detection. For the six traits studied, about 50% of the expected QTLs based on RIL data, were detected in at least one BC3S1: 40%, 20% and 40% were detected in Lgb, Bgb and Dgb over the three generations (RIL/BC3S1/BC3S3), respectively. Several new QTLs were detected in BC3S1-B and BC3S1-D, with many QTLs common to Bgb and Dgb (Figure III.3). However, strong differences in the allelic effects were detected according to the recipient parents, that could mainly be attributed to the allelic variation in the regions of interest. New QTLs were also detected during a marker-assisted selection scheme for the improvement of stripe rust resistance in barley (Toojinda *et al.*, 1998), and the authors suggested that favorable alleles were fixed at these additional loci in the original mapping population. Furthermore, new QTLs could be detected as the overall genetic variation decreases when advanced generations are considered.

In total, 41 QTLs were detected in the three BC3S1 populations and 33 in QTL-NILs (based on the average of the measurements in 2002 and in 2003), but only 18 were common to both BC3S1 and QTL-NILs generations and 10 were common to the three generations. For a given trait, a given region and a given genetic background, when a QTL was detected in several generations, its effect was usually larger in the more advanced generation (Table III.3). Overall, for all the traits, 10 QTLs were stable over generations (RIL/BC3S1/BC3S3) in at least one genetic background. QTLs were more conserved between RILs and advanced generations for Lgb (particularly between RILs and QTL-NILs) than for Bgb or Dgb. This could be due to the fact that L was used to create the RIL population in which QTL analysis was first performed. The two QTLs not recovered in Lgb concerned FIR which was measured with two different apparatus. With Dgb, three QTLs displayed allelic effects opposite to that expected (for FIR, SSC and TA). Such a lack of consistency of QTL effects even using the same genetic background has already been reported (Shen *et al.*, 2001). This inconsistency suggests that the QTLs could be involved in gene interactions. Finally, five new QTLs compared to those detected in RILs were detected, essentially for physical traits, and were stable over generations: for FW on chromosomes 1, 4, 9A and 9B, for LONB on chromosome 1, for FIR on chromosome 2 and for SUC on chromosome 9A.

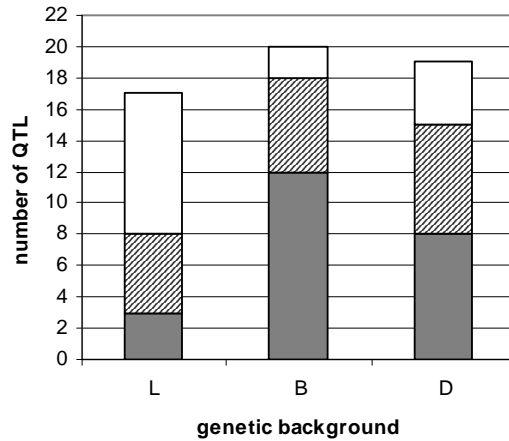
### III.5. Consistency of QTLs over genetic backgrounds

QTL effects were compared in three genetic backgrounds: L, B and D. Consistency of the QTLs between Bgb and Dgb was high. Indeed, among the 17, 20, and 19 QTLs detected with at least one advanced generation in Lgb, Bgb and Dgb, respectively, 4 QTLs were common to the three genetic backgrounds, 7 to Bgb and Lgb, 8 to Dgb and Lgb and 13 to Bgb and Dgb (Figure III.3). Nevertheless, when only QTLs detected in both BC3S1 and QTL-NILs were considered, only two QTLs were common to each pair of genetic backgrounds and the effects of these QTLs were strongly

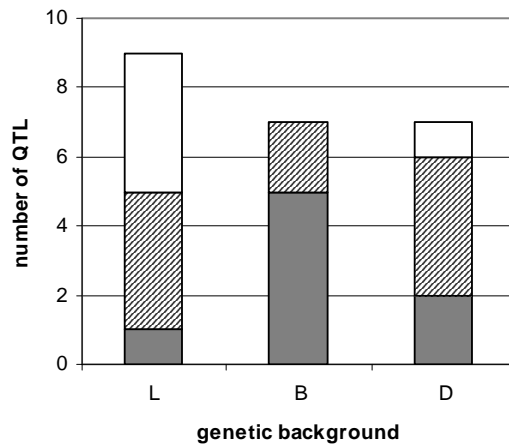
**Figure III.3: Number of the QTLs detected per generation and genetic background for the six traits.**

**(a)** for each genetic background, number of QTLs detected in BC3S1 (grey) and QTL-NILs (white) and common to the two generations (hatched), **(b)** for each genetic background, number of QTLs detected in common in RILs and QTL-NILs (white), in RILs and BC3S1 (grey) and common to the three generations (hatched) **(c)** number of QTLs detected common to two genetic backgrounds in BC3S1 (grey), QTL-NILs (white) and common to both generations (hatched).

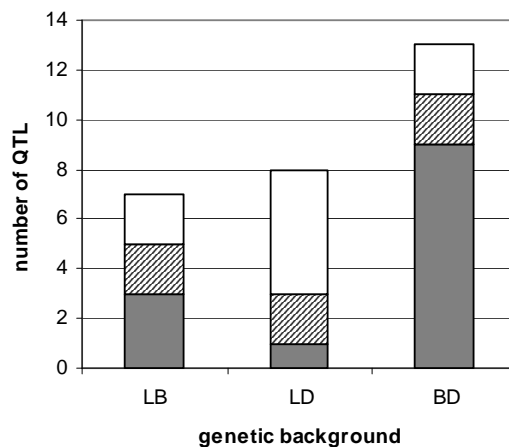
(a)



(b)



(c)





dependent on the genetic background. Only two QTLs were detected in the three genetic backgrounds whatever the generation: for NBLO on chromosome 2 and for SSC in region 9A. These two QTLs probably correspond to major genes that have been previously detected in crosses involving other parental lines (Lippman and Tanksley 2001; Fridman *et al.* 2002).

The QTL for FW on chromosome 2 detected in Lgb and Bgb in all the generations probably corresponds to *fw2.2*, a QTL with a large effect which has been recently cloned and which is one of the QTLs explaining the increase in fruit size from wild species to cultivated tomato that occurred during domestication (Frary *et al.* 2000). In studies where QTLs were transferred into genetic backgrounds unrelated to the mapping population, the lack of consistency of the QTL effects was often attributed to the allelic variation at the locus of interest (Reyna and Sneller, 2001; Sebolt *et al.*, 2000). To quote again the case of firmness, not only were two methods of measurements used, but also, the recipient parents, B and D, are both much firmer than L and QTLs for firmness detected in Bgb and Dgb on chromosome 4 had allelic effects opposite to expected.

#### IV. Conclusion

This study showed that several sources of variation, such as environmental conditions, population structure and genetic background may influence QTL expression. All these factors may reduce the efficiency of marker-assisted selection and explain the low progress in fruit weight observed in the lines derived by marker-assisted backcross (Lecomte *et al.* 2004a). As shown here the fixation of favorable alleles at several QTLs in the genetic background is not sufficient, as it has resulted in the expression of new QTLs carried by one of the five introgressed regions. The large number of QTLs detected in BC3S1, even with a small population size, underlined the interest in mapping QTLs in advanced generations, as proposed by Tanksley and Nelson (1996). QTL-NILs constitute other valuable material for a more detailed evaluation of the effect of each QTL (Van Berloo *et al.*, 2001). They allow either screening of whole genomes for QTLs (Eshed and Zamir 1995) or focusing on a specific region of interest for fine mapping (Lecomte *et al.* 2004b). Lecomte *et al.* (2004a) showed significant differences between the three genetic backgrounds in the improvement of quality traits. The C genotype is a cherry tomato which was shown as distant from L, B and D, based on molecular markers. On the contrary, very few markers revealed differences between the three recipient lines (less than 5% polymorphic loci), so few differences could be expected. This was observed for the traits where the lines were not very different (as for FW or SSC), but when the means are different, allelic differences at the QTL may cause a lower effect or even opposite allelic effects than expected (as for FIR or TA, for instance).

**Acknowledgements**

Many thanks to N. Baffert, A. Gautier and A. Luciani for genotypic and phenotypic works, to A.M. Cossalter for taking care of the plants and for her help during the phenotypic evaluations, to P. Duffé for plant genotyping, to R. Matthieu for chemical evaluations, to C. Dillmann for SAS programs and to Rebecca Stevens for English corrections. Laurent Lecomte was partly supported by the Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur (France). The experiments comply with the current French laws.

## **CHAPITRE IV**

# **CARACTERISATION GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE DE LA TEXTURE DU FRUIT DE TOMATE**

---

## CHAPITRE 4 \_ CARACTERISATION GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE DE LA TEXTURE DU FRUIT DE TOMATE

---

Ce chapitre sous forme d'article se focalise sur l'étude des QTL de texture. Différentes approches ont été utilisées afin de déterminer les caractéristiques du fruit de tomate en lien avec la texture. Dans un premier temps, elles concernaient l'évaluation des propriétés rhéologiques et sensorielles du fruit à maturité ainsi que l'étude de l'anatomie et de l'organisation cellulaire au niveau des tissus du péricarpe. Dans un second temps, différents paramètres physiques et physiologiques ont été mesurés au cours du développement du fruit. Ces analyses ont été réalisées pour les lignées cumulant les cinq régions d'intérêt précédemment présentées et pour les QTL-NIL ayant introgressé les régions des chromosomes 4 et 9 où les QTL ayant les effets les plus forts sur les variations texturales, essentiellement fermeté et farinosité, ont été localisés. L'objectif était (i) de déterminer les caractéristiques du fruit pouvant être reliées à la texture et de corrélérer des mesures instrumentales à des caractères sensoriels, (ii) de préciser les effets individuels des QTL contrôlant la fermeté, la farinosité, la jutosité et l'aspect peau gênante (iii) d'identifier les stades physiologiques déterminant pour les variations texturales, en particulier en terme de fermeté du fruit.

L'article a été soumis au journal *Journal of Experimental Botany* en 2006.

## Genetic and Physiologic Relationships Among Physical, Sensory, and Morphological Attributes of Texture in Tomato Fruits

Jamila Chaïb<sup>1, 2</sup>, Marie-Françoise Devaux<sup>3</sup>, Marie-Ghislaine Grotte<sup>1</sup>, Karine Robini<sup>4</sup>, Mathilde Causse<sup>2</sup>, Marc Lahaye<sup>3</sup>, Isabelle Marty<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Site Agroparc, Domaine Saint-Paul, 84914 Avignon Cedex 9, France; \*Author for correspondence (tel: +33 (0)4-32-72-24-93; fax: +33 (0)4-32-72-24-92; email: marty@avignon.inra.fr)

<sup>2</sup> INRA, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint-Maurice, BP94, 84143 Montfavet Cedex, France

<sup>3</sup> INRA, UR1266 Biopolymères, Interactions Assemblages URBIA, Rue de la Géraudière, BP71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

<sup>4</sup> Maison de l'Alimentation, CCI d'Avignon et de Vaucluse, Laboratoire d'Évaluation Sensorielle, Technopole Agroparc, BP1201, 84911 Avignon Cedex 9

### Abstract

Tomato texture is one of the critical components for the consumer's perception of fruit quality. Texture is a complex character composed of several attributes that are difficult to evaluate and which change during fruit ripening. This study investigated the texture of tomato fruits at the rheological, sensory, morphological and genetic levels and attempted to correlate several parameters. Analyses were performed on tomato fruits from introgressed lines carrying QTLs associated with texture traits localised on different chromosomes, in two genetic backgrounds. Rheological measurements were used to determine resistance to deformation and fruit elasticity. Sensory analysis was used to assess flesh firmness, juiciness, mealiness and skin toughness. Image analysis was used to study fruit morphology and to define the cellular structure and heterogeneity of the pericarp. A highly significant correlation was observed between instrumental and sensory firmness. Moreover, correlations were also established between some texture traits and parameters of the pericarp cellular structure. Compared to QTLs detected in a previous study, the phenotypic effects expected for mealiness were confirmed in all lines whereas, for firmness, they were not confirmed. Significant interactions between QTL and genetic background were observed for several traits. In addition, kinetic analysis showed that differences in firmness occurred from the early stages of fruit development. These results provide both a broad description of texture components and preliminary information to understand their genetic control.

**Keywords:** Firmness, fruit, genetic background, juiciness, mealiness, near isogenic lines (NIL), quantitative trait locus (QTL), ripening, *Solanum lycopersicum*, texture.

**Abbreviations:** **Bgb** – VilB genetic background, **ELA** – total elasticity, **FIRd** – firmness measured with Durofel, **FIRp** – firmness measured with Penelaup, **FW** – fruit weight, **Lgb** – Levovil genetic background, **LONB** – locule number, **%LO** – percentage of locule area in relation to the total area of a transverse section of tomato, **pc1** – principal component 1 (cell size), **pc2** – principal component 2 (heterogeneity of cell distribution), **PERIa** – absolute thickness of the pericarp, **PERIr** – relative thickness of the pericarp.

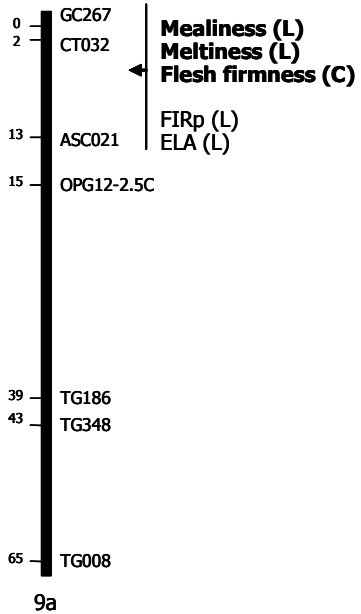
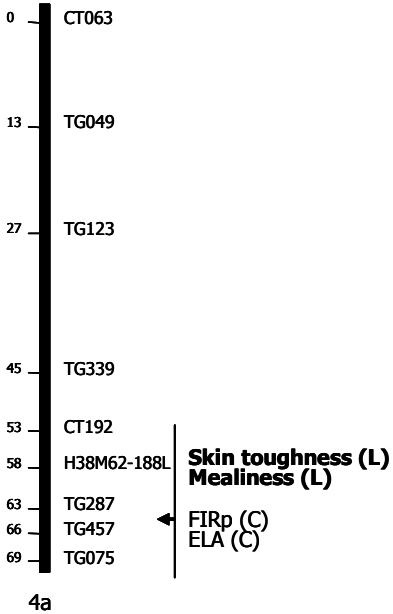
## I. Introduction

Texture is one of the critical components for the consumer's perception of tomato fruit quality (Causse *et al.*, 2003; Serrano-Megias and Lopez-Nicolas, 2006). Many traits are involved in fruit texture, mainly sensory attributes such as flesh firmness, mealiness, meltiness, juiciness, crispness (Harker *et al.*, 1997; Redgwell and Fischer, 2002; Szczesniak, 2002). Major changes in texture occur during fruit ripening, mainly associated with softening which considerably influences post-harvest performance i.e. transportation, storage, shelf-life and pathogen resistance (Brummell and Harpster, 2001). Softening is considered to be associated with a decline in cell wall rigidity and cell wall adhesion (Crookes and Grierson, 1983; Hallett *et al.*, 1992). Although a number of hydrolases affecting cell wall structure have already been identified (Fry *et al.*, 1992; Koch and Nevins, 1989), the relationships between these enzymes and the rheological properties of the fruit are still not clear (Brummell and Harpster, 2001). This is partly due to the difficulties encountered in measuring and characterizing the textural properties of the fruit.

Instrumental measurements are generally used to evaluate firmness related to the mechanical properties of fruit tissues. The most widely used measurement of fruit texture is the Magness-Taylor firmness test, which assesses the maximum force needed to compress the sample in a specific way (Abbott, 2004). This system was mainly developed to evaluate commercial quality with respect to the tactile assessment of fruit firmness by consumers at the time of purchase. Many other types of destructive or non-destructive mechanical measurements exist including compression, puncture, tension, and vibration. Rheological measurements inform about the mechanical properties of the fruit or of a localised part of the fruit (peel, pericarp, etc.). Sensory analysis provides complementary information on human perception of whole fruits. Mastication of the fruit enables characterization of several texture attributes that are difficult to measure mechanically, such as juiciness - release of juice in the mouth - mealiness - dry, powdery, non-sticky - or skin toughness - skin remains in the mouth. In addition, the morphology of the fruit and the combination of the diverse tissues also play a crucial role in texture (Duprat *et al.*, 1991). In the face of such complexity, very few studies have described fruit texture (Seymour *et al.*, 2002). Moreover, most studies have focused on fruit texture (Liebhard *et al.*, 2003), and more specifically on cell wall properties (Brummell, 2006; Devaux *et al.*, 2005; Waldron *et al.*, 2003). In order to improve our understanding of the biophysical and biochemical events involved in changes in texture in fleshy fruits, it is essential to characterize texture at different scales (rheological, sensory and morphological) using complementary phenotypic descriptors. Improving fruit texture also requires an understanding of the genetic control of the various traits involved. Several approaches can be used to assess each component of tomato fruit texture (Barrett *et al.*, 1998) but very few studies have combined physical, chemical and physiological approaches (Causse *et al.*, 2003; Serrano-Megias and Lopez-Nicolas, 2006). Finally, genetic control of such traits in tomato is poorly understood (Doganlar *et al.*, 2002; Frary *et al.*, 2003; Fulton *et al.*, 2000). The aim of this study was

**Figure IV.1. Molecular map showing the 2 regions of interest carrying QTLs for fruit texture.**

Distances in Kosambi centiMorgans are on the left of chromosomes and marker names are on the right. Arrows show the localisation of clusters of QTLs highly involved in organoleptic quality. To the right of the arrows, QTL detected for sensory traits (in bold) and for instrumental traits (see abbreviations) are mentioned. "C" and "L" indicate that the Cervil and Levovil allele respectively increase the trait value (adapted from Causse *et al.*, 2002).



thus to investigate the texture of tomato fruits at the rheological, sensory, morphological and genetic levels. QTL detection for several organoleptic quality traits (Causse *et al.*, 2002; Saliba-Colombani *et al.*, 2001) was performed in a previous study using the progeny from an intraspecific cross between a cherry tomato line, Cervil, and a common tomato line, Levovil. Cervil (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dun.)) is characterised by small fruits with a high organoleptic potential while Levovil (*S. lycopersicum* Mill.) has larger fruits with a classical taste. The main QTLs for fruit texture components have been shown to be located on chromosomes 4 and 9 as for flesh firmness and mealiness. In our experiments, analyses were performed on fruits from isogenic lines that differed in the presence of one (QTL-NILs) or several QTLs previously shown to be associated with texture traits (Fig. IV.1) and/or related to organoleptic quality. Chromosome fragments corresponding to the regions of interest were introgressed from Cervil into two texture-contrasted lines used as genetic background, one soft variety, Levovil, and one firm, VilB (Chaïb *et al.*, 2006; Lecomte *et al.*, 2004a). Phenotypic characterization of texture in these lines was performed on red ripe tomatoes using physical and physiological measurements and sensory analysis. Some of the traits were also evaluated during the course of fruit development. Finally, as the anatomy of tomato fruit presents a large diversity of tissues, analysis of compartment composition provided information about the relative contribution of each compartment to the perception of texture. This was performed not only at the macroscopic scale by measuring pericarp thickness, volume and number of locules, but also at the cellular scale by observing cell structure and the organisation of the pericarp.

The objectives of this work were threefold: first, to determine multiple texture characteristics of tomatoes using different approaches and to correlate the different traits; second, to assess the genetic control of texture-related traits by analysing the effect of QTLs in different genetic backgrounds; and third, to understand the physiological basis of texture, in particular fruit firmness, during fruit development.

## II. Materials and methods

### II.1. Plant material

Five major regions, located on four chromosomes, were shown to be involved in fruit quality. A QTL for sourness was detected on chromosome 1, QTLs for sweetness, tomato aroma intensity, mealiness and meltiness were detected on chromosome 2, a QTL for mealiness was detected on chromosome 4, QTLs for sourness, tomato aroma intensity, mealiness, meltiness and flesh firmness were detected on the top of chromosome 9, and a QTL for pharmaceutical aroma was detected on the bottom of chromosome 9. QTLs for physical and chemical traits were also detected in these regions. A marker-assisted selection scheme was set up to obtain a line cumulating the five regions of interest from Cervil, a cherry tomato line with a high organoleptic potential, in different genetic backgrounds (Lecomte *et al.*, 2004a) and the respective QTL-NILs for each region in each genetic background



(Chaïb *et al.*, 2006). The genetic backgrounds used were Levovil (hereafter referred to as Lgb) and VilB (hereafter Bgb) a modern line with large fruits, firmer than those of Levovil and with good post-harvest performance. The experiments were performed on two types of introgressed lines from different genetic backgrounds: genotypes cumulating five regions of interest for fruit quality and on QTL-NILs for the regions mainly involved in fruit texture on chromosome 4 and on chromosome 9 (Fig. IV.1). The lines cumulating the five regions in Lgb and Bgb were named Lx and Bx respectively. The QTL-NILs were named NIL-L4, NIL-L9, NIL-B4 and NIL-B9 with the letter corresponding to their genetic background, and a number corresponding to the QTL region. NIL-B9 is a line cumulating the top of the chromosome 9 and a region from the chromosome 1, no QTL for fruit texture was detected on chromosome 1.

### *II.2. Growth periods and design of trials*

Two trials were performed during spring in a heated glasshouse. In 2004, the parental lines, the lines cumulating the five regions, and the QTL-NILs in the two genetic backgrounds were studied. Each line was represented by a single plot of six plants, grown in soil. Several types of analyses were performed on red ripe tomatoes: physical measurements, sensory profiling, fruit morphology and cellular structure of pericarp. In 2006, measurements were performed at four stages of fruit development following anthesis on the same lines, except NIL-B4. Five plants per line were grown in pots. The four stages of development were: 14 days post-anthesis (14 DPA), 35 days post-anthesis for mature green (35 DPA), breaker (B) and red ripe tomatoes (RR). To harvest the two first stages, flowers were tagged at anthesis. For the two other stages, fruits were harvested based on fruit colour. Physical traits and ethylene production were measured.

### *II.3. Physical and physiological measurements*

In 2004, red ripe fruits were harvested in bulk on the six plants in each plot twice a week for six weeks. At the first harvest each week, seven fruits from each batch were taken randomly in each plot in order to obtain six sets per line (6 independent repetitions). This strategy was preferred to harvesting individual plants as there is more variation between week rather than among plants (unpublished results). A total of 42 fruits per plot were evaluated for physical traits. Fruit-by-fruit evaluations were performed for fruit weight (FW), colour, firmness (FIRd, FIRp) and "total elasticity" (ELA). Fruit colour was measured using the CIE L\*a\*b (lightness/green-to-red scale/blue-to-yellow scale) colour space with a Minolta chromameter CM-1000R (Minolta, Ramsey, N.J.). Fruit firmness was measured with a Durofel<sup>®</sup> (FIRd) and with a Penelaup<sup>®</sup> penetrometer (FIRp). For FIRd, a probe was applied at two points on the fruit equator, the displacement of the probe when compressing the fruit was recorded and the average of the two measures was used. The Penelaup compressed the fruit between two steel plates. Force was applied by the upper plate to deform the fruit by 3% of its initial diameter and the resulting deformation and force were measured. FIRp is the mechanical stress

needed to deform the fruit (force per surface unit). Total elasticity, ELA, was the slope of the force/displacement curve. As fruits from the Cervil parental line are small, FIRd, FIRp and ELA were not measured.

In 2006, measurements of FW, fruit colour, FIRp, ELA and ethylene production were performed during fruit development on an average of 30 fruits per line and stage, from several trusses of the 5 plants. Ethylene production was measured by gas chromatography (IGC 121 FL) after 1.5 hours of confinement of one fruit in a jar (Chambroy *et al.*, 1995).

#### *II.4. Sensory profiling*

Red ripe tomatoes were harvested in the morning of the day they were to be tasted. Homogeneous fruit samples were selected and stored at 20°C in an air-conditioned room. The sensory panel was composed of 15 judges, who had previously been trained in the quantitative description of tomato attributes according to selection trials based on French norms (ISO8586-1, AFNOR V09-003). For each line, fruits were tasted two times by each judge, giving 30 scores per genotype. Fifteen sessions were held in a sensory analysis laboratory (AFNOR norm V09-105), on two days per week, and eight fruits were tasted by each judge on each occasion. The attributes chosen to describe fruit texture were firmness, juiciness, mealiness and skin toughness. Each was scored on a 10 point scale.

#### *II.5. Macroscopic study of fruit morphology*

The internal structure of the fruit was investigated on red ripe tomatoes. Five fruits were analysed per line. An approximately 0.5 cm thick transversal section was cut in the tomatoes and locules were drained by removing gel and seeds with a vacuum pump. The section was placed on a dark support and an image with a resolution of 768x574 pixels was acquired using a CCD camera. Three types of calibration were used to observe the minimum area in relation to the size of the fruit: calibration 0 for a field of view 51.48 mm in width, calibration 1 for 86.16 mm, calibration 2 for 130.20 mm. A computer program developed by F. Duprat at INRA-Montfavet was used to automatically measure the locule number (LONB), the percentage of locule area (%LO) and the relative thickness of the pericarp (PERIr) in relation to the total area.

#### *II.6. Analysis of the cellular structure of pericarp*

Analysis of the cellular structure of the pericarp was performed on red ripe tomatoes. As the largest parenchyma tomato cells can be more than 500 µm long, macroscopic vision was used to observe a representative number of cells and their arrangement within the pericarp. For each genotype, eight fruits were analysed and three samples were stamped in the equatorial region of the tomato using a circular punch 1 cm in diameter. Sections were cut in the middle of the sample using a vibrating microtome (Microm HM 650 V). The thickness of the section was set at 200 µm. Images were

acquired as described in Devaux *et al.* (2005). For each image, the field of view was 10.7x14.4 mm with a pixel size of 18.6x18.6  $\mu\text{m}$ .

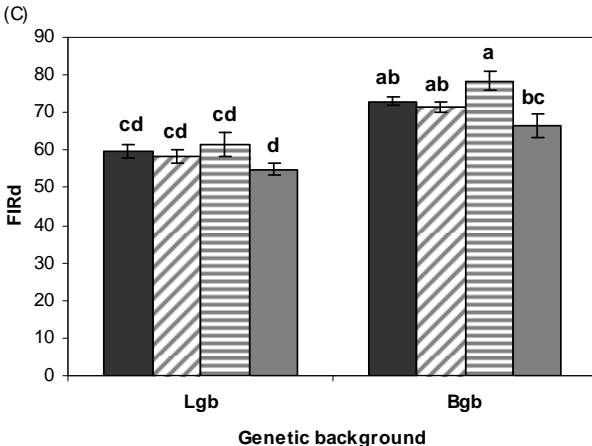
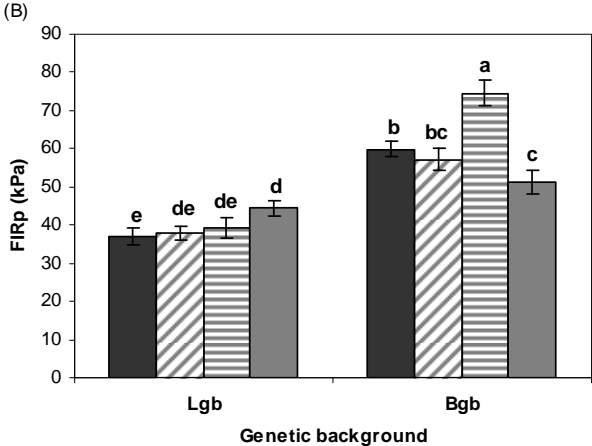
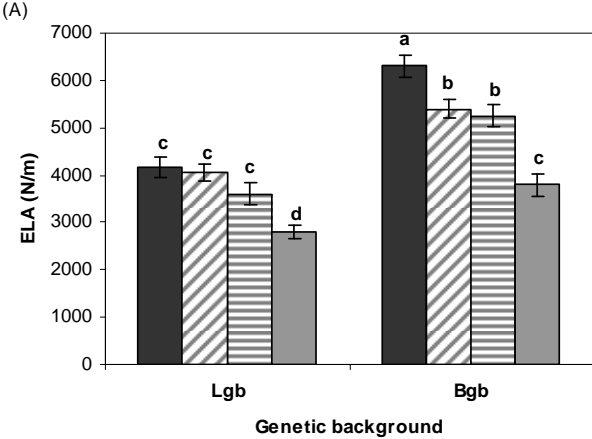
Image analysis was performed as follows. The pericarp was segmented in the image. Cells were closed by a reconstruction operator using a squared structuring element of size 50 and a connectivity of 4 (Soille, 2003). Pericarps were extracted by thresholding the resulting image using a fixed grey level value of 50. A measure of pericarp thickness was achieved as the average length of the 100 central columns of the images. Final region of interest within pericarp was obtained after removing the cuticle by an erosion using a squared structuring element of size 20. Grey levels within the pericarp region were standardised by histogram equalisation. Information concerning cell size distribution was extracted within the pericarp by mathematical morphology using a global technique based on grey level granulometry (Soille, 2003). Such techniques can be applied when objects cannot easily be segmented, which was the case for the scale and resolution used in the present work. The method consists in applying a basic procedure called 'closing'. Closing is based on the comparison of images to structuring elements of given size and shape. Only particles larger than the structuring element remain after opening. A size distribution can be obtained by applying a sequence of closings with structuring elements of increasing size. After each closing step, the sum of grey levels is computed. This sum depends both on the objects remaining and on their grey levels. Variations in grey levels between each step can be plotted as a function of the size of the structuring elements. The resulting curves are called granulometric curves. In the present work, 40 successive openings were applied that used linear structuring elements of lengths ranging from 56  $\mu\text{m}$  to 1505  $\mu\text{m}$  by increments of 37.2  $\mu\text{m}$ . Linear elements were chosen to assess cell elongation in the direction perpendicular to the skin. The orientation of the element was set at 90°. Image analysis procedures were developed using Aphelion 3.2g software (ADCIS France).

### II.7. Statistical tests

For sensory analysis, an ANOVA (genotype, judge and their interaction) test was performed for each attribute to evaluate panellist performance and to eliminate judges and attributes showing extreme variance. For physical measurements and sensory profiling, data from the QTL-NILs were first compared by a two-factor analysis of variance to test differences between the introgressed chromosomal fragment, the genetic background and their interaction (data not shown). All the genotypes were then ranked using a Duncan test. The Cervil line was not included in these analyses because it was too different from the other lines. These statistical analyses were performed using Splus software (Splus, 1993). Pearson coefficients of correlations were calculated between physical measurements, sensory analysis, fruit morphology and cellular structure of pericarp data, measured on red ripe tomatoes. Analysis of data concerning the cellular structure of pericarp was performed using principal component analysis as described in Devaux *et al.* (2005).

**Figure IV.2. Physical measurements of texture-related traits on red ripe tomatoes.**

Mean values were calculated for ELA (A), FIRp (B) and FIRd (C). Confidence intervals at  $P=0.05$  are represented by bars. Means with the same letter are not significantly different at  $P=0.05$ . Levovil and VilB parental lines are in black, NIL-L4 and NIL-B4 in diagonal stripes, NIL-L9 and NIL-B9 in horizontal stripes, and Lx and Bx in grey.



### III. Results

#### *III.1. Physical and sensory analysis of texture related traits*

To assess fruit texture, physical and sensory analysis were performed in various genotypes, in two genetic backgrounds, that differed in one or five regions of the tomato genome involved in fruit quality and particularly in texture: Levovil, NIL-L4, NIL-L9, Lx, ViIB, NIL-B4, NIL-B9 and Bx. Three components were measured to describe physical texture (Fig. IV.2): fruit elasticity (ELA) and firmness using two instrumental methods (FIRp and FIRd). Firmness, mealiness, skin toughness and juiciness described sensory attributes of texture (Fig. IV.3).

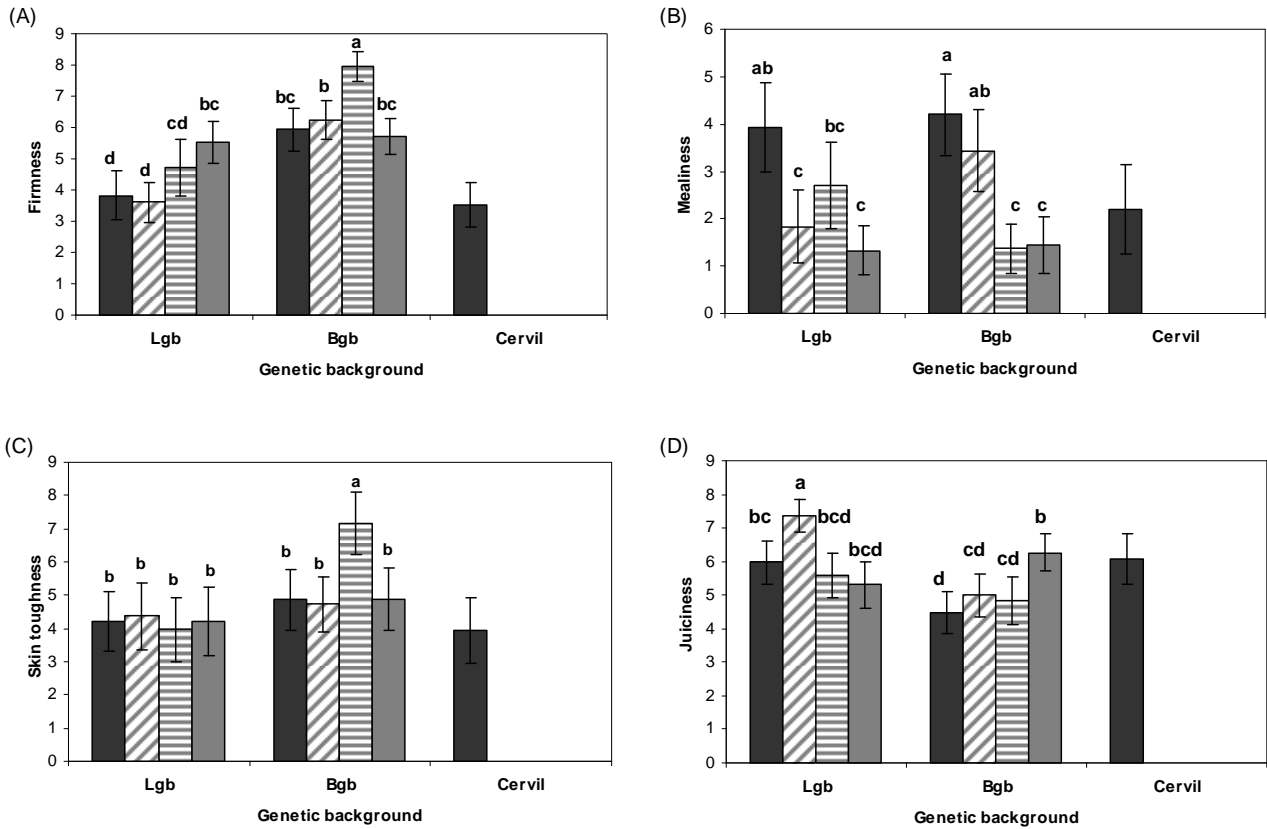
The difference in firmness between ViIB and Levovil was confirmed by both physical measurements and sensory analysis. ViIB showed higher fruit elasticity than Levovil while Levovil was juicier than ViIB. No difference was observed for mealiness or skin toughness. The individual effects of the QTLs of chromosome 4 on texture parameters were generally not significant compared to the parental lines. Significant differences were observed only for NIL-L4, which was juicier and less mealy than Levovil, and for fruit elasticity for NIL-B4, which was slightly less elastic than ViIB. The QTLs of chromosome 9 showed more effects on texture traits. Differences were observed between NIL-B9 and ViIB in firmness, mealiness and skin toughness, the QTL-NIL being less mealy and firmer than the parental line (at physical and sensory levels). Similarly, NIL-L9 was firmer and less mealy than Levovil but less significantly. There were notable differences in the effects of the introgression of several QTLs in Lx and Bx. These lines presented less elasticity and mealiness compared to the corresponding parental lines. The firmness attribute evolved differently depending on the genetic background, Lx was firmer than Levovil, while Bx was less firm than ViIB. Only NIL-Bx was juicier than the parental line. For Lx and Bx, no significant difference was noted for skin toughness.

#### *III.2. Morphological analysis at macroscopic and cellular levels*

The macroscopic study of fruit morphology was conducted by analysing transverse sections of tomatoes at the red ripe stage (Fig. IV.4). Locule number (LONB), the percentage of locule area in relation to total area (%LO) and the relative thickness of the pericarp (PERIr) were measured and means were compared. For NBLO, two groups were detected, one corresponding to lines with many locules including Levovil, NIL-L4 and NIL-L9, and one corresponding to a mean of two locules for Lx and all the lines in Bgb (ViIB, NIL-B4, NIL-B9, Bx). For %LO, Levovil had the highest value and NIL-L4, Lx and ViIB had the lowest means. The other lines were situated between these two groups and very close, except for NIL-B4 which was closer to the group containing ViIB. The relative thickness of the pericarp, PERIr, showed less variation and was distributed in three groups. The lines with the thickest pericarp were ViIB and NIL-B4 while NIL-L4 and NIL-L9 have the thinnest. Means for Levovil, Lx, NIL-B9 and Bx were situated between the two groups.

**Figure IV.3. Sensory analysis of texture attributes on red ripe tomatoes: firmness (A), mealiness (B), skin toughness (C) and juiciness (D).**

Mean values were calculated and confidence intervals at  $P=0.05$  are shown by bars. Means with the same letter are not significantly different at  $P=0.05$ . The parental lines Levovil, ViB and Cervil are in black, NIL-L4 and NIL-B4 in diagonal stripes, NIL-L9 and NIL-B9 in horizontal stripes and Lx and Bx in grey.



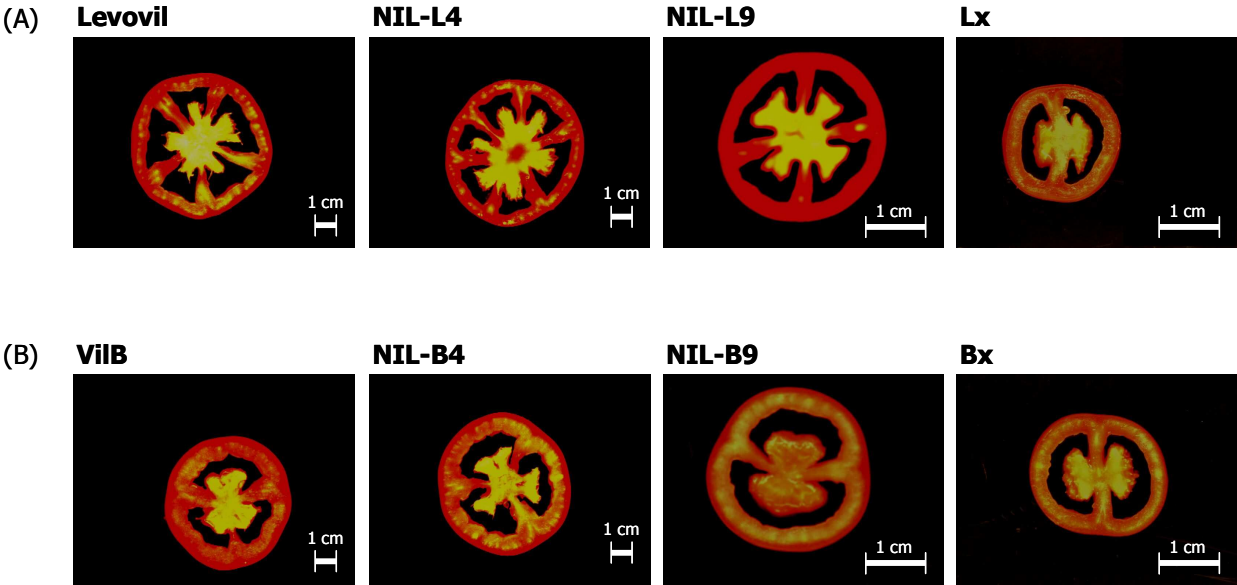
The distribution of different sized and shaped cells in the pericarp of red ripe tomatoes was assessed by macroscopic image analysis (Fig. IV.5). In all images, white spots were observed in the middle of the pericarp that corresponded to vascular bundles. In all lines, smaller cells were observed under the cuticle, which is the region where cell divisions occur (Cheniclet *et al.*, 2005). Cell morphology differed depending on the parental line: Cervil displayed small cells (data not shown) while they were larger in Lgb and more elongated in Bgb lines. In addition, elongation occurred perpendicularly to the cuticle. Image analysis was therefore performed to measure cell length observed at an angle of 90° to the fruit skin (Fig. IV.6A). Granulometric curves exhibited one large peak corresponding to the length at which the majority of cells were removed by image transformation. The peaks were located between 100 and 500 µm: Lx, Bx, NIL-B9 and NIL-L9 lines showed smaller cells than NIL-L4, NIL-B4 and the parental lines. Principal component analysis was applied to the set of granulometric curves computed for all macroscopic images (Fig IV.6B). The two first principal components took into account 67% and 19% of the total variance, respectively. The first principal component (pc1) described the average length with the small cell size on the left and the larger cell size on the right. NIL-L4 and NIL-B4 were not distinct from their parental lines and NIL-B9, NIL-L9, Lx and Bx cells were shorter. The second principal component (pc2) highlighted the heterogeneity of cell distribution with an average cell length ranging between 200 and 400 µm located at the top of the map (positive scores) and the occurrence of simultaneously small and elongated cells located at the bottom of the map (negative scores). The two genetic backgrounds were separated by this component. VilB, NIL-B4, NIL-B9 and Bx were mostly located on the negative side while Levovil, NIL-L4, NIL-L9 and Lx were mostly located on the positive side.

### III.3. Evolution of texture traits during fruit development

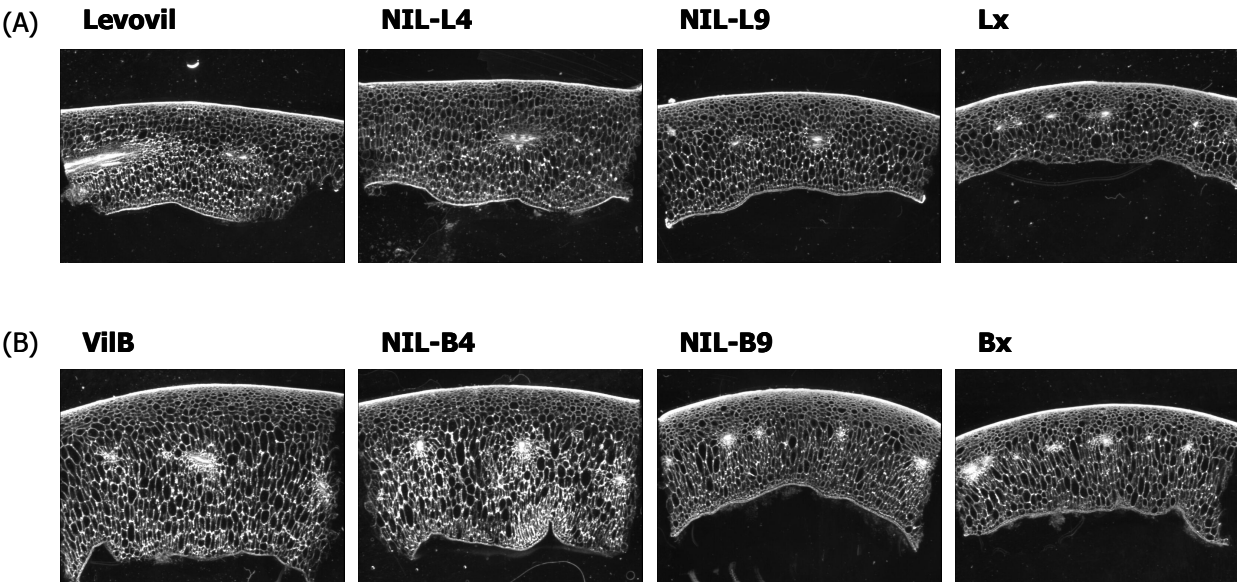
In order to define when differences in texture behaviour occur, fruits were characterized during the course of fruit development. Fruits were collected at four stages of development: 14 days after anthesis (14 DPA) corresponding to the growth stage, 35 days after anthesis (35 DPA) corresponding to mature green fruits, at the breaker stage (B) when fruits began ripening, and at the red ripe stage (RR). Fruits were characterized by colour, weight, ethylene production and firmness (Fig. IV.7).

No difference in fruit weight (Fig. IV.7A) was found between lines at the 14 DPA stage, whereas there was a significant difference in fruit weight between the two groups from 35 DPA until the ripe stage. The first group included the parental lines and NIL-L9 and showed higher weight (around 100 g at 35 DPA and 140 g at the ripe stage) than the second group (around 50 g) containing NIL-B9 and lines carrying the five QTL (Lx and Bx). The colour of fruits (Fig. IV.7B) in all lines was similar during the developmental phases as long as fruits remained green, up to 35 DPA (a around -13). A significant difference was observed at the breaker stage (a from 9 to 15) when fruits began to ripen and to change from green to orange. At the red ripe stage, a very slight but non-significant difference was observed between lines.

**Figure IV.4. Transverse section of tomatoes at the red ripe stage for parental lines and introgression lines in Lgb (A) and Bgb (B).**  
Bar scale 1 cm.



**Figure IV.5. Macroscopic images of pericarp sections for parental lines and introgression lines in Lgb (A) and Bgb (B).**  
The field of view was 10.7x14.4 mm.





Ethylene production was only measured on fruits with Lgb. As expected, ethylene (Fig. IV.7C) was produced at the breaker stage when fruits began to ripen and there was a significant difference between lines. The lines with the five introgressed QTL or only with the region on chromosome 9 produced more ethylene than the parental line. Concerning fruit firmness, in Lgb, only Lx displayed higher FIRp values throughout fruit development, whereas Levovil and NIL-L9 were almost identical. Very few differences between lines were observed in Bgb. Bx displayed the highest values in the green stages whereas NIL-B9 displayed the highest values in the breaker and red ripe stages. Two types of kinetic pattern were distinguished. Lx and NIL-B9 curves decreased regularly, while for the other lines, loss of firmness was greatest between 35 DPA and the breaker stage.

#### III.4. Correlations between texture related traits

Correlations between traits measured at physical and sensory levels were calculated (Table IV.1). The parameters pc1 and pc2 of the principal component analysis of the granulometric curves described above were used to take the cellular structure of pericarp into account.

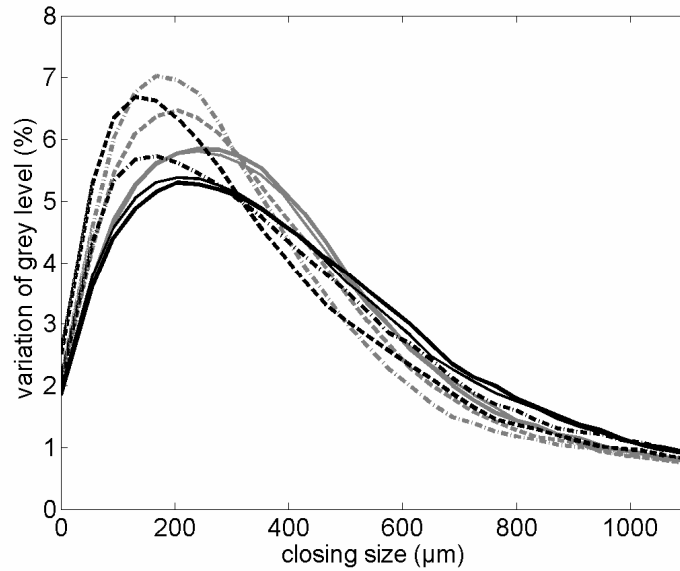
For physical traits, positive correlations were highly significant between the texture parameters FIRd and FIRp, FIRd and ELA, and ELA and PERIa. Regarding cellular structure parameters, the cell size, pc1, was positively correlated to PERIa, to FW and to the colour component a. For the heterogeneity of cell distribution, negative relationships were observed between pc2 and both FIRp and FIRd and a positive correlation with NBLO. Finally, a was positively correlated to ELA and PERIa, as were FW and NBLO. For sensory traits, correlations were positively significant between firmness and skin toughness and negatively between firmness and juiciness. Concerning the links between physical and sensory traits, a highly significant positive correlation was observed between firmness and FIRp, slightly lower with FIRd. The same relationship was detected between skin toughness and FIRp/FIRd. Firmness and NBLO showed a negative correlation, as between firmness and pc2. Juiciness was negatively correlated to FIRp and to PERIr. Mealiness was correlated positively to FW, to a, to pc1 and to PERIa. A negative correlation was observed between skin toughness and pc2.

## IV. Discussion

Many studies describe tomato fruit texture (Barrett *et al.*, 1998) but very few combine such different approaches as rheological, sensory, chemical and physiological measurements, and even fewer analyse genetic determinism (Causse *et al.*, 2002; Doganlar *et al.*, 2002; Frary *et al.*, 2003; Fulton *et al.*, 2000). In this study, we used complementary methods to describe several components of tomato fruit texture and to identify instrumental measurements associated with sensory texture attributes. The physical measurements provided information about the deformation resistance of whole fruit and fruit elasticity while sensory analysis provided detailed information about internal perception of texture through attributes such as flesh firmness, juiciness, mealiness or skin toughness.

**Figure IV.6A. Average granulometric curve for the pericarp of each line.**

The closing size corresponds to the length of the linear structuring element. Curves in grey and in black correspond to lines in Lgb and in Bgb, respectively. The solid line in bold represents VilB and Levovil parental lines, the solid line (not bold) NIL-B4 and NIL-L4, the dashed line NIL-B9 and NIL-L9 and the dotted-dashed line Bx and Lx.



**Figure IV.6B. Principal component analysis of granulometric curves combined with image analysis of pericarp.**

Grey and black lines correspond to Lgb and in Bgb lines, respectively. The solid line in bold represents VilB and Levovil parental lines, the solid line (not bold) NIL-B4 and NIL-L4, the dashed line NIL-B9 and NIL-L9 and the dotted-dashed line Bx and Lx.

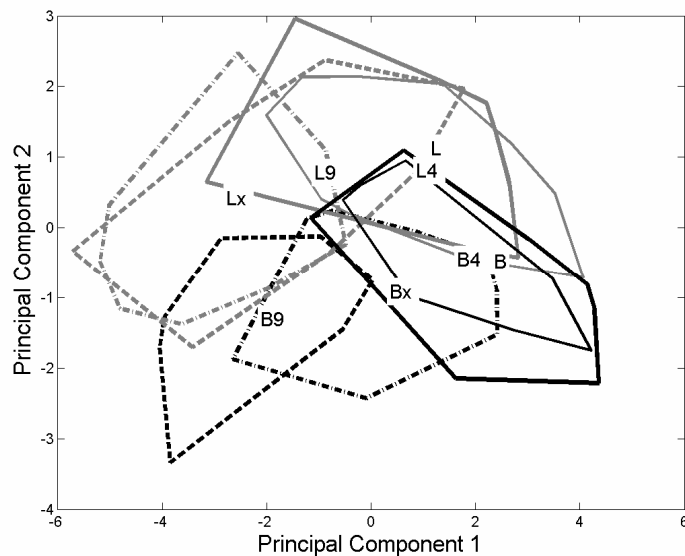


Image analysis provided information about the morphology of the fruit and the structure and heterogeneity of the pericarp cells. In addition, the genetic control of these traits was assessed by studying the effects of texture-related QTLs and their interaction with genetic background. Indeed, different chromosome regions were previously identified as being involved in fruit firmness and mealiness (Causse *et al.*, 2002; Saliba-Colombani *et al.*, 2001) and were introgressed in two texture-contrasted parental lines, VilB and Levovil. In this study, physical and sensory evaluations showed that VILB and Levovil differed for several texture related traits and confirmed the interest in their use to study the impact of genetic background on the effect of the previously described QTLs.

#### *IV.1. QTLs effects on texture traits*

Although QTL for mealiness, firmness and fruit elasticity were detected on chromosomes 4 and 9 in the RIL population derived from the cross between Cervil and Levovil, the individual effects of these QTLs on texture parameters were generally not significant in QTL-NILs compared to the parental lines. For sensory firmness, the major QTL was detected in RILs on chromosome 9 (Fig. IV.1) and another QTL was detected on chromosome 2 (in the same region as for mealiness), the Cervil alleles providing the highest values for these traits. For instrumental firmness, the Cervil and the Levovil alleles provided the higher values of the trait for the QTL on chromosome 4 and on chromosome 9, respectively. The inconsistency of QTL effects in QTL-NILs compared to RILs was particularly observed in Lgb. Nevertheless, the expected QTLs based on RIL data were detected in the lines cumulating the five regions of interest, Lx and Bx, but with an opposite effect for firmness in both lines. New QTLs for juiciness and for skin toughness were detected on chromosomes 4 and 9 in QTL-NILs, respectively, but these effects were not observed in Lx and Bx. The variations in the QTL effects observed in Lx and Bx could be explained by the fact that these lines cumulate several QTLs for the same trait, sometimes with opposite effects depending on the chromosomic region. Such inconsistency in the behaviour of the introgressed lines could be due to interactions between QTLs but also between different parts of the same region since they represent large chromosome fragments (from 20 to 50 cM). Concerning fruit morphology, no significant QTL effect was observed among introgressed lines with respect to the locule area or the relative thickness of the pericarp. A difference was observed for the locule number between Levovil and Lx in relation to the presence of the region of chromosome 2 where a QTL with large effect for this trait was detected in RILs. In addition, the classification of genotypes by variance analysis for the cellular structure and organisation of pericarp (pc1 associated to pc2) was similar to that obtained for firmness (data not shown), suggesting that the pericarp of firm tomatoes is composed of small cells under the cuticle. Tomatoes with the thickest pericarp showed more elongated cells.

**Table IV.1. Pearson coefficient of correlations between texture related traits of the means for the parental lines Levovil and ViIB and the corresponding introgression lines (NIL-L4, NIL-L9, Lx, NIL-B4, NIL-B9 and Bx).**

	Juiciness	Firmness	Mealiness	Skin toughness	ELA	FIRp	FIRd	FW	a	NBLO	%LO	PERIr	PERIa	pc1	pc2
Juiciness	1														
Firmness	-0.73*	1													
Mealiness	ns	ns	1												
Skin toughness	ns	0.83**	ns	1											
ELA	ns	ns	ns	ns	1										
FIRp	-0.68*	0.95**	ns	0.89**	0.67*	1									
FIRd	ns	0.81**	ns	0.80**	0.83**	0.92**	1								
FW	ns	ns	0.81**	ns	ns	ns	ns	1							
a	ns	ns	0.78**	ns	0.84**	ns	ns	ns	1						
NBLO	ns	-0.84**	ns	ns	ns	-0.72*	ns	0.79**	ns	1					
%LO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1				
PERIr	-0.70*	ns	ns	ns	0.64*	0.64*	ns	ns	0.75*	ns	ns	1			
PERIa	ns	ns	0.80**	ns	0.88**	ns	ns	0.69*	0.94**	ns	ns	ns	1		
pc1	ns	ns	0.73*	ns	ns	ns	ns	0.78**	0.80**	ns	ns	ns	0.85**	1	
pc2	ns	-0.90**	ns	-0.79**	ns	-0.92**	-0.85**	ns	ns	0.85**	ns	ns	ns	ns	1

Stars indicate significant correlations: \*\* at  $P < 0.01$  and \* at  $P < 0.05$ .

#### IV.2. Genetic background and environment effects on texture traits

This study demonstrated the impact of the genetic background and/or of the environment on the expression of texture-related QTLs (at the physical and sensory levels) and possible interactions between them. Differences in the effects of QTLs as a function of genetic background were observed for all the characters studied: firmness and skin toughness for NIL-B9, juiciness for NIL-L4 and Bx, mealiness for all the QTL-NILs. In a previous study (Chaïb *et al.*, 2006), the individual effects of QTL for firmness in both Levovil and ViB genetic backgrounds were not observed. This was partly explained by the different instrumental methods used to analyse this character. In this study, Durofel<sup>®</sup> measurements were highly correlated to Penelaup<sup>®</sup> data, confirming the inconsistency of the individual effect of QTLs for firmness, suggesting allelic differences at the loci of interest. A significant individual effect on firmness was observed for the QTL located on chromosome 9 in the ViB genetic background, which was not detected in (Chaïb *et al.*, 2006). Such variations confirm that firmness interacts strongly with environmental conditions such as year of cultivation or location (Bernacchi *et al.*, 1998; Chaïb *et al.*, 2006).

#### IV.3. Correlations between texture traits

The statistical correlations between physical, sensory and morphological results revealed that several parameters are linked. As a limited number of lines in two contrasted genetic backgrounds were used to calculate the Pearson coefficient of correlation, the impact of the genetic background was tested previously. Differences in the significant correlations detected were studied using Lgb lines or Bgb lines separately (data not shown). Consequently only correlations that were confirmed graphically within each genetic background are detailed hereafter. A highly positive correlation was revealed between sensory and physical firmness (measured by penetrometry); this confirmed previous results observed during the detection of QTL in the RIL population (Causse *et al.*, 2002). However, the negative correlation between juiciness and pericarp elasticity observed in the first study was not reproduced here. The present work showed a negative relationship between firmness and juiciness, locule number and the heterogeneity of cell distribution in the pericarp and a positive correlation between firmness and skin toughness. These results suggested that the firmest fruits were less juicy with a tough skin, had a low locule number and a pericarp with an heterogeneous cell distribution. Many of these traits associated with firmness were also correlated between themselves, as were skin toughness and the presence of small cells under the cuticle. However, we have shown that locule number is not associated with firmness since firm tomatoes with a high locule number exist (data not shown). Finally, a positive correlation was shown between mealiness and absolute pericarp thickness and between mealiness and cell size suggesting that mealy tomatoes had a thicker pericarp with elongated cells.



#### IV.4. Evolution of texture during fruit development

In order to understand when changes in texture behaviour occur, measurements of firmness were analysed throughout fruit development. It appeared that differences in firmness between lines occurred from the early stages of development. Parameters such as fruit weight, colour and ethylene production enabled four physiological stages to be defined. As expected, differences in fruit weight appeared at 35 DPA, corresponding to the cell elongation stage. Fruit weight was lower in relation to the number of Cervil alleles unfavourable for this trait. The breaker stage, corresponding to the beginning of the ripening stage, was defined by the change from green to orange (lycopene synthesis) and the beginning of ethylene production. It is interesting to note that ethylene emission was high in Lx which had the firmest fruit but it is difficult to relate to a particular physiological mechanism. Ethylene is known to regulate the expression of several genes connected with ripening, including fruit texture. These genes are principally involved in cell wall degradation, such as polygalacturonase, expansins or pectin methylesterase (Alexander and Grierson, 2002). Finally, as expected, firmness decreased during ripening associated with softening (Brummell, 2006). Nevertheless, the differences in firmness observed between lines appeared as early as the cell expansion stage (14 DPA) and subsequently remained constant. Thus, differences in firmness observed between red ripe tomatoes could result not only from cell wall degradation during ripening but also from the cellular organisation of the pericarp that occurs early during fruit development.

#### IV.5. Conclusion

This study enabled (i) the characterisation of several texture traits of tomato fruit and correlations to be established among some of them, (ii) the identification of genetic and environmental factors that influence the expression of some of these traits and finally (iii) the identification of the stage at which differences in firmness occur during fruit development. Sensory and instrumental evaluations of firmness were shown to be highly correlated whereas only sensory analysis was available for other attributes such as mealiness, juiciness and skin toughness (expensive experiments for routine measurements). For the parameters studied, correlations were established between (i) firmness and a heterogeneous cell distribution in the pericarp, (ii) between skin toughness and the presence of small cells under the cuticle and (iii) between mealiness and a thick pericarp composed of elongated cells. Moreover, analysis of the cellular structure of the pericarp and measurements of firmness statistically distinguished lines in the same way. Genetic control of firmness is complex, as interactions between QTLs and genetic background and interactions with the environment were observed. QTL effects for mealiness appeared to be more consistent, even though the influence of the genetic background was not negligible. In addition, while most studies on fruit texture showed that changes in firmness result from softening and cell wall degradation (Crookes and Grierson, 1983; Hallett *et al.*, 1992), we showed that these differences could also occur at early stages in fruit development. This could be linked to a previous relationship between firmness and the cellular structure of pericarp, so it will be

interesting to complete these observations by macroscopic image analysis of early stages of development. Preliminary results suggest very few differences in pericarp pattern at anthesis whereas marked variations are observed at the breaker stage as described in Cheniclet *et al.* (2005). To complete the study of cellular organisation, another approach would be to take into account the number of cells as a function of their shape and of their location in the tissue.

#### **Acknowledgements**

Many thanks to Emmanuel Botton for taking care of the plants, to Marielle Boge, Philippe Duffé, Esther Pelpoir and Cecile Garchery for their technical support, to Barbara Gouble and Sylvie Bureau for managing the physical evaluations, to Guy Jacquemin and Emilie Terrel for managing sensory profiling and to François Duprat and Abdelkrim Sadoudi, respectively, for developing the program for image analysis of transverse tomato section and for computing the macroscopic data. This project is partially funded by a trilateral co-operation initiative between France, Spain and Germany on plant genome research. The experiments comply with the current French laws.



## CHAPITRE V

# CARTOGRAPHIE FINE DE DEUX REGIONS D'INTERET LOCALISEES SUR LES CHROMOSOMES 4 ET 9

---

## CHAPITRE 5 \_ CARTOGRAPHIE FINE DE DEUX REGIONS D'INTERET LOCALISEES SUR LES CHROMOSOMES 4 ET 9

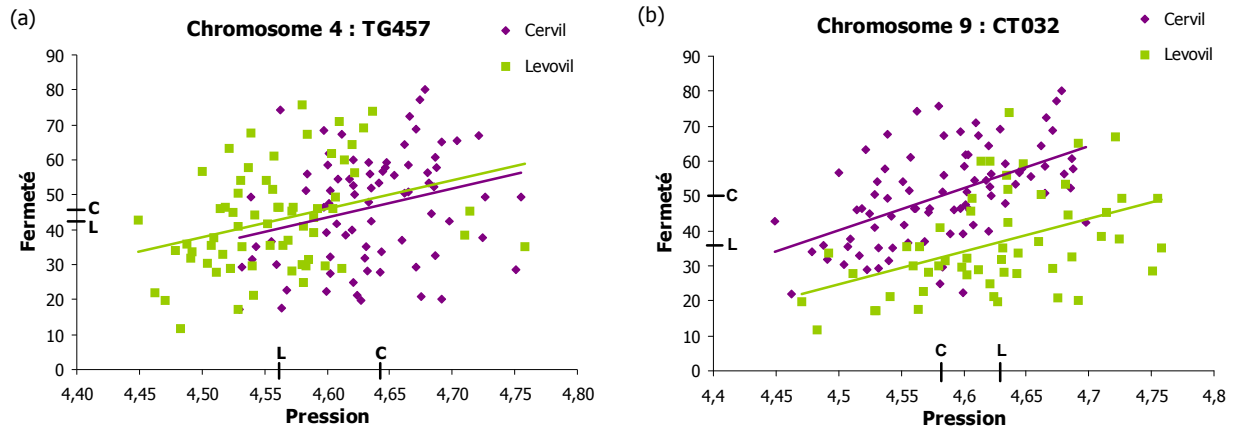
---

Des QTL associés à différentes composantes de la qualité organoleptique du fruit de tomate ont été localisés sur plusieurs chromosomes, dans la plupart des cas, regroupées en cluster (Chapitre 2, Figure II.2). Concernant la texture du fruit, les principales régions chromosomiques d'intérêt sont situées sur les chromosomes 4 et 9 où l'on retrouve à la fois des QTL contrôlant des caractères issus des analyses sensorielles et des mesures physiques. Sur le chromosome 4, les allèles de Cervil confèrent les plus fortes valeurs au phénotype pour la fermeté et l'élasticité du fruit (mesures instrumentales), tandis que pour la farinosité et la peau gênante, ce sont les allèles de Levovil qui augmentent les valeurs. Sur le chromosome 9, les effets des QTL détectés sont plus variables. Les allèles de Levovil confèrent toujours les valeurs élevées de farinosité et de fondant mais aussi de fermeté et d'élasticité du fruit alors que ce sont les allèles de Cervil pour la fermeté sensorielle. Pour simplifier la compréhension, pour la suite du chapitre, la fermeté fera référence à la fermeté sensorielle et la pression à la fermeté physique. Nous avons montré dans le chapitre 4 que la pression et la fermeté étaient très corrélées. Pourtant, les QTL détectés pour ces deux composantes ne colocalisent que dans la région du chromosome 9, des effets antagonistes selon l'origine des allèles étant par ailleurs observés.

De plus, les effets individuels des QTL de fermeté localisés sur les chromosomes 4 et 9 n'ont pas été observés au niveau des lignées quasi-isogéniques (QTL-NIL) correspondantes quel que soit le fonds génétique receveur, laissant présager des interactions entre QTL et/ou avec le fonds génétique (Chapitre 3). Il est également important de préciser que la taille des fragments chromosomiques introgressés pour chaque QTL-NIL est relativement grande: 19,7 cM pour NIL-L4 et 51,9 cM pour NIL-L9a, ce qui permet également d'envisager des interactions au sein même de la région introgressée, éventuellement entre plusieurs gènes liés. Enfin, pour ces deux régions des chromosomes 4 et 9, il est intéressant de noter que pour chaque QTL contrôlant la farinosité est systématiquement présent un QTL de pression et/ou de fermeté. A ce stade d'analyse, il est difficile d'expliquer cette colocalisation: s'agit-il de facteurs génétiquement liés, de pléiotropie ou est-il possible d'individualiser chaque QTL? Afin de mieux comprendre comment l'ensemble des QTL détectés s'organisent et interagissent, la cartographie fine des deux régions a été initiée. L'objectif sera d'affiner la localisation des QTL en réduisant l'intervalle contenant chacun d'eux et ainsi tenter de rompre les liaisons entre les différents caractères d'une même région. Pour cela, il est important de mener deux stratégies en parallèles : la densification en marqueurs des régions d'intérêt et la recherche de recombinants pour ces mêmes régions. Le criblage phénotypique des recombinants étant réalisé sur un grand nombre d'individus

**Figure V.1: Relations entre les mesures instrumentales et sensorielles de la fermeté du fruit pour les marqueurs au QTL du chromosome 4 et du chromosome 9.**

Les données des graphes (a) et (b) proviennent du phénotypage de la population de lignées recombinantes utilisée pour la détection de QTL. Les droites symbolisent les régressions linéaires pour chaque nuage de points. Les valeurs moyennes obtenues, pour chaque caractère, aux locus homozygotes Cervil et Levovil sont représentées sur les axes respectifs. Les coefficients de corrélation,  $r$ , (Pearson) obtenus pour chaque allèle au marqueur, pour la totalité des individus et le niveau de significativité sont présentés dans le tableau (c).



(c) Coefficient de corrélation,  $r$ , de la droite de régression pour chaque groupe d'individus

	TG457		CT032	
Allèle Cervil	0,2643	*	0,5223	***
Allèle Levovil	0,3210	*	0,4509	***
Total		0,3040		***

\*\*  $P > 0,05$ , \*\*\*  $P > 0,001$ .

implique de cibler des caractères faciles à mesurer, c'est pourquoi l'étude s'est focalisée dans un premier temps sur la fermeté du fruit.

En préambule, une analyse complémentaire des données de phénotypage pour la pression et la fermeté, obtenues pour la population de lignées recombinantes (RIL) à l'origine de la détection de QTL a été réalisée afin de préciser la corrélation détectée entre analyse sensorielle et mesure physique pour ce caractère, mais aussi afin d'explorer les relations pouvant exister entre les deux régions des chromosomes 4 et 9 associées au caractère de fermeté du fruit.

## I. Description des QTL de fermeté du fruit de tomate

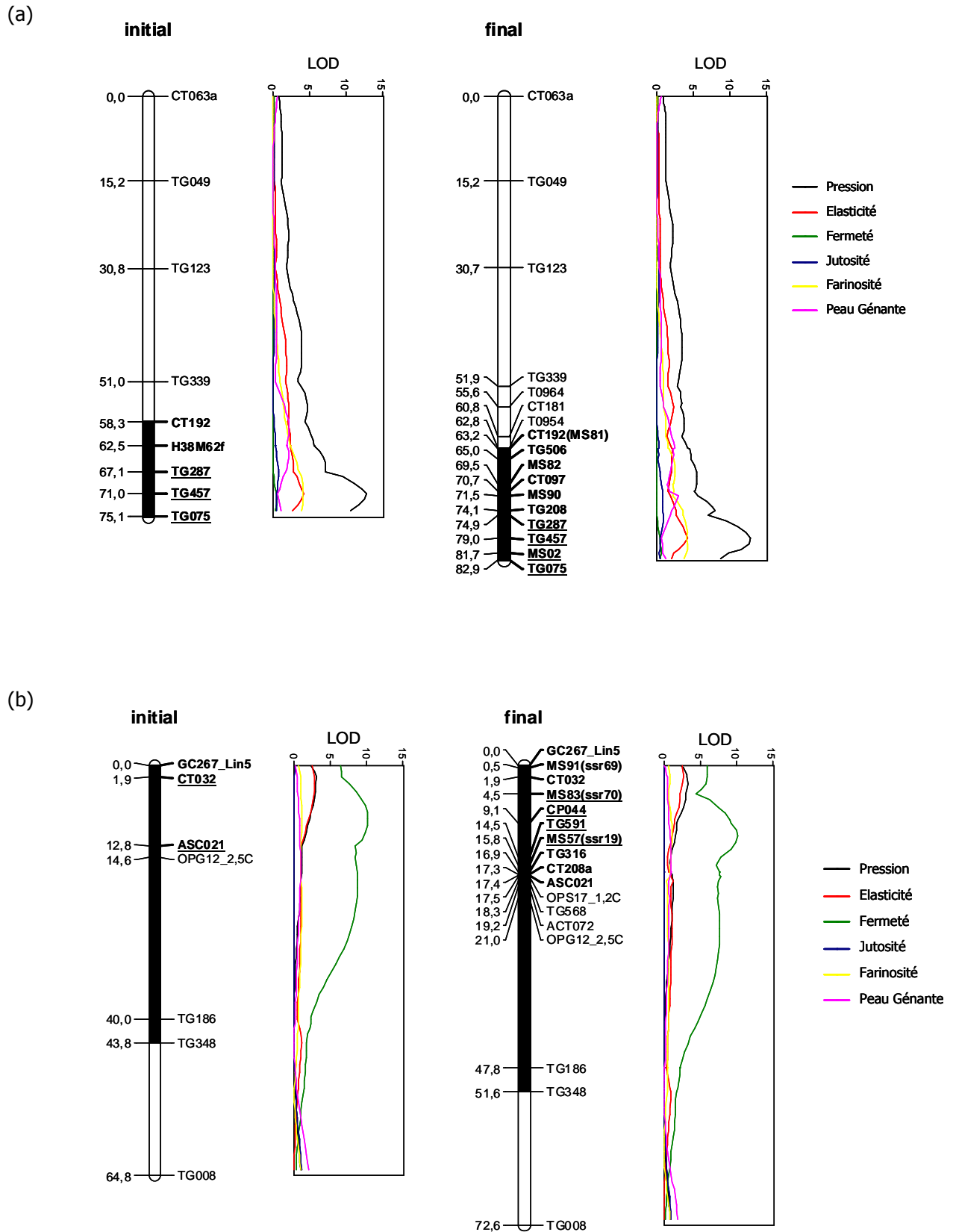
L'analyse des données obtenues sur l'ensemble des RIL montre une corrélation positive (de l'ordre de 0,3) et très significative entre la fermeté et la pression (Figure V.1), ce qui confirme les résultats obtenus au chapitre 4. Les marqueurs présentant les LOD les plus élevés aux QTL de pression sont TG457 et CT032 sur les chromosomes 4 et 9, respectivement. Ces représentations graphiques confirment les effets des QTL détectés pour la pression et la fermeté. Les nuages de points pour chaque allèle au marqueur se distinguent clairement et la localisation sur les axes des moyennes de pression et de fermeté obtenues aux locus homozygotes Cervil et Levovil informe sur la nature des allèles qui apportent les valeurs élevées au caractère. Ainsi, au marqueur TG457 sur le chromosome 4, les allèles de Cervil correspondent aux valeurs les plus élevées de pression alors que, pour la fermeté, les moyennes aux locus Cervil et Levovil sont très proches. De la même façon pour le chromosome 9 au marqueur CT032, les allèles de Cervil et de Levovil augmentent respectivement les valeurs de fermeté et de pression. Les QTL de fermeté et de pression précédemment décrits sont graphiquement validés. En distinguant les allèles Cervil et Levovil à chaque marqueur, les niveaux de corrélations intra-alléliques pour ces deux caractères restent très élevés au marqueur CT032 (Figure V.1b) et légèrement moins au marqueur TG457 (Figure V.1a). Cependant, les valeurs des coefficients de corrélations sont comprises entre 0,26 et 0,52, il n'est donc pas surprenant de ne pas systématiquement détecter un QTL de fermeté pour un QTL de pression.

## II. Densification en marqueur des deux régions chromosomiques

La stratégie BSA-AFLP pour la recherche de marqueurs polymorphes avait été utilisée pour la cartographie fine d'une région de 4,8 cM localisée sur le chromosome 2. Les mélanges d'individus avaient été construits de façon à cibler la région d'intérêt, ainsi qu'un intervalle de 50 cM réparti de part et d'autre de cette région. Sur 150 combinaisons AFLP testées, aucune ne présentaient le profil polymorphe correspondant à la région ciblée de 4,8 cM, et 6 marqueurs ont été cartographiés dans l'intervalle de 50 cM. Globalement, la stratégie a permis d'identifier des marqueurs dans un intervalle donné, mais pas dans la région d'intérêt qui était sans doute trop étroite. De plus, l'objectif de la densification est de disposer de marqueurs très proches du QTL afin de les utiliser pour la recherche

**Figure V.2: Evolution de la cartographie du chromosome 4 (a) et du chromosome 9 (b) suite à la densification en marqueurs des régions d'intérêt.**

Les courbes de LOD pour différentes composantes de la texture du fruit de tomate sont alignées aux cartes génétiques.



de recombinants sur de grands effectifs d'individus. Pour cela, il est préférable de disposer de marqueurs PCR. Or, l'étape de conversion de marqueurs AFLP en marqueurs PCR spécifique s'est révélée délicate notamment face au faible taux de polymorphisme existant entre les parents Cervil et Levovil. Par conséquent, la densification en marqueurs des régions d'intérêt localisées sur les chromosomes 4 et 9 a été réalisée par cartographie comparée, en utilisant les marqueurs présents sur la carte génétique Tomato-EXPEN 2000 du SOL Genomics Network (SGN). Cette carte a été obtenue à partir d'une population F2 de 80 individus issus d'un croisement interspécifique *S. lycopersicum* LA925 x *S. pennellii* LA716 (Tanksley *et al.*, 1992). Les 2327 marqueurs constituant cette carte correspondent essentiellement à des marqueurs RFLP, des microsatellites et des marqueurs COS (Conserved Ortholog Set). Ces derniers ont été développés à partir de différentes banques d'EST de tomate dont les séquences ont été comparées à celles du génome d'*Arabidopsis thaliana* afin de déterminer le niveau de syntenie entre les deux espèces (Fulton *et al.*, 2002). Pour chacune de nos régions cibles, les marqueurs flanquants le QTL ont été utilisés pour aligner la carte génétique issue du croisement entre Cervil et Levovil avec la carte Tomato-EXPEN 2000.

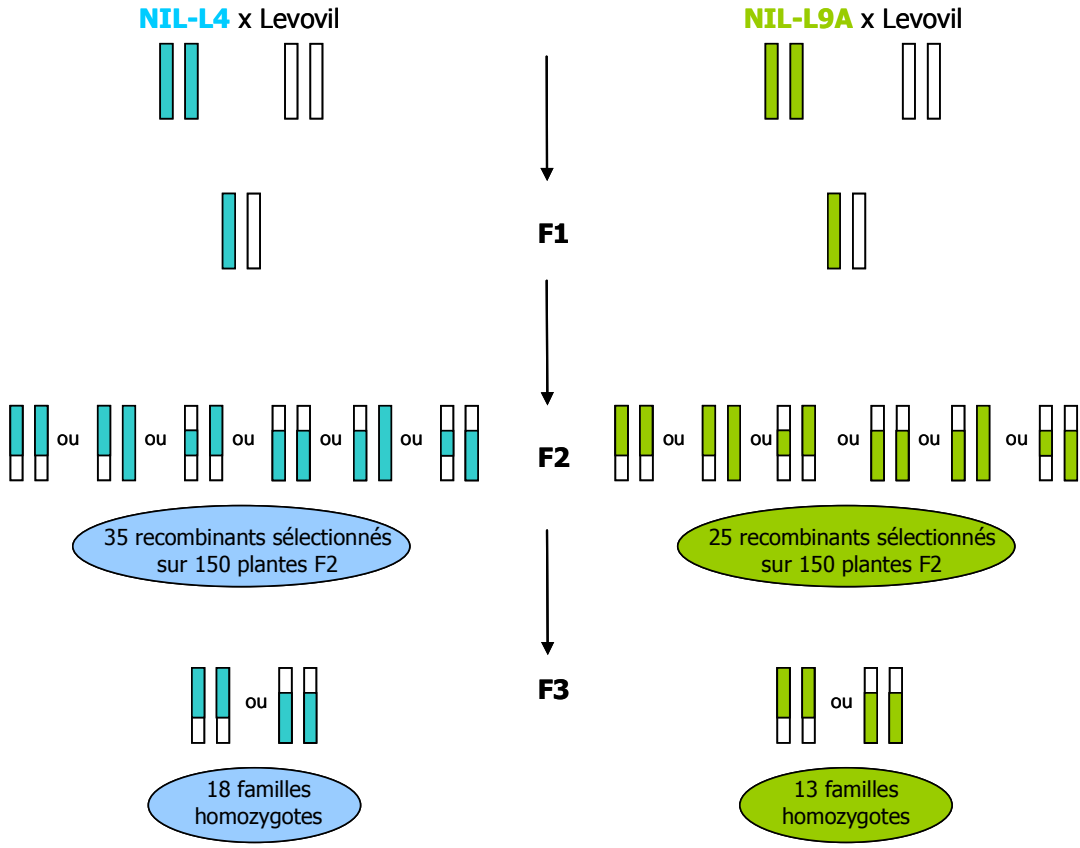
### II.1. Région d'intérêt du chromosome 4

Pour cette région (Figure V.2a), l'alignement avec la carte Tomato-EXPEN 2000 a été réalisé à partir des marqueurs RFLP CT192 et TG075, ce qui correspond à un intervalle moyen de 17 cM dans lequel se positionnait un marqueur tous les 4 cM environ. La région correspondante sur la carte Tomato-EXPEN 2000 a permis de sélectionner 20 marqueurs RFLP, 11 microsatellites et 28 COS. La recherche de polymorphisme entre les parents Cervil et Levovil a été réalisée pour l'ensemble des marqueurs RFLP et microsatellites et pour 4 COS. Ceci a permis de valider 12 marqueurs RFLP, 9 microsatellites et 2 COS, soit un taux de polymorphisme de 66% (Annexe 4). La cartographie de ces marqueurs a mis en évidence de nombreuses colocalisations, soit avec des marqueurs préexistants, soit entre les nouveaux marqueurs (Annexe 5). Sur les 23 marqueurs polymorphes, 9 correspondent à une nouvelle position dans la région ciblée du chromosome 4. La plus grande distance entre deux marqueurs est de 4,5 cM et la plus petite est de 0,8 cM, ce qui représente au final un marqueur tous les 2 cM en moyenne.

### II.2. Région d'intérêt du chromosome 9

A l'origine, la région du chromosome 9 (Figure V.2b) présentait peu de marqueurs dans l'intervalle et surtout deux grands espaces de 10 et 25 cM sans marqueur. Les marqueurs CT032 et TG186 ont permis la localisation de la région cible sur la carte Tomato-EXPEN 2000 qui correspond à un intervalle moyen de 40 cM. Neuf marqueurs RFLP, 4 microsatellites et 18 COS ont été identifiés. Tous les marqueurs RFLP et microsatellites ont été testés sur les parents Cervil et Levovil parmi lesquels 4 RFLP et 3 microsatellites se sont révélés être polymorphes, soit 54% des marqueurs (Annexe 4). Après cartographie, deux marqueurs colocalisaient avec un marqueur préexistant, ce qui représente 5

**Figure V.3: Schéma de sélection assistée par marqueurs utilisée pour la recherche de recombinants dans les régions d'intérêt des chromosomes 4 et 9.**



nouvelles positions dans la région ciblée du chromosome 9 (Annexe 5). La plus grande distance entre deux marqueurs est de 5,4 cM et la plus petite est de 0,4 cM, soit en moyenne un marqueur tous les 2 cM.

### *II.3. Efficacité de la densification en marqueurs des régions ciblées*

L'alignement des régions d'intérêt des chromosomes 4 et 9 avec la carte Tomato-EXPEN 2000 a permis de cartographier respectivement 9 et 5 marqueurs à de nouvelles positions. Ainsi, pour les deux régions, l'intervalle moyen entre deux marqueurs a été divisé par deux. Le taux de marqueurs polymorphes se situe autour de 60% ce qui est très supérieur aux taux précédemment observés entre Cervil et Levovil: 30% pour la cartographie du génome (Saliba-Colombani *et al.*, 2000) et 40% pour la densification de la région située sur le chromosome 2 (Lecomte *et al.*, 2004b). Ces premiers résultats sont encourageants et il reste encore de nombreux marqueurs COS à tester. Cependant, de plus en plus de colocalisations ont été observées pour les derniers marqueurs cartographiés, surtout pour le chromosome 4, ce qui rendra certainement plus difficile la poursuite de la densification de ces régions. Ces redondances de positions sont tout de même informatives car elles permettent de remplacer des marqueurs RFLP par des microsatellites ce qui sera très utile pour la recherche de recombinants. Enfin, les graphiques représentant les courbes de LOD de différentes composantes de la texture ont été alignées aux cartes génétiques des chromosomes 4 et 9: pression, élasticité, fermeté, jutosité, farinosité et peau gênante. Dans les deux cas, l'allure des courbes a peu évolué après la densification en marqueurs, la localisation des QTL n'est pas affinée (Figure V.2). Ceci montre bien que la quantité de marqueurs n'améliore pas forcément la précision de la localisation des QTL, un effectif élevé de la population phénotypée pour la détection des QTL étant beaucoup plus informatif (Kearsey, 1998; Lander and Botstein, 1989).

## **III. Sélection des familles recombinantes**

La recherche de recombinants pour les QTL de pression localisés sur les chromosomes 4 et 9 a été initiée à partir des populations F2 issues des croisements entre les lignées quasi-isogéniques et la lignée parentale Levovil: NIL-L4 x Levovil et NIL-L9a x Levovil (Figure V.3). Les lignées NIL-L4 et NIL-L9a se caractérisent par la présence d'un fragment chromosomique d'origine Cervil dans un fonds génétique Levovil (Chapitre 3). Chaque fragment introgressé représente respectivement un intervalle de 19,7 cM sur le chromosome 4 pour NIL-L4 et de 51,9 cM sur le chromosome 9 pour NIL-L9a. Les génotypes graphiques du chromosome concerné de ces lignées sont détaillés sur les figures V.4 et V.5, où les allèles Cervil, noté C, sont présents à tous les marqueurs.

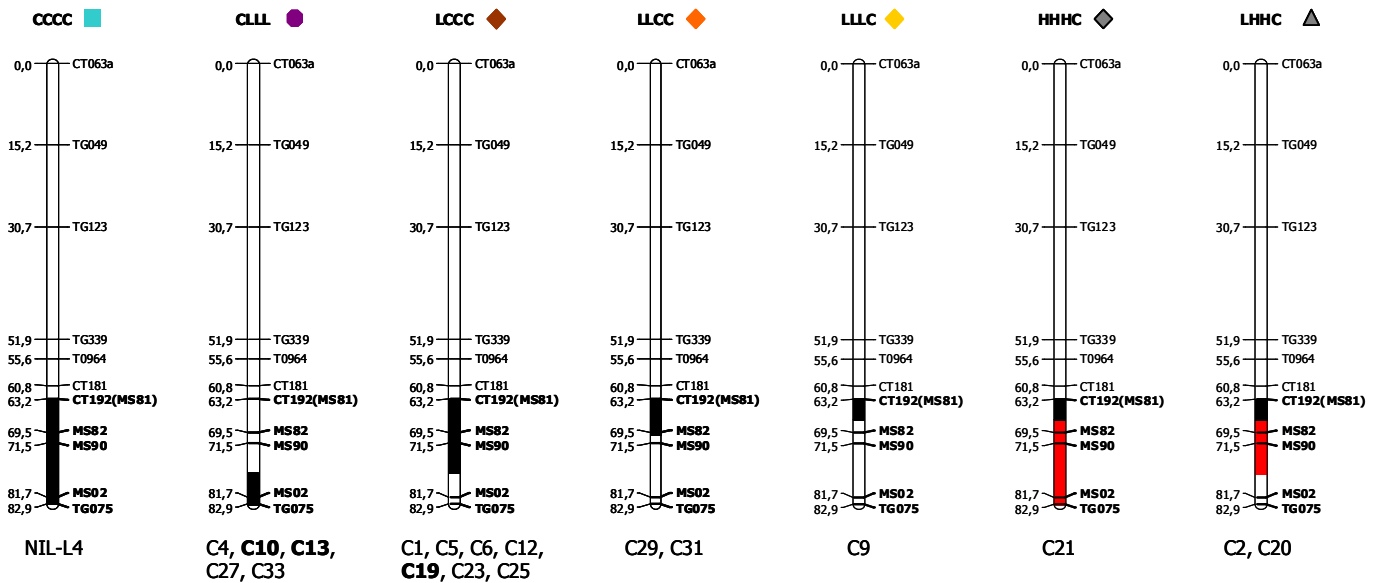
Pour chaque croisement, 150 individus de la population F2 obtenue ont été génotypés afin de sélectionner les individus homozygotes Levovil ou hétérozygotes à un des marqueurs flanquants les



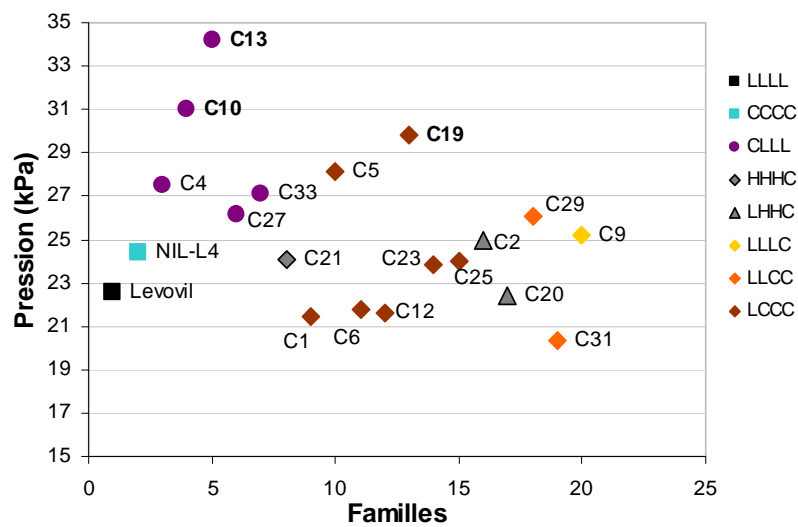
**Figure V.4: Représentation des génotypes graphiques des recombinants obtenus pour la région du chromosome 4 (a) et analyse physique de la fermeté des fruits (b).**

Le code associé au symbole coloré correspond au génotype aux marqueurs MS02/MS90/MS82/MS81 (1 = Cervil, 3 = Levovil, 2 = Hétérozygote). Les régions chromosomiques de génotype Cervil sont représentées en noir, celles hétérozygotes sont en rouge, le fonds génétique Levovil est en blanc. Les familles de recombinants dont les noms sont en gras sont celles dont les valeurs de fermeté sont significativement différentes (Test de Duncan à  $P=0,05$ )

(a)



(b)



QTL, ce qui représente 6 profils de recombinaison (Figure V.3). Pour la région du chromosome 4, les marqueurs microsatellites MS81 et MS02 ont été utilisés et les marqueurs PCR spécifique Lin5 et ASC021 pour celle du chromosome 9. Les intervalles ciblés pour la recherche d'évènements de recombinaison sont donc de 18,5 cM et de 17,4 cM, respectivement. Les plantes F2 sélectionnées ont été autofécondées et une nouvelle étape de sélection assistée par marqueurs sur 20 plantes F3 pour chaque plante F2 a permis d'isoler les recombinants homozygotes Levovil à l'un des deux marqueurs précédemment cités. Les familles issues de chaque recombinant F2 sont constituées de 2 à 6 plantes homozygotes. Les individus de l'ensemble des familles sélectionnées ont été génotypés en utilisant des marqueurs intermédiaires, positionnés entre les marqueurs utilisés pour la recherche des recombinants, afin de préciser la localisation des évènements de recombinaison. Sur le chromosome 4, il s'agit des marqueurs microsatellites MS90 et MS82 et des marqueurs MS91, MS83 et MS57 sur le chromosome 9. Les figures V.4 et V.5 représentent les génotypes graphiques des familles obtenues, 18 familles pour la région du chromosome 4, réparties en 6 classes génotypiques de recombinants et 13 familles pour celle du chromosome 9, réparties en 3 classes de recombinants. La recherche d'évènement de recombinaisons ciblait des segments chromosomiques de taille comparable avec, dans l'ensemble, le même nombre de marqueurs et le même intervalle entre marqueurs. Pourtant, un plus grand nombre de recombinants différents a été obtenu pour la région du chromosome 4, suggérant des différences des fréquences de recombinaison méiotique selon les régions du génome (Sherman and Stack, 1995; Stephan and Langley, 1998).

#### **IV. Analyse des phénotypes des lignées recombinantes**

Chaque famille de plantes recombinantes obtenues pour les régions des chromosomes 4 et 9 est composée de 2 à 6 plantes F3 fixées pour chaque recombinant identifié en F2, les fruits ont été récoltés en mélange et la pression a été mesurée. Les données issues de ce phénotypage sont présentées dans les figures V.4b et V.5b.

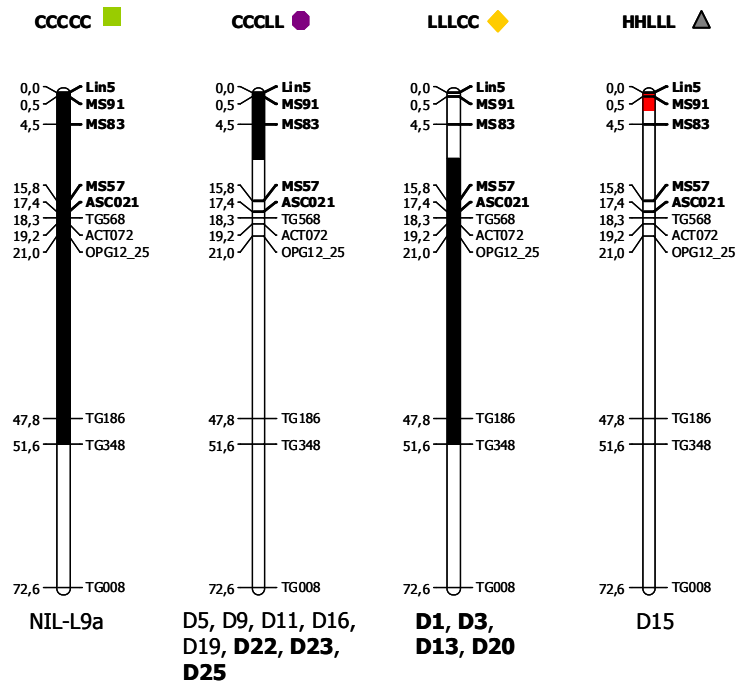
##### *IV.1. Région d'intérêt du chromosome 4*

Pour cette région, un QTL de pression avait été détecté, les allèles de Cervil apportant les fortes valeurs au caractère. Le phénotype attendu pour les recombinants portant ce QTL serait une augmentation de la pression des fruits. Cependant, l'effet individuel de ce QTL n'a pas été observé pour la lignée quasi-isogénique NIL-L4 (Chapitre 3). Bien que plusieurs classes de recombinant aient été sélectionnés (Figure V.4a), seules trois familles, C10, C13 et C19, sont significativement différentes des l'ensemble des familles phénotypées, de la lignée parentale Levovil et de NIL-L4 (Figure V.4b). Pour les trois familles, une augmentation de la pression est observée, ce qui va dans le sens des effets attendus au QTL. Pourtant, ces familles se répartissent dans deux classes de recombinants très distinctes. Les autres familles de recombinants du groupe comprenant les familles

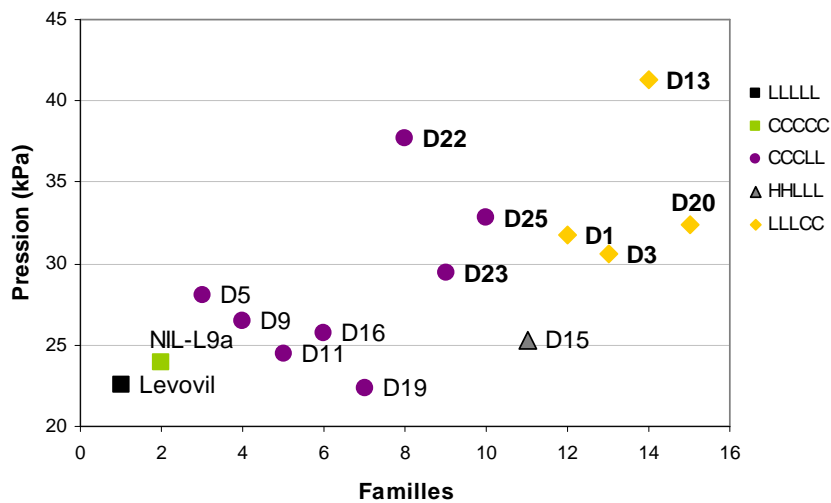
**Figure V.5: Représentation des génotypes graphiques des recombinants obtenus pour la région du chromosome 9 (a) et analyse physique de la fermeté des fruits (b).**

Le code associé au symbole coloré correspond au génotype aux marqueurs Lin5/MS91/MS83/MS57/ASC021 (1 = Cervil, 3 = Levovil, 2 = Hétérozygote). Les régions chromosomiques de génotype Cervil sont représentées en noir, celles hétérozygotes sont en rouge, le fonds génétique Levovil est en blanc. Les familles de recombinants dont les noms sont en gras sont celles dont les valeurs de fermeté sont significativement différentes (Test de Duncan à  $P=0,05$ )

(a)



(b)



C10 et C13 présentent également une augmentation de la pression mais non significative. Par contre, le groupe auquel appartient la famille C19 est essentiellement composé de familles dont le phénotype est très proche de celui de Levovil. Les génotypes aux marqueurs testés pour chacune de ces deux classes de recombinants montrent que l'événement de recombinaison pouvant expliquer la répartition observée se situerait entre les marqueurs MS90 et MS02, soit dans un intervalle de 10 cM. Dans cet intervalle, selon la position de l'événement de recombinaison, la nature des allèles mis en jeu peut aussi bien être d'origine Cervil ou Levovil. Cependant, pour les autres classes de recombinants, il n'y a pas de variations significatives du phénotype par rapport à l'ensemble des familles étudiées et les génotypes aux marqueurs situés entre MS90 et MS02 sont homozygotes Levovil ou hétérozygotes. Ce sont donc probablement les allèles de Cervil, à l'état homozygote, qui augmentent le caractère de pression du fruit dans cette région. De plus, le pic de LOD pour le caractère de pression, dont les allèles Cervil donnent les fortes valeurs au QTL, correspond à l'intervalle du chromosome 4 compris entre MS90 et MS02.

#### *IV.2. Région d'intérêt du chromosome 9*

Pour la région du chromosome 9, un QTL de fermeté et un QTL de pression avaient été localisés à proximité l'un de l'autre. Les allèles de Cervil apportent les valeurs élevées de fermeté tandis que ce sont les allèles de Levovil pour la pression. Le phénotype attendu au caractère pour l'ensemble des familles de recombinants peut aussi bien se traduire par une augmentation des valeurs pour les allèles Cervil au QTL de fermeté que par une diminution pour les allèles Levovil au QTL de pression. Comme pour le QTL de pression du chromosome 4, les effets individuels de ces QTL n'ont pas été retrouvés chez la lignée quasi-isogénique NIL-L9a. La recherche de recombinants n'a permis d'identifier que trois classes de recombinants pour cette région (Figure V.5a). Ceci dit, un grand nombre de variations pour la pression est mis en évidence puisque sept familles montrent une augmentation significative du caractère soit plus de la moitié des familles sélectionnées (Figure V.5b). C'est le cas de toutes les familles de la classe "LLLCC" mais seulement les familles D22, D23 et D25 du groupe "CCCLL". Aucune famille ne présente une diminution du phénotype. D'après les génotypes aux marqueurs observés pour les deux classes de recombinants, l'évènement de recombinaison expliquant la répartition phénotypique des familles doit se situer entre les marqueurs MS83 et MS57, dans une zone d'environ 11 cM. A ce stade, il n'est pas possible de définir la nature des allèles en jeu. Cependant, le fragment chromosomique identifié (MS83 à MS57), associé à l'amélioration du caractère de pression, colocalise avec la région où un pic des valeurs de LOD est observé pour la fermeté. Pour ce QTL, les allèles Cervil apportaient les fortes valeurs au caractère, il serait donc envisageable que les allèles Cervil soient responsables de l'augmentation des valeurs de pression pour les familles de recombinants précédemment décrites.

## V. Discussion et conclusion

La cartographie fine des régions d'intérêt du chromosome 4 et du chromosome 9 a permis d'affiner la position de deux QTL associés à la pression du fruit de tomate. La densification en marqueurs a été abordée en utilisant la macrosynténie, ce qui nous a permis de diviser par deux l'intervalle moyen entre deux marqueurs. En combinant ces résultats de cartographie et les données issues du phénotypage des recombinants sélectionnés, la localisation de ces QTL de texture a été réduite, pour l'instant, à un intervalle moyen de 10 cM pour les deux régions d'intérêt. De plus, cet intervalle délimitant les QTL colocalisent exactement avec les valeurs les plus fortes de LOD pour le QTL de pression sur le chromosome 4 et le QTL de fermeté sur le chromosome 9 qui expliquaient un fort pourcentage de variation phénotypique (33% et 41%, respectivement). Cette distance pourrait être encore diminuée, des marqueurs RFLP étant disponibles dans cet intervalle: TG208, TG287 et TG457 entre les microsatellites MS90 et MS02 pour la région du chromosome 4 et CP044 et TG591 situés entre les microsatellites MS83 et MS57 pour la région du chromosome 9. Cependant, la sélection assistée par marqueurs des plantes F3 a été réalisée à partir de micro-extraction d'ADN, rendant impossible le génotypage de marqueurs RFLP sur les recombinants sélectionnés. Malgré tout, la recherche de nouveaux recombinants dans les deux régions d'intérêt pourra se poursuivre en utilisant de nouveaux marqueurs obtenus suite à la densification, notamment les microsatellites MS90 et MS02 pour la région du chromosome 4 et MS83 et MS57 pour celle du chromosome 9, qui ciblent des fragments chromosomiques plus petits que les marqueurs initialement utilisés. Il faudra également cribler un plus grand nombre de plantes pour obtenir un plus grand nombre de recombinants, avec des profils de recombinaisons plus variés. De grands intervalles persistent entre certains marqueurs et la densification doit se poursuivre. Les régions ciblées étant plus étroites, il serait intéressant de tester la microsyténie, d'autant plus qu'un grand nombre de marqueurs COS sont disponibles pour les deux régions. Enfin, le séquençage du génome de la tomate étant en cours (Mueller *et al.*, 2005b), une nouvelle alternative permettra prochainement de développer des marqueurs dans un intervalle très précis.

Initialement, un QTL de pression a été localisé sur le chromosome 4 ainsi que sur le chromosome 9 sur lequel avait également été localisé un QTL de fermeté. Les effets de ces QTL n'avaient pas été observés au niveau des QTL-NIL respectives, NIL-L4 et NIL-L9a. Ces lignées sont à l'origine des populations F2 utilisées pour la recherche de recombinants et les effets de deux QTL de pression ont été à nouveau détectés sur certains recombinants F3. Au chapitre 3, l'analyse phénotypique de différentes QTL-NIL dans trois fonds génétique sur deux années a permis de montrer que la pression est un des caractères de qualité du fruit influencés par le fonds génétique et par l'environnement (Chaïb *et al.*, 2006). Dans le cas des lignées NIL-L4 et NIL-L9a, aucun effet des QTL n'a été détecté pour les deux années d'expérimentation et cette absence d'effet a été confirmée pour des analyses répétées une 3<sup>ème</sup> année (Chapitre 4) et au cours de l'évaluation phénotypique des plantes F3

sélectionnées. L'augmentation de pression observée au niveau des recombinants n'est donc probablement pas attribuable à un effet de l'environnement. L'effet du fonds génétique sur l'expression des QTL contrôlant la pression est plus probable d'autant plus que la caractérisation des effets épistatiques impliqués dans le contrôle de la pression a permis de mettre en évidence différentes interactions à partir de la population de RIL utilisée pour la détection de QTL (Annexe 8, Tableau 6). Ceci dit, les recombinants sélectionnés varient essentiellement de par la taille du fragment introgressé d'origine Cervil, ce qui permet d'envisager l'existence d'interactions au sein même de la région introgressée. Les chapitres 3, 4 et 5 ont permis l'identification d'un certain nombre d'éléments montrant la complexité du déterminisme génétique contrôlant le caractère de pression, une synthèse des données acquises sera présentée et discutée dans la discussion générale.

Ce chapitre présente la première étape de la cartographie fine de deux régions associées à des caractères de texture. A ce stade, l'intervalle des QTL est encore de 10 cM, la localisation exacte de l'événement de recombinaison n'est pas connue et la nature des allèles impliquée n'est pas toujours clairement identifiée. Cependant, les premiers résultats obtenus sont encourageants. Connaissant l'impact de l'environnement sur l'expression des QTL contrôlant la pression, il faudra répéter l'évaluation phénotypique des plantes F3 pour vérifier la stabilité des effets observés sur les familles recombinantes. A long terme, si les effets des QTL de texture observés au niveau des recombinants restent stables, le clonage positionnel de ces QTL pourrait être envisagé. Pour cela, il faudrait obtenir une carte haute résolution de ces régions et parvenir à localiser le QTL dans un intervalle moins de 1 cM.

## **CHAPITRE VI**

# **VERS LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES COMPOSANTES DE LA TEXTURE**

---

## CHAPITRE 6 \_ VERS LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES COMPOSANTES DE LA TEXTURE

---

Afin d'identifier des gènes candidats associés aux effets des QTL contrôlant les variations de texture, nous avons développé une approche combinant l'étude du transcriptome et du protéome du péricarpe du fruit de tomate. Des données complémentaires seront ainsi acquises non seulement au niveau des transcrits présents dans les tissus mais également au niveau des protéines dont l'abondance n'est pas toujours corrélée à celle des ARN messagers (Greenbaum *et al.*, 2002), notamment suite au processus d'épissage alternatif et aux éventuelles modifications post-traductionnelles.

Pour ce type d'approche, le choix du matériel végétal est déterminant. Nous avons utilisé les lignées cumulant les cinq régions porteuses de QTL de qualité organoleptique, Lx et Bx, que nous avons comparées aux lignées parentales respectives, Levovil et VilB. Bien que ces lignées ne ciblent pas uniquement les QTL de texture, elles ont été privilégiées aux lignées quasi-isogéniques pour les régions du chromosome 4 ou du chromosome 9 car elles présentent des phénotypes significativement contrastés par rapport aux lignées parentales aussi bien pour la fermeté que pour la farinosité du fruit (Chapitre 4, figures IV.2 et IV.3).

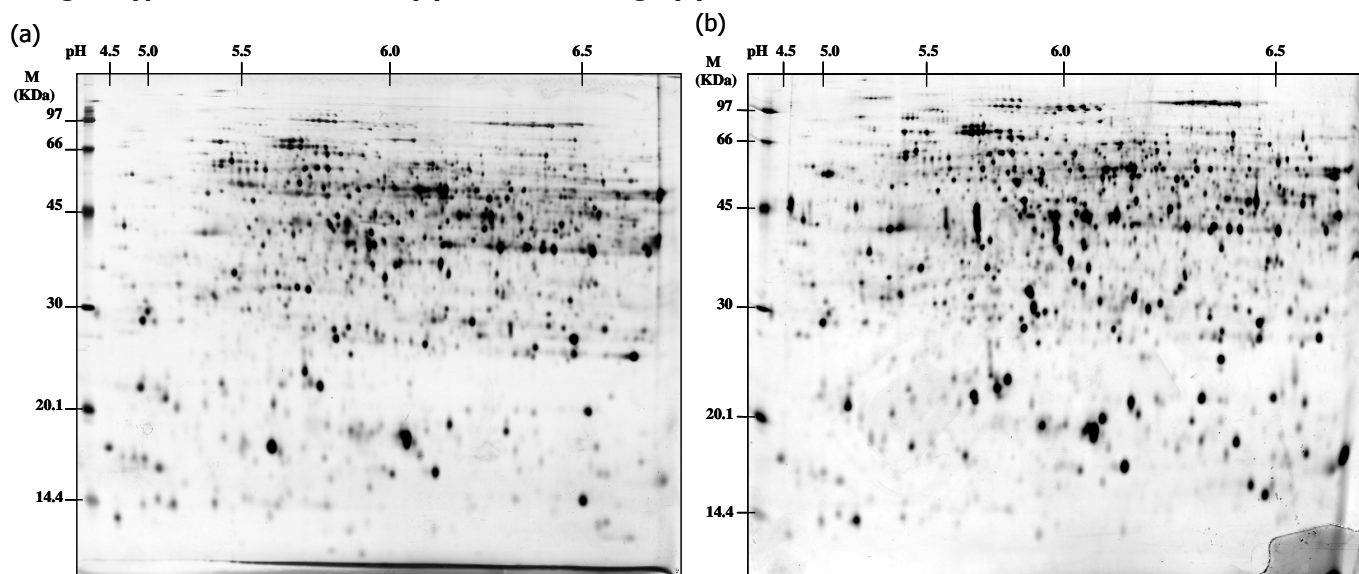
Jusqu'à présent, la plupart des travaux sur les modifications texturales du fruit se concentre sur la caractérisation de gènes impliqués dans la dégradation de la paroi primaire au cours de la maturation. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est également de savoir si les variations de texture observées chez le fruit mûr résultent de différences de propriétés des tissus du péricarpe mises en place au moment de leur construction dès les premières phases du développement, et/ou si elles sont la conséquence de modifications associées à la maturation. C'est pourquoi cette étude a été réalisée à deux stades de développement: un stade précoce pendant la phase d'expansion cellulaire à 14 jours après anthèse (14JAA), et au stade rouge en fin de maturation.

Les gènes candidats fonctionnels identifiés par ces deux approches ont ensuite été cartographiés afin de rechercher une éventuelle colocalisation avec les régions porteuses de QTL. De plus, l'étude de leur profil d'expression au cours du développement du fruit a été réalisée par RT-PCR quantitative sur les trois lignées parentales (Cervil, Levovil et VilB), les lignées Lx et Bx et les lignées quasi-isogéniques pour la région du chromosome 9 (NIL-L9A et NIL-B9A). L'objectif est d'une part de confirmer le différentiel d'expression initialement détecté, d'autre part d'identifier les stades clés d'expression et enfin d'essayer d'identifier les régions du génome contrôlant ces variations d'expression.

La recherche de gènes candidats a été planifié sans *a priori*, que ce soit du fait des méthodes de criblage haut débit utilisées (protéome et transcriptome) ou des stades de développement étudiés



**Figure VI.1: Gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle colorés au nitrate d'argent, obtenus pour le génotype Lx au stade 14JAA (a) et au stade rouge (b).**

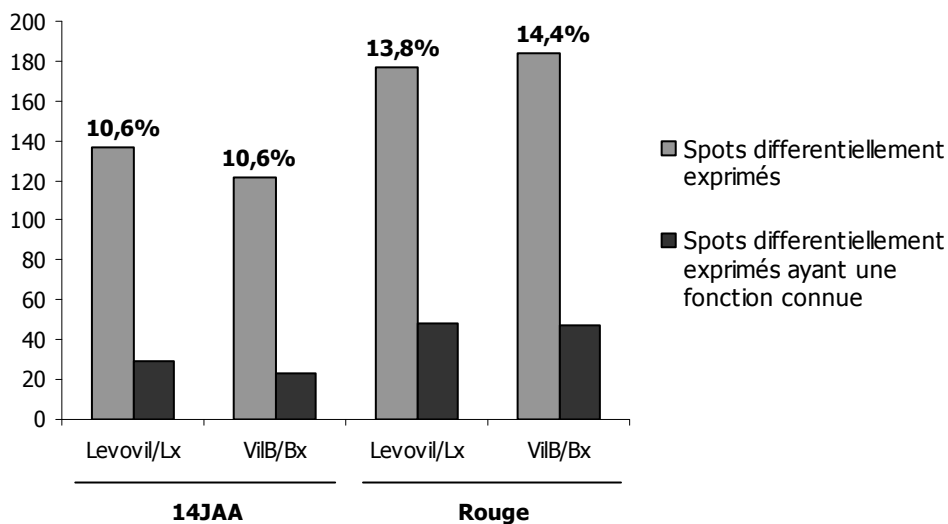


**Tableau VI.1: Nombre moyen de spots obtenus par gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle pour chaque génotype, à chaque stade.**

	14JAA	Rouge
Levovil (L)	1302	1411
VilB (B)	1185	1350
Lx	1203	1104
Bx	1058	1173

**Figure VI.2: Nombre de spots différentiellement exprimés obtenu par gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle pour chaque comparaison, à chaque stade.**

Le pourcentage de spots différentiellement exprimés est indiqué.



(14JAA et rouge). L'étude des profils d'expression au cours du développement du fruit ainsi que la cartographie de ces gènes a été effectuée pour des gènes dont les fonctions étaient décrites comme impliquées dans les variations de texture du fruit. C'est pourquoi, le choix des gènes candidats a par contre été réalisé avec *a priori*, en ciblant prioritairement les fonctions associées aux modifications pariétales et à la turgescence des cellules.

Les résultats obtenus par l'approche protéome et transcriptome ainsi que la caractérisation des gènes candidats sélectionnés (cartographie et profil d'expression) sont présentés et une discussion générale conclura le chapitre.

## I. Etude du protéome

Pour un génotype donné, à un stade donné, deux échantillons indépendants de péricarpes ont été utilisés et deux extractions par échantillon ont été réalisées. Un gel a été obtenu pour chaque extrait, nous disposons donc au final de quatre répétitions par modalité (Chapitre 2, Figure II.4).

### I.1. Description générale du protéome du péricarpe

Les protéines totales extraites du péricarpe du fruit de tomate sont séparées par électrophorèse bi-dimensionnelle puis colorées au nitrate d'argent (Figure VI.1). Pour tous les génotypes, le même type de profil électrophorétique est obtenu. Les spots sont bien focalisés, répartis sur toute la surface du gel et sont plus nombreux dans les hauts poids moléculaires, entre 30 et 97 kDa, pour un pH supérieur à 5. Le nombre moyen de spots par gel est compris entre 1050 et 1400 (Tableau VI.1). Les gels des lignées parentales présentent un plus grand nombre de spots que ceux des lignées respectives ayant introgressé les cinq régions porteuses de QTL. Hormis chez Lx, on observe une quantité plus importante de spots au stade rouge qu'au stade vert. Les profils électrophorétiques des deux stades de développement se distinguent très nettement avec un plus grand nombre de spots de petits poids moléculaires au stade rouge.

### I.2. Variations observées

Afin de limiter l'importance des variations expérimentales telles que l'intensité de la coloration ou du bruit de fond, la quantité de protéine associée à chaque spot est déterminée à partir du volume du spot exprimé en pourcentage du volume total de tous les spots présents sur le gel. La recherche des spots différenciellement exprimés entre deux génotypes au même stade de développement a été réalisée par analyse de variance au seuil  $P=0,05$ .

L'effet de l'introgression des cinq régions porteuses de QTL est net puisque environ 10% du protéome révélé présente des variations entre chaque lignée parentale et la lignée d'introgression

Figure VI.3: Proportions de variations quantitatives et qualitatives observées entre Levovil et Lx et entre ViIB et Bx à chaque stade de développement.

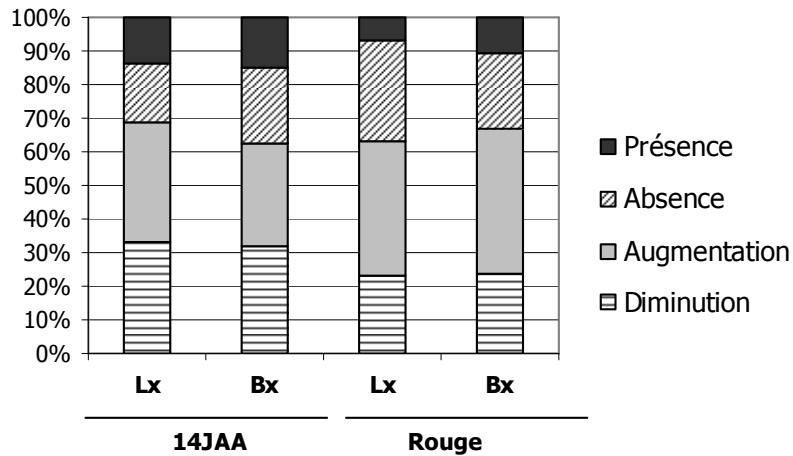
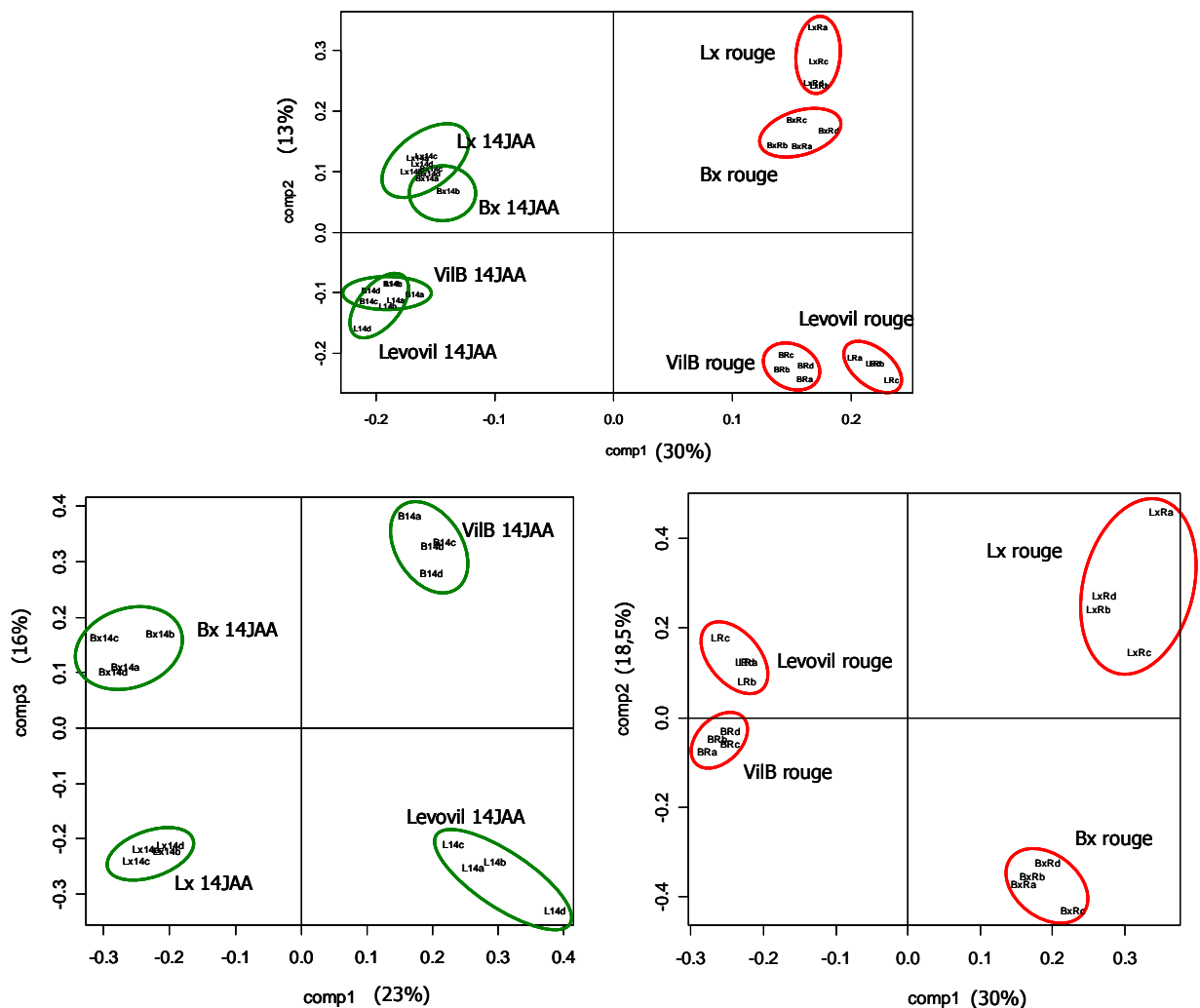


Figure VI.4: ACP réalisées à partir des pourcentages de volume de l'ensemble des spots obtenus pour tous les génotypes aux deux stades de développement (a), tous génotypes au stade 14JAA (b) et tous génotypes au stade rouge (c).



correspondante. Le pourcentage de spots présentant un différentiel d'expression entre Levovil et Lx (LLx) et entre VilB et Bx (BBx) est très proche et se situe autour de 10% de variations au stade vert et de 15% au stade rouge, soit respectivement 120 et 180 spots environ (Figure VI.2). Un effet du stade de développement sur la quantité de variations observées est perceptible quels que soit les génotypes considérés. La proportion de spots variants est plus importante au stade rouge pour lequel un plus grand nombre de spots est observé.

La figure VI.3 représente le type de variations observées pour chaque comparaison, LLx et BBx, à chaque stade de développement. Les variations quantitatives se traduisent par l'augmentation ou la diminution du spot chez Lx ou Bx alors que les variations qualitatives décrivent l'absence ou la présence du spot. Les variations observées sont majoritairement quantitatives quelles que soit les comparaisons (entre 60 et 70%). Au stade vert, il y a globalement autant de spots surexprimés que de spots sous-exprimés chez les lignées d'introgression par rapport aux lignées parentales alors qu'au stade rouge, 2/3 des variations correspondent à une surexpression. Pour les variations qualitatives, la répartition entre spots présents ou absents est également équivalente au stade 14JAA tandis qu'au stade rouge, on remarque une plus forte proportion de spots présents chez les lignées parentales. Globalement, les mêmes répartitions sont observées entre LLx et BBx, les profils de variations étant plus spécifiques des stades de développement. Au stade rouge, l'effet de l'introgression se traduit majoritairement par la surexpression des protéines.

Des analyses en composantes principales ont été réalisées à partir du pourcentage de volume des spots différentiellement exprimés pour chaque génotype, à chaque stade de développement (Figure VI.2). Pour les trois graphiques (Figure VI.4), les axes présentés correspondent aux composantes expliquant le plus fort pourcentage de variation. Dans l'ensemble, les quatre répétitions de chaque modalité sont bien regroupées. Quand les 32 gels du plan d'expérience sont pris en compte pour l'analyse, la composante 1, qui explique 30% de la variation, permet de séparer les modalités essentiellement d'après le stade de développement (Figure VI.4a). L'effet génotype est partiellement masqué mais les lignées d'introgression, Lx et Bx, se distinguent clairement des lignées parentales selon la composante 2. En traitant séparément les gels au stade 14JAA et ceux au stade rouge (Figures VI.4a et VI.4b), dans les deux cas, la composante 1, expliquant respectivement 23% et 30% de la variation, confirme l'effet de l'introgression en séparant les lignées parentales des lignées Lx et Bx. L'axe 2 différencie ensuite les génotypes selon leur fonds génétique.

Les descriptions globales des variations observées entre Levovil et Lx et entre VilB et Bx au stade 14JAA ou au stade rouge montrent un effet fort de l'introgression des cinq régions porteuses de QTL associés à la qualité organoleptique du fruit de tomate. Par contre, les profils de variations sont très similaires dans les deux fonds génétiques puisque les pourcentages de spots différentiellement exprimés obtenus à chaque stade et la répartition du type de variations (qualitatives et quantitatives) sont comparables. Cependant, en s'intéressant au nombre de spots différentiellement exprimés







retrouvés à la fois entre LLx et entre BBx, à chaque stade, les similitudes sont beaucoup moins nettes. En effet, seulement 33 spots au stade vert et 39 spots au stade rouge sont communs soit environ un quart des spots présentant un différentiel d'expression pour chaque fonds génétique. De plus, les protéomes de Levovil et de VilB sont à l'origine sensiblement différents puisque ils présentent 6,5% de spots différentiellement exprimés au stade vert et 8,5% au stade rouge. Il existe donc une forte relation entre la nature des spots variables et le fonds génétique.

### 1.3. Identification des fonctions

L'identification de la fonction de la protéine associée à un spot est généralement réalisée en prélevant ce dernier pour analyse par spectrométrie de masse, soit MALDI-TOF (M), soit LC-MS/MS (E). Cette démarche a été utilisée pour analyser 82 spots choisis parmi les spots variants présentant les différences les plus significatives à l'issue de l'analyse de variance, sous réserve de les révéler avec la coloration au bleu de Coomassie.

Les données de spectrométrie de masse obtenues ont été utilisées pour interroger la base de données du TIGR qui regroupe les séquences de gènes et d'EST disponibles chez la tomate, ce qui a permis d'attribuer une annotation à 80 spots, soit un taux de 97,6% d'identification. Parmi ces 82 spots, onze spots précédemment séquencés pour d'autres expérimentations de l'équipe sur le péricarpe du fruit (Faurobert *et al.*, *in press*) ont été à nouveau prélevés. La même identification a été retrouvée sauf dans un cas. Par ailleurs, d'autres spots se sont avérés avoir été séquencés plusieurs fois au cours de trois séries indépendantes d'analyse. Dans 83% des cas, les différents séquençages d'un même spot aboutissent à la même identification. Nous avons supposé que les 17% de spots présentant des identifications différentes entre expérimentations correspondaient à des spots représentant plusieurs protéines. Par conséquent, nous avons décidé de transférer les résultats d'identification aux spots différentiellement exprimés de notre étude.

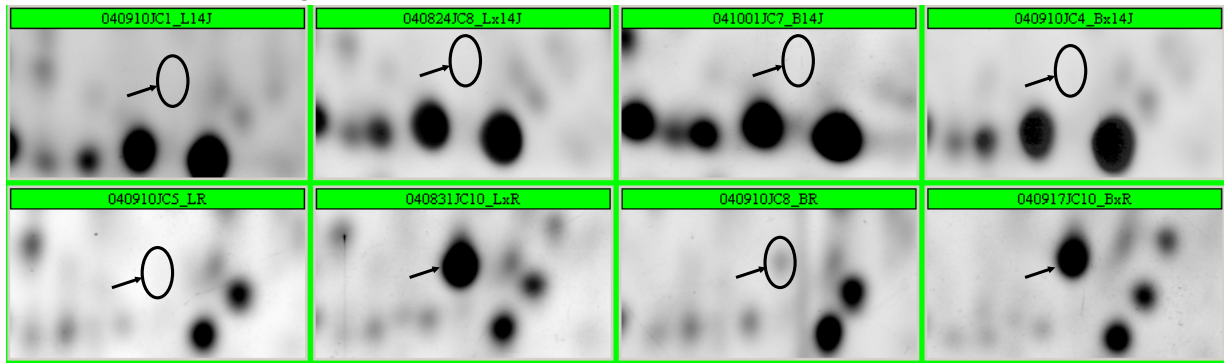
Ainsi, pour chaque comparaison, une annotation a pu être proposée pour environ 20% des spots différentiellement exprimés au stade 14JAA et 26% au stade rouge (Figure VI.2). La localisation de la position de ces spots sur des gels du génotype Lx aux stades 14JAA et rouge est disponible en Annexe 6 montrant que les prélèvements sont bien répartis sur toute la surface des gels. Les caractéristiques de ces spots sont décrites dans le tableau VI.3 pour 88 spots possédant une identification non ambiguë et dans le tableau VI.4 pour cinq spots auxquels plusieurs fonctions ont été attribuées. Les spots dont la référence est codée JC font partis des 82 spots prélevés et séquencés en MS, les autres, codés CM, DT ou MB, correspondent à des transferts d'autres analyses. Parmi toutes les fonctions décrites, 37% correspondent à des séquences de tomate, 19% à des séquences d'autres Solanacées et 23% à des séquences d'*Arabidopsis thaliana*.



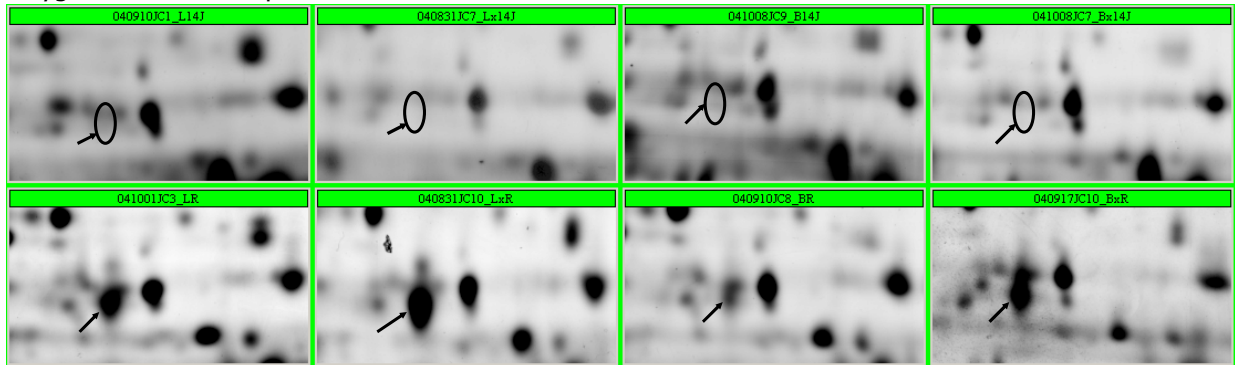
**Figure VI.5: Illustrations de quelques variations d'expression observées, correspondant à des fonctions pouvant être reliées à la texture du fruit.**

La série haute et la série basse correspondent respectivement à des gels au stade 14JAA et au stade rouge, avec de gauche à droite, les génotypes Levovil, Lx, VilB et Bx.  
Les spots absents sont localisés par un cercle.

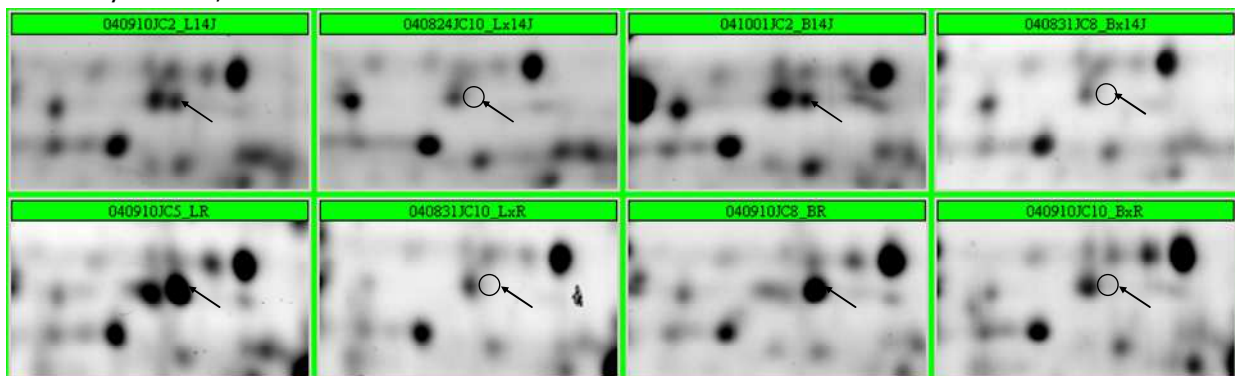
Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase: CM26



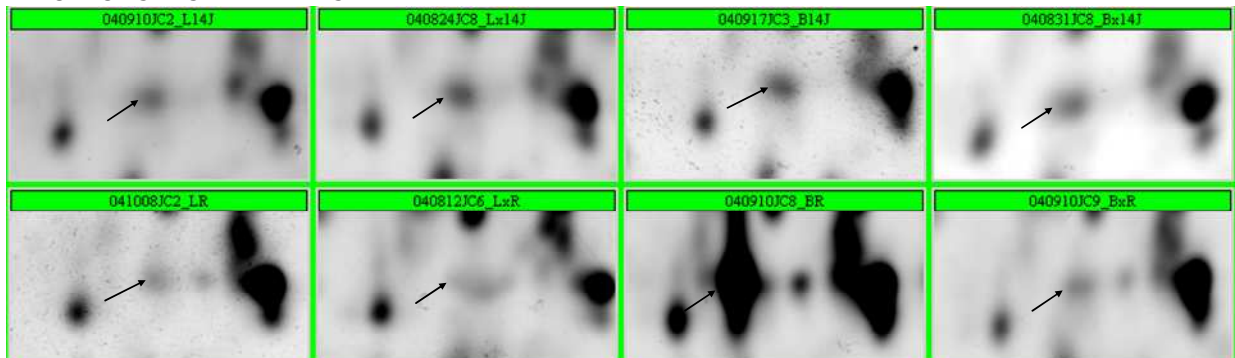
Polygalacturonase 2A precursor: JC9



Beta-D-xylosidase, LEXYL2: JC32



Annexine P34: CM111+DT15



Concernant la répartition des spots en catégories fonctionnelles, nous avons utilisé la classification du MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences). Les fonctions se répartissent en 21 catégories dont les principales concernent la synthèse et la modification des protéines (19%), le métabolisme carboné (14,7%), la réponse au stress (12,5%), le transport d'électron (9%), la différenciation cellulaire (5,7%), la paroi cellulaire (4,5%), la défense cellulaire (4,5%) et la détoxification (4,5%). Certaines catégories fonctionnelles présentent des différentiels d'expression plus spécifiques du stade rouge et sont associées aux processus physiologiques en relation avec la paroi cellulaire, la réponse au stress et la détoxification. Pour toutes les autres classes citées ci-dessus, les variations d'expression observées concernent aussi bien le stade précoce que le stade mature.

#### *1.4. Protéines candidates fonctionnelles associées à la texture*

Les mécanismes les plus couramment cités en relation avec les variations de texture sont associés aux modifications qui se produisent au niveau de la paroi cellulaire ou en relation avec la régulation de l'éthylène et la vitesse de maturation. Parmi les protéines différemment exprimées identifiées, cinq sont liées à ces processus: le facteur 2 de dépolymérisation de l'actine, l'alpha-mannosidase, la glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase, un précurseur de la polygalacturonase 2A (Tableau VI.3) et la  $\beta$ -D-xylosidase 2 (Tableau VI.4).

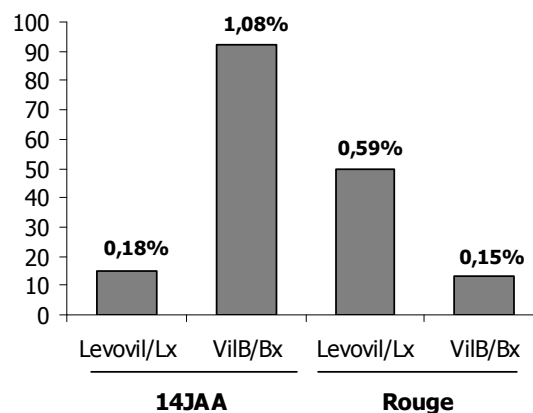
D'autres protéines sont décrites dans la littérature comme pouvant avoir un rôle indirect dans les variations de texture comme l'annexine P34 ou la Le-HSP17.6, respectivement classées dans les catégories fonctionnelles concernant la biogénèse des composés cellulaires et la réponse au stress (Tableau VI.3).

Le rôle de chacune de ces protéines sera abordé dans la discussion.

En observant les différentiels d'expression pour chacune de ces protéines, il apparaît que certaines variations ne sont pas significatives après analyse de variance. En regardant dans le détail les pourcentages de volume obtenus pour chaque gel individuellement, il apparaît que, sur les quatre répétitions, une valeur est excentrée par rapport aux trois autres. En supprimant cette donnée et en renouvelant l'analyse statistique, la différence observée devient significative. Les comparaisons correspondant à cette situation sont signalées dans les tableaux VI.3 et VI.4.

La plupart des différentiels d'expression observés sont associés à l'effet de l'introgression des cinq régions chromosomiques et il s'agit principalement de variations quantitatives. Ainsi, la glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (CM26) n'est exprimée que chez Lx et Bx et uniquement au stade rouge (Figure VI.5). Le précurseur de la polygalacturonase 2A (JC9) est absent chez Lx et Bx au stade vert puis très fortement surexprimé au stade rouge par rapport aux lignées parentales (Figure VI.5). Pour le spot associé à la beta-D-xylosidase 2 (JC32), deux identifications sont disponibles. Il n'est présent que chez les lignées parentales et est surexprimé chez Lx et Bx à maturité (Figure VI.5). L'annexine

**Figure VI.6: Nombre de gènes différentiellement exprimés issus des hybridations réalisées à partir des microarrays Tom-1 pour chaque comparaison, à chaque stade ( $P < 0,005$ ). Les pourcentages de gènes différentiellement exprimés par rapport au nombre de gènes présents sur la lame sont indiqués.**



**Tableau VI.5: Gènes différentiellement exprimés obtenus par l'analyse du transcriptome, en relation avec les modifications de la paroi cellulaire.**

M est le rapport des valeurs des intensités des deux échantillons, après transformation logarithmique en base 2. Les valeurs sont positives quand le gène est surexprimé chez Lx ou Bx.

Position du spot	Unigène		Fonction	Organisme	14JAA				Rouge					
	SGN	TIGR			Levovil/Lx		VilB/Bx		Levovil/Lx		VilB/Bx			
					M	Pvalue	M	Pvalue	M	Pvalue	M	Pvalue		
6.2.1.21	U221968	TC165224	Beta-galactosidase	<i>Solanum lycopersicum</i>			1,81	2,6E-03						
5.3.16.16	U223237	TC158461	Mannitol dehydrogenase (ELI3-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-1,64	1,0E-03	-1,47	1,7E-04						
2.4.12.9	U215382	TC154952	Xyloglucan endotransglycosylase	<i>Glycine max</i>			-1,70	3,3E-03						
8.4.12.11	U217823	TC163780	Xyloglucan endotransglycosylase (XET-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>			-2,09	6,5E-04						
2.2.12.1	U213455	TC164317	Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	<i>Solanum lycopersicum</i>					-1,31	4,5E-03				
5.1.20.3	U214567	TC162599	Similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>					-1,40	2,2E-03				
5.4.15.4	U213044	TC153904	Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase (XTH3)	<i>Solanum lycopersicum</i>					-1,16	4,7E-03				
4.2.15.8	U213043	TC153905	Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase (XTH3)	<i>Solanum lycopersicum</i>					-1,19	4,9E-03				
2.2.6.3	U213213	TC153944	Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A)	<i>Solanum lycopersicum</i>					1,30	1,2E-05	1,03	4,5E-03		
5.4.14.21	U213366	TC154035	GDP-mannose pyrophosphorylase	<i>Solanum tuberosum</i>					2,46	9,2E-04				
8.3.12.2	U227174	TC160782	Pectinesterase family	<i>Arabidopsis thaliana</i>					1,78	2,1E-03				
5.3.9.12	U239331	AW931535	1,3-beta-glucan synthase family	<i>Arabidopsis thaliana</i>							-1,14	5,0E-05		
8.2.20.10	U212884	TC153735	Glycosyl hydrolase family	<i>Arabidopsis thaliana</i>							1,09	5,4E-03		
8.2.2.21	U213714	TC161886	Spermidine synthase 1	<i>Datura stramonium</i>							-1,14	5,2E-04		

P34 est très fortement surexprimée chez VilB au stade rouge (Figure VI.5). Enfin, Lx et Bx surexpriment la Le-HSP17.6 au stade rouge et également au stade vert pour Bx.

Des variations qualitatives sont observées pour le facteur 2 de dépolymérisation de l'actine qui est absent au stade vert chez Levovil et VilB et pour l'alpha-mannosidase qui est absente au stade 14JAA chez Bx et au stade rouge chez Lx et Bx.

Certains des différentiels d'expression observés mettent également en évidence un effet du fonds génétique. La glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase et le précurseur de la polygalacturonase 2A ont des niveaux d'expression plus élevés pour Levovil et Lx. La variation observée pour l'annexine P34 ne concerne que le fonds génétique B et le spot associé à la beta-D-xylosidase 2 est plus intense chez Levovil que chez VilB.

Afin de mieux caractériser ces protéines, la recherche de peptides signaux dans leur séquence a été réalisée. Des signaux d'adressage ont été identifiés pour le facteur 2 de dépolymérisation de l'actine et la glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase sans précision sur le compartiment cellulaire de destination. Les peptides signaux ciblent l'extérieur de la cellule pour l'alpha-mannosidase et le précurseur de la polygalacturonase 2A et le noyau pour la Le-HSP17.6. Aucun peptide signal n'a été décelé pour l'annexine P34 et la beta-D-xylosidase 2.

## II. Etude du transcriptome

### II.1. Description des résultats obtenus

Les mêmes comparaisons LLx et BBx aux stades de développement 14JAA et rouge ont été réalisées à partir des puces à ADNc Tom-1, selon le plan d'expérience décrit au chapitre 2 (Figure II.5).

Le laboratoire ne disposant pas de plateforme dédiée à la transcriptomique, les hybridations des microarrays ont été réalisées manuellement c'est-à-dire sans bioanalyseur pour vérifier de façon précise la qualité des ARN messagers et surtout sans station d'hybridation. Ceci s'est fortement répercuté sur la qualité des hybridations réalisées pour chaque comparaison. Trois problèmes majeurs ont été rencontrés (i) des quantités d'ADNc hétérogènes d'une hybridation à l'autre, associées à des niveaux d'incorporation variables des fluorochromes, (ii) un niveau général de fluorescence des spots relativement faible pour de nombreuses lames, (iii) une intensité de bruit de fonds souvent élevé et pas très homogène pour certaines lames.

Nous avons appliqué une procédure d'analyse des images obtenues pour chaque hybridation très stringente. Tout d'abord, chaque image a été examinée visuellement spot à spot afin de supprimer les spots de mauvaise qualité et d'identifier ceux de qualité passable présentant une forme irrégulière et une intensité hétérogène. Ces informations ont ensuite été prises en compte dans la chaîne d'analyse

utilisée pour le traitement des données d'intensité, au niveau de la normalisation et du test statistique. Plus précisément, les spots de mauvaise qualité, autodéTECTÉS par le logiciel d'analyse d'image et repérés visuellement, ont été rejetés de l'analyse. Les spots de qualité passable n'ont été pris en compte que si la valeur de l'intensité était supérieure à deux fois celle du bruit de fonds. A l'issue de ce double filtre, un grand nombre de spots a été rejeté de l'analyse. En complément, le seuil  $P < 0,005$  a été utilisé pour l'analyse statistique utilisant le test  $t$  de Student. Etant donné également le plan d'expérience utilisé qui comporte deux répétitions biologiques indépendantes, nous avons considéré que les listes de spots différentiellement exprimées obtenues pour chaque comparaison sont fiables mais face à l'étendue de données manquantes pour chaque hybridation, aucun rapprochement ne peut être fait entre les différentes comparaisons effectuées. Seul l'effet de l'introgression des QTL pourra être discuté.

La figure VI.6 représente le nombre de gènes différentiellement exprimés obtenu pour chaque comparaison, soit une dizaine de gènes pour LLx à 14JAA et BBx au stade rouge, 92 pour BBx à 14JAA, et 50 pour LLx au stade rouge. Sur les 13440 spots présents sur la lame, 8500 correspondent à une fonction unique (Alba *et al.*, 2004). Les pourcentages de gènes présentant des variations d'expression vont de 0,15% à 1,08% ce qui reflète les problèmes techniques relatifs à l'hybridation manuelle des lames.

En attendant de répéter les expérimentations, nous nous sommes contentés de rechercher les gènes différentiellement exprimés pouvant être associés aux variations de texture, en se limitant aux fonctions en relation avec la paroi cellulaire (Tableau VI.5).

## *II.2. Gènes candidats associés à la texture du fruit*

L'étude du transcriptome du fruit aux deux stades de développement à travers les comparaisons LLx et BBx a permis l'identification de quatorze gènes différentiellement exprimés en relation avec les modifications de la paroi cellulaire. La plupart de ces gènes sont surexprimés chez les lignées parentales.

Pour le stade de développement 14JAA, les quatre gènes identifiés présentent des variations d'expression entre VilB et Bx. La mannitol deshydrogenase et les deux xyloglucan endotransglycosylases (XET) sont surexprimées chez la lignée parentale VilB, tandis que la beta-galactosidase est surexprimée chez la lignée d'introgression Bx. Le même différentiel d'expression est observé entre Levovil et Lx pour la mannitol deshydrogenase.

A maturité, six gènes sont différentiellement exprimés entre Levovil et Lx, trois entre VilB et Bx et un seul gène est commun aux deux comparaisons. Il s'agit du précurseur de la polygalacturonase 2A qui est surexprimé chez Lx et chez Bx. Les transcrits de la xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase, des deux xyloglucan endotransglucosylase-hydrolases (XTH3) et du gène similaire à la beta-(1-3)-glucosyl

transférase sont présents en plus grande quantité chez Levovil et ceux de la GDP-mannose pyrophosphorylase et des pectinestérases chez Lx. Pour la comparaison BBx, les enzymes appartenant à la famille des glycosyl hydrolases sont surexprimées chez Bx et celles de la famille des 1,3-beta-glucan synthases chez VilB, tout comme la spermidine synthase.

### III. Caractérisation des gènes candidats

Dans cette partie, la caractérisation de gènes candidats est abordée par l'étude de leur profil d'expression en RT-PCR quantitative sur une cinétique de développement du fruit et par une approche de cartographie génétique. Les gènes candidats sélectionnés sont issus des analyses du protéome et du transcriptome précédemment décrites, mais également d'une analyse transcriptomique, effectuée antérieurement par l'équipe à partir de lames à oligonucléotides ciblées texture (Annexe 7).

Les puces à oligonucléotides, composées de 440 gènes, avaient été construites de façon à cibler des familles de gènes décrites dans la littérature comme étant associées aux variations de texture du fruit, en relation avec les mécanismes de modification des parois cellulaires (hydrolases, expansines), d'adhésion cellulaire et de turgescence des cellules. Le criblage de ces lames a été réalisé à partir des génotypes Levovil et Lx à quatre stades de développement du fruit (21JAA, Vert Mature, Tournant et Mûr). Cette analyse transcriptomique a permis d'identifier des gènes communs avec l'étude du protéome (beta-D-xylosidase, glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase) et du transcriptome utilisant les puces à ADNc (xyloglucan endotransglycosylases) mais aussi de sélectionner des gènes candidats supplémentaires, la beta-xylosidase 1, LEXYL1, et deux isoformes d'aquaporine.

La beta-D-xylosidase 2, identifiée par l'approche protéome, et la beta-xylosidase 1, identifiée par le criblage des lames à oligonucléotides, sont les deux isoformes de cette famille de gènes qui sont exprimés au cours du développement du fruit.

Les gènes candidats issus des analyses du protéome et du transcriptome étant majoritairement liés aux propriétés de la paroi cellulaire, les deux isoformes d'aquaporine ont été analysés afin d'élargir notre étude aux gènes impliquées dans la régulation de l'état de turgescence des cellules.

#### III.1. Cartographie génétique

##### a/ Cartographie génétique in silico

Pour les spots différenciellement exprimés identifiés par l'approche protéome pour lesquels une fonction est disponible, nous avons réalisé une cartographie *in silico* afin de rechercher les protéines candidates qui co-localiseraient avec les régions porteuses de QTL. Pour cela, les séquences des unigènes du TIGR de chaque protéine ont été comparées aux séquences de tous les marqueurs de la carte génétique de référence, ainsi qu'aux séquences de BAC et de fin de BAC développés dans le cadre du programme de séquençage du génome de la tomate qui sont également en cours de

**Tableau VI.6: Synthèse des données de cartographie génétique obtenues pour quinze gènes candidats associés à la texture du fruit issus des approches protéome et transcriptome.**

Pour les gènes positionnés dans une des cinq régions ciblées, la mention "QTL" complète la localisation chromosomique.

ND = Non Déterminé

Origine	Nom marqueur	Code interne	Unigène SGN	Unigène TIGR	Fonction	Chromosome
Protéome	z1101	/	U238622	AW624228	Alpha-mannosidase	2
Protéome/Transcriptome oligo	z1104	xylosidase 1	/	TC154654	Beta-D-xylosidase, LEXYL2	1 - QTL
Transcriptome oligo	z1176	xylosidase 4	U329313	TC158851	Beta-xylosidase, LEXYL1	ND
Protéome	z1103	/	/	TC154369	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	10
Protéome	z1105	/	/	TC153761	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog	9 -QTL
Protéome	/	/	/	TC161872	Annexin P34	4
Protéome/Transcriptome	z1100	/	U216469	TC163406	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6	ND
Protéome/Transcriptome	z1102	PG6	U312703	TC153944	Polygalacturonase 2A precursor	10
Transcriptome	z1098	PME 18	U227174	TC160782	Pectinesterase family protein	ND
Transcriptome	z1099	/	U214567	TC162599	Similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	ND
Transcriptome	z1235	/	U319730	TC161429	Endo-beta-1,4-glucanase	ND
Transcriptome	z1097	XET4	U213455	TC164317	Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	12
Transcriptome/Transcriptome oligo	z1191	XET6	U312870	TC153905	Xyloglucan endo-transglucosylase-hydrolase XTH3	ND
Transcriptome	z1192	/	U312869	TC153904	Xyloglucan endo-transglucosylase-hydrolase XTH3	ND
Transcriptome oligo	z1231	Aquaporine 5	U315821	TC113462	Aquaporine	ND

cartographie. Ces séquences sont disponibles sur le site du SGN (<http://www.sgn.cornell.edu/>). La moitié des séquences présentent un alignement positif, 32% avec des séquences de fin de BAC, 9% avec des marqueurs COS, 7% avec des marqueurs RFLP et 2% avec des BAC séquencés. A l'heure actuelle, peu de séquences de fin de BAC sont positionnées sur la carte génétique de la tomate. Par conséquent, nous avons pu obtenir une localisation *in silico* pour une dizaine de protéines. Parmi les protéines candidates fonctionnelles décrites précédemment, seule l'annexine P34 a pu être positionnée sur la carte génétique de la tomate. Elle est localisée sur le chromosome 4 (Tableau VI.6). Pour notre population de cartographie, le chromosome 4 est constitué de deux groupes de liaisons et l'annexine P34 se cartographie *in silico* dans l'espace intermédiaire (Chapitre 1, Figure I.15), à proximité du marqueur TG075 qui délimite l'intervalle de confiance des QTL contrôlant les variations de fermeté et de farinosité.

#### b/ Recherche de polymorphisme et cartographie génétique

La cartographie des gènes candidats en relation avec les variations de texture a été initiée. Pour cela, des marqueurs PCR ont été développés à partir des séquences des unigènes du SGN ou du TIGR pour rechercher du polymorphisme entre les parents de la population de cartographie, Cervil et Levovil.

Le niveau de polymorphisme entre Cervil et Levovil étant relativement faible, nous avons utilisé en complément la population de lignées d'introgression (IL) issue du croisement interspécifique M82 (*S. esculentum*) x LA716 (*S. pennellii*). Cette population est constituée de 75 IL qui découpent le génome en 107 fragments (Annexe 1), permettant de localiser rapidement les gènes candidats sur un chromosome donné dans un intervalle moyen de 12 cM.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.6. Pour plus de la moitié des gènes, la position sur la carte génétique n'a pas pu être déterminée. Il s'agit de gènes pour lesquels nous n'avons pas obtenu de produit d'amplification PCR ou pour lesquels nous n'avons pas obtenu de polymorphisme de séquence. Sur les cinq gènes restants, seule la beta-D-xylosidase 2 se cartographie dans l'intervalle du QTL contrôlant les variations d'élasticité localisé sur le chromosome 1. L'alpha-mannosidase est cartographié sur le chromosome 2 mais pas dans la région où sont localisés les QTL d'intérêt. Enfin, le précurseur de la polygalacturonase 2A et la glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase se cartographient sur le chromosome 10 et la xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase sur le chromosome 12.

Nous nous sommes également intéressés à la protéine E8 qui est une enzyme impliquée dans la régulation de la biosynthèse de l'éthylène. Ce gène colocalise avec la région basse du chromosome 9 où des QTL contrôlant les variations de teneurs en composés aromatiques ont été détectés.



**Tableau VI.7: Synthèse des différentiels d'expression observés par les études du protéome et du transcriptome entre Levovil et Lx au stade rouge.**

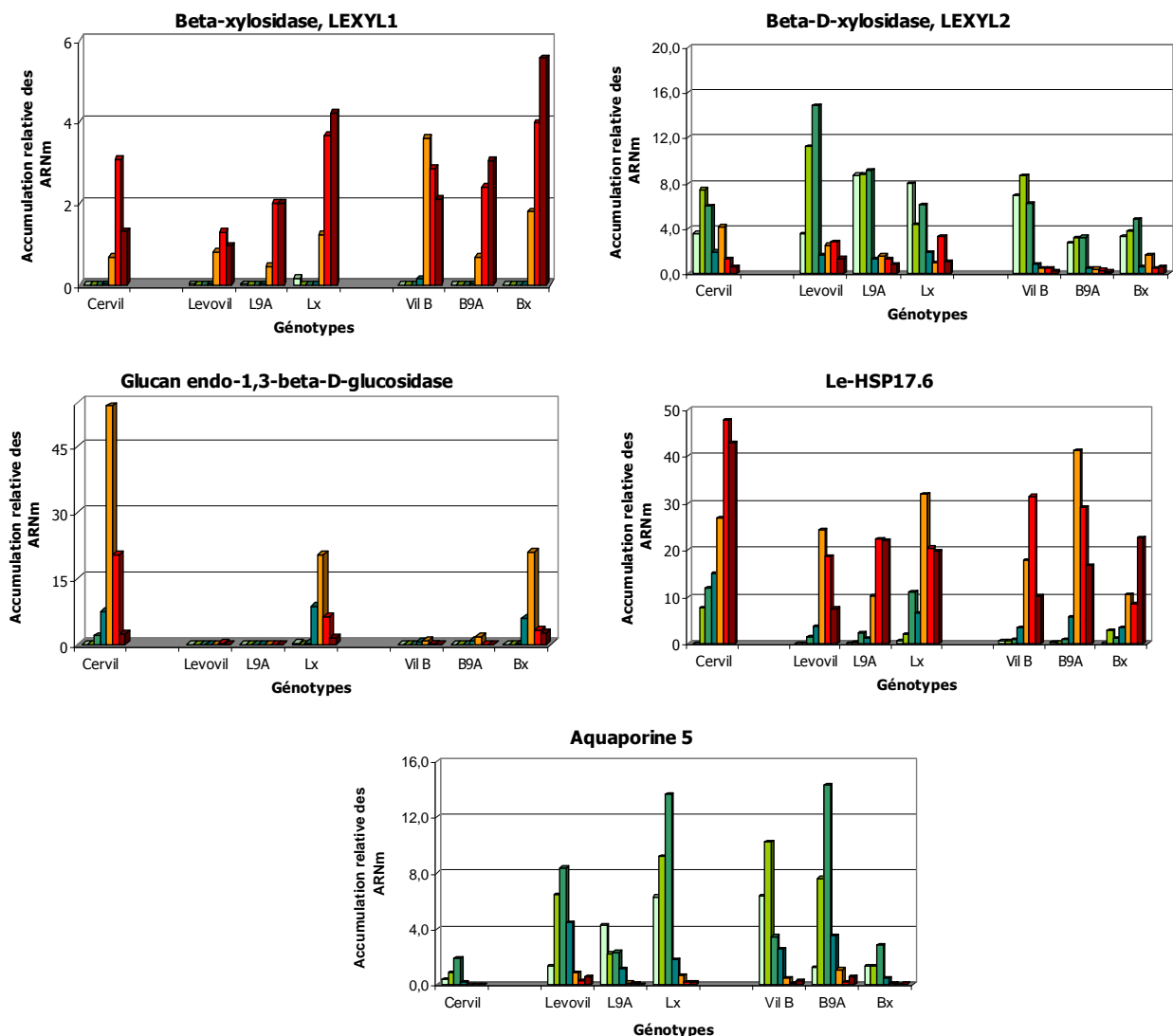
Le différentiel d'expression correspond au rapport des valeurs d'expression Lx/Levovil. Pour les données issues des analyses de puces à ADNc, les valeurs  $2^M$  ont été calculées à partir des valeurs logarithmiques en base 2 obtenues (M). Dans le cas de variations qualitatives, le niveau d'expression obtenu pour le génotype concerné est indiqué et est repéré par un astérisque. Les valeurs sont positives quand le gène est surexprimé chez Lx.

-=pas de donnée disponible, NS = non significatif.

Unigène TIGR	Code interne	Fonction	Origine			
			Protéome	Transcriptome	Transcriptome oligo	PCRq
TC160782	PME18	Pectinesterase family protein	-	3,44	NS	-
TC162599	-	Similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	-	-2,64	-	-3,80
TC153944	PG6	Polygalacturonase 2A precursor	2,78	2,45	1,53	-
NP000369	Glucosidase 24	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase precursor	22,9*	-	5,52	6,2*
TC154654	Xylosidase 1	Beta-D-xylosidase, LEXYL2	-12,6*	-	NS	NS
TC164317	XET4	Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	-	-2,38	-	-1,88
TC153905	XET6	Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase (XTH3)	-	-2,38	-4,17	-3,53

**Figure VI.7: Profils d'expression obtenus par RT-PCR quantitative révélant l'effet de l'introgession des régions porteuses de OTL dans les deux fonds génétiques.**

7JAA 14JAA 21JAA Vert mature Tournant Rouge Sur-Mûr



### III.2. Etude d'expression au cours du développement du fruit

L'étude d'expression de gènes candidats a été réalisée par RT-PCR quantitative. L'accumulation relative des transcrits a été mesurée chez les trois lignées parentales Cervil, Levovil et VilB, chez les lignées d'introgression cumulant les cinq régions d'intérêt, Lx et Bx, et chez les lignées quasi-isogéniques ne possédant que la région du haut du chromosome 9, NIL-L9A (L9A) et NIL-B9A (B9A). Les profils d'expression ont été réalisés sur une cinétique de développement du fruit comportant sept stades: 7JAA, 14JAA, 21JAA, vert mature, tournant, rouge et sur-mûr. Pour chaque gène, trois répétitions ont été réalisées.

Des profils d'expression ont pu être obtenus pour onze des quatorze gènes étudiés. Pour la pectinesterase, il n'a pas été possible de définir des amorces PCR, la séquence de l'unigène correspondant étant trop courte dans la partie 3' non-codante. Pour l'alpha-mannosidase et le précurseur de la polygalacturonase, aucun produit d'amplification n'a pu être obtenu malgré l'utilisation de deux couples d'amorces différents.

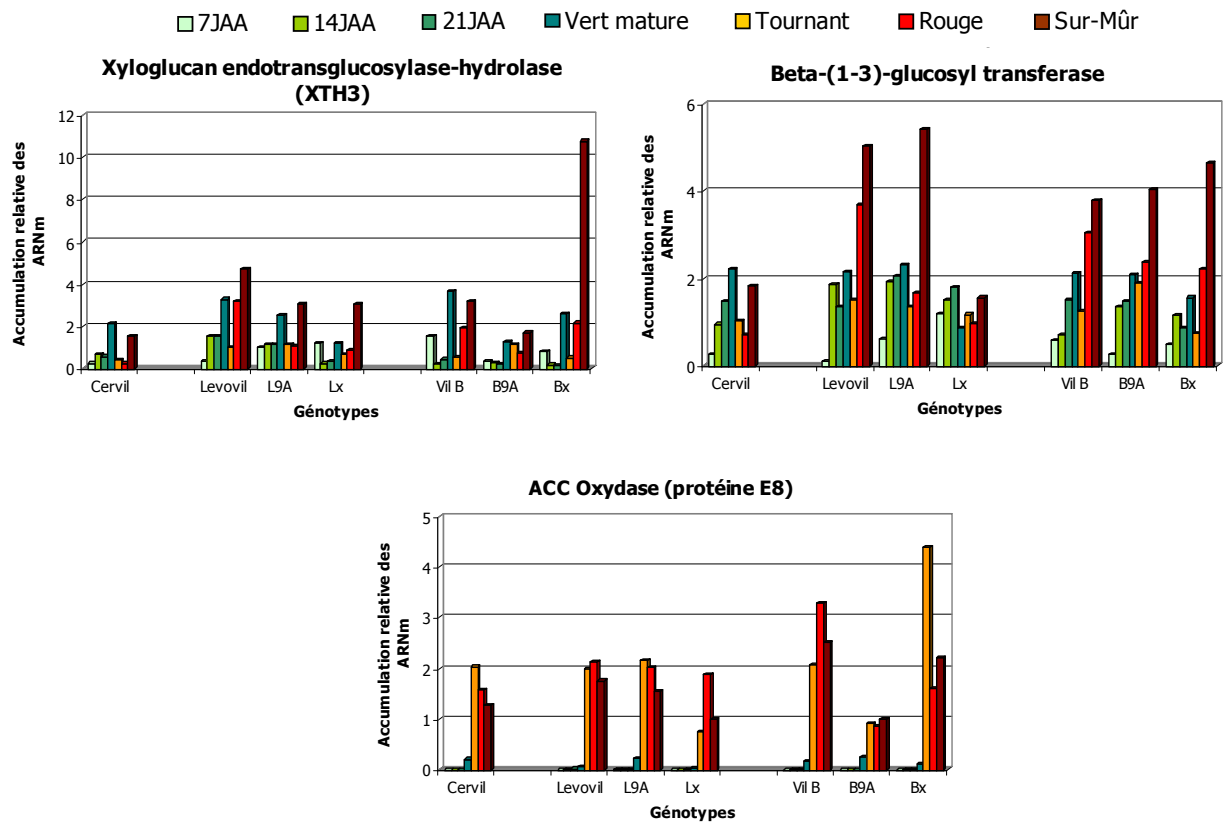
#### a/ Reproductibilité des différentiels observés

Avant de décrire les différents profils d'expression obtenus pour les différents gènes, la reproductibilité des différentiels d'expression observés a été analysée en comparant les valeurs obtenues par les différentes approches (Tableau VI.7). Pour cela, nous avons utilisé les données des gènes différentiellement exprimés entre Levovil et Lx au stade rouge, identifiés par l'approche protéome ou transcriptome (puces à ADNc) pour lesquels nous disposons également de données issues des puces à oligoligonucléotides et/ou des RT-PCR quantitatives. De plus, la reproductibilité de ces différentiels à travers des répétitions biologiques a pu être testé, les fruits utilisés pour les comparaisons réalisées avec les puces à oligonucléotides ayant été récoltés en 2002 et ceux utilisés pour les autres études en 2004.

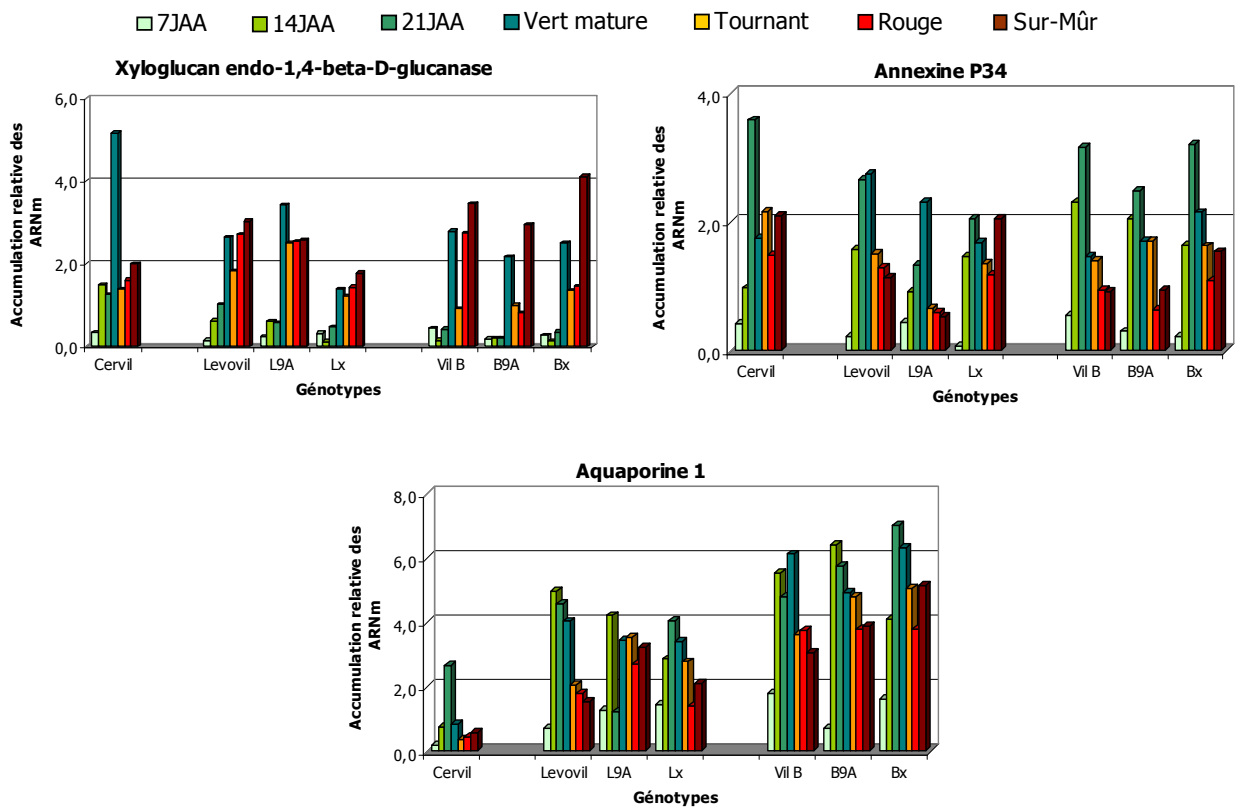
Pour la majorité des gènes étudiés, la tendance des différentiels d'expression, c'est à dire surexpression chez Lx ou chez Levovil, est conservée entre l'approche protéome et les différentes méthodes d'étude du transcriptome. De plus, les résultats sont reproductibles quelle que soit l'année de récolte.

Seules la pectinesterase et la beta-D-xylosidase 2, respectivement surexprimées chez Lx (d'après l'étude transcriptome) et chez Levovil (d'après l'étude protéome), ne présentent pas de différentiel significatif d'après l'analyse des puces à oligonucléotides et ni d'après les résultats de RT-PCR quantitative la beta-D-xylosidase 2.

**Figure VI.8: Profils d'expressions obtenu par RT-PCR quantitative révélant l'effet de l'introgression des régions porteuses de QTL dans un des deux fonds génétiques.**



**Figure VI.9: Profils d'expression obtenus par RT-PCR quantitative ne révélant pas d'effet net de l'introgression des régions porteuses de QTL.**



### b/ Effets des QTL et des fonds génétiques sur les profils d'expression

Pour les différents gènes candidats étudiés, les profils d'expression obtenus se répartissent en trois catégories selon que l'on confirme ou pas l'effet de l'introgression des régions porteuses de QTL, dans les deux fonds génétiques ou dans un seul. Afin de faciliter la description des figures qui vont suivre, nous parlerons de sur- ou de sous-expression chez les lignées d'introgression en référence au niveau d'expression observé chez les lignées parentales et du différentiel d'expression initial en référence au différentiel obtenu au niveau des études du transcriptome et/ou du protéome (en comparaison au différentiel détecté en RT-PCR quantitative).

#### **Effet de l'introgression des régions porteuses de QTL dans les deux fonds génétiques**

Cinq gènes appartiennent à cette catégorie (Figure VI.7).

Le différentiel d'expression initial est confirmé pour tous les gènes, excepté pour la Le-HSP17.6 et la beta-D-xylosidase, LEXYL2. La glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase, la beta-xylosidase, LEXYL1, et la Le-HSP17.6 sont majoritairement exprimées au cours de la maturation alors que les ARN messagers de l'aquaporine 5 et de la beta-D-xylosidase, LEXYL2, s'accumulent principalement pendant les phases précoces du développement. La glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase n'est exprimée que chez Cervil et chez Lx et Bx.

La beta-xylosidase, LEXYL1, exprimée chez tous les génotypes, est surexprimée chez Lx et Bx.

A l'inverse, la beta-D-xylosidase, LEXYL2, sous-exprimée chez toutes les lignées introgressées.

Le gène Le-HSP17.6, très fortement exprimé chez Cervil, a un profil d'expression plus complexe avec des différentiels entre les lignées parentales et les lignées d'expression pour plusieurs stades. Au stade tournant, il est surexprimé chez Lx et NIL-B9A et sous-exprimé chez NIL-L9A et Bx et à sur-maturité chez toutes les lignées introgressées.

Enfin, l'aquaporine 5, faiblement exprimée chez Cervil, est surexprimée chez NIL-B9A et Lx et sous-exprimée chez NIL-L9A et Bx.

#### **Effet de l'introgression des régions porteuses de QTL dans un des deux fonds génétiques**

(Figure VI.8)

L'ACC Oxydase (protéine E8), spécifique de la maturation du fruit, est sous-exprimée chez NIL-B9A.

Les transcrits de la beta-(1-3)-glucosyl transférase et de la xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase (XTH3) sont présents à tous les stades de développement. Au stade rouge, leur niveau d'expression diminue chez Lx pour la beta-(1-3)-glucosyl transférase et augmente fortement chez Bx pour la xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase (XTH3).

Pour ces trois gènes, le différentiel d'expression initial est validé.

### **Pas d'effet net de l'introggression des régions porteuses de QTL** (Figure VI.9)

La xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase, l'annexine P34 et l'aquaporine 1 sont plus ou moins exprimés à tous les stades de développement. Pour ces gènes, les profils d'expression sont complexes mais globalement comparables quels que soient les génotypes. Le niveau général d'expression de l'aquaporine 1 est très élevé chez VilB, intermédiaire chez Levovil et faible chez Cervil, sans effet des introgressions. Le différentiel d'expression initial n'est pas confirmé pour l'annexine P34 dont la protéine était surexprimée chez VilB au stade rouge d'après les analyses du protéome.

## **IV. Discussion et conclusion**

### *IV.1. Efficacité des méthodes*

Plusieurs points de l'analyse du protéome peuvent être discutés.

Pour toutes les comparaisons, un plus grand nombre de variations quantitatives ont été détectées. Les variations qualitatives, *a priori* plus catégoriques, sont en réalité plus difficiles à interpréter car elles peuvent avoir plusieurs origines. L'absence du spot peut correspondre à une absence réelle d'expression. Cependant, il peut également s'agir d'un spot faiblement exprimé, situé en dessous du seuil de détection qui serait en fait une variation quantitative. D'autres part, certaines fonctions sont associées à plusieurs spots, correspondant probablement, (i) à des modifications post-traductionnelles dans le cas de chapelet de spots (protéine E8, spots CM40+JC7, CM46, JC36 et JC6+JC68), (ii) à un polymorphisme allélique quand le spot, absent à une des positions, est systématiquement présent à l'autre (Chloroplast small heat shock protein class I, spots DT8+DT49+CM203 et MB14+CM65+DT27; Elicitor-inducible protein EIG-J7, spots DT9+DT51 et JC52 et MB25).

Concernant l'identification de fonction, la série de séquençage que nous avons réalisée a permis d'attribuer une fonction à 97,6% des spots séquencés en LC-MS/MS. Ce point ne constitue donc pas un facteur limitant pour l'étude du protéome du péricarpe du fruit de tomate. Par contre, le coût de chaque analyse en est un. Pour notre étude, une fonction n'est disponible que pour 20% des spots différentiellement exprimés au stade 14JAA et 26% au stade rouge. Il reste donc encore de nombreuses possibilités d'identifier des gènes candidats en relation avec les variations de texture.

Les puces à ADN constituent un outil puissant pour étudier l'expression d'un grand nombre de gènes simultanément. De nombreux articles posent la problématique des plans d'expérience (Churchill, 2002) et des chaînes d'analyse des données à mettre en place afin d'optimiser la fiabilité des résultats obtenus (Clarke and Zhu, 2006; Nettleton, 2006; Storey, 2002; Yeung *et al.*, 2005). Pour notre étude, ces paramètres ont bien été pris en compte mais la partie pratique s'est révélée la plus délicate. Nos résultats soulignent l'importance de pouvoir contrôler efficacement les différentes étapes de préparation des ADNc marqués et d'utiliser les automates telles que les stations d'hybridation permettant de limiter au maximum les variations expérimentales (Clarke and Zhu, 2006). Quoi qu'il en

soit, il est dans tous les cas nécessaire de confirmer par RT-PCR quantitative les résultats issus de l'analyse de puces à ADN (Chuaqui *et al.*, 2002). Pour tous les gènes que nous avons testés, le différentiel d'expression initialement détecté a été confirmé. Cependant, comme nous l'avons expliqué précédemment, la quantité de données manquantes ne nous permet non seulement pas de confronter les listes de gènes obtenues pour chaque comparaison, mais rend également impossible le rapprochement avec les résultats issus de l'étude du protéome.

L'étude du protéome et du transcriptome nous a permis de révéler vingt-et-un gènes candidats, pour la plupart associés aux modifications des parois cellulaires. La moitié de ces gènes ont ensuite été étudiés en RT-PCR quantitative et les différentiels d'expression initialement observés ont été confirmés, excepté pour trois gènes.

Pour l'annexine P34, le spot correspondant est très fortement surexprimé chez ViIB (Figure VI.5) et la position du spot sur le gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle ne prête pas à confusion. Il est donc possible d'envisager que nous sommes dans le cas des gènes décrits comme présentant des différences entre le niveau d'accumulation des transcrits et des protéines (Greenbaum *et al.*, 2002).

Pour la beta-D-xylosidase, LEXYL2, également identifiée par l'étude du protéome, la même hypothèse peut être avancée, le différentiel d'expression et la position du spot étant également peu contestables (Figure VI.5). Toutefois, ce gène correspond à un spot pour lequel deux identifications sont disponibles. On peut donc également supposer que deux protéines sont présentes à la même position et que la variation observée est associée à l'autre protéine. D'autant plus que nous observons une surexpression de la beta-D-xylosidase, LEXYL2, chez les lignées parentales aux stades 14JAA et au stade rouge alors que ce gène est décrit comme préférentiellement exprimée dans les phases précoces du développement du fruit (Itai *et al.*, 2003).

Enfin, l'aquaporine 1 est issue de l'analyse des puces à oligonucléotides et pourrait correspondre à un faux positif (Storey, 2002; Wang *et al.*, 2003), de nombreux articles concernant la méthodologie et l'analyse des microarrays soulevant la question de la reproductibilité des résultats (Couzin, 2006; Eisenstein, 2006). Cependant, nous avons montré que la majorité des gènes testés présentent des différentiels d'expression stables, confirmés par les différentes méthodes utilisées et pour des échantillons récoltés à différentes années (Tableau VI.7). De plus, une étude complémentaire sur la reproductibilité et la stabilité des différentiels d'expression a été effectuée sur 26 gènes sélectionnés à partir des puces à oligonucléotides (correspondant à 30% des gènes différentiellement exprimés). Les profils d'expression ont été vérifiés par RT-PCR quantitative aux 4 stades de développement et la même tendance de différentiel a été obtenue pour 23 gènes.

La cartographie des gènes candidats s'est révélée difficile essentiellement du fait que ces gènes appartiennent le plus souvent à des familles multigéniques et du faible niveau de polymorphisme moléculaire. La plupart des gènes cartographiés ne colocalisant pas avec les régions porteuses de QTL, on peut supposer l'existence d'interactions entre les gènes introgressés et d'autres régions du génome qui entraîneraient des variations d'expression pour des gènes non localisés sur les QTL. Ceci

a été suggéré par les travaux de Baxter *et al.* (2005) qui, par une démarche inverse, a comparé le transcriptome de plusieurs lignées d'introggression présentant des variations de teneurs en solides solubles, pour lesquelles des gènes candidats du métabolisme carboné avaient été cartographiés dans les régions cibles.

La tentative de cartographie *in silico* a fourni des résultats encourageants puisque des alignements de séquence positifs ont été obtenus pour la moitié des unigènes testés. Cependant, la localisation chromosomique n'est pas encore disponible pour tous les clones BAC, ni pour tous les marqueurs COS et, par conséquent, très peu de protéines ont pu être localisées sur la carte génétique. Dans le futur, la cartographie de gènes candidats par ce type d'approche devrait être facilitée, le génome de la tomate étant en cours de séquençage.

#### IV.2. Effets de l'introggression et interactions génétiques

Les résultats obtenus par l'étude du protéome du péricarpe du fruit de tomate nous ont permis de mettre en évidence différents niveaux de variations. En considérant l'ensemble des spots différentiellement exprimés, l'effet du stade de développement est le plus important et traduit les différences physiologiques qui existent entre un fruit vert en phase d'expansion cellulaire et un fruit à maturité. Ces variations sont cohérentes avec celles observées à travers l'analyse de l'évolution du protéome au cours du développement du fruit de tomate (Faurobert *et al.*, *in press*). Si l'on considère séparément les deux stades de développement, l'effet de l'introggression est la première source de variation, les profils électrophorétiques révélant de 10 à 15% de protéines différentiellement exprimées associées aux régions introgressées. Des différences entre la totalité des spots détectés sont mêmes observées, un plus grand nombre de spots étant présents chez les lignées parentales. L'effet du fonds génétique est également important puisque seulement 25% des spots différentiellement exprimés sont identifiés à la fois pour la comparaison Levovil/Lx et la comparaison VilB/Bx, quel que soit le stade de développement. Si l'on s'intéresse plus précisément aux types de variations observées, l'effet de l'introggression se traduit principalement par des variations quantitatives, avec, au stade rouge, une très forte proportion de spots surexprimés chez Lx et Bx.

Les spots pour lesquels une fonction a pu être proposée se répartissent dans plus de 20 catégories fonctionnelles montrant que l'introggression des cinq régions chromosomiques affecte l'expression de gènes impliqués dans un grand nombre de mécanismes physiologiques. Ceci n'est pas vraiment surprenant part du fait que les fragments chromosomiques introgressés représentent au total 265 cM, soit plus d'un quart du génome. De plus, comme nous l'avons rappelé précédemment, deux stades de développement correspondant à deux états physiologiques bien distincts ont été étudiés.

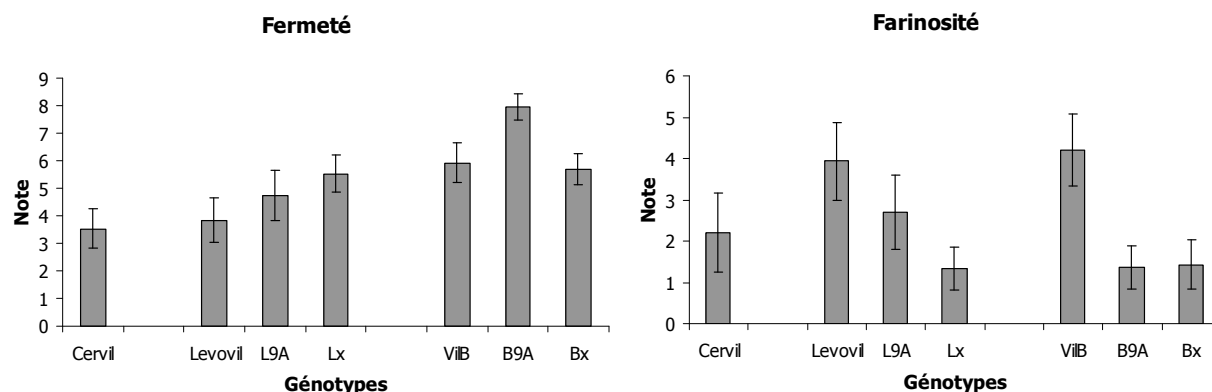
Les profils d'expressions au cours du développement du fruit obtenus par RT-PCR quantitative ont permis d'obtenir plus d'informations concernant le type d'interactions génétiques pouvant réguler l'expression des gènes.

**Tableau VI.8: Récapitulatif des gènes candidats identifiés en relation avec les modifications de texture, classés selon leur rôle physiologique.**

Origine	Unigène TIGR	Fonction	Génotypes surexprimant le gène	Stade
<b>Biosynthèse des composés pariétaux</b>				
Transcriptome	TC154035	GDP-mannose pyrophosphorylase	Levovil	Rouge
Transcriptome	AW931535	1,3-beta-glucan synthase family	ViIB	Rouge
Transcriptome	TC162599	Similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	Levovil	Rouge
<b>Grandissement cellulaire</b>				
Protéome	TC156245	Actin-depolymerizing factor 2	Lx, Bx	14JAA
Transcriptome	TC158461	Mannitol dehydrogenase (ELI3-1)	Levovil, ViIB	14JAA
Protéome	TC161872	Annexin P34	ViIB	Rouge
<b>Modification du réseau hémicellulosique</b>				
Transcriptome	TC154952	Xyloglucan endotransglycosylase	ViIB	14JAA
Transcriptome	TC163780	Xyloglucan endotransglycosylase (XET-1)	ViIB	14JAA
Protéome/Transcriptome oligo	<i>NP000369</i>	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Lx, Bx	Rouge
Transcriptome	TC164317	Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	Levovil	Rouge
Transcriptome/Transcriptome oligo	TC153904	Xyloglucan endotransglycosylase-hydrolase (XTH3)	Levovil	Rouge
Transcriptome	TC153905	Xyloglucan endotransglycosylase-hydrolase (XTH3)	Levovil	Rouge
<b>Modification des pectines</b>				
Protéome/Transcriptome	TC153944	Polygalacturonase 2A precursor	Lx, Bx	Rouge
Transcriptome	TC160782	Pectinesterase family	Levovil	Rouge
<b>Glycosyl hydrolases</b>				
Transcriptome	TC165224	Beta-galactosidase	Bx	14JAA
Protéome	<i>AW624228</i>	Alpha-mannosidase	Levovil, ViIB	14JAA et Rouge
Protéome/Transcriptome oligo	TC154654	Beta-D-xylosidase, LEXYL2	ViIB	Rouge
Transcriptome oligo	TC158851	Beta-xylosidase, LEXYL1	Lx	Rouge
Transcriptome	TC153735	Glycosyl hydrolase family	Bx	Rouge
<b>Inhibiteur de la protéolyse</b>				
Protéome/Transcriptome	TC163406	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6	Lx, Bx	14JAA et Rouge
Transcriptome	TC161886	Spermidine synthase 1	ViIB	Rouge
<b>Echanges d'eau</b>				
Transcriptome oligo	TC115715	Aquaporine 1	Lx	21JAA
Transcriptome oligo	TC123718	Aquaporine 5	Lx	21JAA

**Figure VI.9: Evaluation sensorielle de la fermeté et de la farinosité des fruits rouges des lignées parentales et des lignées d'introgression correspondantes (d'après la figure IV.3).**

La note maximale pour chaque attribut est de 10.





Pour la beta-xylosidase LEXYL1, l'effet de l'introggression se traduit par la surexpression du gène à la fois chez les lignées d'introggression cumulant les cinq régions et chez les lignées quasi-isogéniques pour la région haute du chromosome 9. Le niveau d'expression est plus élevé dans le fonds VilB que dans le fonds Levovil, illustrant l'existence d'interactions entre le fonds génétique et les régions introgressées. De plus, la quantité de transcrite est plus faible chez les lignées quasi-isogéniques que chez Lx et Bx, ce qui peut être la conséquence d'interactions entre ces régions régulant l'expression du gène. Les variations d'expression de la beta-D-xylosidase LEXYL2 sont inversées par rapport à celle de la beta-xylosidase LEXYL1 puisque lignées d'introggression, Lx et Bx, et les lignées NIL-L9A et NIL-B9A sous-expriment le gène. Cependant, les interactions régulant l'expression du gène semblent être du même type. Les profils d'expression obtenus pour la LEXYL1 et la LEXYL2 suggèrent que les gènes sont localisés dans la région du chromosome 9 mais, dans les deux cas, la tentative de cartographie n'a pas permis de confirmer cette hypothèse.

Des interactions épistatiques semblent également être à l'origine des profils d'expression obtenus pour l'aquaporine 5 et le gène Le-HSP17.6. Les variations d'expression pour les lignées introgressées sont inversées entre les deux fonds laissant supposer que les interactions entre les cinq régions sont également régulées par le fonds génétique.

Enfin, seul l'effet de l'introggression est observé pour la glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase qui n'est exprimée que chez Lx et Bx, le fonds génétique ne semblant pas avoir d'influence sur le niveau d'expression du gène.

Pour les gènes présentés dans la figure VI.8, les profils sont plus extrêmes avec un différentiel d'expression observé pour une seule des lignées introgressées et dans un seul fonds génétique laissant présager des interactions génétiques complexes. A ce stade, il serait hasardeux d'émettre des hypothèses. Une étude plus approfondie du niveau d'expression de ces gènes, chez les lignées quasi-isogéniques pour les quatre autres régions, par exemple, pourrait fournir plus d'éléments de compréhension.

#### *IV.3. Gènes candidats associés à la texture*

Un récapitulatif des gènes candidats identifiés en relation avec les variations de texture du fruit de tomate est présenté dans le tableau VI.8. Les mécanismes physiologiques en jeu concernent essentiellement les modifications de la paroi cellulaire. Des gènes impliqués dans le grandissement cellulaire, les échanges d'eau ou ayant un rôle protecteur vis-à-vis de la protéolyse ont également été identifiés.

Même si un plus grand nombre de gènes sont différenciellement exprimés au stade rouge, quelques gènes ont pu être identifiés au stade 14JAA, laissant présager que les variations de texture observées chez le fruit mûr peuvent être la conséquence d'événements associés aux phases précoces du développement. Notamment, les gènes impliqués dans les processus de grandissement cellulaire peuvent être mis en relation avec la structure et l'organisation cellulaire des tissus. Ainsi, le facteur 2

de dépolymérisation de l'actine, par exemple, permet de réguler la réorganisation des filaments d'actine et la surexpression de ce gène aurait un effet négatif sur la croissance et l'élongation cellulaire (McCurdy *et al.*, 2001; Wasteneys and Galway, 2003).

Les relations entre la texture du fruit et la structure cellulaire des tissus ou l'état de turgescence des cellules sont très peu étudiés. En revanche, les différentes enzymes liées aux changements des structures pariétales, intervenant dans les modifications des pectines, du réseau hémicellulosique et des chaînes de sucres associées ont été très largement décrites (Brummell and Harpster, 2001; Redgwell and Fischer, 2002). Nous n'allons pas détailler toutes les connaissances acquises sur chacune d'entre elles (effectué dans la synthèse bibliographique) mais simplement rappeler que plusieurs études, utilisant la transformation génétique, ont eu pour objectif de tester l'effet individuel de ces enzymes modifiant la structure de la paroi cellulaire sur la texture du fruit, et peu de résultats concluants ont été obtenus (Brummell and Harpster, 2001; Brummell *et al.*, 1999). Face à la complexité de la structure et de la composition de la paroi cellulaire et à la quantité de processus biochimiques en relation avec les modifications pariétales, les changements de texture au cours de la maturation des fruits résulteraient plutôt de l'interaction de différentes enzymes (Rose and Bennett, 1999; Waldron *et al.*, 2003).

A partir des seuls différentiels d'expression observés entre Levovil et Lx ou entre VilB et Bx, il serait présomptueux d'établir un lien avec les phénotypes observés pour les caractères de fermeté ou de farinosité (Figure VI.3), d'autant plus si la variation n'a été détectée que pour une des comparaisons. En revanche, les profils d'expression au cours du développement du fruit ayant également été réalisés sur les lignées NIL-L9A et NIL-B9A, la comparaison du niveau d'expression des gènes observé pour les six lignées avec les données phénotypiques correspondantes peut permettre de sélectionner des gènes candidats pertinents. Ainsi, les variations d'expression entre les différents génotypes relatives à l'aquaporine 5 et au gène Le-HSP17.6 semblent être liées aux variations observées pour le caractère de fermeté, celles de la beta-xylosidase LEXYL1 et de la la beta-D-xylosidase, LEXYL2, pouvant être reliées aux variations du caractère de farinosité. A ce stade d'analyse, il n'est pas possible d'aller au-delà de ces observations. Cependant, les éléments de la bibliographie concernant ces gènes proposent des arguments en faveur de ces associations. En effet, les aquaporines pourraient jouer un rôle prépondérant dans la turgescence des cellules du fruit, les beta-xylosidases seraient impliquée dans la dégradation des hémicelluloses et la HSP aurait un rôle de protection des cellules.

Les aquaporines sont des protéines impliquées dans le transport d'eau à travers la membrane plasmique. Une étude récente a mis en évidence neuf isogènes d'aquaporines de type membranaires chez la tomate (PIPs pour plasma membrane intrinsic protein) dont huit s'expriment chez le fruit (Shiota *et al.*, 2006). Cinq font partie de la famille des PIP1 et quatre de la famille des PIP2, ces dernières montrant une activité forte sur les flux d'eau. Les aquaporines 1 et 5 décrites dans cette étude appartiennent à cette deuxième famille et correspondent respectivement aux PIP2-3 et PIP2-2.

Les travaux de Shiota *et al.* (2006) ont mis en évidence des profils d'expression très divers au cours du développement du fruit avec des gènes qui s'expriment pendant les phases précoces du développement (PIP1-1, PIP1-2, PIP2-2...), au cours de la maturation (PIP1-5, PIP2-1, PIP2-3...) et d'autres étant plutôt constitutifs (PIP1-4). Leur conclusion indique que le taux d'expression de PIP total est maintenu tout le long du développement du fruit et implique au minimum 8 PIPs.

Les beta-xylosidases sont des enzymes qui dégradent les hémicelluloses de type xylanes. Elles ont été isolées principalement chez les bactéries et les champignons et ont été découvertes très récemment chez les fruits. Les deux isogènes LEXYL1 et LEXYL2 ont été isolés chez la tomate (Itai *et al.*, 2003) et les profils d'expression que nous avons observés pour ces gènes sont similaires à ceux obtenus dans cette étude. De plus, ces travaux ont montré que les mutants de la maturation *rin* et *nor*, la LEXYL1 n'est pas exprimée chez les fruits à maturité. Plus récemment, une relation positive entre le niveau d'expression d'une beta-xylosidase maturation-spécifique et la fermeté de la fraise a été mise en évidence (Bustamante *et al.* 2006).

Le rôle exact du gène Le-HSP17.6 n'est pas clairement défini mais les HSP protégeraient les protéines de la protéolyse (Vierstra, 1993). Chez la tomate, cette protéine a été décrite comme pouvant être impliquée dans la protection des cellules face aux dysfonctionnements métaboliques induits par un stress froid ("chilling injury") (Kadyrzhanova *et al.*, 1998).

#### IV.4. Conclusion

L'objectif de cette étude était d'identifier des gènes dont les fonctions et/ou le niveau d'expression pourrait être associé aux effets de QTL contrôlant les variations de texture du fruit. D'une façon générale, la stratégie développée a fourni des résultats encourageants. La comparaison de lignées possédant le même génome à l'exception de cinq régions chromosomiques où ont été localisés des QTL de la qualité organoleptique, nous a permis d'identifier, par l'étude du protéome et du transcriptome, de nombreux gènes différentiellement exprimés. Ainsi, des premiers éléments d'informations ont pu être obtenus quant aux mécanismes physiologiques et aux phases de développement associés aux modifications texturales.

Les gènes candidats en relation avec les variations de texture obtenus par l'approche sans *a priori* correspondent à des fonctions physiologiques variées. Notamment, les gènes impliqués dans les processus de grandissement cellulaire au cours des phases précoces du développement du fruit sont particulièrement intéressants et ils ont très peu été étudiés chez le fruit. Cependant, la caractérisation individuelle de ces gènes étant lourde et onéreuse, la majorité des gènes candidats que nous avons choisi d'étudier en priorité concernent les modifications des parois cellulaires au stade rouge. Si les différentiels d'expression ont été confirmés pour plusieurs gènes, le lien entre le niveau d'accumulation des transcrits et le phénotype des lignées introgressées est beaucoup moins évident.

Les profils d'expression de l'aquaporine 5 et, d'une façon moins nette, du gène Le-HSP17.6 sont en relation avec les variations phénotypiques observées pour le caractère de fermeté. De même, les variations d'expression des deux xylosidases, LEXYL1 et LEXYL2 chez les différents génotypes sont très proches des variations observées pour la farinosité.

Pour finir, les comparaisons de génotypes réalisées ciblant les composantes de la qualité organoleptique, il est important de signaler que des gènes candidats associés à d'autres caractères que la texture du fruit peuvent être identifiés. En ne considérant que la liste de gènes différentiellement exprimés obtenus à partir de l'étude du protéome (Tableau VI.3), plusieurs protéines en relation avec le métabolisme des sucres ont été identifiées telle que la fructokinase 3 (German *et al.*, 2004) qui a par ailleurs été cartographié dans l'intervalle d'un QTL contrôlant la teneur en sucres, sur le chromosome 2. De la même façon, l'aconitase cytosolique et la lipoxygénase B peuvent respectivement être associés aux QTL contrôlant les teneurs en acides (Carrari *et al.*, 2003) et en composés volatils (Ferrie *et al.*, 1994).

**DISCUSSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

---

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

Ces dernières années, l'essor de la génomique fonctionnelle s'est traduit par l'accumulation d'un grand nombre de données sur l'expression des génomes, le plus souvent issues de l'analyse du transcriptome, du protéome ou du métabolome. Ceci a favorisé l'émergence d'une nouvelle discipline, la biologie des systèmes ou biologie intégrative. La biologie des systèmes se définit comme "l'étude itérative et intégrative des systèmes biologiques en tant que systèmes, en réponse à des perturbations" (Auffray *et al.*, 2003; Kitano, 2002). Cette démarche nouvelle s'attache à réunir l'ensemble des informations décrivant un modèle biologique donné afin de mieux comprendre les réseaux d'interactions qui le régissent et aller du génome au phénotype (Pigliucci, 2003).

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette démarche scientifique, l'objectif principal étant de mieux comprendre les mécanismes de régulation aussi bien génétiques que physiologiques ou moléculaires contrôlant les variations de composantes de la texture du fruit.

### **Une démarche intégrée pour la caractérisation des composantes de la texture et, plus largement, de la qualité organoleptique du fruit de tomate**

L'étude des QTL associés aux différentes composantes de la texture du fruit de tomate s'inscrit dans une démarche plus globale de caractérisation de QTL contrôlant la qualité organoleptique, car ceux-ci sont fréquemment regroupés en cluster.

Cette démarche intégrée a associé une approche génétique visant à caractériser l'effet individuel de QTL de qualité, l'influence du fonds génétique et de l'environnement sur l'expression de ces QTL et une approche génomique visant à identifier des gènes candidats susceptibles de correspondre aux effets de ces QTL. Que ce soit au niveau génétique ou moléculaire, nous avons pu montrer que des interactions complexes régissent l'expression de ces caractères dès les premières phases de développement du fruit. Plus particulièrement, pour les composantes de la texture des fruits, plusieurs sources de variations ont pu être identifiées, l'effet des facteurs génétiques et environnementaux sur l'expression de ces caractères étant prépondérant. De plus, l'existence d'interactions génétiques régulant l'expression des QTL associés à la fermeté du fruit a pu être observée que ce soit par l'étude de l'effet individuel des QTL, la cartographie fine ou même les études d'expression de plusieurs gènes candidats. Trois types d'interaction ont été décrits (i) interactions entre QTL et fonds génétique, (ii) interactions entre QTL des cinq régions d'intérêt (iii) interactions au sein d'une même région introgressée, portant probablement plusieurs QTL.

En complément, l'approche génomique a permis de révéler l'existence de réseaux de régulation, certains gènes candidats n'étant pas localisés dans les régions introgressées présentant des variations d'expression.

La caractérisation de la texture du fruit a été réalisée à différentes échelles, faisant intervenir plusieurs approches. Les fruits à maturité ont pu être décrits pour leurs caractéristiques sensorielles, leurs propriétés rhéologiques et leur morphologie. De plus, la structure et l'organisation cellulaire des tissus du péricarpe ont également été décrits. Ce phénotypage multicritère nous a permis de montrer que les composantes de la texture résultent de l'association de plusieurs mécanismes physiologiques. Des différences entre les lignées quasi-isogéniques disponibles pour les régions chromosomes 4 et 9 ont pu être observées au niveau de l'organisation cellulaire. Pourtant, ces deux régions portent des QTL associés aux variations de fermeté et de farinosité, suggérant que les mécanismes physiologiques qui contrôlent les variations texturales sont différents dans chacun des cas. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par l'étude du protéome où des processus associés aux modifications des parois cellulaires, à l'état de turgescence des cellules ou au grandissement cellulaire ont été supposés impliqués dans la construction de la texture du fruit. Enfin, des analyses ont également été réalisées à partir des mêmes lignées quasi-isogéniques afin d'étudier les relations entre la composition biochimique et la structure des parois cellulaires. Ainsi, les analyses biochimiques suggèrent que la farinosité en lien avec les propriétés d'adhésion cellulaire est associée à la structure du réseau pectique tandis que la fermeté serait plutôt en rapport avec la structure du réseau hémicellulosique (Quémener *et al.*, 2007).

Des collaborations sont en cours afin de poursuivre ce type de caractérisation multicritère au niveau de l'ensemble des composantes de la qualité organoleptique, notamment par des analyses globales du métabolome (Schauer *et al.*, 2006).

## **De l'identification de gènes candidats au clonage de QTL**

L'étude du protéome et du transcriptome que nous avons réalisée a permis d'identifier un certain nombre de gènes candidats pouvant être associés aux effets des QTL de fermeté ou de farinosité du fruit. Cependant, un facteur limitant de cette approche est la caractérisation plus fine de ces gènes qui ne peut pas être réalisée pour chacun de façon systématique.

La recherche de colocalisations avec les régions porteuses des QTL ciblés permet de réduire la liste de gènes candidats en sélectionnant les candidats fonctionnels et positionnels. Dans le cadre de notre étude, la cartographie des gènes candidats s'est révélée très délicate. Différentes techniques de génotypage à haut débit utilisant les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont récemment été développées et pourraient permettre d'exploiter plus efficacement le faible niveau de polymorphisme auquel nous avons souvent été confrontés pour développer des marqueurs PCR spécifiques (Giancola *et al.*, 2006). De plus, le séquençage du génome de la tomate étant en cours (Mueller *et al.*, 2005b),

la cartographie *in silico* devrait être facilitée. A terme, l'annotation du génome fournira des informations essentielles sur le nombre et la localisation des membres des familles multigéniques.

A une autre échelle, les outils de génomique fonctionnelle peuvent être utilisés pour réaliser des profils d'expression à partir des populations ayant servi à la détection de QTL (Salvi, 2005). En effet, le niveau d'expression d'un gène, transcrits ou protéine, peut être assimilé à un caractère quantitatif et utilisé en tant que tel pour réaliser des analyses QTL. Des colocalisations entre ces QTL d'expression, eQTL (ou PQL dans le cas spécifique des protéines) et des QTL correspondants à des caractères phénotypiques sont ensuite recherchées. Ce type d'approche, combiné aux informations de séquences génomiques, permettrait de savoir si la régulation d'un gène donné est sous le contrôle d'un facteur localisé dans le gène ou à proximité (régulation en *cis*) ou d'un facteur distant (régulation en *trans*). L'existence de clusters de QTL contrôlant la variation d'expression de plusieurs gènes permet d'identifier des réseaux de régulation éventuellement complexes.

A ce jour, concernant le clonage de QTL, la plupart des gènes clonés chez les plantes l'ont été par clonage positionnel complété en phase finale par l'approche gène candidat (Price, 2006). Les travaux de Baxter *et al.* (2005) ont montré qu'il était possible, pour des QTL majeur, d'identifier quelques gènes candidats associés aux effets de QTL contrôlant la teneur en sucre, en comparant à l'aide de puces à ADNc les profils d'expression de lignées d'introgression.

L'approche que nous avons développée ciblait cinq régions chromosomiques simultanément et pourrait plutôt être assimilée à une phase de criblage des différents mécanismes physiologiques pouvant être impliqué dans la construction de la qualité organoleptique du fruit. Dans l'optique de cloner un QTL contrôlant les variations de texture, il serait préférable d'appliquer l'approche gène candidat à la comparaison de lignées issues de la cartographie fine des régions des chromosomes 4 et 9. Plus le fragment introgressé sera petit, plus nous cibleront spécifiquement les régions liées au QTL d'intérêt.

## **Perspectives**

A cours terme, certains résultats de ce travail de thèse doivent être confirmés ou finalisés. En fonction de cela, plusieurs perspectives seront envisageables.

La cartographie fine des régions localisées sur les chromosomes 4 et 9 a permis de sélectionner, dans les deux cas, des lignées recombinantes où l'effet des QTL associés à la fermeté du fruit a pu être détecté. Il faudra en priorité s'assurer que les effets observés sont stables en répétant l'expérimentation une deuxième année. Si les effets sont conservés, il serait ensuite intéressant d'affiner la position des QTL en génotypant des marqueurs présents dans l'intervalle de 10 cM actuellement défini et de poursuivre ensuite la cartographie fine initiée en recherchant de nouveaux



recombinants dans la région. Le clonage positionnel des QTL de fermeté pourrait être envisagé pour au moins une des deux régions, d'autant plus que les mesures instrumentales de compression disponibles (rapides et peu coûteuses) sont positivement corrélées aux évaluations sensorielles et permettent d'envisager le phénotypage avec un débit élevé. Des QTL associés à la farinosité ayant également été localisés sur les régions des chromosomes 4 et 9, l'évaluation sensorielle des recombinants sélectionnés pour la fermeté nous fournirait des informations quant au lien entre les deux caractères. Cependant, il n'est pas envisageable de mettre en place ce type d'analyse pour un seul caractère, aussi difficile à mesurer. Ceci souligne le besoin d'identifier une méthode instrumentale permettant d'estimer la farinosité du fruit.

Au niveau de l'étude du protéome, le séquençage des spots différenciellement exprimés doit être poursuivi ce qui permettra d'identifier de nouveaux gènes candidats, que ce soit pour les composantes de la texture du fruit ou de la qualité organoleptique dans son ensemble. De plus, les profils protéiques des lignées issues de la cartographie fine pourraient être réalisés. Ainsi, les gènes candidats associés à la texture du fruit, plus spécifiques des QTL localisées sur les chromosomes 4 et 9, pourraient être sélectionnés. De plus, la comparaison des niveaux d'accumulation des protéines observés pour ces lignées à ceux observés pour Lx pourrait permettre de mieux appréhender la nature des interactions génétiques existant entre les cinq régions introgressées. Enfin, l'étude du protéome pariétal pourra être envisagée, des protocoles adaptés étant en cours de développement au laboratoire.

L'approche transcriptome n'ayant pas abouti du fait de problèmes techniques, les comparaisons de génotypes doivent être répétées afin de pouvoir comparer les résultats à ceux obtenus au niveau du protéome. Etant donné que les gènes candidats que nous avons déjà pu identifier appartiennent très souvent à des familles multigéniques, il serait préférable d'utiliser des puces à oligonucléotides afin d'éviter le risque d'hybridation croisée des différentes isoformes du même gène.

La caractérisation des gènes candidats a été initiée par l'étude des gènes dont la fonction était liée aux modifications des parois cellulaires. Cependant, d'autres gènes, impliqués notamment dans les mécanismes de différenciation cellulaire peuvent constituer des candidats pertinents, d'autant plus que l'analyse de la structure et de l'organisation cellulaire des tissus du péricarpe a mis en évidence des corrélations entre la distribution des cellules selon leur taille et la fermeté et entre la forme des cellules et la farinosité. Une étude approfondie de ces gènes devra être réalisée.

A plus long terme, des approches complémentaires de celles que nous avons développées pourront être mises en place.

Comme nous l'avons signalé précédemment, la caractérisation de gènes candidats doit être élargie à d'autres mécanismes physiologiques. Il sera ensuite intéressant de sélectionner quelques gènes, si possible colocalisant avec les régions des QTL et représentatifs des différents processus impliqués

dans les modifications texturales du fruit afin d'entreprendre la validation fonctionnelle de ces gènes par transformation génétique. Cette étape sera probablement délicate comme ont pu le démontré les travaux de Brummel and Harpster (2001). En effet, ces gènes appartenant à des familles multigéniques, la perturbation de l'expression d'une isoforme peut être compensée par un autre gène de la famille et aucune variation du phénotype ne sera observée. De plus, le rôle de ces gènes est associé à des mécanismes physiologiques concernant la plante dans son ensemble que ce soit au niveau de la structure des parois cellulaires, de la différenciation cellulaire ou de l'état de turgescence des cellules. Il sera donc nécessaire de privilégier des gènes spécifiquement exprimés dans le fruit afin de limiter l'impact de leur sur- ou sous-expression sur l'architecture générale de la plante qui pourrait avoir des conséquences sur le développement du fruit. Une alternative à ces problèmes serait d'utiliser des promoteurs fruits spécifiques.

L'étude de la stabilité des effets des QTL contrôlant les variations de fermeté du fruit a montré que ce caractère est très sensible aux effets environnementaux. Une analyse écophysiological des différents facteurs pouvant être en cause tels que la position du fruit sur la plante ou sur le bouquet, l'exposition à la lumière, la température, les conditions de cultures, permettrait d'évaluer l'impact de chacun d'eux sur les modifications texturales du fruit de tomate à maturité.

La qualité organoleptique du fruit est étudiée chez de nombreux fruits. Aussi, le transfert de résultats obtenus sur le modèle tomate vers d'autres fruits charnus est envisageable et permettra de savoir si les mêmes mécanismes physiologiques sont impliqués chez différentes espèces. De plus, chez les espèces fruitières pérennes, la création de lignées quasi-isogéniques comme cela a pu être réalisé chez la tomate est peu envisageable du fait de la durée du cycle de développement. Des approches *a priori* utilisant les gènes candidats identifiés chez la tomate pourraient être développées et faciliter l'étude des caractères de la qualité organoleptique du fruit.

Ce travail a permis de fournir des informations quant aux différents facteurs pouvant influencer l'expression des QTL contrôlant des composantes de la qualité organoleptique du fruit de tomate et d'accumuler de nombreuses données sur les réseaux de gènes régulés en relation avec les régions chromosomiques associées à ces QTL. L'ensemble de ces informations constitue une base solide pour la poursuite de la caractérisation des QTL associés à la qualité organoleptique du fruit de tomate pour identifier, pour chaque composante, les réseaux de gènes/protéines corégulés suivant le contexte génétique.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abbal P, Planton G.** 1990. La mesure objective de la fermeté des fruits et légumes, un pénétromètre électronique automatique et programmable, le système Pénélaup. *Infos-Ctifl* **62**, 27-30.
- Abbott JA.** 2004. Textural quality assessment for fresh fruits and vegetables. *Quality of Fresh and Processed Foods*, Vol. 542, 265-279.
- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J.** 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science* **9**, 331-338.
- Ageorges A, Fernandez L, Vialet S, Merdinoglu D, Terrier N, Romieu C.** 2006. Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science* **170**, 372-383.
- Aguayo E, Escalona V, Artes F.** 2004. Quality of fresh-cut tomato as affected by type of cut, packaging, temperature and storage time. *European Food Research and Technology* **219**, 492-499.
- Ahmadi N, Albar L, Pressoir G, Pinel A, Fargette D, Ghesquière A.** 2001. Genetic basis and mapping of the resistance to *Rice yellow mottle virus*. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1084-1092.
- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JKC, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J.** 2004. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *The Plant Journal* **39**, 697-714.
- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ.** 2005. Transcriptome and Selected Metabolite Analyses Reveal Multiple Points of Ethylene Control during Tomato Fruit Development. *Plant Cell* **17**, 2954-2965.
- Alexander L, Grierson D.** 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2039-2055.
- Alvarez AE, van de Wiel CCM, Smulders MJM, Vosman B.** 2001. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1283-1292.
- Amiour N, Merlino M, Leroy P, Branlard G.** 2003. Chromosome mapping and identification of amphiphilic proteins of hexaploid wheat kernels. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 62-72.
- Artes F, Conesa MA, Hernandez S, Gil MI.** 1999. Keeping quality of fresh-cut tomato. *Postharvest Biology and Technology* **17**, 153-162.
- Asins MJ.** 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* **121**, 281-291.
- Aubert J, Bar-Hen A, Daudin J-J, Robin S.** 2004. Determination of the differentially expressed genes in microarray experiments using local FDR. *BMC Bioinformatics* **5**, 125.
- Auffray C, Imbeaud S, Roux-Rouquie M, Hood L.** 2003. From functional genomics to systems biology: Concepts and practices. *Comptes Rendus Biologies* **326**, 879-892.
- Bacic A, Harris PJ, Stone BA.** 1988. Structure and fonction of plant cell walls. In: Preiss J, ed. *The Biochemistry of Plants*, Vol. 14. New York: Academic Press, 297-371.
- Baldwin EA, Goodner K, Plotto A, Pritchett K, Einstein M.** 2004. Effect of volatiles and their concentration on perception of tomato descriptors. *Journal of Food Science* **69**, S310-S318.
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Moshonas MG.** 1991. Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for certain constituents of two tomato cultivars during ripening. *J Am Soc Horticult Sci* **116**, 265-269.
- Barbier-Brygoo H, Joyard J.** 2004. Focus on plant proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 913-917.
- Barrett DM, Garcia E, Wayne JE.** 1998. Textural modification of processing tomatoes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**, 173-258.
- Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D.** 2000. The Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Expression during the Transition from System-1 to System-2 Ethylene Synthesis in Tomato. *Plant Physiol.* **123**, 979-986.

- Baxter CJ, Sabar M, Quick WP, Sweetlove LJ.** 2005. Comparison of changes in fruit gene expression in tomato introgression lines provides evidence of genome-wide transcriptional changes and reveals links to mapped QTLs and described traits. *J. Exp. Bot.* **56**, 1591-1604.
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S.** 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design & Selection* **17**, 349-356.
- Bergervoet JHW, Verhoeven HA, Gilissen LJW, Bino RJ.** 1996. High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) pericarp. *Plant Science* **116**, 141-145.
- Bernacchi D, Beck-Bunn T, Emmatty D, Eshed Y, Inai S, Lopez J, Petiard V, Sayama H, Uhlig J, Zamir D, Tanksley S.** 1998. Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 170-180.
- Bernacchi D, Tanksley SD.** 1997. An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* : linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* **147**, 861-877.
- Bernatzky R, Tanksley SD.** 1986. Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **72**, 314-321.
- Bleecker AB, Kende H.** 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 1-+.
- Bohner J, Bangerth F.** 1988. Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiologia Plantarum* **72**, 316-320.
- Bouchez A, Hospital F, Causse M, Gallais A, Charcosset A.** 2002. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. *Genetics* **162**, 1945-1959.
- Bouchez D, Hofte H.** 1998. Functional genomics in plants. *Plant Physiology* **118**, 725-732.
- Bourne MC.** 1982. Food texture and viscosity. *Concept and measurement*. London: Academic Press, Inc, 325 pp.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brummell DA.** 2005. Regulation and genetic manipulation of ripening in climacteric fruit. *Stewart Postharvest Review* **3:1**, 1-19.
- Brummell DA.** 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* **33**, 103-119.
- Brummell DA, Harpster MH.** 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**, 311-340.
- Brummell DA, Harpster MH, Dunsmuir P.** 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology* **39**, 161-169.
- Budiman MA, Mao L, Wood TC, Wing RA.** 2000. A Deep-Coverage Tomato BAC Library and Prospects Toward Development of an STC Framework for Genome Sequencing. *Genome Res.* **10**, 129-136.
- Butler L.** 1952. The linkage map of the tomato. *The Journal of Heredity* **43**, 25-35.
- Buttery RG.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavour of tomato and other vegetables and fruits. In: Society AC, ed. *Flavor Science: Sensory Principles and Techniques*. Washington DC, 259-286.
- Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorrin J, Mock HP, Rossignol M.** 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics* **4**, 285-298.
- Carpita N, Gibeaut D.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**, 1-30.
- Carrari F, Fernie AR.** 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J. Exp. Bot.*
- Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Lytovchenko A, Loureiro ME, Fernie AR.** 2003. Reduced Expression of Aconitase Results in an Enhanced Rate of Photosynthesis and Marked Shifts in Carbon Partitioning in Illuminated Leaves of Wild Species Tomato. *Plant Physiol.* **133**, 1322-1335.
- Catala C, Rose JKC, Bennett AB.** 2000. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.* **122**, 527-534.
- Causse M.** *in press*. Genetic background of fresh-market tomato flavour. In: B. B, Wyllie SG, eds. *Fruit and vegetable flavour: recent advances and future prospects*.

- 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. *Journal of Food Science* **68**, 2342-2350.
- Causse M, Duffe P, Gomez MC, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Gur A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C.** 2004. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1671-1685.
- Causse M, Lecomte L, Baffert N, Duffé P, Hospital F.** 2001a. Marker-assisted selection for the transfer of QTLs controlling fruit quality traits into tomato elite lines. *Acta Horticulturae* **546**, 557-564.
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffe P, Rousselle P, Buret M.** 2002. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2089-2098.
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lesschaeve I, Buret M.** 2001b. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 273-283.
- Chaïb J, Lecomte L, Buret M, Causse M.** 2006. Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTLs) for organoleptic quality in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 934-944.
- Chambroy Y, Souty M, Jacquemin G, Gomez RM, Audergon JM.** 1995. Research on the suitability of modified atmosphere packaging for shelf-life and quality improvement of apricot fruit. *Acta Horticulturae* **384**, 633-638.
- Chapman HD, Morris VJ, Selvendran RR, O'Neill MA.** 1987. Static and dynamic light-scattering studies of pectic polysaccharides from the middle lamellae and primary cell walls of ciders apples. *Carbohydrate research* **165**, 53-68.
- Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z, Grierson D.** 2004. Identification of a Specific Isoform of Tomato Lipoxygenase (*TomloxC*) Involved in the Generation of Fatty Acid-Derived Flavor Compounds. *Plant Physiol.* **136**, 2641-2651.
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde JP, Renaudin JP.** 2005. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology* **139**, 1984-1994.
- Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJM, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR.** 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature Genetics* **32**, 509-514.
- Churchill GA.** 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature Genetics* **32**, 490-495.
- Clarke JD, Zhu T.** 2006. Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives. *The Plant Journal* **45**, 630-650.
- Collazo C, Ramos PL, Chacon O, Borroto CJ, Lopez Y, Pujol M, Thomma B, Hein I, Borrás-Hidalgo O.** 2005. Phenotypical and molecular characterization of the *Tomato mottle Taino virus-Nicotiana megalosiphon* interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**, 231-236.
- Consoli L, Lefevre A, Zivy M, deVienne D, Damerval C.** 2002. QTL analysis of proteome and transcriptome variations for dissecting the genetic architecture of complex traits in maize. *Plant Molecular Biology* **48**, 575-581.
- Coombe BG.** 1976. The Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 207-228.
- Cosgrove DJ.** 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. **407**, 321-326.
- Costa P, Plomion C.** 1999. Genetic analysis of needle proteins in maritime pine: 2. Variation of protein accumulation. *Silvae Genetica* **48**.
- Couzin J.** 2006. Genomics - Microarray data reproduced, but some concerns remain. *Science* **313**, 1559-1559.
- Crookes PR, Grierson D.** 1983. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiology* **72**, 1088-1093.
- Damerval C, Maurice A, Josse JM, Vienne Dd.** 1994. Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* **137**.
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M.** 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* **134**, 943-951.

- Davies JN, Hobson GE.** 1981. The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition, and genotype. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **15**, 205-280.
- de Vienne D, Causse M.** 1998. La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In: de Vienne D, ed. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. INRA.
- de Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M.** 1999. Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. *J. Exp. Bot.* **50**, 303-309.
- Dekkers JCM, Hospital F.** 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev Genet* **3**, 22-32.
- Devaux MF, Barakat A, Robert P, Bouchet B, Guillon F, Navez B, Lahaye M.** 2005. Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. *Postharvest Biology and Technology* **37**, 209-221.
- Doganlar S, Frary A, Ku HM, Tanksley SD.** 2002. Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* **45**, 1189-1202.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J.** 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* **135**, 1893-1902.
- Duprat F, Roudot F, Grotte-Nicolas M, Roudot AC.** 1991. Non-homogeneity of fruits. *Sciences des Aliments* **11**, 613-626.
- Eisenstein M.** 2006. Microarrays: Quality control. **442**, 1067-1070.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.** 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**, 1005-1016.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR.** 1994. An approach to correlate tandem mass spectral of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass spectrum.* **5**, 976-989.
- Eshed Y, Zamir D.** 1994. A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica* **79**, 175-179.
- Eshed Y, Zamir D.** 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**, 1147-1162.
- Eshed Y, Zamir D.** 1996. Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics* **143**, 1807-1817.
- Faria MV, Maluf WR, Azevedo SMD, Andrade Junior VC, Gomes LAA, Moretto P, Licursi V.** 2003. Yield and post-harvest quality of tomato hybrids heterozygous at the loci *alcobaca*, *old gold-crimson* or *high pigment*. *Genetics and Molecular Research* **2**, 317-327.
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M.** *in press*. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiol.*
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J.** 2006. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. In: Zivy M, ed. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, N.J.: Humana Press, 9-14.
- Fei Z, Tang X, Alba R, Giovannoni J.** 2006. Tomato Expression Database (TED): a suite of data presentation and analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **34**, D766-770.
- Fei Z, Tang X, Alba RM, White JA, Ronning CM, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ.** 2004. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *The Plant Journal* **40**, 47-59.
- Fernandez L, Torregrosa L, Terrier N, Sreekantan L, Grimplet J, Davies C, Thomas M, Romieu C, Ageorges A.** 2006. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Molecular Biology eFIRST*.
- Ferrie BJ, Beaudoin N, Burkhart W, Bowsher CG, Rothstein SJ.** 1994. The Cloning of Two Tomato Lipxygenase Genes and Their Differential Expression during Fruit Ripening. *Plant Physiol.* **106**, 109-118.
- Fishman ML, Gillespie DT, Sondey SM.** 1991. Intrinsic viscosity and molecular weight of pectin components. *Carbohydrate research* **215**, 91-104.

- Frary A, Doganlar S, Frampton A, Fulton T, Uhlig J, Yates H, Tanksley S.** 2003. Fine mapping of quantitative trait loci for improved fruit characteristics from *Lycopersicon chmielewskii* chromosome 1. *Genome* **46**, 235-243.
- Frary A, Fulton TM, Zamir D, Tanksley SD.** 2004. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 485-496.
- Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD.** 2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**, 85-88.
- Fray RG, Grierson D.** 1993. Identification and Genetic-Analysis of Normal and Mutant Phytoene Synthase Genes of Tomato by Sequencing, Complementation and Co-Suppression. *Plant Molecular Biology* **22**, 589-602.
- Fridman E, Liu YS, Carmel-Goren L, Gur A, Shoshani M, Pleban T, Eshed Y, Zamir D.** 2002. Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. *Mol Genet Genomics* **266**, 821-826.
- Fridman E, Pleban T, Zamir D.** 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait loci for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 4718-4723.
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ.** 1992. Xyloglucan Endotransglycosylase, a New Wall-Loosening Enzyme-Activity from Plants. *Biochemical Journal* **282**, 821-828.
- Fulton TM, Beck-Bunn T, Emmatty D, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD.** 1997. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theoretical and Applied Genetics* **95**.
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD.** 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **13**, 207-209.
- Fulton TM, Grandillo S, Beck-Bunn T, Fridman E, Frampton A, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD.** 2000. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 1025-1042.
- Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD.** 2002. Identification, Analysis, and Utilization of Conserved Ortholog Set Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *Plant Cell* **14**, 1457-1467.
- Georgelis N, Scott JW, Baldwin EA.** 2004. Relationship of tomato fruit sugar concentration with physical and chemical traits and linkage of RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**, 839-845.
- Georgelis N, Scott JW, Baldwin EA.** 2006. Inheritance of high sugars from tomato accession PI 270248 and environmental variation between seasons. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **131**, 41-45.
- German MA, Asher I, Petreikov M, Dai N, Schaffer AA, Granot D.** 2004. Cloning, expression and characterization of LeFRK3, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase. *Plant Science* **166**, 285-291.
- Giancola S, McKhann HI, Berard A, Camilleri C, Durand S, Libeau P, Roux F, Reboud X, Gut IG, Brunel D.** 2006. Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 1115-1124.
- Gillapsy G, Ben-David H, Gruissem W.** 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**, 1439-1451.
- Giovannoni J, Yen H, Shelton B, Miller S, Vrebalov J, Kannan P, Tieman D, Hackett R, Grierson D, Klee H.** 1999. Genetic mapping of ripening and ethylene-related loci in tomato. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **98**, 1005-1013.
- Giovannoni JJ.** 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* **16**, S170-S180.
- Goodstal FJ, Kohler GR, Randall LB, Bloom AJ, St.Clair DA.** 2005. A major QTL introgressed from wild *Lycopersicon hirsutum* confers chilling tolerance to cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **111**.



- Greenbaum D, Jansen R, Gerstein M.** 2002. Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics* **18**, 585-596.
- Grimplet J, Romieu C, Sauvage FX, Lambert P, Audergon JM, Terrier N.** 2004. Transcriptomics and proteomics tools towards ripening markers for assisted selection in apricot. *Acta Horticulturae*, 291-293.
- Hagerman AE, Austin PJ.** 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **34**, 440-444.
- Hallett IC, MacRae EA, Wegrzyn TF.** 1992. Changes in kiwifruit cell wall ultrastructure and cell packing during postharvest ripening. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 49-60.
- Hard MM, Zaehring MV, Bowman F, Mackey AC.** 1977. Predicting texture of fresh fruits and vegetables by chemical and physical methods. *Bulletin, Washington Agricultural Experiment Station*.
- Harker FR, Maindonald JH, Jackson PJ.** 1996. Penetrometer measurement of apple and kiwifruit firmness: operator and instrument differences. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 927-936.
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G.** 1997. Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* **20**, 121-224.
- Henikoff S, Till BJ, Comai L.** 2004. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiology* **135**, 630-636.
- Heukeshoven J, Dernick R.** 1986. Silver staining of proteins. In: Radola BJ, ed. *Electrophoresis forum*. Munich, 22--27.
- Hirschberg J.** 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 210-218.
- Ho LC, Hewitt JD.** 1986. Fruit development. In: Atherton JG RJ, ed. *The tomato crop*. Chapman and Hall, 201-240.
- Hobson GE.** 1968. Cellulase activity during the maturation and ripening of tomato fruit. *J. Food Sci.* **33**, 588-592.
- Hobson GE, Bedford L.** 1989. The composition of cherry tomatoes and its relation to consumer acceptability. *J Hort Sci* **64**, 321-329.
- Hobson GE, Gough C, Townley C.** 1990. Measuring consumer reaction to the flavour of fresh tomatoes. *Acta Horticulturae* **259**, 107-116.
- Hobson GE, Grierson D.** 1993. Tomato. In: Seymour G. B. TJE, Tucker, G.A., ed. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall, 405-442.
- Huber DJ.** 1983. Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**, 405-409.
- Hung YC, McWatters KH, Prussia SE.** 1998. Peach sorting performance of a nondestructive laser air-puff firmness detector. *Applied Engineering in Agriculture* **14**, 513-516.
- Hyne V, Kearsey MJ, Pike DJ, Snape JW.** 1995. QTL Analysis - Unreliability and Bias in Estimation Procedures. *Molecular Breeding* **1**, 273-282.
- Itai A, Ishihara K, Bewley JD.** 2003. Characterization of expression, and cloning, of beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2615-2622.
- Jackman RL, Gibson HJ, Stanley DW.** 1992. Effects of chilling on tomato fruit texture. *Physiologia Plantarum* **86**, 600-608.
- Jackman RL, Stanley DW.** 1995a. Creep behaviour of tomato pericarp tissue as influenced by ambient temperature ripening and chilled storage. *Journal of Texture Studies* **26**, 537-552.
- Jackman RL, Stanley DW.** 1995b. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science & Technology* **6**, 187-194.
- Janoria HP, Rhodes AM.** 1974. Juice viscosity as related to various juice constituents and fruit characters in tomatoes. *Euphytica* **23**, 553-562.
- Janse J, Schols M.** 1995. Une préférence pour un goût sucré et non farineux. *Groenten + Fruit* **26**, 16-17.
- Jansen RC.** 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**.

- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP.** 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment* **26**, 977-989.
- Jeffery D, Goodenough PW, Weitzman PDJ.** 1988. Citrate synthase and malate dehydrogenase from tomato fruit. *Phytochemistry* **27**.
- Johnston JW, Hewett EW, Banks NH, Harker FR, Hertog M.** 2001. Physical change in apple texture with fruit temperature: effects of cultivar and time in storage. *Postharvest Biology and Technology* **23**, 13-21.
- Joubès J, Phan T-H, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P, Chevalier C.** 1999. Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiology* **121**, 857-869.
- Kadryzhanova DK, Vlachonasios KE, Ververidis P, Dilley DR.** 1998. Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* **36**, 885-895.
- Kanayama Y, Granot D, Dai N, Petreikov M, Schaffer A, Powell A, Bennett AB.** 1998. Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. *Plant Physiology* **117**, 85-90.
- Kearsey MJ.** 1998. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany* **49**, 1619-1623.
- Kersten B, Bürkle L, Kuhn EJ, Giavalisco P, Konthur Z, Lueking A, Walter G, Eickhoff H, Schneider U.** 2002. Large-scale plant proteomics. *Plant Molecular Biology* **48**, 133-141.
- Kieselbach T, Schroder WP.** 2003. The proteome of the chloroplast lumen of higher plants. *Photosynthesis Research* **78**, 249-264.
- King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, Alston FH, Durel CE, Evans KM, Griffon B, Laurens F, Manganaris AG, Schrevens T, Tartarini S, Verhaegh J.** 2000. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 1074-1084.
- Kitano H.** 2002. Systems biology: A brief overview. *Science* **295**, 1662-1664.
- Klee H, Tieman D.** 2002. The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum* **115**, 336-341.
- Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM.** 2004. Solanaceae - a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics* **5**, 285-291.
- Knott SA, Haley CS.** 1992. Aspects of maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci in line crosses. *Genetical Research* **60**.
- Koch JL, Nevins DJ.** 1989. Tomato Fruit Cell Wall: I. Use of Purified Tomato Polygalacturonase and Pectinmethylesterase to Identify Developmental Changes in Pectins. *Plant Physiol.* **91**, 816-822.
- Kojima K, Sakurai N, Kuraishi S, Yamamoto R, Nevins DJ.** 1991. Novel technique for measuring tissue firmness within tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiology* **96**, 545-550.
- Kolloffel C, Linssen PWT.** 1984. The formation of intercellular spaces in the cotyledons of developing and germinating pea-seeds. *Protoplasma* **120**, 9-12.
- Lamb FC.** 1977. Tomato products. *National Cannery Association* **27-L**.
- Lander ES, Botstein D.** 1989. Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. *Genetics* **121**, 185-199.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlox A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L.** 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- Langlois D, Etievant PX, Pierron P, Jorrot A.** 1996. Sensory and instrumental characterisation of commercial tomato varieties. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **203**, 534-540.
- Lapsley KG, Escher FE, Heohn E.** 1992. The cellular structure of selected apple varieties. *Food Structure* **11**, 339-349.
- Lecomte L, Duffé P, Buret M, Servin B, Hospital F, Causse M.** 2004a. Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 658-668.
- Lecomte L, Saliba-Colombani V, Gautier A, Gomez-Jimenez MC, Duffé P, Buret M, Causse M.** 2004b. Fine mapping of QTLs of chromosome 2 affecting the fruit architecture and composition of tomato. *Molecular Breeding* **13**, 1-14.

- Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC.** 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* **101**, 727-739.
- Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C.** 2005. Changes in Transcriptional Profiles Are Associated with Early Fruit Tissue Specialization in Tomato. *Plant Physiol.* **139**, 750-769.
- Li Z, Jakkula L, Hussey RS, Tamulonis JP, Boerma HR.** 2001. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1167-1173.
- Liebhart R, Kellerhals M, Pfammatter W, Jertmini M, Gessler C.** 2003. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Molecular Biology* **52**, 511-526.
- Liljegren SJ, Roeder AHK, Kempin SA, Gremski K, Ostergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF.** 2004. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell* **116**, 843-853.
- Lincoln SE, Daly MJ, Lander ES.** 1992. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP version 3.0. Whitehead Institute Technical Report.
- Liu YS, Zamir D.** 1999. Second generation of *L. pennellii* introgression lines and the concept of bin mapping. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* **49**, 26-30.
- Lorenz WW, Dean JFD.** 2005. Studies of plant gene expression using SAGE. *Sage: Current Technologies and Applications*, 189-206.
- Loudet O, Gaudon V, Trubuil A, Daniel-Vedele Fo.** 2005. Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **110**, 742-753.
- Luby JJ, Shaw DV.** 2001. Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? *HortScience* **36**, 872-879.
- Lucas WJ, Ding B, Vanderschoot C.** 1993. Tansley Review No. 58 Plasmodesmata and the Supracellular Nature of Plants. *New Phytologist* **125**, 435-476.
- Lurie S.** 2002. Temperature management. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 107-121.
- Magness JR, Taylor GF.** 1925. An improved type of pressure tester for the determination of fruit maturity. *USDA Cir.* **350**.
- Maliepaard C, Alston FH, van Arkel G, Brown LM, Chevreau E, Dunemann F, Evans KM, Gardiner S, Guilford P, van Heusden AW, Janse J, Laurens F, Lynn JR, Manganaris AG, den Nijs APM, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmidt H, Tartarini S, Verhaegh JJ, Vrielink-van Ginkel M, King GJ.** 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 60-73.
- Mann M, Jensen ON.** 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* **21**, 255-261.
- Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB.** 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. **38**, 948-952.
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP.** 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology* **19**, 1281-1288.
- Marga F, Grandbois M, Cosgrove DJ, Baskin TI.** 2005. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant Journal* **43**, 181-190.
- Marsh GL, Buhlert JE, Leonard SJ.** 1980. Effect of composition upon Bostwick consistency of tomato concentrate. *Journal of Food Science* **45**, 703-706.
- McCurdy DW, Kovar DR, Staiger CJ.** 2001. Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma* **215**, 89-104.
- McFeeters RF.** 1980. A manual method for reducing sugar determinations with 2,2'-bichinchoninate reagent. *Analytical Biochemistry* **103**, 302-306.
- Mechin V, Balliau T, Chateau-Joubert S, Davanture M, Langella O, Negroni L, Prioul J-L, Thevenot C, Zivy M, Damerval C.** 2004. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry* **65**, 1609-1618.
- Meissner R, Chague V, Zhu QH, Emmanuel E, Elkind Y, Levy AA.** 2000. A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant Journal* **22**, 265-274.

- Michelmore R, Paran I, Kesseli R.** 1991. Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations. *PNAS* **88**, 9828-9832.
- Miller JC, Tanksley SD.** 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* **80**, 437-448.
- Mir N, Beaudry R.** 2002. Atmosphere control using oxygen and carbon dioxide. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 122-156.
- Miron D, Petreikov M, Carmi N, Shen S, Levin I, Granot D, Zamski E, Schaffer AA.** 2002. Sucrose uptake, invertase localization and gene expression in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* and the sucrose-accumulating *Lycopersicon hirsutum*. *Physiologia Plantarum* **115**, 35-47.
- Moco S, Bino RJ, Vorst O, Verhoeven HA, de Groot J, van Beek TA, Vervoort J, de Vos CHR.** 2006. A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato. *Plant Physiol.* **141**, 1205-1218.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T.** 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* **3**, 87-103.
- Monforte AJ, Tanksley SD.** 2000. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 471-479.
- Moore S, Payton P, Wright M, Tanksley S, Giovannoni J.** 2005. Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.* **56**, 2885-2895.
- Moore S, Vrebalov J, Payton P, Giovannoni J.** 2002. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J. Exp. Bot.* **53**, 2023-2030.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin CW, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD.** 2005a. The SOL Genomics Network. A comparative resource for *Solanaceae* biology and beyond. *Plant Physiology* **138**, 1310-1317.
- Mueller LA, Tanksley SD, Giovannoni JJ, van Eck J, Stack S, Choi D, Kim BD, Chen MS, Cheng ZK, Li CY, Ling HQ, Xue YB, Seymour G, Bishop G, Bryan G, Sharma R, Khurana J, Tyagi A, Chattopadhyay D, Singh NK, Stiekema W, Lindhout P, Jesse T, Lankhorst RK, Bouzayen M, Shibata D, Tabata S, Granell A, Botella MA, Giullano G, Frusciante L, Causse M, Zamir D.** 2005b. The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International *Solanaceae* Project (SOL). *Comparative and Functional Genomics* **6**, 153-158.
- Muller C.** 1940. A revision of the genus *Lycopersicon*. *US Dept of Agriculture Misc Publication no.* **382**.
- Munoz AM.** 1986. Development and application of texture reference scales. *Journal of Sensory Studies* **1**, 55-83.
- Mutschler MA, Wolfe DW, Cobb ED, Yourstone KS.** 1992. Tomato fruit quality and shelf life in hybrids heterozygous for the alc ripening mutant. *HortScience* **27**, 352-355.
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A.** 1998. Differential Expression and Internal Feedback Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase, and Ethylene Receptor Genes in Tomato Fruit during Development and Ripening. *Plant Physiol.* **118**, 1295-1305.
- Nettleton D.** 2006. A Discussion of Statistical Methods for Design and Analysis of Microarray Experiments for Plant Scientists. *Plant Cell* **18**, 2112-2121.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH.** 2001. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**, 881-889.
- Noir S, Brautigam A, Colby T, Schmidt J, Panstruga R.** 2005. A reference map of the Arabidopsis thaliana mature pollen proteome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **337**, 1257-1266.

- Odanaka S, Bennett AB, Kanayama Y.** 2002. Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of *Frk1* and *Frk2* expression in tomato. *Plant Physiology* **129**, 1119-1126.
- Oh K, Hardeman K, Ivanchenko MG, Ellard-Ivey M, Nebenfuhr A, White TJ, Lomax TL.** 2002. Fine mapping in tomato using microsynteny with the *Arabidopsis* genome: the *Diageotropica* (*Dgt*) locus. *Genome Biology* **3**, 49.01-49.11.
- O'Malley RC, Rodriguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleecker AB.** 2005. Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *The Plant Journal* **41**, 651-659.
- Paoletti F, Moneta E, Bertone A, Sinesio F.** 1993. Mechanical properties and sensory evaluation of selected apple cultivars. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **26**, 264-270.
- Paterson AH, de Verna JW, Lanini B, Tanksley SD.** 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics* **124**, 735-742.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD.** 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature, UK* **335**, 721-726.
- Peterson DG, Price HJ, Johnston JS, Stack SM.** 1996. DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome* **39**, 77-82.
- Petro-Turza M.** 1986. Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International* **2**, 309-351.
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M.** 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* **7**, 275-291.
- Pigliucci M.** 2003. From molecules to phenotypes? The promise and limits of integrative biology. *Basic and Applied Ecology* **4**, 297-306.
- Pitt RE.** 1982. Models for the rheology and statistical strength of uniformly stressed vegetative tissue. *Transactions of the ASAE* **25**, 1776-1784.
- Pitt RE, Chen HL.** 1983. Time-dependent aspects of the strength and rheology of vegetative tissue. *Transactions of the ASAE* **26**, 1275-1280.
- Planton G.** 1991. Tomate, Mesure de la fermeté au Durofel 25. *Infos-Ctifl* **74**, 17-20.
- Poovaiah BW, Mizrahi Y, Dostal HC, Cherry JH, Leopold AC.** 1975. Water permeability during tomato fruit development in normal and *rin* nonripening mutant. *Plant Physiology* **56**, 813-815.
- Pressey R.** 1986. Extraction and assay of tomato polygalacturonases. *HortScience* **21**, 490-492.
- Prestage S, Linforth RST, Taylor AJ, Lee E, Speirs J, Schuch W.** 1999. Volatile production in tomato fruit with modified alcohol dehydrogenase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 131-136.
- Price AH.** 2006. Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends in Plant Science* **11**, 213-216.
- Prussia SE, Astleford JJ, Hung YC, Hewlett R.** 1994. Non-destructive firmness measuring device. U.S. Patent: 5,372,030.
- Quéméner B, Bertrand D, Marty I, Causse M, Lahaye M.** 2007. Tomato near-isogenic lines differing in QTLs for fruit texture show affected cell wall: structural analysis by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Journal of Chromatography* **1141**, 41-49.
- Ratanachinakorn B, Klieber A, Simons DH.** 1997. Effect of short-term control atmospheres and maturity on ripening and eating quality of tomatoes. *Postharvest Biol Technol* **11**, 149-154.
- Redgwell RJ, Fischer M.** 2002. Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 46-88.
- Reyna N, Sneller CH.** 2001. Evaluation of marker-assisted introgression of yield QTL alleles into adapted soybean. *Crop Science* **41**, 1317-1321.
- Rick C, Laterrot H, Philouze J.** 1990. A revised key for the *Lycopersicon* species. *Tomato Genetics Cooperative Report* **40**.
- Rick CM.** 1956. New mutants. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* **6**, 22-23.

- Robert VJM, West MAL, Inai S, Caines A, Arntzen L, Smith JK, St Clair DA.** 2001. Marker-assisted introgression of blackmold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects. *Molecular Breeding* **8**, 217-233.
- Robinson R, Tomes M.** 1968. Ripening inhibitor: a gene with multiple effect on ripening. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* **18**, 36-37.
- Rocco M, D'Ambrosio C, Arena S, Faurobert M, Scaloni A, Marra M.** 2006. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. *PROTEOMICS* **6**, 3781-3791.
- Rodriguez GR, Pratta GR.** 2006. Recombinant lines obtained from an intraspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life. *Journal Of The American Society For Horticulture Science* **131**, 651-656.
- Romagosa I, Han F, Ullrich SE, Hayes PM, Wesenberg DM.** 1999. Verification of yield QTL through realized molecular marker-assisted selection responses in a barley cross. *Molecular Breeding* **5**, 143-152.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J.** 2000. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11102-11107.
- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Saravanan RS.** 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal* **39**, 715--733.
- Rose JKC, Bennett AB.** 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* **4**, 176-183.
- Rose JKC, Lee HH, Bennett AB.** 1997. Expression of a divergent expansion gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5955-5960.
- Rossignol M.** 2001. Analysis of the plant proteome. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 131--134.
- Roy S, Jauneau A, Vian B.** 1994. Analytical detection of calcium ions and immunocytochemical visualization of homogalacturonic sequences in the ripe cherry tomato. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* **32**, 633-640.
- Roy S, Watada AE, Wergin WP.** 1997. Characterization of the cell wall microdomain surrounding plasmodesmata in apple fruit. *Plant Physiology* **114**, 539-547.
- Ruan YL, Patrick JW.** 1995. The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* **196**, 434-444.
- Saladie M, Rose JKC, Watkins CB.** 2005. Characterization of *DFD* (*delayed fruit deterioration*): a new tomato mutant. *Acta Horticulturae*, 79-84.
- Salentijn EMJ, Aharoni A, Schaart JG, Boone MJ, Krens FA.** 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* **118**, 571-578.
- Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L, Philouze J.** 2000. Efficiency of AFLP, RAPD and RFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome* **43**, 29-40.
- Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, Philouze J, Buret M.** 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 259-272.
- Sampedro J, Cosgrove DJ.** 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* **6**, 242.241-242.248.
- Saravanan RS, Rose JKC.** 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *proteomics* **4**, 2522-2532.
- Sarry JE, Sommerer N, Sauvage FX, Bergoin A, Rossignol M, Albagnac G, Romieu C.** 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* **4**, 201-215.
- SAS Institute.** 1988. *SAS users guide: statistics*. Cary, North Carolina (USA).
- Schaffer AA, Petreikov M.** 1997. Sucrose-to-Starch Metabolism in Tomato Fruit Undergoing Transient Starch Accumulation. *Plant Physiol.* **113**, 739-746.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie AR.** 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* **24**, 447-454.

- Schuch W, Bird CR, Ray J, Smith CJS, Watson CF, Morris PC, Gray JE, Arnold C, Seymour GB, Tucker GA, Grierson D.** 1989. Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **13**, 303-311.
- Sebolt AM, Shoemaker RC, Diers BW.** 2000. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean. *Crop Science* **40**, 1438-1444.
- Serrano-Megias M, Lopez-Nicolas JM.** 2006. Application of agglomerative hierarchical clustering to identify consumer tomato preferences: influence of physicochemical and sensory characteristics on consumer response. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 493-499.
- Servin B, Dillmann C, Decoux G, Hospital F.** 2002. MDM: a program to compute fully informative genotype frequencies in complex breeding schemes. *The Journal of Heredity* **93**, 227-228.
- Seymour GB, Colquhoun IJ, Dupont MS, Parsley KR, R. Selvendran R.** 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry* **29**, 725-731.
- Seymour GB, Harding SE, Taylor AJ, Hobson GE, Tucker GA.** 1987. Polyuronide solubilization during ripening of normal and mutant tomato fruit. *Phytochemistry* **26**, 1871-1875.
- Seymour GB, Manning K.** 2002. Genetic control of fruit ripening. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 253-274.
- Seymour GB, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ.** 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J. Exp. Bot.* **53**, 2065-2071.
- Shackel KA, Greve C, Labavitch JM, Ahmadi H.** 1991. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiology* **97**, 814-816.
- Shen L, Courtois B, McNally KL, Robin S, Li Z.** 2001. Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 75-83.
- Sherman JD, Stack SM.** 1995. Two-Dimensional Spreads of Synaptonemal Complexes from Solanaceous Plants. VI. High-Resolution Recombination Nodule Map for Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genetics* **141**, 683-708.
- Shiota H, Sudoh T, Tanaka I.** 2006. Expression analysis of genes encoding plasma membrane aquaporins during seed and fruit development in tomato. *Plant Science* **171**, 277-285.
- Smith JJ, Muldoon EP, Willard JJ, Lamport DTA.** 1986. Tomato extensin precursors *P1* and *P2* are highly periodic structures. *Phytochemistry* **25**, 1021-1030.
- Smyth GK.** 2005. Limma: Linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solution Using R and Bioconductor*, 397-420.
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS.** 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**, 2067-2075.
- Soille P.** 2003. *Morphological image analysis. Principles and applications.*: Springer-Verlag, Berlin.
- Splus.** 1993. *Splus guide to statistical and mathematical analyses.* Seattle, Washington (USA).
- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S.** 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum L.* section *Lycopersicon (Mill.) Wettst.* *Taxon* **54**, 43-61.
- Stanley DW.** 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **30**, 487-553.
- Stephan W, Langley CH.** 1998. DNA Polymorphism in *Lycopersicon* and Crossing-Over per Physical Length. *Genetics* **150**, 1585-1593.
- Stevens MA.** 1972. Citrate and malate concentrations in tomato fruits: genetic control and maturational effects. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **97**, 655-658.
- Stevens MA, Kader AA, Albright-Holton M, Algazi M.** 1977. Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **102**, 680-689.
- Stone H, Sidel J, Oliver S, Woolsey A, Singleton RC.** 1974. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology* **28**, 24-29.
- Storey JD.** 2002. A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology* **64**, 479-498.
- Stuber CW, Sisco PH.** 1992. Marker-facilitated transfer of QTL alleles between elite inbred lines and responses in hybrids. In: American Seed Trade Assoc, ed. *46<sup>th</sup> Annual Corn and Sorghum Research Conference*, Vol. 46, 104-113.
- Sugar D.** 2002. Management of postharvest diseases. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 225-252.
- Szczesniak AS.** 2002. Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference* **13**, 215-225.
- Szczesniak AS, Ilker R.** 1988. The meaning of textural characteristics - juiciness in plant foodstuffs. *Journal of Texture Studies* **19**, 61-78.

**Szczesniak AS, Skinner EZ.** 1973. Meaning of texture words to the consumer. *Journal of Texture Studies* **4**, 378-384.

**Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR, Grandbastien MA.** 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 819-831.

**Tanksley SD.** 2004. The Genetic, Developmental, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. *Plant Cell* **16**, S181-189.

**Tanksley SD, Ganal MW, Martin GB.** 1995. Chromosome landing : a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* **11**, 63-68.

**Tanksley SD, Ganal MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND.** 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**, 1141-1160.

**Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J, BeckBunn T.** 1996. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 213-224.

**Thiellement H, Bahrman N, Damerval C, Plomion C, Rossignol M, Santoni V, de Vienne D, Zivy M.** 1999. Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* **20**, 2013-2026.

**Thompson AJ, Tor M, Barry CS, Vrebalov J, Orfila C, Jarvis MC, Giovannoni JJ, Grierson D, Seymour GB.** 1999. Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiology* **120**, 383-389.

**Thybo AK, Bechmann IE, Brandt K.** 2005. Integration of sensory and objective measurements of tomato quality: quantitative assessment of the effect of harvest date as compared with growth medium (soil versus rockwool), electrical conductivity, variety and maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 2289-2296.

**Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ.** 2001. Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal* **26**, 47-58.

**Tieman DM, Zeigler M, Schmelz EA, Taylor MG, Bliss P, Kirst M, Klee HJ.** 2006. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany* **57**, 887-896.

**Tigchelaar EC, Tomes M, Kerr E, Barman R.** 1973. A new ripening mutant, non-ripening (*nor*). *Report of the Tomato Genetics Cooperative* **35**, 20.

**Tonutti P, Bonghi C.** 2006. Genomics approaches for better understanding the biological basis of fruit ripening and quality. *Proceedings of the 14th International Conference on Managing Quality in Chains, Vols 1 and 2 - the Integrated View on Fruits and Vegetables Quality*, 307-316.

**Toojinda T, Baird E, Booth A, Broers L, Hayes P, Powell W, Thomas W, Vivar H, Young G.** 1998. Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 123-131.

**Tucker GA.** 1993. Introduction. In: Seymour G. B. TJE, Tucker, G.A., ed. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall, 1-51.

**Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE.** 2001. Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. *Molecular Breeding* **8**, 187-195.

**Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S.** 2002. Deductions about the Number, Organization, and Evolution of Genes in the Tomato Genome Based on Analysis of a Large Expressed Sequence Tag Collection and Selective Genomic Sequencing. *Plant Cell* **14**, 1441-1456.

**Varga A, Bruisma J.** 1986. Tomato. In: Monselise S, ed. *CRC Handbook of Fruit Set and Development*. Boca Raton, FL: CRC Press, 461-491.

**Verkerke W, Janse J, Kersten M.** 1998. Instrumental measurement and modelling of tomato fruit taste. *Acta Horticulturae*, 199-205.



- Vicente AR, Greve C, Labavitch JM.** 2006. Recent findings in plant cell wall structure and metabolism: future challenges and potential implications for softening. *Stewart Postharvest Review* **2:9**.
- Vierstra RD.** 1993. Protein-Degradation in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 385-410.
- Visscher PM, Haley CS.** 1996. Detection of putative quantitative trait loci in line crosses under infinitesimal genetic models. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 691-702.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J.** 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* **296**, 343-346.
- Wade MJ, Winther RG, Agrawal AF, Goodnight CJ.** 2001. Alternative definitions of epistasis: dependence and interaction. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 498-504.
- Waldron KW, Parker ML, Smith AC.** 2003. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**, 101-119.
- Walley PG, Seymour GB.** 2006. Investigating the polygenic nature of texture traits in tomato fruit. *VI International Solanaceae Conference*. Madison, Wisconsin.
- Wang X, Hessner MJ, Wu Y, Pati N, Ghosh S.** 2003. Quantitative quality control in microarray experiments and the application in data filtering, normalization and false positive rate prediction. *Bioinformatics* **19**, 1341-1347.
- Wang Y, van der Hoeven R, Nielsen R, Mueller L, Tanksley S.** 2005. Characteristics of the tomato nuclear genome as determined by sequencing undermethylated EcoRI digested fragments. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **112**, 72-84.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpapojak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humpherysmith I.** 1995. Progress with Gene-Product Mapping of the Mollicutes - Mycoplasma-Genitalium. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094.
- Wasteneys GO, Galway ME.** 2003. Remodelling the cytoskeleton for growth and form: An overview with some new views. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 691-722.
- Watkins CB.** 2002. Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 180-224.
- White J, Pacey-Miller T, Crawford A, Cordeiro G, Barbary D, Bundock P, Henry R.** 2006. Abundant transcripts of malting barley identified by serial analysis of gene expression (SAGE). *Plant Biotechnology Journal* **4**, 289-301.
- White PJ.** 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1995-2000.
- Willats WGT, Knox P, Mikkelsen JD.** 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 97-104.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ.** 1995. An Ethylene-Inducible Component of Signal-Transduction Encoded by Never-Ripe. *Science* **270**, 1807-1809.
- Wu F, Mueller LA, Cruzillat D, Petiard V, Tanksley SD.** 2006. Combining Bioinformatics and Phylogenetics to Identify Large Sets of Single-Copy Orthologous Genes (COSII) for Comparative, Evolutionary and Systematic Studies: A Test Case in the Euasterid Plant Clade. *Genetics* **174**, 1407-1420.
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Speed TP.** 2001. Normalization for cDNA microarray data. In: Bittner ML, Chen Y, Dorsel AN, Dougherty ER, eds. *SPIE BiOS*, Vol. 4266. San Jose, California.
- Yeung KY, Bumgarner RE, Raftery AE.** 2005. Bayesian model averaging: development of an improved multi-class, gene selection and classification tool for microarray data. *Bioinformatics* **21**, 2394-2402.
- Yousef GG, Juvik JA.** 2002. Enhancement of seedling emergence in sweet corn by marker-assisted backcrossing of beneficial QTL. *Crop Science* **42**, 96-104.
- Zeng ZB.** 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 10972-10976.
- Zeng ZB.** 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**, 1457-1468.

- Zhu H, Briceño G, Dovel R, Hayes PM, Liu BH, Liu CT, Ullrich SE.** 1999. Molecular breeding for grain yield in barley: an evaluation of QTL effects in a spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 772-779.
- Zivy M, de Vienne D.** 2000. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology* **44**, 575-580.

## **ANNEXES**

---

---

## ANNEXES

---

**Annexe 1:** Carte génétique représentant les 75 IL de M82 dans LA716 (Eshed and Zamir, 1994; Liu and Zamir, 1999).

**Annexe 2:** Protocole d'extraction d'ADN en format 96 sans solvant (d'après Stéphane Muñoz, Extrait du cahier de protocoles de l'UGAFL)

**Annexe 3:** Protocole d'extraction des protéines totales au phénol.

**Annexe 4:** Liste de l'ensemble des marqueurs testés pour la densification en marqueurs des régions d'intérêt du chromosome 4 (Ch4) et du chromosome 9 (Ch9).

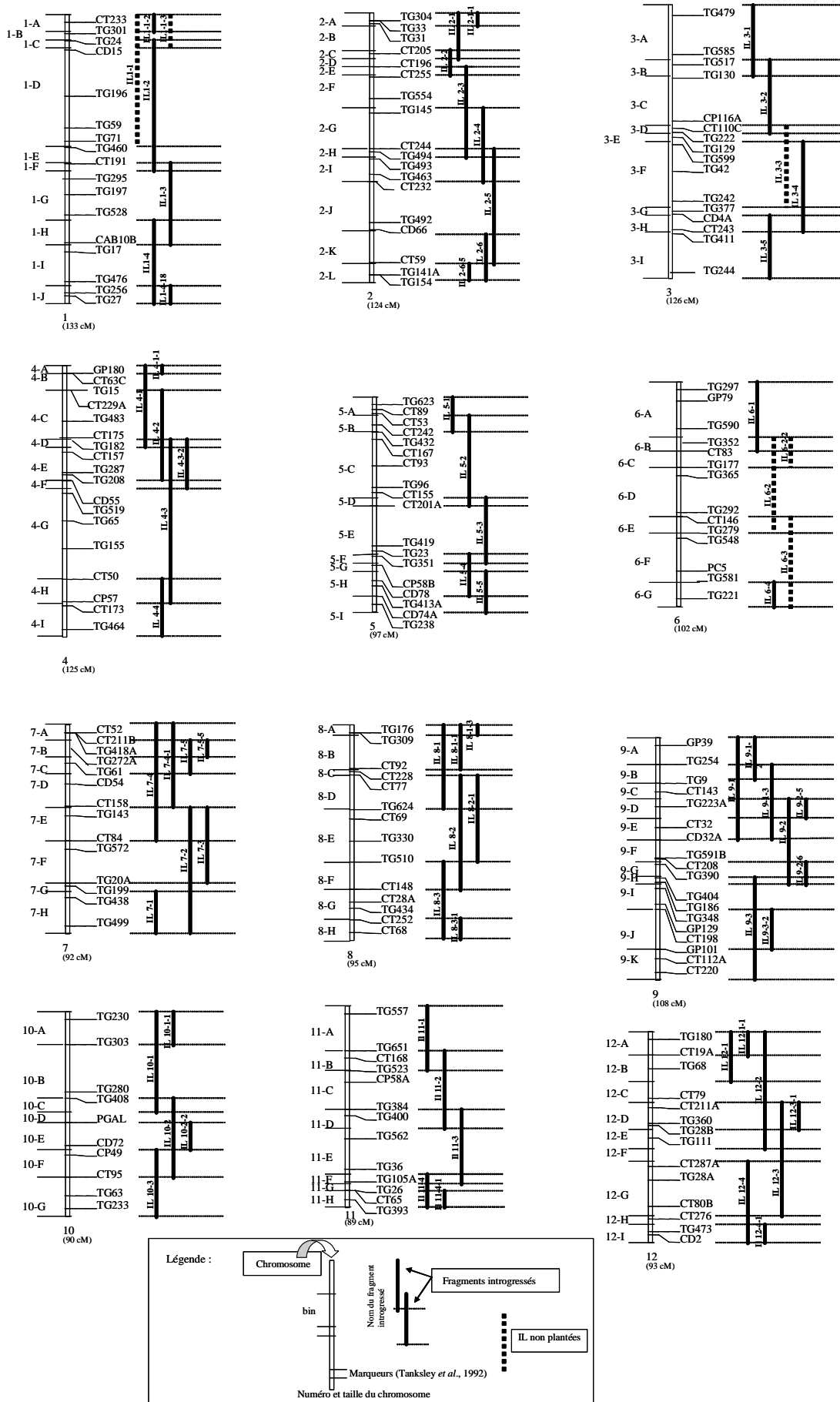
**Annexe 5:** Cartes génétiques du chromosome 4 et du chromosome 9 représentant la totalité des marqueurs cartographiés.

**Annexe 6:** Localisation des spots différenciellement exprimés (Tableaux VI.3 et VI.4) sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle, colorés au nitrate d'argent, réalisés à partir d'extraits de protéines totales du péricarpe de tomate.

**Annexe 7:** Gènes candidats issus du criblage différentiel Lxl/Levovil à quatre stades de développement réalisé sur des puces à oligonucléotides dédiées texture

**Annexe 8:** Article présentant l'étude des effets épistatiques contrôlant les variations phénotypique de six composantes de la qualité du fruit de tomate: poids du fruit, nombre de loge, fermeté instrumentale, acidité titrable, teneurs en sucres et en solides solubles.

**Annexe 1: Carte génétique représentant les 75 IL de M82 dans LA716 (Eshed and Zamir, 1994; Liu and Zamir, 1999).**



## Annexe 2: Protocole d'extraction d'ADN en format 96 sans solvant (d'après Stéphane Muños, Extrait du cahier de protocoles de l'UGAFL)

### MATERIELS ET PRODUITS

- \* Tubes de transfert 1,2 ml en format 96
- \* Bouchons pour ces tubes (barrettes ou plaques)
- \* Tampon d'extraction :

	Concentration	pour 100ml
Tris HCl pH 7.5	0,1M	10 ml Tris HCl 1 M pH 7.5
EDTA pH 8.0	0,05M	10 ml EDTA 0,5 M pH 8.0
Na Cl	0,1M	10 ml Na Cl 1 M
SDS	1 %	1 g SDS poudre
Béta-mercaptoéthanol		70 µl
H2O ultra pure		qsp 100 ml

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

- \* K Ac 5 M : 49,07g de K Ac pour H2O ultra pure qsp 100 ml
- \* TE 10/1 pH8 (Tris / EDTA)
- \* Isopropanol froid
- \* Ethanol 70 % froid

### MODE OPERATOIRE

La veille, prélever le matériel végétal (environ 50mg de feuille) dans des boites de tubes de transfert (format 96 puits) puis placer une bille métallique /puits. Lyophilisation *over night*.

- \* Broyer au broyeur à billes, vitesse maxi, 2 fois 3 mn. en inversant le sens des boites entre chaque étape de broyage et en bien tapant les boites sur la paillasse pour faire tomber la poudre lyophilisée au fond des tubes.
- \* Centrifuger 10 mn. à 4000 rpm à 20°C.
- \* Ajouter le tampon d'extraction (700 µl/tube) puis placer les boites à 65 °C (étuve) pendant environ 1 heure. Si possible agiter de temps en temps pendant l'incubation.
- \* Ajouter 100 µl/tube de K Ac 5M et laisser incuber sur la glace ou au réfrigérateur pendant 20 mn.
- \* Centrifuger 20 mn. à 5000 rpm à 4°C.
- \* Prélever 400 µl du surnageant dans de nouveaux tubes, précipiter à l'isopropanol froid (400µl/tube), boucher les tubes et les retourner plusieurs fois puis placer la plaque à -20°C 10 mn.
- \* Centrifuger 25 mn. à 5500 rpm à 4°C. Vider le surnageant par renversement.
- \* Laver le culot à l'éthanol 70% (400µl/tube).
- \* Centrifuger 15 mn. à 5500 rpm à 4°C. Vider le surnageant par renversement.
- \* Sécher le culot (sous la sorbonne).
- \* Suspender le culot dans 30 µl de TE 10 : 1, (jusqu'à 60 µl pour les gros culots).
- \* Conserver l'ADN à 4°C (pour une courte durée) ou congelé à -20°C.

### Annexe 3: Protocole d'extraction des protéines totales au phénol.

From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 335: *Plant Proteomics: Methods and Protocols*  
 Edited by: H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, and V. Méchin © Humana Press Inc., Totowa, NJ

## Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues

Mireille Faurobert, Esther Pelpoir, and Jamila Chaïb

### Summary

Phenol extraction of proteins is an alternative method to classical TCA-acetone extraction. It allows efficient protein recovery and removes nonprotein components in the case of plant tissues rich in polysaccharides, lipids, and phenolic compounds. We present here a tried and tested protocol adapted for two dimensional electrophoresis (2-DE) and further proteomic studies. After phenol extraction, proteins are precipitated with ammonium acetate in methanol. The pelleted proteins are then resuspended in isoelectric focusing buffer, and the protein concentration is measured with a modified Bradford assay prior to electrophoresis.

The important points for successful use of this protocol are (1) keeping samples at very low temperature during the first step and (2) careful recovery of the phenolic phase after the centrifugations, which are major features of this protocol.

**Key Words:** extraction method; proteins; phenol; plant proteomic; membrane proteins; two-dimensional gel electrophoresis; glycoproteins.

### 1. Introduction

Plant protein extraction is the first step in proteomic studies. Plant tissues contain relatively low levels of proteins whose extraction is often rendered difficult by the presence of other compounds, such as cell wall and storage polysaccharides, lipids, and phenolic compounds. The solubility of plant proteins is closely associated with their intracellular localization, and proteins are classically extracted by either aqueous buffer, detergents, or direct precipitation (1). Besides the most commonly used trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation method (2), phenol extraction followed by methanol/ammonium acetate precipitation was reported by Hurkman and Tanaka (3) in 1986 for proteomic studies. The authors emphasized the efficiency of the method in removing nucleic acids, which interact with proteins and give poor resolution and high background in two-dimensional electrophoresis (2-DE).

Phenol extraction was first developed to purify (deproteinize) carbohydrates and then nucleic acids. For molecular biologists, phenol extraction is now the standard and preferred way to remove proteins from nucleic acid solutions.

Phenol is the simplest aromatic alcohol; it contains a polar [OH] group bound to an aromatic ring. It exhibits weak acidic properties and is corrosive and poisonous. Phenol is partially miscible with water: when saturated with water the aqueous layer contains about 7% phenol and the organic layer about 28% water. It interacts with proteins mainly via hydrogen bonding and causes proteins to become denatured and soluble in the organic phase. Then, contrary to widespread belief, proteins are not in the interface but in the phenol phase.

The phenol extraction method is mainly reported for recalcitrant plant tissues or organs such as wood (4) potato and rapeseed seedlings (5); potato, apple, and banana leaves (6); olive leaf (7); and tomato, avocado and banana fruits (8).

Comparison of TCA/acetone and phenol extraction protocols led Carpentier et al. (6) and Saravanan and Rose (8) to the observation that the two methods were efficient in extracting proteins from recalcitrant tissues, but phenol extraction was most efficient in removing interfering substances and resulted in the highest quality gels with less background and less vertical streaking. The two methods minimize the protein degradation often encountered during sample preparation, owing to endogenous proteolytic activity. It was also pointed out that the phenol method yielded a greater number of glycoproteins (8).

The phenol extraction procedure has a high clean-up capacity. It also acts as a dissociating agent decreasing molecular interaction between proteins and other materials (6). The major drawbacks of the protocol are that it is time consuming (at least 6 h) and that phenol and methanol are toxic.

## 2. Materials

1. Phenol: Tris-HCl saturated, pH 6.6/7.9 (Amresco-Interchim, Biotechnology Grade).
2. Extraction buffer: Prepare a solution of 500 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 700 mM sucrose, 100 mM KCl and adjust pH to 8.0 with HCl. This solution can be stored for a week at 4°C.  
Add just before extraction 2%  $\beta$ -mercaptoethanol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; see Note 1).
3. Precipitation solution: 0.1 M ammonium acetate in cold methanol. This solution is stored at -20°C.
4. Isoelectric focusing buffer: 9 M urea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 20 mM DTT, 1.2% Pharmalytes pH 3 to 10 (see Note 2). Triton X-100 is provided as a 10% solution. This solution can be aliquoted and stored at -20°C for months.
5. Determination of protein concentration: protein concentration is evaluated according to a modified Bradford assay using the dye reagent from Bio-Rad (see Note 3).

## 3. Methods

### 3.1. Protein Extraction

1. Fresh plant tissue is frozen in liquid nitrogen after harvest and ground to a fine powder within precooled steel cylinders of an automatic cryogenic crusher (see Note 4).
2. Then 1 g of ground tissue is suspended in 3 mL of extraction buffer in a 15-mL Falcon tube, vortexed, and incubated by shaking for 10 min on ice (see Note 5).
3. Afterward, an equal volume of Tris-buffered phenol is added, and the solution is incubated on a shaker for 10 min at room temperature (see Note 6).
4. To separate insoluble material (in the pellet), for aqueous and organic phases, the sample is centrifuged for 10 min at 5500g and 4°C. The phenolic phase, which is on the top of the tube (see Note 7), is recovered carefully to avoid contact with the interphase and poured into a new tube.
5. This phenol phase is then back-extracted with 3 mL of extraction buffer. The sample is shaken for 3 min again and vortexed. Centrifugation for phase separation is repeated for 10 min at 4°C and 5500g.
6. The phenol phase still on the top of the tube is carefully recovered and poured into a new tube; 4 vol of precipitation solution are added. The tube is shaken by inverting, and the sample is incubated for at least 4 h or overnight at -20°C.
7. Proteins are finally pelleted by centrifugation (10 min, 5500g at 4°C).
8. After centrifugation, the pellet is washed three times with cooled precipitation solution and finally with cooled acetone. After each washing step, the sample is centrifuged for 5 min at 5500g and 4°C.
9. Finally, the pellet is dried under vacuum (see Note 8).

The proteins are first extracted in a Tris buffer containing several protecting agents. EDTA inhibits metalloproteases and polyphenol oxidases by chelating metal ions. PMSF irreversibly inhibits serine proteases.  $\beta$ -Mercaptoethanol is a reducing agent that prevents protein oxidation. Moreover, as a precaution against protease activity, the temperature must be kept below 4°C, and samples should be placed on ice during the first step of the extraction process (see Note 5). The extraction period should also be minimized. The presence of KCl is related to its "salting in" effect, improving the solubility and then the extraction of proteins.

An alternative method to classical phenol extraction has been proposed by Wang et al. (7). Extraction is carried out in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) and is termed phenol/SDS extraction. It maximized protein yields in olive leaf tissue, displayed a good 2-DE resolution, and gave more spots with increased intensity than phenol alone. However, the addition of SDS did not improve extraction in the case of banana, apple, and potato leaves (6).

With sucrose, the Tris buffer is heavier than Tris-buffered phenol. So, during the phase separation the phenol phase is "pushed" on top, which facilitates recovery of the phenol phase (see Note 7). The upper phenol phase contains cytosolic and membrane proteins.

Buffering the phenol with Tris to pH 8.0 (see Note 6) ensures that nucleic acids are partitioned to the buffer phase and not to the phenol-rich phase (6).

Proteins are usually precipitated by addition of salts or water-miscible organic solvents. Here a combination of both is used. Four volumes of methanol efficiently precipitate most proteins. However, methanol poorly precipitates proteins from acidic solutions. An organic base or a buffer (ammonium acetate) solves this problem.



### 3.2. Protein Solubilization and Quantification

1. The final pellet is resuspended in IEF buffer. In our conditions, starting with 1 g of fresh tomato fruit tissue, 200  $\mu$ L of IEF buffer are needed.
2. The sample is incubated for at least 1 h (sometimes more) at room temperature under agitation. Do not heat samples; this would lead to carbamylation of proteins.
3. For quantification, several dilutions of ovalbumin standard are made in IEF buffer (8 dilutions from 0 to 60  $\mu$ g/ $\mu$ L). Then 10  $\mu$ L of 0.1 N HCl are added to every samples. The final volume is adjusted to 100  $\mu$ L with water, either for standard curve samples or for tissue sample.
4. Then 3.5 mL of diluted dye reagent are added, and the optical density is read at 595 nm.

To estimate the protein concentration in plant samples, the Bradford assay (9) is more appropriate than the Lowry (10) and biuret methods, which are based on the quantification of phenolic compounds (1). However, direct quantification in sample solubilization buffers is not possible owing to interference with IEF buffer components. We therefore use the modified procedure of Ramagli and Rodriguez (11), which is based on acidification of the sample buffer. It allows direct quantitation of protein solubilized in sample buffers containing urea, carrier ampholytes, nonionic detergents, and thiol compounds.

### 4. Notes

1. **Caution:**  $\beta$ -mercaptoethanol and PMSF are toxic compounds. PMSF can be prepared as a stock solution 200 mM in isopropanol, aliquoted, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Don't add too much water to solubilize CHAPS and urea powders; for a 25 mL final volume, add only about 10 mL of water. When preparing this solution, avoid heating above  $30^{\circ}\text{C}$  to prevent protein carbamylation. Solubilization may take time.
3. The diluted dye reagent is prepared according to the standard macroassay procedure as described in the Bio-Rad instruction manual.
4. It is very important to obtain a fine powder; the finer it is, the more efficient are the protein extraction and the removal of contaminants. The powder should also be homogenous for accurate sample comparison.
5. At this step it is important to work at low temperature to limit protease activity.
6. Tris-buffered phenol is prepared according to the manufacturer's recommendations and is stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . In the bottle, the phenol phase is below the Tris phase. Pipet the whole required volume at once to avoid bottle manipulation and ambiguous separation of the two phases.
7. The trick here is to use sucrose in the extraction buffer to invert the phases.
8. It is possible to delay pellet resolubilization by storing well-dried protein pellets at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Be careful to prevent rehydration of the pellet by placing it in a vacuum chamber while warming up.

### References

1. Michaud, D. and Asselin, A. (1995) Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A* **698**, 263–279.
2. Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., and de Vienne, D. (1988) Two-dimensional electrophoresis in plant biology. *Adv. Electrophoresis* **2**, 263–340.
3. Hurkman, W. J. and Tanaka, C. K. (1986) Solubilisation of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**, 802–806.
4. Mijnsbrugge, K. V., Meyermans, H., Van Montagu, M., Bauw, G., and Boerjan, W. (2000) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* **210**, 589–598.
5. Mühr, C. and Braun, H. P. (2003) Proteomics in plant biology, in *Handbook of Proteomics* (Conn, P., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 409–416.
6. Carpentier, S. B., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., and Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **5**, 2497–2507.
7. Wang, W., Scali, M., Vignani, R., et al. (2003) Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**, 2369–2375.
8. Saravanan, R. S. and Rose, J. K. C. (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**, 2522–2532.
9. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
10. Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.

11. Ramagli, L. S. and Rodriguez, L. V. (1985) Quantification of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**, 559-563.

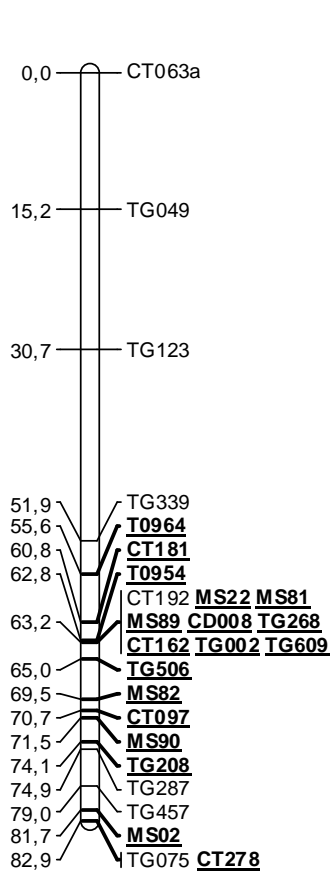
**Annexe 4: Liste de l'ensemble des marqueurs testés pour la densification en marqueurs des régions d'intérêt du chromosome 4 (Ch4) et du chromosome 9 (Ch9).** Pour les marqueurs positionnés dans la région ciblée, la mention "QTL" complète la localisation chromosomique.

Nom Marqueur	Type	Origine	Polymorphisme Cervil/Levovil	Localisation
<u>Chromosome 4</u>				
<b>T0635</b>	COS	SGN	monomorphe	
<b>T0883</b>	COS	SGN	monomorphe	
<b>T0954</b>	COS	SGN	co-dominant	Ch4
<b>T0964</b>	COS	SGN	dominant	Ch4
<b>CD008</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>CD055</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>CD070</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch10
<b>CT097</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>CT145</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>CT157</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>CT162</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>CT178</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>CT181</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4
<b>CT194</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>CT261</b>	RFLP	SGN	dominant	polymorphisme 2 <sup>degré</sup> non retrouvé pour cartographie
<b>PC001</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG002</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>TG146</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG208</b>	RFLP	SGN	dominant	Ch4 - QTL
<b>TG268</b>	RFLP	SGN	dominant	Ch4 - QTL
<b>TG272</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG506</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>TG516</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG609</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>MS02</b>	SSR	INRA-UGAFL	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>MS15</b>	SSR	INRA-UGAFL	monomorphe	
<b>MS22</b>	SSR	INRA-UGAFL	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>MS30</b>	SSR	INRA-UGAFL	co-dominant	non lié
<b>MS48</b>	SSR	SGN-ssr43	monomorphe	
<b>MS49</b>	SSR	SGN-ssr188	co-dominant	Ch4b
<b>MS80</b>	SSR	SGN-ssr86	co-dominant	non lié
<b>MS81</b>	SSR	SGN-ssr450	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>MS82</b>	SSR	SGN-ssr94	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>MS89</b>	SSR	SGN-ssr310	co-dominant	Ch4 - QTL
<b>MS90</b>	SSR	SGN-ssr555	co-dominant	Ch4 - QTL
<u>Chromosome 9</u>				
<b>CD003</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>CD032</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>CP044</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch9 - QTL
<b>GP125</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG003a</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch9 - QTL
<b>TG010</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG223</b>	RFLP	SGN	monomorphe	
<b>TG316</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch9 - QTL
<b>TG568</b>	RFLP	SGN	co-dominant	Ch9
<b>MS56</b>	SSR	SGN-ssr73	monomorphe	
<b>MS57</b>	SSR	SGN-ssr19	co-dominant	Ch9
<b>MS83</b>	SSR	SGN-ssr70	co-dominant	Ch9 - QTL
<b>MS91</b>	SSR	SGN-ssr69	co-dominant	Ch9 - QTL

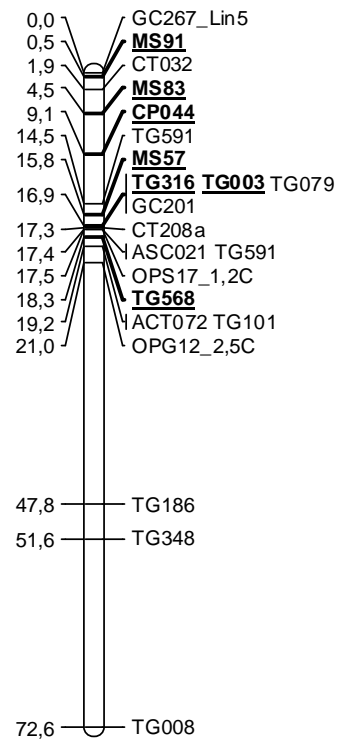
**Annexe 5: Cartes génétiques du chromosome 4 et du chromosome 9 représentant la totalité des marqueurs cartographiés.**

Les marqueurs ajoutés à la carte initiale sont soulignés et en gras.

**Chromosome\_4**

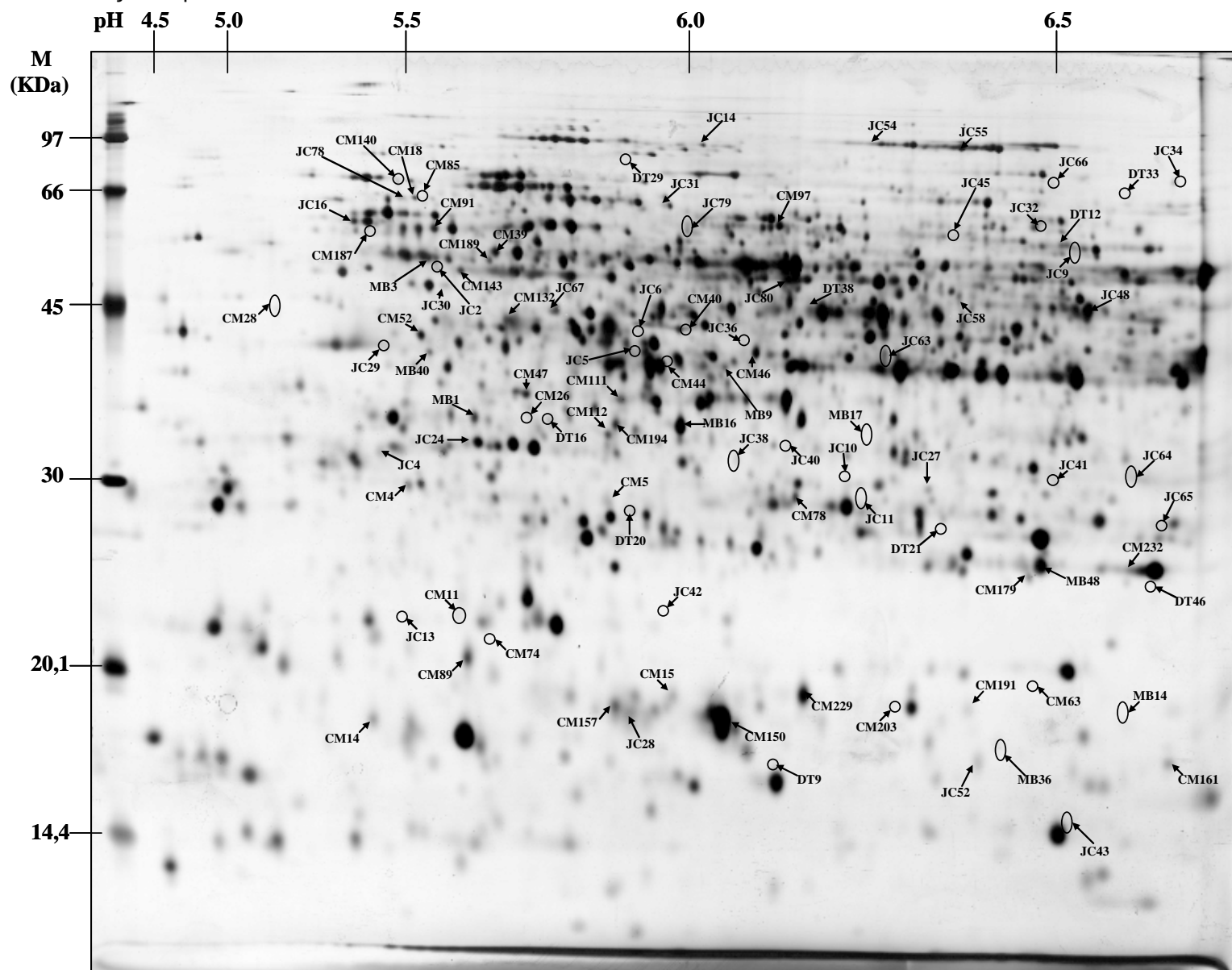


**Chromosome\_9a**





(b) Génotype Lx au stade 14 jours après anthèse



**Annexe 7: Gènes candidats issus du criblage différentiel Lx/Levovil à quatre stades de développement (21JAA, Vert Mature (VM), Tournant (T) et Rouge (R)), réalisé sur des puces à oligonucléotides dédiées texture.** Les valeurs d'expression correspondent à la moyenne des rapports de fluorescence entre Lx et Levovil. Des valeurs positives correspondent à une surexpression chez Lx.

Clone ID	Fonction	E-Value	Lx/Levovil							
			21JAA	VM	T	R	21JVM	T	R	
<b>Gènes en relation avec les modifications de la cellulose et de l'hémicellulose</b>										
TC124702	Cellulase 1	4.5 E-6	-5,39	-6,24	0,69	0,62				
TC117059	Endo-1,4-beta glucanase 1	5 E-6	3,66	11,76	5,95	13,31				
TC125319	Endo-1,4 beta-glucanase 3	5.4 E-6	4,01	-0,53	0,52	0,89				
TC116827	Beta-1 3-glucanase 13	4.8 E-6	5,57	0,37	-1,33	-1,46				
TC120253	Beta-1 3-glucanase 20	2.8 E-6	-5,41	-0,03	0,48	-3,74				
TC130186	Endo-1,4 beta-glucanase 26	9.8 E-6	1,59	0,25	-0,58	-3,24				
NP299185	Beta-1 3-glucanase 34	1.9 E-6	-14,26	-0,55	-0,06	-0,52				
TC116732	Beta 1-3 Glucanase 4	4.9 E-6	4,08	-3,95	0,32	-0,36				
TC116507	Beta-Glucosidase 3	5.1 E-6	-5,59	-1,35	-0,29	-0,44				
TC124913	Glucan 1-3 Beta-Glucosidase	4.5 E-6	-1,46	2,58	-1,47	5,72				
TC119394	Alpha-Glucosidase 11	3.6 E-6	-1,04	-2,87	0,74	-0,05				
TC129453	Alpha-Glucosidase 17	3.2 E-6	-5,35	-1,06	-0,70	-0,23				
NP000369	Glucan 1-3 Beta-Glucosidase 24		20,75	20,07	4,17	5,52				
TC125606	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 4	4.2 E-6	14,64	13,20	-1,28	0,26				
TC124049	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 6	3.9 E-6	16,99	1,40	2,54	-4,17				
TC124051	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 7	1.1 E-6	3,62	0,55	1,93	0,41				
TC124788	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 8	3.8 E-6	11,17	-4,45	-0,91	-6,02				
TC117821	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 10	3.4 E-6	6,46	-0,35	-0,31	0,20				
TC142639	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 10'		7,83	6,36	-1,57	-1,01				
TC124789	Xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase 12	2.9 E-6	10,92	1,76	0,34	0,43				
<b>Gènes en relation avec les modifications des pectines</b>										
TC125259	Beta-Galactosidase 1	5.7 E-6	3,86	0,58	0,17	1,25				
TC119516	Beta-Galactosidase 6	5.6 E-6	-0,03	2,02	-1,74	-0,75				
TC116171	Beta-Galactosidase 8	5.5 E-6	-9,63	9,41	-2,36	0,90				
TC123842	Beta-Galactosidase 10	1.0 E-5	-7,89	0,23	0,68	0,20				
AW933314	Beta-Galactosidase 21	9.3 E-7	-3,37	-0,12	-0,45	-0,16				
TC117830	Pectin Methylesterase 2	5.2 E-6	8,44	0,49	-1,64	0,87				
TC129445	Pectin Methylesterase 16	1.1 E-6	-9,04	-0,60	1,12	0,11				
TC124082	Polygalacturonase 6	4.8 E-6	4,85	6,31	-1,19	1,53				
TC118696	Polygalacturonase 7	5.2 E-6	0,02	-3,42	0,66	0,72				
TC117864	Pectin Acetyl Esterase 3	1.1 E-6	-3,68	-2,24	-1,15	-0,13				
TC118028	Pectin Acetyl Esterase 4	4.4 E-6	-6,73	0,61	-0,78	-0,54				
TC131340	Pectin Acetyl Esterase 8	4.2 E-6	7,33	-0,34	-0,03	0,34				
<b>Gènes en relation avec les modifications des sucres des chaînes latérales</b>										
TC116335	Beta-Mannosidase 1	5.1 E-6	-4,11	2,42	-0,70	-0,59				
TC117323	Beta-Mannosidase 2	5.2 E-6	-7,05	-4,22	-0,74	1,52				
BG133768	Beta-Mannosidase 8	1.2 E-6	4,42	-3,16	-0,79	1,06				
TC124239	Endo Beta Mannanase 2	4.6 E-6	8,58	16,71	-3,08	-0,98				
TC116998	Beta-Xylosidase 1	2 E-6	-4,77	0,59	-0,21	0,23				
TC122145	Beta-Xylosidase 4	3.9 E-6	-3,55	0,76	-1,30	2,15				
<b>Gènes en relation avec le relachement de la paroi cellulaire</b>										
TC116982	Expansin 1	4.3 E-6	0,69	-1,79	0,89	0,41				
TC125086	Expansin 3	4.2 E-6	12,16	3,50	-0,41	1,10				
TC118408	Expansin 6	3.8 E-6	-3,01	-0,88	-0,43	-1,95				
TC125357	Expansin 10	3.6 E-6	-5,64	-1,04	-0,15	-0,06				
NP000109	Expansin 11	8.9 E-7	-6,54	-0,68	1,32	-0,60				
<b>Gènes en relation avec l'adhésion cellulaire</b>										
TC115860	Lipid Transfer Protein 1	2.2 E-6	-6,57	-0,94	-0,02	-0,14				
TC115923	Lipid Transfer Protein 2	2.2 E-6	-3,45	-9,93	-1,82	-0,31				
AW217829	Lipid Transfer Protein 4	4.0 E-6	1,64	-5,60	0,10	1,05				
TC116912	Fasciclin-like arabinogalactan-protein 1	4.4 E-6	4,30	0,19	-0,05	-0,13				
TC117141	GPI-anchored protein 1	3.5 E-6	5,59	0,80	0,26	-0,58				
<b>Gènes en relation avec les échanges d'eau</b>										
TC115715	Major Intrinsic Protein - 1	4.3 E-6	-4,61	-4,12	-2,28	0,91				
TC116588	Aquaporin-like protein - 2	4.3 E-6	-1,84	-4,26	-0,46	0,97				
TC117967	Aquaglyceroporin - 3	3.7 E-6	-3,92	-1,89	1,96	-2,03				
TC123718	Aquaporin-like protein - 5	4.5 E-6	-13,27	-6,29	-0,03	0,12				

**Annexe 8: Article présentant l'étude des effets épistatiques contrôlant les variations phénotypique de six composantes de la qualité du fruit de tomate: poids du fruit, nombre de loge, fermeté instrumentale, acidité titrable, teneurs en sucres et en solides solubles.**

Both additivity and epistasis control the genetic variation for fruit quality traits in tomato

**Mathilde Causse\***, **Jamila Chaïb**, **Laurent Lecomte**, **Michel Buret<sup>†</sup>** and **Frédéric Hospital<sup>‡, 1</sup>**

INRA, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint-Maurice, 84143 Montfavet, France.

\*Author for correspondence (fax: +33 (0)4-32-72-27-02; email: Mathilde.Causse@avignon.inra.fr)

<sup>†</sup> INRA, UMR Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Domaine Saint-Paul, 84914 Avignon, France

<sup>‡</sup> INRA, UMR de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>1</sup> present address : Laboratoire de Physique Théorique et Modèles Statistiques, Université Paris Sud, UMR8626, Bâtiment 100, ORSAY CEDEX, F-91405, France

## Abstract

The expression of a gene involved in the variation of a quantitative trait may change due to epistatic interactions with the overall genetic background or with other genes through digenic interactions. The classical populations used to map quantitative trait loci (QTL) are poorly efficient to detect epistasis. To assess the importance of epistasis in the genetic control of fruit quality traits, we compared 13 tomato lines having the same genetic background except for one to five chromosome fragments introgressed from a distant line. Six traits were assessed: fruit soluble solid content, sugar content and titratable acidity, fruit weight, locule number and fruit firmness. The average values of lines cumulating several QTL often departed from the values predicted by an additive or a multiplicative model, suggesting less than additive epistasis. Although the quantification of epistatic effect of each introgressed region revealed significant epistatic interactions, additivity explained the major part of the variation of all the traits except firmness, which was not predictable. Finally the re-examination of the segregating population initially used to map the QTL confirmed the extent of epistasis, which frequently involved a region where main effect QTL have been detected in this progeny or in other studies.

**Key words:** quantitative trait locus (QTL), epistasis, fruit quality, *Solanum lycopersicum*



Epistasis — the interaction between genes at different loci — has two related but distinct definitions depending on the way it is revealed (Phillips 1998). In 1909, Bateson used the term epistasis to describe the masking effect of an allele at one locus upon an allele at another locus. This definition, first used in Mendelian segregation studies was further used by biologists when interactions among proteins were detected. In quantitative genetics, the term epistasis has been used in a different sense. In 1918, Fisher defined epistasis as the deviation from additivity of the contributions of several loci to a quantitative phenotype. Epistasis may exert important effect on the dynamics of evolving populations (Cheverud and Routman 1996; Elena and Lenski 2001). In the evolutionary history of species, complementary epistatic interactions due to the isolation of subspecies explain some epistatic interactions (Fenster *et al.* 1997) for instance for female sterility in rice (Kubo and Yoshimura 2005) or seed yield in bean (Johnson and Gepts 2002). Epistasis is also supposed to be the main factor responsible for overdominance and heterosis in *A. thaliana* (Syed and Chen 2005), rice (Li *et al.* 2001, Xing *et al.* 2002, Mei *et al.* 2003), and maize (Doebley *et al.* 1995). Its presence may have important consequences on the success of detection, introgression and characterization of the genes controlling quantitative traits (Carlborg and Haley 2004). Indeed as additive and epistatic effects are partially confounded, analysing only single locus effects can lead to detect a quantitative traits into quantitative trait loci (QTL) that has no actual main effect but interact epistatically with another (Purcell and Sham 2004). This could result in a restricted genetic gain from marker-assisted selection (Liu *et al.* 2003) as well as some difficulties when trying to characterize the QTL. Ignoring the epistatic interactions also leads to underestimate genetic variance and to overestimate individual QTL effects (Carlborg and Haley 2004). Any departure from a specific linear model describing the relationships between alleles at different genetic loci may be attributed to epistatic interactions (Wade *et al.* 2001). The choice of scale may be important, as in some cases, a log transformation of the data reduces the departure from the additive model (Cordell *et al.* 2001).

The studies aiming at dissecting QTL with molecular markers help to bridge the gap between the two definitions of epistasis. However due to the number of tests performed to detect epistatic interactions, significance thresholds must be very stringent and thus the power to detect interactions between QTL is low. Consequently, the number of significant epistatic interactions found is usually close to that expected by chance (Tanksley 1993). Nevertheless, several cases of epistatic interactions have been detected in plants, for flowering time (Monna *et al.* 2002; Li *et al.* 2001), inflorescence development (Ungerer *et al.* 2002), plant development (Doebley *et al.* 1995) or metabolic traits (Mc Mullen *et al.* 2001; Mahmood *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2005). Several cases of epistasis were also detected for disease resistance (Visker *et al.* 2003; Thabuis *et al.* 2004; Zhao and Meng 2003; Calenge *et al.* 2005; Clarke *et al.* 2001; Ahmadi *et al.* 2001, Coaker and Francis 2004). In tomato, significant interactions were detected for fruit shape (Van Der Knaap *et al.* 2002), locule number (Lippman and Tanksley 2001), colour (Kabelka *et al.* 2004), soluble solid content (Monforte *et al.* 2001), fructose to glucose ratio (Levin *et al.* 2004) and aroma production (Causse *et al.* 2002).

Several methods have been proposed to search simultaneously for multiple QTL (Kao *et al.* 1999). An alternative approach consists in restricting the search to the portions of the genome carrying main effect QTL (Lark *et al.* 1995). Because in statistical genetics epistasis is a by-product of the additive model, its effect is rarely significant, except when specific designs are used (Kearsey *et al.* 2003). Indeed interactions with the genetic background could be revealed by multiple crosses between

**Table 1: Characteristics of the QTL detected by interval mapping in the CL-RIL population.**

Negative additive effect indicates that the Levovil alleles increase the trait value. Heritability measured in the CL-RIL (according to Saliba-Colombani et al. 2001 and unpublished data for locule number).

Trait	Chromosome (a)	Position on EXPEN92 (b)	Markers (c)	R <sup>2</sup>	Additive effect	Introgressed Region Qi
Fruit weight (h <sup>2</sup> =0.75)	2 (1)	56	CT103	13.3	-8.9	Q2
	2 (2)	110	TG492	40.9	-12.4	Q2
	3	83	CT85	20.2	-9.1	-
	11	84	CT65	13.9	-8.9	-
	12	30	CT120B	12.4	-8.5	-
Firmness (d) (h <sup>2</sup> =0.63)	4	48	TG287	31.9	6745	Q4
	9	39	CT32 (SIM only)	9.8	-4936	Q9a
Locule number (h <sup>2</sup> =0.92)	1	75	TG116	7.0	-0.39	Q1
	2	71	TG484	49.0	-1.08	Q2
	12	30	TG367	8.0	-0.44	-
Soluble solid content (h <sup>2</sup> =0.58)	2 (1)	56	CT103	26.5	0.94	Q2
	2 (2)	78	AE4-0.9C	31.9	1.01	Q2
	9	39	CT32 (CIM only)	7.3	0.49	Q9a
Sugar content (h <sup>2</sup> =0.61)	2 (1)	56	CT103	22.5	0.53	Q2
	2 (2)	78	AE4-0.9C	29.0	0.59	Q2
	10	62	TG1 (CIM only)	9.5	0.34	-
	11	74	TG36	12.5	0.39	-
Titratable acidity (h <sup>2</sup> =0.81)	1	100	TG77	14.9	1.00	Q1
	2 (2)	110	TG492	14.3	1.01	Q2
	3	71	H42M47.112L	16.6	1.05	-
	9	39	CT32	11.5	0.85	Q9a
	12	30	CT120B	9.7	0.80	-

(a) The 2 regions carrying QTL on chromosome 2 are indicated with (1) and (2)

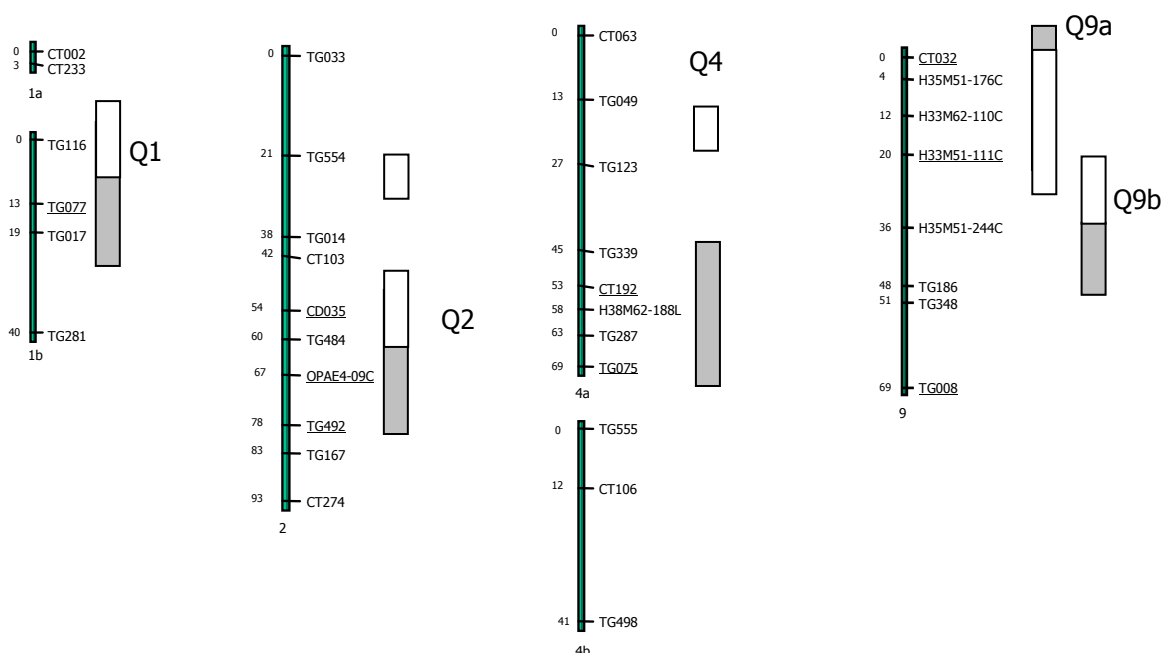
(b) The marker position is indicated as extrapolated on the reference map (Tanksley et al. 1992)

(c) The QTL detected only by Simple Interval mapping (SIM only) or only by Compositi Interval Mapping (CIM only) are indicated

(d) A penetrometer was used to measure firmness in CL-RIL whereas it was measured with a Durofel in QTL-NIL and QTL-CIL

**Figure 1: Genetic map showing the 5 regions of interest introgressed in each QTL-NIL (named Qi) on chromosome 1, 2, 4 and 9.**

The molecular markers used to control these regions are underlined (according to Lecomte et al. 2004). Grey boxes correspond to the regions chosen to be introgressed, white boxes indicate the regions which were introgressed by hitch-hiking with the QTL regions in the corresponding QTL-NILs.



related inbred lines (Charcosset *et al.* 1995; Jannink and Jansen 2001; Cockerman and Zeng 1996) or when transferring the same mutation or QTL in several genetic backgrounds (Elena and Lenski 2001; Lecomte *et al.* 2004). Introgression lines are also particularly adapted to reveal epistatic interactions. By crossing near-isogenic lines carrying different QTL, Eshed and Zamir (1996) showed that the addition of favourable alleles for fruit weight provided less progress than expected. Crosses between lines carrying interacting QTL were also used to confirm epistatic effects detected in tomato (Coaker and Francis 2004). At the molecular level, many examples can be found in the dissection of mutations controlling developmental or physiological traits such as flowering time (Caicedo *et al.* 2004) or defence mechanisms (Li *et al.* 2004).

In this study, we assessed the amount of epistasis for six traits involved in tomato development and tomato fruit quality. These traits are known to have different genetic architectures: fruit weight is controlled by many QTL (Grandillo *et al.* 1999), locule number is linked to organogenesis and probably controlled by only a few loci with both additive and epistatic effects (Lippman and Tanksley 2001), fruit firmness results from several biological processes (Seymour *et al.* 2002), soluble solid content is controlled by many QTL and has been extensively studied in processing tomato (Fulton *et al.* 2002), contrarily to sugar content and titratable acidity, both linked to the primary metabolism in fruit. Several QTL controlling these traits were previously mapped in a recombinant inbred line population (Causse *et al.*, 2001b; Saliba-Colombani *et al.*, 2001). Very few epistatic interactions were detected at the whole genome level and at a stringent threshold. A marker-assisted backcross scheme was then performed in order to introgress five major regions carrying QTL for quality traits into a recipient line (Lecomte *et al.*, 2004a). During the marker-assisted backcross, BC3S2 lines carrying favorable alleles at one to five QTL regions were produced (Lecomte *et al.* 2004). The comparison of lines carrying only one introgressed region (hereafter named QTL-NIL, for near isogenic lines) with the recipient line allowed additive QTL effects to be assessed. Comparing the values of the lines cumulating several introgressed regions (hereafter named QTL-CIL, for cumulating introgressed lines) to their expected values based on additive QTL effects estimated in QTL-NIL allowed interactions among QTL to be assessed. As significant epistatic effects were detected for all the traits, epistatic interactions in the CL-RIL population were then re-examined in the light of these results. Putative epistatic loci were compared with the QTL detected for the same traits in other QTL mapping experiments, showing that a majority of the interacting loci in the present study actually corresponded to additive QTL detected in other studies.

## Materials and methods

### Plant material

In a previous study (Causse *et al.*, 2001b; Saliba-Colombani *et al.*, 2001), QTL analysis was performed using a population (named CL-RIL) of 144 recombinant inbred lines developed from a cross between Cervil (a cherry tomato, *Solanum lycopersicum*, formerly *Lycopersicon esculentum*, var. *cerasiforme*, with 7g fruits, a good taste and a high aroma intensity) and Levovil (a *S. lycopersicum* line, with 125g fruits and a common taste). Several QTL controlling the variation of organoleptic quality traits were detected (Causse *et al.*, 2002). The favorable alleles for fruit quality were conferred by Cervil in all cases. Five regions (called 1, 2, 4, 9a and 9b, according to their chromosome location) were then chosen to be introgressed into Levovil. Two to five QTL were detected in

**Table 2: Genotypic and phenotypic characteristics of the near isogenic lines (QTL-NIL) and lines cumulating three to five chromosome regions (QTL-CIL) introgressed from the cherry tomato line (Cervil) into Levovil genetic background.**

The percentage of Cervil genome is indicated (% Cervil). The means of the QTL-NIL and QTL-CIL over two trials were compared to the recipient line. The regions for which a QTL was detected in the CL-RIL population are underlined.

<i>% Cervil</i>		<b>FW</b>		<b>LCN</b>		<b>FIR</b>		<b>SSC</b>		<b>SUC</b>		<b>TA</b>	
Donor line mean (Cervil)	<i>100</i>	6.76		2.00		58.33		11.68		5.91		8.16	
Recipient line mean (Levovil)	<i>0</i>	124.1		4.27		60.97		5.73		2.77		4.61	
QTL-NIL													
Q <sub>1</sub>	<i>0.11</i>	79.5	*	<u>3.75</u>	ns	56.24	ns	7.03	*	3.41	*	<u>5.22</u>	*
Q <sub>2</sub>	<i>0.07</i>	<u>57.1</u>	*	<u>2.04</u>	*	53.58	*	<u>6.98</u>	*	<u>3.40</u>	*	<u>5.91</u>	*
Q <sub>4</sub>	<i>0.08</i>	128.1	ns	4.75	ns	<u>56.74</u>	ns	5.90	ns	3.06	ns	4.82	ns
Q <sub>9a</sub>	<i>0.14</i>	94.7	*	4.03	ns	<u>57.65</u>	ns	<u>6.78</u>	*	3.29	*	<u>5.24</u>	*
Q <sub>9b</sub>	<i>0.04</i>	112.0	ns	4.40	ns	58.92	ns	5.54	ns	2.69	ns	4.74	ns
QTL-CIL													
Q <sub>1/2/9b</sub>	<i>0.12</i>	57.7	*	2.21	*	55.90	ns	7.27	*	3.61	*	5.90	*
Q <sub>1/4/9b</sub>	<i>0.12</i>	97.8	*	3.72	ns	60.61	ns	5.67	ns	3.07	ns	4.89	ns
Q <sub>1/9a/9b</sub>	<i>0.15</i>	87.4	*	3.24	*	54.76	ns	6.52	*	3.35	*	5.44	*
Q <sub>2/4/9b</sub>	<i>0.17</i>	47.6	*	2.29	*	62.57	ns	6.78	*	3.49	*	4.87	ns
Q <sub>2/9a/9b</sub>	<i>0.16</i>	64.0	*	2.40	*	51.42	*	7.98	*	3.79	*	6.02	*
Q <sub>4/9a/9b</sub>	<i>0.15</i>	82.5	*	3.99	ns	62.64	ns	6.46	*	3.44	*	4.77	ns
Q <sub>1/4/9a/9b</sub>	<i>0.20</i>	68.3	*	3.46	*	62.45	ns	6.54	*	3.74	*	5.19	*
Q <sub>1/2/4/9a/9b</sub>	<i>0.30</i>	29.7	*	2.14	*	60.04	ns	8.55	*	4.57	*	5.81	*

\* : significant difference from the recipient line, in Dunnett's test (P<0.05) , ns = non significant.

the CL-RIL population for the six traits of interest (**Table 1**). The five chromosome regions selected to be introgressed covered the major QTL intervals detected in the CL-RIL. The regions to transfer were chosen not only on the basis of QTL described in Table 1, but also on the basis of the QTL for sensory traits and volatile aroma content (Causse *et al.* 2002). For instance the segment 9b was retained because it carried a QTL controlling pharmaceutical aroma. No effect is thus expected in this region for the traits studied here. A single RIL with Cervil alleles for the five regions was used as donor parent in the introgression program. The implementation of the selection scheme is described elsewhere (Lecomte *et al.* 2004). The five regions were controlled by one to three markers during marker-assisted introgression (**Figure 1**). After three marker-assisted backcrosses, one BC3 plant heterozygous at the five regions of interest was selected and selfed. In two generations of selection and selfing, BC3S2 lines with homozygous Cervil genotypes at one, three, four or five regions were derived. Lines having a single introgressed region were called QTL-NIL (Van Berloo *et al.*, 2001), those cumulating three to five introgressed regions were called QTL-CIL (Cumulating Isogenic Lines). The lines are named  $Q_i$ ,  $i$  corresponding to the introgressed fragment(s) carried by the line. Markers covering the whole genome were used to characterize the genotypes of every line and to assess the remaining percentage of donor genome, as described in Lecomte *et al.* (2004). In the end, the introgressed segments were often larger than the QTL region because of linkage drag (Lecomte *et al.* 2004).

### Phenotypic evaluations

Three trials were performed in heated glasshouses in Southern France. The first trial consisted in the 144 RIL as described in Saliba-Colombani *et al.* (2001). Fruits of each plot were harvested on the basis of their red color, twice a week during six weeks. The QTL-NIL and QTL-CIL were evaluated in two trials in greenhouses in the South East of France, one performed from February to June 2002, the other from February to June 2003. The recipient line Levovil, Cervil and 13 BC3S2 lines were grown, each represented by a plot of six plants. Fruits were harvested in bulk on the six plants of each plot twice a week during six weeks. Each week, seven fruits were sampled per plot. It was preferred to bulk fruits harvested each week on several plants rather than several weeks of harvest per plant in order to maximize the environmental variability, as previous experiments showed that variability among weeks of harvest is higher than among plants of the same genotype (MC unpublished data). A total of 42 fruits per plot were evaluated for the three physical and the three chemical traits previously described. Fruit-by-fruit evaluations were performed for fruit weight (**FW**) and firmness (**FIR**). Fruit firmness was evaluated with a penetrometer in CL-RIL and with a Durofel (a probe was applied at two points on the fruit equator, the moves of the probe was recorded and the average of the two measurements was used as an indicator of fruit firmness) in introgressed lines. Then, fruits were cut to determine the locule number (**LCN**) and then frozen (-30°C). Chemical analyses were performed on fruit powder derived from blending a bulk of seven fruits with liquid nitrogen. Soluble solids content (**SSC**), sugar content (**SUC**) and titratable acidity (**TA**) were evaluated as described in (Saliba-Colombani *et al.*, 2001).

### Statistical analyses

BC3S2 lines having one to five introgressed regions were analyzed using the SAS software (SAS Institute, 1988). Mean values over the 2 trials were estimated for each line after testing the genotype and year effects by ANOVA. The difference between each line mean and the recipient line mean was tested by a Dunnett's test. Let  $Q$  and  $Q_i$  be the average values of the recipient line and of the QTL-NIL carrying region  $i$ , respectively. Then, QTL effect was estimated from the values of the lines having a single introgressed region, as (1) additive effect  $a_i$  of region  $i$ :

$$a_i = (Q_i - Q)/2, \text{ and (2) multiplicative effect of the region } I: \quad m_i = Q_i / Q.$$

**Table 3: Additive (ai) and epistatic (ei) effect of each region i estimated by comparing QTL-NIL and QTL-CIL.**  
Correlations between additive and epistatic effect.

fragment	FW		LCN		FIR		SSC		SUC		TA													
	a <sub>i</sub>	e <sub>i</sub>	a <sub>i</sub>	e <sub>i</sub>	a <sub>i</sub>	e <sub>i</sub>	a <sub>i</sub>	e <sub>i</sub>	a <sub>i</sub>	e <sub>i</sub>	a <sub>i</sub>	e <sub>i</sub>												
<b>Q1</b>	-22.29	*	37.46	*	-0.26	ns	0.25	ns	-2.37	ns	4.63	*	0.65	*	-1.26	*	0.32	*	-0.50	*	0.31	*	-0.41	*
<b>Q2</b>	-33.52	*	47.74	*	-1.12	*	1.57	*	-3.69	*	6.18	*	0.62	*	-0.24	ns	0.32	*	-0.22	ns	0.65	*	-0.99	*
<b>Q4</b>	2.00	ns	-13.57	*	0.24	ns	-0.36	ns	-2.12	ns	8.08	*	0.09	ns	-0.16	ns	0.15	ns	-0.09	ns	0.10	ns	-0.33	*
<b>Q9a</b>	-14.68	*	14.62	*	-0.12	ns	0.11	ns	-1.66	ns	4.24	*	0.52	*	-0.61	*	0.26	*	-0.19	ns	0.32	*	-0.48	*
<b>r(ai - ei)</b>	-0.99	*			-0.99	*			0.20	ns			-0.59	ns			-0.74	ns			-0.96	*		

\* : significant effect (P<0.05) , ns = non significant.

According to these individual effects, the expected effect for a line having several introgressed regions  $i$ ,  $j$  and  $k$  was predicted based on (1) a linear additive model:  $A_{ijk} = a_i + a_j + a_k$  and (2) a multiplicative model:  $M_{ijk} = m_i \times m_j \times m_k$ .

Observed effect of QTL in QTL-CIL was compared to predicted effect through the comparison of the residual sum of squares of both models by a F-test.

Epistatic effects  $e_i$  were estimated for each region  $i$  by the differences :

$$e_1 = Q_{1/4/9a/9b} - Q_{4/9a/9b} - 2a_1 ;$$

$$e_2 = Q_{1/2/4/9a/9b} - Q_{1/4/9a/9b} - 2a_2 ;$$

$$e_4 = Q_{1/4/9a/9b} - Q_{1/9a/9b} - 2a_4 \text{ and}$$

$$e_{9a} = Q_{1/4/9a/9b} - Q_{1/4/9b} - 2a_{9a}.$$

Significance of  $e_i$  was tested by comparing with a t-test the two contrasts  $Q-Q_i$  and  $Q_{ijk} - Q_{jki}$  which should be equal in absence of epistasis.

In the CL-RIL population, epistasis was tested by 2-way ANOVAs among all the 129 markers covering the genome at a significance threshold of  $P < 0.001$ . In RIL, the epistatic interaction was assessed by an index adapted from Keightley (1996):

$$I_K = \frac{|m_{CC} - m_{LL}|}{[m_{CL} + m_{LC} - 2 * \min(m_{LL}, m_{CC})]}, \text{ if } (m_{CC} + m_{LL}) > (m_{CL} + m_{LL}),$$

$$I_K = \frac{|m_{CL} - m_{LC}|}{[m_{CC} + m_{LL} - 2 * \min(m_{CL}, m_{LC})]}, \text{ if } (m_{CL} + m_{LC}) > (m_{CC} + m_{LL}),$$

where  $m_{XY}$  is the average value of the plants with a genotype homozygous X at the first locus and Y at the second.

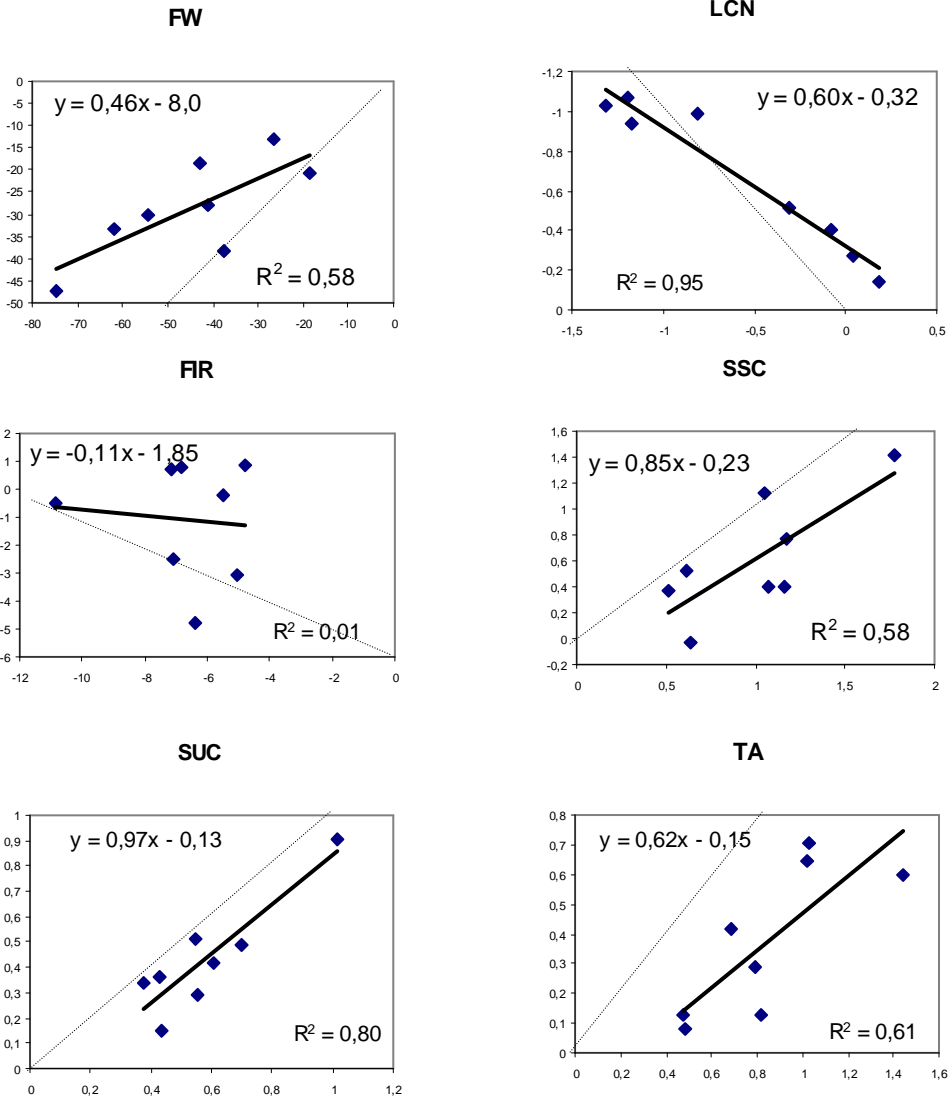
## Results

### Genotype and phenotype of the introgressed lines

The 13 introgressed lines carried one to five chromosome segments from the cherry tomato genome. Eight lines cumulating three, four or five regions were characterized, and each region was thus introgressed into four or five different lines. **Table 2** shows the percentage of Cervil genome remaining in each introgressed line. Over the whole genome, the QTL-NIL contained 4 to 14 % Cervil genome, and the QTL-CIL contained 12 to 30 % Cervil genome. QTL-CIL carried Cervil alleles on a few chromosome fragments apart from the QTL regions, but we verified that all these regions did not carry any QTL (Saliba-Colombani *et al.* 2001). Residual Cervil alleles were found close to QTL regions in only two QTL-NIL (5 cM above CT32 on chromosome 9 in  $Q_4$  and 30 cM from the top of chromosome 4a in  $Q_{9a}$ ). As these segments did not correspond to any QTL region, we did not take them into account. In the introgression lines, the correlation between the percentage of Cervil genome and the phenotypic value was significant for fruit weight, soluble solid content and sugar content due to the high effect of the QTL controlling these traits. Indeed, when the fragments carrying the QTL were not taken into account, the correlation remained only significant for soluble solid content, confirming the low impact of the residual introgressions outside these regions.

**Figure 2: Regression of expected value of QTL-CIL based on the additive model (X-axis) on observed (Y-axis) for fruit weight (FW), locule number (LCN), firmness (FIR), soluble solid content (SSC), sugar content (SUC) and titratable acidity (TA).**

The linear regression is shown in bold and the dashed line corresponds to  $y=x$ .





Significant differences between means of lines over the two years was shown for all the traits, except for locule number, but the year x genotype interaction was only significant for sugar content and acidity and in both cases the genotype effect was much more significant than the interaction (data not shown). The comparison of the QTL-NIL to the recipient line allowed QTL effect in a homogenous genetic background to be assessed (**Table 2**). We considered only one effect on chromosome 2, as it was impossible to separate the two QTL on this chromosome in the QTL-NIL. Three regions (on chromosomes 1, 2, and 9a) showed significant effects for more than one trait, revealing either pleiotropic effects or linkage of several QTL in the same region. These colocations were in accordance with the correlations observed between soluble solid and sugar content ( $r=0.78$  in the CL-RIL and  $0.90$  in the introgressed lines) or acidity ( $r=0.59$  in the CL-RIL and  $0.80$  in introgressed lines), as well as between fruit weight and locule number ( $r=0.91$  in introgressed lines). Firmness was not correlated to any other trait except to acidity in the introgressed lines ( $r=-0.71$ ). All the eight QTL-CIL had fruits much smaller than the recipient line, the line with five QTL fragments having the smallest fruits. Locule number of six lines was significantly lower than the recipient line, and only one line ( $Q_{2/9a/9b}$ ) was different for firmness. For sugar content and soluble solid content, seven lines were different from the recipient line and five lines differed in acidity from the recipient line.

### Cumulative effect of the QTL

The average values of lines cumulating three, four or five introgressed fragments were compared to the predicted values based on the additive effects of each region assessed from the QTL-NIL (**Figure 2**). Then, an overall epistatic effect ( $e_i$ ) was assessed for each chromosome segment (except 9b) by subtracting from the line with four or five segments the mean of the line with the same fragments except the  $i$  fragment (**Table 3**). The region carrying the bottom part of chromosome 9 (region 9b) was present in every QTL-CIL and could not be individually studied, but it did not show any effect on the traits studied here.

For fruit weight, the Cervil alleles had a negative effect for all the three significant QTL, with a major effect on chromosome 2. A significant reduction of fruit weight was observed when several donor regions were introgressed. The QTL-CIL showed a significant reduction of 13g to 47g in fruit mass compared to the recipient line. Expected values were lower than observed values, except in the two QTL-CIL  $Q_{2/4/9b}$  and  $Q_{4/9a/9b}$  (**Figure 2**), indicating less than additive interactions. All the combinations involving the region  $Q_1$  had much lower effects than expected, as if the additive QTL effect of this region had been overestimated in the QTL-NIL. This was confirmed by the estimation of epistatic effect which was very large for  $Q_1$ . Epistatic effects appeared as high or higher than additive effects. The sign of all epistatic effects was opposite to that of additive effect, which confirmed that epistasis was reducing the additive effect of the QTL when several QTL were combined. Individual effects of  $Q_1$  and  $Q_{9a}$  QTL could not be detected in the CL-RIL population probably because of the masking effect of  $Q_2$ . Indeed in QTL-CIL the chromosome 2 exhibited the highest epistatic effect ( $e_2$ ).

Firmness exhibited the strongest epistatic effects. For this trait, the additive effect detected in CL-RIL on chromosome 4 and 9a were not significant in QTL-NIL, whereas an additive effect was detected for  $Q_2$ , the Cervil alleles reducing firmness. The expected means of QTL-CIL were all lower than the observed values, and the correlation between predicted and observed values was not significant. The epistatic effects were significant for the four regions. As all the QTL-CIL containing the  $Q_4$  fragment were not different in average from the recipient line, the epistatic effect for this fragment was highly significant.

Only  $Q_2$  showed a significant additive effect on locule number. The observed and predicted values were relatively close, three QTL-CIL exhibiting observed values higher than expected, contrarily to the five others. The QTL-CIL

**Table 4: Epistatic interactions detected in the CL-RIL population at P<10<sup>-3</sup>.**

The average value of each genotypic class (CC, CL, LC and LL) is indicated. The magnitude of epistasis is estimated by an Index  $I_k$  (see Materials and Methods). Effects significant at the  $P < 10^{-4}$  threshold are in bold.

Trait	Chr1	Position (a)	Marker 1	Chr2	Position (a)	Marker 2	Probability	R <sup>2</sup>	mCC	mLC	mCL	mLL	I <sub>k</sub>
FW	Q2	62	H35M47l	6	50	H38M47g	4.88E-04	0.1	22.03	27.18	20.64	42.01	5.31
LCN	1a	0	CT233	Q2	73	H35M47l	8.66E-04	0.07	2.39	2.44	3.91	3.15	2.23
	3	10	TG131a	4b	124	TG498	1.96E-04	0.11	3.15	2.74	2.75	3.37	0.27
	<b>8</b>	<b>38</b>	<b>CT287a</b>	<b>10</b>	<b>62</b>	<b>TG001</b>	<b>5.55E-06</b>	<b>0.15</b>	<b>2.86</b>	<b>3.65</b>	<b>3.06</b>	<b>2.61</b>	0.91
FIR	Q1b	100	TG077	4a	2	CT063a	1.91E-04	0.1	38613	45830	39910	38895	2.56
	Q1b	133	TG281	Q4a	48	TG287	5.49E-04	0.08	40863	45155	38545	35800	15.48
	<b>Q1b</b>	<b>103</b>	<b>CT259</b>	<b>Q9a</b>	<b>55</b>	<b>TG079</b>	<b>2.13E-05</b>	<b>0.12</b>	<b>39655</b>	<b>39514</b>	<b>38601</b>	<b>47473</b>	6.54
	Q2	56	CT103	Q4a	50	TG075	3.56E-04	0.07	42188	44032	39171	34168	2.45
	Q2	62	H35M47l	Q4a	31	TG339	6.20E-04	0.2	39742	44245	38660	33397	1.34
	Q2	71	TG484	8	36	CT245	4.85E-04	0.09	39988	42099	42225	37028	0.02
	3	3	TG040	7	56	TG639	1.71E-04	0.1	38068	42004	42126	37998	0.02
	3	76	H35M48d	4a	21	TG123	1.70E-04	0.16	44674	39207	37278	40245	1.11
	6	42	TG365	8	38	CT287a	6.53E-04	0.1	41424	37345	38499	42635	0.17
	<b>6</b>	<b>51</b>	<b>TG357</b>	<b>6</b>	<b>94</b>	<b>TG314</b>	<b>9.19E-05</b>	<b>0.11</b>	<b>38754</b>	<b>43722</b>	<b>43348</b>	<b>39222</b>	0.04
SSC	Q2	110	TG492	Q2	123	CT274	5.67E-04	0.07	7.58	6.23	7.13	6.93	1.30
	3	76	H35M48d	12	14	TG068	7.35E-04	0.13	7.23	7.57	7.83	6.83	0.24
	<b>6</b>	<b>42</b>	<b>TG365</b>	<b>6</b>	<b>94</b>	<b>TG314</b>	<b>7.58E-05</b>	<b>0.13</b>	<b>7.35</b>	<b>6.85</b>	<b>6.61</b>	<b>7.41</b>	0.05
	<b>11</b>	<b>83</b>	<b>H33M51b</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>GC092</b>	<b>2.81E-05</b>	<b>0.22</b>	<b>7.91</b>	<b>6.88</b>	<b>6.82</b>	<b>7.42</b>	0.43
SUC	Q2	110	TG492	Q2	123	CT274	6.22E-04	0.07	4.32	3.53	3.94	3.89	1.39
	Q2	105	H33M49i	12	35	H33M50p	2.44E-04	0.14	4.13	4.13	4.48	3.63	0.70
	3	103	TG152	Q9a	60	H35M51s	1.38E-04	0.17	3.68	4.34	4.2	3.92	0.17
	3	120	TG267	12	17	H33M61a	5.70E-04	0.17	3.61	4.44	3.99	3.88	0.92
	4b	124	TG498	6	30	H33M47l	4.14E-04	0.17	3.91	4.3	4.27	3.7	0.03
	5	47	CT091a	Q9a	43	H35M51s	3.03E-04	0.14	3.76	4.45	4.11	3.91	0.62
	6	5	GC094	6	18	GC099	7.00E-04	0.1	3.89	4.38	4.28	3.84	0.12
	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>H33M49g</b>	<b>10</b>	<b>62</b>	<b>TG001</b>	<b>7.26E-05</b>	<b>0.2</b>	<b>4.3</b>	<b>3.8</b>	<b>3.7</b>	<b>4.25</b>	0.05
	11	83	H33M51b	12	33	GC092	1.34E-04	0.18	4.44	3.7	3.91	4.1	0.58
TA	3	3	TG040	8	41	CT069	5.08E-04	0.09	7.34	8.07	8.46	7.57	0.32
	3	83	CT085	Q4a	31	TG339	2.19E-04	0.13	8.01	7.72	9.22	6.93	3.00
	Q4a	45	H38M62f	6	30	H33M47l	2.57E-04	0.16	8.18	7.59	6.97	8.58	0.22

(a) The marker position is indicated as extrapolated on the high-density map (Tanksley et al. 1992)

cumulating the fragments on chromosome 1 and 9a showed a significant effect which was masked when added to the fragments on chromosome 2, as locule number was the same in  $Q_{1/2/9b}$  combination, in  $Q_{2/9a/9b}$  combination and in the line carrying the five introgressed regions. This was confirmed by the estimation of subtractive effects:  $e_2$  was highly significant with a direction opposite to the  $a_2$  additive effect.

For soluble solid content, sugar content and titratable acidity, significant additive effects were detected for fragments  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_{9a}$ , the Cervil alleles always increasing the trait. Expected values of the QTL-CIL were all higher than observed values, suggesting less than additive interactions. For soluble solid content, it seemed that the presence of  $Q_4$  in a combination, although not significant at the QTL-NIL level, masked the  $Q_1$  effect. The fragment  $Q_2$  also systematically masked the effect of the other fragments except when all the five fragments were included together in the genotype. The epistatic effects  $e_1$  and  $e_{9a}$  were very high for soluble solid content, while for sugar content, only  $e_1$  was significant. For titratable acidity, all the epistatic effects were significant, the presence of  $Q_2$  masking the effect of  $Q_1$  and  $Q_{9a}$ .  $Q_4$  also masked the expression of  $Q_2$  in  $Q_{2/4/9b}$  and the effect of  $Q_{9a}$  in  $Q_{4/9a/9b}$ , but not in  $Q_{1/4/9a}$  nor in the line with the five fragments.

### Prediction with a multiplicative model

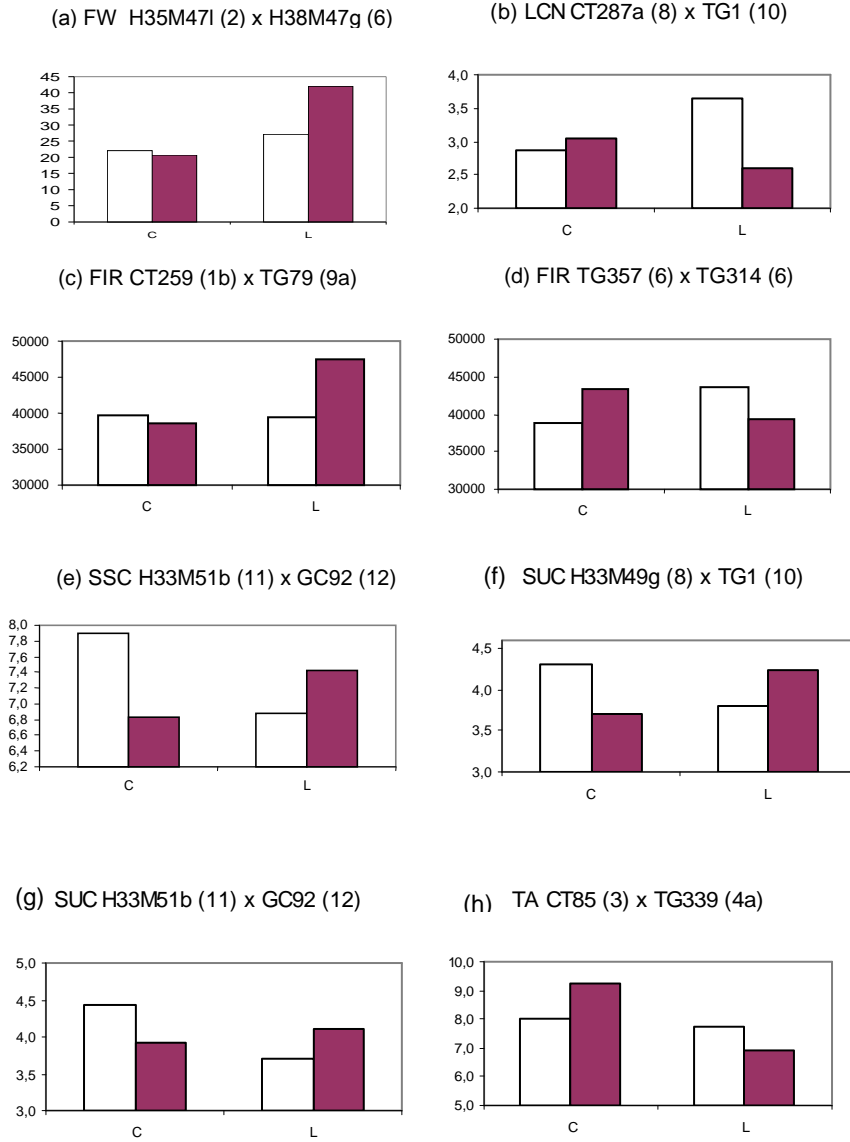
A multiplicative model was also tested to predict the cumulative effects of the four regions. Such model may be more realistic in the case of additive-by-additive epistasis (Wade *et al.*, 2001). For fruit weight and locule number, both additive and multiplicative models gave similar results. For fruit firmness, the correlation between predicted and observed values was very low and non significant whatever the model. For soluble solid content, sugar content and titratable acidity, the departure from the observed value was higher with the multiplicative model than with the additive one (data not shown).

### A re-examination of epistatic interactions in the segregating population

The screening for epistatic interactions in the CL-RIL population was first performed at a  $P < 10^{-4}$  threshold (Saliba-Colombani *et al.* 2001) in order to avoid false positive effects (0.5 significant test per trait expected by chance if we assume the independence of every tests). At this threshold, 6 significant interactions were detected for the traits studied here. They concerned locule number (between chromosomes 8 and 10), firmness (between regions carrying  $Q_1$  and  $Q_{9a}$  and among two distant loci of chromosome 6), soluble solid content (among two distant loci of chromosome 6 and between chromosomes 11 and 12), and for sugar content (between chromosomes 8 and 10). Taking into account the amount of putative epistatic interactions detected in QTL-CIL, we then re-analysed these data with a less stringent threshold ( $P < 10^{-3}$ ) and in regard to the epistatic effects detected with the QTL-CIL. When all the markers are concerned, the number of significant tests is higher than that expected by chance only for firmness and sugar content. When we screened for interactions between at least one marker within one of the five regions introgressed and one outside, the number of significant tests exceeded the number expected by chance for firmness, sugar content and acidity. The number of interactions among two of the five regions was low, but interactions were detected for firmness, soluble solid content, and sugar content (**Table 4**). Among the 39 significant interactions, some involved two or three closely linked markers. In these cases, only the pair of markers with the most significant interaction was taken into account, reducing to 30 the number of putative interactions. Several significant interactions involved loci on chromosome 2, 3, 4 and 6. The epistatic interaction was assessed by an index  $I_k$  adapted from Keightley (1996), which ranges from 0 to 1 for antagonistic (or duplicate) epistatic effects and is higher than 1 for synergistic or complementary epistatic effects. Among the 30 epistatic effects 19 had an  $I_k$  lower than 1. The **Figure 3** illustrates a few cases

**Figure 3: Examples of epistatic interactions detected in CL-RIL population.**

Average values of the four genotypic classes, from left to right CC, CL, LC, LL. (a) Fruit weight, interaction between H35M47l and H38M47g, (b) Locule Number, interaction between CT287a and TG1, (c) Firmness, interaction between CT259 and TG79, (d) Firmness, interaction between TG357 and TG314, (e) Soluble Solid Content, interaction between H33M51b and GC92, (f) Sugar content, interaction between H33M49g and TG1 (10), (g) Sugar content, interaction between H33M51b and GC 92, (h) Titratable acidity, interaction between CT85 and TG339. Chromosome number is indicated after each marker.



of epistasis: (i) "complementary", when the two parental genotypes had close averages, opposite to the two recombinant ones (Figure 3d and 3f), (ii) "duplicate" when three classes had the same average and only one was different (Figure 3a and 3c), or (iii) "intermediate" when only two genotypes (CC and CL or LL and LC) differed, not the two other ones (Figure 3b, 3e, 3g and 3h).

For fruit weight, a significant interaction was detected between the fragment  $Q_2$  and a marker on chromosome 6. This interaction corresponded to complementary type, where only the genotype combining recipient alleles at both loci increased fruit weight. For locule number, three significant interactions involved six chromosome regions. Firmness showed the largest number of significant tests (ten interactions involving ten chromosome regions). Four interactions involved two QTL regions and two others involved one QTL region. Some regions on chromosome 1, 2, 4 and 8 were involved in two or three distinct interactions. For soluble solid content, four significant interactions were detected, one between two loci of  $Q_2$ , one between two loci on chromosome 6, the others involving the chromosomes 3, 11 and 12. For sugar content, four interactions among nine involved at least one QTL region ( $Q_2$  or  $Q_{9a}$ ). For acidity, three interactions were significant, two involving  $Q_4$ . For chemical traits, most of the interactions were of the duplicate type.

## Discussion

### Interest of QTL-NIL and QTL-CIL for revealing epistasis

Our results showed that cumulating QTL may not always provide the trait values expected based on additive effects. The interest to physically generate the genetic decomposition of interactions by limiting the total genotypic variation to just a few sites has already been underlined either with point mutations in *Drosophila* (Clark and Wang 1997) or with introgressed regions in tomato (Eshed and Zamir 1996). Introgression lines allow one to attribute all the observed variation only to the difference in the introgressed region and they facilitate fine mapping experiment (Eshed and Zamir 1996). The development of QTL-NIL also provides valuable material for marker-assisted selection, permitting a more detailed evaluation of the effect of a given QTL in a new genetic composition (Van Berloo *et al.*, 2001). Due to epistasis, selection of lines carrying several QTL combinations may also be interesting, as the best genotype may not always be the line having the highest number of QTL introgressed (Robert *et al.*, 2001; Yousef and Juvik, 2002).

### Importance of non additive interactions in the genetic control of fruit quality traits

Except for firmness, a large part of the variation of the six fruit quality traits was under additive control, but interactions leading to less than additive effects were common. This study reveals that epistasis may control a significant part of the genetic variation for quantitative traits. A previous experiment, where the same five QTL were simultaneously transferred into three genetic backgrounds and then crossed in a half diallel design, also resulted in the evidence of QTL by genetic background interactions for most of the quality traits (Lecomte *et al.* 2004). Nevertheless, it was not yet possible to assess epistasis at the QTL level. In the lines cumulating several QTL regions, all the significant epistatic effects ( $e$ ) had a sign opposite to the additive effects ( $a_i$ ), suggesting less than additive epistasis. Eshed and Zamir (1996) found that 28% of the epistatic interactions were significant and generally independent of the scale, for yield-related traits. Most of the interactions they found were also less than additive. Furthermore they found that the combinations of three QTL exhibited even more important epistatic effect than combinations of two. The additive and epistatic effects were negatively correlated for fruit

weight, locule number and acidity, the strongest additive effects having thus the most masking effects on the other regions. These traits were also those exhibiting the highest heritability in CL-RIL (Table 1).

Epistasis was detected more frequently in introgression lines than in the CL-RIL, confirming that epistasis detection in a RIL population is powerless. In CL-RIL, additive and epistatic effects are partially confounded, as the analysis can in fact detect as a single QTL a region that has no main effect but interacts epistatically with another one (Purcell and Sham 2004). Testing only single point effects may reveal statistical additive effect that correspond to physiological epistasis: Indeed, in case of complementary epistatic interactions, no main effect should be detected, whereas in case of duplicate epistatic interactions, two apparently additive QTL could be detected. The major limit in testing two-point interactions in RIL is due to the population size, but otherwise, RIL population, with only four homozygous genotypic classes is the best situation among segregating populations to test additive x additive interactions.

In CL-RIL, interactions frequently involved regions where additive effects were already detected. Limiting the analysis to these regions reduces the number of tests performed and allows a less stringent threshold to be applied, but some important interactions may be missed, as for instance between chromosome 8 and 10, for locule number and sugar content or between markers of chromosome 6 for firmness and soluble solid content. Some of the interactions were detected between linked markers on chromosome 6 and 2. Such interactions between linked loci have already been detected in several studies (Visker *et al.* 2003; Steinmetz *et al.* 2002) and their evidence is particularly clear in fine mapping experiments (Kroymann and Mitchell-Olds 2005; Monforte and Tanksley 2000).

### **Origin of epistatic interactions**

The intensity of epistatic interactions varied according to the traits and several causes of epistasis could be proposed. In order to understand the consistency of QTL effects when they are simultaneously introgressed with other QTL, two prediction models were used to estimate the value of lines having several introgressed regions, a linear additive model and a multiplicative model. The multiplicative model fitted slightly better only for fruit weight. For the other traits, none of the models gave good predictions using QTL-NIL data, and when expected values were estimated from the additive effects assessed in the CL-RIL, the prediction did not give better results (data not shown). The presence of interactions among QTL reveals that loci epistatically control the same developmental process. It is thus important to dissect the processes underlying complex traits either through the analysis of metabolic pathway (Mc Mullen *et al.* 2001) or by ecophysiological modeling (Quilot *et al.* 2004), and search for QTL of the individual processes. This should allow choosing more efficiently QTL for gene pyramiding as one expects more epistasis between QTL corresponding to the same process. Some masking effect may also result from QTL acting successively on the same pathway. Whole genome scan and systems biology approaches reveal the importance of epistatic interactions and may further conciliate the two definitions of epistasis as shown in *Drosophila* (Anholt *et al.* 2003) or yeast (Segre *et al.* 2005).

### **Genetic control of quality traits**

Expression of genetic interactions may depend on the genetic backgrounds. For instance, in tomato, introgressions of a QTL region of chromosome 4 from three wild species showed differences in the magnitude of main effects and interactions. QTL locations were conserved across species, but they exerted additive or epistatic effect according to their origin (Monforte *et al.* 2001). We thus compared the results presented here with those obtained in the literature with other progenies (mostly advanced backcross and introgression lines), in order to compare the location of epistatic interactions with the locations of main effect QTL. Two QTL were considered to

be the same locus if they mapped to the same 20-cM region of the high density tomato map (Tanksley *et al.* 1992). Thus many QTL detected in this study (with additive or epistatic effect) corresponded to main effect QTL in other studies on tomato, confirming that QTL are consistent over species, but that some QTL may be detected as additive in one cross and epistatic in another one. Particularly many QTL detected in advanced backcross progenies exhibited apparent additive effect, as interaction can not be tested in such progeny.

For example, a set of at least 28 QTL controlling **fruit weight** variation has been identified in a synthesis of 15 studies on tomato (Grandillo *et al.* 1999). In the CL-RIL population, five QTL were mapped and two other (on  $Q_1$  and  $Q_{9a}$ ) were detected in QTL-CIL. Fruit weight QTL have already been found in all these regions, in at least two other progenies (Grandillo *et al.* 1999), except on chromosome 12. In CL-RIL, a duplicate epistatic interaction was shown between  $Q_2$  and a region of chromosome 6 where a QTL was detected by Grandillo *et al.* (1999).

For **locule number**, at least eight QTL were previously detected in four progenies (Lippman and Tanksley 2001; Van Der Knaap and Tanksley, 2003; Barrero and Tanksley, 2004), five of which being detected in at least two progenies. Interactions between QTL were detected only in certain progenies, and three new putative epistatic interactions involving five other fragments were detected in the CL-RIL.

Many biological processes control fruit **firmness**: the change of color during ripening, the ethylene synthesis partly responsible of cell wall loosening, cell adhesion and osmotic pressure modifications (Seymour *et al.* 2002). Although a few major mutations are known to influence fruit ripening and firmness (Giovannoni 2001), firmness has a low heritability and is generally quantitatively inherited. A comparison of previously mapped QTL for firmness in progenies of *S. pimpinellifolium* (Tanksley *et al.* 1996), *S. peruvianum* (Fulton *et al.* 1997), *S. neorickii* (Fulton *et al.* 2000), *S. habrochaites* (Bernacchi *et al.* 1998) and *S. pennellii* (M.C. unpublished data) revealed 28 QTL in 18 regions. Firmness had the lowest heritability and the lowest number of QTL detected in CL-RIL. QTL on chromosome 4 and 9 were already detected twice in the same regions in studies of advanced backcross progenies involving wild species. For this trait the epistatic interactions appeared much more important than additive effects in both CL-RIL and QTL-CIL. In QTL-CIL the four regions exhibited significant epistatic interactions and ten interactions were significant in the CL-RIL, among which four involved  $Q_4$  or  $Q_{9a}$ , three  $Q_2$  and one  $Q_1$ , highlighting the consistency of results in QTL-CIL and CL-RIL. Overall, 13 of the 20 loci involved in interactions corresponded to main effect QTL in another progeny.

**Soluble solid content** is mainly determined by the content in sugars and acids. Many studies have focused on the identification of QTL controlling this trait, and more than 20 QTL were mapped (Fulton *et al.* 2002; Eshed and Zamir 1995; Causse *et al.* 2004). The two additive QTL detected in the CL-RIL on chromosome 2 and 9 correspond to regions where several QTL were already detected, as well as the epistatic loci. The region  $Q_1$  detected in QTL-CIL also corresponded to a QTL for soluble solid content in Fulton *et al.* (2002). Thus for this trait, no new QTL location was shown.

QTL for **sugars** have been mapped in at least 35 regions (Fulton *et al.* 2002; Causse *et al.* 2004). All the QTL regions detected with CL-RIL and QTL-NIL have already been detected with other populations. In the CL-RIL a complex network of interactions was shown. A total of 9 interactions involved 14 regions, among which 8 corresponded to QTL regions in other studies.

**Acidity** relies on the content of citric and malic acids, for which at least 29 QTL have been detected (Fulton *et al.* 2002; Causse *et al.* 2004). All the additive QTL detected in CL-RIL or QTL-NIL have already been mapped in another progeny. Four of the 6 loci involved in interactions corresponded to QTL in other progenies. Thus, more than 30 QTL could be involved in the control of acid content.

In conclusion, we showed that most of the chromosome regions where loci control genetic variation for fruit quality traits have been already identified in one of about ten studies published. Several QTL may lay in each of these regions and only high resolution mapping experiments can resolve the number of underlying genes. The actual effect of these QTL on trait variation is strongly dependent on the genetic background and the influence of epistasis needs to be reconsidered in order to ensuring marker-assisted selection efficiency and QTL characterization. The future progresses in tomato genome sequencing (Mueller *et al.* 2005) will provide new tools to be combined with quantitative genetics for this purpose.

## Acknowledgements

Many thanks to A. Gautier for genotypic and phenotypic works, to the greenhouse experimental team for plant cultivation, to A.M. Cossalter for taking care of the plants and for her help during the phenotypic evaluations, to P. Duffé for plant genotyping, to R. Matthieu for chemical evaluations and to C. Dillmann for SAS programs. Thanks to Vilmorin for providing lines and the trial in Ledenon. Laurent Lecomte was partly supported by the Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur (France). The experiments comply with the current French laws.

## References

- Ahmadi N, Albar L, Pressoir G, Pinel A, Fargette D, Ghesquiere A (2001) Genetic basis and mapping of the resistance to Rice yellow mottle virus. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theor Appl Genet* 103:1084-1092
- Anholt RRH, Dilda CL, Chang S, Fanara JJ, Kulkarni NH, Ganguly I, Rollmann SM, Kamdar KP, Mackay TFC (2003) The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila*: epistasis and the transcriptome. *Nature Genet* 35:180-184
- Barrero LS, Tanksley SD (2004) Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theor Appl Genet* 109:669-679
- Bernacchi D, Beck-Bunn T, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD (1998) Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTL for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor Appl Genet* 97:381-397
- Brem RB, Kruglyak L (2005) The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1572-1577
- Caicedo AL, Stinchcombe JR, Olsen KM, Schmitt J, Purugganan MD (2004) Epistatic interaction between *Arabidopsis* FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15670-15675
- Calenge F, Drouet D, Denance C, Van De Weg WE, Brisset M-N, Paulin JL, Durel CE (2005) Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTL for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theor Appl Genet* 111:128-135
- Carlborg O, Haley CS (2004) Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature Rev Genet* 5:618-624
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffé P, Rousselle P, Buret M (2002) QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *J Exp Bot* 53:2089-2098
- Causse M, Duffe P, Gomez MC, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Gur A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C (2004) A Genetic map of candidate genes and QTL involved in tomato fruit size and composition. *J Exp Bot* 55:1671-85
- Charcosset A, Causse M, Moreau M, Gallais A (1995) Investigation into the effect of genetic background on QTL expression using three connected maize recombinant inbred lines (RIL) populations. In: van Ooijen JW (ed) *Biometrics in Plant Breeding: Applications of molecular markers*, pp 83-89



- Cheverud JM, Routman EJ (1996) Epistasis as a source of increased additive genetic variance at population bottlenecks. *Evolution* 50:1042-1051
- Clarke JD, Aarts N, Feys BJ, Dong XN, Parker JE (2001) Constitutive disease resistance requires EDS1 in the *Arabidopsis* mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially EDS1-dependent in *cpr5*. *Plant J* 26: 409-420
- Coaker GL, Francis DM (2004) Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor Appl Genet* 108:1047-1055
- Cockerham CC, Zeng ZB (1996) Design III with marker loci. *Genetics* 143:1437-1456
- Cordell HJ, Todd JA, Hill NJ, Lord CJ, Lyons PA, Peterson LB, Wicker LS, Clayton DG (2001) Statistical modeling of interlocus interactions in a complex disease: Rejection of the multiplicative model of epistasis in type 1 diabetes. *Genetics* 158:357-367
- Doebley J, Stec A, Gustus C (1995) Teosinte Branched 1 and the origin of maize - evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* 141:333-346
- Elena SF, Lenski RE (2001) Epistasis between new mutations and genetic background and a test of genetic canalization. *Evolution* 55:1746-1752
- Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141:1147-1162
- Eshed Y, Zamir D (1996). Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics* 143:1807-1817
- Fenster C, Galloway LF, Chao L (1997) Epistasis and its consequences for the evolution of natural populations. *Trends Ecol Evol* 12:282-286
- Fisher RA (1918) The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans Roy Soc Edinburgh* 52:399-433
- Fulton TM, Beck-Bunn T, Emmatty D, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD (1997) QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theor Appl Genet* 95:881-894
- Fulton TM, Grandillo S, Beck-Bunn T, Fridman E, Frampton A, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD (2000) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theor Appl Genet* 100:1025-1042
- Fulton TM, Bucheli P, Voirol E, Lopez J, Petiard V, Tanksley SD (2002) Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica* 127:163-177
- Giovannoni J (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 52:725-749
- Grandillo S, Ku HM, Tanksley SD (1999) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor Appl Genet* 99:978-987
- Jack T (2004) Molecular and Genetic mechanisms of floral control. *The Plant Cell* 16:S1-S17
- Jannink JL, Jansen R (2001) Mapping epistatic quantitative trait loci with one-dimensional genome searches. *Genetics* 157:445-454
- Johnson WC, Gepts P (2002) The Role of epistasis in controlling seed yield and other agronomic traits in an Andean x Mesoamerican cross of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 125:69-79
- Kabelka E, Yang WC, Francis DM (2004) Improved tomato fruit color within an inbred backcross line derived from *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum* involves the interaction of loci. *J Amer Soc Hort Sci* 129:250-257
- Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.
- Kearsey M.J, Pooni HS Syed NH (2003) Genetics of quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 91:456-464
- Keightley PD (1996) Metabolic models of selection response. *J Theor Biol* 182:311-316.
- Kroymann J, Mitchell-Olds T (2005) Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature* 435:95-98
- Kubo T, Yoshimura A (2005) Epistasis underlying female sterility detected in hybrid breakdown in a Japonica-Indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 110:346-355
- Lark KG, Chase K, Adler F, Mansur LM, Orf JH (1995) Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4656-4660
- Lecomte L, Duffé P, Buret M, Servin B, Hospital F, Causse M (2004). Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic background. *Theor Appl Genet* 109:658-668

- Li J, Brader G, Palva ET (2004) The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense *Plant Cell* 16: 319-331
- Li ZK, Luo LJ, Mei HW, Wang DL, Shu QY, Tabien R, Zhong DB, Ying CS, Stansel JW, Khush GS, Paterson AH (2001) Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. *Genetics* 158:1737-1753
- Lippman Z, Tanksley SD (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L-esculentum* var. giant heirloom. *Genetics* 158:413-422
- Liu PY, Zhu J, Lou XY, Lu Y (2003) A method for marker-assisted selection based on QTLs with epistatic effects. *Genetica* 119:75-86
- Mahmood T, Ekuere U, Yeh F, Good AG, Stringam GR (2003) RFLP linkage analysis and mapping genes controlling the fatty acid profile of *Brassica juncea* using reciprocal DH populations. *Theor Appl Genet* 107:283-290
- McMullen MD, Snook M, Lee EA, Byrne PF, Kross H, Musket TA, Houchins K, Coe EH (2001) The biological basis of epistasis between quantitative trait loci for flavone and 3-deoxyanthocyanin synthesis in maize (*Zea mays* L.) *Genome* 44:667-676
- Mei HW, Luo LJ, Ying CS, Wang YP, Yu XQ, Guo LB, Paterson AH, Li ZK (2003) Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two testcross populations *Theor Appl Genet* 107:89-101
- Monforte AJ, Tanksley SD (2000) Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theor Appl Genet* 100:471-479
- Monforte AJ, Friedman E, Zamir D, Tanksley SD (2001) Comparison of a set of allelic QTL-NILs for chromosome 4 of tomato: Deductions about natural variation and implications for germplasm utilization. *Theor Appl Genet* 102:572-590
- Monna L, Lin HX, Kojima S, Sasaki T, Yano M (2002) Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, Hd3, into two loci, Hd3a and Hd3b, controlling heading date in rice. *Theor Appl Genet* 104:772-778
- Mueller LA, Tanksley SD, Giovannoni JJ, van Eck J, Stack S, Choi D, Kim BD, Chen MS, Cheng ZK, Li CY, Ling HQ, Xue YB, Seymour G, Bishop G, Bryan G, Sharma R, Khurana J, Tyagi A, Chattopadhyay D, Singh NK, Stiekema W, Lindhout P, Jesse T, Lankhorst RK, Bouzayen M, Shibata D, Tabata S, Granell A, Botella MA, Giullano G, Frusciante L, Causse M, Zamir D (2005) The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). *Compar. Funct. Genomics* 6:153-158.
- Phillips PC (1998) The language of gene interaction *Genetics* 149:1167-1171
- Purcell S, Sham PC (2004) Epistasis in quantitative trait locus linkage analysis: Interaction or main effect? *Behavior Genetics* 34:143-152
- Quilot B, Génard M, Kervella J, Lescourret F (2004) Analysis of genotypic variations in flesh total sugar content via a modelling approach applied to peach fruit. *Theor Appl Genet* 109:440-449
- Robert VJM, West MAL, Inai S, Caines A, Arntzen L, Smith JK, St Clair DA (2001) Marker-assisted introgression of blackmold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects. *Mol Breed* 8:217-233
- Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, Philouze J, Buret M (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor Appl Genet* 102:259-272
- SAS Institute (1988) SAS users guide: statistics (SAS Institute, Ed.), Cary, North Carolina (USA)
- Segre D, DeLuna A, Church GM, Kishony R (2005) Modular epistasis in yeast metabolism. *Nature Genetics* 37: 77-83
- Seymour G, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ (2002) Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J Exp Bot* 53:2065-2071
- Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker JH, Davis RW (2002) Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* 416:326-330
- Syed NH, Chen ZJ (2005) Molecular marker genotypes, heterozygosity and genetic interactions explain heterosis in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 94:295-304
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160

- Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27:205-233.
- Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J, Beck-Bunn T (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92:213-224
- Thabuis A, Palloix A, Servin B, Daubèze AM, Signoret P, Hospital F, Lefebvre V (2004) Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. *Mol Br* 14:9-20
- Ungerer MC, Halldorsdottir SS, Modliszewski JL, Mackay TFC, Purugganan MD (2002) Quantitative trait loci for inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 160:1133-1151
- Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. *Mol Breed* 8:187-195
- Van der Knaap E, Tanksley SD (2003) The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. *Theor Appl Genet* 107:139-147
- Van der Knaap E, Lippman ZB, Tanksley SD (2002) Extremely elongated tomato fruit controlled by four quantitative trait loci with epistatic interactions. *Theor Appl Genet* 104:241-247
- Visker MHPW, Keizer LCP, Van Eck HJ, Jacobsen E, Colon LT, Struik PC (2003) Can the QTL for late blight resistance on potato chromosome 5 be attributed to foliage maturity type? *Theor. Appl. Genet.* 106:317-325
- Wade MJ, Winther RG, Agrawal AF, Goodnight CJ (2001) Alternative definitions of epistasis: dependence and interaction. *Trends Ecol Evol* 16:498-504
- Yousef GG, Juvik JA (2002) Enhancement of seedling emergence in sweet corn by marker-assisted backcrossing of beneficial QTL. *Crop Sci* 42:96-104
- Zhao JW, Meng JL (2003) Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus L.*). *Theor. Appl. Genet.* 106 (4): 759-764
- Zhao JY, Becker HC, Zhang DQ, Zhang YF, Ecker W (2005) Oil content in a European x Chinese rapeseed population: QTL with additive and epistatic effects and their genotype-environment interactions. *Crop Sci* 45:51-59

**Résumé:**

La texture est un critère essentiel dans la perception de la qualité organoleptique du fruit de tomate. Cependant, il s'agit d'un caractère complexe dont les différentes composantes (fermeté, farinosité, jutosité) sont essentiellement évaluées par analyses sensorielles. L'objectif de la thèse est d'identifier des mécanismes contrôlant les variations de texture du fruit de tomate, tant au niveau génétique que moléculaire, afin de fournir, à long terme, des outils intéressants pour assister la sélection de ces caractères dans le cadre de l'innovation variétale.

Au niveau génétique, la caractérisation des QTL de texture est abordée en cherchant à savoir comment les régions porteuses de QTL interagissent entre elles et comment le fonds génétique peut influencer l'expression de ces QTL. A l'exception de la fermeté, les effets des QTL de qualité ont été retrouvés au niveau des lignées quasi-isogéniques correspondantes dans le fonds génétique utilisé à l'origine pour la détection de QTL. Néanmoins, de fortes interactions entre QTL et fonds génétiques ont été mises en évidence ainsi qu'un effet fort de l'environnement sur l'expression de ces QTL. Parallèlement, la cartographie fine de deux régions où sont localisés des QTL associés à la texture, a été initiée. Les effets des QTL contrôlant la fermeté du fruit ont été détectés au niveau de certaines familles de recombinants et la localisation de ces QTL a été précisée.

Au niveau moléculaire, la recherche de gènes candidats dont la fonction et/ou le niveau d'expression sont associés aux variations de texture a été réalisée par des analyses du protéome et du transcriptome. Plusieurs gènes candidats ont été identifiés et la cartographie de certains d'entre eux a révélé une co-localisation avec les QTL ciblés.

**Mots-clés :** *Solanum lycopersicum*, Fruit, Qualité Organoleptique, Texture, QTL, Fonds génétiques, Interactions, Cartographie fine, Protéomique, Transcriptomique, Gène Candidat.

---

**Abstract:**

Texture is one of the critical components for the perception of tomato fruit quality. However, texture is a complex character composed of several attributes (firmness, mealiness, and juiciness) that are essentially evaluated by sensory analysis. The objective of this work is to identify mechanisms controlling texture variations of tomato fruit, at genetic and molecular levels, in order to provide tools to assist the selection of this character in the context of breeding innovation.

At a genetic level, the characterisation of QTLs for texture was assessed with the aim to understand how the regions carrying QTLs interact together and how genetic background can influence QTL expression. Except for firmness, QTL effects for quality trait were recovered in near-isogenic lines with the genetic background used for the initial QTL mapping experiment. Nevertheless, strong interactions between QTL and genetic backgrounds were observed, as well as a strong effect of environment on QTL expression. At the same time, we started the fine mapping of two regions where texture QTLs were located. QTL effects for firmness were detected for some recombinant families and the localisation of these QTLs was refined.

At a molecular level, the research of candidate genes with a function or an expression level related to texture variations was performed using proteomic and transcriptomic approaches. Several candidate genes were identified, and part of them was mapped and one co-localisation was observed.

**Keywords :** *Solanum lycopersicum*, Fruit, Organoleptic Quality, Texture, QTL, Genetic Background, Interactions, Fine Mapping, Proteomic, Transcriptomic, Candidate Gene.