

THESE DE DOCTORAT

Etude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la remontée florale chez le fraisier

Ecole doctorale des Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie végétale

Université de Bordeaux 1&2

Soutenue le 17 décembre 2010

par **Amèlia GASTON**

Devant le jury constitué de :

Mme Anne-Marie CHEVRE, Directrice de Recherche, INRA Rennes

Rapporteur

Mme Bernadette JULIER, Directrice de Recherche, INRA Lusignan

Rapporteur

M. Fabrice FOUCHER, Chargé de Recherche, INRA Angers

Examineur

M. Michel HERNOULD, Professeur, Université de Bordeaux

Président

M. Laurent TORREGROSA, Professeur, SupAgro Montpellier

Examineur

Directrice de thèse :

Mme Béatrice DENOYES-ROTHAN, Ingénieur de Recherche, INRA Bordeaux

Remerciements

Ce manuscrit marque la fin de mes trois années de thèse passées au sein de l'Unité de Recherche sur les Espèces Fruitières à l'INRA de Bordeaux. Bien plus qu'une formation de recherche, cette thèse aura également été une fabuleuse aventure humaine. Ainsi, je tiens à exprimer toute ma gratitude aux nombreuses personnes qui ont rendu ce projet possible.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Béatrice Denoyes-Rothan, de m'avoir fait confiance en me donnant la possibilité de travailler sur ce passionnant sujet. Merci pour tous tes conseils, tous nos échanges et les 'brainstorming' passionnants que nous avons pu partager. Merci pour cet enthousiasme et ce dynamisme communicatifs que tu mets dans ton travail. Enfin, ce fût un plaisir de travailler avec toi tant pour tes qualités professionnelles qu'humaines.

Un grand merci à notre duo de choc et de charme Béatrice Denoyes-Rothan et Teresa Barreneche en charge de la direction d'unité de m'avoir accordé tous les moyens matériels nécessaires pour assurer ce travail.

Je remercie vivement Michel Hernould pour tous ses judicieux conseils et toutes nos discussions. Votre vision 'physiologiste' a permis une ouverture du sujet vers de nouvelles perspectives.

Je tiens à remercier également Fabrice Foucher et Laurence Hibrand Saint-Oyant de l'UMR GenHort d'Angers pour notre fructueuse collaboration. Différentes idées sont nées ou ont pris forme suite à nos nombreuses discussions. Merci de m'avoir accueillie à Angers et merci à Ruxandra de m'avoir initiée aux joies de la transformation du fraisier diploïde.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Anne-Marie Chèvre, Bernadette Julier, Fabrice Foucher, Michel Hernould et Laurent Torregrossa pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier mon tuteur de thèse, Philippe Gallusci et les membres de mon comité de thèse Marie-Noëlle Démené, Fabrice Foucher, Jean-Marc Gion, Michel Hernould, Catherine Rameau et Christophe Rothan pour m'avoir fait bénéficier de leurs précieux conseils.

Je remercie chaleureusement Aurélie Petit, ingénieur Ciref (Création Variétale Fraises Fruits rouges) détachée à l'INRA. Tout d'abord, merci de m'avoir apporté une vision 'appliquée' de ma recherche. Ensuite, merci pour ton aide précieuse et ton soutien tout au long de la thèse et jusqu'à l'envoi des manuscrits... Enfin, j'ai beaucoup apprécié nos délires, nos 'débriefes' d'après 19h, ta joie de vivre, ton humour (parfois malgré toi...).

Je tiens également à remercier les autres membres du Ciref, et notamment, le directeur, Pierre Gaillard, et le sélectionneur, Philippe Chartier, de m'avoir fait découvrir le monde fraisicole.

Je remercie Marie-Noëlle Démené et Karine Guy d'Invenio d'avoir eu la patience de collecter tous ces méristèmes et de m'avoir initiée à l'architecture florale d'un plant de fraisier.

Un grand merci aux différents stagiaires qui ont participé activement à ce sujet de thèse : David Alletru (Licence professionnelle), Michael Lissare (Master 1), Laetitia Riva-Roveda (Master 2) et Enric Zehraoui (Licence professionnelle). Un merci tout particulier à Laetitia Aprosio (Master 2) que j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant six mois pour s'être autant passionnée pour ses petits fraisiers et pour ses fameux petits sablés maison. Je leur souhaite à tous une belle réussite personnelle et professionnelle.

Pendant ces trois années, j'ai eu le grand plaisir de travailler au sein de l'équipe 'fraise' dont je tiens à remercier chaque membre. D'abord, un grand merci au jeune retraité Daniel Rocca, à Nicole Pedepat et à Alain Bonnet pour s'être occupé avec tant de soin de mes petits plants en serre. Un grand merci également à Sadia Schafleitner pour son aide pour la culture in vitro, pour les litres de milieu préparés, pour toutes les notations phénotypiques et sa grande curiosité... Ensuite, une immense pensée pour notre grand maître de la 'Bad Fragaria Team' : Mathieu Rousseau-Gueutin qui vit désormais de belles aventures au pays des kangourous. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir guidé mes premiers pas à l'UREF. Merci à Laurent Richard (même si tu travailles sur la châtaigne en ce moment, tu fais partie à jamais de la 'Bad Fragaria Team') pour tous ses conseils de technicien expert en biologie moléculaire. Merci à Aniko Horvath pour m'avoir initiée aux joies des études de diversité à travers l'utilisation de certains logiciels tels que Structure et Darwin. Un grand merci à Mathieu Fouché, camarade de promo de Master 1, que j'ai eu le plaisir de retrouver cette année dans l'équipe fraise. Merci à Yasmin Zorilla-Fontanesi qui a passé quelques mois parmi nous lors de sa thèse pour m'avoir avancé quelques manips et pour nos nombreuses discussions qui ont permis d'améliorer mon anglais et mes notions d'espagnol. Je remercie également les différents stagiaires qui sont passés dans l'équipe pour leur 'fraicheur' et leur bonne humeur : Audrey, Cyril, Rémi, David et Karine. Enfin, je souhaite bon courage à la nouvelle recrue, Justine Perrotte, pour ses trois prochaines années de thèse.

Je tiens à remercier les membres de l'UMR Biologie du Fruit pour toutes les manips que j'ai eu besoin de faire chez eux, 'en face'. Un immense merci à Christophe Rothan pour ses précieux conseils tout au long de la thèse. Un grand merci à Thomas Guiraud pour m'avoir montré tous les secrets de la construction de vecteurs de transformation. Un grand merci également à Frédéric Delmas pour m'avoir chaperonnée lors de mes premières manips de transformation du fraisier et pour m'avoir laissé 'coloniser' la chambre de culture avec mes fraisiers. Merci à Elodie Mathieu-Rivet de m'avoir initiée à la qRT-PCR.

Un immense merci à Teresa Barreneche pour ses conseils, ses encouragements, sa gentillesse, son soutien, son esprit pétillant et tout le reste...

Je tiens à remercier Jean-Luc Renoux d'avoir toujours trouvé rapidement des solutions à mes problèmes informatiques, et en particulier, lorsque le jour de rendre mon manuscrit, le document Word est impossible à ouvrir...

Merci à Dominique Calvi et Chantal Mounier pour avoir si souvent rattrapé mes défaillances administratives. Merci pour votre patience et votre disponibilité.

Merci à notre bio-informaticien, Loïck Le Dantec. Je ne désespère pas que tu nous trouves un jour la meilleure solution pour disposer rapidement de tous les allèles d'une espèce octoploïde...

Merci aux différents membres de l'unité pour tous les échanges, les discussions de couloir et les distributions de cerises, pêches, noix, châtaignes et bonbons : Emilie Balsemin, Hélène Christmann, Patrick Reynet, Georges Manzano, Jean-Claude Barbot, Jose Quero-Garcia, Yves Tauzin, Jacques Joly, Lydie Fouilhaux, Elisabeth Dirlewanger, Karima Boudheri, Gaëlle Capdeville, Maria Lafargue, René Franzini, Jean-Philippe Eyquart, Marc Kleinhentz, Bernard Lafargue et Michelle Gaborit.

Merci pour tous ces bons moments partagés à la pause café avec Miss Charlotte, Béatrice, Térésa, Emilie, Hélène, Laurent, Aniko, Mathieu, Jean-Luc, Daniel, Nabil, Laurence, Elisabeth...

Un immense merci à Nabil Girollet, mon 'co-voitureur' préféré, pour avoir rendu les trajets quotidiens Langon – Bordeaux bien plus sympas ! Merci pour ta bonne humeur et tous les fous-rires partagés !

Je remercie chaleureusement toutes ces personnes qui me soutiennent et auprès de qui je me ressource et puise mon énergie. Un immense merci à Elodie, Vivien, Géraldine et Antoine pour tous vos encouragements, votre soutien quotidien et votre précieuse amitié. Un grand merci aux copains du 47, Vidou, Elodie, Séb, Nadège, David, Marion, Denis et Momo, sur qui je peux toujours compter pour me faire déconnecter du boulot en moins de 5 minutes. Merci au NBG, fournisseur officiel d'amies d'exception : Titi, Mamour, Képhanie et Angèle. Merci à la famille Salinier d'être toujours présente pour partager les moments importants. Merci à Almée et Jean-Marie pour leur soutien.

Un immense merci à mon frère, Guilhèm, d'abord pour son soutien, ensuite, pour m'assurer une assistance installation et dépannage informatique 7 jours sur 7 et 24 heures sur 24, et enfin pour m'avoir hébergée et déposée à la gare ou à l'aéroport lorsque je partais en déplacement très tôt le matin.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes parents pour m'avoir apporté l'aide, le soutien, l'affection et l'énergie dont j'avais besoin pour mener à terme ce travail.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon mari, Jean-Christophe, pour la patience et la compréhension dont il a fait preuve. Je n'en serais jamais arrivée jusque là sans ta présence et ton soutien.

Sommaire

Liste des abréviations.....	3
Introduction générale.....	7
Chapitre I : Synthèse bibliographique	13
I. La floraison	13
I.1. Du développement végétatif vers le développement reproducteur	13
I.2. Les différentes stratégies de cycle de vie : plantes monocarpiques vs polycarpiques.	15
I.3. Le contrôle génétique de la transition florale chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
I.3.1. Modèle d'étude : <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
I.3.2. Les répresseurs de la floraison	19
I.3.3. Les voies de signalisation de la floraison chez <i>A. thaliana</i>	23
I.3.4. Les intégrateurs floraux.....	31
I.3.5. Les gènes d'identité du méristème floral	33
I.4. Le contrôle génétique de la transition florale chez d'autres angiospermes.....	35
I.5. Le rôle clef des gènes de la famille PEBP dans la transition florale.....	39
II. Le fraisier	43
II.1. Histoire des fraisiers.....	43
II.1.1. Domestication des espèces du vieux monde	43
II.1.2. Domestication de <i>F. virginiana</i> et <i>F. chiloensis</i>	43
II.1.3. Origine du fraisier cultivé octoploïde, <i>F. x ananassa</i>	45
II.2. Le contexte économique : le marché de la fraise	45
II.3. Le genre <i>Fragaria</i>	47
II.4. Spécificité d'une espèce polyploïde.....	47
II.4.1. La polyploïdie	47
II.4.2. Cartographie génétique d'une espèce polyploïde : exemple du fraisier cultivé octoploïde	53
II.4.3. Le fraisier diploïde modèle génétique pour l'étude du fraisier octoploïde ..	57
II.5. Cycle de vie du fraisier : entre reproduction sexuée et multiplication végétative	61
II.5.1. Biologie du fraisier.....	61
II.5.2. Multiplication végétative par la production de stolons	61
II.5.3. La floraison	63
II.6. Contrôle génétique de la remontée florale et de la production de stolons chez <i>Fragaria</i>	71
II.6.1. Chez le fraisier diploïde	73
II.6.2. Chez le fraisier octoploïde.....	73
III. Démarche scientifique.....	75

Chapitre II : Matériel et Méthodes	79
I. Matériel	79
I.1. Matériel végétal.....	79
I.1.1. Matériel diploïde	79
I.1.2. Matériel octoploïde	81
I.2. Souches bactériennes.....	83
I.3. Vecteurs de clonage	83
II. Caractérisation phénotypique des populations en ségrégation.....	85
II.1. Caractérisation phénotypique des populations en ségrégation diploïdes	85
II.1.1. Population de cartographie Fv x Fb	85
II.1.2. Population de cartographie Ilaria-1	85
II.1.3. Collection des ressources génétiques de <i>F. vesca</i>	85
II.2. Caractérisation phénotypique des populations en ségrégation octoploïdes	85
II.2.1. Caractères phénotypiques observés.....	85
II.2.2. Test du biais entraîné par la coupe des hampes florales sur la floraison	87
II.2.3. Analyse du caractère ‘remontée florale’ de manière mendélienne	87
III. Analyses moléculaires.....	89
III.1. Extraction d’ADN	89
III.2. Développement des amorces.....	89
III.3. Amplification génique par PCR	89
III.4. Clonage moléculaire.....	91
III.4.1. Isolement des homéoallèles.....	91
III.4.2. Préparation des vecteurs de transformation	93
III.5. Séquençage de l’ADN.....	95
IV. Analyses génétiques	95
IV.1. La cartographie génétique	95
IV.1.1. Les marqueurs moléculaires.....	95
IV.1.2. La cartographie génétique chez le fraisier diploïde	99
IV.1.3. La cartographie génétique chez le fraisier octoploïde.....	103
IV.2. Détection de régions impliquées dans un caractère quantitatif (QTL).....	109
IV.2.1. Analyses statistiques des données de phénotypage.....	111
IV.2.2. Détection et cartographie de QTL.....	111
IV.3. Analyse d’association et étude de diversité.....	113
IV.3.1. Analyse d’association.....	113
IV.3.2. Etude de diversité	113
V. Transgénèse.....	115
V.1. Constructions des vecteurs de transformation.....	115
V.1.1. Constructions 35S:: <i>KSN</i> et 35S:: <i>ksn</i> par la technologie Gateway®.....	117
V.1.2. Constructions <i>KSN</i> :: <i>KSN</i> et <i>ksn</i> :: <i>ksn</i> par la technique ‘classique’	119
V.2. Transformation génétique du matériel végétal.....	121
V.2.1. Désinfection du matériel végétal.....	121
V.2.2. Mise en culture d’ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	123

V.2.3.	Infection des explants par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	123
V.2.4.	Co-culture.....	123
V.2.5.	Lavages.....	125
V.2.6.	Régénération des explants.....	125
V.2.7.	Sélection des explants transformés	125

Chapitre III : Résultats 129

I.	Etude du déterminisme génétique de la remontée florale	129
I.1.	Different genetic keys depending on the ploidy level control recurrent flowering, an agronomical interest trait, in strawberry.....	129
I.2.	Vers une précision de la position du QTL majeur	149
I.2.1.	Développement de nouveaux marqueurs pour enrichir le HGIV femelle..	149
I.2.2.	Développement d'une nouvelle approche pour enrichir spécifiquement le groupe de liaison IVb	151
I.2.3.	Cartographie fine du QTL	155
I.3.	Recherche du QTL majeur dans un autre fond génétique.....	159
I.3.1.	Cartographie de la population Mara des Bois x Pajaro.....	159
I.3.2.	Détection de QTL chez la population de cartographie Mara des Bois x Pajaro	161
I.3.3.	Cartographie comparée des QTL détectés entre les deux populations de cartographie octoploïdes	165
II.	Déterminisme moléculaire de la remontée florale	167
II.1.	Déterminisme moléculaire de la remontée florale chez le fraisier diploïde.....	167
II.1.1.	Identification et isolation de gènes candidats à la floraison chez le fraisier diploïde	167
II.1.2.	The genetic key to continuous flowering in rose and strawberry is the <i>TFLI</i> homologue <i>KSN</i>	169
II.2.	Déterminisme moléculaire de la remontée florale chez le fraisier octoploïde...	195
II.2.1.	Cartographie de gènes candidats sur la carte de liaison génétique octoploïde de référence	195
II.2.2.	Comparaison entre la carte physique et la carte génétique au niveau de la région d'intérêt IVb.....	197
II.2.3.	Clonage du gène <i>FT</i>	197
III.	Vers la validation fonctionnelle du gène candidat chez le fraisier diploïde.....	199
III.1.	Construction des vecteurs de transformation génétique.....	199
III.1.1.	Constructions <i>35S::KSN</i> et <i>35S::ksn</i> par la technologie de Gateway® (Invitrogen).....	199
III.1.2.	Constructions <i>KSN::KSN</i> et <i>ksn::ksn</i>	201
III.2.	Transformation et régénération des explants de fraisiers.....	203
III.2.1.	Explants témoins	203
III.2.2.	Explants transformés	205

Chapitre IV : Discussion et conclusion.....	209
I. Le déterminisme génétique de la remontée florale chez le fraisier octoploïde.....	209
I.1. Mise en place d'une stratégie pour enrichir spécifiquement un groupe de liaison d'intérêt chez une espèce octoploïde.....	209
I.2. Un verrou génétique différent entre fraisiers diploïde et octoploïde pour un même caractère	209
I.3. Détection d'un QTL majeur lié à la remontée florale chez le fraisier octoploïde....	213
I.3.2. Une même introgression dans deux fonds génétiques différents ?	217
I.3.3. Remontée florale, date de floraison et hauteur du plant.....	219
I.4. Détection d'une région impliquée dans la croissance végétative et reproductive....	219
II. Le déterminisme moléculaire de la 'remontée florale' chez les fraisiers diploïde et octoploïde.....	223
II.1. Le gène <i>KSN</i> , homologue à <i>TFL1</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> , est responsable de la 'remontée florale' chez le fraisier diploïde	223
II.1.1. Contexte de l'étude du gène <i>FvKSN</i>	223
II.1.1. Influence de la population ou de l'âge de la plante sur l'expression du gène de remontée florale.....	223
II.1.2. Le gène <i>KSN</i> , homologue du répresseur floral <i>TFL1</i> chez <i>A. thaliana</i>	225
II.2. Le gène <i>FvFT</i> , homologue à l'activateur floral <i>FT</i> chez <i>A. thalianas</i> , se localise dans la région d'intérêt chez le fraisier octoploïde	227
III. Validation fonctionnelle du gène <i>FvKSN</i> par transgénèse	229
IV. Discussion générale, conclusion et perspectives.....	233
IV.1. Stratégie utilisée pour isoler les gènes impliqués dans la floraison chez le fraisier.	233
IV.2. Modèle des mécanismes moléculaires responsables de la 'remontée florale' chez le fraisier.....	233
IV.3. Conclusion et perspectives	235
Bibliographie	241
Annexes	259

Liste des abréviations

Gènes

AG : Agamous	LD : Luminidependens
AGL : Agalous Like	LF : Late Flowering
AP1 à 3 : Apetala 1 à 3	LFY : Leafy
ATC : Arabidopsis Thaliana relative of Centroradialis	LHY : Late Elongated Hypocotyl
BFT : Brother Of FT	MAF1 à 5 : MADS Affecting Flowering 1 à 5
BvFL1 : Beta vulgaris FLC-like 1	MFT : Mother Of FT
CAL : Cauliflower	PHY : Phytochrome
CCA1 : Circadien Clock Associated 1	PI : Pistillata
CEN : Centroradialis	R : Runnering
CO : Constans	RG : Repressor of Gibberellic Acid
CRY1 et 2 : Cryptochrome 1 et 2	SEP1 à 4 : Sepallata 1 à 4
DET : Determinate	SFL : Seasonal Flowering Locus
EMF : Embryonic Flower	SFT : Single Flower Truss
FD : Flowering Locus D (intervenant en aval de FT)	SLY : Sleepy
FLC : Flowering locus C	SOC1 : Suppressor of Overexpression of Constans 1
FLD : Flowering Locus D (intervenant dans la voie autonome)	SP : Self Pruning
FLK : Flowering Locus K	SPY : Spindly
FRI : Frigida	STK : Seedstick
FT : Flowering Locus T	TFL1 : Terminal Flower 1
FUL : Fruitfull	TOC1 : Timing Of CAB expression 1
GAI : Gibberellic Acid Insensitive	TSF : Twin Sister of FT
GID1 : GA Insensitive Dwarf 1	VRN1 à 3 : Vernalization 1 à 3
KSN : Koushin bara (Rosa chinensis en Japonais)	ZFL1 à 2 : Zea Mays Floricaula/Leafy

Autres :

° : degré

μ : micro

A. : *Agrobacterium*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

AIB : acide indole-acétique, auxine

ANOVA : analysis of variance, analyse de variance

ARN : acide ribonucléique

BLAST : Basic Local Alignment Searching Tool

blastn : Basic Local Alignment Searching Tool nucleotide

C : Celsius

c : couplage

Cf. : confer

CF : continuous flowering

CIM : composite interval mapping, cartographie par intervalle composite

Cl₂ : chlorure

cM : centiMorgan

cr : couplage-répulsion

CRA : Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura

DN : day neutral

dNTP : désoxynucléotides tri-phosphate

DO : densité optique

Duch. : Duchesne

E. : *Escherichia*

EMR : East Malling Research

EST : Expressed Sequence Tag

et al. : et alii

F : carte de liaison génétique femelle

F. : *Fragaria*

f. : forma

FAO : Food and Agriculture Organization

Fb : *Fragaria bucharica*

Fv : *Fragaria vesca*

g : gramme

g : force d'attraction gravitationnelle, accélération de la gravité

GA : gibberellic acid

GC : guanine-cytosine

GDR : Genome Database for Rosaceae

h : heure

H² : effet (positif ou négatif) d'une région génomique sur un caractère phénotypique

H² : héritabilité

HG : homoeology group, groupe d'homéologie

hpl : hauteur du plant

i.e. : id est

IF : induction florale

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

L : litre

L. : Linné

LB : milieu de culture 'Lysogeny Broth', de Luria Bertani ou de Luria Broth

LD : long day

LG : linkage group, groupe de liaison

LOD : logarithm of the odds

LR : linear regression, régression linéaire

m : mètre

m : milli

M : molaire, en g/mol

M : carte de liaison génétique mâle

Mb : mégabase

Mg : magnésium

min : minute
mol : mole
MS : milieu de culture de Murashige et Skoog
N : nord
n : nano
N= : nombre d'individus
NCBI : National Center for Biotechnology Information
ND : nulli dose
OF : once flowering
p : plasmide
P : valeur p en statistiques, probabilité que l'hypothèse nulle soit vraie
pb : paire de bases
PCR : polymerase chain reaction
PEBP : Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein
Pn : Populus nigra
QTL : quantitative trait loci
r : répulsion
R² : coefficient de détermination
rem : nombre de hampes florales en juillet
RU : runnering
s : seconde

SAS : Statistical Analysis System, système d'analyses statistiques
SD : short day
SD : simple dose
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOC : milieu de culture 'Super Optimal broth with Catabolite repression'
SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism
ssp. : subspecie
SSR : Simple Sequence Repeat
sto : nombre de stolons
subsp. : subspecie
TAIR : The Arabidopsis Information Resource
Taq : Thermus aquaticus
T-DNA : transfer deoxyribonucleic acid
U : unité
USA : United States of America
USDA : United States Department of Agriculture
UV-A : ultraviolet A
vs. : versus
Vv : Vitis vinifera
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

Introduction générale

Introduction générale

La floraison, transition entre l'état végétatif et l'état reproducteur d'une plante, est un évènement clef dans la vie d'une plante. Chez les plantes monocarpiques annuelles, comme *Arabidopsis thaliana*, la transition florale ne se déroule qu'une fois et conditionne la survie de la plante par la production de graines. Les plantes polycarpiques pérennes présentent une alternance entre les phases végétatives et reproductives permettant une floraison et une fructification à plusieurs reprises au cours de leur existence. La transition florale a été largement étudiée chez le modèle *A. thaliana* et a révélé un réseau génique complexe intégrant des signaux endogènes et environnementaux. Les acteurs principaux de la floraison ont été également identifiés chez de nombreuses espèces monocarpiques et polycarpiques telles que les grandes cultures céréalières, la vigne, la tomate ou le peuplier. Cependant, le contrôle de l'alternance entre les phases végétatives et reproductives chez les plantes polycarpiques reste encore mal connu.

Le fraisier (*Fragaria*), plante polycarpique pérenne, présente deux modes de floraison : les génotypes remontants présentent une floraison continue tout au long de la période végétative alors que les génotypes non-remontants ne fleurissent qu'une fois, au printemps. Le caractère 'remontée florale' traduit une modification dans l'équilibre de l'alternance entre les phases végétatives et reproductives. Ce caractère original est spécifique aux plantes pérennes et d'un grand intérêt économique. Ce caractère est présent chez le fraisier des bois diploïde, *Fragaria vesca* ($2n=2x=14$) comme chez le fraisier cultivé octoploïde, *Fragaria x ananassa*, ($2n=8x=56$) présentent ces deux modes de floraison.

Le contrôle génétique du caractère 'remontée florale' chez les fraisiers diploïde et octoploïde a fait l'objet d'études antérieures : pour le fraisier diploïde, un locus majeur situé sur le groupe de liaison VI (SFL, Seasonal Flowering Locus) contrôle la remontée florale (Brown and Wareing, 1965), alors que, pour le fraisier octoploïde, différentes études ont montré des résultats contradictoires allant d'un contrôle monogénique à polygénique. Quant aux mécanismes moléculaires à l'origine de la 'remontée florale', ils restent inconnus.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les déterminismes génétique et moléculaire de la remontée florale chez les fraisiers diploïde et octoploïde. Cet objectif se décline en trois questions scientifiques :

(1) Quelles sont les régions du génome impliquées dans la variation du caractère 'remontée florale' et ces régions sont-elles orthologues entre les fraisiers diploïde et octoploïde ?

(2) En se basant sur l'hypothèse que les acteurs de la floraison décrits chez les plantes modèles sont les mêmes chez le fraisier, peut-on identifier des gènes candidats à la floraison co-localisant avec les régions impliquées dans la remontée florale chez *Fragaria* à partir de ceux connus chez les espèces modèles telles que *Arabidopsis thaliana* ?

(3) Est-ce que ces gènes candidats co-localisant avec les QTL de remontée florale sont bien impliqués dans la variation du caractère ?

Ce manuscrit est organisé de la façon suivante :

Le premier chapitre comprend une synthèse bibliographique scindée en deux parties : une première partie sur la floraison, et en particulier, sur les principaux acteurs impliqués dans la signalisation de la floraison, et une seconde partie présentant l'espèce étudiée : le fraisier.

Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes nécessaires aux différentes approches utilisées pour répondre aux questions scientifiques posées.

Le troisième chapitre est divisé en trois parties qui correspondent aux résultats obtenus pour chacune des questions scientifiques posées :

(1) Pour l'étude du déterminisme génétique de la remontée florale chez le fraisier cultivé, un article intitulé "Different genetic keys depending on the ploidy level control recurrent flowering, an agronomical interest trait, in strawberry" (en fin de rédaction) puis les résultats complémentaires sont présentés.

(2) Pour l'étude du déterminisme moléculaire de la remontée florale, la partie concernant le fraisier diploïde est développée sous forme d'un article intitulé "The genetic key to continuous flowering in rose and strawberry is the TFL1 homologue" (soumis). Les résultats pour le fraisier octoploïde sont présentés ensuite.

(3) La troisième partie présente les résultats préliminaires obtenus pour la validation fonctionnelle du gène candidat chez le fraisier diploïde.

L'ensemble des résultats obtenus offre un large champ de recherche qui fait l'objet d'une discussion dans un quatrième chapitre. Une conclusion et les nombreuses perspectives offertes par ce travail sont présentées dans ce dernier chapitre.

Synthèse bibliographique

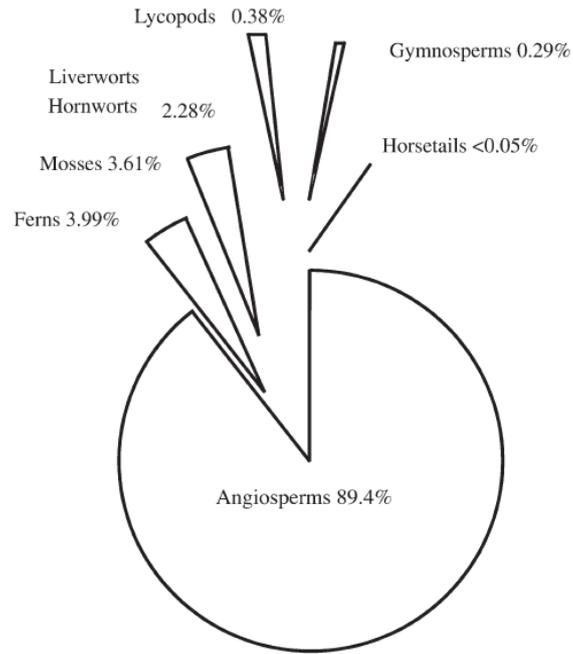


Figure 1 : Répartition en pourcentage des espèces existantes affectées à différents groupes de plantes embryophyte (Crepet and Niklas, 2009)

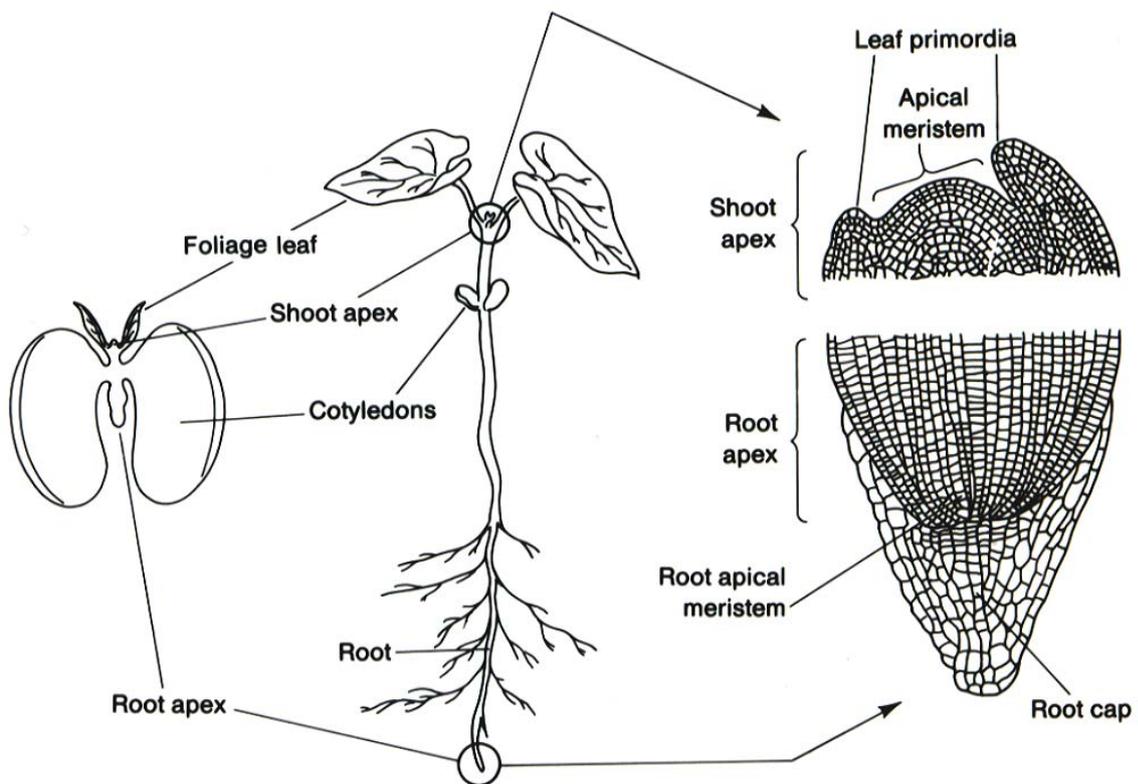


Figure 2 : Le méristème racinaire et le méristème apical (Sussex, 1989).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. La floraison

La floraison marque la transition entre l'état végétatif et l'état reproducteur d'une plante. Elle constitue une étape primordiale dans le processus de reproduction sexuée chez les plantes à fleurs ou angiospermes par la mise en place des organes reproducteurs de la plante (Crepet and Niklas, 2009). La floraison constituerait un avantage biologique compte tenu de la prévalence des angiospermes qui représentent le groupe le plus important (Figure 1) et le plus diversifié du règne végétal avec ses 250000 membres connus (Krizek and Fletcher, 2005).

Le succès de la reproduction sexuée, correspondant au développement des fleurs et des fruits, dépend d'une floraison au moment adéquat, c'est-à-dire, au moment favorisant la pollinisation entre individus d'une même espèce et aux conditions favorisant le développement du fruit et de la graine (Simpson and Dean, 2002; Putterill et al., 2004).

Au cours de la floraison, la transition florale est un événement clef, hautement contrôlé qui nécessite l'intégration de différents signaux environnementaux avec des repères physiologiques endogènes (Tremblay and Colasanti, 2007).

Chez les plantes cultivées, ce caractère clef est sélectionné pour produire des variétés mieux adaptées à leur environnement. Il s'agit de sélectionner des variétés présentant une forte plasticité leur apportant une capacité d'adaptation aux changements climatiques, par exemple (Jung and Muller, 2009).

I.1. Du développement végétatif vers le développement reproducteur

Le développement végétatif est un processus continu. Dans l'embryon, le plan d'organisation général de la plante est établi par le méristème apical et le méristème racinaire (Figure 2). Les méristèmes sont des pools de cellules souches totipotentes capables d'initier tous les organes de la plante (Smith et al., 2004). Le méristème apical est à l'origine de toutes les parties aériennes de la plante, la tige et les feuilles alors que le méristème racinaire permet la mise en place du système racinaire, généralement souterrain.

La période pendant laquelle le méristème apical végétatif peut produire des organes végétatifs est variable d'une espèce à une autre. Cette phase juvénile permet à la plante d'accumuler suffisamment de réserves pour assurer le développement floral et la production de graines (Simpson and Dean, 2002). Pour ce faire, le méristème apical végétatif va passer de son état incompetent ou juvénile, incapable de percevoir des signaux d'induction florale, à un état compétent, où il est capable d'interpréter des signaux d'induction florale (Poethig, 1990; Lawson and Poethig, 1995). L'acquisition des compétences à la reproduction est souvent marquée par des changements de morphologie et de physiologie du méristème apical végétatif (Levy and Dean, 1998b).

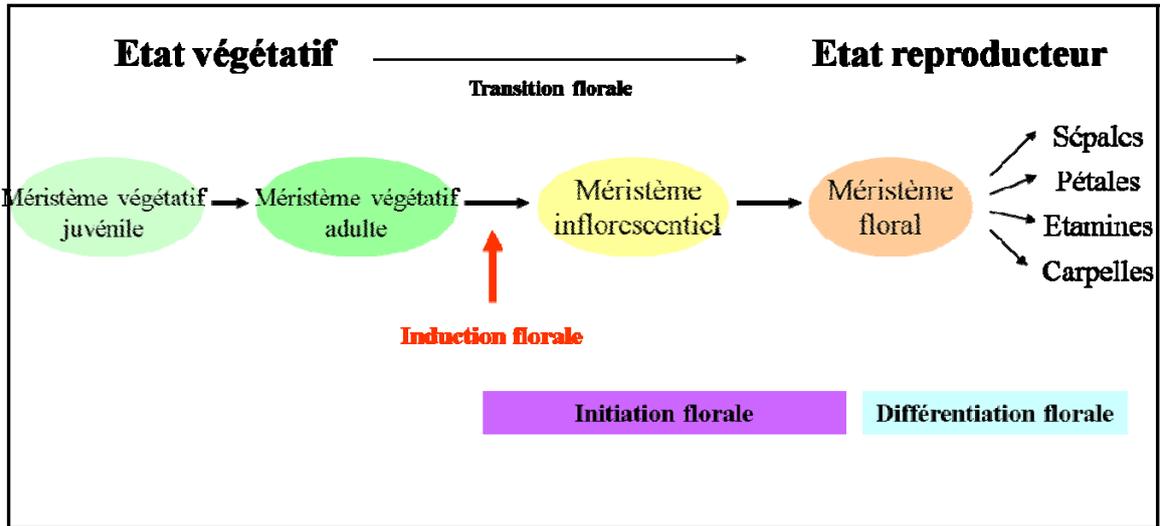


Figure 3 : Représentation schématique des différents stades successifs du méristème apical lors de la transition de l'état végétatif à l'état reproducteur d'une plante.

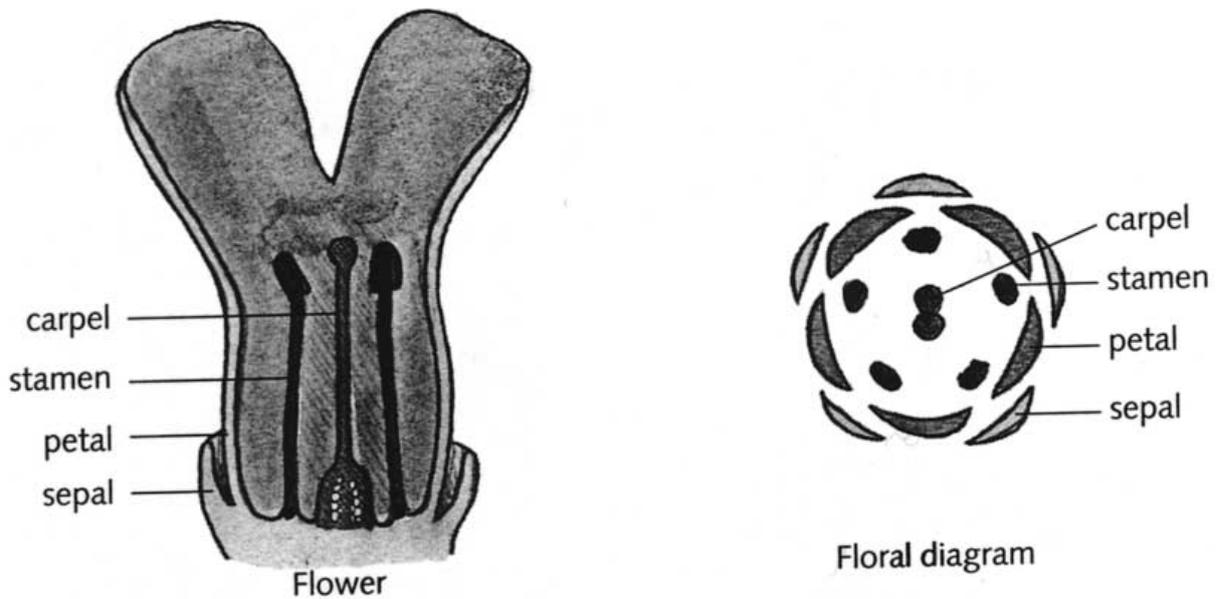


Figure 4 : Coupe d'une fleur typique (à gauche) montrant organes disposées en verticilles concentriques de sépalcs, pétales, étamines et des carpelles. La disposition générale est représentée sous forme de diagramme sur la droite (Coen, 2001).

Lorsque le méristème apical est devenu compétent à la floraison, les signaux inducteurs de floraison générés par des stimuli externes ou internes peuvent induire la transition florale. Ces signaux contrôlent l'induction florale pour qu'elle coïncide avec les conditions favorisant la production de graines et de fruits et pour coordonner la date de floraison entre les individus de la même espèce (Putterill et al., 2004). Suite à l'induction florale, le méristème apical végétatif se transforme en méristème inflorescentiel puis floral lors de la phase de l'initiation florale (Figure 3).

Lors de la différenciation florale, le méristème floral produit les organes floraux. La majorité des fleurs est composée de quatre types d'organes floraux distincts (Figure 4) organisés en cercles concentriques appelés verticilles (Krizek and Fletcher, 2005). De l'extérieur vers l'intérieur de la fleur, se trouvent le premier correspondant au calice composé de l'ensemble des sépales ; le deuxième verticille correspondant à la corolle formée par l'ensemble des pétales ; le troisième verticille correspondant à l'androcée, l'organe reproducteur mâle, composé de l'ensemble des étamines et le quatrième verticille, correspondant au gynécée ou pistil, l'organe reproducteur femelle, composé de l'ensemble des carpelles.

I.2. Les différentes stratégies de cycle de vie : plantes monocarpiques vs polycarpiques.

Parmi les angiospermes, différentes stratégies de cycle de vie ont été adoptées pour survivre : monocarpique vs. polycarpique (Amasino, 2009).

Une plante monocarpique est une plante qui ne fleurit et ne fructifie qu'une seule fois dans son cycle de vie. L'ensemble des méristèmes végétatifs deviennent des méristèmes inflorescentiels et produisent des fleurs. Au contraire, les plantes polycarpiques fleurissent et fructifient plusieurs fois au cours de leur existence. Les plantes polycarpiques doivent maintenir un pool de méristèmes végétatifs capables de croissance végétative. Leur développement résulte d'une balance entre développement végétatif et reproductif.

Les plantes annuelles accomplissent leur cycle de vie en un an et n'initient leur floraison qu'une fois alors que les plantes pérennes vivent plusieurs années. Les plantes monocarpiques regroupent souvent des plantes annuelles, bisannuelles ou pluriannuelles alors que les plantes polycarpiques correspondent à des plantes pérennes.

I.3. Le contrôle génétique de la transition florale chez *Arabidopsis thaliana*

Pour l'accomplissement de la reproduction sexuée, les plantes ont mis en place des mécanismes de régulations complexes pour assurer une floraison optimale au moment opportun. La coordination de ces mécanismes de régulation nécessite l'intégration de différents signaux environnementaux avec des repères physiologiques endogènes.

Les avancées récentes sur la compréhension des mécanismes régissant la floraison ont été obtenues grâce à l'utilisation de techniques de génétique moléculaire sur des plantes annuelles (Tan and Swain, 2006). Les études les plus avancées sur le contrôle génétique de la transition florale ont été menées sur la plante modèle, *Arabidopsis thaliana* (Levy and Dean, 1998a).

I.3.1. Modèle d'étude : *Arabidopsis thaliana*

L'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* ou Arabette des Dames est une angiosperme de petite taille appartenant à la famille des Brassicacées. Son génome diploïde de petite taille (125 Mb) est séquencé depuis 2000 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). C'est une espèce autogame, annuelle avec un cycle reproductif court de moins de 2 mois. Sa floraison est photodépendante. En effet, elle fleurit plus tôt en jours longs qu'en jours courts, ce qui la classe parmi les plantes de jours longs facultatives. Elle se transforme facilement, ce qui en fait un modèle intéressant pour les études de fonction de gène avec des stratégies de perte ou de gain de fonction. Enfin, de nombreuses ressources génétiques, génomiques, moléculaires et des mutants sont disponibles sur les bases de données (TAIR: The Arabidopsis Information Resources www.arabidopsis.org).

La variation génétique naturelle pour la date de floraison entre des accessions d'*A. thaliana* collectées dans différentes parties du monde (écotypes) ont permis de cartographier et d'isoler des régions du génome qui contrôlent ce caractère (Kowalski et al., 1994; Koornneef et al., 1998; Putterill et al., 2004). De plus, un grand nombre de mutants présentant une floraison précoce ou tardive ont été identifiés et les gènes correspondant ont été clonés (Koornneef et al., 1991; Hicks et al., 1996).

Ainsi, les travaux menés sur *A. thaliana* ont permis de mettre en évidence un réseau de voies de signalisation entre protéines qui traduisent et intègrent les signaux développementaux et environnementaux lesquels activent ou inhibent la transition de floraison (Boss et al., 2004; Putterill et al., 2004; Parcy, 2005; Zhou et al., 2007).

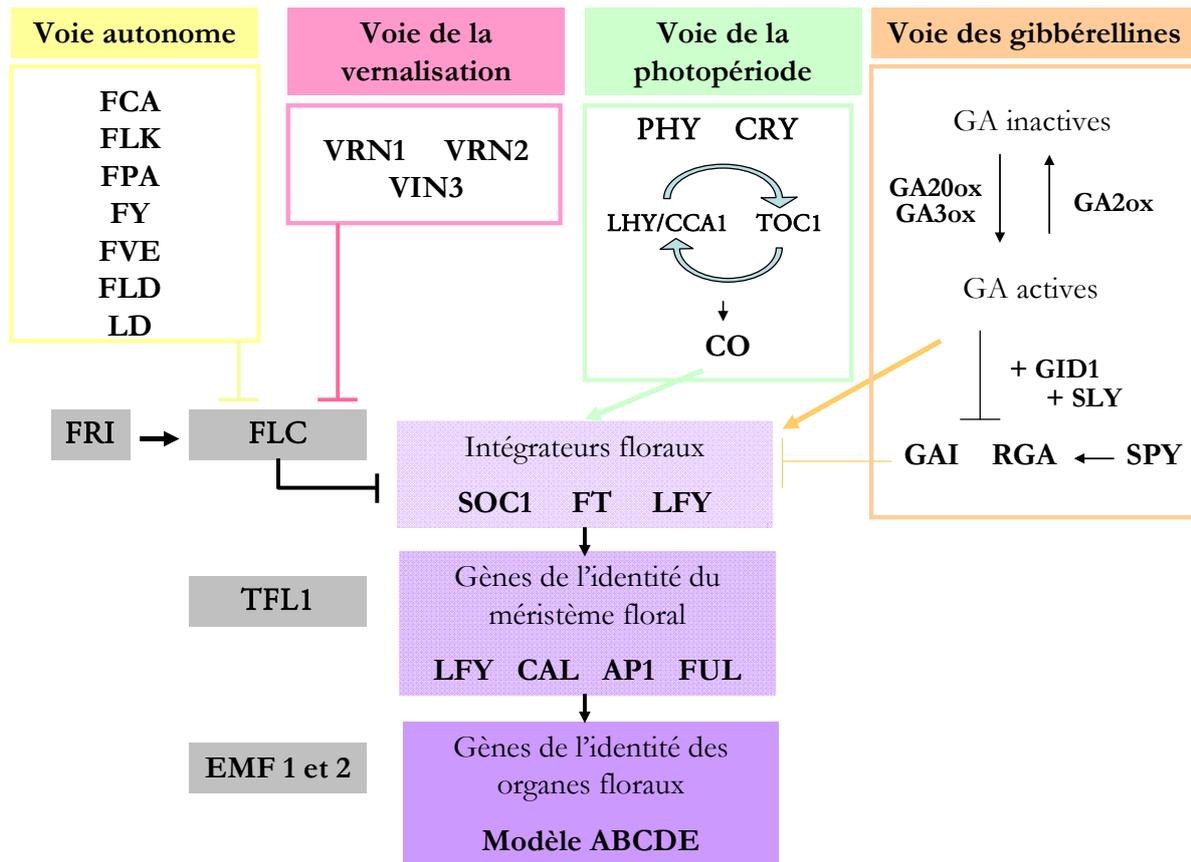


Figure 5 : Schéma simplifié de l'interaction des quatre voies de signalisation la floraison et des principaux répresseurs floraux (Blazquez, 2000; Roux et al., 2006)

Les gènes jouant un rôle sur la transition florale (Figure 5) ont été regroupés (Jung and Muller, 2009) comme appartenant soit :

- aux répresseurs floraux qui inhiberaient la floraison jusqu'à ce que la plante atteigne la maturité nécessaire ;
- à l'une des quatre voies de signalisations (Levy and Dean, 1998b) qui font généralement référence aux signaux endogènes ou exogènes auxquels ils répondent : vernalisation, photopériode, gibbérelline, autonome (Jung and Muller, 2009).

Chez *Arabidopsis*, la voie de la vernalisation et la voie autonome, permettent la floraison en réprimant l'action des inhibiteurs floraux et les deux autres voies, la voie de la photopériode et la voie des gibbérellines, favorisent la floraison (Boss et al., 2004).

D'autres voies peuvent avoir une action sur l'initiation florale chez *Arabidopsis* dans des circonstances spécifiques comme la qualité de la lumière et la température ambiante (Cerdan and Chory, 2003; Samach and Wigge, 2005).

Par souci de clarté et de simplification, seuls les principaux acteurs intervenant dans la répression de la floraison et dans les quatre voies principales de signalisation de la floraison chez *Arabidopsis* seront présentés.

I.3.2. Les répresseurs de la floraison

La reproduction nécessitant une mobilisation importante des nutriments, les plantes doivent être capables d'accumuler les éléments nutritifs avant de devenir réceptives aux signaux de floraison. Ainsi, la floraison est réprimée tant que la plante n'a pas atteint un stade de développement végétatif suffisant (Komeda, 2004). Chez *Arabidopsis*, l'identification de mutants présentant une floraison précoce a permis de mettre en évidence des gènes intervenant dans la répression de la floraison (Koornneef et al., 1998; Levy and Dean, 1998b) :

- **le gène FLC** (FLOWERING LOCUS C) codant pour un facteur de transcription de type MADS-box qui réprime la transition florale (Michaels and Amasino, 2000). Chez *A. thaliana*, *FLC* est un acteur majeur dans le contrôle de la transition florale (Boss et al., 2004). Il est essentiellement exprimé dans les apex apicaux et racinaires (Michaels and Amasino, 1999). La protéine FLC agit en réprimant la floraison à travers la répression des intégrateurs floraux, *SOC1*, *FT* et *LFY* (Blazquez and Weigel, 2000). Il a été montré que la protéine FLC interagit *in vivo* avec la chromatine des promoteurs des gènes *SOC1* et *FT* (Helliwell et al., 2006).

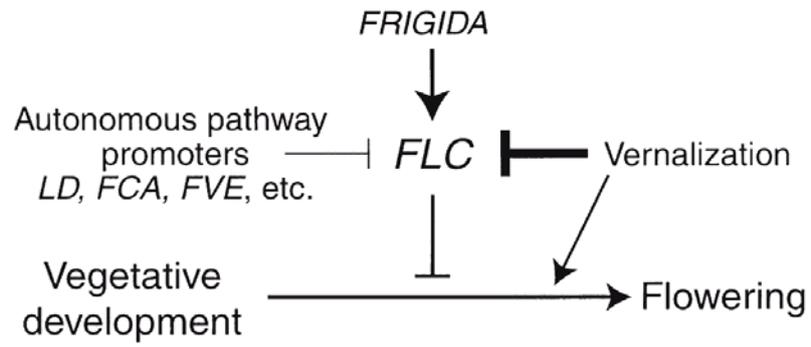


Figure 6 : Action du gène *FLC* sur la floraison sous l'effet de régulateurs positif (le gène *FRI*) et négatifs (la voie autonome et la voie de la vernalisation) (Michaels and Amasino, 2000).

FLC fonctionne de manière quantitative sous l'effet de régulateurs positifs et négatifs qui régulent la quantité de ses transcrits (Koornneef et al., 1998). La voie de la vernalisation, la voie autonome et le gène *FRI* (FRIGIDA) influencent l'état de la chromatine du gène *FLC*. Le gène *FRI*, de fonction biochimique inconnue, régule positivement l'expression de *FLC* (Michaels and Amasino, 1999; Johanson et al., 2000; Sheldon et al., 2000) (Figure 6). Au contraire, la voie de la vernalisation et la voie autonome régulent négativement *FLC* et activent ainsi la floraison (Michaels and Amasino, 2000).

- **les gènes *MAF*** (MADS AFFECTING FLOWERING) codent pour des protéines, *MAF1* à 5, de type MADS-box partageant de 53 à 87% d'identité avec la protéine *FLC* (Ratcliffe et al., 2001). La vernalisation réprime l'expression de *MAF1*, *MAF2* et *MAF3* alors qu'elle induit celle de *MAF5* et qu'elle ne semble pas affecter l'expression de *MAF4* (Ratcliffe et al., 2003; Sung et al., 2006; Alexandre and Hennig, 2008).

- **les gènes *EMF1* et *EMF2*** (EMBRYONIC FLOWER) maintiennent le développement végétatif en réprimant le développement floral (Moon et al., 2003; Kim et al., 2010). Les mutants *emf* fleurissent très rapidement après la germination (Levy and Dean, 1998b; Komeda, 2004). Le gène *EMF1* code pour un facteur de transcription alors que le gène *EMF2* code pour une protéine homologue au groupe polycomb (Moon et al., 2003). Les protéines polycomb forment des complexes qui maintiennent certains gènes silencieux via des modifications de l'histone. Les gènes *EMF* participent à la répression de trois gènes homéotiques *AG* (AGAMOUS), *PI* (PISTILLATA) et *AP3* (APETALA3) (Kim et al., 2010).

- **le gène *TFL1*** (TERMINAL FLOWER 1) contrôle l'identité du méristème inflorescentiel. Le gène *TFL1* est exprimé au centre du méristème apical (Blazquez et al., 2006). Chez les mutants *tfl1*, les méristèmes des inflorescences sont remplacés par des méristèmes floraux et forment des fleurs terminales. Le mutant *tfl1* affecte également la date de floraison et présente une floraison précoce. Les plantes sur-exprimant *TFL1* présentent une rosette élargie et des inflorescences hautement ramifiées qui peuvent éventuellement produire des fleurs normales (Ratcliffe et al., 1998). Il appartient à la famille des PEBP (Kobayashi et al., 1999). La protéine *TFL1* retarde la transition entre la phase végétative et reproductive (Ratcliffe et al., 1998). Elle contrôle ainsi la longueur de la phase végétative en inhibant l'expression des gènes de l'identité du méristème floral (Blazquez et al., 2006).

L'ensemble des répresseurs assure un développement végétatif suffisant. Lorsque la plante a atteint la maturité végétative, les signaux environnementaux et endogènes vont inhiber les répresseurs et activer la floraison.

I.3.3. Les voies de signalisation de la floraison chez *A. thaliana*

L'étude des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans leur réponse à la floraison a permis d'identifier quatre voies majeures de signalisation de la transition florale : les voies de la photopériode et de la vernalisation répondant à des modifications environnementales et les voies autonome et des gibbérellines répondant à des signaux endogènes.

a. La voie de la photopériode

Dans les zones tempérées, la longueur du jour ou photopériode change avec la saison. Les plantes ont développé des mécanismes pour se préparer au changement de saison en intégrant les informations de la photopériode dans leur programme de développement (Imaizumi and Kay, 2006). Les transitions développementales majeures, comme l'initiation florale, sont synchronisées avec les changements de saison. La photopériode fournit l'une des causes environnementales permettant cette synchronisation (Searle and Coupland, 2004).

Garner et Allard (1920) ont classé les plantes en trois catégories en fonction de la réponse à la photopériode : plantes de jours courts (short day, SD), plantes de jours longs (long day, LD) et plantes insensibles à la photopériode (day neutral, DN) (Lagercrantz, 2009). Les mécanismes moléculaires de la voie de la photopériode ont été étudiés chez *A. thaliana* en tant que modèle de plante de jours longs.

Plusieurs modèles expliquant comment les plantes captent la longueur du jour ont été proposés. Le plus probable est celui basé sur la coïncidence entre un rythme interne et un signal externe (lumière) qui sous certaines conditions, induit la floraison (Lagercrantz, 2009). La voie de la photopériode débute avec la détection de la lumière par les photorécepteurs : cryptochromes et phytochromes (Levy and Dean, 1998b; Lin, 2000; Zhou et al., 2007). Les cryptochromes absorbent la lumière bleue et les UV-A (Cashmore et al., 1999) alors que les phytochromes absorbent la lumière rouge et rouge lointain (Hughes and Lamparter, 1999). Chez *A. thaliana*, il existe au moins cinq phytochromes, codés par les gènes *PHYA* à *PHYE* (Quail et al., 1995), et deux cryptochromes, codés par les gènes *CRY1* et *CRY2* (Lin, 2000).

Les photorécepteurs captent la lumière et initient les signaux transmis à l'horloge circadienne. Les acteurs principaux de l'horloge circadienne sont les gènes *LHY* (LATE ELONGATED HYPOCOTYL), *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) et *TOC1* (TIMING OF CAB EXPRESSION 1) (Searle and Coupland, 2004; Zhou et al., 2007). Cette horloge agit comme un oscillateur central dont le mécanisme est basé sur des boucles de rétrocontrôle négatif interconnectées (Zhou et al., 2007). En fin de journée, *TOC1* active l'expression des gènes *CCA1* et *LHY* et les niveaux de transcrits de ces deux gènes augmentent jusqu'à l'aube. Inversement, *CCA1* et *LHY* régulent négativement l'expression de *TOC1*. La diminution de *TOC1* réduit l'expression de *CCA1* et *LHY* pendant la journée entraînant un relâchement de l'inhibition de l'expression de *TOC1* (Zhou et al., 2007).

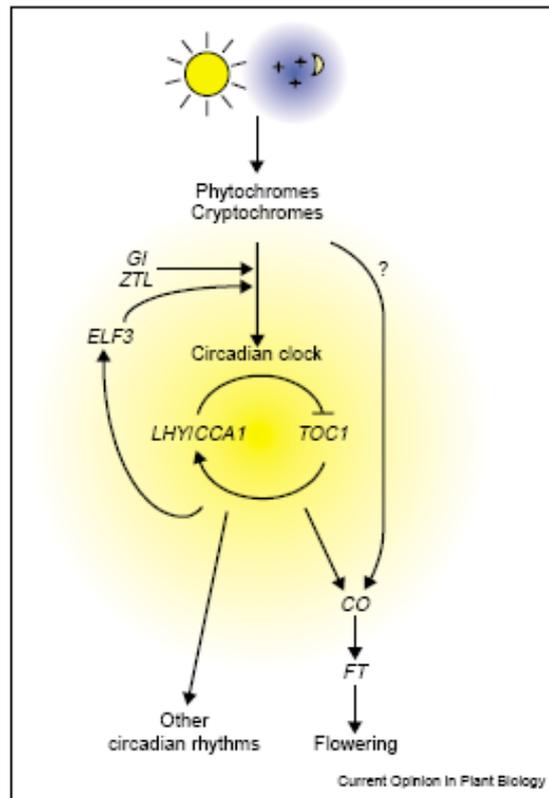


Figure 7 : Représentation du modèle de l'horloge circadienne chez *Arabidopsis* et sa relation avec les gènes de floraison comme *CO* et *FT* (Hayama and Coupland, 2003).

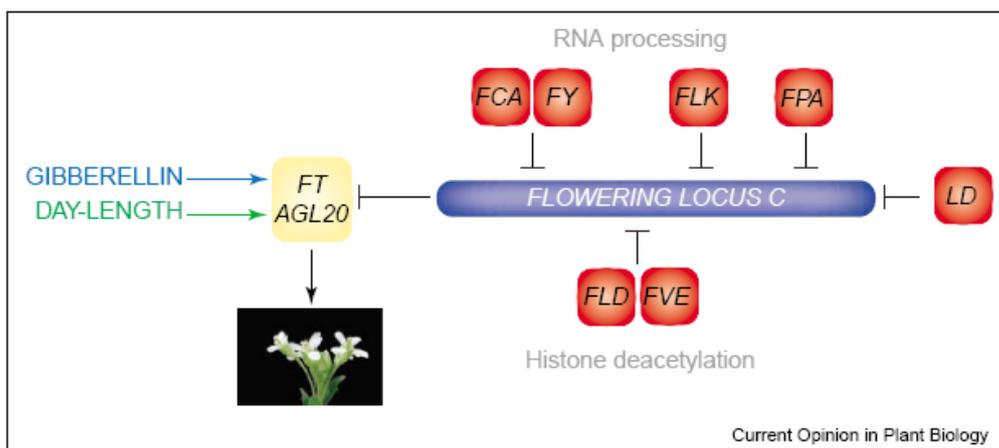


Figure 8 : Rôle de la voie autonome sur la floraison à travers la régulation du gène *FLC* (Simpson, 2004).

L'horloge circadienne va permettre une expression cyclique du gène CO (CONSTANS) (Imaizumi and Kay, 2006) avec un pic d'expression dans la seconde partie de la journée. Lorsqu'en jours longs, ce pic coïncide avec la lumière externe, la protéine active CO est produite et induit l'expression du gène FT (FLOWERING LOCUS T) (Putterill et al., 2004) (Figure 7). CO contrôle également la floraison en induisant l'expression de l'intégrateur floral SOC1 (Yoo et al., 2005). Le gène CO code pour un facteur de transcription à domaine CCT (CONSTANS, CONSTANS-LIKE AND TOC1) et à doigt de zinc (Putterill et al., 1995). Le domaine CCT permet à CO de se lier au promoteur de l'intégrateur floral FT via un élément cis unique contenant le motif TGTG(N2-3)ATG (Tiwari et al., 2010) pour activer sa transcription.

b. *La voie autonome*

La voie autonome répondant à des signaux internes active la transition florale de la plante indépendamment des conditions environnementales (Levy and Dean, 1998b; Simpson, 2004). Les analyses des mutants affectés au niveau de la floraison *via* le blocage de la voie autonome ont permis d'identifier sept gènes dont les produits activent la floraison en inhibant l'expression du répresseur floral *FLC* (Veley and Michaels, 2008) (Figure 8). Ces sept régulateurs agissent selon deux modes d'action. Quatre d'entre eux FCA, FLK (FLOWERING LOCUS K), FPA et FY (Koornneef et al., 1991) semblent avoir une activité liée à l'ARN indiquant que ces protéines doivent réguler les transcrits de *FLC*. Deux autres protéines FVE et FLD (FLOWERING LOCUS D) semblent interagir avec un complexe histone acétylase (He et al., 2003) et exercent un contrôle sur *FLC* à travers des modifications épigénétiques (Simpson, 2004). Enfin, le dernier régulateur, LD (LUMINIDEPENDENS), code pour une protéine comprenant un homéodomaine pouvant se fixer à l'ADN, et dans certains cas, à l'ARN (Dubnau and Struhl, 1996).

Ainsi, les acteurs de la voie autonome impliqués soit dans la régulation de l'ARN, soit dans la régulation épigénétique régulent négativement le répresseur floral *FLC* (Simpson, 2004). La voie autonome active indirectement la floraison en rendant la plante sensible aux stimuli activateurs de la floraison comme la photopériode ou la voie des gibbérellines (Simpson, 2004).

c. *La voie de la vernalisation*

La vernalisation est le processus par lequel la transition florale est activée par des expositions prolongées au froid. La nécessité d'une vernalisation assure la floraison dans des conditions qui doivent être favorables à la phase reproductive (Henderson et al., 2003).

La vernalisation est un processus nécessaire à la floraison des écotypes d'*A. thaliana* ayant un cycle annuel alors que les écotypes ayant un cycle rapide n'en ont pas besoin. En effet, ces derniers germent et fleurissent au cours du même été (Putterill et al., 2004). Les écotypes annuels germent en été, croissent végétativement en hiver et fleurissent seulement en réponse à l'accroissement de la durée des jours au printemps et après avoir été exposés trois mois aux températures froides de l'hiver.

La vernalisation est un processus quantitatif. En effet, plus l'exposition au froid est longue et plus la floraison est accélérée. La perception de la vernalisation se fait au niveau du méristème végétatif apical (Boss et al., 2004). Contrairement à la photopériode, la vernalisation prépare la plante à fleurir mais ne peut pas à elle seule induire la floraison (Levy and Dean, 1998b).

Il existe une séparation temporelle entre le traitement au froid et la floraison. Après une exposition plus ou moins prolongée au froid, la plante reprend un développement végétatif pendant plusieurs semaines avec les températures plus chaudes, puis la floraison va être initiée. Ce déroulement suppose que la perception des basses températures doit être mémorisée au niveau de l'apex et au cours des mitoses (Levy and Dean, 1998b; Henderson et al., 2003). Cet état vernalisé est cependant perdu après méiose (Putterill et al., 2004). Un processus permettant une mémorisation stable à travers des divisions cellulaires suggère que la réponse à la vernalisation implique des régulations épigénétiques (Henderson et al., 2003).

Les écotypes à cycle rapide dont la floraison est indépendante de la vernalisation présentent une mutation soit dans *FRI*, soit dans *FLC* (Johanson et al., 2000; Michaels and Amasino, 2001). Ces données indiquent que *FLC* et *FRI* rendent le processus de vernalisation nécessaire pour accélérer le processus de floraison.

L'analyse de mutants montrant une réponse à la vernalisation déficiente a également permis d'isoler trois autres gènes impliqués dans cette voie. *VIN3* serait impliqué dans l'établissement de l'état réprimé de *FLC* (Sung and Amasino, 2004) alors que *VRN1* et *VRN2* maintiendraient la répression induite par la vernalisation sur *FLC* (Gendall et al., 2001; Levy et al., 2002).

Ainsi, la voie de la vernalisation permet d'inhiber la répression que *FRI* et *FLC* exercent sur la floraison. Des modifications épigénétiques des gènes *FRI* et *FLC* induites par la voie de la vernalisation sont responsables de leur inhibition (Veley and Michaels, 2008).

d. La voie des gibbérellines

Les gibbérellines sont des phytohormones impliquées dans des processus développementaux fondamentaux tels que la germination, l'expansion des feuilles, l'élongation cellulaire, la floraison et le développement du fruit (Davies et al., 1985; Foster et al., 2007). Les gibbérellines sont des molécules diterpénoïdes issus de la voie de biosynthèse des terpénoïdes (Grennan, 2006). Différentes enzymes assurent la synthèse, l'activation et l'inactivation des gibbérellines. Les oxydases GA20ox et GA3ox sont impliquées dans la maturation des formes actives des gibbérellines alors que GA2ox est impliquée dans leur inactivation (Yamaguchi and Kamiya, 2000).

L'effet des gibbérellines sur la floraison est variable selon les plantes. Chez *A. thaliana*, la voie de signalisation des gibbérellines joue un rôle activateur de la floraison, notamment sous des conditions de photopériode non-inductibles (Levy and Dean, 1998b; Mutasa-Gottgens and Hedden, 2009). L'application de gibbérellines accélère la floraison sur les plantes sauvages en jours courts comme en jours longs et peut outrepasser le phénotype de retard de floraison de beaucoup de mutants des trois autres voies (Chandler and Dean, 1994; Tremblay and Colasanti, 2007).

Les cibles principales de la voie des gibbérellines sont des protéines de type DELLA telles que les répresseurs floraux *RGA* (REPRESSOR OF GIBBERELIC ACID) et *GAI* (GIBBERELIC ACID INSENSITIVE). Les protéines DELLA sont activées par le gène *SPY* (SPINDLY) (Silverstone et al., 2007). Le récepteur *GID1* (GA INSENSITIVE DWARF 1) recrute les gibbérellines actives et la protéine *SLY* (SLEEPY) pour former un complexe avec les protéines DELLA (McGinnis et al., 2003; Nakajima et al., 2006). Ce complexe entraîne l'ubiquitination des protéines DELLA conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S (Sun and Gubler, 2004). Ainsi, la voie des gibbérellines active la floraison en initiant la dégradation des répresseurs floraux *GAI* et *RGA*. La voie des gibbérellines active également la floraison en activant les intégrateurs floraux, *SOC1*, *LFY* et *FT* dans les inflorescences, les méristèmes floraux et les feuilles respectivement (Mutasa-Gottgens and Hedden, 2009).

Les analyses de doubles mutants ont permis d'établir que la voie des GA est génétiquement distincte de la voie de la photopériode et de la voie autonome. Ces analyses ont confirmé que, chez *Arabidopsis*, la voie des gibbérellines a plus d'influence sur la floraison en jours courts qu'en jours longs (Boss et al., 2004; Mutasa-Gottgens and Hedden, 2009).

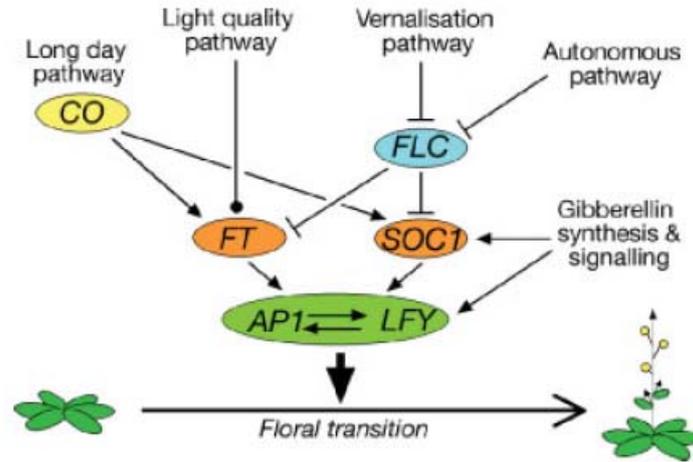


Figure 9 : Convergence des différentes voies de signalisation vers les trois intégrateurs floraux : FT, SOC1 et LFY (Putterill et al., 2004).

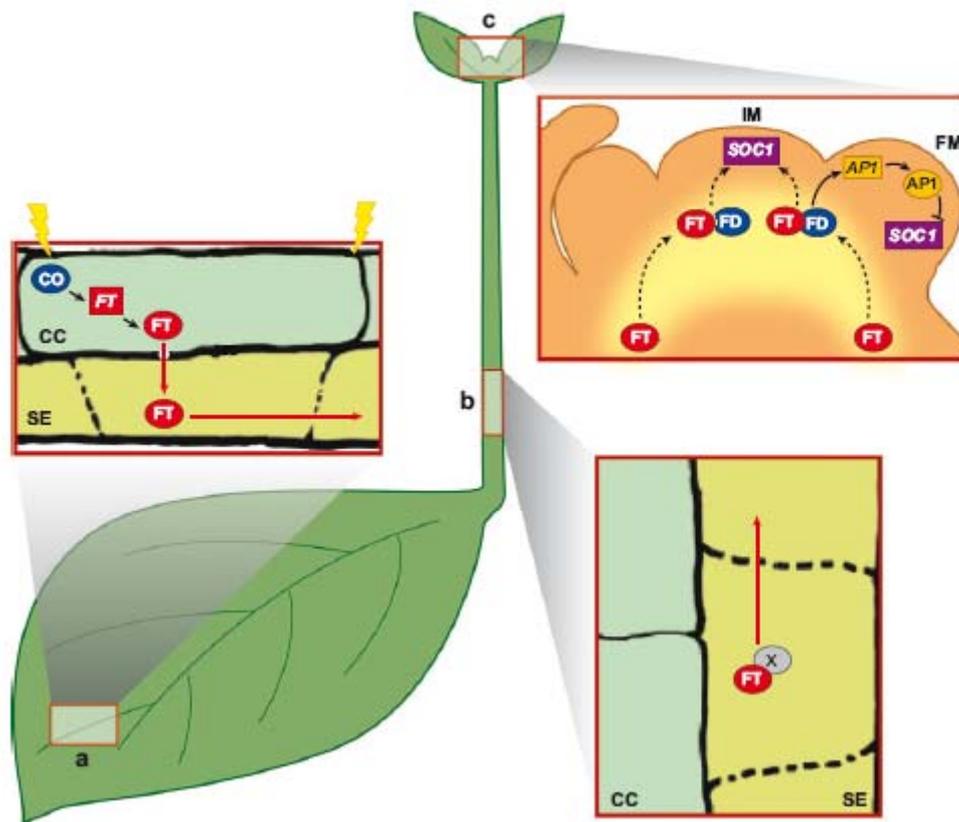


Figure 10 : Représentation schématique du transport longue distance de FT chez *Arabidopsis thaliana* (Turck et al., 2008). En jours longs, la protéine CO (CONSTANS) induit la transcription du gène FT au niveau des feuilles. La protéine FT circule via le phloème de la feuille vers le méristème apical. En présence du facteur de transcription FD, FT active la transcription de SOC1. Le complexe FT/FD active directement la transcription du gène AP1 au niveau du méristème floral.

I.3.4. Les intégrateurs floraux

Le signal de floraison *via* les voies de signalisation de la floraison est transmis aux intégrateurs floraux: FT, SOC1 et LFY, (Simpson and Dean, 2002) (Figure 9).

a. Le gène *FT* (*Flowering Locus T*)

Le gène *FT* code pour une protéine de la famille des PEBP (voir chapitre I ; paragraphe I. 5). Le gène *FT* est un activateur de la floraison et est antagoniste à son homologue *TFL1*. Les mutants *ft* présentent un retard de floraison alors que la surexpression de *FT* provoque des floraisons précoces (Koornneef et al., 1991; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Yoo et al., 2005; King et al., 2008). Les mutants *ft* ne répondent pas à la vernalisation (Komeda, 2004). L'expression de *FT* est contrôlée par la voie de la photopériode mais aussi par la voie autonome puisque la mutation du gène *FCA* entraîne une sous-expression de *FT* (Komeda, 2004).

FT est induit par des jours longs par l'intermédiaire du gène *CO* (Corbesier et al., 2007). Il atteint son pic d'expression au moment de l'induction florale. Le gène *FT* est exprimé au niveau des feuilles et une induction transitoire de ce gène au niveau de ces organes est suffisante pour stimuler la floraison (Huang et al., 2005; Corbesier et al., 2007). La protéine FT agit comme un signal à longue distance au niveau du méristème apical pour induire la floraison chez *Arabidopsis* (Corbesier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007) (Figure 10). Ainsi, le signal se déplace depuis une feuille induite (par la lumière ou un autre stimulus) vers l'apex végétatif où elle induit la floraison. Des études récentes ont montré que la protéine FT est transportée des feuilles jusqu'au méristème *via* le phloème (Corbesier et al., 2007; Mathieu et al., 2007). Au niveau du méristème apical, la protéine FT interagit avec le facteur de transcription FD pour activer la transcription du gène *API* (Abe et al., 2005).

Cette action de signal longue distance de FT en fait un très bon candidat pour répondre à la notion de florigène, hormone de floraison (Zeevaart, 2008). Le paradigme du florigène est né de l'observation d'un signal de floraison activé dans les feuilles par des stimuli spécifiques de l'espèce, transmissible par greffage et commun à toutes les plantes (Zeevaart, 1976; Notaguchi et al., 2005).

b. *Le gène SOC1/AGL20 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1)*

Le gène *SOC1* code pour un facteur de transcription de type MADS-box et intègre les signaux de floraison issus des quatre voies de signalisation (Lee and Lee, 2010). Le mutant *soc1* fleurit plus tard en jours longs comme en jours courts (Borner et al., 2000; Parcy, 2005). *CO* active *SOC1* à travers l'activation du gène *FT* (Yoo et al., 2005). *FLC* réprime *SOC1* en se liant directement à son promoteur (Searle et al., 2006). La mutation de *SOC1* supprime le phénotype de floraison précoce des mutants sur-exprimant *CO* (Onouchi et al., 2000; Samach et al., 2000). *SOC1* est exprimé principalement dans les feuilles et dans les apex caulinaires (Parcy, 2005). L'expression de *SOC1* est régulée par les quatre voies de signalisation de la floraison (Komeda, 2004). De plus, *SOC1* activerait *LFY* (Mouradov et al., 2002) via une autre MADS box, *AGL24* (AGAMOUS LIKE 24) (Yu et al., 2002).

c. *Le gène LFY (LEAFY)*

Le gène *LFY* joue un rôle clef lors du développement floral: il intervient dans l'intégration du signal de différentes voies d'induction de la floraison et dans l'activation de gènes de l'identité du méristème floral comme *API* (William et al., 2004; Parcy, 2005).

L'expression de *LFY* précède la transition florale; il est le premier gène détecté dans les ébauches de feuilles et son pic d'expression est atteint dans les jeunes méristèmes floraux (Parcy, 2005). Les plantes qui sur-expriment *LFY* présentent une floraison précoce (Blazquez et al., 1997) tandis que les mutants *lfy* portent des feuilles à la place des fleurs (Weigel et al., 1992). *LFY* est un type de facteur de transcription retrouvé uniquement chez les plantes (Parcy et al., 1998; William et al., 2004). Ces trois gènes intégrateurs des signaux de floraison vont activer les gènes de l'identité du méristème floral et initier le développement floral dans le méristème apical (Wigge et al., 2005).

I.3.5. Les gènes d'identité du méristème floral

Les intégrateurs floraux activent les gènes de l'identité du méristème floral comme, *CAL* (CAULIFLOWER), *API* (APETALA 1) et *FUL* (FRUITFULL), dont l'activité provoque la transition de l'apex végétatif en méristème inflorescentiel puis floral (Tan and Swain, 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine *SOC1* active également le gène *LFY*. Or la protéine *LFY*, après l'initiation de la transition de l'identité du méristème, a un second rôle en tant que régulateur de l'identité du méristème floral en activant les gènes homéotiques spécifiques de l'identité des organes floraux (William et al., 2004). Trois cibles de *LFY* ont été identifiées : deux gènes homéotiques floraux *AG* et *AP3* qui agissent sur la

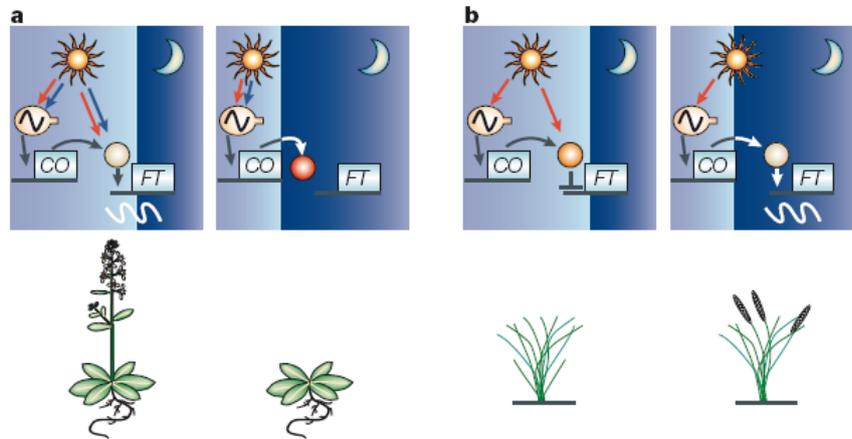


Figure 11 : Régulation de la floraison par la photopériode chez *Arabidopsis* et le riz (Yanovsky and Kay, 2003). Chez *A. thaliana*, CO (CONSTANS) active l'expression de *FT* (FLOWERING LOCUS T) en jours longs alors que chez le riz, CO active l'expression de *FT* en jours courts. a. Chez *A. thaliana*, l'accumulation d'ARNm du gène *CO* en fin de journée doit coïncider avec la lumière pour produire une protéine CO capable d'activer la transcription du gène *FT* en jours longs. b. Chez le riz, l'accumulation d'ARNm du gène *CO* en fin de journée doit coïncider avec l'obscurité pour produire une protéine CO capable d'activer la transcription du gène *FT*.

morphogénèse florale et *API* qui agit sur l'identité du méristème floral et qui est également un gène homéotique floral (William et al., 2004). La protéine LFY se lie aux éléments cis présents chez les séquences régulatrices des gènes *API* (Parcy et al., 1998), *AP3* (Lamb et al., 2002) et *AG* (Busch et al., 1999).

Les gènes *API*, *FUL* et *CAL* codent pour des facteurs de transcription de type MADS-box qui présentent entre eux une forte similarité au niveau de leurs séquences et de leurs profils d'expression (Mandel et al., 1992; Kempin et al., 1995; Ferrandiz et al., 2000; Blazquez et al., 2006).

Les produits d'expressions des gènes d'identité du méristème floral vont activer les gènes responsables de la mise en place des organes floraux (Krizek and Fletcher, 2005).

I.4. Le contrôle génétique de la transition florale chez d'autres angiospermes

Les connaissances sur la transition florale sont essentielles chez les espèces cultivées pour notamment produire des variétés mieux adaptées à leur environnement local et aux changements climatiques (Jung and Muller, 2009). La mise en évidence des gènes intervenant dans la floraison de l'espèce modèle *A. thaliana* a permis de rechercher leurs orthologues chez d'autres espèces. Certains de ces gènes et leurs fonctions ont été identifiés chez des espèces cultivées.

Le contrôle de **la voie de la photopériode** à travers le gène *CO* semble largement conservé chez les plantes à fleurs (Turck et al., 2008). Un travail récent sur l'algue *Chlamydomonas* montre que la fonction régulatrice des gènes *CO-like* dans le processus dépendant de la photopériode précède l'apparition des angiospermes au cours de l'évolution (Serrano et al., 2009).

Bien que les acteurs impliqués dans l'activation de la floraison *via* la voie de la photopériode soient conservés, quelques adaptations existent dans les mécanismes de régulation entre les plantes de jours courts et de jours longs (Jung and Muller, 2009). Par exemple, chez le riz utilisé comme plante modèle de jours courts, la concordance du pic de *CO* avec la nuit permet la floraison alors que chez *A. thaliana*, la floraison est activée lorsque le pic d'expression de *CO* coïncide avec une période de jour (Figure 11).

L'action de la **voie de la vernalisation** à travers le gène clef *FLC*, chez d'autres familles d'Angiospermes que celle des Brassicacées à laquelle appartient l'espèce *A. thaliana*, est controversée. Bien que des séquences *FLC-like* aient été identifiées dans les trois clades majeurs des eudicots (rosides, astérides et caryophyllides), la conservation de la fonction des gènes correspondant a été très rarement mise en évidence (Reeves et al., 2007; Jung and Muller, 2009). Seul le gène *BvFL1* de la canne à sucre semble être un répresseur de la floraison et complète le mutant nul *FLC* d'*A. thaliana* (Reeves et al., 2007).

Chez les monocotylédones comme le blé, les gènes clefs de la régulation de la vernalisation sont *VRN1*, 2 et 3, non homologues aux *VRN* d'*A. thaliana*. Ces gènes révèlent un réseau de régulation différent de celui dépendant de *FLC* chez *A. thaliana*. Cependant, l'expression de *VRN1*, un facteur de transcription de type MADS-box, est essentiel pour la transition florale (Shitsukawa et al., 2007). *VRN1* présente des homologies avec les gènes de l'identité du méristème comme *API*, *FUL* et *CAL*. *VRN2* tout comme *CO* présente un domaine CCT permettant de se lier directement à l'ADN (Yan et al., 2004). Enfin, *VRN3* est un homologue de *FT* (Yan et al., 2006). La voie de la vernalisation semble avoir évolué plusieurs fois puisque le blé et *A. thaliana* utilise des gènes différents pour empêcher la floraison jusqu'à la fin de l'hiver (Putterill et al., 2004).

Le rôle des **gibbérellines** dans la transition florale a été démontré mais beaucoup de ces effets semblent spécifiques de l'espèce. Bien que la voie des gibbérellines puisse activer la floraison dans différentes espèces, les effets des gibbérellines sur la floraison ne sont pas systématiquement les mêmes. Ainsi, contrairement à *A. thaliana*, les gibbérellines chez la vigne inhibent la floraison et la mutation gain de fonction dans la protéine *DELLA*, *VvGAI1*, provoque le nanisme et la formation d'une inflorescence au lieu de tendrils (Boss and Thomas, 2002). Chez les arbres fruitiers pour lesquels les mécanismes de floraison sont étudiés, les gibbérellines ont également un effet inhibiteur de la floraison (Wilkie et al., 2008).

Les composants de la **voie autonome** sont plus largement conservés dans les autres espèces de plantes qu'*A. thaliana* (Simpson, 2004). Par exemple, *FCA* a également été identifiés chez le riz (Izawa et al., 2003).

Les **intégrateurs floraux** comme *FT*, *SOCI*, *LFY* sont largement conservés entre les monocotylédones et les dicotylédones (Jung and Muller, 2009). L'identification d'homologues de *LFY* avec des fonctions similaires dans la transition florale et la détermination du méristème floral montre une conservation de ses fonctions (Veit et al., 2004). Par exemple, la découverte d'homologues de *LFY* chez le maïs, *ZFL1* et *ZFL2*, jouant un rôle dans la transition de la floraison et dans l'organisation du méristème floral (Bomblies et al., 2003), confirme la conservation de la fonction de *LFY* chez les monocotylédones et les dicotylédones. L'expression constitutive de ce gène dans les espèces pérennes comme le peuplier ou le citrus provoque une floraison précoce (Weigel and Nilsson, 1995; Pena et al., 2001).

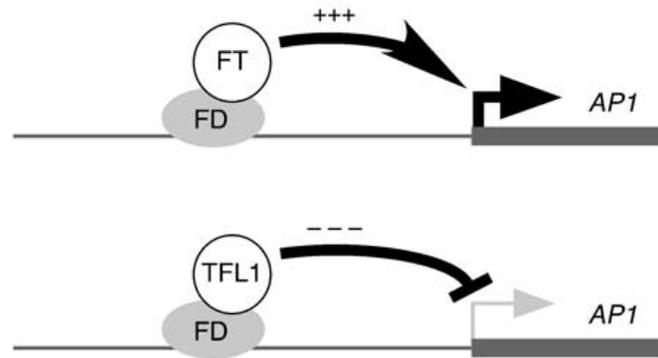


Figure 12 : Modèle d'interaction de FD avec FT et TFL1 proposé par Ahn et al., 2006. FT convertirait FD en un activateur fort alors que TFL1 convertirait FD en un répresseur fort.

Malgré leur différence de mode de vie et même si les mécanismes varient parfois d'une espèce à l'autre, les acteurs principaux de la transition florale chez les plantes angiospermes semblent les mêmes, avec cependant une exception notable concernant le gène *FLC* (Tan and Swain, 2006; Danilevskaya et al., 2008).

I.5. Le rôle clef des gènes de la famille PEBP dans la transition florale

Deux des acteurs principaux de la floraison chez *A. thaliana*, *FT* et *TFL1*, appartiennent à une même famille de gènes qui codent pour des protéines de type PEBP (Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein) (Danilevskaya et al., 2008). Cette famille comprend des membres chez les bactéries, les levures et les animaux. Les protéines PEBP animales agissent comme des inhibiteurs de type Raf kinase (Yeung et al., 1999; Lorenz et al., 2003; Odabaei et al., 2004) dans la cascade de signalisation qui contrôle la croissance cellulaire (Keller et al., 2004). Les PEBP des mammifères sont des protéines multifonctionnelles dont le rôle physiologique commence à être élucidé. Le mécanisme d'action de ces protéines chez les plantes n'a pas encore été découvert (Blazquez et al., 2006).

Chez *A. thaliana*, la famille PEBP se compose de six membres : *FT*, *TFL1*, *TSF* (TWIN SISTER OF *FT*), *ATC* (ARABIDOPSIS THALIANA RELATIVE OF CENTRORADIALIS), *BFT* (BROTHER OF *FT*) et *MFT* (MOTHER OF *FT*) (Kobayashi et al., 1999). *FT* et *TFL1* ont des fonctions opposées : *FT* active la floraison alors que *TFL1* la réprime. Le gène *TSF*, qui présente la plus forte homologie avec *FT*, semble agir comme un intégrateur de la floraison et pourrait activer la floraison de façon redondante avec *FT* (Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005). *MFT* pourrait agir comme un inducteur floral puisque la surexpression de *MFT* peut induire une floraison précoce en jours longs (Yoo et al., 2004). En se basant sur leurs profils d'expression, les gènes *MFT-like* pourraient être impliqués dans le développement de la graine (Danilevskaya et al., 2008). La fonction de *BFT* n'a pas encore été identifiée. Enfin, *ATC* pourrait fonctionner de façon redondante avec *TFL1* (Mimida et al., 2001).

Bien que *FT* et *TFL1* présentent moins de 60% d'homologie de séquence protéique, la conversion d'un seul acide aminé, l'histidine en position 88 sur *TFL1* en tyrosine en position 85 sur *FT*, est suffisante pour convertir *FT* en un répresseur et *TFL1* en un activateur de la floraison (Hanzawa et al., 2005). Un modèle dans lequel *FT* et *TFL1* seraient en compétition pour interagir avec un même partenaire, tel que *FD*, a été proposé (Ahn et al., 2006) (Figure 12).

Les orthologues de *FT* et *TFLI* ont été clonés chez de nombreuses plantes (Chardon and Damerval, 2005; Carmona et al., 2007; Igasaki et al., 2008; Hedman et al., 2009; Sato et al., 2009). La fonction de *FT* comme activateur de la floraison semble remarquablement conservée chez toutes les espèces étudiées (Turck et al., 2008). Par exemples, les orthologues de *FT* chez la vigne, *VvFT* (Carmona et al., 2007), chez le peuplier *PnFT1* et *PnFT2* (Igasaki et al., 2008) ou encore chez la tomate *SFT* (SINGLE FLOWER TRUSS) (Molinero-Rosales et al., 2004; Shalit et al., 2009), agissent également comme activateurs de la floraison. L'acide aminé histidine caractéristique de *TFLI* chez *A. thaliana* est conservé chez les homologues fonctionnels de *TFLI* chez différentes plantes. Cependant, il existe quelques différences notables dans la fonction de ses homologues. Chez *A. thaliana*, *TFLI* contrôle la longueur de la phase végétative et la détermination du méristème inflorescentiel, alors que les orthologues de *TFLI* chez *Antirrhinum* et chez la vigne, *CEN* (CENTRORADIALIS) et *VvTFLIA* respectivement, n'affectent pas la date de floraison mais jouent un rôle dans la détermination du méristème (Bradley et al., 1996; Carmona et al., 2007). Chez le pois, deux homologues de *TFLI* sont présents : *LF* (LATE FLOWERING) agit comme un répresseur de la floraison et *DET* (DETERMINATE) contrôle la détermination du méristème inflorescentiel (Foucher et al., 2003). Des homologues fonctionnels de *TFLI*, *CEN* et *SP* (SELF PRUNING) chez *Antirrhinum* et la tomate respectivement, affectent la croissance déterminée ou indéterminée (Bradley et al., 1996; Pnueli et al., 1998).

L'ensemble de ces études montre que le rôle déterminant de gènes de la famille PEBP dans la transition florale semble relativement bien conservé chez l'ensemble des angiospermes.

II. Le fraisier

II.1. Histoire des fraisiers

Alors que l'homme cultive les céréales depuis 10 000 ans, la première espèce de fraisier a été domestiquée il y a 2000 ans et le fraisier cultivé que l'on apprécie aujourd'hui est né il y a seulement 250 ans (Hancock et al., 1992).

II.1.1. Domestication des espèces du vieux monde

En Europe, les premières citations mentionnant le fraisier datent de la période romaine et portent sur ses propriétés médicinales (Apulius, Virgil, Ovid). Jusqu'au Moyen Âge, l'espèce de fraisier récoltée est *Fragaria vesca*, la fraise des bois. Au Moyen Âge, *F. moschata*, lui succède car elle présente de plus gros fruits. La culture du fraisier n'apparaît clairement en Europe qu'au milieu du XIV^{ème} siècle. En 1368, le roi Charles V fait demander à son jardinier, Jean Dudoy, de planter 1200 plants de fraisiers dans les jardins royaux du Louvre à Paris. Un autre témoignage de la fraise comme fruit cultivé est sa disponibilité sur les étals londoniens en 1430. Dans les années 1500, les références sur la culture de ce fruit se multiplient. En 1548, la description de la conduite culturale apparaît dans «L'agriculture et Maison rustique». Enfin, à la fin du XVI^{ème} siècle, la popularité des fraisiers est générale.

Au niveau botanique, le fraisier a fait l'objet d'une description détaillée pour la première fois en 1484 dans «Herbarius latinus monguntiae». Les médecins et apothicaires l'utilisent à fin médicinale. A cette époque, les botanistes décrivent les trois espèces présentes en Europe : *F. vesca*, *F. moschata* et *F. viridis*. Chez *F. vesca*, ils distinguent différentes « races » dont principalement *F. vesca subsp. alba* qui produit des fruits blancs, et *F. vesca subsp. semperflorens* qui fleurit continuellement. La première description de cette dernière « espèce » remonte au XVI^{ème} siècle et a été réalisée par Jérôme Bock en 1532 (Duchesne, 1766). Par la suite, Duchesne en donnera une description très détaillée dans son livre « Histoire des fraisiers » (1766).

II.1.2. Domestication de *F. virginiana* et *F. chiloensis*

Au XVII^{ème} siècle, des plants de *F. virginiana*, prélevés aux Amériques, en Virginie, sont introduits en Europe (France, Angleterre, Suède). Ces fraisiers plus vigoureux, plus rustiques et produisant de plus gros fruits que les fraisiers européens (*F. moschata* ou *F. vesca*), se développeront rapidement dans la première moitié du XVIII^{ème} siècle, et principalement en Angleterre.

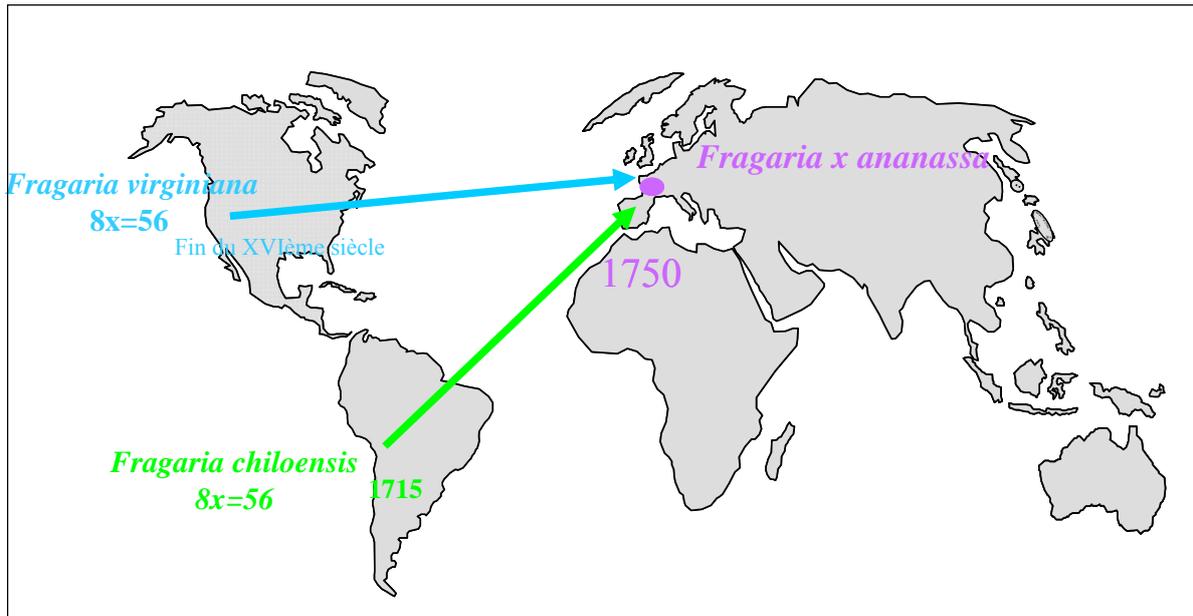


Figure 13 : Origine du fraisier cultivé octoploïde *Fragaria x ananassa* issu de l'hybridation interspécifique entre *F. virginiana* et *F. chiloensis*.

En 1716, une autre espèce d'origine américaine, *F. chiloensis*, prélevée au Chili, fut introduite en Europe par le capitaine Amédée Frézier. Au Chili, cette espèce produisait de gros fruits aromatiques, mais, une fois introduits en Europe, ces fraisiers fleurissaient mais ne donnaient plus de fruits. Amédée Frézier avait par inadvertance prélevé des plants mâles stériles. Les plants furent propagés par stolons et cultivés dans de nombreux jardins botaniques d'Europe (Darrow, 1966). Les horticulteurs français avaient cependant découvert que *F. chiloensis* pouvait en produire lorsqu'il était localisé près de plants de *F. moschata*. Le fraisier *F. chiloensis* ne devint jamais populaire en Europe en dehors de la Grande-Bretagne car il nécessitait un pollinisateur.

II.1.3. Origine du fraisier cultivé octoploïde, *F. x ananassa*

Au XVIII^{ème} siècle, la présence simultanée des deux espèces d'origine américaines, *F. virginiana* et *F. chiloensis* a permis d'obtenir des plants cumulant les avantages des deux espèces, l'arôme et la taille des fruits de *F. chiloensis* et capacité de production de stolons de *F. virginiana*. En 1766, Duchesne est le premier à émettre l'hypothèse que ces nouvelles plantes étaient des hybrides interspécifiques issus de la pollinisation de *F. chiloensis* par *F. virginiana* et l'appela *F. x ananassa* car il trouvait que le fruit sentait l'ananas (Figure 13).

A partir de 1800, les sélectionneurs ne cesseront pas d'améliorer ce fraisier pour donner les centaines de variétés existantes aujourd'hui.

II.2. Le contexte économique : le marché de la fraise

La fraise est un fruit consommé soit frais, la fraise de bouche, soit transformé en confiture, sirop et sorbet ou incorporé à d'autres préparations, la fraise d'industrie. La production mondiale de fraises dépassait les 4 millions de tonnes en 2008 (données FAO), soit plus de cinq fois la production de fraises en 1960. Les pays qui produisent le plus de fraises sont les Etats-Unis, l'Espagne et la Turquie avec 28%, 6,5% et 6,5% de la production mondiale, respectivement. La France arrive en 17^{ème} position avec 1% de la production mondiale. Les premiers pays exportateurs sont l'Espagne, les Etats-Unis et le Mexique et les plus gros importateurs sont la France, le Canada et l'Allemagne. La production européenne représente 35% de la production mondiale.

En France, la production de fraises est orientée vers la fraise de bouche. Pour se distinguer de ses concurrents sur le marché de la fraise, la filière fraisicole française mise sur la qualité gustative et nutritionnelle. Dans ce cadre, l'Association Interprofessionnelle de la Fraise du Lot-et-Garonne a réussi à obtenir le premier Label Rouge Fraise pour les variétés Gariguette et Ciflorette. Les Fraises Label Rouge sont produites, élaborées et commercialisées selon un cahier des charges strict offrant des garanties de qualité.

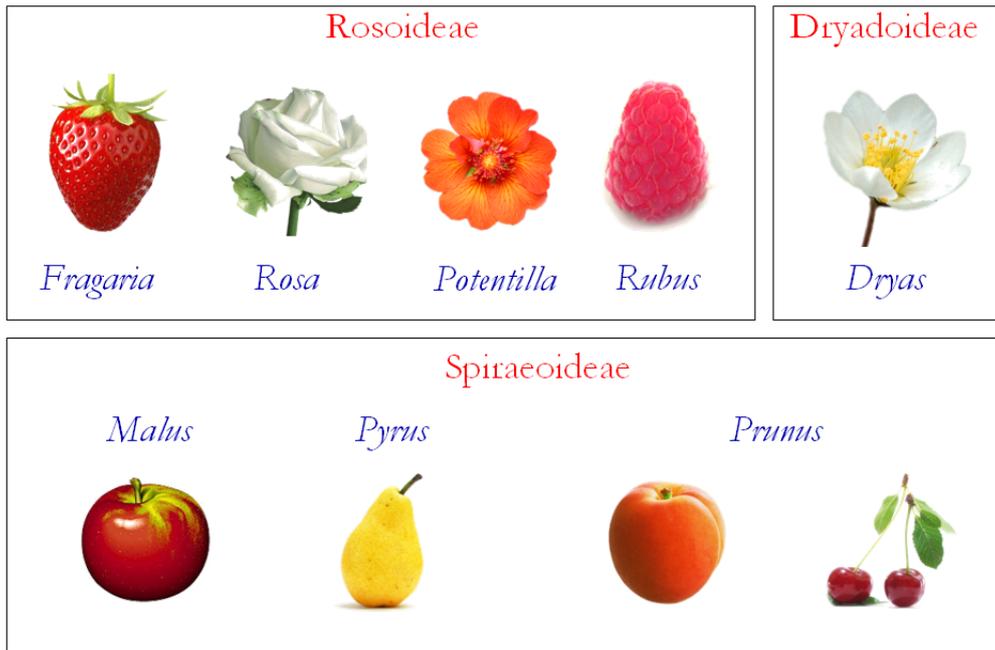


Figure 14 : Composition de la famille des Rosacées (Potter et al., 2007). La famille des Rosacées comprend trois sous-familles : les Rosoideae, les Dryadoideae et les Spiraeoideae. Des exemples de genres composant ces sous-familles sont donnés.

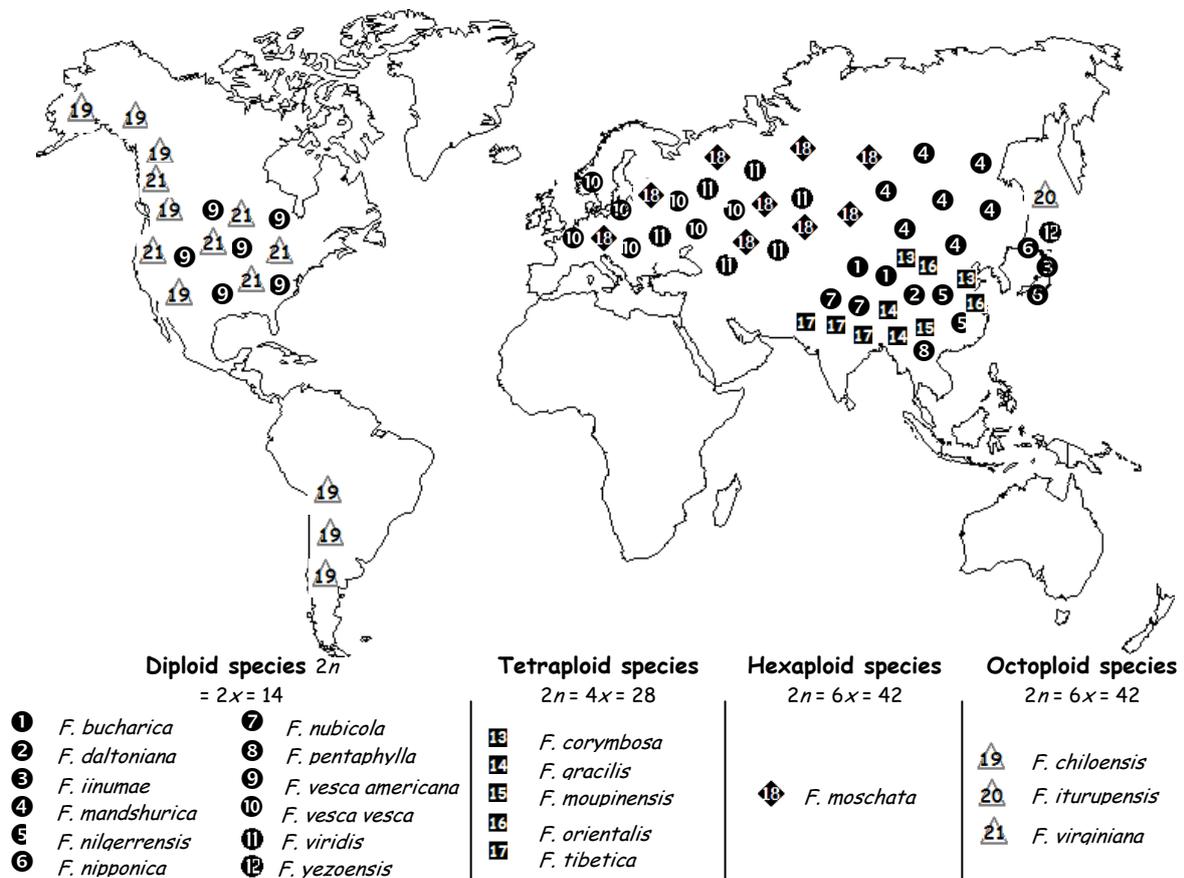


Figure 15 : Répartition géographique de l'ensemble des espèces du genre *Fragaria* (Rousseau-Gueutin et al., 2009).

II.3. Le genre *Fragaria*

Le genre *Fragaria* appartient à la famille des *Rosacées*. Cette famille comprend des espèces d'importance économique telles que des arbres fruitiers (pommier, pêcher, cerisier, abricotier), des espèces herbacées fruitières (fraisier, framboisier) et des plantes ornementales (rosier, potentiller) (Figure 14). Le genre *Fragaria* appartient à la sous-famille des Rosoïdées qui regroupe également les genres *Rubus*, *Potentilla* et *Rosa* (Potter et al., 2007).

Le genre *Fragaria* regroupe 20 espèces sauvages de différents niveaux de ploïdie, du diploïde (e.g. fraisier des bois *F. vesca*, $2n=2x=14$) à octoploïde ($2n=8x=56$) (Figure 15). Une espèce décuploïde, *F. iturupensis*, a très récemment été décrite (Hummer et al., 2009). Ainsi, parmi les 20 espèces de fraisier, 11 sont diploïdes, cinq tétraploïdes, une hexaploïde, deux octoploïdes et une décuploïde. Le fraisier cultivé, *F. x ananassa*, est un hybride interspécifique issu du croisement entre deux espèces octoploïdes *F. virginiana* et *F. chiloensis*.

Chez le genre *Fragaria*, la polyploïdie semble résulter de l'unification de gamètes non réduits (Hancock et al., 1999; Hummer et al., 2009). Cet événement pourrait être de l'ordre de 1% (Hancock et al., 1999). La constitution des génomes au sein de la série de ploïdie chez le genre *Fragaria* sera détaillée dans le paragraphe II.4.3.c.

II.4. Spécificité d'une espèce polyploïde

Le fraisier cultivé étant une espèce polyploïde, les spécificités de ce type d'espèces et en particulier celles concernant les études génétiques sont présentées ici. En effet, lors des analyses génétiques et moléculaires d'une espèce polyploïde, il est primordial de prendre en compte la complexité du génome de ces espèces.

II.4.1. La polyploïdie

La polyploïdie est un phénomène de duplication de l'ensemble du génome. C'est un mécanisme majeur d'adaptation et de spéciation des plantes (Leitch and Bennett, 1997; Wendel, 2000). 70% des angiospermes ont connu au moins un événement de polyploïdisation (Masterson, 1994).

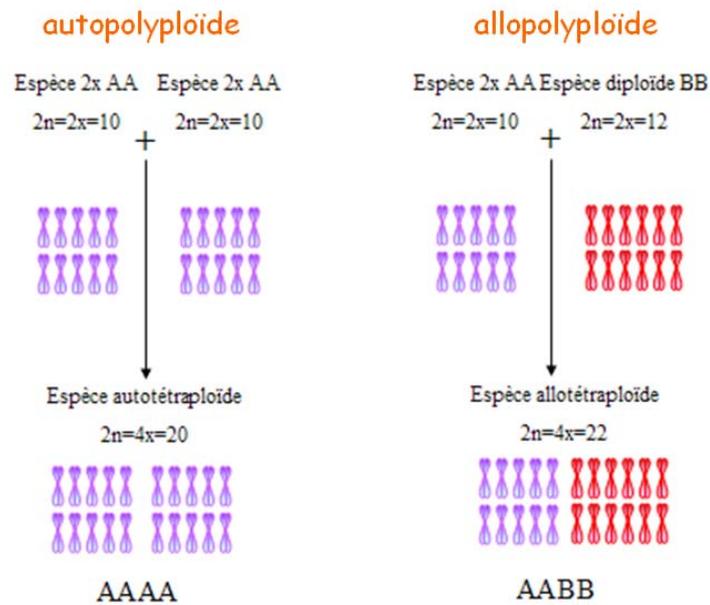


Figure 16: Schéma représentant l'origine des espèces polyplôïdes : autopolyploïde et allopolyploïde.

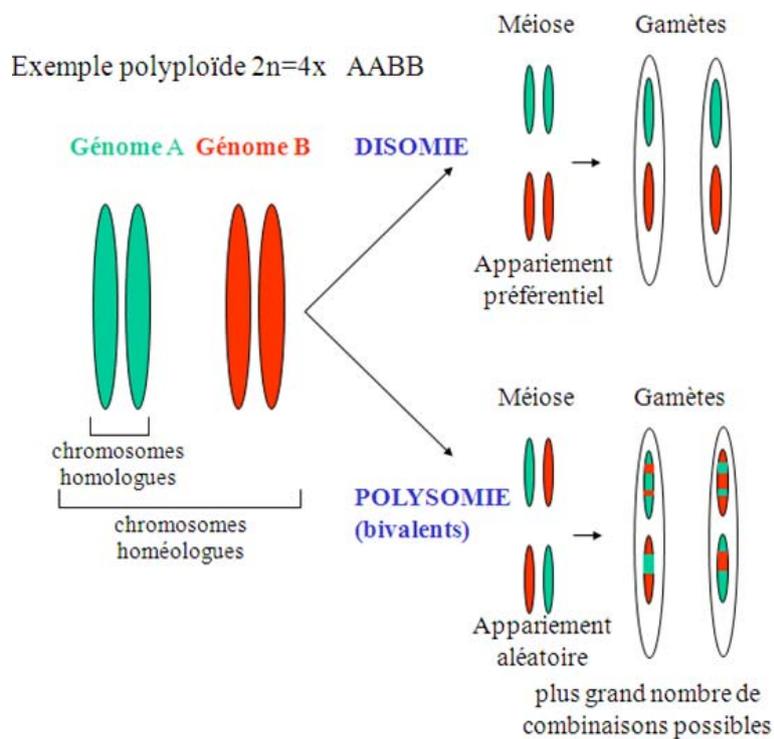


Figure 17: Le comportement méiotique d'une espèce polyplôïde, exemple d'un allotétraploïde $2n=4x$ avec une formule génomique AABB.

a. Définitions

Les polyploïdes, dont le principal évènement de formation est la production de gamètes non réduits (diplogamètes), peuvent se définir :

- selon leur origine (Figure 16) :

Un autopolyploïde dérive de la multiplication d'un simple génome ou de génomes dérivant de la même espèce (origine monophylétique).

Un allopolyploïde résulte de la combinaison de deux ou plusieurs génomes d'espèces distinctes, les deux génomes parentaux étant homéologues (origine polyphylétique). Il existe peu de recombinaison homéologue, ce qui permet de conserver un appariement stable à travers les générations.

- selon leur comportement à la méiose (Figure 17) :

Un comportement polysomique correspond à un appariement aléatoire entre les chromosomes homéologues lors de la méiose (avec ou non formation de multivalents).

Un comportement disomique correspond à un appariement préférentiel entre les chromosomes homologues lors de la méiose (formation de bivalent simplement).

En général, les espèces autopolyploïdes et allopolyploïdes ont un comportement polysomique et disomique, respectivement (Osborn et al., 2003).

b. Généralités

De nombreuses plantes d'intérêt économique ont subi un évènement de polyploïdie. Certaines sont autopolyploïdes, comme la betterave à sucre (3x), la pomme de terre (4x) ou la luzerne (4x). D'autres sont allopolyploïdes, comme le colza, le blé, le coton, l'avoine, le café ou la canne à sucre. De plus, des espèces diploïdes actuelles peuvent avoir subi des évènements de polyploïdisation au cours de leur évolution comme le maïs (Gaut and Doebley, 1997) ou *A. thaliana* (Blanc et al., 2000): Ces espèces sont dites paléopolyploïdes (Osborn et al., 2003).

L'augmentation du nombre de chromosomes et la redondance du génome créées par la polyploïdie sont depuis longtemps reconnues comme un facteur important dans l'évolution des plantes à fleur. La juxtaposition de deux génomes, identiques ou non, au sein d'un même noyau peut être à l'origine de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles dès les premières générations qui suivent l'évènement de polyploïdisation (Osborn et al., 2003). Ces changements peuvent apporter un avantage adaptatif à l'espèce polyploïde lui permettant de coloniser de nouvelles niches écologiques (Soltis and Soltis, 2000; Thompson et al., 2004). Les mécanismes par lesquels la polyploïdie contribue à de nouvelles variations sont mal connus mais on suppose que les gènes dupliqués libérés des contraintes de leur fonction pourraient diverger et créer de nouveaux phénotypes chez les polyploïdes (Osborn et al., 2003).

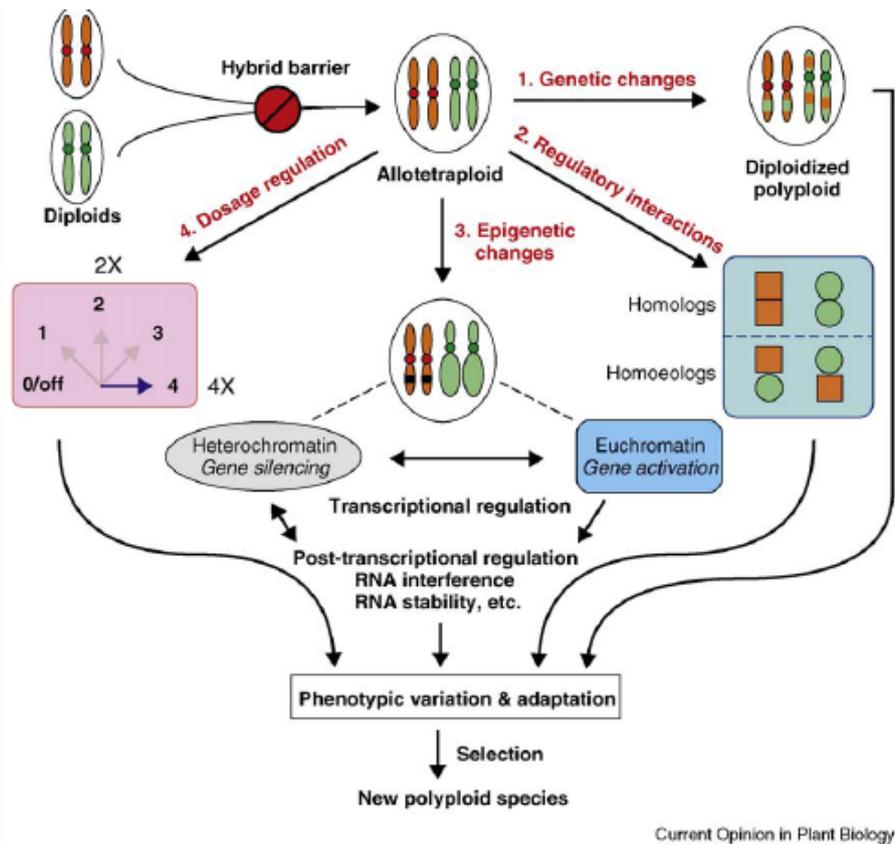


Figure 18 : Les mécanismes entraînant des changements de l'expression des gènes chez les espèces polyploïdes (Jackson and Chen, 2010)

1. Des changements génétiques (comme des réarrangements chromosomiques et des pertes de gènes) peuvent entraîner des variations dans l'expression de gènes et des variations phénotypiques. Certains gènes dupliqués peuvent diverger au niveau de leur profil d'expression.
2. Des protéines produites à partir de gènes orthologues peuvent générer des produits incompatibles conduisant au 'silencing' d'un des gènes homéologues. Au contraire, les protéines homéologues peuvent être plus performantes que les formes homozygotes.
3. Les profils d'expression des gènes peuvent être reprogrammés par des changements épigénétiques chez un nouveau allopolyploïde.
4. La régulation de dose suggère des effets additifs dans de l'expression de gènes chez un polyploïde conduisant à l'augmentation des niveaux d'expression et de la variation phénotypique.

Les changements d'expression des gènes entraînés par la polyploïdie, peuvent être sélectionnés par des forces naturelles ou artificielles qui facilitent leur adaptation et leur développement.

Chez les Poacées comme chez les genres *Brassica* ou *Gossypium* ; il est possible de créer des espèces polyploïdes synthétiques. La comparaison entre les génomes d'espèces polyploïdes synthétiques, des espèces polyploïdes naturelles (blé, colza, coton) et de leurs espèces diploïdes ancestrales permet de mettre en évidence des modifications structurales ou d'expression de gènes qui interviennent juste après l'évènement de polyploïdisation et/ou au cours de l'évolution.

c. Conséquences de la polyploïdisation : les modifications génomiques et les changements d'expression des gènes chez les polyploïdes (Figure 18)

- **Modification génomique**

De nombreux changements génétiques et épigénétiques se déroulent rapidement après la formation d'un polyploïde, et dans certains cas, sont associés à l'altération d'expression de gènes et de phénotypes (Chen and Ni, 2006; Jackson and Chen, 2010).

Les changements génétiques sont dus à des pertes, des gains ou des modifications de la séquence de nombreux fragments d'ADN dans les générations suivant immédiatement la formation du polyploïde. Par exemple, une première étude réalisée chez les *Brassica* avait montré que dès les premières générations qui ont suivi l'évènement de polyploïdisation, les génomes des espèces synthétiques ont montré la perte ou le gain de fragments d'ADN par rapport aux espèces diploïdes parentales (Song et al., 1995). Les mécanismes potentiels pouvant générer ces changements sont les recombinaisons homéologues, les translocations réciproques, les mutations ponctuelles et les conversions de gènes.

Les changements épigénétiques n'impliquent pas d'altérations dans les séquences d'ADN mais affectent l'expression des gènes à travers des modifications comme la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'empaquetage des chromosomes. Par exemple, dans des populations allopolyploïdes récentes de *Tragopogon*, il a été observé que 5% des gènes analysés ont été inactivés alors que 4% présentaient une nouvelle expression (Soltis et al., 2004).

- **Les variations dans l'expression des gènes**

La polyploïdisation va entraîner des phénomènes de répression de gènes, de dominance génétique, de sous-fonctionnalisation ou de nouvelle activation dus par exemple à des changements dans les réseaux de régulation ou à des variations d'expression des gènes. Ces variations dans l'expression des gènes vont entraîner des modifications phénotypiques dont certaines peuvent avoir un avantage sélectif (Osborn et al., 2003; Jackson and Chen, 2010).

II.4.2. Cartographie génétique d'une espèce polyploïde : exemple du fraisier cultivé octoploïde

a. Généralités

La cartographie génétique est une représentation graphique de la position de marqueurs génétiques et de la distance qui les sépare sur un chromosome. Une carte de liaison génétique correspond à un balisage du génome à l'aide de marqueurs. Un marqueur génétique est un fragment d'ADN présentant une variabilité, autrement dit du polymorphisme entre individus d'une descendance. Ces marqueurs ne peuvent être cartographiés que s'ils sont polymorphes au sein d'une population en ségrégation. L'estimation de la distance génétique entre deux marqueurs polymorphes est ensuite calculée à partir de la fréquence de recombinaison qui existe entre ces marqueurs. Après avoir estimé les distances génétiques entre l'ensemble des marqueurs et déterminé s'ils étaient liés ou indépendants, ceux-ci sont regroupés en groupes de liaison. L'ensemble des groupes de liaison va représenter la carte de liaison génétique, sur laquelle des gènes ou des QTL d'intérêt (locus impliqué dans la variation d'un caractère quantitatif) pour l'amélioration d'une espèce vont pouvoir être positionnés.

Pour réaliser une carte génétique, il faut disposer de marqueurs génétiques et d'une descendance en ségrégation.

b. Construction de la carte de liaison génétique

La cartographie génétique d'une espèce polyploïde s'avère plus ou moins complexe en fonction du comportement méiotique (disomique ou polysomique) de l'espèce. Le fraisier cultivé octoploïde ayant été montré comme ayant un comportement essentiellement disomique (Rousseau-Gueutin et al., 2008), l'établissement de la carte de liaison génétique va être similaire à celle d'une espèce diploïde, tout en conservant certaines particularités qui seront présentées ci-dessous.

Une carte de liaison génétique est construite à partir d'une descendance en ségrégation ; les parents sont donc choisis afin de maximiser les chances d'obtenir du polymorphisme moléculaire dans la descendance (Plomion, 1995). Plusieurs types de descendance sont utilisables en cartographie, il faut optimiser le choix selon les contraintes biologiques de l'espèce à cartographier.

Le fraisier cultivé octoploïde étant majoritairement allogame et donc très hétérozygote, la descendance utilisée pour réaliser sa cartographie génétique est une population F1 de type double pseudo test-cross (Grattapaglia and Sederoff, 1994). Ce type de croisement est analogue à deux tests-cross réciproques : l'un des parents est considéré comme le testeur de l'autre et vice-versa, même si la configuration génétique parentale initiale est inconnue (Qu and Hancock, 2001). Ce type de population a souvent été utilisé chez les espèces allogames



Figure 19 : Phases de liaison en couplage et en répulsion pour quatre allèles. Les traits symbolisent les chromosomes.

où l'obtention de lignées pures est difficile. En effet, ce type de population permet d'étudier de taux de recombinaison sans disposer d'information génétique préalable (Da Silva and Sobral, 1996).

Dans les populations octoploïdes F1 (pseudo test-cross), seuls les marqueurs « simple dose » (SD) présentant une ségrégation 1:1 sont retenus car ils se cartographient sans ambiguïté sur un seul groupe de liaison (Aljanabi et al., 1993). Ce type de marqueurs est présent en un seul exemplaire chez l'un des parents (configuration simple dose, SD) et absent chez l'autre (configuration nulli dose, ND). Les configurations parentales des marqueurs qui seront conservés a posteriori pour le double pseudo test-cross sont les suivantes :

	Femelle	x	Mâle	
(1)	Aa aa aa aa	x	aa aa aa aa	(marqueur de type SD*ND)
(2)	aa aa aa aa	x	Aa aa aa aa	(marqueur de type ND*SD)

(SD, simple dose et ND, nulli dose)

Deux cartes de liaison génétique sont donc établies à partir du même croisement : les cartes femelle et mâle sont construites avec les marqueurs permettant d'observer les événements méiotiques chez le parent femelle et mâle (configurations (1) et (2) respectivement). La distinction des marqueurs « simple dose » des autres marqueurs "multi dose" est possible en testant si le marqueur en ségrégation présente un ratio de type 1:1 plutôt qu'un ratio égal ou supérieur à 3:1 (test de chi-2) (Lerceteau-Köhler et al., 2003).

La réalisation de la carte de liaison génétique d'une espèce hétérozygote nécessite tout d'abord la construction de cartes parentales à partir de marqueurs en phase de couplage, puis à partir des marqueurs en phase de couplage/répulsion (Figure 19).

c. Cartes de liaison génétique disponibles chez *Fragaria*

La première carte génétique dans le genre *Fragaria* a été réalisée chez l'espèce diploïde *F. vesca* L. (Davis and Yu, 1997), puis la première carte de *F. x ananassa* Duch. a été publiée en 2003 (Lerceteau-Köhler et al., 2003). L'ajout de marqueurs microsatellites et l'élargissement de la taille de la population à 213 individus ont permis d'obtenir une carte presque saturée (Rousseau-Gueutin et al., 2008) avec 28 (2582 cM) et 26 (2165 cM) groupes de liaison chez les cartes femelle et mâle respectivement. Parmi ces groupes de liaison, 21 contenaient des marqueurs en couplage/répulsion suggérant un comportement disomique majoritaire mais pas exclusif. Chez les espèces octoploïdes, trois autres cartes ont récemment été réalisées, soit à l'aide de marqueurs AFLP (Spigler et al., 2008; Weebadde et al., 2008), soit à l'aide de marqueurs SSR (Sargent et al., 2009).

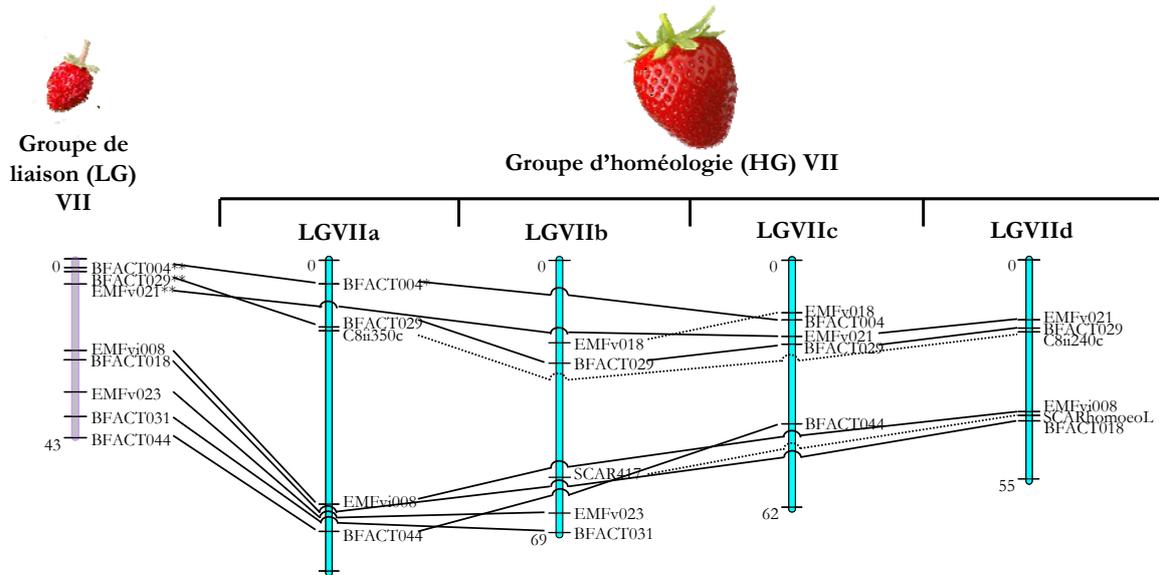


Figure 20 : Exemple de cartographie comparée entre le groupe de liaison VII (LGVII) de la carte de liaison génétique du fraisier diploïde et le groupe d’homéologie VII (HGVII) de la carte de liaison génétique consensus du fraisier octoploïde. Au groupe de liaison VII de la carte de liaison génétique du fraisier diploïde correspond le groupe d’homéologie VII de la carte de liaison génétique du fraisier octoploïde composé de quatre groupes de liaison VIIa, VIIb, VIIc et VIId.

II.4.3. Le fraisier diploïde modèle génétique pour l'étude du fraisier octoploïde

Le génome octoploïde du fraisier cultivé ($2n=8x=56$), *F. x ananassa*, compte parmi les plus complexes des espèces cultivées. En contraste, la taille de base du génome du fraisier diploïde ($2n=2x=14$), 200 Mb, compte parmi les plus petites des espèces cultivées. Parmi les espèces diploïdes, *F. vesca* ($2n=2x=14$) présente des caractéristiques qui en font un modèle très intéressant pour le genre *Fragaria*, mais aussi pour d'autres membres de la famille des Rosacées (Slovin et al., 2009). Ainsi, cette espèce est développée en tant que système efficace pour étudier la génétique et la génomique des fraisiers mais également des autres espèces de la famille des Rosacées (Rabinowicz and Slovin, 2007; Shulaev et al., 2008).

a. *Le fraisier diploïde présente de nombreux avantages*

Le fraisier diploïde *F. vesca* ($2n=2x=14$) possède un petit génome (200 Mb), la taille du plant est petite, le temps de régénération est rapide puisqu'un cycle de vie peut être complet en quatre mois, et l'espèce est facilement transformable. De plus, sa faculté de produire des stolons permet la multiplication végétative d'un génotype.

Au début de ma thèse, seulement 1% des séquences de génome du fraisier était disponible sur les bases de données (Genome Database for Rosaceae GDR <http://www.rosaceae.org/> et National Center for Biotechnology Information NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Au cours de ma thèse, le séquençage du génome complet du fraisier diploïde a été réalisé et devrait être accessible à l'ensemble de la communauté scientifique à la fin de l'année 2010. La dernière année de ma thèse, j'ai pu accéder au séquençage en cours à travers un consortium. Aujourd'hui, la comparaison entre les génomes des Rosacées est en cours puisqu'on dispose des génomes du pommier (Velasco et al., 2010), du pêcher (<http://www.rosaceae.org/peach/genome>) et du fraisier (Shulaev et al., submitted).

Des études de cartographie comparée ont déjà montré qu'il était possible de transférer des marqueurs développés sur le fraisier diploïde aux autres genres de la famille des Rosacées, comprenant des arbres (pomme, poirier et cerisier) et le rosier ainsi que le fraisier cultivé octoploïde (Sargent et al., 2007; Rousseau-Gueutin et al., 2008).

b. *L'information moléculaire obtenue chez l'espèce diploïde peut être transférée à l'espèce cultivée octoploïde*

Une étude de cartographie génétique comparée (Rousseau-Gueutin et al., 2008) a démontré que peu d'évènements importants de restructuration du génome ont eu lieu entre les fraisiers diploïde et octoploïde. En effet, la macrosynténie et la macrocolinéarité entre les génomes des fraisiers diploïdes et octoploïdes sont conservées (Figure 20). Ce résultat montre que l'espèce diploïde *F. vesca* peut servir de modèle au sein du genre *Fragaria*.

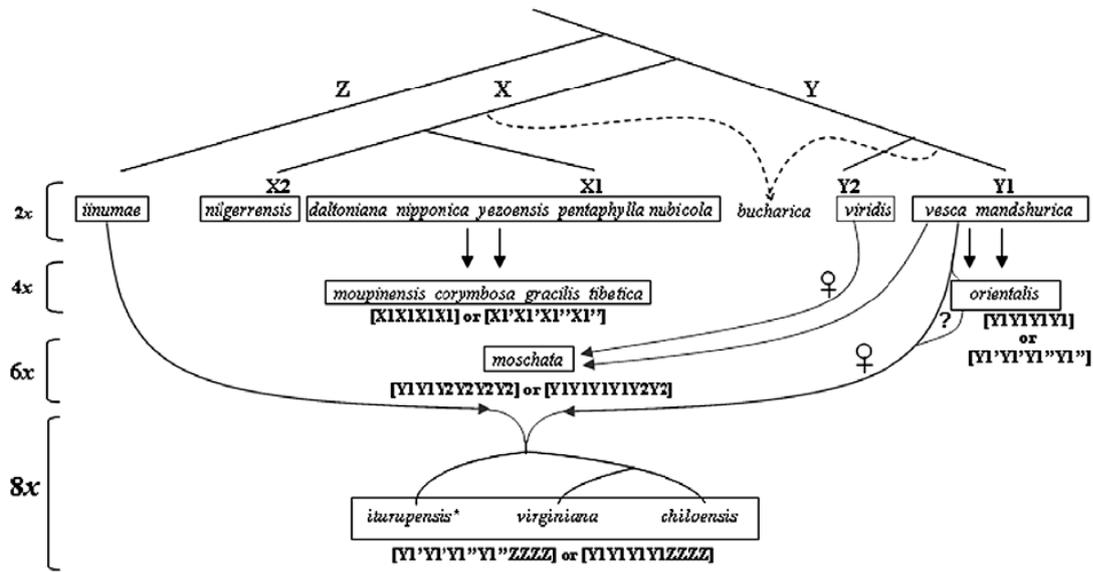


Figure 21 : Histoire évolutive des espèces diploïdes et polyploïdes du genre *Fragaria* (Rousseau-Gueutin et al., 2009).

Ainsi, l'information moléculaire obtenue chez l'espèce diploïde pourra être transférée à l'espèce octoploïde complexe *F. x ananassa*, ce qui devrait faciliter la compréhension des bases génétiques de caractère d'intérêt chez le fraisier octoploïde (Rousseau-Gueutin et al., 2008).

c. *L'espèce diploïde, F. vesca, est proche d'un des génomes impliqués dans la structure génomique du fraisier cultivé octoploïde*

Dans un premier temps, la définition de la composition génomique du fraisier octoploïde a été limitée à des analyses classiques de cytologie de la configuration méiotique comprenant l'examen de l'importance de la formation de bivalents ou multivalents dans les hybrides interspécifiques et les polyploïdes artificiels dérivés d'un doublement chromosomique. Ces études ont été limitées par la petite taille et la différenciation minimale des chromosomes de *Fragaria* (Folta and Davis, 2006).

Toutefois, différentes formules génomiques des espèces octoploïdes ont été énoncées, la première étant AAAABBCC (Federova, 1946). Elle a ensuite été modifiée en AAA'A'BBBB après avoir observé que les génomes A et C présentaient une forte homologie (Senanayake and Bringham, 1967). Enfin, cette formule a été remodifiée en AAA'A'BBB'B' par (Bringham, 1990) suite à l'observation de bivalents lors de la méiose (Byrne and Jelenkovic, 1976). Cependant, l'observation de bivalents n'est pas strictement liée à une hérédité de type disomique. L'espèce diploïde *F. vesca* était considérée par Senanayake et Bringham (Senanayake and Bringham, 1967) comme étant à l'origine du génome A et cette hypothèse avait été renforcée par des analyses phylogénétiques réalisées sur l'ADN mitochondrial ou chloroplastique (Potter et al., 2007). Cependant, ces différentes analyses ne prenaient pas en compte l'ensemble des espèces identifiées de *Fragaria*. Une étude récente de phylogénie basée sur l'analyse de deux gènes nucléaires a montré que plusieurs événements de polyploïdisation indépendants avaient eu lieu au sein du genre (Rousseau-Gueutin et al., 2009) (Figure 21). De plus, cette étude a permis de suggérer que *F. vesca* ou *F. mandshurica* étaient à l'origine du génome A et A' et *F. iinumae* à l'origine du génome B. Des résultats non publiés conduits sur la totalité du génome du chloroplaste montrent que ce serait *F. vesca subsp bracteata*, plus proche de *F. mandshurica* que de *F. vesca* qui serait à l'origine du génome A et A' (Basil, communication personnelle).

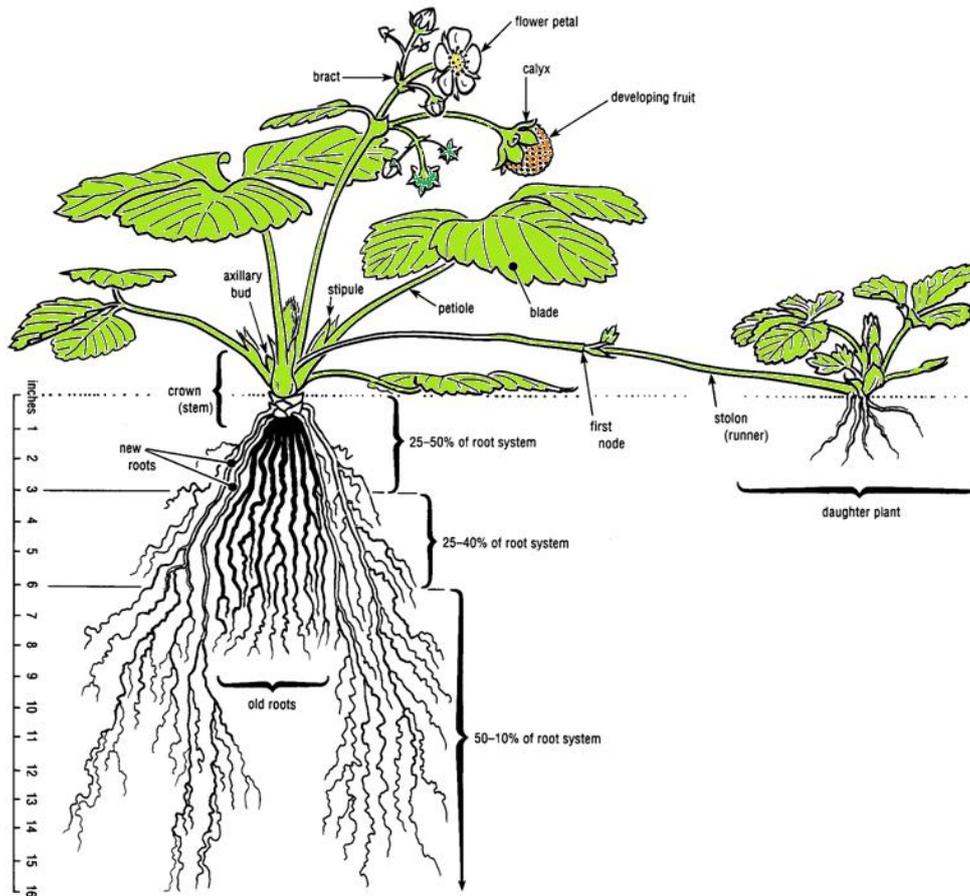


Figure 22 : Aspect général d'un plant de fraisier.

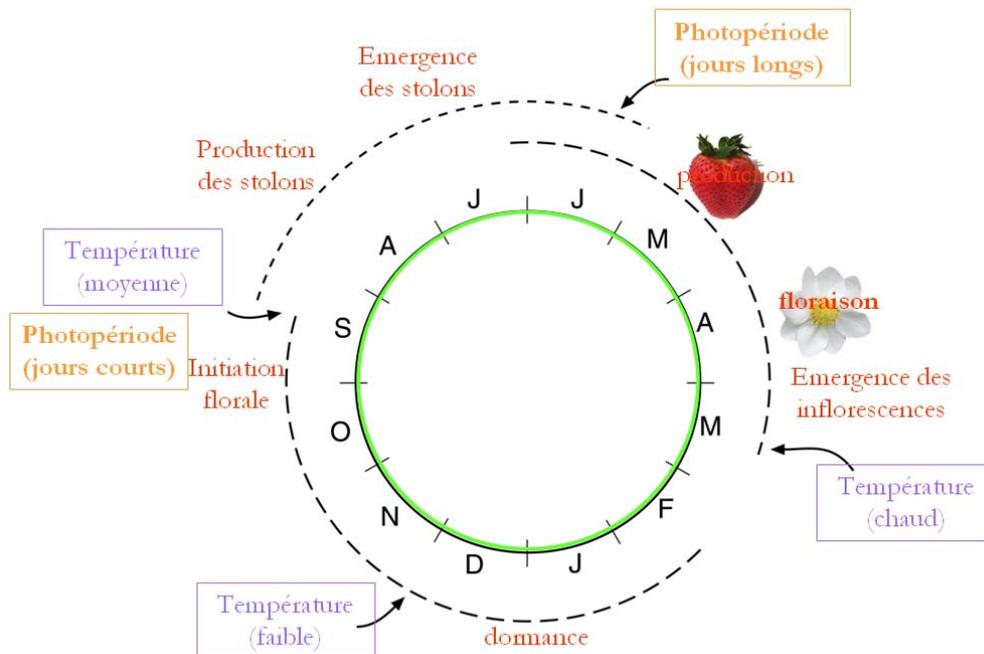


Figure 23 : Cycle général de développement d'un fraisier au cours d'une année.

II.5. Cycle de vie du fraisier : entre reproduction sexuée et multiplication végétative

II.5.1. Biologie du fraisier

Le fraisier est une plante herbacée pérenne avec une tige très courte portant une rosette de feuilles alternes et trifoliées formant un cœur. L'imbrication étroite des feuilles rend difficile l'étude de son développement (Figure 22). L'inflorescence est une cyme bipare. Les fleurs sont composées de cinq sépales, cinq pétales, une vingtaine d'étamines et de nombreux carpelles. Après fécondation, les fruits secs et indéhiscent sont des akènes et sont disposés dans des alvéoles plus ou moins profondes du réceptacle floral. Ce dernier va grossir sous l'effet des auxines pour donner le fruit complexe charnu qu'est la fraise.

Plante vivace, le fraisier subit au cours des saisons de profondes transformations qui permettront successivement sa survie dans les conditions de froid hivernal, la floraison suivie de la production de fruits et l'émergence de stolons permettant la multiplication végétative. De façon générale, le cycle de développement d'un fraisier présente quatre étapes (Risser and Navatel, 1997) : (1) une phase de développement et de croissance végétative avec production de stolons, (2) une phase d'initiation florale, (3) une phase de ralentissement de croissance lorsque le plant entre en dormance, initiée par la diminution de la photopériode et de la température, (4) une phase de production de fleurs et de fruits (Figure 23). La période et la durée des différentes phases dépendent du comportement remontant ou non remontant du fraisier.

II.5.2. Multiplication végétative par la production de stolons

Le fraisier est capable de se multiplier végétativement grâce aux stolons. Les stolons sont des ramifications particulières dont les deux premiers entre-nœuds sont anormalement allongés. Le second nœud au contact avec le sol va entraîner la production de racines, puis la vie autonome du jeune plant ainsi formé (Figure 24). Les stolons sont produits par les bourgeons axillaires qui selon les conditions environnementales produisent des stolons ou des ramifications secondaires de la tige principale. Les stolons permettent d'obtenir de nombreux clones d'un même génotype.

D'une façon générale, tout comme la floraison, la production de stolons est affectée par la température et la photopériode (Stewart and Folta, 2010). Les conditions photo-thermiques favorables à la production de stolons sont spécifiques du génotype. En général, la production de stolons est stimulée par des jours longs (>14-16h) et des températures élevées (>17-20°C) (Darrow, 1966; Heide, 1977; Durner et al., 1984; Bradford et al., 2010). L'inhibition de la production de stolons en jours courts semble liée aux métabolismes des gibbérellines (Hytonen et al., 2009).

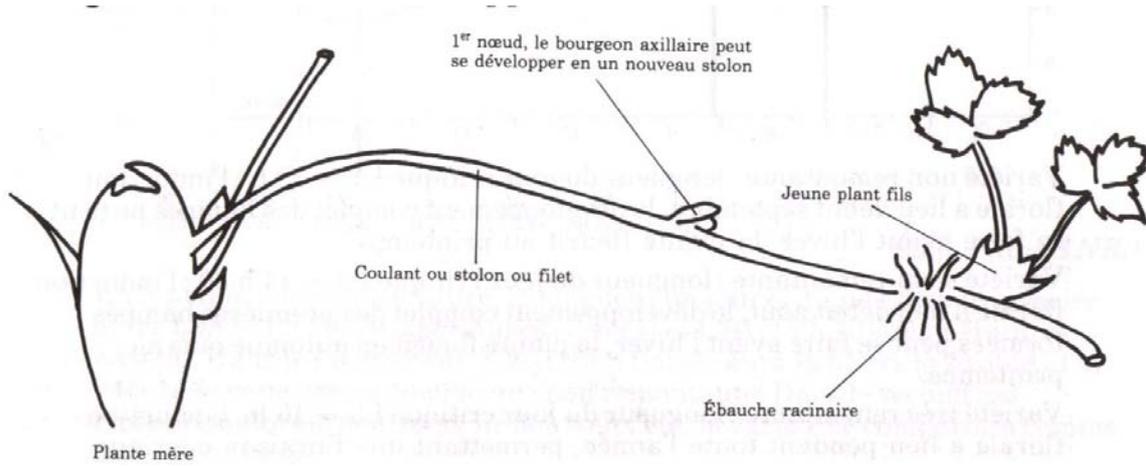


Figure 24 : Schéma d'un bourgeon axillaire se développant en stolon (Risser and Navatel, 1997).

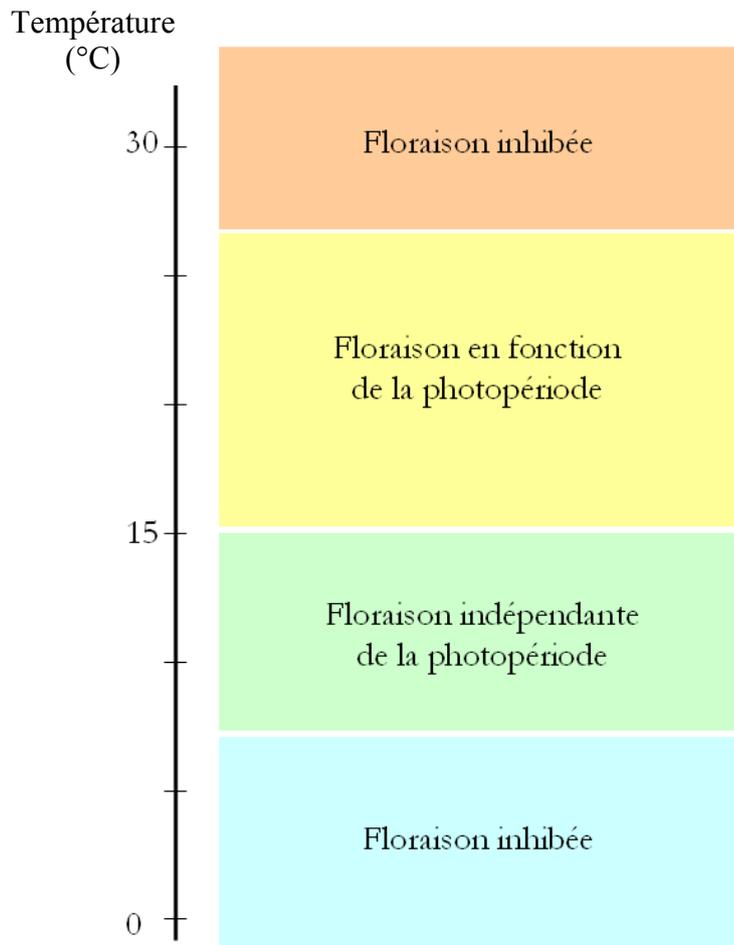


Figure 25 : Impact de la température sur la floraison.

II.5.3. La floraison

Les fraisiers présentent une large distribution sur l'hémisphère nord et les différentes espèces se distribuent des tropiques à des latitudes de 70°N (Darrow, 1966). Certaines espèces sont réparties sur l'ensemble de l'hémisphère Nord comme *F. vesca* et d'autres ont une aire de répartition étroite comme *F. iinumae* présente essentiellement au Japon. La large distribution de certaines espèces met en évidence leur adaptabilité à différentes conditions de développement et notamment leur capacité à croître et fleurir dans des environnements très différents (Darrow, 1966). La physiologie de la floraison chez le fraisier a été largement étudiée à cause de ses conséquences économiques (Sonsteby and Heide, 2008a).

a. Facteurs influençant la floraison chez le fraisier

- **Effet de la température**

La floraison chez le fraisier est gouvernée par l'interaction étroite entre photopériode et température (Bradford et al., 2010). Déjà en 1966, Darrow décrivait l'influence de la température sur l'initiation florale du fraisier, indiquant la difficulté d'une classification des variétés en fonction de la photopériode comme c'est généralement le cas.

L'effet de la température sur la floraison du fraisier peut être résumé ainsi (Figure 25):

- pour des températures basses (<9°C), la floraison du fraisier est inhibée,
- entre 10°C et 15°C, la floraison est activée quel que soient les conditions de photopériode (Brown and Wareign, 1965; Guttridge, 1985),
- entre 15°C et 25°C, le génotype fleurit en fonction des conditions de photopériode,
- au dessus de 25°C, la floraison du fraisier est inhibée (Ito and Saito, 1962).

Les réponses sont analogues chez les fraisiers diploïdes et octoploïdes, bien que les optimums de température et les limites soient souvent plus élevés pour *F. x. ananassa* que pour *F. vesca* (Sonsteby and Heide, 2007a, b, 2008b; Bradford et al., 2010).

- **Besoin en froid : effet de la vernalisation**

Les besoins en froid sont nécessaires pour lever la dormance des bourgeons et permettre la poursuite du développement floral au printemps (Stewart and Folta, 2010). Les besoins en froid sont très dépendants du génotype (Darnell and Hancock, 1996). Ils peuvent être définis comme le nombre d'heures cumulées entre 0°C et 7°C permettant de satisfaire les besoins du fraisier, c'est-à-dire permettant une reprise de la croissance normale lorsque les températures sont en hausses.

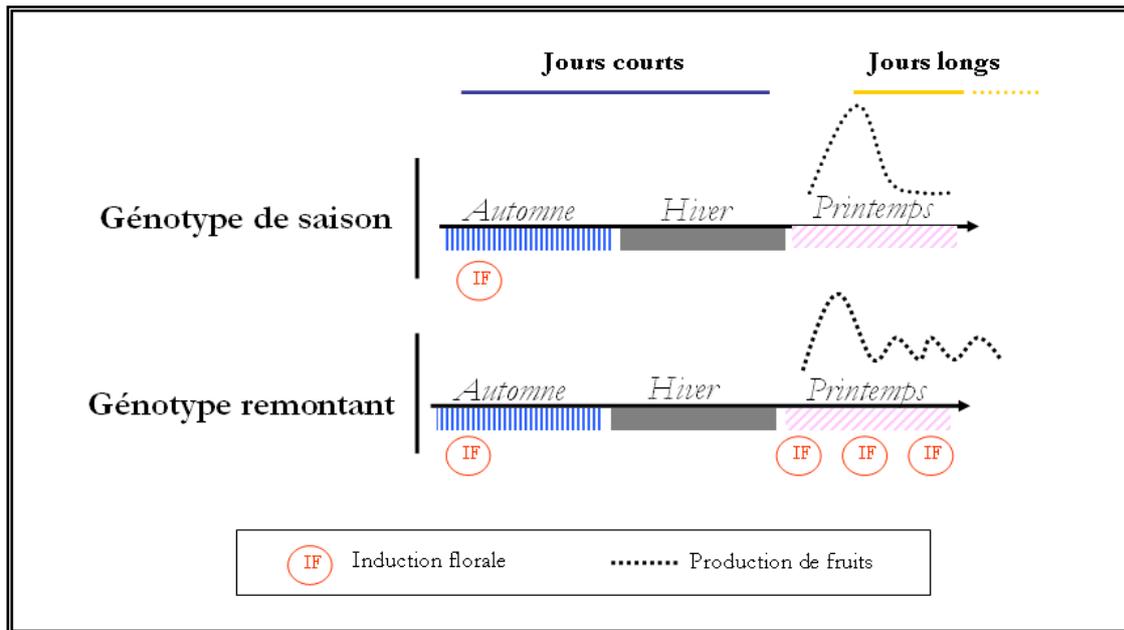


Figure 26 : Les deux modes de floraison chez le fraisier. Les génotypes de saison ou non remontants présentent une induction florale en automne et fleurissent au printemps. Les génotypes remontants présentent une première induction florale à l'automne qui conduit à une floraison au printemps puis sont capables d'induire à nouveau leur floraison tout au long de la période végétative, ce qui entraîne un allongement de la période de production de fleurs et de fruits.

La vernalisation favorise le développement végétatif et reproductif (Darnell and Hancock, 1996). La vernalisation favorise la croissance végétative et réduit l'induction florale alors qu'elle favorise la différenciation florale (Durner and Poling, 1987). Un génotype non vernalisé produit des fruits plus petits (Hamann and Poling, 1997) et de moins bonne qualité (Bringhurst et al., 1960) que ce même génotype avec une vernalisation adéquate.

- **Effet de l'âge du plant**

Les jeunes plants allouent les ressources pour la croissance végétative et ne fleurissent pas durant la période juvénile (Stewart and Folta, 2010). Ainsi, le plant atteint une taille suffisante avant la floraison pour permettre le développement de la fleur, du fruit et de la graine. La plante doit développer environ 10 feuilles avant de pouvoir être réceptive aux stimuli de la floraison (Risser, communication personnelle).

b. La remontée florale

Le fraisier cultivé octoploïde *F. x ananassa*, comme le fraisier diploïde *F. vesca*, présentent deux modes de floraison qui affectent la durée de floraison. Le premier mode de floraison caractérise les fraisiers dits 'de saison' ou 'non remontants' qui initient leur floraison en automne et fleurissent au printemps. Le second mode de floraison caractérise les fraisiers dits 'remontants', capables d'initier la floraison tout au long de la période végétative (Figure 26). La 'remontée florale' est la capacité d'une plante à fleurir tout au long de l'année.

La 'remontée florale' constitue un caractère d'intérêt agronomique puisqu'un génotype remontant va présenter une extension de la période de floraison et donc de la production de fruits. Ce caractère se retrouve chez d'autres espèces et notamment des espèces ornementales telles que le rosier.

- **Les fraisiers non remontants**

L'induction florale des fraisiers non remontants se déroule en jours courts. Ces fraisiers sont considérés comme des plantes de jours courts (Darrow, 1966). Darrow (1966) a montré que des photopériodes de 9,5h à 13,5h étaient favorables à l'induction de la floraison des fraisiers non remontants avec un optimum de 12h. Bien que ce modèle soit généralement vrai, il existe des variations dans cette gamme en fonction des génotypes.

Une photopériode de jours courts est nécessaire pour induire la floraison, mais la poursuite du développement floral est favorisée par des jours longs (Stewart and Folta, 2010). En effet, des études ont montré que des variétés de jours courts placées de façon continue en jours courts présentent un développement plus lent des bourgeons floraux que des variétés

placées d'abord en jours courts puis en jours longs (Moore and Hough, 1962; Durner and Poling, 1987). Ainsi, Salisbury et Ross (Salisbury and Ross, 1992) considèrent que les fraisiers sont des plantes de jours courts pour l'induction florale et de jours longs pour le développement floral.

- **Les fraisiers remontants**

Chez le fraisier, ce caractère a été décrit pour des fraisiers présentant deux niveaux de ploïdie. La première description a été faite par Jérôme Bock en 1532 chez le fraisier des bois, *F. vesca* (Duchesne, 1766). Plus récemment, ce caractère a été décrit chez les espèces octoploïdes, *F. virginiana* et *F. x ananassa* (Darrow, 1966).

La remontée florale, en permettant l'allongement de la période de production, intéresse particulièrement les producteurs. Déjà en 1899, Henri de Vilmorin dans son article "Perpetual strawberries" faisait part de l'intérêt des variétés remontantes : "Strawberries are so wholesome and health-preserving, so [fragrant and] delicious, that it is small wonder that everyone should endeavour to make the season during which they are available last as long as possible."

(1) *La remontée florale chez le fraisier diploïde*

Une seule origine de la remontée florale a été décrite chez le fraisier diploïde (Darrow, 1966; Stewart and Folta, 2010). Le fraisier remontant, *F. vesca semperflorens*, découvert dans les Alpes, est un mutant du fraisier des bois diploïde commun qui se montre plus vigoureux (Duchesne, 1766). Il fleurit dès trois mois après germination et continue à fleurir même en hiver jusqu'aux froids sévères de novembre et décembre. Il fut l'un des premiers fraisiers à être cultivé. Comme mentionné précédemment, il a été décrit pour la première fois décrit en 1532 par Jérôme Bock comme fleurissant et fructifiant dans les Alpes tout au long de la période végétative. Il prend de l'importance dans le milieu du XVIII^{ème} siècle où il est multiplié en France et en Angleterre.

D'abord considéré comme plante insensible à la photopériode (Brown and Wareign, 1965; Battey et al., 1998), il semble en fait être gouverné par une interaction étroite entre la photopériode et la température (Sonsteby and Heide, 2008b). En effet, à 9°C, le génotype remontant produit autant de hampes florales en jours courts qu'en jours longs. Par contre, pour des températures supérieures à 9°C, le génotype remontant produit plus de hampes florales en jours longs qu'en jours courts. A 27°C, le génotype remontant ne produit plus que en condition de jours longs. Ainsi, le fraisier diploïde remontant est considéré comme une plante de jours longs (Sonsteby and Heide, 2008b).

(2) La 'remontée florale' chez le fraisier octoploïde

Chez les fraisiers octoploïdes, différentes sources du caractère 'remontée florale' ont été décrites et ont été introgressées chez le fraisier cultivé (Stewart and Folta, 2010). La description de ces différentes sources suggère que des génotypes octoploïdes remontants sont apparus indépendamment en Europe et en Amérique du Nord.

Ainsi, la première variété octoploïde remontante est décrite en Europe. La source génétique de cette introgression n'est pas claire. D'abord supposée être l'hybride entre le fraisier octoploïde et le fraisier remontant diploïde (Fletcher, 1917), cette hypothèse a été abandonnée pour deux principales raisons. Tout d'abord, à partir d'un croisement entre *F. vesca* et *F. x ananassa*, les hybrides et une descendance fertile issue de ces hybrides sont difficiles à obtenir. De plus, ce caractère s'hérite différemment chez les deux espèces, diploïde et octoploïde, puisqu'il est récessif chez l'un et dominant chez l'autre (Clarke, 1937; Brown and Wareign, 1965). Richardson (1914) suggère que la première variété octoploïde remontante européenne soit 'Gloede's Seedling'. Elle est introduite en 1866 et doit être la source de la plupart ou de toutes les variétés européennes remontantes qui ont suivi.

La deuxième variété remontante décrite est 'Pan American' obtenue en 1898 aux Etats-Unis (Fletcher, 1917). Elle proviendrait de la mutation d'une variété non remontante 'Bismark'. La variété 'Pan-American' est la source du caractère remontant pour plusieurs variétés remontantes ayant eu un succès important auprès des producteurs. Le caractère remontant serait le résultat d'une "instabilité" à un locus. Cette hypothèse a été émise car un révertant non-remontant d'une variété remontante 'Rockhill' a été observé, la variété 'June Rockhill' (Darrow, 1966).

L'ensemble des variétés provenant de ces deux origines est classé comme des variétés de jours longs (Darrow and Waldo, 1934; Downs and A.A., 1955; Darrow, 1966).

La troisième origine de la 'remontée florale' est également américaine et est issue d'une sous-espèce de l'espèce octoploïde *F. virginiana* : *F. virginiana subsp. glauca*. Dans les années 1970, Bringhurst et Voth ont utilisé un génotype de *F. virginiana subsp. glauca* provenant des montagnes Wasath dans l'Utah pour introgresser le caractère 'remontée florale' chez les fraisiers cultivés (Bringhurst and Voth, 1984).

L'ensemble des variétés provenant de cette dernière origine est d'abord classé comme des variétés insensibles à la longueur de la photopériode (DN, day-neutral). Cependant, des travaux récents montrent que ces génotypes capables d'initier en jours longs ne peuvent initier en jours courts que lorsque les températures sont basses (Sonsteby and Heide, 2007a). Stonteby et Heide proposent donc de reclasser ces génotypes comme plantes de jours longs.

En conclusion, les génotypes non remontants sont des plantes de jours courts. Tous les génotypes remontants, quelque soit leur origine, activent leur floraison en jours longs et sont ainsi classés comme plantes de jours longs (Sonsteby and Heide, 2007a). La floraison d'un fraisier ne dépend pas seulement des conditions de photopériode, la température est également un facteur déterminant. De plus, d'autres facteurs, comme la vernalisation et l'âge du plant, influencent également le comportement à la floraison du fraisier. Par ailleurs, plusieurs études sur des descendants qui ségrégent pour la remontée florale ont montré que lors de la deuxième année de notation, un plus grand nombre de génotypes était noté remontant (Ourecky and Slate, 1967; Scott and Lawrence, 1975).

Ainsi, le comportement remontant ou non remontant d'un individu dépend de son génotype mais également de son environnement. Un même génotype peut être noté remontant dans une partie des Etats-Unis et non remontant dans une autre partie (Durner et al., 1984).

Par ailleurs, le développement reproducteur et la production de stolons sont régulés de façon opposée par la température et la photopériode. Chez les fraisiers non remontants, les conditions favorisant la production de stolons sont défavorables à la production de hampes florales et inversement. Les fraisiers remontants capables de fleurir en été produisent peu de stolons (Simpson and Sharp, 1988) voire aucun stolon pour certains génotypes remontants. Cet antagonisme entre développement végétatif et reproducteur est un phénomène largement répandu chez les plantes pérennes (Battey et al., 1998).

II.6. Contrôle génétique de la remontée florale et de la production de stolons chez *Fragaria*

Le déterminisme génétique de la remontée florale et de la production de stolons a été étudié par des analyses de ségrégation et de cartographie de QTL sur des populations en ségrégation pour ces caractères (Powers, 1954; Brown and Wareign, 1965; Bringhurst and Voth, 1978; Ahmadi et al., 1990; Hancock et al., 2002; Shaw, 2003; Serce and Hancock, 2005; Weebadde et al., 2008). La production de stolons étant antagoniste à la production de hampes florales chez le fraisier (Battey et al., 1998), le caractère 'production de stolons' a souvent été étudiée en parallèle de celui de la remontée florale (Brown and Wareign, 1965).

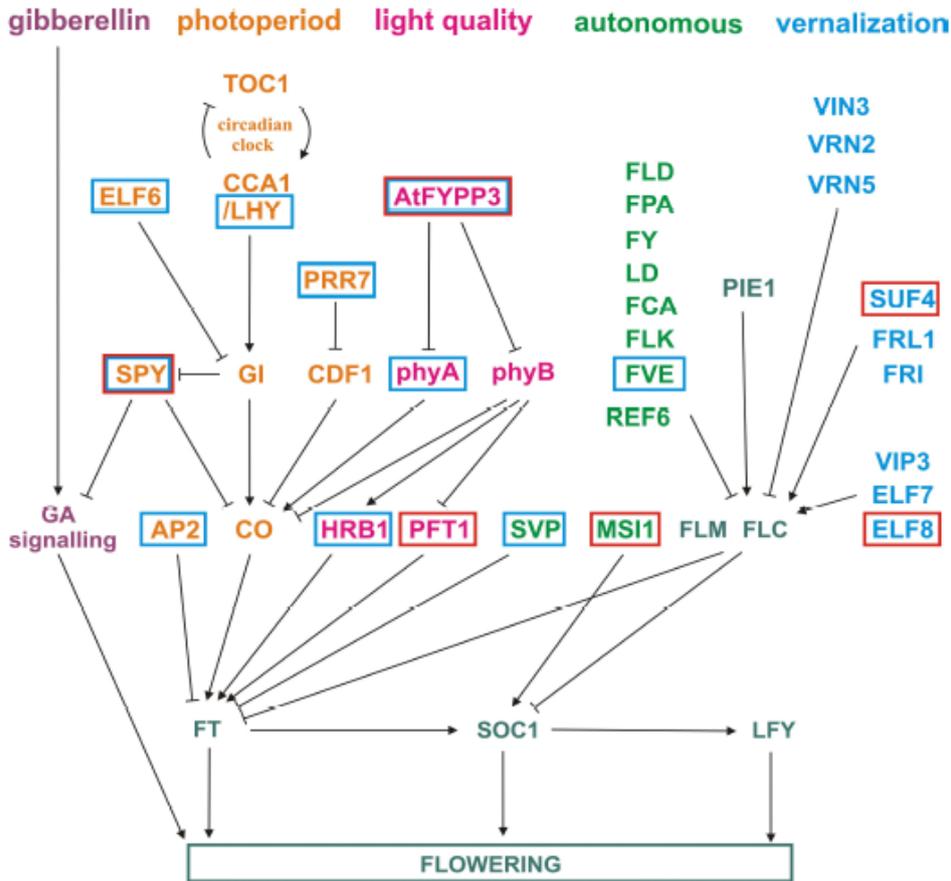


Figure 27: Schéma simplifié du réseau de gènes impliqués dans la floraison chez *Arabidopsis* et de leurs homologues chez *Fragaria* (Mouhu et al., 2009). Les gènes homologues issus des banques d'ADNc de génotypes non remontants et remontants sont encadrés en bleu et en rouge, respectivement. Les flèches indiquent une régulation positive et les barres une régulation négative.

II.6.1. Chez le fraisier diploïde

Chez *F. vesca*, la remontée florale est contrôlée par un locus majeur récessif (Brown and Wareign, 1965) nommé SFL, Seasonal Flowering Locus (Albani et al., 2004). Les individus non remontants sont homozygotes pour l'allèle dominant SFL/SFL et hétérozygotes SFL/sfl alors que les individus remontants sont homozygotes récessifs sfl/sfl. Le locus SFL a été cartographié sur le groupe de liaison VI de la carte de référence diploïde (Sargent et al., 2004). Bien que des marqueurs moléculaires aient été développés proches du locus SFL, le gène responsable n'a pas été identifié (Cekic et al., 2001; Albani et al., 2004). SFL coderait pour un répresseur de la floraison (Townsend et al., 2007; Mouhu et al., 2009).

Une étude récente (Mouhu et al., 2009) a identifié chez *F. vesca* les homologues de plusieurs acteurs principaux impliqués dans les voies de signalisation de la floraison chez *A. thaliana* (Figure 27). La comparaison de l'expression de ces gènes entre génotypes remontants et non remontants a montré peu de différences d'expression et n'a pas permis d'identifier le locus SFL.

Comme la remontée florale, la production de stolons est contrôlée par un gène majeur dominant R, Runnering locus (Brown and Wareign, 1965). A partir de la carte de référence diploïde, le locus R a été cartographié sur le groupe de liaison II (Sargent et al., 2004). De plus, Sargent (2004) a noté que la ségrégation du caractère dévie significativement du ratio attendu pour un gène dominant, suggérant que d'autres régions sont impliquées dans ce caractère.

II.6.2. Chez le fraisier octoploïde

Les résultats des analyses génétiques sur le contrôle de la remontée florale chez le fraisier octoploïde sont contradictoires. Selon les études, la remontée florale, serait contrôlée par un seul gène dominant (Bringhurst and Voth, 1978; Ahmadi et al., 1990), par plusieurs gènes dominants complémentaires (Ourecky and Slate, 1967) ou par des locus quantitatifs (Powers, 1954; Hancock et al., 2002; Shaw, 2003; Serce and Hancock, 2005; Weebadde et al., 2008). Aucun mécanisme moléculaire n'a été proposé.

La production de stolons a été peu étudiée chez le fraisier octoploïde bien que ce soit un caractère majeur pour la sélection. L'analyse d'un plan factoriel entre des variétés non remontantes a montré que ce caractère était héritable (Simpson, 1992). En plus de la composante génétique, les fraisiers non remontants et remontants qui produisent des stolons en jours longs avec des températures élevées sont également sensibles à la qualité de la lumière (Durner et al., 1984).

III. Démarche scientifique

Malgré son intérêt agronomique, le déterminisme génétique et moléculaire du caractère ‘remontée florale’ reste peu connu chez le fraisier. L’étude de ce caractère permettrait de mettre en évidence des mécanismes génétiques clefs de la transition florale chez les plantes polycarpiques en comparant des génotypes non remontants capables d’initier leur floraison une fois par an à des génotypes remontants, capables d’initier leur floraison tout au long de la période végétative. De plus, l’antagonisme entre croissance végétative et reproductive observé chez le fraisier nous a conduit à nous intéresser à des caractères liés au développement végétatif tels que la production de stolons ou la hauteur du plant.

Comme énoncé dans l’introduction générale, l’objectif de cette thèse est de caractériser les déterminismes génétique et moléculaire de la remontée florale chez les fraisiers diploïde et octoploïde. Cet objectif se décline en trois questions scientifiques :

(1) Quelles sont les régions du génome impliquées dans la variation du caractère ‘remontée florale’ et ces régions sont-elles orthologues entre les fraisiers diploïde et octoploïde ?

(2) En se basant sur l’hypothèse que les acteurs de la floraison décrits chez les plantes modèles sont les mêmes chez le fraisier, peut-on identifier des gènes candidats à la floraison co-localisant avec les régions impliquées dans la remontée florale chez *Fragaria* à partir de ceux connus chez les espèces modèles telles que *Arabidopsis thaliana* ?

(3) Est-ce que ces gènes candidats co-localisant avec les QTL de remontée florale sont bien impliqués dans la variation du caractère ?

Pour répondre à ces trois questions, différentes approches ont été mises en place :

(i) Une approche de détection de QTL a été réalisée afin d’identifier et de cartographier les régions du génome impliquées dans la variation quantitative du caractère ‘remontée florale’.

(ii) En se basant sur l’hypothèse que les acteurs principaux de la floraison sont conservés chez les angiospermes, une approche ‘gène candidat’ a été développée afin d’isoler chez le fraisier les homologues des gènes connus comme étant impliqués dans la floraison.

(iii) Une analyse de génétique d’association a été effectuée afin de confirmer la relation entre le polymorphisme moléculaire d’un gène candidat et la variation du caractère dans d’autres fonds génétiques. Enfin, une approche de transgénèse a été initiée afin de valider la fonction des gènes candidats.

Matériel et Méthodes

nom	utilisé pour ?	niveau de ploïdie	description des populations			
			type de croisement	parent femelle	parent male	nombre d'individus
Fv x Fb	population de cartographie de référence	2x	F2	F. vesca (815) remontant	F. bucharica (601) non remontant	76
Iaria	population en ségrégation pour le caractère 'remontée florale'	2x	S1	autofécondation		158
collection de ressources génétiques F. vesca	étude de diversité	2x				38
	variété : Yellow Wonder génotype : 5AF7	2x				
Capitola x CF1116	population de cartographie de référence	8x	F1	F. x ananassa Capitola remontant	F. x ananassa CF1116 non remontant	213
Mara des bois x Pajaro	population de cartographie octoploïde	8x	F1	F. x ananassa Mara des bois remontant	F. x ananassa Pajaro non remontant	86

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques de l'ensemble du matériel végétal utilisé.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est du fraisier (genre *Fragaria*) décrit ci-dessous en fonction de son niveau de ploïdie (diploïde ou octoploïde) (Tableau 1).

I.1.1. Matériel diploïde

a. Populations de cartographie diploïdes en ségrégation pour le caractère ‘remontée florale’

- population de cartographie génétique de référence : *F. vesca* x *F. bucharica* (Fv x Fb)

La population de cartographie génétique diploïde Fv x Fb est une population de type F2 issue de l'autofécondation d'un individu F1 obtenu par le croisement interspécifique entre *F. vesca* 815 et *F. bucharica* 601 (Sargent et al., 2004). Les parents présentent des modes de floraison contrastés, *F. vesca* et *F. bucharica* étant remontant et non remontant, respectivement, et la descendance est en ségrégation pour le caractère ‘remontée florale’. Cette population de 76 individus est à l'origine de la carte de référence du fraisier diploïde pour laquelle on dispose d'un set d'individus permettant une cartographie grossière rapide par la stratégie de ‘bin mapping’ (Sargent et al., 2008).

- population diploïde en ségrégation pour le caractère ‘remontée florale’

L'autofécondation du génotype Ilaria-1 a permis l'obtention à l'INRA de Bordeaux d'une population de type S1 ségrégeant pour le caractère ‘remontée florale’. Cette population comprend 158 individus semés en mars 2010.

b. Collection diploïde

Pour l'étude de diversité, une collection de ressources génétiques de *F. vesca* (2x) a été utilisée. Elle se compose de 37 génotypes décrits dans le tableau 2.

Nom	Numéro d'accèsion	de	Taxon	Origine
Alpine-3	551517	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
Reine des vallées-3	-	G. Risser	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
Yellow Wonder	551827	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
Ruegen	551508	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
Trésor des Alpes	-	G. Risser	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
Baron Solemacher Light Green-1	552290	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
S5-1	98137-03.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Russie
S5-2	98137-03.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Russie
Alba-1	602578	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Europe
Roseiflora	616872	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Europe
Blanche des Bois	-	G. Risser	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
815	-	EMR	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Alpes
B1	93085-01.K	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Allemagne
Monophylla	551909	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Suisse
Fraisier de Versailles	-	G. Risser	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Europe
Norlanska	-	G. Risser	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	-
B2	93085-01.K	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Allemagne
E6	94096-01.K	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Allemagne
A1	95095-01.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Royaume-Uni
A2	95095-01.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Royaume-Uni
G6-1	98137-08.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Russie
Rodluvan	-	CRA	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Europe
White	551841	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Suisse
New Hampshire	552287	Corvallis	<i>F. vesca subsp. americana</i>	Etats-Unis
UC-05	551513	Corvallis	<i>F. vesca subsp. californica</i>	-
Frost King	551898	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	-
L1	94056-04.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Kazakhstan
N3-1	94056-19.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Russie
89USSR-1	551890	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Russie
89USSR-1-1	551890	Corvallis	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Russie
F4	94100-01.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. vesca</i>	Allemagne
LH 2-1	551881	Corvallis	<i>F. vesca subsp. americana</i>	Etats-Unis
H6	94094-01.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. americana</i>	Canada
H3	94094-01.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. americana</i>	Canada
I8	95091-01.P	Dresden	<i>F. vesca subsp. bracteata</i>	Canada
DC2005-1	651550	Corvallis	<i>F. vesca subsp. bracteata</i>	Etats-Unis
CA 1523	551749	Corvallis	<i>F. vesca subsp. californica</i>	Etats-Unis

Tableau 2 : Origine et caractéristiques des 37 géotypes constituant la collection de ressources génétiques de *F. vesca* utilisée. Le numéro d'accèsion est indiqué pour les géotypes obtenus du 'National Clonal Germplasm Repository' de Corvallis, en Oregon aux Etats-Unis (Corvallis) et du 'Federal Research Centre for Cultivated Plants' de Dresden, en Allemagne (Dresden).

c. Génotype utilisé pour la transformation génétique

Pour la transformation génétique du fraisier diploïde, la lignée Yellow Wonder 5AF7 issue de *Fragaria vesca* a été utilisée car elle présente de bonnes prédispositions à la transformation (Slovin and Rabinowicz, 2007). Cette lignée est remontante et ne produit pas de stolons.

Les plants à transformer ont été obtenus à partir de graines issues de l'autofécondation de la lignée Yellow Wonder 5AF7. Elles ont été mises à germer sur du papier filtre maintenu humide en continu pendant deux semaines, à une température comprise entre 22°C et 24°C, sous une intensité lumineuse de 170 μmol de photons/m²/s et une alternance jour/nuit de 16h/8h. Ces deux premières semaines de culture permettent le développement de la racine et des deux cotylédons. Ensuite, les plants ont été repiqués en petits pots contenant un mélange de terreau et de sable (4:1) puis placés dans une chambre de culture dispensant environ 70% d'humidité et une alternance jour/nuit de 16h/8h à une intensité lumineuse de 170 μmol de photons/m²/s. Après six à sept semaines de culture, les fraisiers présentant suffisamment de jeunes feuilles trifoliées (au moins deux) ont été utilisés pour la transformation génétique.

I.1.2. Matériel octoploïde

a. Population de cartographie génétique de référence octoploïde : *Capitola* x CF1116

La première population octoploïde utilisée pour la cartographie génétique est une population pseudo-F1 issue du croisement intraspécifique (*F. x ananassa*) entre la variété Capitola et l'hybride CF1116 (Figure 28) (Lerceteau-Kohler et al., 2003; Rousseau-Gueutin et al., 2008). Les deux parents Capitola et CF1116 présentent des modes de floraison contrastés et les 213 descendants ségrégent pour le caractère 'remontée florale'. Les génotypes Capitola et CF1116 sont remontant et non remontant, respectivement. Pour le parent femelle Capitola, le caractère remontant a été introgressée à partir de *F. virginiana glauca*. La population est maintenue par multiplication végétative et renouvelée tous les deux à trois ans depuis 2000.

b. Seconde population de cartographie génétique octoploïde : *Mara des Bois* x Pajaro

La seconde population de cartographie génétique utilisée a été obtenue à partir du croisement intraspécifique (*F. x ananassa*) entre les variétés Mara des Bois et Pajaro (Figure 29). Cette population compte 86 individus ségrégeant pour le caractère 'remontée florale'.

Le parent femelle Mara des Bois présente le caractère remontant issu de vieilles variétés remontantes européennes. Le parent mâle Pajaro est non remontant.

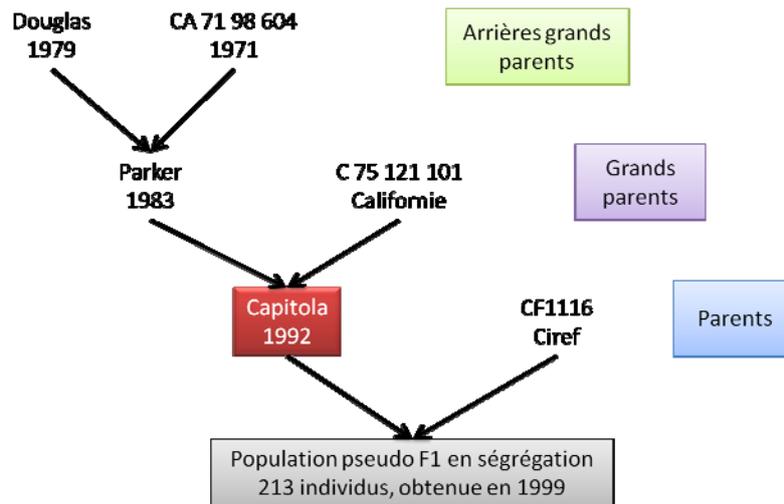


Figure 28 : Représentation graphique du pédigrée de la population octoploïde Capitola x CF1116. Le parent remontant est encadré en rouge. Le parent femelle est situé à gauche et le parent mâle à droite pour chaque croisement.

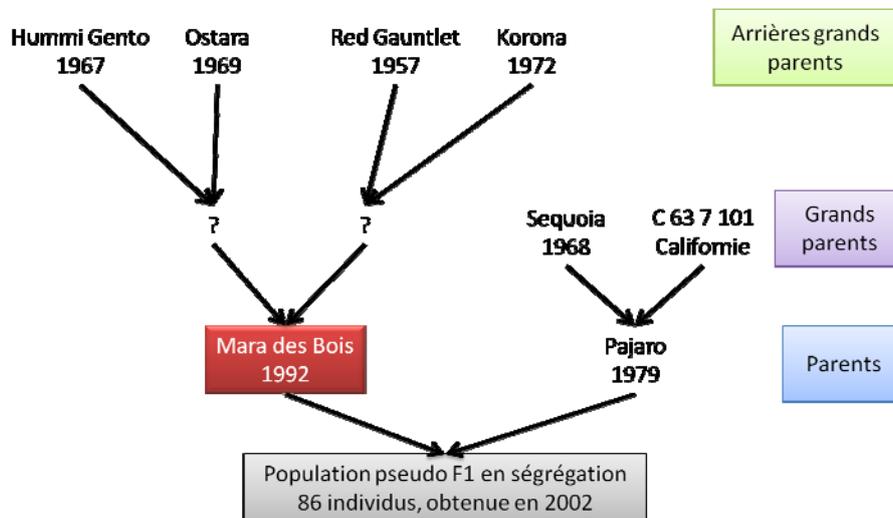


Figure 29 : Représentation graphique du pédigrée de la population octoploïde Mara des Bois x Pajaro. Le parent remontant est encadré en rouge. Le parent femelle est situé à gauche et le parent mâle à droite pour chaque croisement.

I.2. Souches bactériennes

Trois souches bactériennes ont été utilisées :

- la souche thermocompétente DH5 α d'*Escherichia coli*, cultivée à 37°C, pour le clonage de gènes,
- la souche électrocompétente TOP10 d'*Escherichia coli*, cultivée à 37°C, pour l'amplification des plasmides recombinants,
- la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*, cultivée à 28°C, résistante au chloramphénicol et à la rifampicine, utilisée comme vecteur de transformation pour générer des plants transgéniques.

I.3. Vecteurs de clonage

Le vecteur de clonage **pGEM®-T Easy** (Promega) a été utilisé pour le clonage de séquences amplifiées par PCR au niveau du multisite de clonage. Ce multisite de clonage se situe dans le fragment d'ADN codant pour le peptide α de la β -galactosidase permettant une sélection des colonies recombinantes par le système blanc/bleu. Ce vecteur confère à la bactérie recombinée la résistance à l'ampicilline.

Le vecteur donneur **pDONR™201** (4 470 pb) conçu pour la technologie Gateway® par Invitrogen, a été utilisé pour la réaction de recombinaison BP. Il contient la résistance bactérienne à la kanamycine et les séquences de recombinaison *attP*.

Le vecteur de destination **pMDC32** (12 100 pb) également conçu pour la technologie Gateway® a été utilisé pour la réaction de recombinaison LR. Il contient la résistance bactérienne à la kanamycine et le T-DNA transféré lors de l'infection du végétal par *A. tumefaciens*. Le T-DNA, bordé par les régions LB et RB, inclut un double promoteur 35S, les séquences de recombinaisons *attR* et la séquence conférant la résistance à la plante à l'hygromycine.

Le plasmide binaire **pCAMBIA-1301** (11 849 pb) (Cambia) a été utilisé pour des constructions réalisées à l'aide de digestions enzymatiques et de ligations. Ce vecteur, contenant la résistance bactérienne à la kanamycine, est un vecteur spécifique à la transformation génétique végétale *via A. tumefaciens*.

Capitola x CF1116

Année de notation	Nombre de hampes florales	Nombre de stolons	Hauteur du plant	Date de floraison
2001				D2001
2002	rem02	sto02		D2002
2003	rem03	sto03		D2003
2003b	rem03b		hpl03b	
2004	rem04		hpl04	
2005	rem05	sto05		
2006				D2006
2007	rem07			D2007
2008	rem08			D2008
2009	rem09			D2009
nombre de variables	8	4	2	7

Tableau 3 : Ensemble des données phénotypiques disponibles sur la population Capitola x CF1116.*Mara des Bois x Pajaro*

Année de notation	Nombre de hampes florales	Nombre de stolons	Date de floraison
2003	rem03	sto03	
2006	rem06*		D2006
2007	rem07		D2007
2008	rem08	sto08	D2008
2009	rem09		D2009
nombre de variables	5	2	4

Tableau 4 : Ensemble des données phénotypiques disponibles sur la population Mara des Bois x Pajaro.

II. Caractérisation phénotypique des populations en ségrégation

II.1. Caractérisation phénotypique des populations en ségrégation diploïdes

II.1.1. Population de cartographie Fv x Fb

Pour la population diploïde de référence Fv x Fb, nous disposons des données de phénotypage de Sargent (2004) pour la 'remontée florale' et pour la production de stolons.

II.1.2. Population de cartographie Ilaria-1

Les graines des 158 individus de la population Ilaria-1 ont été semées en avril 2010. Le nombre de hampes florales et de stolons émergents ont été comptés en été et en automne. Comme la population n'a été plantée qu'au printemps, seuls les génotypes remontants sont capables de produire des fleurs. Le nombre de hampes florales comptabilisé à l'automne est donc un indicateur de remontée florale sur cette population.

II.1.3. Collection des ressources génétiques de *F. vesca*

Sur les 37 génotypes de la collection, 21 étaient en culture sous serre verre à Bordeaux. A partir de plusieurs années d'observation, les génotypes présentant des hampes florales en été et en automne ont été notés remontants. Pour les 16 autres génotypes, seul l'ADN était disponible, le phénotypage de la remontée florale ayant été réalisé par USDA-Corvallis.

II.2. Caractérisation phénotypique des populations en ségrégation octoploïdes

II.2.1. Caractères phénotypiques observés

Un ensemble de données de phénotypage sur les populations Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro est disponible. Les caractères observés en fonction des années sont résumés dans les tableaux 3 et 4 pour les populations de cartographie Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro, respectivement.

Quatre caractères ont été observés depuis 2001 :

- Suite à l'induction en jours courts (septembre), la **date de première floraison**, correspondant au stade des trois premières fleurs épanouies par plant, a été notée entre février et avril pour l'ensemble des plants des deux populations observées. Les dates ont été analysées en jours calendaires.
- Les hampes florales induites en jours courts (septembre) ont été coupées entre fin mai à mi-juin. Le **nombre de hampes florales** nouvellement émergées induites en jours longs (mai) ont été comptées sur chaque plant fin juillet. Seuls les plants remontants sont capables de produire des hampes fin juillet. Ainsi, la notation du nombre de hampes florales fin juillet est représentative du caractère 'remontée florale'.
- Le **nombre de stolons** par plant a été dénombré en été.
- La **hauteur du plant** a été notée au mois de juin.

II.2.2. Test du biais entraîné par la coupe des hampes florales sur la floraison

Afin de vérifier que la coupe des hampes florales en juin ne provoque pas de biais, un essai expérimental a été mis en place. Sept génotypes de la population Capitola x CF1116 ont été sélectionnés en fonction de leur aptitude à la remontée florale (non-remontant ou remontant). Nous avons comparé les effets de trois traitements :

- « Pas coupé » : les hampes florales ont été baguées en juin afin de discerner les hampes florales baguées issues de l'initiation florale en jours courts (automne) de celles issues de l'initiation florale en jours courts (printemps) représentatives de la remontée florale.
- « Coupe moyenne » : seules les vieilles feuilles et les hampes florales sont coupées.
- « Coupe forte » : les vieilles feuilles, les feuilles extérieures et les hampes florales sont coupées. Seuls le cœur et 2-3 jeunes feuilles restent.

Un mois après la coupe, le nombre de hampes florales non baguées, issues donc de l'initiation florale en jours courts et représentatives de la remontée florale, est noté par plant.

II.2.3. Analyse du caractère 'remontée florale' de manière mendélienne

Afin d'étudier la 'remontée florale' comme un caractère mendélien chez les deux populations de cartographie, le nombre de hampes florales émergées entre fin mai et fin juillet a été regroupé en deux classes : remontant et non-remontant. Chaque génotype a été considéré comme non remontant ou remontant en se basant sur leur comportement à la floraison sur toutes les années de notation. Ces deux classes regroupent respectivement les plants produisant en moyenne moins de 2,5 et ceux produisant plus de six nouvelles hampes florales. Les ratios de ségrégation ont été testés à l'aide d'un test de χ^2 .

III. Analyses moléculaires

III.1. Extraction d'ADN

Les extractions des ADN génomiques ont été réalisées selon les protocoles préconisés par le fournisseur :

- en microtube : à partir de 90 mg de feuilles en utilisant le kit 'DNeasy Plant Mini Kit' de Qiagen ;

- en plaques de 96 puits : à partir de 50 mg de feuilles en utilisant le kit 'DNeasy 96 Plant Kit' (Qiagen) pour les quatre populations en ségrégation pour le caractère 'remontée florale' diploïdes.

La qualité des ADN génomiques extraits a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%). La quantité des ADN génomiques a été estimée par dosage spectrophotométrique (NanoVue™, GE Healthcare). Les solutions mères des ADN génomiques ont été diluées pour être utilisées à une concentration de 4 ng/μL.

III.2. Développement des amorces

Les séquences *Malus*, *Prunus*, *Rosa*, *Arabidopsis*, et *Fragaria* utilisées pour développer les amorces ont été recherchées sur les bases de données publiques à l'aide d'algorithmes de type BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) disponibles sur le serveur NCBI (National Center for Biotechnology Information), sur TAIR (The Arabidopsis Information Resource) et GDR (Genome Database for Rosaceae). Au début de la thèse, seules 45 000 EST (Expressed Sequence Tag) de *Fragaria* publiques étaient disponibles. En cours de thèse, l'accès au séquençage en cours du génome diploïde de *F. vesca* a offert de nouvelles perspectives.

Les amorces utilisées ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) avec les conditions suivantes : une température d'hybridation des amorces de 60°C, une haute stringence contre la formation de dimères d'amorces, un pourcentage de GC autour de 50% et une taille des amorces de 20 pb. Les amorces ont été synthétisées par la société Sigma.

III.3. Amplification génique par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR) permet l'amplification sélective d'une séquence d'ADN génomique, complémentaire ou plasmidique conduisant à l'accumulation d'un grand nombre de copies du fragment. Les produits PCR peuvent être alors utilisés pour les expériences de génotypage, de clonage, ou de séquençage.

Le mélange réactionnel est composé du tampon PCR 1X (VWR) ; de $MgCl_2$ à 1,5 mM ; des dNTP (VWR) à 0,2 mM ; des amorces sens et anti-sens à 0,2 μM ; de la Taq polymérase (VWR) à 0,05 U/ μL et de la matrice. La réaction est généralement réalisée dans un volume final de 12 μL . La matrice est 1 μL d'ADNg à 4 ng/ μL , 1 μL de culture bactérienne ou 1 μL de plasmide.

La réaction de PCR est constituée d'une première phase de dénaturation de trois minutes à 94°C ; puis 35 cycles successifs composés des trois étapes suivantes :

- dénaturation de l'ADN pendant 45 secondes à 94°C,
- hybridation des amorces sur la matrice pendant 45 secondes à la température spécifique en fonction de la taille et de la composition en bases des amorces, de 55° à 60°C,
- élongation de l'ADN par la Taq polymérase pendant deux minutes à 72°C.

L'amplification par PCR se termine par une extension finale de 72°C pendant quatre minutes. La vérification de l'amplification par PCR et l'estimation de la taille des fragments amplifiés à l'aide de marqueurs de taille ont été effectuées par migration électrophorétique des produits PCR sur gel d'agarose à 1,5%.

III.4. Clonage moléculaire

Le clonage moléculaire consiste à introduire un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur de clonage. Le vecteur recombinant est ensuite intégré dans une cellule bactérienne où il est capable de s'y répliquer. Cette intégration du vecteur recombinant par transformation génétique dans une bactérie permet d'amplifier le fragment d'ADN d'intérêt et de le purifier.

Le clonage moléculaire a été utilisé pour deux objectifs :

- obtenir et isoler l'ensemble des homéoallèles d'un gène chez le fraisier cultivé octoploïde afin de les séquencer ;
- préparer des vecteurs de transformation contenant la séquence du gène à transférer dans la plante pour la transgénèse.

III.4.1. Isolement des homéoallèles

Chez une espèce polyploïde, pour obtenir la séquence d'une région génomique d'intérêt ou d'un gène, un séquençage direct des produits PCR n'est pas réalisable. Il est alors nécessaire de réaliser un clonage moléculaire afin d'isoler les différents allèles potentiels avant de les séquencer.

a. *Amplification génique de la région d'intérêt et réaction de ligation*

Le gène ou la région d'intérêt a d'abord été amplifié par PCR. Une réaction de ligation a été ensuite réalisée en présence du produit PCR de la région d'intérêt, du tampon de ligation, du vecteur de clonage pGEM®-T Easy (Promega) et de la T4 DNA ligase (Promega), suivant les indications préconisées par le fournisseur.

b. *Transformation de bactéries thermocompétentes*

Les bactéries thermocompétentes *E.coli* DH5a ont été transformées en présence de 2 µL de la réaction de ligation par choc thermique de 42°C pendant 45 secondes (Annexe 1). Deux minutes après le choc thermique, 950 µL de milieu SOC ont été ajoutés à la solution bactérienne, puis ce mélange a été incubé pendant 1h30 à 37°C. La solution bactérienne a été étalée avec 100 µL d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à 0,1 M et 40 µL de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) à 50 mg/mL pour la sélection blanc/bleu sur des boîtes de Petri contenant un milieu nutritif (LB + agar) et l'antibiotique de sélection (ampicilline à 100 µg/mL). Ces boîtes ont été incubées sur la nuit à 37°C.

c. *Criblage des colonies*

Seules les bactéries ayant intégré le plasmide ont été capables de pousser sur le milieu sélectif. Une sélection blanc/bleu a permis de discriminer les plasmides ayant bien intégré le fragment d'intérêt. Seules les colonies blanches ayant intégré le fragment d'intérêt ont été repiquées dans un milieu liquide contenant du milieu LB, de l'ampicilline et du glycérol à 7%. Afin de récupérer l'ensemble des copies de la région d'intérêt, 100 clones par génotype octoploïde ont été repiqués (Annexe 1).

L'ensemble de ces clones a été amplifié par PCR réalisée directement à partir de 1 µL de la culture bactérienne (PCR sur colonies) en majorant le premier cycle de cinq minutes afin de lyser les bactéries. Les produits d'amplification ont été déposés sur gel d'agarose afin d'identifier les clones ayant bien intégré le fragment d'ADN. Pour une espèce octoploïde, 64 clones par génotype ont été sélectionnés pour être séquencés.

III.4.2. Préparation des vecteurs de transformation

Seule la technique de clonage moléculaire utilisée pour l'obtention de vecteurs de transformation génétique est présentée ci-dessous. Les étapes permettant la construction des vecteurs de transformation sont présentées au paragraphe V.1.

a. Transformation de bactéries électrocompétentes

Les bactéries *E.coli* TOP10 ont été transformées par électroporation (application d'un courant électrique) en présence de 1 µL de la réaction de recombinaison ou de ligation. Après électroporation, 500 µL de milieu LB ont rapidement été ajoutés à la solution bactérienne, puis ce mélange a été incubé pendant 1h à 37°C. La solution bactérienne a ensuite été étalée sur boîtes de Petri contenant un milieu nutritif (LB + agar) et l'antibiotique de sélection (kanamycine à 30 mg/mL). Ces boîtes ont été incubées sur la nuit à 37°C.

b. Criblage des colonies par PCR et extraction des plasmides

Un criblage des colonies obtenues a été réalisé par PCR sur colonies à l'aide d'amorces spécifiques du gène cloné. Les colonies positives (*i.e.* transformées) ont ensuite été repiquées en milieu liquide (LB + kanamycine à 30 mg/mL) et incubées à 37°C sur la nuit. L'extraction des plasmides a été réalisée à partir du kit « PureYield™ Plasmid Miniprep System » de Promega, suivant les indications préconisées par le fournisseur. Afin de s'assurer de la bonne qualité des plasmides extraits, un dosage spectrophotométrique (NanoVue™, GE Healthcare) et une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% ont été réalisés.

III.5. Séquençage de l'ADN

Les produits d'amplification provenant de PCR directe ou de PCR sur colonies ont été séquencés par la société Cogenics ou par l'INRA d'Evry.

IV. Analyses génétiques

IV.1. La cartographie génétique

IV.1.1. Les marqueurs moléculaires

Deux types de marqueurs moléculaires ont été utilisés : les marqueurs microsatellites et les marqueurs liés à un gène candidat.

a. *Les marqueurs microsatellites ou SSR*

Les marqueurs microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) sont des séquences d'ADN répétées en tandem d'un motif de 2 à 10 paires de bases (pb) et de taille généralement inférieure à 100 pb. Les microsatellites offrent un polymorphisme très élevé dû à des variations dans le nombre de motifs répétés. Des amorces encadrant le microsatellite permettent d'amplifier des fragments de taille différente. Ce polymorphisme de taille peut être révélé par une migration électrophorétique sur gel d'acrylamide en condition dénaturante.

b. *Les marqueurs liés à un gène candidat*

- **Principe de l'approche gène candidat**

L'approche gène candidat consiste à rechercher et isoler chez l'espèce étudiée les orthologues de gènes de fonction connue chez une espèce modèle. Cette approche est utilisée pour isoler des gènes pouvant être responsables d'un caractère étudié. Un bon gène candidat doit présenter un polymorphisme moléculaire lié à la variation phénotypique observée. Les gènes candidats peuvent être fonctionnels (choisis pour leur fonction que l'on présume responsable de la variation du caractère), positionnels (situés à proximité du locus à étudier) ou structurels (de structure connue) (Pflieger et al., 2001).

Cette approche a été utilisée pour rechercher les gènes pouvant être responsables de la variation du caractère 'remontée florale' chez le fraisier. Après avoir détecté les régions génomiques impliquées dans la variation du caractère étudié, des gènes de fonction connue pouvant *a priori* correspondre au locus majeur contrôlant le caractère ont été identifiés et isolés chez le fraisier.

Un fraisier remontant étant capable d'initier sa floraison en continue, nous avons recherché des gènes candidats impliqués dans l'initiation florale, autrement dit, les gènes impliqués dans la voie de signalisation de la floraison. Notre approche gène candidat est basée sur l'hypothèse que les acteurs de la floraison sont conservés chez les plantes à fleurs. Les orthologues des gènes décrits chez *Arabidopsis* ont été recherchés chez le fraisier.

- **Choix des gènes candidats**

Sur l'ensemble des gènes décrits comme étant impliqués dans la voie de signalisation de la floraison chez *Arabidopsis*, je me suis d'abord intéressée aux gènes présentant un rôle central dans l'initiation florale et aux gènes de la voie des gibbérélines. Pour chaque gène candidat étudié, la séquence nucléique disponible de l'espèce la plus proche de *Fragaria* a été utilisée pour dessiner des amorces.

- **Recherche de polymorphisme lié à un gène candidat**

Des amorces encadrant un gène candidat permettent d'amplifier du polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism, polymorphisme d'un seul nucléotide) ou de type insertion / délétion (polymorphisme de taille). Pour le fraisier diploïde *F. vesca*, les polymorphismes de type insertion / délétion ou SNP peuvent être révélés par séquençage direct des produits PCR et analyse des chromatogrammes. Pour le fraisier octoploïde *F. x ananassa*, les polymorphismes de type insertion / délétion et SNP peuvent être révélés par électrophorèse sur gel d'acrylamide, respectivement, en condition dénaturante et non dénaturante par la technique SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism). La technique SSCP est fondée sur le comportement électrophorétique d'un fragment d'ADN monocaténaire dans un gel d'acrylamide non dénaturant. Après dénaturation du produit PCR, les acides nucléiques monocaténaires migrent sur un gel non dénaturant et peuvent adopter des conformations secondaires en fonction de leur séquence. Ainsi, deux allèles différents présentent des conformations différentes et peuvent être distingués.

c. Les marqueurs phénotypiques

Lorsque le phénotype d'un caractère cible se comporte de façon mendélienne, ce caractère peut être cartographié comme tout autre marqueur génétique (Plomion, 1995). Ainsi, la notation qualitative de la 'remontée florale' (Cf. II.2.3.) a été utilisée pour cartographier ce caractère.

IV.1.2. La cartographie génétique chez le fraisier diploïde

a. Descendance en ségrégation

Chez le fraisier diploïde, la carte de liaison génétique de référence Fv x Fb a été établie à partir d'une population de type F2 (Cf. I.1.1.a.). Les marqueurs utilisés pour l'établissement de ce type de carte de liaison génétique ségrégent soit dans les proportions 1:2:1 pour les marqueurs co-dominants et soit dans les proportions 3 :1 pour les marqueurs dominants.

b. Origine des amorces

Les amorces utilisées pour amplifier les gènes candidats ont été dessinées à partir des séquences disponibles de *Malus*, *Prunus*, *Rosa*, *Arabidopsis*, et *Fragaria*.

c. Recherche du polymorphisme

Les amorces développées ont été testées par amplification PCR sur les huit individus développés pour la stratégie de 'bin mapping'. La taille attendue des amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. Les produits PCR ont été séquencés. L'orthologie des séquences obtenues avec les séquences ayant servi à développer les amorces a été vérifiée par BLAST sur le serveur NCBI. L'analyse des chromatogrammes des séquences a permis de détecter des SNP. La cartographie génétique par 'bin mapping' a permis de localiser grossièrement les marqueurs SNP sur les groupes de liaison.

d. Génotypage de l'ensemble de la population

Pour une cartographie plus fine des marqueurs SNP, les couples d'amorces révélant du polymorphisme ont été utilisés pour génotyper l'ensemble des individus de la population diploïde. Les ratios de ségrégations ont été testés à l'aide d'un test de Chi-2 afin de vérifier que ces marqueurs SNP répondent au ratio 1 :2 :1 attendu pour un marqueur co-dominant. Les marqueurs ont ensuite été ajoutés à la matrice de données de génotypage comprenant tous les marqueurs constituant la carte de référence.

e. Cartographie des marqueurs

Le logiciel de cartographie génétique utilisé est MAPMAKER/Exp v3.0 (Lander et al., 1987). Le LOD (logarithm of odds) seuil a été fixé à 5 : la vraisemblance qu'il y ait une liaison entre deux locus est 100 000 fois supérieure à celle qu'il n'y en ait pas. La fréquence de recombinaison maximum entre deux marqueurs a été fixée à 35 cM, la distance de cartographie choisie était celle de Kosambi. Dans un premier temps, la commande 'GROUP' du logiciel attribue les marqueurs nouvellement développés aux différents groupes de liaison de la carte de référence en calculant la fréquence de recombinaison entre deux marqueurs. Puis, ces marqueurs ont été ordonnés au sein des groupes de liaison à l'aide de la commande 'TRY'.

IV.1.3. La cartographie génétique chez le fraisier octoploïde

La cartographie génétique a été utilisée sur deux populations octoploïdes pour différents objectifs en fonction de l'état d'avancement de leurs cartes de liaison génétique. La carte de liaison génétique de la population octoploïde Capitola x CF1116 suffisamment bien développée a été utilisée pour : (1) la recherche de régions impliquées dans la variation d'un caractère quantitatif (détection de Quantitative Trait Loci (QTL)), (2) l'enrichissement de régions d'intérêt à l'aide de marqueurs microsatellites et (3) la cartographie de gènes candidats. La carte de liaison génétique de la population octoploïde Mara des Bois x Pajaro a été initiée puis utilisée pour la recherche de régions impliquées dans la variation d'un caractère quantitatif (détection de QTL).

a. Choix de la descendance en ségrégation et des marqueurs utilisés pour la cartographie génétique du fraisier octoploïde

Deux populations octoploïdes en ségrégation de type F1 (pseudo test-cross) ont été utilisées pour cartographier des marqueurs de type microsatellite et des marqueurs liés à des gènes candidats. Pour ce type de population, deux cartes de liaison génétique femelle et mâle sont établies et seuls les marqueurs montrant une configuration 'simple-dose' (présent en un seul exemplaire, par exemple : Aaaaaaaaa) sont retenus car ils se cartographient sans ambiguïté sur un seul groupe de liaison (Aljanabi et al., 1993; Da Silva and Sobral, 1996).

Dans un premier temps, seuls les marqueurs 'simple-dose' présentant une ségrégation 1:1 sont utilisés. Ce type de marqueur est présent en un seul exemplaire uniquement chez l'un des deux parents de la population. Un marqueur en simple dose (SD) chez le parent femelle et absent (nulli dose, ND) chez le parent mâle (soit une configuration SDxND) est utilisé pour l'établissement de la carte de liaison génétique du parent femelle. Inversement, un marqueur présent en simple dose chez le parent mâle et absent chez le parent femelle (soit NDxSD) est utilisé pour la construction de la carte du parent mâle.

Dans un second temps, des marqueurs présents chez les deux parents en simple dose (soit SDxSD) présentant une ségrégation 3:1 peuvent être utilisés pour associer les cartes génétiques femelle et mâle.

b. Origine des amorces

Certaines amorces utilisées pour la cartographie génétique du fraisier octoploïde ont été préalablement utilisées pour celle du fraisier diploïde, soit pour amplifier des microsatellites, soit pour amplifier des gènes candidats. Les autres amorces ont été développées à partir du séquençage du génome du fraisier diploïde *F. vesca* pour amplifier des marqueurs microsatellites autour de régions d'intérêt.

c. Recherche du polymorphisme

Les amorces ont été testées par amplification PCR sur huit individus dont les deux génotypes parentaux. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Le polymorphisme des produits d'amplification a été révélé par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante (polymorphisme de taille : insertion / délétion et microsatellite) et non dénaturante (polymorphisme de conformation simple brin, SSCP) (Annexe 2). La révélation des gels d'acrylamide a été réalisée par coloration au nitrate d'argent (Annexe 2). Les amorces révélant du polymorphisme ont été amplifiées sur l'ensemble de la population de cartographie et les produits PCR ont été déposés sur gel d'acrylamide.

d. Génotypage de l'ensemble de la population

Les gels révélés au nitrate d'argent ont été analysés par deux lecteurs indépendants. Chaque couple d'amorces peut révéler plusieurs bandes, appelées alors marqueurs. La présence (notée '1') ou l'absence (notée '0') des différentes bandes polymorphes a été notée.

Les ratios de ségrégation observés ont été comparés à l'ensemble des ratios théoriques attendus chez une population octoploïde à l'aide du test de Chi-2 et au seuil de 1%. Les marqueurs polymorphes présents chez l'un des deux parents (1_0 ou 0_1) et répondant au ratio de ségrégation 1:1 (configuration SDxND pour la femelle et NDxSD pour le mâle) ont été utilisés pour la construction des cartes de liaison génétique femelle et mâle à l'aide du logiciel MAPMAKER (Lander et al., 2009).

Deux matrices binaires initiales rassemblant les données de génotypage de chaque descendant de la population ont été générées, l'une compilant les marqueurs présents chez le parent femelle et l'autre compilant les marqueurs présents chez le parent mâle. Les matrices binaires sont recodées (1 devient H et 0 devient A). Ces marqueurs sont dits en couplage, un 'c' est ajouté à la fin du nom des marqueurs. Puis, chaque matrice binaire initiale est inversée (1 devient A et 0 devient H) afin d'obtenir les matrices binaires inversées femelle et mâle ; ces marqueurs « inversés » sont dits en répulsion, un 'r' est ajouté à la fin du nom des marqueurs. Pour chaque carte de liaison génétique parentale (femelle et mâle), la matrice finale utilisée pour la cartographie génétique par MAPMAKER est composée des marqueurs en couplage et en répulsion.

e. *Construction des cartes de liaison génétique*

- Constitution des groupes de liaison

A partir des matrices binaires, deux cartes de liaison génétique ont été construites indépendamment : une carte femelle regroupant les marqueurs de configuration SDxND et une carte mâle regroupant les marqueurs de configuration NDxSD. La population déclarée au logiciel MAPMAKER est de type F2 Backcross. Le logiciel rassemble les marqueurs par groupe de liaison avec la commande 'GROUP' en calculant la fréquence de recombinaison entre deux marqueurs. Le rapport de vraisemblance ou LOD (logarithm of odds) score a été utilisé pour tester la liaison entre deux locus. Le LOD seuil a été fixé à 5 : la vraisemblance qu'il y ait une liaison entre deux locus est 100 000 fois supérieure à celle qu'il n'y en ait pas. La fréquence de recombinaison maximale entre deux marqueurs est fixée à 0.35, soit une distance de 35 cM. Afin de regrouper des groupes de liaison ou d'inclure des marqueurs non liés aux groupes de liaison, l'analyse a été reconduite en abaissant le LOD seuil à 4 puis à 3.

- Ordonnement des marqueurs au sein des groupes de liaison

Après avoir constitué les groupes, une analyse multipoint a été effectuée afin d'ordonner les marqueurs au sein de chaque groupe de liaison avec la commande 'COMPARE'. Pour les groupes de liaison constitués de plus de cinq marqueurs, les marqueurs les plus informatifs ont d'abord été placés puis les marqueurs restants ont été insérés un à un à l'aide de la commande 'TRY'. La commande 'RIPPLE' a permis de vérifier la vraisemblance de l'ordre établi par rapport aux autres combinaisons possibles.

Enfin, la commande 'MAP' a permis de transformer les fréquences de recombinaison en distances génétiques (distance de Kosambi en cM) entre chaque marqueur pour chaque groupe de liaison dans l'ordre défini précédemment.

Cas des marqueurs distordus : les marqueurs en simple dose (1_0 ou 0_1) dont les ratios de ségrégation observés ne correspondaient pas aux ratios attendus, appelés marqueurs distordus, ont été ajoutés dans un second temps et retenus si l'ordre précédemment établi des marqueurs non distordus n'était pas altéré.

Cas des marqueurs SDxSD : les marqueurs polymorphes présents chez les deux parents (1_1) et répondant au ratio de ségrégation 3:1 (de configuration SDxSD) ont été cartographiés à l'aide du logiciel Join Map (Stam, 1993).

f. Mise en place d'une technique permettant de cibler l'ajout de marqueurs sur un groupe de liaison spécifique chez le fraisier octoploïde

Problématique : Pour la cartographie du fraisier octoploïde, les marqueurs moléculaires ont été développés à partir d'un 'scaffold' issu du séquençage du fraisier diploïde *F. vesca* et cartographié sur un groupe de liaison d'intérêt. A un groupe de liaison chez le fraisier diploïde correspond un groupe d'homéologie constitué de quatre groupes de liaison homéologues chez le fraisier octoploïde. Chez le fraisier octoploïde, ces marqueurs peuvent potentiellement amplifier sur chacun des quatre groupes de liaison homéologues.

L'objectif est d'ajouter des marqueurs spécifiquement sur un seul groupe de liaison de la carte de liaison génétique femelle du fraisier octoploïde où se situe une région d'intérêt. Sur le principe de la cartographie sélective ou 'bin mapping', nous avons voulu identifier un minimum d'individus permettant de discriminer les groupes de liaison d'un groupe d'homéologie.

Les individus ont été sélectionnés à partir de la population de cartographie octoploïde Capitola x CF1116, laquelle a servi à établir la carte génétique octoploïde de référence. A partir de la matrice binaire de la carte génétique femelle contenant l'ensemble des données de génotypage de chaque individu pour chaque marqueur moléculaire, l'ensemble des marqueurs cartographiés sur le groupe d'homéologie d'intérêt ont été sélectionnés. D'abord, ont été éliminés les individus présentant :

- plus de 30% de données manquantes,
- des données manquantes pour les cinq marqueurs constituant la région d'intérêt,
- aucun élément de recombinaison sur le groupe de liaison d'intérêt.

Ensuite, les individus présentant une recombinaison sur le groupe homéologue d'intérêt et le minimum de recombinaison sur les trois autres groupes d'homéologie ont été préférentiellement sélectionnés.

Des marqueurs moléculaires se cartographiant sur le groupe d'homéologie d'intérêt ont été développés à partir du génome du fraisier diploïde et testés sur les individus sélectionnés de la population octoploïde. Seuls les marqueurs présentant le génotypage attendu pour les individus sélectionnés ont été cartographiés sur toute la population.

IV.2. Détection de régions impliquées dans un caractère quantitatif (QTL)

De nombreux caractères d'intérêt agronomiques ne sont pas contrôlés par un gène majeur mais résultent de l'interaction de nombreux gènes à effets inégaux et influencés par l'environnement. Les segments chromosomiques, ou loci, en ségrégation influençant la variation d'un caractère quantitatif sont appelés Quantitative Trait Loci (QTL).

Le principe de la détection de QTL réside dans l'utilisation de données quantitatives issues du phénotypage d'une population en ségrégation couplées aux données de génotypage de cette même population.

La recherche des régions impliquées dans la variation quantitative des caractères 'remontée florale', 'production de stolons', 'date de floraison' et 'hauteur du plant' a été réalisée à partir des données phénotypiques et des cartes de liaison génétiques des deux populations de cartographie génétique octoploïdes : Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro. Les caractères analysés pour la détection de QTL sont résumés dans les tableaux 3 et 4.

IV.2.1. Analyses statistiques des données de phénotypage

Pour les parents et les descendants des deux populations de cartographie octoploïdes, la moyenne et les écart-types du nombre de hampes florales, de stolons et de hauteur du plant ont été calculés pour les années présentant des répétitions. Les données pour les parents ont été comparées par le test T de Student ($P < 0.05$). De plus, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée sur les données de la descendance à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System, Institute, Inc., Cary, NC, USA). Lorsque l'effet du génotype était significatif ($P < 0.05$), l'héritabilité du caractère a été calculée. Les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés entre les années pour les différents caractères (procédure 'PROC CORR', SAS).

IV.2.2. Détection et cartographie de QTL

Les données de génotypage et de phénotypage obtenues pour chaque individu des deux populations octoploïdes ont été analysées afin d'associer la variation d'un caractère quantitatif à une ou des régions chromosomiques.

Pour chaque population, la détection de QTL a été réalisée indépendamment sur les cartes de liaisons génétiques femelle et mâle à l'aide du logiciel QTL Cartographer v1.17e (Basten et al., 2003). Au préalable, deux fichiers pour chacune des deux cartes de liaison génétique ont d'abord été analysés par le logiciel MAPMAKER afin de créer les deux fichiers d'entrée nécessaires à QTL Cartographer. Le premier fichier comprend la matrice binaire utilisée pour construire la carte de liaison génétique (données de génotypage de chaque descendant de la population pour chaque marqueur moléculaire) à laquelle a été ajoutée une matrice contenant les données phénotypiques. Le second fichier restitue les groupes de liaison ordonnés obtenus lors de la construction de la carte.

Sous QTL Cartographer, dans un premier temps, une détection de QTL a été réalisée par régression linéaire à l'aide de la commande 'LR mapqtl'. La régression linéaire permet de rechercher des associations entre un marqueur moléculaire et un caractère quantitatif. Cette étape a permis de calculer le seuil significatif approprié de détection de QTL, le LOD score seuil, avec un risque de 0,1% à $P < 0.05$ après 1 000 ré-échantillonnages aléatoires des données phénotypiques (appelés permutations).

Dans un second temps, la détection de QTL a été réalisée par cartographie d'intervalle composite (Composite Interval Mapping : CIM). Cette méthode permet d'estimer la probabilité de la présence d'un ou de plusieurs QTL dans un intervalle donné entre deux marqueurs en prenant en compte les co-facteurs. Les co-facteurs ont été choisis à l'aide de la commande 'SRmapqtl' avant de réaliser la détection de QTL par CIM à l'aide de la commande 'Zmapqtl'. Une fenêtre de 10 cM autour de l'intervalle testé, où les co-facteurs ne sont pas considérés, a été choisie (modèle 6).

La proportion de variation phénotypique expliquée par chaque marqueur a été estimée à l'aide du coefficient de détermination (R^2) à la position du pic du QTL. L'effet positif ou négatif de la région détectée sur le caractère est donné par H^2 .

IV.3. Analyse d'association et étude de diversité

IV.3.1. Analyse d'association

Pour confirmer la relation entre le polymorphisme moléculaire d'un gène candidat et la variation de caractères quantitatifs détectée sur la population de cartographie de référence, la deuxième population diploïde (Ilaria) en ségrégation pour le caractère 'remontée florale' de 158 individus a été phénotypée pour le caractère 'remontée florale' et génotypée pour un gène candidat d'intérêt. L'ensemble des génotypes a été amplifié avec les amorces du gène candidat d'intérêt. Les produits PCR ont été séquencés et les chromatogrammes analysés. Les amorces ont révélé du polymorphisme de type SNP ou insertion / délétion. Chaque SNP ou insertion / délétion a été noté comme étant à l'état hétérozygote A/B ou homozygote A/A ou B/B. Une association entre le phénotype observé pour la 'remontée florale' et le polymorphisme moléculaire du gène candidat a été recherchée.

IV.3.2. Etude de diversité

La validation d'un gène candidat est complexe car sa co-localisation avec un QTL ou un locus majeur responsable d'un caractère ne signifie pas obligatoirement que le gène est impliqué dans la variation phénotypique de ce caractère. Alors qu'une association entre le polymorphisme moléculaire d'un gène candidat et la variation du caractère semble évident

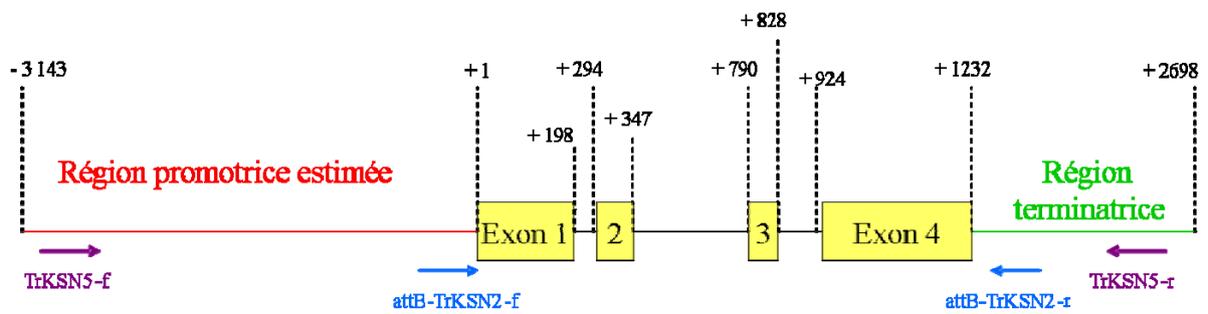


Figure 30 : Schématisation de la région génomique du gène *FvKSN* avec la position des amorces utilisées pour l'amplification de la région d'intérêt à transférer par transgénèse.

pour une population, il est important de s'assurer que cette association reste avérée dans d'autres fonds génétiques.

L'étude des relations entre polymorphisme moléculaire de gènes candidats et variation de caractères quantitatifs d'intérêt au sein de collections de ressources génétiques suppose de déterminer dans un premier temps la structure de la population étudiée.

Afin de structurer la collection de ressources génétiques *F. vesca*, 11 microsatellites neutres répartis sur le génome ont été amplifiés et ont permis de génotyper l'ensemble des génotypes. Une matrice contenant les données de génotypage de chaque génotype pour chacun des microsatellites a été réalisée. A partir de cette matrice, le logiciel STRUCTURE 2.2. (Pritchard et al., 2000) a permis d'appréhender la structure de cette population.

Une fois la structuration de la population établie, la recherche d'association entre le polymorphisme moléculaire du gène candidat et la variation du caractère 'remontée florale' a été réalisée.

V. Transgénèse

La transgénèse a été mise en place et réalisée chez le fraisier diploïde *F. vesca* pour la validation fonctionnelle du gène candidat *FvKSN*.

V.1. Constructions des vecteurs de transformation

Deux constructions différant par le choix du promoteur ont été réalisées pour chacun des allèles *KSN* et *ksn* : les transgènes *KSN* et *ksn* ont été placés sous le promoteur fort 35S (*35S::KSN* ; *35S::ksn*) et sous leur propre promoteur (*KSN::KSN* ; *ksn::ksn*). Le choix de la technique utilisée pour réaliser chacun type de construction a été fait en fonction de la taille du transgène :

- pour les constructions *35S::KSN* ou *35S::ksn*, la taille du transgène est d'environ 1 500 pb (Figure 30) : la technologie Gateway® (Invitrogen) a été employée,

- pour la construction *KSN::KSN* et *ksn::ksn*, la taille du transgène est d'environ 5 500 pb (région promotrice estimée à 3 000 pb + séquence codante de 1 500 pb + région terminatrice de 1 000 pb, Figure 30) : un clonage 'classique', avec des digestions enzymatiques et des ligations, a été choisi.

V.1.1. Constructions 35S::*KSN* et 35S::*ksn* par la technologie Gateway®

La technologie Gateway® (Invitrogen) est une méthode de clonage reposant sur le système de recombinaison site-spécifique du bactériophage Lambda. Elle implique deux composantes majeures : (i) les séquences ADN de recombinaison, dites séquences d'attachement (sites *att*), et (ii) les clonases, enzymes permettant cette réaction de recombinaison. L'avantage de cette technique est le fait que les réactions de recombinaison ne nécessitent plus de synthèse d'ADN : cela minimise donc au maximum les erreurs de séquences dues à la réaction d'amplification.

Une première réaction de recombinaison BP entre le gène d'intérêt et le vecteur donneur conduit à la production d'un clone d'entrée. Une seconde réaction de recombinaison LR entre le clone d'entrée et le vecteur de destination conduit à la production d'un clone d'expression.

Un couple d'amorces spécifique à la technologie Gateway® a été dessiné respectant strictement le schéma suivant : quatre guanines en 5' suivies des 25 pb constituant le site de recombinaison *attB* et 18 à 25 pb de la séquence spécifique du gène *KSN* : TrKSN2-f (TCTCCCTCTTTCGAGTTCTAACA) et TrKSN2-r (CTCACGTACAGCTCCGTTTG).

Les séquences d'ADN nécessaires au clonage Gateway® ont été obtenues par amplification des allèles *FvKSN* et *Fvksn*, à partir de l'ADN génomique issu des individus non remontant et remontant, respectivement. Les amplifications par PCR ont été réalisées avec la Taq polymérase haute fidélité iProof™ (BioRad) qui limite le nombre d'erreurs introduites dans la séquence lors de la PCR (taux d'erreur de la iProof™, $4,4 \cdot 10^{-7}$ contre $2 \cdot 10^{-5}$ pour la Taq polymérase classique). La présence d'un produit PCR unique a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Les produits PCR obtenus ont été purifiés à l'aide du kit « Wizard® SV Gel and Clean Up System » de Promega.

La réaction de recombinaison BP a été réalisée avec 3 µL de produits PCR purifiés, 1 µL de vecteur donneur et 1 µL de BP Clonase™ II (Invitrogen) sous incubation une nuit à température ambiante. La recombinaison entre les sites *attB* du produit PCR et les sites *attP* du vecteur donneur a conduit à un vecteur appelé 'clone d'entrée', contenant le gène d'intérêt et la nouvelle séquence d'attachement, *attL*.

La réaction de recombinaison BP a été utilisée pour la transformation génétique des bactéries électrocompétentes *E. coli* TOP10, lesquelles ont été sélectionnées sur milieu sélectif LB + Agar + kanamycine (30 mg/mL). Seules les bactéries porteuses d'un plasmide recombiné ont pu se développer. En effet, la cassette de contre-sélection présente dans les plasmides n'ayant pas recombiné est toxique pour les bactéries. Les colonies positives ont été criblées par PCR et les plasmides ont été extraits des clones positifs selon les protocoles décrits au paragraphe III.4.2.b. Les produits PCR à partir des colonies positives ont été séquencés pour vérifier l'exactitude de la séquence.

Pour la réaction de recombinaison LR, une PCR avec les amorces spécifiques du site *attL* a été réalisée sur le clone d'entrée afin d'en extraire le transgène encadré par les séquences *attL*. Les produits PCR obtenus ont été purifiés à l'aide du kit « Wizard® SV Gel and Clean Up System » de Promega. Ainsi la réaction de recombinaison LR a été conduite avec 3 µL de produit PCR, 0,5 µL de vecteur de destination (contenant les séquences *attR*) à 75 ng/µL, 1 µL de TE 1X et 1 µL de LR Clonase™ II (Invitrogen) sous incubation une nuit à température ambiante. Le vecteur résultant est appelé 'clone d'expression'.

Les bactéries électrocompétentes *E. coli* TOP10 ont été transformées avec la réaction de recombinaison LR. Les colonies positives ont été criblées par PCR et les clones d'expression ont été extraits des clones bactériens positifs selon les protocoles décrits au paragraphe III.4.2.b. Les produits PCR à partir des colonies positives ont été séquencés pour vérifier l'exactitude de la séquence.

La transformation génétique de la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été réalisée selon le protocole exposé au paragraphe III. 4.2 avec 0,5 µL de clone d'expression extrait. La souche *A. tumefaciens* étant résistante au chloramphénicol et à la rifampicine, ainsi qu'à la kanamycine grâce aux clones d'expression, les bactéries ont été étalées sur des boîtes de Petri contenant du LB + agar, de la kanamycine (30 mg/mL), du chloramphénicol (10 mg/mL) et de la rifampicine (10 mg/mL), puis incubées une nuit à 28°C. Ces boîtes ont ensuite été conservées à +4°C.

V.1.2. Constructions *KSN::KSN* et *ksn::ksn* par la technique 'classique'

L'amplification des fragments à cloner a été réalisée par PCR grâce à la Taq polymérase haute fidélité iProof™ (Biorad) (Cf. 2.2.1). Les amorces TrKSN5-f (GCAAATGGGCATTTTCCTA) et TrKSN5-r (ACGACGGTACCTGGACGAG) dessinées pour la PCR incorporent en 3' un site KpnI et présentent en 5' une extrémité franche. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit « Wizard® SV Gel and Clean Up System » (Promega) puis dosés au NanoVue™ (GE Healthcare).

Des digestions enzymatiques ont été réalisées sur ces produits PCR 'TrKSN5' purifiés et sur le vecteur de transformation pCAMBIA-1301 : les produits PCR 'TrKSN5' ont été digérés par l'enzyme de restriction KpnI (FastDigest®, Fermentas), pendant 10 min à 37°C, et le plasmide pCAMBIA-1301 a été digéré par cette même enzyme ainsi que par une enzyme conduisant à une coupure franche, PmlI (FastDigest®, Fermentas), pendant 10 min à 37°C.

Une ligation a été réalisée entre chaque produit PCR digéré et le vecteur de transformation digéré. Afin d'optimiser la réaction de ligation, plusieurs ratios insert/vecteur ont été testés. La ligation a été catalysée à 4°C pendant une nuit, dans un volume final de 10 µL contenant 1 µL de vecteur (70 ng/µL), du tampon à 1X, 102 ou 136 ng de plasmide et 1 µL de T4 DNA Ligase (Promega).

Les **bactéries TOP10 ont été transformées** avec la réaction de ligation, les colonies positives ont été criblées par PCR et les plasmides ont été extraits des clones positifs selon les protocoles décrits au paragraphe III.4.2.b. Les produits PCR sur colonies positives ont été séquencés pour vérifier l'exactitude de la séquence. Les bactéries retenues ont été conservées sur milieu solide LB + kanamycine (30 mg/mL).

Comme pour la technique de Gateway®, les plasmides ainsi extraits seront transformés dans la souche d'*A. tumefaciens* utilisée pour la transgénèse végétale.

V.2. Transformation génétique du matériel végétal

Le protocole décrit ci-dessous, utilisé pour la mise en place de la transformation génétique au laboratoire, a été adapté de celui proposé par Slovin *et al.* (Slovin et al., 2009).

V.2.1. Désinfection du matériel végétal

Par construction, environ dix jeunes feuilles trifoliées entières (pétioles compris) de *F. vesca* ont été excisées des plants, lavées à l'eau du robinet et au savon classique. Sous la hotte, elles ont ensuite été désinfectées par immersion dans un bain d'éthanol à 70% pendant 30 secondes.

A ce stade-là, deux expériences de transformation génétique ont été réalisées à deux semaines d'intervalle, elles diffèrent par le type de désinfection choisi : (1) un premier lot (noté T1a) a été désinfecté avec 20% d'eau de Javel additionnée d'environ 0,1% de Tween, (2) tandis qu'un deuxième lot (noté T1b) a été traité avec du Domestos© (hypochlorite de sodium à 4,8%, moins de 5% d'agents de blanchiment chlorés et d'agents de surface non ioniques, savon) dilué à 15% additionné lui-aussi d'environ 0,1% de Tween. Ces deux lots ont été incubés sous agitation pendant sept à huit minutes dans l'un ou l'autre de ces deux bains. Puis, les feuilles ont été rincées quatre à cinq fois à l'eau stérile.

	MS sans vitamines (g/l)	MS + vitamines (g/l)	TDZ (mg/l)	AIB (mg/l)	Céfotaxime (mg/l)	Carbenicilline (mg/l)	Hygromycine (mg/l)	Saccharose	Phytigel (Sigma) (g/l)
Culture d'Agrobactérium	4,3	-	-	-	-	-	-	2%	-
Milieu de co-culture (solide)	4,3	-	2,2	0,5	-	-	-	2%	2,5
Milieu de régénération (solide)	-	4,4	2,2	0,5	90	250	-	2%	2,5
Milieu de sélection (solide)	-	4,4	2,2	0,5	90	250	4	2%	2,5

Tableau 5 : Composition des différents milieux de culture utilisés pour la culture *in vitro*.

V.2.2. Mise en culture d'*Agrobacterium tumefaciens*

Un clone d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction 35S::*KSN* et un autre contenant la construction 35S::*ksn* ont été repiqués en culture liquide, chacun dans un tube Falcon contenant 10 mL de LB supplémenté de chloramphénicol à 10 mg/mL, de rifampicine à 10 mg/mL et de kanamycine à 30 mg/mL, puis incubés à 28°C sous agitation, pendant 48h.

La densité optique (DO) de la culture a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm et la culture a été diluée de façon à obtenir une DO finale de 0,5 dans un volume final de 40 mL. Ce volume de culture a été centrifugé à 8 000 g pendant dix minutes.

Pendant la centrifugation, une solution d'acétyrsingone fraîche à 50 mg/mL a été préparée à partir de 10 mg d'acétyrsingone en poudre, diluée dans 200 µL d'éthanol à 70%. L'acétyrsingone est une molécule de réponse aux blessures. Dans la nature, la plante blessée émet des composés phénoliques dans la rhizosphère qui sont captés par *A. tumefaciens* (chimiotactisme) et qui induisent le transfert du plasmide T-DNA de la bactérie vers le génome de la plante. Il s'agit donc d'une molécule qui favorise la transformation des plants.

Après centrifugation de la culture d'*A. tumefaciens*, le surnageant a été éliminé et le culot a été repris délicatement dans une solution de MS supplémentée de 2% de saccharose (Tableau 5) et de 16 µL d'acétyrsingone fraîche. Les 40 mL de culture liquide ont été répartis dans deux tubes Falcons de 20 mL : un pour la construction 35S::*KSN* et un pour la construction 35S::*ksn*.

V.2.3. Infection des explants par *Agrobacterium tumefaciens*

Sous la hotte à flux laminaire, les feuilles de *F. vesca* désinfectées ont été découpées dans une boîte de Petri contenant quelques gouttes de culture d'*Agrobacterium tumefaciens* (la bactérie n'étant capable de passer la paroi pectocellulosique de la plante qu'à la faveur d'une lésion de la paroi), puis les explants ont été ajoutés aux 20 mL de culture d'*A. tumefaciens* présents dans chacun des deux tubes Falcons et mis sous agitation pendant 20 min à température ambiante.

V.2.4. Co-culture

Sous la hotte à flux laminaire, les explants ont été retirés du milieu contenant les bactéries puis séchés sur du papier filtre stérile et déposés sur le milieu de co-culture (Tableau 5) dans des boîtes de Petri. Les boîtes ont été scellées avec du film alimentaire et placées 48h, à 20°C, à l'obscurité. Cette co-culture va permettre à la bactérie de pénétrer les tissus végétaux lésés et d'opérer son transfert de matériel génétique : le plasmide T-DNA est alors inséré aléatoirement dans le génome du végétal.

Des explants de feuilles et de pétioles ayant subi les mêmes traitements de stérilisation mais sans avoir été infectés par *A. tumefaciens* ont été déposés sur ce même milieu de co-culture. Ces explants constitueront un troisième lot, le lot témoin, non transformé.

V.2.5. Lavages

Après les deux jours de co-culture, les explants ont été lavés trois fois pendant une à deux minutes dans une solution d'antibiotiques contenant 500 µg/mL de carbénicilline, 180 µg/mL de céfotaxime et 250 µg/mL de Timentin® (GSK) afin d'éliminer au maximum *A. tumefaciens* des tissus végétaux.

V.2.6. Régénération des explants

Les explants ont été séchés sur papier filtre stérile puis déposés sur le milieu de régénération (Tableau 5) dans des boîtes de Petri. Les boîtes ont été incubées une semaine, à 20°C selon un cycle jour/nuit de 16h/8h, à une intensité lumineuse de 40 µmol de photons/m²/s.

Ce milieu vise à éliminer les bactéries *A. tumefaciens* rémanentes ou du moins à stopper leur développement grâce à la présence d'antibiotiques à effet bactériostatique.

V.2.7. Sélection des explants transformés

Après une semaine de culture, les explants ont été repiqués directement sur du milieu de sélection (Tableau 5) de même composition que le milieu de régénération mais supplémenté d'antibiotique hygromycine, qui constitue l'agent de sélection des plants ayant intégrés le plasmide T-DNA transféré par *A. tumefaciens* lors de l'infection. Les explants ont alors été incubés selon les conditions décrites au paragraphe V.2.6. Un repiquage sur du milieu de sélection neuf a été réalisé toutes les trois à quatre semaines.

Résultats

Chapitre III : Résultats

I. Etude du déterminisme génétique de la remontée florale

L'étude du déterminisme génétique de la remontée florale a été conduite chez l'espèce cultivée octoploïde, le déterminisme génétique du fraisier diploïde ayant déjà été décrit comme étant contrôlé par un locus majeur récessif SFL (Seasonal Flowering Locus) cartographié sur le groupe de liaison VI.

Afin d'identifier les régions impliquées dans la variation du caractère 'remontée florale' chez le fraisier cultivé octoploïde, une approche QTL a été mise en place.

Dans un premier temps, la détection de QTL a été réalisée sur la population de cartographie de référence Capitola x CF1116 pour laquelle nous disposons d'une carte saturée. Dans un second temps, l'obtention de marqueurs microsatellites enrichissant la région d'intérêt a permis de mieux préciser la région du QTL chez la population Capitola x CF1116. Enfin, la cartographie comparée du QTL dans deux fonds génétiques différents a été conduite en se basant sur deux populations en ségrégation, Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro dans lesquelles Capitola et Mara des Bois étaient deux variétés remontantes ayant à priori connues des événements d'introgession de la remontée florale différents.

I.1. Different genetic keys depending on the ploidy level control recurrent flowering, an agronomical interest trait, in strawberry

Different genetic keys depending on the ploidy level control recurrent flowering, an agronomical interest trait, in strawberry

Gaston A., Lerceteau-Köhler E., Petit A., Rousseau-Gueutin M., Barrot L., Denoyes-Rothan B.

INTRODUCTION

One of the most important developmental switches in a plant's life cycle is the transition from vegetative to reproductive growth, i.e. the initiation of flowering, which has a major impact on reproductive output in many crop species (Heyer et al., 2004). This transition has been extensively studied in the monocarpic model plants, e.g. *Arabidopsis thaliana* and rice (Boss et al., 2004; Corbusier and Coupland, 2006). In the temperate polycarpic perennials, majority of plants were seasonal with a single flowering period per year ("Once flowering habit", OF) while maintaining a pool of vegetative buds for the next year.

Strawberry, a perennial herbaceous species, provides useful model for studying flowering since it presents two contrasting flowering behaviors for flowering duration, once flowering and recurrent flowering. In seasonal flowering *Fragaria*, flowering is induced in autumn characterized by a reduction of the duration of days (short day SD) and temperatures. These conditions promote the transition of apical meristem from the vegetative to the reproductive state, transition called floral initiation. After entering dormancy and receiving chilling requirement, the autumn-initiated flowers emerge in the spring, following by fruiting and then by runner production, a response to long days in summer. In the recurrent flowering, flowers are initiated during all the growing season included in the autumn. These both flowering patterns occur in the diploid *F. vesca* as in the octoploid cultivated strawberry, *F. x ananassa*.

Control the flowering process in strawberry is connected to the control of the production of runners, as they are both produced by the shoot apical meristem (Townsend et al., 2007). Runners are considered as a specialized branch crown and are highly elongated at the first two internodes (Battey et al., 1998). Whereas in the diploid *F. vesca*, the runner production appears to be less frequent in the recurrent flowering plants (Battey et al., 1998), in the cultivated octoploid *Fragaria*, conflicting results have been obtained. In this species, while several studies have reported recurrent flowering as poor runner producers (Downs and Bonaminio, 1976; Smeets 1979), other analyses did not support this conclusion with more runners produced by recurrent flowering than seasonal flowering (Durner et al., 1984).

Temperature, photoperiod and their interaction are the most important environmental factors that regulate the transition from vegetative to floral growth in strawberries (Darrow, 1966; Durner et al., 1984; Battey, 2000). Differences in their range of temperature for the floral induction in SD exist between the wood strawberry, *F. vesca*, and the cultivated strawberry, *F. x ananassa*, as within each species. For example, in the cultivated strawberry, under cooler temperatures than 15°C but higher than 7°C, genotypes form flower buds regardless of photoperiod (Battey et al. 1998). In addition, the recurrent flowering *Fragaria* genotypes generate flower buds cyclically regardless of photoperiod if temperatures are at least moderate (<28°C) (Durner et al., 1984; Galletta and Maas, 1990; Battey et al., 1998).

The origin of the recurrent flowering in the diploid species, *F. vesca*, has been reported mainly in *F. vesca* f. *semperflorens* and found in Alpes (Hancock, 2004). In the cultivated octoploid *Fragaria*, three independent sources of recurrent flowering from the wild species *F. virginiana* have been described (Hancock et al., 1990, 1995). Among these three sources, the Wasatch source coming from *F. virginiana* ssp. *glauca* originated from the Wasatch Mountains from Utah collected by Bringhurst was introgressed in all the modern recurrent flowering cultivars (Hancock et al., 1995).

Concerning the inheritance of the recurrent flowering in the diploid *F. vesca*, the seasonal flowering vs recurrent flowering is controlled by one major gene, *SFL* for seasonal flowering locus located on the LGIV, and the dominant allele confers seasonal flowering (Albani et al., 2004). In the octoploid strawberry, despite numerous analyses, the genetic control of recurrent flowering remains unclear and no conclusion can be drawn between the control by a single dominant gene (Bringhurst and Voth, 1978; Ahmadi et al., 1990; Sugimoto et al., 2005), to quantitative inheritance (Powers, 1954; Hancock et al., 2001a; Serçe and Hancock, 2005) with numerous QTL with varying additive effects that influence the trait (Weebadde et al., 2007). These conflicting results can be due to the use of different set of parents in inheritance studies and to different environments (Maltoni et al., 1996). Control of runnering has been deciphered only for the diploid *Fragaria*, *F. vesca*, where this trait is controlled by one dominant gene located on the LGII, and therefore is not linked to the *SFL* gene.

In this work, we report the genetic dissection of the recurrent flowering using a QTL approach in the cultivated octoploid strawberry (*F. x ananassa* Duch., 2n=8x=56). The major QTL we found is not orthologous of the *SFL* gene of *F. vesca*, which suggests different genetic keys for the control of the recurrent flowering of the two levels of *Fragaria*, diploid and octoploid. In addition, we found that runnering is controlled by a major QTL that co-localizes with the recurrent flowering one with opposite effects. This work will contribute to a better understanding of the evolution of the flowering in the *Fragaria* genome and to the

development of map-based cloning approaches for identifying QTLs controlling flowering traits in the cultivated strawberry.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

In the cultivated octoploid *F. x ananassa*, a pseudo full-sibling F1 population of 213 individuals obtained from a cross between the variety ‘Capitola’ ([CA75.121-101 x Parker], University of California, Davis, USA) and the genotype ‘CF1116’ ([‘Pajaro’ x (‘Earlyglow’ x ‘Chandler’)], reference from the Ciref, France) has been developed (Lerceteau-Kohler et al., 2003). The two parents, ‘Capitola’ and ‘CF1116’, present contrasting flowering behaviors, continuous and seasonal flowering respectively.

The mapping progeny was obtained in 2001 and the field plantation was renewed every two years by runner propagation. Due to propagation problems, only 193 out of the initial 213 individuals (90.6%) were maintained in the field. For each of the five consecutive study years (2002 to 2007 except 2006), field plantation was conducted with cold stored plants under a plastic tunnel with drip irrigation. In 2003, notations were performed on the first planting of the segregating population (2003) as on the second planting (2003b). Each genotype was represented by a single plant in the first plantation years 1 and 2, and then by three or four plants in further plantations (Table 1).

The diploid *Fragaria* population used was the F2 (N=76) progeny of the interspecific cross between *F. vesca* ‘815’ and *F. bucharica* ‘601’ (formerly identified as *F. nubicola*), used by Sargent et al. (2006, 2008) to construct the reference map for diploid strawberry.

Phenotyping

The continuous flowering was evaluated as the number of inflorescences initiated during the spring and emerged from end of May to end of July. To evaluate this number, all inflorescences emerging until end of May and resulting mainly of the autumn flowering initiation were removed. To facilitate further notations, part of old leaves was also removed. Then, emerged inflorescences from end of May until the end of July were counted from 2002 to 2007, except 2006. Runners produced in summer were counted on each plant at the end of June (2005), July (2002) or August (2003b). The plant height was measured as the distance from the crown to the top of the highest leaf. This measure was performed in May in 2003b and 2004. The Table 1 summarizes all the measurement done on the different years.

The effects of removing inflorescences and old leaves on the number of new emerged inflorescences and the flowering behavior were studied in seven strawberry progeny plants to estimate if the removal introduces a bias in the notation. For this purpose, we compare three

treatments, removal of inflorescences and old leaves, removal of inflorescences and no removal as control, using seven genotypes from the progeny.

For studying the continuous flowering as a Mendelian character, number of emerged inflorescences from end of May to end of July was grouped into two classes: the continuous flowering class (CF) and the once flowering class (OF). Each genotype was considered as CF or OF based on the flowering behavior of the six years of observations. These two classes grouped respectively the plants producing a mean of until 2.5 new emerged inflorescences and a mean of at least 6.0 emerged inflorescences. This mean was calculated on the six years of notations. The threshold of 2.5 and 6.0 of new emerged inflorescences were chosen since they represented the limit of the gap that separated the two pics of the bimodal distribution. These values represented also the mean of the OF parent data plus the standard deviation and the mean of the CF parent data minus the standard deviation, both calculated on all data of the six years. The runnering trait was also treated as a Mendelian character. Genotypes were ranged as non-runnering or runnering when they showed a number of runners < 4 , 4 or 2 respectively in 2002, 2003 or 2005 for non-runnering and number of runners ≥ 4 , 4 or 2 in respectively 2002, 2003 or 2005 for non-runnering. The segregation ratio of the pseudo F1 population was tested for goodness-of-fit to theoretical ratio for the hypothesis that dominant loci control continuous flowering and non-runnering characters. Test performed on segregating populations was Chi2 for the segregation ratio 1:1. For the diploid population, recurrent flowering was evaluated as Mendelian trait. Individuals were declared as continuous flowering when inflorescences were present from August to November.

Data analysis

For the two parents and the progeny, the mean of the number of inflorescences and runners and standard deviation of each trait were calculated for the four years with replicates. Pairwise comparisons among parents were done using Student's T-test ($P < 0.05$). In addition, data of progeny were subjected to analyses of variance (ANOVA) with the Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Where a genotypic effect within progeny was found, broad sense heritability was evaluated from variance analysis as follows:

$H^2 = \sigma^2g / [\sigma^2g + (\sigma^2e/n)]$, where σ^2g is the genetic variance, σ^2e is the environmental variance and n the coefficient for σ^2g from the genotype expected mean square in the RANDOM statement of PROC GLM.

Pearson correlation coefficients were calculated for the different trait values, both between and within years (PROC CORR, SAS).

For traits deviating from normality, three transformations (log, square root) were tested. The transformation providing the least-skewed and significant results was used in the QTL analysis. Where the post transformation result was not significant, the raw data were used. All

statistical analyses were performed with the Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

Genetic maps

For the octoploid population, the female and male genetic maps have been previously developed using data obtained from the 213 individuals from the cross between ‘Capitola’ x ‘CF1116’ (Rousseau-Gueutin et al., 2008). These female and male linkage maps constructed using MAPMAKER included 367 and 440 markers respectively which were displayed on 28 and 26 linkage groups respectively. We included in this map the CF character as a Mendelian character as FaCF. All the markers ranged as unlinked markers were inverted to display both phases for MAPMAKER analysis. The loci order of the linkage group that included this CF gene was established following the multipoint analysis mapping method. The names of the linkage groups ranged by four in homoeologous groups were conserved compared to the previous study.

For the diploid population, the linkage map is the one described in Sargent et al. (2006).

QTL detection

QTL detection was performed on data by composite interval mapping (CIM) (Zeng, 1993, 1994) using QTL Cartographer software (Basten et al., 1997). These data represented the mean of the plant for each year except the first two years in which only one plant has been observed. A Forward-Backward stepwise regression was performed to choose the five co-factors with the highest F values before performing QTL detection by CIM. A window size of 10 cM around the test interval, where the co-factors were not considered, was chosen (model 6 of QTL Cartographer). The statistical significance threshold for declaring a putative QTL was determined by permutations of the data set. After 1 000 permutations, mean LOD thresholds of 2.86 and 2.90 were chosen for female and male data, respectively. This corresponded to a genome-wise significance level of $\alpha = 0.10$. The proportion of phenotypic variation explained by each significant marker was estimated as the coefficient of determination (R^2) at the peak QTL position estimated by QTL Cartographer. Separate QTL analyses were carried out for each parent.

RESULTS

Variation in number of inflorescences and runners traits

Removing inflorescences and old leaves at the end of May compared to either removal of inflorescence or no removal did not affect the number of new emerged inflorescences from end of May to end of July whatever the genotype and the flowering behavior. Whatever the treatment, six of the progeny ranged as OF did not produce any inflorescence while the

progeny 86 ranged as CF has produced new inflorescences with similar amount between the three treatments (Figure 1).

The number of new emerged inflorescences from end of May to end of July and the number of runners were examined seven and three years respectively. The two parental genotypes, Capitola and CF1116, which belong to different flowering behavior, OF and CF, were significantly different for these two traits whatever the year of observation (Table 2; Figure 2). Within the population, the number of inflorescences and runners displayed a large range of mean values from 0 to 24 or 30 and from 0 to 14 or 31 respectively according to the year. In 2005, the notation of number of runners was performed one month and half sooner, which led to a weak number of runners, from 0 to 5. Transgression beyond the continuous flowering values within the studied population was observed for both traits except in 2002 and 2003b. High values of heritability were found suggesting major genetic components for controlling both traits.

Pearson phenotypic correlation coefficients within the same trait and between years were positive and significant in all cases, with correlation coefficients varying from 0.56 to 0.86 for number of inflorescences, from 0.26 to 0.43 for number of runners, and 0.45 for plant height (Table 3). Negative correlations between numbers of inflorescences and runners were highly significant with correlation coefficients varying from -0.26 to -0.78 (Table 3). In addition, plant height was negatively correlated to number of inflorescences (from -0.14 to -0.34) and positively correlated to number of runners (from 0.21 to 0.34). These results suggest that genotypes producing inflorescences in summer, and which can be considered as continuous flowering, produce few runners and were smaller than genotypes that not produce inflorescences in summer but large number of runners.

Major dominant gene for recurrent flowering and genetic maps

The segregations of the numbers of inflorescences and runners fit the expected 1:1 ratio for a F1 pseudo test cross progeny ($P > 0.05$) (Table 4). These segregation ratios were consistent with the hypothesis that the continuous flowering and the non-runnering behavior were controlled by a single heterozygous dominant locus present in the female parent. These loci were respectively named FaCF and FanonRU for continuous flowering and non-runnering behaviors in *F. x ananassa* species and were included in the female linkage group LGIVb previously obtained (Rousseau-Gueutin et al., 2008). Three other markers, previously ranged as unlinked were also included in this group. Therefore, this group was enlarged to 117.2 cM. Predominance of genotypes that were CF and non-RU or OF and RU suggested that the two genes were linked. Only one recombinant genotype that displayed continuous flowering and runnering behaviors, CF and RU, was observed.

QTL analysis

Between years, the distributions were similar for the number of inflorescences and the plant height while large variation was observed for the number of runners.

Significant deviations from the normal distributions were observed for both traits. Since the post transformation result was not significant, the raw data were used.

Using CIM, a total of 29 QTLs were found to be significant at the LOD threshold of 2.7 across both traits and all the years of observation (Table 4). Sixteen, seven and six QTLs were detected for the number of inflorescences, the number of runners and the plant height, respectively. The number of QTL mapped per HG varied greatly with the largest number of QTLs localized on the HGIV for both traits and no QTL on HGVII.

When QTLs found at the same genomic location in different years were considered as a single QTL, the 29 QTLs were classed as 19 single QTLs for which nine, five and five were detected for the number of inflorescences, the number of runners and the plant height, respectively. Of these, 14 (74%) were detected in only one year while the five remaining (26%) were detected in at least two years of observation. Among these later QTLs, one cluster of three QTLs, one for each trait, IF-HGIV-Fb and RU-HGIV-Fb and PH-HGIV-Fb, was detected on the female Capitola in all years of observations. This QTL cluster represented the same class of trait, plant development but with different allocations, reproductive and vegetative. Other co-localisations between traits were found on HGI between female and male linkage maps, IF-IF-HGI-Fa and PH-HGI-Ma. QTLs linked to the same trait but with opposite effects were detected on IF-HGI-Md1 and -Md2 or IF-HGIV-Md1 and -Md2.

Beside to the 29 significant QTLs, we found three QTLs with LOD just below the threshold (2.4-2.5). These three QTLs co-localized with already detected significant QTLs, IF-HGI-Fa, IF-HGI-Md and IF-HGIV-Md1 (Table 4).

To investigate where came from the alleles conferring high or low numbers of inflorescences or runners, we investigate the genotyping of the grand-parents except CN25, parent of Capitola and not available. The alleles for increasing the number of inflorescences for the QTLs IF-HGI-Fa and IF-HGIV-Fb around the loci *gtaa129c* and *gata295c* or *gatt284c* were not present in the three other grand-parents and therefore came from CN25. In addition, the increasing effect on number of inflorescences at *gatt284c* was associated with decreasing effect on number of runners and on plant height at the same allele. This was linked to the negative correlation between the number of inflorescences and the number of runners or plant height. This indicates that increase in number of inflorescences was accompanied with a decrease in number of runners and in plant height. For the QTLs detected on the HGI and HGIV on the male for the number of inflorescences, it was not possible to precise where the positive or negative effect came from since both grand-parents of the male, CF129 and Pajaro displayed the allele *gatt284c*.

The explained variations per QTL varied from 3% to 61% according to the trait and the year of observation. The largest percentages of phenotypic variance were explained by the cluster of QTLs localized on the LGIV-Fb with IF-HGIV-Fb for the number of inflorescences (37-59.5 %), RU-HGIV-Fb for the number of runners (26.1-61.4 %) and PH-HGIV-Fb for the plant height (17.8-8.5%). These major QTLs were the ones that were detected all the years of observation.

HomoeoQTLs

QTLs controlling a given trait and located at same positions on various linkage groups within one HG were considered as homoeo-QTLs. Among the 29 QTLs (19 single QTLs) identified, a total of 13 single QTLs (68%) were detected on homoeology groups (HG). QTL detected on homoeologous linkage groups would represent different alleles of the same locus. As example, QTLs were expressed for a specific trait on the same HGs different years (e.g. two QTLs for the number of runners were located on HGII in 2003b and 2005, PH-HGII-Ma and PH-HGII-Mc or located on HGIII in 2002, 2003 and 2004, RU-HGIII-Ma, RU-HGIII-Mb and RU-HGIII-Md Figure 3) (Table 4).

Comparative QTL mapping

Based on the presence of flowers in August for both diploid and octoploid strawberry, the recurrent flowering was compared between the diploid and the octoploid segregating populations. Results on the mapping of QTLs showed that the major QTL of the octoploid species was located on a different homoeology group (HGIV) than the SFL locus in the diploid species. In regards with the colinearity of the markers all over the linkage maps, we can conclude that these two locations are not orthologous (Figure 4).

When similar approach was performed for the production of runners observed in summer, one QTL from the octoploid *Fragaria*, HGII-Mc, could be potentially orthologous to the locus *r* conferring the runnering in the diploid *Fragaria* (Brown and Wareign, 1965).

Table 1. Measured traits between 2002 and 2007

Year of observation	2002	2003	2004	2005	2007	
Plantation number	Plantation 1		Plantation 2		Plantation 3	
Number of plants	1 plant		4 plants		3 plants	
Studied traits						
Inflorescence number	IF-02	IF-03	IF-03b	IF-04	IF-05	IF-07
Runner number	RU-02	RU-03			RU-05	
Plant Height			HP-03b	HP-04		

Table 2. Numbers of inflorescences (IF) and runners (RU) in summer and plant height (PH) for ‘Capitola’ and ‘CF1116’ parents and related progeny. The number (No) of individuals analysed, the mean values, standard deviations (SD) and range of the traits are described. The significance level of the difference between ‘Capitola’ vs. ‘CF1116’ means is indicated in the C vs. CF column. Heritability (h²) was only calculated for traits and years in which repetitions of each progeny were present. Trait segregation was declared transgressive (Tr) when at least one progeny had a value that was higher or lower than the highest or lowest parental value by at least twice the SD of the parents.

Trait	Code	Capitola				CF1116				C vs CF	Progeny				h ²	Tr
		No	Mean	SD	range	No	Mean	SD	range		No	Mean	SD	range		
<i>Inflorescence number end of July</i>																
2002	Nb-IF-02	10	23.70	4.88	18-33	10	1.67	1.32	0-3	***	176	5.90	6.36	0-28	-	no
2003	Nb-IF-03	10	15.10	4.46	9-23	10	1.20	1.48	0-4	***	132	6.48	4.87	0-25	-	yes
2003b	Nb-IF-03b	19	21.79	9.17	10-40	25	1.12	1.24	0-4	***	173	7.51	7.60	0-30	0.76	no
2004	Nb-IF-04	38	13.20	7.24	2-29	38	1.52	1.43	0-4	***	179	6.76	6.89	0-27	0.7	yes
2005	Nb-IF-05	10	9.44	8.57	2-29	24	0.25	0.61	0-2	***	169	6.25	7.51	0-24	0.71	yes
2007	Nb-IF-07	9	9.78	4.09	5-15	14	0.93	1.38	0-4	***	169	5.97	6.29	0-26	0.58	yes
<i>Runner number</i>																
2002	Nb-RU-02	8	1	1.07	0-3	8	6.5	4.11	3-15		176	5.91	1.77	0-14	-	no
2002	Nb-RU-02-nur	9	2.33	1.32	0-4	9	4.11	1.96	2-8	*	197	4.11	1.96	0-8	-	no
2003	Nb-RU-03	10	0.40	0.70	0-2	7	6.43	4.35	1-14	***	173	4.16	6.10	0-31	-	yes
2005	Nb-RU-05	10	1.23	1.09	0-3	22	2.45	0.60	2-4	***	190	1.51	1.44	0-5	0.75	yes
<i>Plant Height</i>																
2003b	PH-03b	20	38.33	4.37	30-42	26	31.50	5.59	20-39	***	173	35.70	4.32	22-51	0.39	yes
2004	PH-04	38	37.06	4.30	31-44	38	33.20	3.62	26-38	***	179	36.65	12.24	24-49	0.67	yes

Table 3. Phenotypic correlations for the numbers of inflorescences (IF) and runners (RU) and plant height (PH) measured between 2002 and 2007 (P<0.05). Correlations significant at P<0.0001, P<0.01 or P<0.05 are followed by ***, **,or * respectively. The number of individuals per trait pair ranges from 141 to 199.

	IF-02	IF-03	IF-03b	IF-04	IF-05	IF-07	RU-02	RU-03	RU-05	HP-03b
IF-03	0.73*** 151									
IF-03b	0.80*** 169	0.69*** 147								
IF-04	0.77*** 173	0.65*** 150	0.84*** 170							
IF-05	0.73*** 164	0.56*** 141	0.83*** 160	0.81*** 166						
IF-07	0.76*** 165	0.70*** 143	0.86*** 161	0.80*** 166	0.79*** 161					
RU-02	-0.31*** 171	-0.26** 149	-0.41*** 168	-0.49*** 174	-0.49*** 164	-0.35*** 165				
RU-03	-0.51*** 155	-0.44*** 151	-0.54*** 150	-0.52*** 155	-0.53*** 145	-0.53*** 147	0.26** 168			
RU-05	-0.69*** 166	-0.58*** 143	-0.75*** 162	-0.72*** 168	-0.78*** 168	-0.71*** 162	0.35*** 185	0.43*** 161		
HP-03b	-0.28** 175	-0.26** 152	-0.27** 172	-0.32*** 177	-0.34*** 167	-0.29** 168	0.31*** 195	0.21** 172	0.31*** 188	
HP-04	-0.24** 175	-0.14 152	-0.30*** 172	-0.19* 178	-0.34*** 168	-0.30*** 168	0.34*** 196	0.31*** 171	0.30*** 189	0.45*** 199

Table 4. Significant QTLs detected for the female (F) parent ‘Capitola’ and for the male parent (M) 'CF1116' according the homoeology groups (HG) and the linkage group (LG). The identification of QTLs for the numbers of inflorescences (IF), runners (RU) and the plant height (PH) was based on CIM analysis with LOD>LOD threshold (2.86 for the female map and 2.90 for the male map). QTLs in brackets were below the threshold.

HG &									
LG	QTL name	Year	Marker	No	Pos	LOD	R ²	Effect	
HGI									
a	IF-HGI-Fa	03b/04/(03)	gtaa129	1	0.01	2.7-2.8 (2.5)	3.0 (5.1)	+	2.2-2.4
a	PH-HGI-Ma	03b	tggt195	8	30.95	3.9	7.4	+	4.15
d	IF-HGI-Md1	02	ccta185	1	6.01	3.2	10.3	+	5.7
d	IF-HGI-Md2	02	gata148	3	21.11	3.4	8.7	-	7.6
d	IF-HGI-Md	07/(04)	ccaa267	11	43.71	3.7 (2.4)	8.5	+	3.4
HGII									
a	PH-HGII-Ma	03b	gatg420	13	93.70	4.0	7.7	-	2.42
c	RU-HGII-Mc	05	gctg207	18	54.59	3.1	7.2	+	1.2
HGIII									
a	RU-HGIII-Ma	02	b043201	14	92.70	2.8	6.0	+	0.9
b	RU-HGIII-Mb	03	gaat198	7	45.83	3.7	7.3	+	1.0
d	RU-HGIII-Md	04	tgac108	1	2.01	4.2	9.0	+	1.1
HGIV									
a	PH-HGIV-Ma	03b	caat411	2	18.41	3.5	6.9	-	2.31
b	IF-HGIV-Fb	02/03/03b/04/05/07	gata295/gatt284(02)	3	9.1/21.8	14.5-33.9	37.0-59.5	+	8.5-10.8
b	RU-HGIV-Fb	02/03/05	gatt284	3	19.8/23.8	9.0-30.0(2.3)	26.1-61.4	-	1.8-6.7
b	PH-HGIV-Fb	03b/04	gatt284	3	11.8/17.8	7.2/4.6	17.8-8.5	-	2.3-3.7
b	PH-HGIV-Mb	04	i136148	2	17.58	2.8	5.9	+	1.96
							10.5-13.4		
d	IF-HGIV-Md1	02/03/(03b)	tgta115/tgac408	10-11	55.5/60.0	3.1-3.7 (2.5)	(6.8)	+	4.0-6.1
d	IF-HGIV-Md2	2003b	tgtx104	12	94.02	2.7	6.0	-	3.9
HGV									
a	IF-HGV-Fa	07	u009180	1	20.01	3.3	5.8	-	2.9
HGVI									
c	IF-HGVI-Fc	07	v013200	8	84.47	3.1	4.0	-	2.5

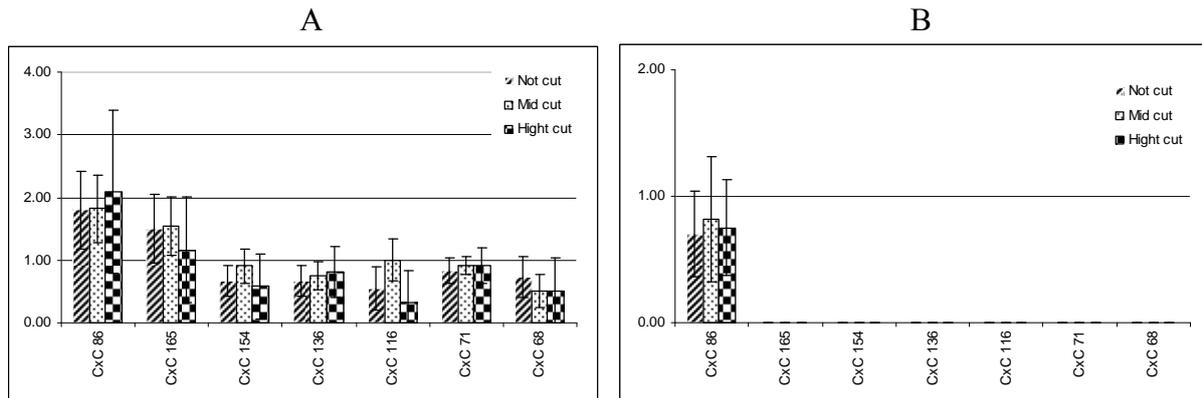


Figure 1: Effect of removing inflorescences and old leaves on inflorescence number on seven progeny displaying two contrasting flowering behaviour. One progeny, 86, is ranged as CF behaviour while the six other progenies, 165, 154, 136, 116, 71, 68, are ranged as OF behaviour. Three treatments are compared: removal of inflorescences and old leaves (hight cut), removal of inflorescences (mid cut) and no removal (not cut). A: before the treatments and B: one month and a half after the treatment.

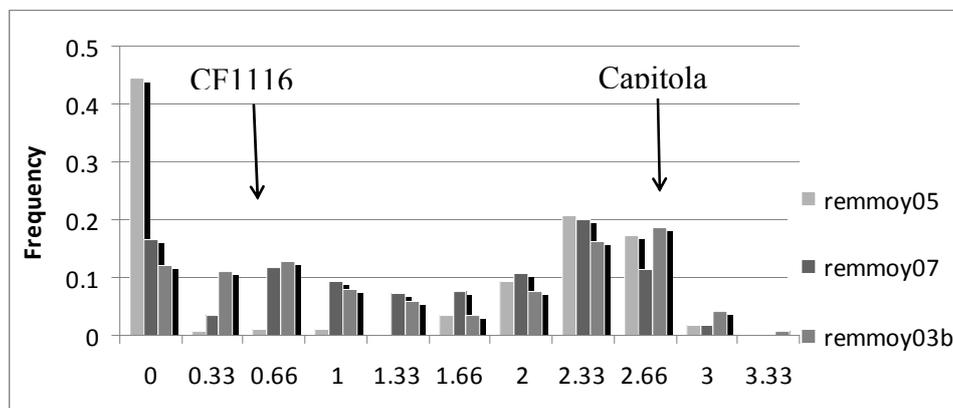


Figure 2. Frequency distribution for the number of inflorescences emerged after the end of May and until the end of July in the 'Capitola x CF1116' population consisting in 213 progeny for three years 2003b, 2005 and 2007. Values are the means of the genotype for n = 4 replicates for 2003b and 3 replicates for 2005 and 2007. Arrows indicate the mean of the phenotypic values of parents, Capitola and CF1116 respectively for these three years.

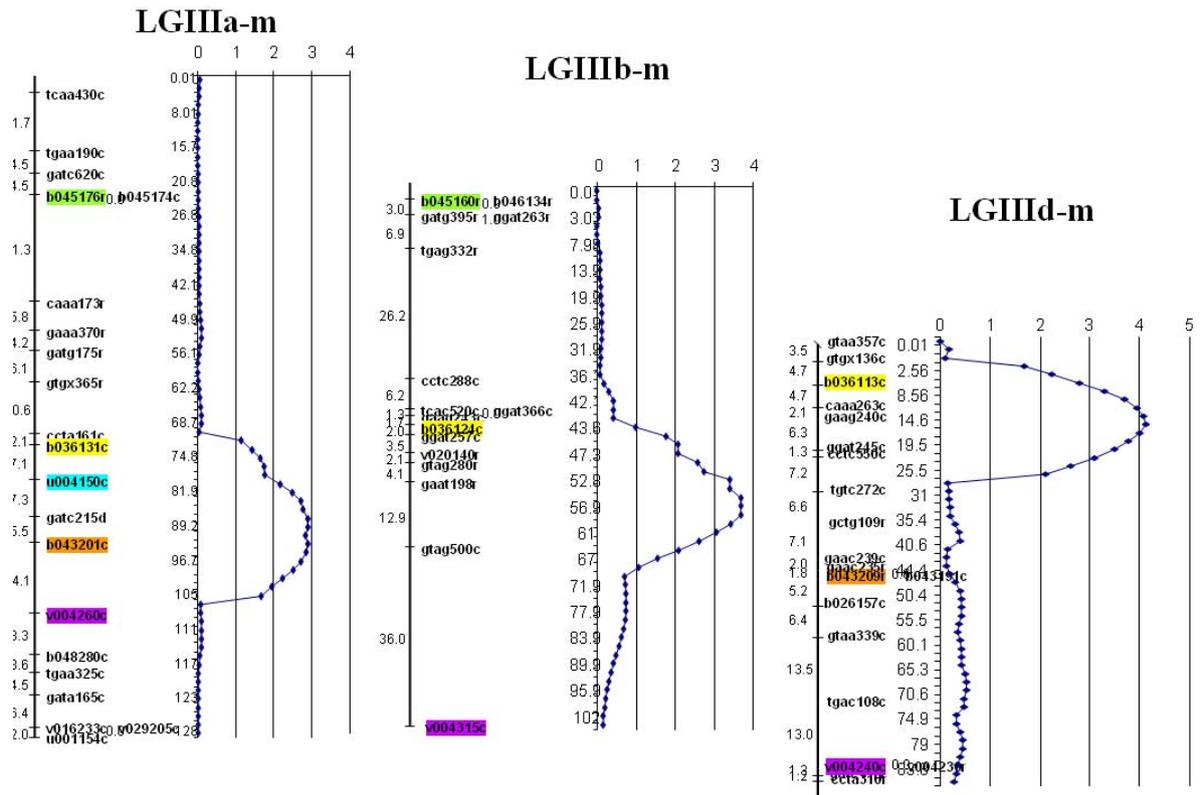
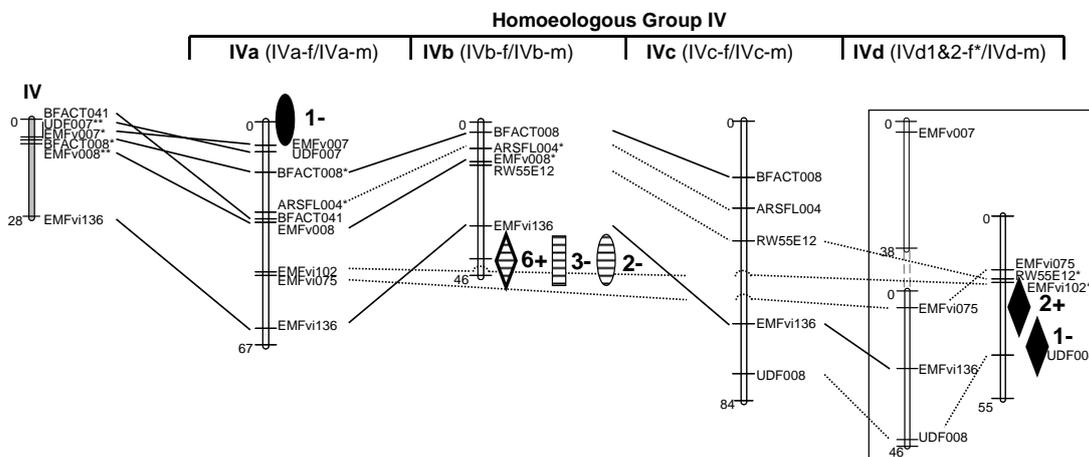
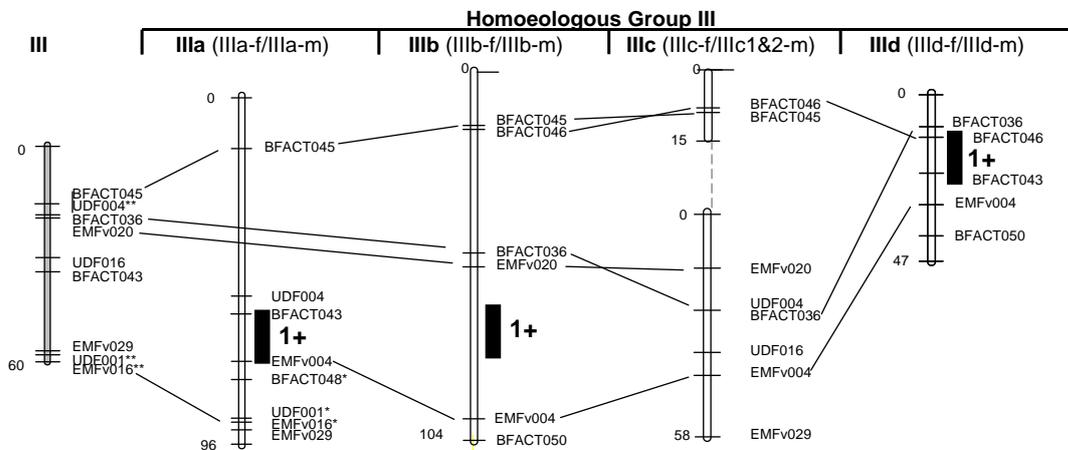
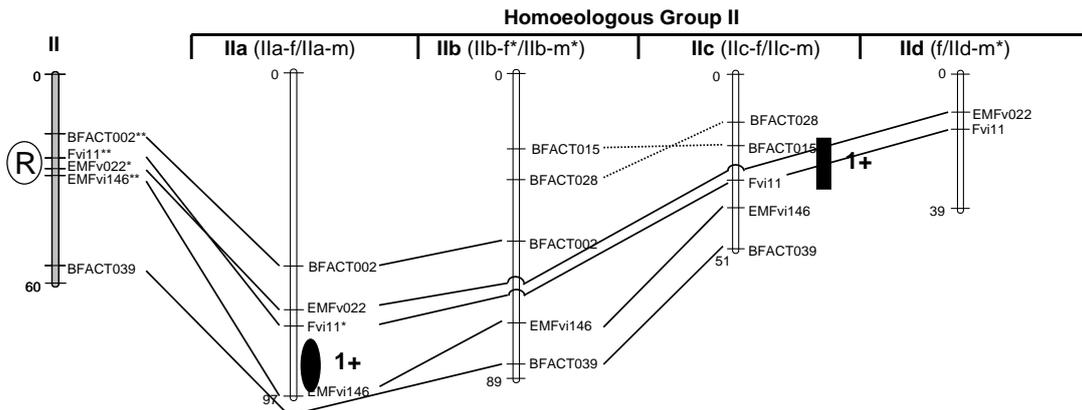
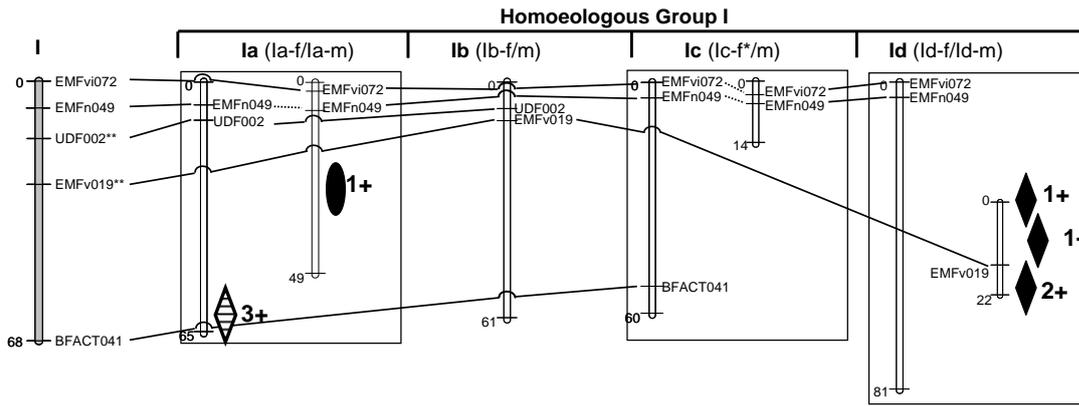


Figure 3. HomeoQTLs location on the homoeologous group III for the numbers runnerings (RU).



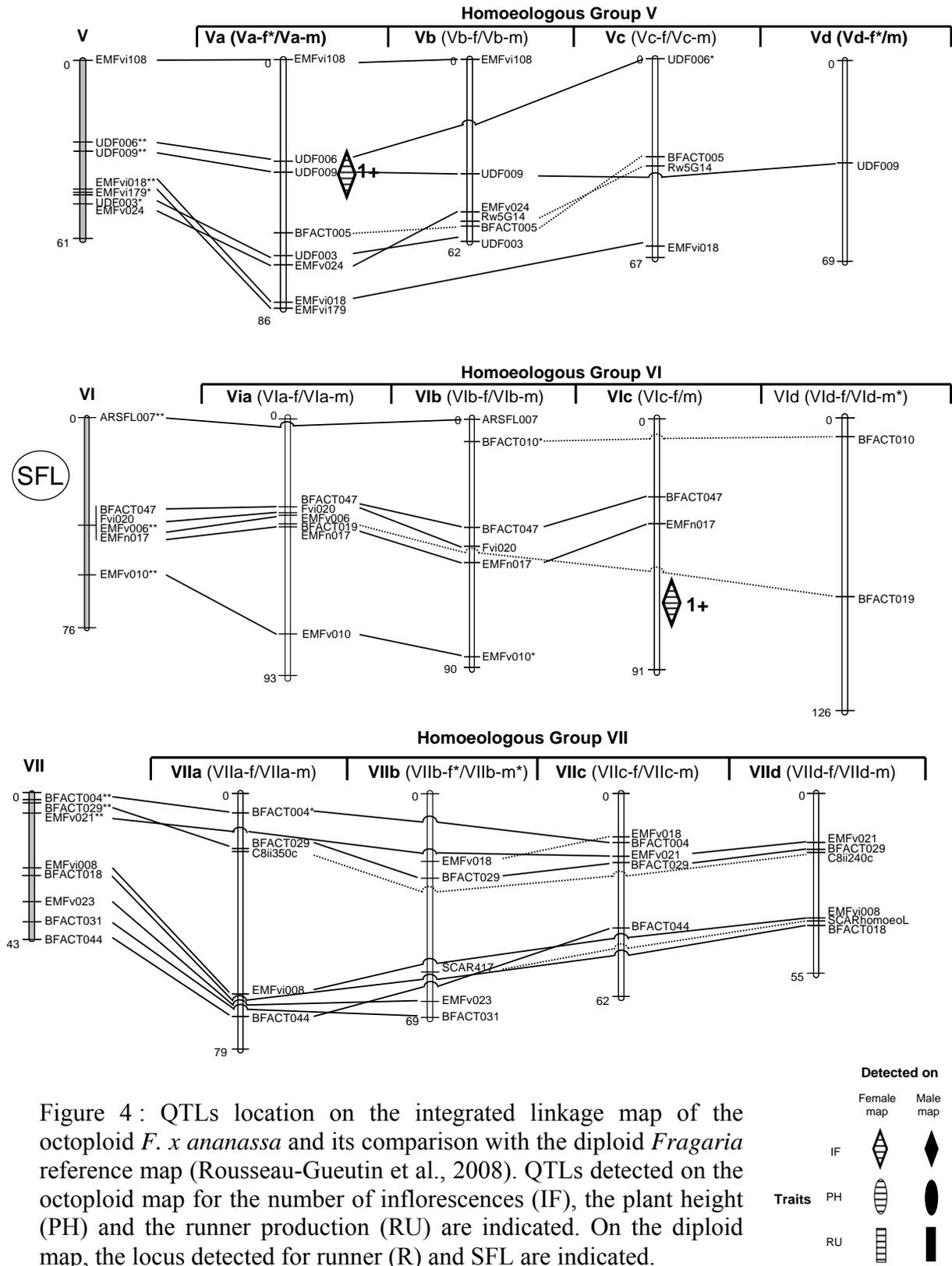


Figure 4 : QTLs location on the integrated linkage map of the octoploid *F. x ananassa* and its comparison with the diploid *Fragaria* reference map (Rousseau-Gueutin et al., 2008). QTLs detected on the octoploid map for the number of inflorescences (IF), the plant height (PH) and the runner production (RU) are indicated. On the diploid map, the locus detected for runner (R) and SFL are indicated.

	70	88	118	75	14	141	62	181	198	152	128	130	
LGIVa	*gtag268c	-	-	A	A	A	H	H	A	H	H	A	A
	*gtag267r	-	-	A	A	A	H	H	A	H	H	A	A
	*i075235c	A	A	A	A	A	H	H	A	H	H	A	A
	*tggx136c	A	A	A	A	A	H	-	-	-	H	A	A
	*tggx184c	H	A	A	A	A	-	H	-	-	H	A	A
	*caag165c	H	A	A	A	A	H	H	A	H	H	A	A
	*v008173c	H	A	A	A	A	H	H	A	H	H	A	A
	*i175199r	H	A	A	A	A	H	H	A	-	H	A	A
	*v007205r	A	A	H	A	A	H	H	H	A	-	A	H
	*v007184c	A	A	H	A	A	H	H	H	A	-	A	H
LGIVb	*u008123c	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H
	*gata295c	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H
	BxFT064.216	H	H	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H
	*gatt284c	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H
	BxFT052.225	H	H	H	A	A	A	A	A	H	H	H	H
	*FaRemc	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H
	*BxFT05c	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H
	*catc139c	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A
	*tcaa260c	H	H	A	H	H	H	-	A	A	A	A	A
	*cttg228c	H	H	-	H	H	H	A	A	A	A	A	A
	*c103120c	H	H	A	H	H	H	-	A	A	-	A	A
	*v007190c	H	H	A	H	H	H	A	A	A	-	A	A
LGIVc	*gatg165r	H	H	A	H	H	H	A	A	A	A	A	A
	*caaa410r	H	-	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A
	*tgat134r	H	H	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A
	*c014138c	H	H	A	H	H	H	-	A	A	-	A	A
	*v007224r	H	H	A	H	H	H	A	H	A	-	A	A
	*gatc143r	H	H	A	H	A	A	A	H	H	A	H	H
	*i136118r	H	H	A	H	A	A	A	H	A	A	H	H
	*tcac210s	H	H	A	H	A	A	-	-	A	A	H	H
	*catc184c	A	H	H	H	H	H	A	H	A	A	H	H
	*i175253c	A	H	H	H	H	A	A	H	-	A	H	H
	*i175202c	A	H	H	H	H	A	A	H	-	A	H	H
	*gata185r	A	H	H	H	H	A	A	H	A	A	H	H
	*ars4207r	A	H	H	H	H	A	A	H	-	A	-	H
	*ars4186c	A	H	H	H	H	A	A	H	-	A	-	H
	*gatc162c	A	H	H	H	H	H	A	H	A	A	H	H
	*gaac472c	A	-	H	H	H	H	A	H	A	A	H	H
	*gtgx360c	A	H	H	H	H	H	A	H	A	A	H	H
	*b008168r	A	A	A	H	H	H	A	H	A	-	-	-
*c103138r	H	A	A	H	H	H	-	H	A	-	A	H	
*tggx147c	H	A	A	H	H	H	A	H	A	A	A	H	
LGIVd1	*cctc270c	H	A	H	A	H	H	H	H	A	H	H	A
	*gata560c	H	A	H	A	H	H	H	H	A	H	H	A
	*gtta203c	H	A	H	A	H	H	H	H	A	H	H	A
LGIVd2	*i136147c	A	H	H	A	A	A	A	A	H	A	A	H
	*gtgx440c	A	H	H	A	A	A	A	A	H	A	A	H
	*tgtg253c	H	H	H	A	A	A	H	A	H	A	A	H
	BxFT064.208	H	H	H	A	A	A	H	A	H	A	A	H
	*b048266c	H	H	H	A	A	A	H	A	-	A	A	-
	*u008116c	H	A	H	A	A	A	H	A	H	A	A	H
*gaag490c	H	A	H	A	A	A	H	-	H	A	A	H	

Tableau 6 : Représentation du génotypage des 12 individus choisis (bin-set) pour l'ensemble des marqueurs ordonnés constituant le groupe d'homéologie IV de la carte de liaison génétique femelle de la population génétique Capitola x CF1116. Les marqueurs BxFT64.216, BxFT52.225 et BxFT64.208 ont pu être cartographiés grossièrement sur ce groupe d'homéologie.

I.2. Vers une précision de la position du QTL majeur

I.2.1. Développement de nouveaux marqueurs pour enrichir le HGIV femelle

L'enrichissement de la région incluant le QTL majeur lié à la remontée florale a nécessité plusieurs étapes. Tout d'abord, la séquence de cette région a été récupérée à partir des données disponibles en juin 2009. En recherchant par alignement les marqueurs encadrant le QTL majeur sur le génome du fraisier, les contig30683 et scaffold0513158 ont été identifiés. A partir de ces séquences, 38 microsatellites ont été repérés et des amorces les encadrant ont été dessinées. De plus, 16 couples d'amorces de marqueurs déjà développés et cartographiés sur le LGIV du fraisier diploïde ont également été testés.

Au total, 54 couples d'amorces ont été testés sur huit individus de la population Capitola x CF1116 (six descendants et deux parents) et 44 ont permis de révéler des fragments polymorphes. Sur ces 44 couples d'amorces, 14 couples d'amorces ont été choisis pour amplifier l'ensemble des 213 individus de la population. Le choix a été réalisé en fonction de la facilité de lecture des marqueurs et sur la présence des marqueurs chez la femelle (SDxND). Ces 14 couples d'amorces utilisés pour amplifier l'ensemble de la population ont généré un total de 44 bandes (ou marqueurs) polymorphes.

Parmi les 44 marqueurs, 33 marqueurs répondaient à la ségrégation d'un marqueur simple dose, 1:1, selon le test du chi-2 (Annexe 3). Parmi ces marqueurs, seuls deux présentaient une ségrégation distordue, B718262 et u1H5237 ($P < 1\%$).

Dix-huit et 15 marqueurs présents respectivement chez la femelle et le mâle ont donc été intégrés dans les cartes de liaison génétique femelle et mâle déjà disponibles pour être cartographiés à l'aide du logiciel MAPMAKER. Au final, 14 marqueurs ont été cartographiés sur la carte de liaison génétique mâle et 14 autres sur la carte de liaison génétique femelle.

Sur les 14 marqueurs cartographiés sur la carte mâle, sept se cartographient sur le LGIVa, deux sur le LGIVc et deux sur le LGIVd. Sur les 14 marqueurs cartographiés sur la carte femelle, deux se cartographient sur le LGIVa, trois sur le LGIVb, deux sur le LGIVc et trois sur le LGIVd.

En résumé, sur 54 couples d'amorces dessinés pour amplifier des régions sur le HGIV, 14 ont été retenus car ils permettaient d'obtenir des profils clairs avec des bandes polymorphes. Ces 14 couples d'amorces ont généré 33 marqueurs simple dose dont 20 marqueurs (61%) se cartographient comme attendu sur le HGIV et parmi ces 20 marqueurs, seuls trois (15% des marqueurs présents sur le HGIV et 10% du nombre des marqueurs cartographiés) ont été localisés sur la région d'intérêt, le LGIVb. De plus, seul un couple d'amorces, BxFT05, a permis d'enrichir la région à moins de 10 cM du QTL majeur. Afin d'optimiser le rendement des marqueurs cartographiés, une stratégie a été mise en place pour ajouter spécifiquement des marqueurs autour de la région d'intérêt sur le LGIVb.

Couple d'amorces	allèle	état	Test Khi ²				Cartographie		
			Test 1/1	Test 3/1	Test 5/1	Test 7/1	M/F	HG	LG
BxF ^r T48 f/r	bx48345	1_0	0,146	0,000	0,000	0,000	F	IV	b
BxF ^r T52 f/r	bx52225	1_0	0,489	0,000	0,000	0,000	F	IV	b
	bx52242	0_1	0,817	0,000	0,000	0,000	M	IV	a
BxF ^r T56 f/r	bx56206	1_0	0,535	0,000	0,000	0,000	F	IV	b
	bx56202	1_0	0,186	0,000	0,000	0,000	F	IV	d2
	bx56222	0_1	0,277	0,000	0,000	0,000	UL		
BxF ^r T64 f/r	bx64216	1_0	0,443	0,000	0,000	0,000	F	IV	b
	bx64208	1_0	0,357	0,000	0,000	0,000	F	IV	d2
	bx64202	0_1	0,188	0,000	0,000	0,000	UL		
BxF ^r T59 f/r	bx59350	1_0	0,590	0,000	0,000	0,000	F	IV	b
	bx59198	1_0	0,144	0,000	0,000	0,000	F	IV	d2
	bx59260	0_1	0,590	0,000	0,000	0,000	M	IV	a
	bx59250	0_1	0,249	0,000	0,000	0,000	M	IV	c

Tableau 7 : Liste des cinq couples d'amorces permettant de révéler les 13 marqueurs 'simple dose' sur le groupe d'homéologie IV de la population de cartographie octoploïde Capitola x CF1116. L'état 1_0 ou 0_1 (présent chez le parent femelle ou le parent mâle, respectivement) est précisé. La ségrégation de chaque marqueur a été testée avec un test de Khi² pour différents ratios de ségrégation (1:1 ; 3:1 ; 5:1 ; 7:1). La ségrégation observée correspond à la ségrégation attendue lorsque P>0,01. Le groupe de liaison où se cartographie chaque marqueur est indiqué (F ou M pour la carte de liaison génétique femelle ou mâle, respectivement). Les marqueurs ne se regroupant pas dans un groupe de liaison sont indiqués par UL (unlinked).

I.2.2. Développement d'une nouvelle approche pour enrichir spécifiquement le groupe de liaison IVb

a. Une nouvelle approche

Des couples d'amorces dessinées à partir du groupe de liaison IV diploïde peuvent amplifier sur un ou plusieurs des groupes de liaison du groupe d'homéologie IV du fraisier octoploïde. Avant de saturer spécifiquement la région du QTL majeur localisé sur le groupe de liaison IVb, il était nécessaire d'optimiser le rendement des marqueurs cartographiés dans cette région. Pour cela, nous avons développé un lot d'individus soigneusement choisis.

Cette technique, basée sur le principe du 'bin-mapping' couramment utilisé chez les espèces diploïdes, a été réalisée à partir de la carte de liaison génétique de référence du fraisier octoploïde issue du croisement Capitola x CF1116 déjà bien développée du fraisier octoploïde. Douze individus de la descendance ont été retenus car ils étaient hautement recombinants au niveau de la région d'intérêt sur le LGIVb et non ou peu recombinants sur les autres groupes de liaison du groupe d'homéologie IV (Tableau 6). Par ailleurs, les parents ont également été intégrés afin de s'assurer de la présence du marqueur uniquement chez le parent femelle. Ainsi, un lot de 14 individus devait nous permettre de discriminer le groupe de liaison IVb des trois autres groupes, LGIVa, LGIVc ou LGIVd de la carte femelle.

b. Validation de cette stratégie par addition de nouveaux marqueurs

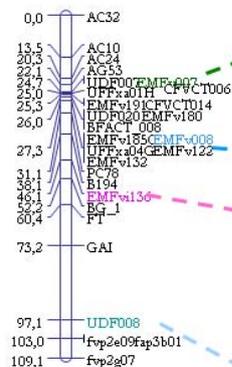
Cinquante nouveaux couples d'amorces ont été développés à partir du scaffold0513158 et testés sur les 14 individus du bin-set. Sur ces 50 couples d'amorces, 31 (62%) ont permis de révéler du polymorphisme. Parmi ces 31 couples d'amorces, cinq (10%) ont permis de révéler du polymorphisme potentiellement lié au LGIVb compte tenu du profil des 14 individus du bin set (Tableau 6). Seuls les cinq couples ont été utilisés pour amplifier l'ensemble des individus de la population (Tableau 7). Les résultats ont permis de confirmer que chacun des cinq couples d'amorces générait un marqueur qui se cartographiait sur le LGIVb. Par ailleurs, les autres marqueurs obtenus à partir de ces cinq couples d'amorces se sont cartographiés sur les trois autres groupes de liaison homéologues, LGIVa et LGIVc et LGIVd2 (Tableau 7).

En résumé, les cinq couples d'amorces choisis selon les résultats du bin-mapping ont tous générés des fragments cartographiés sur le groupe de liaison IVb. Ce résultat montre l'efficacité de l'utilisation de bin-set pour saturer de marqueurs une région d'intérêt.

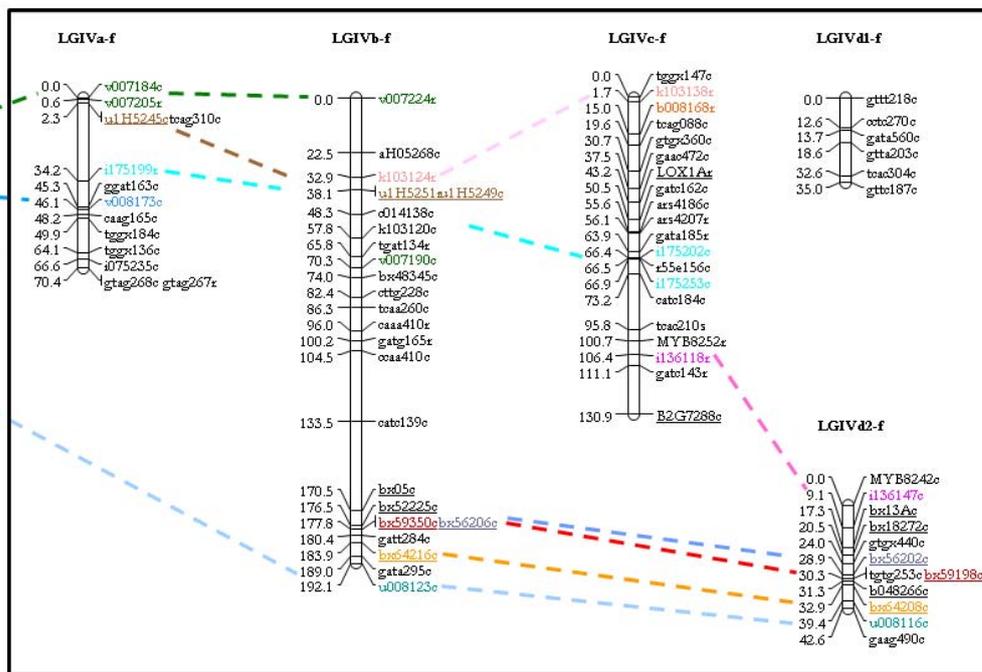
La figure 31 présente les cartes de liaison génétique femelle et mâle du groupe d'homéologie IV enrichies avec 32 nouveaux marqueurs.

a.

LGIV de la carte de référence diploïde *F. vesca* x *F. bucharica*

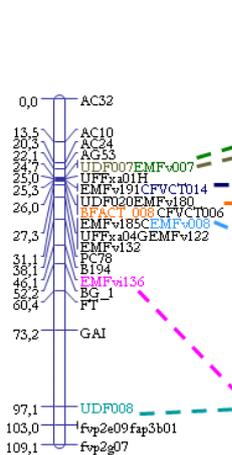


HGIV de la carte de liaison génétique octoploïde femelle de la population de cartographie Capitola x CF1116 (*F. x ananassa*)



b.

LGIV de la carte de référence diploïde *F. vesca* x *F. bucharica*



HGIV de la carte de liaison génétique octoploïde mâle de la population de cartographie Capitola x CF1116 (*F. x ananassa*)

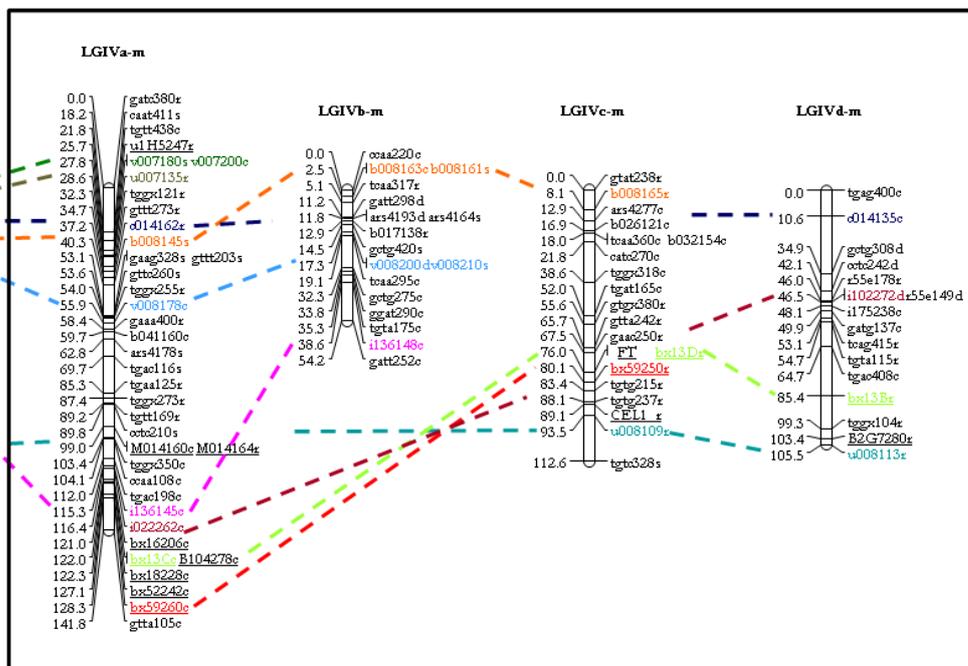


Figure 31 : Représentation des groupes d'homéologie IV (HGIV) des cartes de liaison génétique femelle (a.) et mâle (b.) de la population de cartographie octoploïde Capitola x CF1116 en comparaison avec le groupe de liaison IV de la carte diploïde Fv x Fb.

	rem02	rem03	rem03b	rem04	rem05	rem07	rem08	rem09	sto02	sto03	sto05	hpl03b	hpl04	dfd01	dfd02	dfd03	dfd06	dfd07	dfd08
rem03	0.73*** 151																		
rem03b	0.80*** 169	0.69*** 147																	
rem04	0.77*** 173	0.65*** 150	0.84*** 170																
rem05	0.73*** 164	0.56*** 141	0.83*** 160	0.81*** 166															
rem07	0.76*** 165	0.70*** 143	0.86*** 161	0.80*** 166	0.79*** 161														
rem08	0.79*** 171	0.66*** 148	0.87*** 167	0.82*** 172	0.80*** 162	0.84*** 164													
rem09	0.74*** 163	0.59*** 142	0.83*** 160	0.78*** 165	0.82*** 155	0.83*** 157	0.79*** 182												
sto02	-0.31*** 171	-0.26** 149	-0.41*** 168	-0.49*** 174	-0.49*** 164	-0.35*** 165	-0.37*** 189	-0.35*** 179											
sto03	-0.51*** 155	-0.44*** 151	-0.54*** 150	-0.52*** 155	-0.53*** 145	-0.53*** 147	-0.49*** 165	-0.47*** 157	0.26** 168										
sto05	-0.69*** 166	-0.58*** 143	-0.75*** 162	-0.72*** 168	-0.78*** 168	-0.71*** 162	-0.69*** 183	-0.68*** 173	0.35*** 185	0.43*** 161									
hpl03b	-0.28** 175	-0.26** 152	-0.27** 172	-0.32*** 177	-0.34*** 167	-0.29** 168	-0.31*** 193	-0.33*** 183	0.31*** 195	0.21** 172	0.31*** 188								
hpl04	-0.24** 175	-0.14 152	-0.30*** 172	-0.19* 178	-0.34*** 168	-0.30*** 168	-0.27** 193	-0.32*** 183	0.34*** 196	0.31*** 171	0.30*** 189	0.45*** 199							
dfd01	0.15 171	0.25** 148	0.26** 168	0.12 174	0.13 165	0.22** 164	0.17* 189	0.18* 179	-0.08 192	-0.07 168	-0.16* 186	0.01 196	-0.10 196						
dfd02	0.20* 170	0.18* 148	0.25** 167	0.21** 173	0.19* 163	0.23** 163	0.18* 188	0.12 178	-0.24** 191	-0.21** 168	-0.10 184	-0.03 195	-0.09 195	0.08 193					
dfd03	-0.09 175	-0.05 152	-0.16* 172	-0.14 177	-0.18* 167	-0.15 168	-0.17* 193	-0.19* 183	0.06 195	0.10 172	0.08 188	0.14* 200	0.06 199	0.23** 196	0.26** 195				
dfd06	-0.49*** 171	-0.35*** 148	-0.52*** 168	-0.50*** 174	-0.55*** 167	-0.50*** 168	-0.50*** 189	-0.55*** 180	0.15* 191	0.35*** 166	0.53*** 188	0.27** 194	0.17* 195	-0.01 191	0.03 190	0.26** 194			
dfd07	-0.14 171	-0.05 149	-0.12 168	-0.16* 173	-0.21** 166	-0.16* 167	-0.11 189	-0.18* 179	-0.03 190	0.04 167	0.16* 187	0.18* 194	0.08 194	0.18* 190	-0.01 189	0.36*** 194	0.32*** 193		
dfd08	0.08 156	0.12 136	0.07 153	0.04 160	0.07 148	0.06 149	0.10 175	0.03 167	0.01 172	-0.03 152	-0.08 166	-0.08 176	-0.15 176	0.11 173	0.12 172	0.20** 176	0.05 172	0.11 172	
dfd09	0.13 173	0.14 150	0.15* 170	0.10 175	0.06 165	0.07 167	0.13 191	0.00 184	0.01 191	-0.03 167	-0.03 184	0.05 195	0.01 195	0.08 191	0.06 190	0.19** 195	-0.03 191	0.12 190	0.26** 175

Tableau 8 : Corrélations phénotypiques entre le nombre de hampes florales (rem), de stolons (sto), la hauteur du plant (hpl) et la date de floraison (dfd) mesurée entre 2002 et 2009. Les corrélations significatives à P<0.001, P<0.01 et P<0.05 sont suivies de ***,** ou *, respectivement.

	Caractère	année de notation	GL	Marqueur	Position	LOD	R ²	Effet		
<i>Carte de liaison génétique femelle</i>	<i>Nombre de hampes florales</i>									
		2002	IVb	bx52225	17,68	33,42	55,77	9,80		
		2003	IVb	bx52225	17,68	17,59	40,59	5,95		
			IVd	gttt218	0,01	3,61	6,61	-2,41		
		2003b	IVb	bx52225	17,68	43,51	67,57	11,46		
		2004	IIa	b037206	47,88	5,70	5,80	5,60		
			IIa	gtgx115	85,48	2,84	4,82	-3,99		
			IVb	bx52225	17,68	37,26	50,19	9,61		
		2005	IVb	bx52225	17,68	49,93	64,97	11,40		
		2007	IVb	bx52225	15,68	39,14	58,83	8,95		
			VIc	gatg490	124,73	3,99	3,66	-2,23		
		2008	IVb	bx52225	17,68	40,34	59,73	4,69		
			IVb	u1H5249	158,25	5,67	7,85	2,72		
		2009	IVb	bx52225	17,68	36,77	56,88	7,49		
			Va	HLH1240	0,01	3,12	3,68	-1,91		
		<i>Nombre de stolons</i>								
		2002	IVb	bx52225	17,68	8,79	18,56	-1,54		
		2003	IVb	bx52225	17,68	11,27	24,66	-6,36		
		2005	IVb	bx52225	17,68	42,32	63,14	-2,16		
		<i>Hauteur du plant</i>								
		2003	IVb	bx52225	15,68	7,65	14,70	-3,32		
		2004	IVb	gatt284	11,72	4,91	9,27	-2,45		
		<i>Date de floraison</i>								
		2002	VIIb	i079124	63,13	3,08	7,58	-2,11		
		2003	IVc	i175202	64,48	3,09	5,96	2,70		
			IVc	gtgx360	102,16	5,36	12,05	-3,66		
		2006	IVb	bx52225	19,68	14,63	27,08	-10,52		
		2007	IVb	bx52225	17,68	2,85	6,18	-4,00		
	2008	VIc	b010168	114,37	3,40	8,13	-4,85			
	2009	IIIa	ggat355	102,23	4,07	10,90	-4,99			
		Vd	ANT1222	6,01	3,35	9,84	4,78			
<i>Carte de liaison génétique mâle</i>	<i>Nombre de hampes florales</i>									
		2002	Id	MY10306	6,01	3,14	10,08	5,68		
			Id	gatg350	21,11	3,40	8,79	-7,64		
			IVd	tgac408	66,85	3,43	13,17	6,78		
		2003	Vb	gttc269	52,84	5,34	16,08	-7,00		
		2003b	IVd	tgac408	70,85	2,88	9,61	4,91		
			IVd	tgx104	99,44	2,93	6,92	-4,10		
		2004	Id	ccaa267	42,34	3,11	7,29	3,50		
		2007	Id	b037210	43,71	3,69	8,60	3,44		
		2009	IIIc1	u004139	0,01	3,14	6,37	-2,49		
			Va	b037227	53,65	3,77	7,72	3,46		
		<i>Nombre de stolons</i>								
		2002	IIIb	gtag280	54,85	3,42	7,31	0,98		
			IIIc	tgac108	15,51	3,73	7,84	1,00		
			Vb	cate192	26,43	3,93	8,52	1,28		
			Vb	gttc269	50,84	3,19	6,15	1,08		
		2005	IIc	gctg207	54,60	3,21	7,33	1,25		
		<i>Hauteur du plant</i>								
		2003b	IIa	gatg420	97,46	3,46	6,71	-2,35		
			IVa	caat411	18,19	3,45	7,00	-2,33		
		2004	IVb	i136148	17,58	2,82	5,92	1,96		
		<i>Date de floraison</i>								
		2001	Vb	r5g1172	29,26	3,67	7,71	-4,62		
		2002	VIIa	gatt560	0,01	3,92	8,81	-2,35		
		2008	Ia	tgag395	45,40	3,53	7,56	4,71		

Tableau 9 : QTL significatifs détectés pour le parent femelle ‘Capitola’ et pour le parent mâle ‘CF1116’ en fonction du caractère étudié : nombre de hampes florales, nombre de stolons, hauteur du plant et date de floraison. **L’identification des QTL est basée sur une analyse en CIM avec des LOD supérieurs au LOD seuil (2,73 et 2,70 pour les cartes de liaison génétique femelle et mâle, respectivement). Les QTL liés au nombre de hampes florales, au nombre de stolons, à la hauteur du plant et à la date de floraison qui co-localisent sont surlignés en jaune.**

I.2.3. Cartographie fine du QTL

Après enrichissement de la région portant le QTL majeur et l'obtention de nouvelles données phénotypiques, il était nécessaire de réaliser une nouvelle détection de QTL afin de confirmer ou non les QTL déjà détectés. Aux 11 variables analysées et décrites au chapitre 'III ; I.1' regroupant le nombre de hampes florales émergées entre juin et fin juillet (six variables correspondant à six années de notation), le nombre de stolons émergés en été (trois variables correspondant à trois années de notation) et la hauteur du plant (deux variables correspondant à deux années de notation), neuf nouvelles variables ont également été analysées : le nombre de hampes florales en juillet 2008 et 2009 ainsi que les dates de début de floraison pour sept années de notations entre 2001 et 2009.

Les résultats ci-dessous reprendront les nouveaux résultats comparés à ceux obtenus précédemment au paragraphe I.1.

a. Analyse des données phénotypiques

Pour le nombre de hampes florales, les coefficients de corrélation entre les huit années d'observation sont positifs et très significatifs, avec des coefficients de corrélation (R) qui varient entre 0,56 et 0,87 (Tableau 8).

Pour la date de floraison, entre les sept années de notations, les coefficients de corrélation ne sont pas significatifs, excepté pour l'année de notation 2003 où les coefficients de corrélations avec les six autres années sont significatifs et positifs mais varient seulement entre 0,19 et 0,36 (Tableau 8).

Pour le caractère 'date de floraison' comparé aux autres caractères, seule la date de floraison en 2006 présente des coefficients de corrélation significatifs avec les autres caractères analysés. Cette variable est corrélée de façon négative avec le nombre de hampes florales, avec un coefficient de corrélation qui varie entre 0,35 et 0,55. La date de floraison en 2006 est corrélée de façon positive et significative avec le nombre de stolons en 2003 (R=0,35) et 2005 (R=0,53) (Tableau 8).

b. Détections des QTL

- Nouvelles variables analysées

L'analyse en Composite Interval Mapping sur les neuf variables supplémentaires a permis de révéler un total de 17 QTL significatifs avec un LOD seuil supérieur au LOD seuil de 2,7 (Tableau 9).

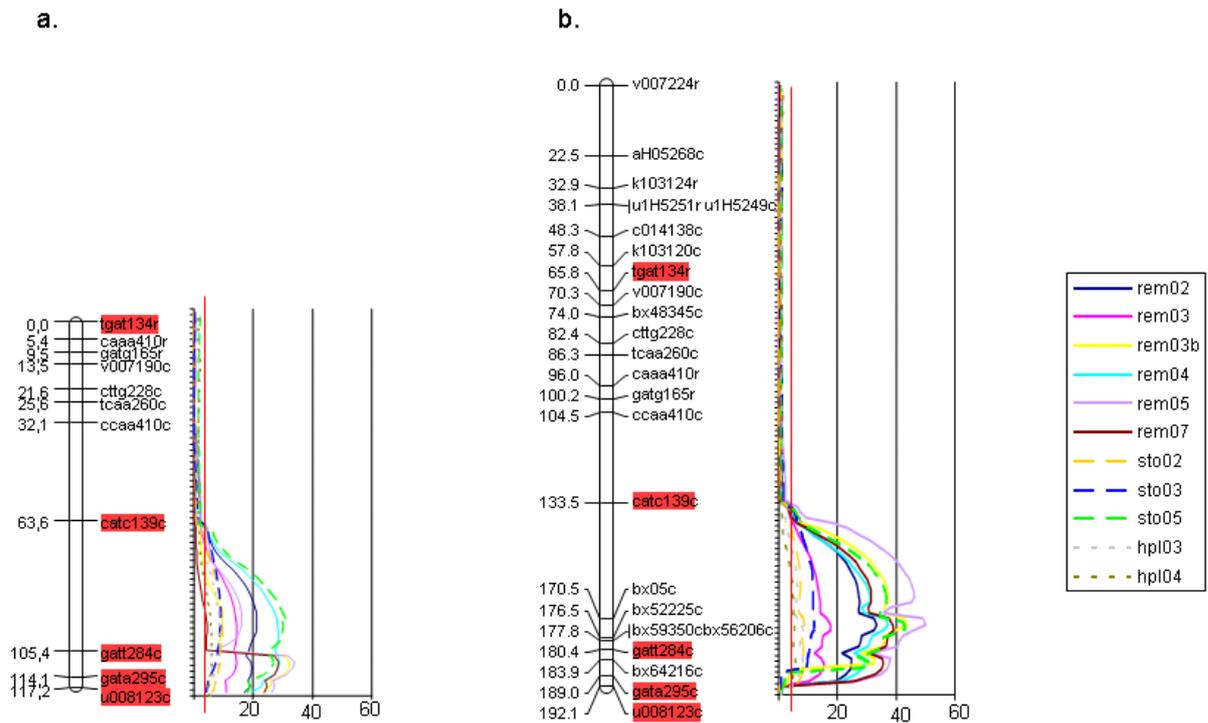


Figure 32 : Groupes de liaison IVb de la carte de liaison génétique femelle de la population de cartographie Capitola x CF1116 avant (a.) et après (b.) enrichissement de la carte. Comparaison des courbes de LOD obtenus pour la détection de QTL avant et après enrichissement de la carte sur 11 variables comprenant le nombre de hampes florales en juillet (rem), le nombre de stolons (sto) et la taille du plant (hpl). La ligne en rouge indique un LOD seuil de 3.

Pour le nombre de hampes florales, six QTL ont été détectés dont quatre et deux sur les cartes de liaison génétique femelle et mâle, respectivement. Sur la carte femelle, sur les deux années de notation supplémentaires, le QTL majeur détecté précédemment sur le groupe de liaison femelle IVb a été détecté et toujours avec des LOD très élevés, 40,3 et 36,8 pour 2008 et 2009 respectivement.

Pour la date de floraison, au total 11 QTL ont été détectés dont huit et trois sur les cartes de liaison génétique femelle et mâle, respectivement. Ils se répartissent sur neuf groupes de liaison et ne sont détectés que pour une seule année excepté celui cartographié sur le LG-IVb de la carte de liaison génétique femelle. Ce dernier a été identifié pour deux années de notation en 2006 et 2007.

- Comparaison des QTL détectés avant et après enrichissement de la région d'intérêt

Pour les 11 variables analysées avant et après enrichissement de la région d'intérêt, 29 QTL avaient été détectés lors de la première analyse alors que 31 QTL sont détectés après enrichissement de la carte de liaison génétique. Huit et six QTL mineurs (LOD entre 2,7 et 5,7) ont été détectés en plus et en moins respectivement entre la première et la seconde analyse.

Avant comme après l'enrichissement de la région d'intérêt, le QTL majeur sur le groupe de liaison IV-b femelle entre les marqueurs UDF008 et catc139 a été détecté pour toutes les années de notation du nombre de hampes florales, du nombre de stolons et de la hauteur du plant (Figure 32).

Dans la première analyse, le pic de détection de QTL a été détecté entre les marqueurs gata295c et gatt284c distants de 8,7 cM pour le nombre de hampes florales et entre les marqueurs gatt284c et catc139c distants de 41,8 cM pour le nombre de stolons et la hauteur du plant. Avec l'enrichissement de la région, ce pic a été détecté entre les marqueurs BxFT52 et BxFT05 distants de 6 cM pour les trois caractères analysés. De plus, l'enrichissement du groupe de liaison IVb femelle a permis une détection des QTL avec une valeur de LOD plus importante, comprise entre 4,57 et 32,16 avant, et entre 4,91 et 43,51 après l'ajout des marqueurs.

Ainsi, l'enrichissement en marqueurs du LGIVb-F a permis d'identifier une localisation unique pour le QTL majeur lié à la remontée florale, à la production de stolons, à la hauteur du plant et à la date de floraison (pour deux années de notation).

Carte de liaison génétique femelle de la population Mara des Bois x Pajaro

Carte de liaison génétique mâle de la population Mara des Bois x Pajaro

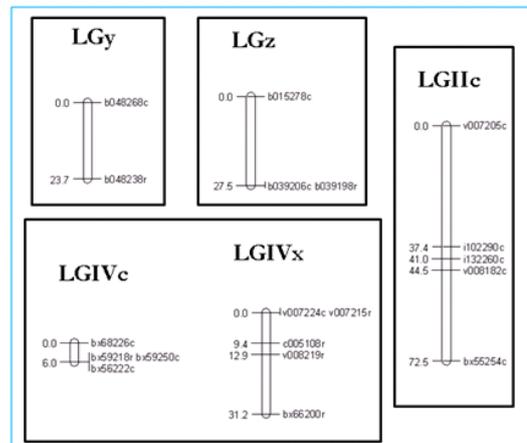
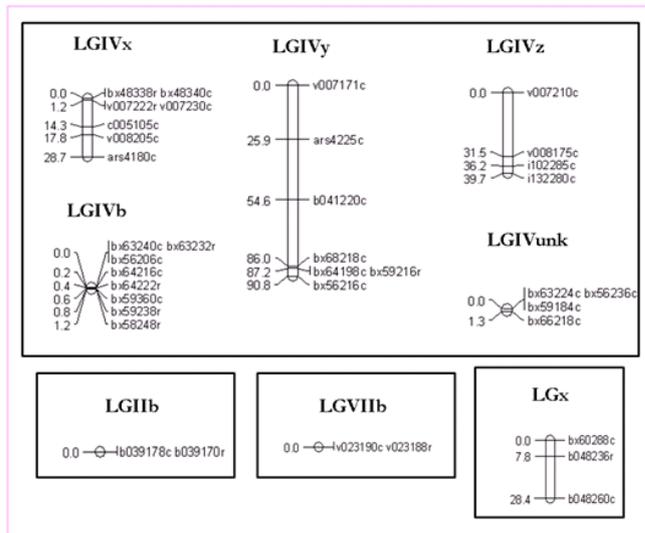


Figure 33 : Cartes de liaison génétique femelle et mâle de la population de cartographie octoploïde Mara des Bois x Pajaro.

I.3. Recherche du QTL majeur dans un autre fond génétique

Afin de rechercher la présence du QTL majeur détecté sur la population Capitola x CF1116 dans un autre fond génétique, la carte génétique d'une seconde population de cartographie octoploïde, Mara des Bois x Pajaro, a été initiée.

I.3.1. Cartographie de la population Mara des Bois x Pajaro

Un total de 153 couples d'amorces amplifiant des microsatellites, déjà utilisés pour la cartographie de la population Capitola x CF1116, ont été testés sur huit individus de la population de cartographie Mara des Bois x Pajaro. Sur ces 153 couples d'amorces testés, 95 ont révélé du polymorphisme (soit 62%). Parmi ces 95 couples d'amorces, ceux cartographiés sur le groupe de liaison IV des cartes de liaison génétiques déjà établies du fraisier diploïde et octoploïde ont été préférentiellement choisis. Trente couples d'amorces ont été amplifiés sur l'ensemble de la population et ont permis de révéler 96 bandes polymorphes, soit 3,2 bandes polymorphes par couple d'amorces en moyenne.

Parmi ces 96 marqueurs, l'analyse des ratios de ségrégation à un seuil de 1% a montré que :

- 18 marqueurs étaient présents chez les deux parents et ségrégeaient selon un ratio 3:1 (marqueur présent à l'état hétérozygote chez les deux parents). La cartographie de ces marqueurs est possible en utilisant JoinMap mais elle est imprécise. Elle n'a pas été envisagée dans cette thèse.
- 74 marqueurs ségrégeaient selon un ratio 1:1 (marqueur simple dose présent chez un seul parent). Les 48 marqueurs présents chez le parent femelle et les 26 marqueurs présents chez le parent mâle ont servi à construire la carte de liaison génétique femelle et mâle, respectivement (Annexe 4).

a. Cartes de liaison génétique femelle et mâle

La construction de la carte de liaison génétique femelle a été réalisée à partir des 48 marqueurs simple dose à l'aide du logiciel MAPMAKER, avec un LOD de 5.0 et une distance maximale entre deux marqueurs liés de 33 cM. La carte génétique femelle est constituée de huit groupes de liaison comprenant 36 marqueurs pour une longueur totale de 190,1 cM. De plus, en abaissant le LOD à 3.0, un marqueur supplémentaire v0007210c (EMFv007, taille 210 pb) s'associe à l'un des huit groupes. Onze marqueurs n'ont pas pu être liés à un groupe et ont été déclarés non-liés (UL, unlinked) (Figure 33).

La construction de la carte de liaison génétique mâle a été réalisée à partir des 26 marqueurs simple dose avec une même stratégie que celle décrite ci-dessus. La carte génétique mâle est constituée de cinq groupes de liaison comprenant 18 marqueurs pour une longueur totale de 160.9 cM. De plus, en abaissant le LOD à 3.0, un marqueur supplémentaire v0007205c (EMFv007, taille 205 pb) s'associe à l'un des cinq groupes. Sept marqueurs n'ont pas pu être liés à un groupe (Figure 33).

b. Attributions des noms des groupes de liaison

Dans un premier temps, les groupes de liaison appartenant au groupe d'homéologie IV ont été identifiés sur la présence de marqueurs issus d'au moins de deux couples d'amorces déjà cartographiés sur le groupe d'homéologie IV. Ceci a permis de repérer six groupes de liaison, quatre femelles et deux mâles : IVx-f, IVy-f, IVz-f, IVunk-f, IVx-m et IVy-m, f et m désignant les cartes de liaison génétique femelle et mâle, respectivement. Dans un deuxième temps, cinq marqueurs présentant des allèles identiques chez les deux populations de cartographie ont permis d'identifier les groupes de liaison IVb-f, Iib-f, et IVc-m sur la carte de liaison génétique de la population Mara des Bois x Pajaro. De plus, un marqueur génome-spécifique, EMFv023, développé sur une population de diversité (Denoyes, communication personnelle) a permis d'identifier le groupe VIIb-f. Enfin, les groupes restant non identifiés ont été nommés x-f, x-m, y-m et z-m (Figure 33).

I.3.2. Détection de QTL chez la population de cartographie Mara des Bois x Pajaro

a. Analyse des données phénotypiques

La recherche de QTL a été réalisée pour 11 variables qui relèvent de trois caractères : le nombre de hampes florales observées fin juillet, le nombre de stolons et la date de floraison. Pour chacune de ces 11 variables, des analyses statistiques descriptives de base ont été réalisées. Pour chaque variable, la normalité des données a été vérifiée à l'aide du logiciel R en utilisant le test de Shapiro-Wilk. Pour les onze variables étudiées, la p-value du test était inférieure à 0.1, donc les distributions n'ont pas pu être considérées comme normales.

Caractère	année	LG	marqueur	position	LOD	R ² (%)	effet
Nombre de hampes	2003	IVb-f	bx63240c	0,01	12,06	47,45	16,57
	2006	IVb-f	bx63240c	0,01	19,48	66,83	5,99
	2007	IVb-f	bx59238r	0,90	13,85	57,98	12,57
	2008	IVb-f	bx63232r	0,05	10,32	50,07	9,59
	2009	IVb-f	bx56206c	0,09	3,50	24,75	3,34
Nombre de stolons	2003	IVb-f	bx63232r	0,05	15,88	57,04	-31,21
	2008	IVb-f	bx59238r	0,90	11,04	52,46	-17,78

Tableau 10 : QTL significatifs détectés pour le parent femelle ‘Mara des Bois’ uniquement en fonction du caractère étudié : nombre de hampes florales et nombre de stolons. L’identification des QTL est basée sur une analyse en CIM avec des LOD supérieurs au LOD seuil (2,73 et 2,70 pour les cartes de liaison génétique femelle et mâle, respectivement).

b. Détection des QTL par régression linéaire et par CIM

Par régression linéaire, avec un seuil de 0,01%, des QTL significatifs ont été détectés seulement pour la carte génétique femelle pour toutes les années de notation sur les caractères ‘nombre de hampes florales’ et ‘nombre de stolons’. Ces QTL ont été détectés liés aux huit marqueurs constituant le groupe de liaison IVb-f. Pour le caractère ‘date de floraison’, aucun QTL n’a été détecté au seuil de 0,01%. Avec un seuil de détection à 1%, deux QTL ont été détectés pour la date de floraison : un sur la carte femelle pour l’année 2009 lié au marqueur b041220c du groupe de liaison IV-y-f et un sur la carte mâle pour l’année 2007 lié au marqueur bx55254c du groupe de liaison IV-y-m.

Pour l'analyse par Composite Interval Mapping (CIM), le seuil de significativité de détection d’un QTL (LOD seuil) pour un risque d’erreur de 0,1% a été déterminé. Un LOD seuil moyen a été calculé sur l'ensemble des variables. Il est de 2,9 et de 2,7 chez la femelle et le mâle respectivement.

Aucun QTL n’a été détecté pour la carte mâle avec un LOD supérieur au LOD seuil moyen de 2,7. Pour la carte femelle, sept QTL significatifs ont été détectés avec un LOD supérieur au LOD seuil moyen de 2,9 pour sept variables différentes (Tableau 10) relevant des deux caractères : le nombre de hampes florales et le nombre de stolons. Aucun QTL significatif n’a été détecté pour le caractère ‘date de floraison’.

Pour le caractère ‘nombre de hampes florales’, un QTL avec un effet positif a été détecté sur le groupe de liaison IV-b-f pour les cinq années de notation avec une variabilité expliquée (R^2) de 25 à 67% selon les années. Pour le caractère ‘nombre de stolons’, un QTL avec un effet négatif a été détecté sur le même groupe de liaison IV-b-f pour les deux années de notation avec une variabilité expliquée (R^2) de 52 à 57% selon les années.

En résumé, un QTL majeur à effet positif lié au caractère ‘nombre de hampes florales’ co-localise avec un QTL majeur à effet négatif lié au caractère ‘nombre de stolons’ sur le groupe de liaison IVb de la carte de liaison génétique femelle de la population Mara des Bois x Pajaro.

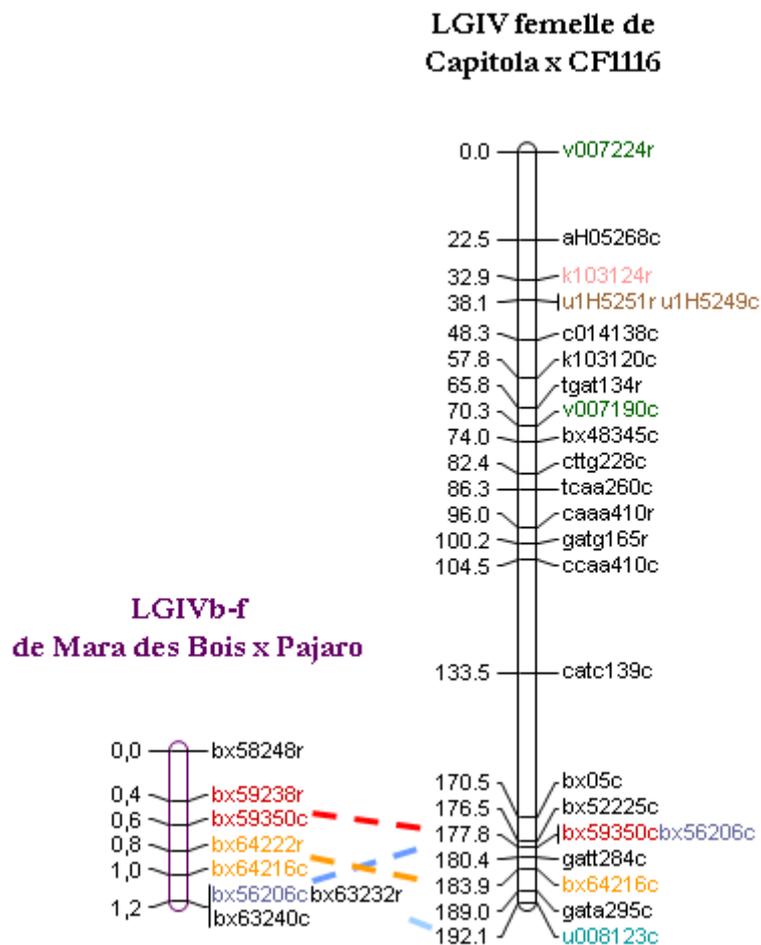


Figure 34 : Cartographie comparée du groupe de liaison LGIVb entre les cartes de liaison génétique femelle des deux populations octoploïdes Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro.

I.3.3. Cartographie comparée des QTL détectés entre les deux populations de cartographie octoploïdes

Des marqueurs présents chez les deux populations de cartographie ont permis de faire le lien entre les groupes de liaison de ces deux populations. Trois couples d'amorces (BxFT56, BxFT64 et BxFT59) développés pour la cartographie fine de la région d'intérêt chez la population Capitola x CF1116 ont révélé des allèles communs entre les deux populations de cartographie. Trois allèles, bx56206, bx64216 et bx59350, ont été identifiés comme étant communs aux deux populations. Ces allèles, cartographiés sur le groupe de liaison IVb-f et étroitement liés au QTL majeur détecté pour le nombre de hampes florales et le nombre de stolons sur la population Capitola x CF1116, sont également étroitement liés au QTL majeur détecté pour ces mêmes caractères chez Mara des Bois x Pajaro.

Un QTL majeur lié à la remontée florale et en position orthologue sur le groupe de liaison IVb chez deux populations distinctes, Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro, a donc été identifié. Ce résultat n'était pas attendu compte tenu du fond génétique différent des deux génotypes portant la remontée florale, Capitola et Mara des Bois (Figure 34).

Gène	Couple d'amorces	À partir de	Cartographie par bin mapping	Cartographie sur l'ensemble de la population
FT	FT4/FT5	<i>Fragaria</i>	IV ??	IV
LFY	LFY1/LFY2	<i>Fragaria</i>	III ?	?
CO	CO1c/CO2c	<i>Fragaria</i>	III ou VI ?	VI
AG	AG3/AG4	<i>Fragaria</i>	III ?	
AG	AG3/AG2	<i>Fragaria</i>	III ?	III
SLY	SLY1/SLY2	<i>Fragaria</i>	II	II
SLY	SLY3/SLY2	<i>Fragaria</i>	II	
GA2ox	GA2ox1/GA2ox2	<i>Rosa</i>	?	III
GAI	GAI1/GAI2	<i>Fragaria</i>	I ?	IV
GAI	GAI3/GAI2	<i>Fragaria</i>	I ?	
LHP	LHP1/LHP2	<i>Rosa</i>	VII	VII
GA3ox	GA3ox 3/4	<i>Rosa</i>	VI	VI
GA20ox	GA20ox 3/4	<i>Rosa</i>	VII	VII
SPY	SPY1/SPY2	<i>Rosa</i>	VI	VI
KSN	KSN1b/4b	<i>Fragaria</i>	VI	VI
KSN	KSN7c/2c	<i>Fragaria</i>	VI	VI
FT3	Fv3FT1f/r	<i>Fragaria</i>	VI	
BFT	FvBFT1f/r	<i>Fragaria</i>	VII	
MFT	FvMFT1f/r	<i>Fragaria</i>	V	

Tableau 11 : Gènes candidats cartographiés sur la carte de liaison de référence du fraisier diploïde. Les couples d'amorces utilisés et les origines des séquences utilisées pour dessiner les amorces sont précisés.

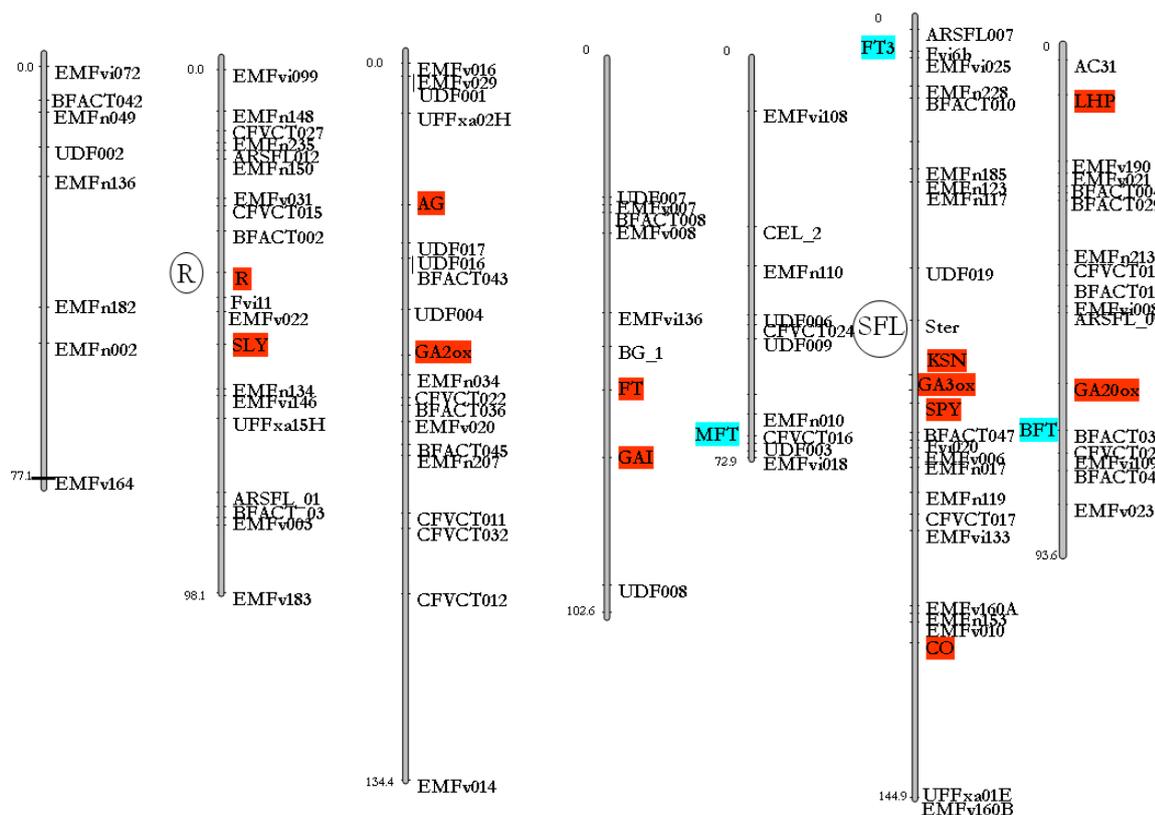


Figure 35 : Carte de liaison génétique diploïde réalisée à partir de la population de cartographie Fv x Fb. Les gènes candidats cartographiés pour l'ensemble de la population sont en rouge, ceux cartographiés uniquement par bin mapping sont en bleu.

II. Déterminisme moléculaire de la remontée florale

II.1. Déterminisme moléculaire de la remontée florale chez le fraisier diploïde

II.1.1. Identification et isolation de gènes candidats à la floraison chez le fraisier diploïde

Comme mentionné en introduction, le séquençage du fraisier diploïde n'était pas réalisé en début de thèse. C'est au cours de ma troisième année de thèse que j'ai pu y avoir accès à travers un consortium.

Ainsi, dans un premier temps, la recherche de gènes orthologues impliqués dans la floraison chez le fraisier diploïde a été basée sur les séquences disponibles dans les bases de données. Vingt deux gènes candidats ont été choisis pour leur rôle dans les voies de signalisation de la floraison chez *Arabidopsis thaliana*. Les séquences des homologues de ces gènes ont été recherchées chez le fraisier ou une espèce proche dans les bases de données. Afin de cartographier ces gènes candidats, 123 amorces ont été développées à partir de séquences disponibles de *Fragaria*, *Rosa*, *Malus*, *Prunus*, *Populus* et *Arabidopsis*. Pour amplifier les 22 gènes candidats, 84 couples d'amorces ont été testés sur les huit individus du 'bin mapping' de la carte de référence de la population diploïde (Sargent et al., 2004). Trente-neuf couples d'amorces ont permis d'amplifier une bande à la taille attendue pour 19 des 22 gènes candidats. Les produits d'amplification de 28 couples d'amorces ont été séquencés. Par 'bin mapping', 15 gènes candidats ont été cartographiés (Tableau 11). Parmi ces 15 gènes candidats, 12 ont été amplifiés pour tous les individus de la population de référence diploïde et ont pu être cartographiés (Figure 35).

Plusieurs gènes candidats ont été cartographiés sur des groupes de liaison intéressants :

- Les gènes *FT* et *GAI* ont été cartographiés sur le groupe de liaison IV. Ils constituent des gènes candidats très intéressants pouvant expliquer la remontée florale ou la production de stolons chez le fraisier octoploïde. Chez cette espèce, le QTL majeur avait été détecté sur le groupe de liaison homéologue, IV-b.
- Les gènes *KSN*, *SPY*, *GA2ox* et *CO* ont été cartographiés sur le groupe de liaison VI où se situe le locus lié à la remontée florale, SFL. Le gène *KSN*, orthologue au répresseur *TFL1* chez *A. thaliana*, est celui qui se cartographie au plus prêt du locus SFL.

II.1.2. The genetic key to continuous flowering in rose and strawberry is the *TFL1* homologue *KSN*

Une étude conduite en collaboration avec l'UMR GenHort d'Angers nous a permis de confirmer le rôle de *KSN*, homologue de *TFL1*, dans la remontée florale chez le fraisier diploïde. Le manuscrit ci-dessous décrit le travail réalisé sur le rosier par l'UMR d'Angers et sur le fraisier dans le cadre de ma thèse.

The genetic key to continuous flowering in rose and strawberry is the *TFL1* homologue *KSN*

Hikaru Iwata^{1,5}, Amélia Gaston², Arnaud Remay³, Tatiana Thouroude³, Koji Kawamura³, Laurence Hibrand-Saint Oyant³, Takashi Araki⁴, Béatrice Denoyes-Rothan² and Fabrice Foucher^{3,6}

¹ Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd. 1624 Shimokodachi, Akitakatashi, Hiroshima 739-1195, Japan

² UREF, Centre INRA Bordeaux, BP81, 33883 Villenave d'Ornon, France

³ UMR Génétique et Horticulture (GenHort), IFR149 QUASAV, Centre INRA Angers-Nantes, BP 60057, 49071 Beaucouzé, France

⁴ Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

⁵ Present address: Adviser of a non-profit organization Rose Culture Institute 820 Iino, Sakura-City, Chiba-Pref. 285-0003 Japan

⁶ Corresponding Author: UMR Génétique et Horticulture (GenHort), IFR149 QUASAV, Centre INRA Angers-Nantes, BP 60057, 49071 Beaucouzé, France, Tel 33(0) 241 225 775, Fax 33(0) 241 225 777, e-mail :fabrice.foucher@angers.inra.fr

Classification: Biological Sciences / Plant Biology

Keywords: retrotransposon, seasonality, floral initiation, perennial plants

ABSTRACT

Flowering is a key event in plant life and is finely tuned by environmental and endogenous signals to adapt to different environments. In horticulture, continuous flowering (CF) is a popular trait introduced in different species. It played an important role in the tremendous success of modern roses and wood strawberry in gardens. CF genotypes flower during all favourable seasons, while once-flowering (OF) genotypes flower only in spring. Here we show that continuous flowering is controlled by a TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) homologue in both rose and wood strawberry. In rose, six independent pairs of CF/OF mutants differ in the presence of a retrotransposon in the second intron of the TFL1 gene. Due to insertion of the retrotransposon, transcription of the gene is blocked and the absence of the floral repressor provokes rapid conversion of all growing vegetative apices into floral apices. In OF mutants, the retrotransposon has recombined to give an allele bearing only the long terminal element, and restoring a functional allele. In OF roses, the gene is repressed in spring to allow the first bloom. Then new arising shoots accumulate high TFL1 transcripts and remain vegetative. In wood strawberry, *F. vesca*, a 2 bp deletion in the coding region of the TFL1 homologue introduces a frame shift and is responsible for CF behaviour. Our results demonstrate a new role of TFL1 in perennial plants in maintaining vegetative growth and modifying flowering seasonality. It offers new prospects for controlling flower and fruit production in perennial plants.

INTRODUCTION

Obtaining plants that flower over a long period is the goal of many gardeners so as to be able to achieve year-round fruit and flower production. The flowering period can be lengthened by exploiting the blossoming duration or number of flowering cycle. Most plants have a single annual flowering period (“Once flowering habit”, OF). Some perennial plants have new waves of flowering during the year. This trait is present in some Rosoidae, such as rose and strawberry species in which flowering can be continuous (“Continuous flowering habit” CF). This character is controlled by a recessive major gene named RECURRENT BLOOMING (RB) and SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in diploid rose (1) and wood strawberry (*Fragaria vesca*) (2, 3), respectively. In rose and wood strawberry, the origin of continuous flowering is uncertain. The phenotype may arise from a mutation in natural populations. The rose mutant was thought to be selected from wild *Rosa chinensis* in China (4) and used in rose breeding as early as the Song Dynasty (A.D. 960-1279 (5)). Later, in the 17th century, cultivated CF Chinese roses were introduced in Europe and crossed with OF European to give rise to modern roses (4). Although mentioned as early as 1553, the "perpetual" woody strawberry, which is native to the Alpine mountain region, was completely described by Duchesne in 1766 (6), and was then introduced in gardens all over Europe. These *F. vesca* *semperflorens* plants were considered as mutants of once flowering woody strawberry (7). The potential of continuous flowering for flower and fruit production from spring to late fall explains the high gardening success of these CF roses and wood strawberries.

In rose and wood strawberry, the CF habit has not only effects on flowering but also on other important developmental characters: CF plants have a short juvenile phase and flower rapidly after seed germination (6, 8). They have determinate growth, with each shoot terminating in an inflorescence (3, 8). In both OF rose and wood strawberry, flowering occurs on axillary meristems and is under environmental control (9, 10). Continuous flowering roses are self-inductive and need no environmental control for flowering (11). There have been conflicting reports on the environmental control of flowering in the CF wood strawberries, which could have lost the photoperiodic and thermal control trait (9) or became long-day control types (12). Concerning endogenous control, the gibberellins hormone, GA, inhibits flowering in both OF rose and wood strawberry (13, 14). Continuous flowering roses are insensitive to GA for flowering as GA fails to block the floral process in CF roses (14).

In Chinese rose and wood strawberry, as the mutation leading to CF is recessive and affects flowering and determinate/indeterminate growth, good candidate genes are members of the TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) family. Members of this family control shoot meristem identity and loss of function mutations in perennial and annual plants result in changes in plant architecture. TFL1 genes are required to maintain the inflorescence identity of the shoot apical meristem in different annual plants like *Arabidopsis thaliana* (15, 16), *Antirrhinum majus* (17), pea (18) and soybean (19, 20). Furthermore, in *Arabidopsis* and pea, TFL1 also

controls the length of the vegetative phase (15, 18). In *Arabidopsis*, *tfl1* mutants flower earlier. In perennial tomato, *SELF PRUNING*, the homologue of TFL1, controls the length of the sympodial unit. After flowering, *sp* mutants produce only a few sympodial units with less and less nodes, leading to a terminal inflorescence (21). In poplar, TFL1 does not modify indeterminate growth but rather regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release (22).

TFL1 belongs to a larger family, represented by six proteins in *Arabidopsis* (23). Among them, FT and TSF for FLOWERING LOCUS T and TWIN SISTER OF FT are floral activators (23, 24). FT was proposed to be a component of the florigen (25). Here we investigated the function of TFL1 homologues in Rosoidae and we demonstrated that the continuous flowering gene in rose and strawberry is encoded by a TFL1 homologue.

RESULTS

RoKSN and FvKSN are TFL1 orthologous and co-localise with the OF/CF locus

Using degenerate primers in rose and results from the strawberry genome sequencing project (26), we identified four and seven TFL1/FT homologues in rose and strawberry, respectively. Two TFL1 homologues were denominated KSN, for Koushin, an old Japanese name of Chinese CF roses (5) and were further revealed as good candidates for the continuous flowering gene. RoKSN and FvKSN clearly belonged to the TFL1 clade with also RoTFL1 and FvATC; RoFT, FvFT, FvFT2 and FvFT3 to the FT clade and one (FvMFT) to the MFT clade (Figure 1). The two last identified TFL1/FT homologues, i.e. RoTFL1b and FvTFL1b, were more related to BFT or MFT.

Using large populations that segregated for the OF/CF trait, we found that RoKSN and FvKSN co-localized with the OF/CF locus. In rose and wood strawberry, no recombinants were found between RoKSN/FvKSN and the CF/OF locus in 670 individuals from two F1 progenies obtained via the cross between CF and OF roses, and in 158 S1 selfings of *F. vesca* Ilarya, respectively.

Insertion of a retrotransposon in RoKSN is responsible for the recurrent blooming character

In order to validate the function of RoKSN in continuous flowering control in rose, we studied six different CF/OF mutant pairs and one rare OF/CF mutant pair. Frequently, bushy CF roses mutate into climbing roses, with an OF habit, while once flowering rose rarely mutate into CF (27). All the 7 CF genotypes studied presented a retrotransposon in the 2nd intron of the RoKSN gene and were homozygous for this RoKSN allele (Figure 2). This 9 kbp long retrotransposon presented characteristics of the copia retrotransposon family. This large insertion may lead to an inactive RoKSN allele (see results below).

Each of the 7 studied mutants presented a difference at the RoKSN locus when compare with the wild type. Indeed, all the six climbing–OF mutants presented a new allele at the RoKSN locus with a 1 kbp insertion at the same place as the 9 kbp insertion in the second intron (Figure 2c). This 1 kbp sequence corresponds to the long terminal repeat (LTR) element of the retrotransposon. Five climbing mutants (‘Gold Bunny Cl.’, ‘Wendy Cusson Cl.’, ‘Pink Chiffon Cl.’, ‘Iceberg Cl.’ and ‘Peace Cl.’) had both the 9 kbp retrotransposon inserted and the 1 kbp LTR inserted patterns. One climbing mutant (‘Old Blush Cl.’) only had the 1 kbp insertion (Figure 2b and c). Recombination of the retrotransposon in the climbing mutants restores an active RoKSN allele (see discussion below). In the rare OF/CF vegetative mutation, a OF rose, i.e. ‘Félicité Perpétue’ (FP), gave CF dwarf mutant ‘Little White Pet’, LWP (28). FP was found to be heterozygous at the RoKSN locus (allele with and without the retrotransposon), whereas LWP only had the allele with the retrotransposon (Figure 2c). In LWP, by sequencing and Southern blot analyses, only one allele has been found, the allele with the retrotransposon (Figure 2c, S1). In this later genotype, the absence of the active allele

(without the retrotransposon) can be explained by the deletion of the gene or a somatic chromatid exchange. Analysis of these independent mutants demonstrated that recombination of the retrotransposon restored an OF phenotype, whereas deletion of the functional allele led to CF roses.

Full length RoKSN mRNA is not accumulated in CF roses due to retrotransposon insertion

By two-step RT-PCR, we were unable to detect RoKSN transcript accumulation in CF roses, whereas the transcript accumulated in OF roses (Figure 3b). mRNA synthesis or accumulation might be blocked by the copia-like retrotransposon insertion. To test this hypothesis, RoKSN transcript accumulation was studied by one-step RT-PCR using RoKSN specific primers in a CF/climbing-OF mutant pair, i.e. ‘Peace’/‘Peace Climbing’. As described before, ‘Peace Climbing’ presents an allele with the LTR element at the RoKSN locus (Figure 2c). Using primer combination F9XR11 (surrounding intron 1), one-step RT PCR products were observed in both “Peace” and “Peace Climbing”, suggesting that pre-mRNA is synthesised and the first intron is spliced out in both (Figure 3a and b). Using primer combination F9XR13 (surrounding intron 2, where the retrotransposon is inserted), one-step RT-PCR products were observed only in “Peace Climbing”. Then, using primer combination F9 and primers in the retrotransposon (InsR3, Ins R4, Ins R5 or Ins R8), we observed one-step RT-PCR products in “Peace” corresponding to PCR products that would be expected if the second intron was not spliced out (Figure 3a and c). We conclude that due to the retrotransposon insertion, the second intron is not spliced out in CF roses and no full length cDNAs are accumulated. In OF-climbing mutants, recombination of the retrotransposon restored splicing of the second intron and an active RoKSN allele, leading to non-continuous flowering.

FvKSN, the RoKSN orthologue in wood strawberry controls continuous flowering

Sequencing the entire FvKSN revealed that CF genotypes showed a 2 bp deletion in the coding sequence responsible for a frame shift, which led to rapid introduction of a stop codon in the putative translated protein and to a non-functional allele (Figure 4d). In the 158 S1 seedlings, all homozygous individuals with a 2 bp deletion at the FvKSN locus (*ksn/ksn*) had a CF habit, while all homozygous individuals without a 2 bp deletion (*KSN/KSN*) or heterozygous (*ksn/KSN*) had an OF habit.

In order to confirm the role of the 2 bp deletion of FvKSN in continuous flowering, we conducted an association analysis between the 2 bp deletion and flowering phenotypes using 37 accessions of *F. vesca*, including 13 CF genotypes. The 37 accessions were available from different genetic resources (Table S2). Sequencing of the entire FvKSN gene in all accessions revealed a total of six SNPs located in introns and the 2 bp deletion in the first exon, which led to six haplotypes. Within this genetic polymorphism, only the 2 bp deletion was associated with the CF habit (Figure 4b and 4c). Using 11 neutral microsatellites, we investigated the population structure in these 37 accessions using STRUCTURE 2.2. The

most likely number of potential clusters (K) was estimated at two. All genotypes except one were clearly ranked within one of the two groups. The first group included 17 genotypes from Europe, mainly from the Alps, whilst the second group included 19 genotypes that originated from Europe/North America (Figure 4a). All CF strawberries were included in the former group. In the 19 genotypes from the Europe/North American group, the 2 bp deletion was absent and no CF habit was observed.

Continuous flowering gene expression is regulated during the floral process

We monitored RoKSN transcript accumulation during the floral process. In the OF *Rosa x wichurana*, new shoots arose from axillary buds borne by shoots from the previous year. These new shoots were vegetative and floral initiation rapidly occurred. RoKSN transcripts were barely detectable in these vegetative shoots. The RoKSN level increased during floral initiation and inflorescence development (Figure 5a). During floral initiation and development, RoFT, a floral activator, was progressively accumulated (Figure 5b). An inflorescence formed at the tips of these shoots. The RoKSN transcript level was almost undetectable in floral buds. After the first flowering, new shoots arose from the base of the bush, had indeterminate growth and remained vegetative during the growing season. An eightyfold increase in transcript accumulation was detected between vegetative spring and autumn shoots (Figure 5a). RoFT was barely detectable in these vegetative shoots (Figure 5b). Therefore, low RoKSN expression in spring was associated with floral transition and determinate growth, whereas high expression of RoKSN in autumn was associated with vegetative and indeterminate growth. In CF roses, functional RoKSN transcripts were not present (due to retrotransposon insertion), and all new shoots had determinate growth with an inflorescence rapidly forming at the shoot tips.

DISCUSSION

A floral repressor controls continuous flowering in rose and wood strawberry

In rose, we demonstrated that the continuous flowering phenotype could be explained by the insertion of a copia-like retrotransposon in the second intron of RoKSN, i.e. a TERMINAL FLOWER 1 homologue. Insertion of the retrotransposon modified the RNA maturation. The second intron was not spliced out, and full length RoKSN RNA was not accumulated (Figure 3). In six independent vegetative mutants, OF mutant roses differed from CF roses by recombination of the copia-like retrotransposon at the RoKSN locus (Figure 2). After retrotransposon recombination, only the LTR elements remained and the second intron was spliced out, thus restoring a functional RoKSN allele (Figure 3). In the CF/OF mutant pair, restoration of the RoKSN in OF-climbing mutant may not be complete as flowering can occur occasionally in the summer. The presence of the LTR element in the second intron may modify the level or the spatio-temporal pattern of expression of RoKSN (REF). In another vegetative mutant pair (from OF to CF behaviour), the function allele was deleted and only the non-functional allele was present, leading to the continuous flowering phenotype (Figure 3 and S1). Furthermore, the role of KSN in continuous flowering control was strengthened by the absence of recombination between RoKSN and the continuous flowering locus in large F1 progenies segregating for the CF/OF phenotype (in 670 individuals). From these results, we conclude that in rose the continuous flowering gene is encoded by RoKSN, i.e. a TFL1 homologue.

We investigated the role of FvKSN, the RoKSN orthologue in wood strawberry, which also presented continuous flowering in certain genotypes. All CF individuals from a S1 segregating population presented a 2 bp deletion in the coding sequence of the gene, whereas the deletion was absent in all OF homozygous genotypes. This deletion induced a frame shift and the rapid introduction of a stop codon leading to a truncated protein (Figure 4d). We proposed that this 2 bp deletion in the coding sequence is responsible for continuous flowering in *F. vesca*. As no mutant was available in strawberry, we performed an association analysis. Among 37 accessions studied, the 2 bp deletion and the continuous flowering phenotype were always associated (Figure 4). We concluded that FvKSN is the orthologue of RoKSN as the two genes were highly similar (Figure 1) and both controlled continuous flowering process.

KSN and seasonality of flowering

The main effect of continuous flowering is that it modifies the seasonality of flowering. Perennial plants repeatedly cycle between vegetative and floral development. Most perennial plants have a single reproductive phase which is synchronized to the changing seasons. Once flowering plants bloom in spring or early summer and further developments are vegetative. This seasonality might be explained by seasonal regulation of KSN. We showed a seasonal

regulation of RoKSN transcript accumulation in OF rose: before the first bloom, KSN was weakly expressed; in parallel RoFT, an homologue of the floral integrator FT (23, 24), was progressively accumulated (Figure 5). Later in new arising shoots, high accumulation of RoKSN transcripts was associated with vegetative shoots. No RoFT transcript was then accumulated. In continuous flowering roses, this regulation was disrupted due to the absence of RoKSN transcript accumulation. The floral repressor was absent and flowering occurred during all seasons. This report and a previous study in *Arabis alpina* (29) highlighted the importance of floral repressors in the control of seasonality. In *A. alpina*, PERPETUAL FLOWERING 1 (PEP1), an homologue of the floral repressor FLOWERING LOCUS C (FLC), limited the duration of flowering and facilitated the return to vegetative development. PEP1 is transiently repressed by low temperature, thus allowing seasonal flowering of *A. alpina* (29).

KSN might integrate endogenous and environmental signals

KSN is involved in different aspects of plant development, which are controlled by endogenous and environmental signals. KSN is a good candidate to integrate these different signals. We showed that, in rose, KSN was seasonally regulated and might integrate environmental signals such as cold and photoperiod. Gibberellins (GA) signalling is modified between OF and CF roses (14, 30). The loss of KSN function makes CF roses insensitive to GA for flowering. CF roses still respond to GA in terms of internode elongation (14). Therefore KSN may be an element in GA signalling for flowering control in rose. The interaction with hormones is unknown in TFL1 homologues. In tomato, it was proposed that SFT (the FT homologue) may interact with auxin to regulate the sympodial cycle and leaf architecture (31). In Arabidopsis, MOTHER OF FT AND TFL1 was shown to regulate seed germination *via* the GA and ABA signalling pathway (32). Interaction of TFL1 family genes and the hormonal pathway represent an interesting field of investigation.

KSN and juvenile phase

In different species, TFL1 was proposed to control the length of the different growing phases such as the juvenile from adult (JA) transition (REF). In Arabidopsis, *tfl1* mutants have a shorter juvenile phase (16). In rose and strawberry, CF genotypes can flower rapidly after seed germination (a few weeks), whereas once-flowering genotypes have a juvenile period of 1 or 2 years (6, 8). The RoKSN mutation in CF roses markedly limits the juvenile phase. Extinction of the TFL1 homologue in trees (apple and poplar) was also shown to reduce the juvenile phase (22, 33). Furthermore, in poplar, it was proposed that FT accumulation to a certain level during the juvenile phase enables flowering (34, 35). Therefore, the FT/TFL1 ratio might be important for control of the juvenile/adult transition. Loss of the KSN function in CF rose modifies this ratio, and may reduce the length of the juvenile phase.

Maintenance of indeterminate growth

In monocarpic plants, TFL1 homologues were proposed to maintain indeterminate growth (15, 17-19). In monocarpic indeterminate *tfl1* mutants, after floral initiation the inflorescence meristem is rapidly converted into terminal flowers (15). Rose is a polycarpic indeterminate plant. Loss of the TFL1 function in roses induces the conversion of indeterminate vegetative meristems into terminal inflorescence meristems. In poplar, another polycarpic indeterminate plant, downregulation of PopCEN1 by RNAi does not change indeterminate into determinate growth (22). In the TFL1 RNAi poplars, the weak remaining expression of TFL1 homologue may be sufficient to maintain indeterminate growth.

Origin of continuous flowering in horticulture

Our results highlighted the origin of continuous flowering in two important horticultural plants. In wood strawberry, continuous flowering was well described from XVIII century and was proposed to be originated from Alps (6). The hypothesis of only one mutation is strengthened by the presence of only one haplotype in CF genotypes with the 2 bp deletion in the FvKSN coding sequence even though the OF displayed five haplotypes (Table S2). Only one mutation might be responsible for the CF habit in the wood strawberry studied genotypes despite it was found wild at various places in the European Alps (36). In rose, CF flowering was thought to arise from a mutation in wild Chinese rose and then introduced in old Chinese cultivated roses (4, 5). We propose that the mutation is due to insertion of a retrotransposon into the RoKSN locus. The retrotransposon is present in 'Old Blush', i.e. the Chinese progenitor or its close relative used to introduce the CF habit in European roses. The retrotransposon was absent in the wild species *R. chinensis spontanea* (Figure 2b), i.e. an OF rose that is supposed to be an ancestor of the original CF roses (37).

Identification of KSN as the continuous flowering genes offers new perspectives in ornamentals and fruits. As proposed, KSN may integrate endogenous and environmental factors. Understanding the regulation of KSN by these different factors may provide new ways to control flower and fruit production.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. *R. x wichurana* originated from the ‘Jardin de Bagatelle’ (Paris, France). *R. hybrida* ‘Félicité Perpetue’ and its mutant ‘Little White Pet’ were obtained from Loubert Nursery (Les Rosiers sur Loire, France). *R. chinensis spontanea* was a gift from Mr Ogisu. ‘Gold Bunny’, ‘Wendy Cussons’, ‘Pink Chiffon’, ‘Old Blush’, ‘Iceberg’, ‘Peace’ and the corresponding climbing mutants were from Hiroshima Botanical Garden (Japan) and are of independent origins (38). The mutants are vegetative mutants, also known as sports. A sport of a clonally propagated plant arises as a mutant cell in the shoot meristem (27). Rose F1 progenies were obtained from a cross between *R. x wichurana* and H190 (575 individuals (39)) and *R. x wichurana* and *R. hybrida* “The Fairy” (95 individuals, unpublished results). In strawberry, the 158 S1 progeny was obtained from *F. vesca* Ilaria. The collection of the 37 genotypes listed in Table S2 was obtained from Dresden, INRA and USDA-Corvallis.

Cloning and phylogenetic analysis. TFL1 homologues in rose were isolated by PCR on *R. chinensis spontanea* using the primers UtlF1 and UtlR1. All primers are listed in Table S1. In strawberry, FvKSN was first isolated using primers from rose, KSNqPCRF2 and KSNqPCRR2. Other TFL1 homologues were isolated using sequences obtained *via Fragaria* genome sequencing (26). Amino acid sequences of FT and TFL1 homologues in Arabidopsis, tomato, poplar and grapevine were aligned with predicted FT/TFL1 proteins in strawberry and rose using ClustalW software (40). A phylogenetic tree was produced from 1000 bootstrap replicates by applying the neighbour joining (NJ) method with Phillips software. The phylogenetic tree was displayed using TREEVIEW (41).

Phenotyping, mapping, genetic structure. Segregating populations were phenotyped for continuous flowering. In rose, genotypes were considered as CF when plants flowered in the first year after germination and were confirmed by the presence of flowers in October and November over a 4-year period (2006 to 2009). In strawberry, genotypes were considered as CF when plants presented inflorescences in late summer and fall. In the seven pairs of mutants, the climbing rose genotypes, classified as OF, may present occasional flowering late in the summer. In rose, based on polymorphism due to the retrotransposon insertion, the RoKSN genetic marker was developed using a multiplex kit (Qiagen, Germany) with F3, InsR3 and R1 primers. In strawberry, FvKSN was genotyped based on the 2 bp deletion identified in the coding region. The relatedness of 40 wood strawberry genotypes was studied with 11 neutral microsatellite loci displayed throughout the genome and using STRUCTURE software (42).

Gene expression analysis. Total RNA extraction was performed as previously described (30). To test the effect of retrotransposon on mRNA accumulation, a one-step RT-PCR was performed using the one-step RT-PCR kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer’s recommendations. To study RoKSN accumulation during the floral process, a two-step RT-PCR was carried out as previously described (30). Total RNA was reverse-transcribed using

oligo-dT primers and subjected to quantitative PCR to analyse transcript accumulation. The amount of RNA was normalized using the TCTP gene as reference after checking the homogeneity of the Ct variation with a second housekeeping gene, i.e. EF1 α (30). Terminal parts of vegetative shoots were harvested in spring and autumn from *R. x wichurana* at different time points (see details in the legend of Figure 5)

ACKNOWLEDGMENTS

A. Gaston and A. Remay were supported by a joint grant from Région Aquitaine and Pays de la Loire, respectively, as well as the French ‘Institut National de la Recherche Agronomique’. A. Gaston was supported by a grant from Région Aquitaine. We thank the experimental unit “Horticole”, N. Dousset and J. Chameau from the experimental team of GenHort and A. Bonnet, N. Pedepat and S. Schafleitner from UR 419 for growing and phenotyping the plants. We thank the Strawberry Sequencing Consortium for accession to the sequences before publication of the strawberry genome and more particularly V. Shulaev and K. Folta. H. Iwata was encouraged and supported by the late Dr. Susumu Ohno and the late Gisuke Wakunaga, Chairman of Wakunaga Pharmaceutical Co. Ltd.

REFERENCES

1. Semeniuk P (1971) Inheritance of recurrent blooming in *Rosa wichuraiana*. *J. Hered.* 62(203-204).
2. Albani MC, Battey NH, & Wilkinson MJ (2004) The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theor. Appl. Genet.* 109(3):571-579.
3. Brown T & Wareing PF (1965) The genetical control of everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica* 14:97-112.
4. Hurst CC (1941) Notes on the origin and evolution of our garden roses. *J. Roy. Hort. Soc.* 66:73-82, 242-250, 282-289.
5. Ogisu M (1996) Some thoughts on the history of China roses. *New Plantsman* 3:152-157.
6. Duchesne N (1766) *Histoire naturelle des fraisiers* (Didot Panckoucke, C.J., Paris).
7. Darrow G (1966) *The strawberry: History, Breeding and Physiology* (Holt Rinehart Winston, New York).
8. Vries DP (1976) Juvenility in Hybrid Tea-roses. *Euphytica* 25(1):321-328.
9. Battey NH, et al. (1998) *Genetic and Environmental Control of Flowering in Strawberry* (CAB International) pp 111-131.
10. Foucher F, et al. (2008) New resources for studying the rose flowering process. *Genome* 51(10):827-837.
11. Havelly AH (1972) Phytohormones in flowering regulation of self inductive plants. *Proceeding of the 18th International Horticultural Congress, Tel-Aviv*, Vol 5, pp 178-198.
12. Sonstebly A & Heide OM (2008) Long-day rather than autonomous control of flowering in the diploid everbearing strawberry *Fragaria vesca* ssp *semperflorens*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 83(3):360-366.
13. Guttridge CG & Thompson PA (1963) The effects of gibberellins on growth and flowering of *Fragaria* and *Duchesna*. *J. Exp. Bot.* 144(248-257).
14. Roberts AV, Blake PS, Lewis R, Taylor JM, & Dunstan DI (1999) The effect of gibberellins on flowering in roses. *J. Plant Growth Regul.* 18(3):113-119.
15. Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, & Coen E (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275(5296):80-83.
16. Ratcliffe OJ, et al. (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* 125(9):1609-1615.
17. Bradley D, et al. (1996) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* 379(6568):791-797.

18. Foucher F, et al. (2003) DETERMINATE and LATE FLOWERING Are Two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS Homologs That Control Two Distinct Phases of Flowering Initiation and Development in Pea. *Plant Cell* 15(11):2742-2754.
19. Tian ZX, et al. (2010) Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(19):8563-8568.
20. Liu BH, et al. (2010) The Soybean Stem Growth Habit Gene Dt1 Is an Ortholog of Arabidopsis TERMINAL FLOWER1. *Plant Physiology* 153(1):198-210.
21. Pnueli L, et al. (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* 125(11):1979-1989.
22. Mohamed R, et al. (2010) Populus CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in Populus. *Plant J.* 62(4):674-688.
23. Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, & Araki T (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286(5446):1960-1962.
24. Kardailsky I, et al. (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286(5446):1962-1965.
25. Corbesier L, et al. (2007) FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis. *Science* 316(5827):1030-1033.
26. Shulaev V, et al. (submitted) Short and sweet: the genome of a diploid strawberry.
27. Lewis R (1994) Investigation of mutants of Rosa that affect growth before flowering. PhD (University of East London, London).
28. Roberts AV, Debener T, & Gudin S (2003) Encyclopedia of rose science. Volumes 1-3. Encyclopedia of rose science. Volumes 1-3), p xviii + 1450 pp.
29. Wang R, et al. (2009) PEP1 regulates perennial flowering in Arabis alpina. *Nature* 459(7245):423-427.
30. Remay A, et al. (2009) A survey of flowering genes reveals the role of gibberellins in floral control in rose. *Theor. Appl. Genet.* 119(5):767-781.
31. Shalit A, et al. (2009) The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(20):8392-8397.
32. Xi W, Liu C, Hou X, & Yu H (2010) MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 22(6):1733-1748.
33. Kotoda N, Iwanami H, Takahashi S, & Abe K (2006) Antisense expression of MdTFL1, a TFL1-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 131(1):74-81.
34. Bohlenius H, et al. (2006) CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312(5776):1040-1043.
35. Hsu C-Y, Liu Y, Luthe DS, & Yuceer C (2006) Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18(8):1846-1861.

36. De Vilmorin H (1898) Perpetual strawberries. *Journal of the Royal Horticultural Society*, (Rev. W. Wilks, M.A., London), Vol XXII, pp 311-326.
37. Martyn R (2005) *Rosa Chinensis* f. *spontanea*. *Curtis's Botanical Magazine* 22(4):214-219.
38. Cairns T (2000) Modern roses XI. *The world encyclopedia of Roses* (Academic press, San Diego).
39. Hibrand-Saint Oyant L, Crespel L, Rajapakse S, Zhang L, & Foucher F (2008) Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. *Tree Genet. Genomes* 4(1):11-23.
40. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, & Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24):4876-4882.
41. Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS, Comput. Appl. Biosci.* 12:357-358.
42. Pritchard JK, Stephens M, & Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945-959.
43. Carmel-Goren L, Liu Y, Lifschitz E, & Zamir D (2003) The SELF-PRUNING gene family in tomato. *Plant Mol. Biol.* 52(6):1215-1222.
44. Carmona MJ, Calonje M, & Martinez-Zapater JM (2007) The FT/TFL1 gene family in grapevine. *Plant Mol. Biol.* 63(5):637-650.
45. Igasaki T, Watanabe Y, Nishiguchi M, & Kotoda N (2008) The FLOWERING LOCUS TERMINAL FLOWER 1 family in Lombardy poplar. *Plant Cell Physiol.* 49(3):291-300.

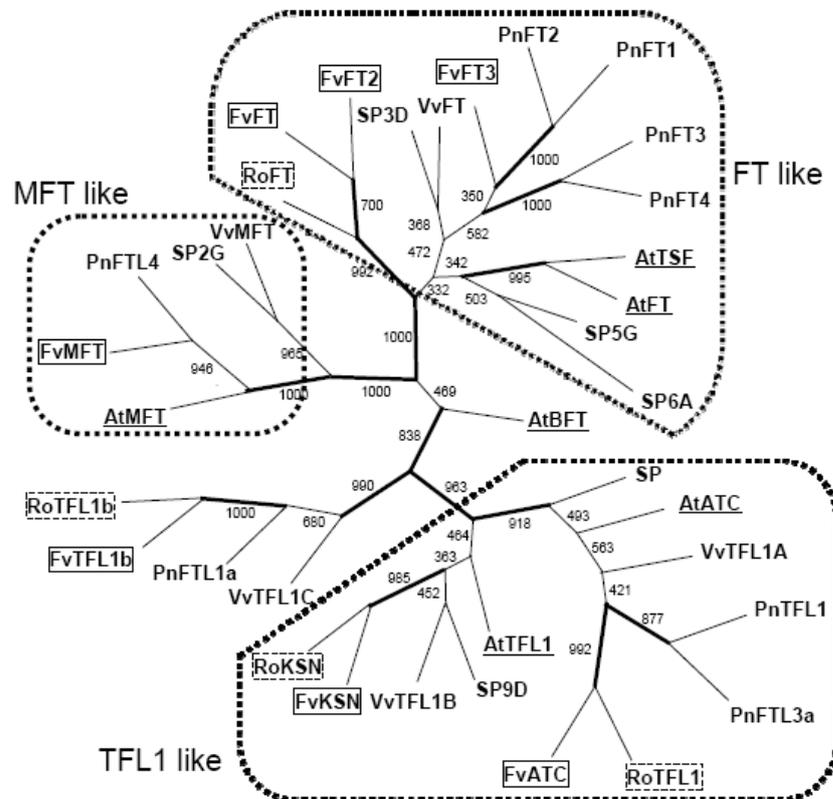


Figure 1

Figure 1: Phylogenetic analysis of members of the FT/TFL1 family in rose and wood strawberry. The *TFL1* homologues *RoKSN* and *FvKSN* belong to a small gene family. *RoKSN* (HQ174211), *FvKSN* (HQ378595), *RoTFL1* (FM999796) and *FvATC* (21992) belong to the TFL1 clade; and four (*FvFT1* (04680), *FvFT2* (28959), *FvFT3* (21535), and *RoFT* (FM999826)) to the FT clade, one (*FvMFT* (09405)) to the MFT clade and two more (*FvTFL1b* (13304) and *RoTFL1b* (HQ174212)) are related to *AtBFT*. The tree was constructed using the NJ method with the TFL1 family protein from rose (outlined with dotted lines), wood strawberry (outlined with solid lines), *Arabidopsis* (underlined (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)), tomato (Carmel-Goren et al., 2003), grapevine (Carmona et al., 2007) and poplar (Igasaki et al., 2008). Bootstrap values for 1000 resamplings are shown on each branch. Branches with a bootstrap value greater than 700 (of 1,000) are shown with a thick line. The circle represents the different clades (TFL1, FT and MFT).

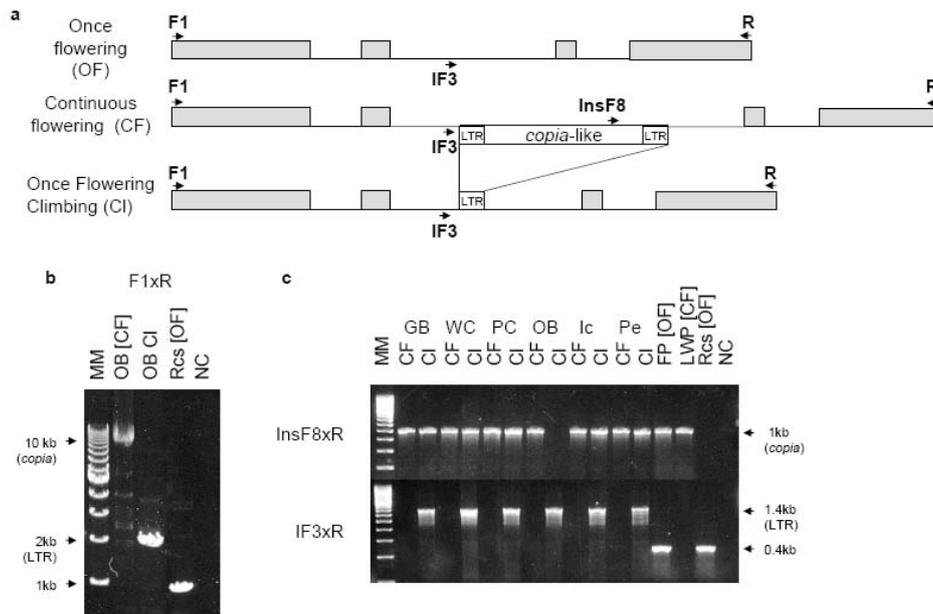


Figure 2: Insertional polymorphism at the *RoKSN* locus between once flowering and continuous flowering (CF and OF, respectively) mutant roses. (a) Schematic representation of the *RoKSN* genomic region for the three different alleles. In the second intron, the CF allele had a 9 kbp *copia*-like retrotransposon, the “climbing” (CI) allele only had a long terminal repeat (LTR) element, whereas the original and OF allele had no insertion. The exons are represented by grey boxes, introns by black lines and primers used by arrows. (b) PCR amplification of *RoKSN* in Chinese roses. A CF Chinese rose ‘Old Blush’ (OB), a progenitor used to introduce continuous flowering had a *copia*-like retrotransposon inserted in the second intron, whereas OF wild Chinese rose (*R. chinensis spontanea*, Rcs) had no retrotransposon. The climbing vegetative mutant of ‘Old Blush’ (OB CI) only had the LTR elements. The F1xR2 primer pair amplified the complete coding sequence (intron and exon) of *RoKSN*: 10 kb for the allele with the retrotransposon (*copia*), 2 kb for the allele with LTR element and 1 kb for the ancestral allele. (c) Characterization of the retrotransposon insertion in different vegetative mutant pairs using different primer combinations. All climbing mutants tested presented recombination of the retrotransposon with the LTR motif remaining. InsF8xR6 only amplified the sequence with the retrotransposon (1 kb amplification, *copia*), whereas IF3xR9 only amplified the sequence with the LTR motif (1.4 kb amplification, LTR) or the allele without insertion (400 bp amplification). In the CF/OF mutant pairs, the CF rose varieties and their corresponding climbing (CI) mutants are ‘Gold Bunny’ (GB), ‘Wendy Cusson’ (WC), ‘Pink Chiffon’ (PC), ‘Old Blush’ (OB), ‘Iceberg’ (Ic), ‘Peace’ (Pe). The OF/CF mutant pair is ‘Félicité Perpétue’ (FP) and its mutant ‘Little White Pet’ (LWP). MM for molecular marker, NC for negative control (water).

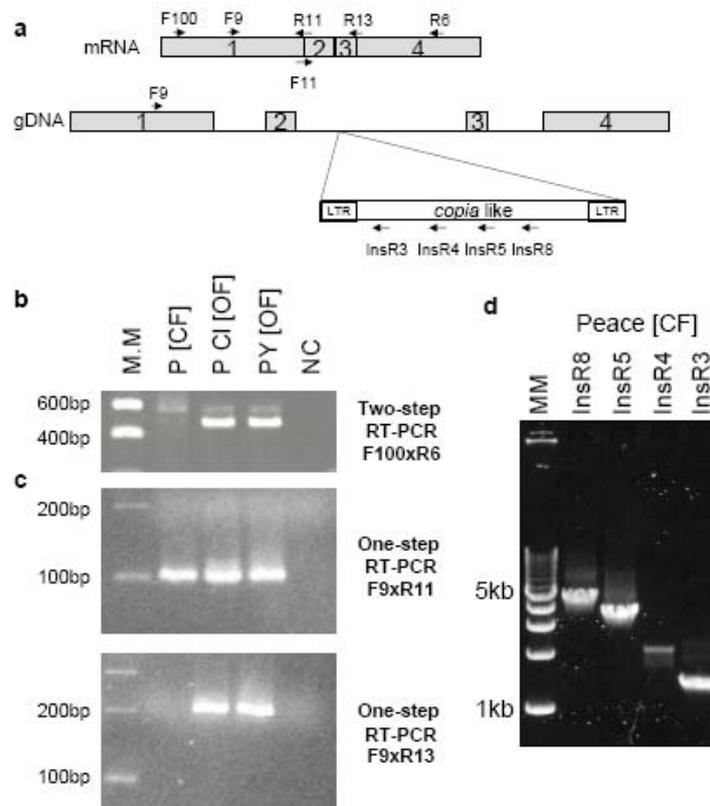


Figure 3: Effect of the insertion of the *copia*-like retrotransposon on the splicing of the second intron of *RoKSN* (a) Schematic representation of *RoKSN* mRNA and genomic (gDNA) region with the exons (boxes numbered from 1 to 4), introns (lines) and retrotransposon (insert). Primers used are indicated by arrows (b) Two-step RT-PCR using F100 X R6 primer combination (c). One-step RT-PCR using different *RoKSN* primer pairs. The F9 x R11 primer pair amplified the 100 bp product only if the first intron was spliced out as the R11 primer spanned the first intron; the F9 x R13 primer pair amplified the 200 bp product only if the second intron was spliced out as R13 primer spanned the second intron and (d) One step RT-PCR using the primer pair, F11 in combination with InsR8, InsR5, InsR4 and InsR3 respectively located within the retrotransposon. F11 spanned the first intron. RT-PCR was performed on total RNA from terminal shoots of ‘Peace’ (P), a CF rose, its OF climbing mutant (‘Peace Climbing’, PCI) and ‘Park Yellow Tea Scented China’ (PY, an OF Chinese rose). MM for molecular marker and NC for negative control (water).

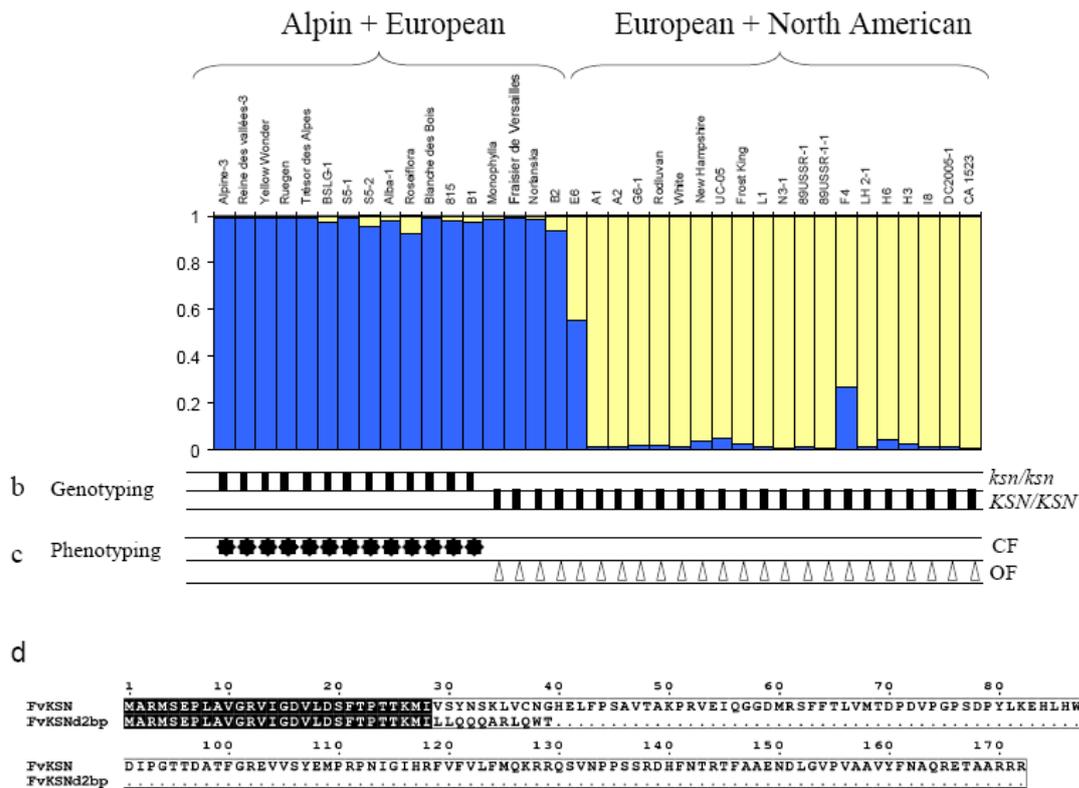


Figure 4: Relationship between genetic structure of 37 wood strawberry genotypes, *FvKSN* genotyping and CF/OF phenotyping. (a). Estimated genetic structure of wood strawberry genotypes. Structure was represented by vertical line in which the ancestry proportions of each genotype were indicated by the length of colour segment. Genotypes were distributed in $K = 2$ ancestry groups (dark and clear) (b). Distribution of the 2 bp deletion present in the coding sequence. *KSN* and *ksn* are respectively the allele without and with the deletion. The *ksn/ksn* or *KSN/KSN* genotyping of each genotype was marked by vertical bars. (c). CF/OF phenotyping, indicated by stars and triangles respectively for each genotype (d) Alignment of the protein encoded by *FvKSN* and the version encoded by the allele with the 2 bp deletion (*FvKSNd2bp*).

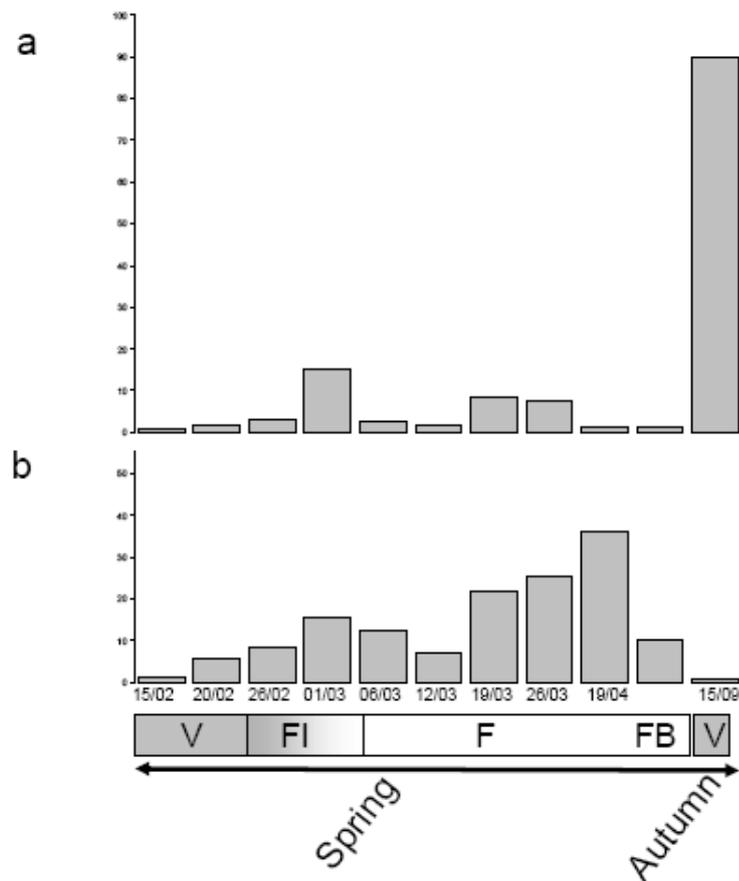


Figure 5: Seasonal accumulation of *RoKSN* (a) and *RoFT* (b) transcripts in once flowering (OF) genotypes. Transcript accumulation was monitored by two-step RT PCR on an OF genotype (*R. x wichurana*) in new shoots emerging in spring and later in autumn. In spring, axillary buds from previous year shoots burst and gave new shoots. After a short vegetative (V) phase, floral initiation (FI) rapidly occurred, followed by inflorescence development. (F), leading to flower buds (FB). Later in summer, new shoots arose and remained vegetative (OF genotypes). The X-axis indicates the dates at which shoot terminal parts were sampled in 2007. The transcript accumulation levels are expressed relative to the first sample (February 15th, base value = 1). Floral initiation and inflorescence development stages were determined by histological and microscopic analysis, as previously described (Foucher et al., 2008).

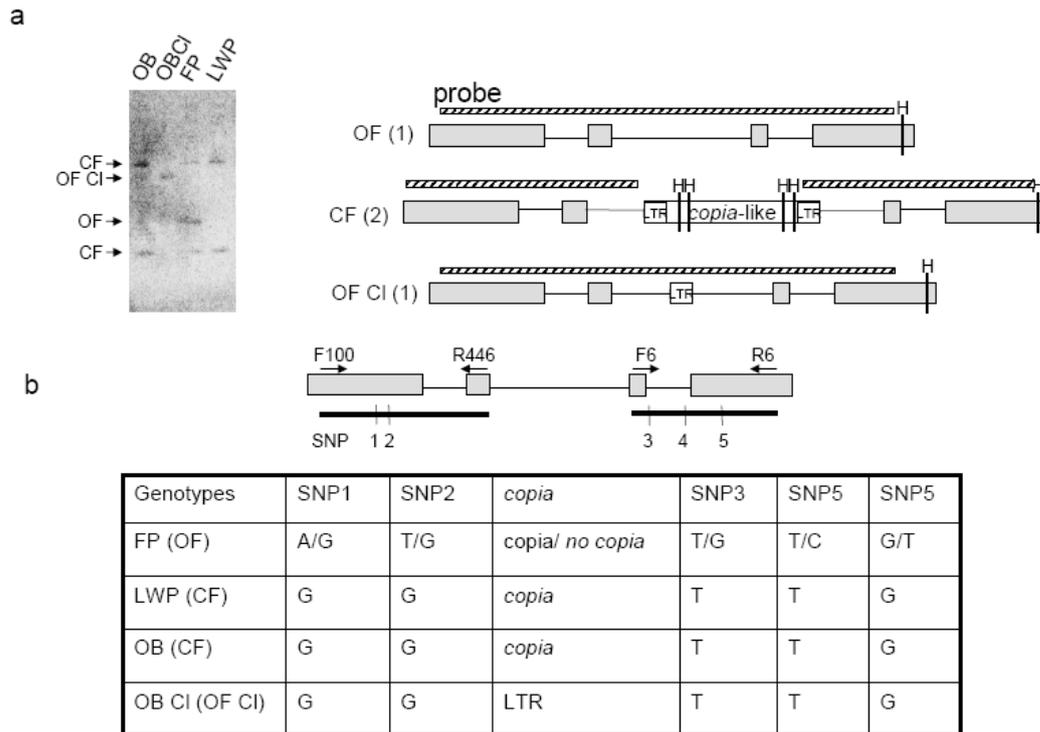


Figure S1: Molecular characterization of two continuous (CF) and once-flowering (OF) mutants in rose: ‘Félicité Perpétue’ (FP), an OF genotype and its CF mutant ‘Little White Pet’; ‘Old Blush’ (OB), a CF genotype and its OF climbing (OF Cl) mutant, ‘Old Blush Climbing’ (OB Cl). (a) DNA Gel Blot of mutants and their progenitors. Genomic DNA was digested by *Hind*III and the blot was hybridized with a probe corresponding to the OF *RoKSN* allele. The three expected alleles (OF, CF, OF Cl) are represented with the different *Hind*III restriction sites (H). The numbers in parentheses represented expected bands on the hybridized blot. FP was heterozygous (OF/CF) and therefore presented 3 bands. The mutant LWP presented the 2 bands corresponding to the CF allele, demonstrating that the OF allele was deleted (when compared with FP). OB presented 2 bands corresponding to CF alleles, whereas OB Cl presented only the band corresponding to the OF Cl allele. The *copia*-like retrotransposon had recombined and only the LTR element remained. (b) Partial sequencing of the introns and exons in the two mutant pairs, using F100xR446 and F6xR6 primer pairs. The PCR products were directly sequenced and SNP (single nucleotide polymorphism) detected. We detected 5 SNP (from SNP1 and 5). *Copia*-like retrotransposon polymorphism was scored according to the results on Figure 2c. The only difference between OB and OB Cl was the recombination of retrotransposon. Concerning the FP/LWP mutant pair, FP was heterozygous with the OF and CF alleles. Only the CF allele (with the retrotransposon) was detected in the CF mutant LWP. The exons are represented by grey boxes, introns by thin lines, the probe used by a dashed box and sequencing part by thick lines.

Primer name	Primer sequence
Cloning of <i>RoKSN</i> and <i>FvKSN</i>	
Utf1F1	GATAGACCCAGATGTTCCAGGTCC
Utf1R1	CCTGGAATATCTGTCACCATCCT
KSNqPCRF2	AGCAGAAACGAAGGCAGTC
KSNqPCRR2	GGCAGCAACAGGAAGACC
Mapping of <i>RoKSN</i> and <i>FvKSN</i>	
F3	GCAAGTAGGAACTGCGAGGTG
R1	ACCTGCCTCCTGCTAGCTGC
InsR3	TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC
KSN-7c	AATGGCAAGAATGTCGGAAC
KSN-2c	AAGGTTCGGGTGTGGAAGTG
<i>RoKSN</i> characterisation in rose mutants	
F1	ATTAGGAGTACAATCCTTCCTTCC
R2	ACCTGCCTCCTGCTAGCTGC
IF3	CATATTATGGCATAGGGTGTGGC
InsR3	TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC
R6	TCTGCGCATTGAAGTAAACG
R9	CGGGTGTGGAAGTGATCCCTTG
F9	CAATGGACATGAGCTCTTCCCA
F11	TTCACTCTGGTGATGACAGACCC
R11	GGGTCTGTCATCACCAGAGTGAA
R13	TCACCATCTCTTCCAAATGT
R16	CTGCGAAGCTTCGGGTGTTG
InsR4	TTTGTAGAGTTGTTTGCAGCGAAC
InsR5	AAATTTGGCAAGCCTCGGAC
InsR8	ACTTACCTGAACTGCAGCCTTTC
F100	CGGAACCTTTAGTTGTTGGAAG
R6	TCTGCGCATTGAAGTAAACG
R446	TGCAGGTGCTCCTTCAAATAAG
<i>RoKSN</i> transcript accumulation by Q-PCR	
R5	ACAGACATTCCAGGCACCACA
F6	TCTGCGCATTGAAGTAAACG

Table S1: List of primers used for the cloning and characterization of *KSN* in rose and strawberry.

Name	Accession number ^a	from	Taxon	Origin (selected in)	Genotyping ^b	Phenotyping ^c	Structure ^d	Haplotype ^e
Alpine-3	551517	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
Reine des vallées-3	-	G. Risser	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
Yellow Wonder	551827	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
Ruegen	551508	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
Trésor des Alpes	-	G. Risser	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
Baron Solemacher Light Green-1 (BSLG1)	552290	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
S5-1	98137-03.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Russian	ksn/ksn	CF	B	H1
S5-2	98137-03.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Russian	ksn/ksn	CF	B	H1
Albs-1	602578	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	European (Washington)	ksn/ksn	CF	B	H1
Roseifora	616872	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	European	ksn/ksn	CF	B	H1
Blanche des Bois	-	G. Risser	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
815	-	EMR	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Alpine	ksn/ksn	CF	B	H1
B1	93085-01.K	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Deutschland	ksn/ksn	CF	B	H1
Monophylla	551909	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Sweden	KSN/KSN	OF	B	H2
Fraisier de Versailles	-	G. Risser	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	European	KSN/KSN	OF	B	H2
Norlanska	-	G. Risser	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	-	KSN/KSN	OF	B	H2
B2	93085-01.K	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Deutschland	KSN/KSN	OF	B	H3
E6	94096-01.K	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Deutschland	KSN/KSN	OF	AB	H3
A1	95095-01.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	England	KSN/KSN	OF	A	H2
A2	95095-01.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	England	KSN/KSN	OF	A	H2
G6-1	98137-08.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Russian	KSN/KSN	OF	A	H2
Rodluvan	-	CRA	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	European (Sweden)	KSN/KSN	OF	A	H2
White	551841	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Sweden	KSN/KSN	OF	A	H2
New Hampshire	552287	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	USA	KSN/KSN	OF	A	H2
UC-05	551513	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>americana</i>	USA	KSN/KSN	OF	A	H2
Frost King	551898	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>californica</i>	-	KSN/KSN	OF	A	H2
L1	94056-04.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	-	KSN/KSN	OF	A	H2
N3-1	94056-19.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Kazakhstan	KSN/KSN	OF	A	H3
89USSR-1	551890	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Russian	KSN/KSN	OF	A	H3
89USSR-1-1	551890	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Russian	KSN/KSN	OF	A	H3
F4	94100-01.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Deutschland	KSN/KSN	OF	A	H4
LH2-1	551881	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>americana</i>	USA	KSN/KSN	OF	A	H5
H6	94094-01.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>americana</i>	Canadian	KSN/KSN	OF	A	H5
H3	94094-01.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>americana</i>	Canadian	KSN/KSN	OF	A	H5
I8	95091-01.P	Dresden	<i>F. vesca</i> subsp. <i>bracteata</i>	Canadian	KSN/KSN	OF	A	H6
DC2005-1	651560	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>bracteata</i>	USA	KSN/KSN	OF	A	H6
CA 1523	551749	Corvallis	<i>F. vesca</i> subsp. <i>californica</i>	USA	KSN/KSN	OF	A	-

Table S2: Origin and characterization of the different wood strawberry genotypes used in the diversity analysis. ^a The PI number is indicated for genotypes obtained from the National Clonal Germplasm Repository of Corvallis. ^b Genotyping of the 2 bp deletion done by *FvKSN* sequencing (*ksn* for the allele with the deletion and *KSN* for the allele with no deletion). ^c Phenotyping of the flowering behaviour (Continuous flowering (CF) / once-flowering (OF)). ^d Ranking of the wood strawberry genotypes in two clusters, A and B, based on STRUCTURE 2.2 analysis. ^e Haplotypes (H) based on the 2pb gap and the six SNPs; H1, gap-T-G-G-T-G-C; H2, GT-T-G-G-T-G-C; H3, GT-T-C-G-C-G-A; H4, GT-T-C-A-C-G-A; H5, GT-T-C-A-C-G-A; H6, GT-T-C-A-C-G-A. H4, GT-T-C-A-C-G-A; H5, GT-T-C-A-C-G-A; H6, GT-T-C-A-C-G-A.

II.2. Déterminisme moléculaire de la remontée florale chez le fraisier octoploïde

II.2.1. Cartographie de gènes candidats sur la carte de liaison génétique octoploïde de référence

La cartographie de gènes candidats chez le fraisier cultivé octoploïde a été réalisée pour ceux qui potentiellement pouvaient co-localiser avec le QTL majeur identifié sur groupe de liaison homéologue IVb et orthologue du groupe de liaison IV chez le fraisier diploïde. Par conséquent, les deux gènes *FT* et *GAI*, localisés sur le LGIV de la carte de liaison génétique diploïde, ont été retenus pour être cartographiés sur la population de cartographie du fraisier cultivé octoploïde, Capitola x CF1116. Les deux couples d'amorces (FT4b/FT5b et GAI1/GAI2), ayant permis la cartographie de ces deux gènes chez le fraisier diploïde, ont révélé du polymorphisme et ont été utilisés pour génotyper l'ensemble des individus de la population octoploïde Capitola x CF1116.

Le couple d'amorces FT4b/FT5 a permis de révéler une bande polymorphe de configuration NDxSD par électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition non dénaturante (SSCP). Après vérification de la ségrégation selon le ratio attendu 1:1, ce marqueur a été cartographié sur le groupe de liaison IV-c de la carte mâle.

La non co-localisation de ce polymorphisme avec le QTL majeur peut soit signifier que ce gène n'est pas impliqué dans le QTL, soit que la zone amplifiée n'a pas permis de mettre en évidence un polymorphisme sur le groupe de liaison IV-b de la femelle au niveau du QTL. Afin de mettre en évidence de nouveaux sites polymorphiques, 10 nouveaux couples d'amorces ont été développés sur le gène *FT*. Aucun de ces couples d'amorces n'a généré des bandes polymorphes de configuration SDxND.

Le couple d'amorces GAI1/GAI2 a permis de mettre en évidence deux bandes polymorphes (deux marqueurs) présentes chez les deux parents et ségrégeant sur l'ensemble des descendants (SDxSD). Le test de Chi-2 a permis de confirmer que ces deux marqueurs de configuration SDxSD suivent une ségrégation de type Mendélienne 3:1. Ce type de marqueur a été cartographié à l'aide du logiciel JoinMap permettant de faire la liaison entre les cartes femelle et mâle. Sur la carte de liaison génétique consensus, *GAI* a été cartographié sur le groupe de liaison IVd. Le couple d'amorces utilisé n'a donc pas permis de révéler de polymorphisme permettant de le cartographier sur le groupe de liaison IV-b-f. Ainsi, six nouveaux couples d'amorces ont été développés pour obtenir des marqueurs liés au gène *GAI* mais aucun n'a présenté de bandes polymorphes de configuration SDxND.

Nom du gène putatif	AT gene locus	Fonction putative ?	e-value
ATMYB16	AT5G15310.1	facteur de transcription Myb	3.00E-80
LOF1 (LATERAL ORGAN FUSION1)	AT1G26780.2	facteur de transcription Myb	5.00E-60
MYB88	AT2G02820.2	facteur de transcription Myb	6.00E-25
WRKY72	AT5G15130.1	facteur de transcription WRKY	8.00E-52
TCP family transcription factor	AT1G69690.1	facteur de transcription TCP	6.00E-47
AGL30	AT2G03060.1	facteur de transcription de type MADS Box	7.00E-25
CDF3 (CYCLING DOF FACTOR 3)	AT3G47500.1	facteur de transcription à doigt de zinc	7.00E-87
Homeobox protein 34 (HB34)	AT3G28920.1	facteur de transcription	7.00E-26
Homeodomain-like superfamily protein	AT1G69580.2	facteur de transcription	1.00E-31
ATHB13 Encodes a homeodomain leucine zipper class I	AT1G69780.1	facteur de transcription à leucine zipper	3.00E-51
RHL2 (ROOT HAIRLESS 2)	AT5G02820.1	développement racines	4.00E-18
BAM1 (BARELY ANY MERISTEM 1)	AT5G65700.1	différenciation des cellules souches dans le méristème	1.00E-108
TSD2 (TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2)	AT1G78240.2	développement tige et racine	7.00E-27
EMB2756 (EMBRYO DEFECTIVE 2756)	AT1G34550.1	développement embryonnaire	6.00E-86
Cullin homolog 3 (CUL-3)	AT1G26830.1	régulation développement racinaire et floral	1.00E-30
SHB1 (SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1)	AT4G25350.1	perception lumière	7.00E-75
AFR (ATTENUATED FAR-RED RESPONSE)	AT2G24540.1	perception lumière	9.00E-08
KDR (KIDARI)	AT1G26945.1	perception lumière	3.00E-08
PKS1 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1)	AT2G02950.1	perception lumière	7.00E-35

Tableau 12 : Liste de 19 gènes prédits par alignement des séquences du scaffold0513158 sur la base de données TAIR.

II.2.2. Comparaison entre la carte physique et la carte génétique au niveau de la région d'intérêt IVb

L'accès en dernière année de thèse aux résultats du séquençage du génome de *F. vesca* a permis de comparer la carte de liaison génétique femelle IVb de l'espèce cultivée octoploïde avec la carte physique de la carte diploïde pour la région d'intérêt autour du QTL majeur.

Le scaffold 0513158 correspondant à la région d'intérêt a été comparée avec les résultats de détection de QTL. Sur ce scaffold, le gène candidat *GAI* se situe en dehors de la région d'intérêt délimitée par les deux marqueurs BxFT05 et BxFT52. En revanche, le gène *FT* se situe dans la cette région et reste un très bon candidat.

Entre ces deux marqueurs, 500 000 pb ont été analysées et utilisées pour réaliser de la prédiction de gènes par alignement des séquences avec les bases de données. En plus du gène *FT*, un total de 86 gènes a été prédit et a été classé selon leur fonction putative. Dix-neuf gènes prédits dont la fonction pourrait être liée à la floraison et/ ou au développement de la plante sont présentés dans le tableau 12.

II.2.3. Clonage du gène *FT*

Afin de mieux identifier le polymorphisme des gènes candidats les plus pertinents, une démarche de clonage de l'ensemble des allèles présents chez les parents a été entreprise. D'après les résultats des études génétiques présentées ci-dessus, un seul des huit allèles du parent femelle confère l'aptitude à la remontée florale.

Le gène *FT* représentant le meilleur candidat localisé dans la région du QTL majeur, les premiers clonages ont concerné ce gène. Les clonages ont été réalisés à partir d'un individu remontant et d'un individu non remontant sur différentes régions du gène *FT*. Dans un premier temps, deux régions génomiques recouvrant des introns et des exons ont été clonées chez les parents de la population octoploïde, Capitola et CF1116. Dans un deuxième temps, les clonages ont été réalisés à partir d'ADNc obtenus à partir de deux variétés remontante, Charlotte, et non remontante, Gariguettes, et dont les ARN avaient été extraits en juillet (jours longs) et en septembre (jours courts). Les résultats attendus sont, chez la variété remontante, l'expression d'un seul allèle conférant la remontée florale en jours longs, alors que plusieurs allèles peuvent être exprimés en jours courts chez les deux variétés, remontante et non remontante.

L'analyse des résultats de clonage est en cours. Une lecture rapide des résultats ne permet pas de distinguer de façon évidente un allèle spécifique chez les génotypes remontants étudiés.

III. Vers la validation fonctionnelle du gène candidat chez le fraisier diploïde

Ce chapitre concerne exclusivement le fraisier diploïde. Cette partie est prospective.

III.1. Construction des vecteurs de transformation génétique

III.1.1. Constructions *35S::KSN* et *35S::ksn* par la technologie de Gateway® (Invitrogen)

a. Obtention du clone d'entrée

Les amorces TrKSN2 f/r ont permis l'amplification d'un fragment d'environ 1 500 pb pour les génotypes remontant et non remontant. Après la réaction de recombinaison BP, la transformation a permis l'obtention d'une centaine de colonies pour l'allèle *ksn* de l'individu remontant et de quelques colonies pour l'allèle *KSN* de l'individu non remontant. Après criblage d'une vingtaine de ces colonies par PCR, huit clones bactériens positifs ont été obtenus (six pour l'allèle *ksn* conférant la remontée de floraison, deux pour l'allèle *KSN* réprimant la floraison).

Ces huit clones positifs ont été envoyés à séquencer et les séquences obtenues pour chacun des clones ont été alignées sur l'interface du site Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Les séquences et les chromatogrammes ont été analysés afin d'exclure les clones présentant des erreurs de séquences.

Cette vérification a permis de sélectionner un clone d'entrée contenant l'allèle *KSN* issu de l'individu remontant et un contenant l'allèle *ksn* issu de l'individu non remontant pour la suite du clonage.

b. Obtention du clone d'expression

La PCR réalisée avec les amorces *attL* sur les deux clones d'entrée a permis d'amplifier un fragment de la taille attendue (1 350 pb environ). La réaction de recombinaison LR réalisée entre ce produit PCR et le vecteur de destination a permis la transformation et l'obtention de nombreuses colonies pour les deux allèles, *KSN* et *ksn*. Une PCR sur colonies avec différents couples d'amorces (internes au gène, spécifiques du vecteur et "à cheval" sur les deux) a conduit à la sélection de plusieurs clones positifs pour lesquels les plasmides ont été extraits. Deux clones pour chaque génotype ont été envoyés à séquencer. La vérification de séquence nous a permis de sélectionner un clone par génotype.

c. *Obtention des souches d'Agrobacterium tumefaciens transformées*

La transformation des clones d'expression dans la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* a donné un tapis bactérien sans colonies isolées. Un nouvel isolement de ces bactéries a été nécessaire pour obtenir des colonies isolées utilisables pour la transformation végétale.

III.1.2. Constructions *KSN::KSN* et *ksn::ksn*

a. *Obtention du transgène KSN*

Les amorces PCR utilisées, TrKSN5 f/r, ont permis d'obtenir un fragment de 5 566 pb, incorporant un site KpnI en 3' et une extrémité franche en 5'.

La purification de ce produit PCR a donné un échantillon d'environ 50 ng/μL pour les deux géotypes choisis.

b. *Digestions*

Le produit PCR TrKSN5 a été digéré par KpnI, puis dosé au Nanoview™. Les concentrations obtenues (35 ng/μL pour l'allèle *ksn* et 20 ng/μL pour l'allèle *KSN*) ont servi à calculer les ratios de ligation.

Le vecteur pCAMBIA-1301 a été digéré par les enzymes KpnI et PmlI. Cette digestion conduit donc à deux fragments de taille différente (un de 9 004 pb et un de 2 845 pb) qui rend aisée la vérification de cette étape par électrophorèse sur gel d'agarose. Un dosage spectrophotométrique a permis de définir la concentration du vecteur : 70 ng/μL.

c. *Ligations*

Deux ratios ont été choisis pour réaliser les ligations :

- un ratio insert/vecteur de 3/1, dans lequel 102 ng d'insert ont été ajoutés (3 μL pour l'individu remontant, 5 μL pour l'individu non remontant) au 70 ng de vecteur (1 μL) ;

- un ratio insert/vecteur de 4/1, dans lequel 136 ng d'insert ont été ajoutés (4 μL pour l'individu remontant, 7 μL pour l'individu non remontant) au 70 ng de vecteur (1 μL).

Après ligation, les produits obtenus ont été vérifiés sur gel d'agarose et ont montré des profils conformes à ceux attendus.

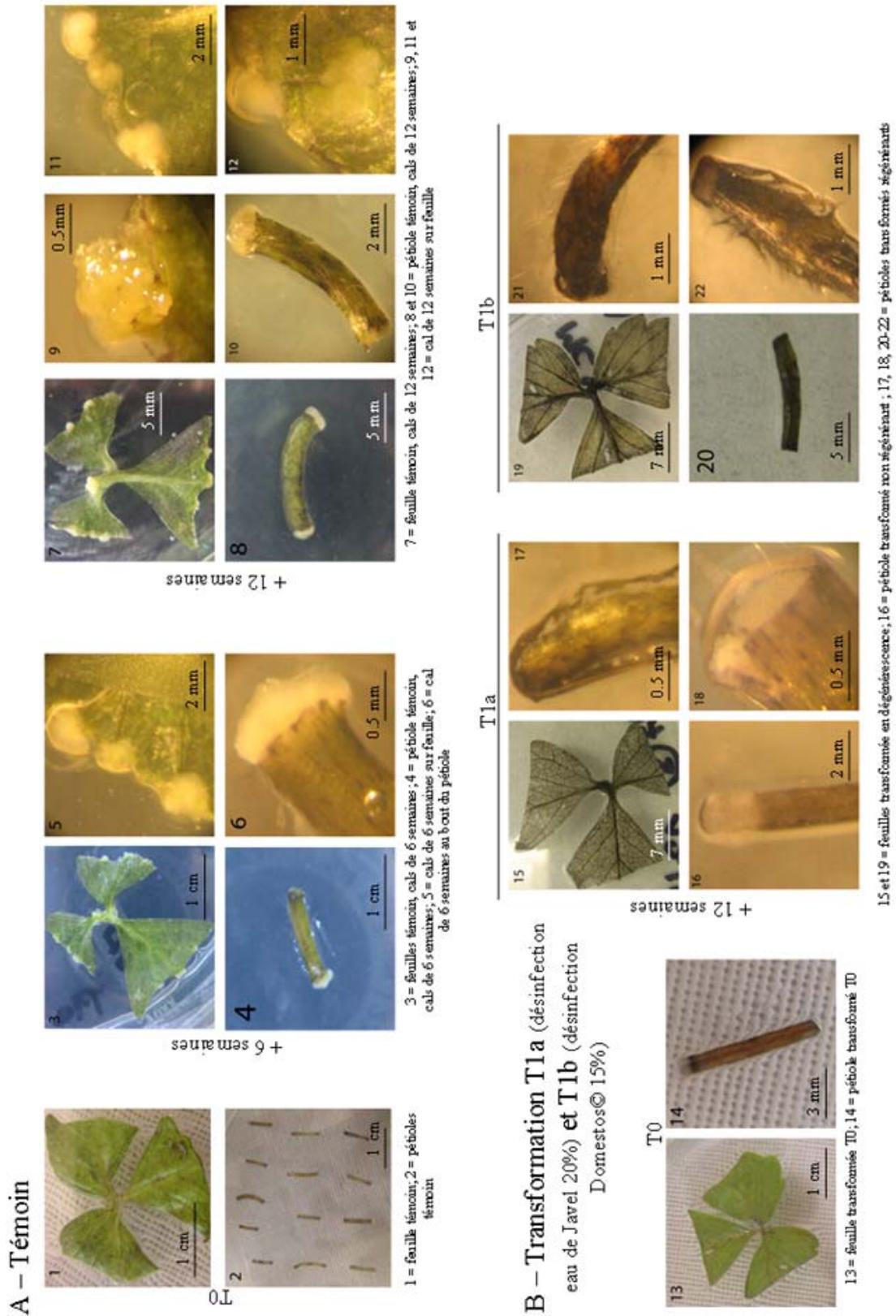


Figure 36 : Illustration de régénération d'explants de fraisiers témoins et d'explants après transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

d. Transformation et extraction des plasmides

La transformation des produits de ligation a permis d'obtenir un grand nombre de colonies isolées à partir desquelles les PCR sur colonies ont été réalisées. A partir de celles-ci, huit clones (quatre pour l'allèle *ksn* et quatre pour l'allèle *KSN*) ont pu être sélectionnés en vue de l'extraction des plasmides.

Après extraction, les plasmides ont été dosés et deux nouvelles PCR, avec des amorces spécifiques au vecteur et des amorces spécifiques à l'insert ont été réalisées. L'amplification avec les amorces spécifiques au vecteur a donné un fragment de taille attendue, d'environ 1 600 pb et l'amplification avec les amorces spécifiques à l'insert a donné un fragment de taille attendue, d'environ 1 000 pb.

Les profils sur gel d'agarose sont cohérents avec la présence du transgène dans le vecteur. Le séquençage en vue de la vérification de la séquence est en cours.

III.2. Transformation et régénération des explants de fraisiers

Les explants, témoins et inoculés, ont été repiqués sur des milieux de régénération non sélectif (sans antibiotiques) et sélectif respectivement, toutes les trois à quatre semaines. Les résultats des deux séries de transformation réalisées à deux semaines d'intervalle, T1a (désinfection à l'eau de Javel) et T1b (désinfection au Domestos®), sont présentés ci-dessous.

III.2.1. Explants témoins

Les explants témoins, feuilles et pétioles, déposés sur milieu de régénération sans antibiotiques sont restés verts après douze semaines de culture *in vitro* (Figure 36 ; Planches 1, 3 et 7) et aucune contamination n'est apparue (Tableau 13). Les premiers cals se sont développés sur ces témoins six semaines après la mise en culture (Figure 36 ; Planches 3 à 6). Ces cals étaient blancs et se sont formés en priorité sur le pourtour des feuilles au niveau des nervures et à l'extrémité des pétioles. Après douze semaines, les cals ont légèrement augmenté en taille et en nombre (Figure 36 ; Planches 7 à 12).

Le pourcentage de régénération (nombre d'explants présentant des cals sur le nombre d'explants mis en culture ; Tableau 13) varie selon le type d'explants. Sur les feuilles témoins, 100% de régénération ont été observés, avec plusieurs cals distincts par feuille (Figure 36 ; Planches 3, 5 et 7). Sur les pétioles, nous avons constaté 65,9 % de régénération avec parfois deux cals par pétiole.

	Explants témoins		Explants transformés			
	Pétioles	Feuilles	Construction avec allèle <i>KSN</i>		Construction avec allèle <i>ksn</i>	
			Pétioles	Feuilles	Pétioles	Feuilles
Nombre d'explants initial	41	10	110	54	149	41
Nombre d'explants restant	41	10	98	49	136	37
% de perte	0	0	10,9	9,3	8,7	9,8
Nombre d'explants régénérés	27	10	48	0	55	0
% de régénération	65,9	100	49	0	40,4	0

Tableau 13 : Récapitulatif des données statistiques des transformations T1a et T1b.

III.2.2. Explants transformés

Les explants ont été déposés sur milieu de sélection et ont été repiqués toutes les trois à quatre semaines sur du milieu frais. Au fil des semaines, une majorité des explants transformés (65,9%), en particulier les feuilles, a nécrosé, virant du vert au marron et parfois au noir (Figure 36 ; Planches 13, 15 et 19).

L'aspect des explants a été affecté par le type de désinfectant. En effet, les explants traités au Domestos© 15% (T1b) conservent un aspect brillant, presque plastifié (Figure 36 ; Planche 19) et deviennent très noirs lors de la nécrose, alors que les explants traités à l'eau de Javel 20% (T1a) virent au marron clair et restent souples (Figure 36 ; Planche 15). Le traitement à l'eau de Javel semble être le moins agressif envers les explants.

Comme pour les explants témoins, le pourcentage de régénération varie selon le type d'explants. Sur les feuilles transformées, aucune régénération n'a été observée (0% ; Tableau 13). Sur les pétioles, 44% de régénération ont été observés après 13 semaines de culture. Au cours de ces 13 semaines de culture, différents types de cals se sont développés : (1) cinq à sept semaines après la transformation, les premiers cals sont apparus au milieu du pétiole, comme une boursouffure conduisant à la courbure du pétiole, soit 36% des pétioles régénérants (Figure 36 ; Planche 21) ; (2) au bout de treize semaines, d'autres cals sont apparus aux extrémités des pétioles, soit 64% des pétioles régénérants (Figure 36 ; Planche 18) alors que la majorité (89%) des premiers cals a noirci.

A la onzième semaine après transformation, les milieux ont été modifiés pour être moins agressifs envers les explants et favoriser le développement des cals :

- la concentration en céfotaxime a été réduite à 30 mg/L (au lieu de 90 mg/L) ;
- la concentration en carbénicilline a été réduite à 150 mg/L (au lieu de 250 mg/L) ;
- la concentration en hygromycine a été réduite à 2,5 mg/L (au lieu de 4 mg/L).

Dans le même temps, la balance hormonale a légèrement été modifiée de façon à augmenter la concentration en auxine (AIB) : désormais 1 mg/L d'AIB est ajouté au lieu de 0,5 mg/L précédemment.

Entre chaque repiquage, des contaminations sont susceptibles d'avoir lieu, que ce soit par des champignons et/ou par une résurgence d'*A. tumefaciens*. Ces contaminations peuvent réduire considérablement le taux de réussite d'une transformation. Dans notre cas, onze semaines après la première transformation, le pourcentage de perte (10%) est faible (Tableau 13).

Discussion et Conclusion

Chapitre IV : Discussion et conclusion

I. Le déterminisme génétique de la remontée florale chez le fraisier octoploïde

Cette étude a montré qu'un verrou génétique différent contrôle le déterminisme génétique de la remontée florale entre les fraisiers diploïde et octoploïde. En effet, les régions génomiques impliquées dans le caractère 'remontée florale' chez les fraisiers octoploïde et diploïde sont non orthologues puisqu'elles appartiennent respectivement au groupe de liaison IVb et au groupe de liaison VI pour le locus *SFL* (Albani et al., 2004).

De plus, chez le fraisier octoploïde, cette région responsable du caractère 'remontée florale' est également liée à la production de stolons et à la hauteur du plant. Les résultats de corrélation et les effets des QTL sur ces trois caractères suggèrent que cette région est le siège d'une compétition entre développement végétatif et reproducteur.

I.1. Mise en place d'une stratégie pour enrichir spécifiquement un groupe de liaison d'intérêt chez une espèce octoploïde

Pour saturer la région d'intérêt sur le groupe de liaison IVb du fraisier octoploïde, une stratégie de 'bin mapping' a été développée à partir de 14 individus. Cette stratégie permet d'estimer grossièrement le groupe de liaison sur lequel se cartographie un nouveau marqueur (Howad et al., 2005). Compte tenu de la complexité du fraisier polyploïde, nous avons appliqué cette approche sur un sous-ensemble de groupes de liaison, ceux appartenant au groupe d'homéologie IV.

I.2. Un verrou génétique différent entre fraisiers diploïde et octoploïde pour un même caractère

Des études conduites chez différentes espèces ou genres ont suggéré qu'il était possible d'utiliser une espèce pour étudier le déterminisme génétique d'une autre espèce proche, qui peut être plus complexe génétiquement comme par exemple dans la comparaison d'une espèce diploïde avec une espèce polyploïde. Le préalable à cette approche est l'identification de régions orthologues impliquées dans la variation d'un caractère.

Chez les Fagacées, Casasoli a montré qu'une même région orthologue était impliquée dans la date de débourrement chez le chêne et le châtaignier (Casasoli et al., 2006). Chez les Solanacées, des régions orthologues semblent contrôler différents caractères du fruit entre la tomate et le poivron (Ben Chaim et al., 2001). Par ailleurs, l'orthologie d'une région

responsable de la taille de la plante et de la date de floraison entre le sorgho et la canne à sucre a également été mise en évidence (Ming et al., 2002). Cependant, d'autres exemples tels que la résistance à l'aluminium chez les Poacées montre que les régions impliquées ne sont pas toujours orthologues (Magalhaes et al., 2004).

Le fraisier diploïde est souvent présenté comme modèle pour l'étude génétique du fraisier octoploïde (Shulaev et al., 2008; Slovin et al., 2009) puisque la portabilité de l'information génétique s'est souvent avérée possible entre les deux espèces (Rousseau-Gueutin et al., 2008). Malgré une conservation de l'organisation des génomes entre les espèces diploïdes et octoploïdes (Rousseau-Gueutin et al., 2008), les deux caractères 'remontée florale' et 'production de stolons' ne sont pas orthologues entre les espèces diploïdes et octoploïdes ce qui suggère que les verrous génétiques contrôlant des voies de signalisation diffèrent entre les deux niveaux de ploïdie. La présence de verrous génétiques différents entre les espèces diploïde et octoploïde chez *Fragaria* pour contrôler la remontée florale pourrait être due à des remaniements structuraux survenus au cours des événements de polyploïdie au sein du genre *Fragaria*. En effet, après un événement de polyploïdisation, différents mécanismes entraînent des modifications dans l'expression des gènes *via* des mécanismes génétiques, perte d'ADN ou remaniements structuraux, et épigénétiques, des régulations post-traductionnelles, des effets additifs d'expression de gènes (Jackson and Chen, 2010).

Pour le caractère 'remontée florale', les recherches sur la physiologie de la floraison ont montré des réponses similaires des fraisiers remontants diploïde et octoploïde avec une activation et une répression de la floraison en jours longs et en jours courts, respectivement (Jonkers, 1965; Nishiyama and Kanahama, 2002; Sonsteby and Heide, 2007a, b, 2008b). Ces études suggéraient un contrôle de la floraison commun entre les deux espèces (Sonsteby and Heide, 2008b). Les voies de signalisation de la floraison seraient conservées entre les fraisiers diploïde et octoploïde et les différents verrous génétiques contrôlant la remontée florale pourraient être dus à des modifications discrètes. Chez le fraisier diploïde, une mutation à l'état homozygote du locus *SFL* codant pour un répresseur floral serait responsable du caractère remontant (Albani et al., 2004; Mouhu et al., 2009). Chez le fraisier octoploïde, la présence du répresseur floral *SFL* pour réprimer la remontée florale supposerait qu'un même allèle soit à l'état homozygote et qu'ainsi, les huit allèles portent la même mutation. Cette situation apparaîtrait très rarement génétiquement et il est beaucoup plus probable qu'une autre clef génétique, de type activateur, soit responsable du caractère 'remontée florale' chez le fraisier octoploïde.

I.3. Détection d'un QTL majeur lié à la 'remontée florale' chez le fraisier octoploïde

Comme les variétés remontantes présentant une extension de la période de production intéressent particulièrement les producteurs, la compréhension des bases génétiques de ce caractère a été largement recherchée. Cependant, les différentes analyses génétiques sur le contrôle de la remontée florale chez le fraisier octoploïde ont montré des résultats contradictoires. Selon les études, la remontée florale serait contrôlée par un seul gène dominant (Bringham and Voth, 1978; Ahmadi et al., 1990), par plusieurs gènes dominants complémentaires (Ourecky and Slate, 1967) ou par des locus quantitatifs (Powers, 1954; Hancock et al., 2002; Shaw, 2003; Serce and Hancock, 2005; Weebadde et al., 2008). Notre étude a permis de détecter un QTL majeur présent sur l'ensemble des années de notation et plusieurs QTL mineurs dont la localisation varie selon les années. Différentes hypothèses peuvent expliquer les résultats différents selon les études.

a. Les sources d'introgression du caractère 'remontée florale' sont différentes

Trois différentes sources d'introgression du caractère 'remontée florale' chez le fraisier octoploïde ont été décrites : une source issue de vieilles variétés européennes (Richardson, 1914), une autre issue de la variété américaine 'Pan American' (Fletcher, 1917) et la dernière issue de l'espèce *F. virginiana subsp. glauca* (Darrow, 1966). Toutes les analyses génétiques sur des variétés remontantes issues de vieilles variétés européennes ont clairement montré des ratios monogéniques (Richardson, 1914; Simpson and Sharp, 1988; Sugimoto et al., 2005). Par contre, les études utilisant les sources américaines de la remontée florale ont plutôt montré des ratios multigénétiques (Powers, 1954; Hancock et al., 2001; Weebadde et al., 2008). Il semblerait que le caractère, bien que répondant similairement à l'environnement, implique différents mécanismes (Stewart and Folta, 2010).

Dans notre étude, la remontée florale est clairement contrôlée par un QTL majeur qui pourrait être similaire à celui identifié par Weebadde et al. (2008). Dans leur étude conduite aux Etats-Unis, une population en ségrégation pour la remontée florale a été mise en place sur cinq sites. Bien que leur étude mette en évidence une région expliquant une large part de la variation du caractère (autour de 45%) et détectée pour quatre des cinq lieux d'étude, les auteurs ne concluent pas sur un QTL majeur. L'utilisation de marqueurs communs pourra permettre de confirmer ou non l'hypothèse d'une même région.

b. L'influence de l'environnement sur l'expression de la remontée florale

La photopériode, la température et leur interaction sont des facteurs environnementaux importants régulant la balance entre multiplication végétative et reproduction sexuée chez le fraisier (Darrow, 1966; Durner et al., 1984; Battey et al., 1998) et influençant ainsi fortement l'expression du caractère 'remontée florale'. Tous les génotypes de jours longs ou de jours courts présentent une gamme de température où la floraison peut se dérouler quelque soit les conditions photopériodiques (Bradford et al., 2010). Ainsi, un génotype de jours courts peut initier des fleurs au printemps s'il est soumis à des températures basses et donc fleurir en été (Bradford et al., 2010).

Le rôle des facteurs environnementaux sur le déterminisme génétique de la remontée florale a été étudié à l'aide d'une même population en ségrégation évaluée sur deux lieux très contrastés, l'Angleterre (East Malling) et l'Italie (Forli) (Maltoni et al., 1996). Selon le lieu, le caractère semble contrôlé par un gène majeur (Angleterre) ou par deux gènes (Italie). L'étude de Weebadde (2008) mentionnée ci-dessus a également mis en évidence des QTL mineurs différents selon le lieu de notation (Weebadde et al., 2008). Ainsi, les variations observées entre les QTL des différentes études pourraient être partiellement dues à l'environnement. Des analyses dans des environnements mieux contrôlés, par exemple en chambre climatique, permettraient d'étudier cette hypothèse.

c. L'impact du phénotypage pour évaluer les descendants remontants des non-remontants

La méthode de classification des variétés remontantes varie selon les auteurs. La plupart des études ont classé remontants les génotypes qui fleurissent jusqu'en août (Stewart and Folta, 2010) alors que deux études ont considéré remontants les génotypes fleurissant jusqu'en octobre (Richardson, 1914; Ahmadi et al., 1990). L'âge du plant peut également influencer le classement du génotype. Ainsi, des notations réalisées sur une population la première année de plantation ou sur des plantations plus anciennes peuvent entraîner des biais.

Dans notre étude, nous avons considéré comme remontants les génotypes capables, après la première initiation florale de septembre, d'initier à nouveau une floraison à partir du mois d'avril (jours s'allongeant). Ainsi, les génotypes remontants ont été estimés en comptant le nombre de hampes florales ayant émergées entre fin mai et fin juillet. Cette mesure repose sur l'hypothèse que toutes les hampes initiées à l'automne ont émergé fin mai. Environ deux mois à deux mois et demi, selon les conditions de température, sont nécessaires pour le développement d'un méristème floral jusqu'à l'émergence de la hampe issue de ce méristème (Hytönen et al., 2004).

Ainsi, les hampes qui émergent après fin mai ont pu être initiées fin mars, lorsque la longueur de jour est d'au moins 12 heures. Avec cette photopériode, il faudrait des températures basses pour initier chez des variétés non remontantes (Darrow, 1966; Durner et al., 1984; Battey et al., 1998). Ces températures n'ont à priori pas été observées ces 10 dernières années. Notre méthode de phénotypage semble donc pertinente pour la détection du QTL majeur. Cependant, d'autres QTL mineurs ne sont pas stables entre les années. Il serait toutefois intéressant de noter le nombre de hampes florales jusqu'au mois d'octobre pour être sûr qu'on note bien des hampes remontantes et non des floraisons tardives.

I.3.2. Une même introgression dans deux fonds génétiques différents ?

Dans notre étude, le déterminisme génétique de la remontée florale a été étudié dans deux fonds génétiques différents. L'observation des pédigrées de Capitola et de Mara des Bois (Figure 29) montrent que l'introgression du caractère serait issue d'évènements bien distincts. En effet, la remontée florale chez Capitola proviendrait d'une introgression à partir de *F. virginiana subsp. glauca* alors que celle de Mara des bois aurait pour origine Hummi Gento sélectionné en 1967. A cette époque, les nouvelles variétés issues de l'introgression de *F. virginiana subsp. glauca* des montagnes Wasath dans l'Utah et obtenues par l'Université de Davis (Bringhurst and Voth, 1984) n'étaient pas encore disponibles. Il était donc logique de penser que la remontée florale de Hummi Gento, dont les parents sont inconnus, soit issue de variétés remontantes européennes anciennes (Richardson, 1914).

Nos résultats montrent que non seulement, la même région est impliquée dans le caractère 'remontée florale' chez les deux populations, mais également que les mêmes allèles sont liés au QTL majeur. Ces résultats suggèrent qu'une même région chromosomique a été introgressée chez ces deux espèces. Ceci est en contradiction avec l'hypothèse d'une introgression différente du caractère 'remontée florale' entre les deux variétés. Cette remarque illustre qu'il est parfois difficile de retracer le pedigree de certaines variétés et d'établir, de façon certaine, l'origine du caractère remontant. Ainsi, il se pourrait que la variété Mara des Bois soit issue de matériel américain après des échanges non renseignés entre les Etats-Unis et l'Europe.

L'analyse du déterminisme génétique de la remontée florale de l'origine européenne pourra être étudiée à partir de croisements impliquant les variétés européennes anciennes remontantes classées dans un groupe bien distinct des autres variétés après une analyse de diversité génétique en utilisant une approche Bayésienne (Horvath et al., submitted).

I.3.3. Remontée florale, date de floraison et hauteur du plant

Plusieurs études précédentes suggéraient que l'expression du caractère 'remontée florale' était corrélée avec une précocité de floraison (Barritt et al., 1982; Luby et al., 2008). Nos résultats ont mis en évidence une corrélation significative et négative entre la date de floraison en 2006 et la remontée florale pour les sept années de notation. De plus, un QTL lié à la date de floraison en 2006 et 2007 co-localisant avec un effet négatif avec le QTL majeur de remontée florale a été détecté. Cependant, pour la plupart des années, la date de floraison est mal corrélée avec la remontée florale, ce qui suggère un rôle important de l'environnement sans que nous puissions le préciser compte tenu de l'absence de données précises pour le caractériser. Certaines études ont par exemple souligné le rôle de l'âge du plant dans la date de floraison (Van Dijk, 2009).

Des co-localisations entre un QTL de date de floraison et un QTL lié à la hauteur de la plante ont été observées chez le sorgho (Lin et al. 1995), le maïs (Austin et Lee 1996 ; Koester et al 1003), le riz (Li et al. 1995), la canne à sucre (Ming et al 2002) et *M. truncatula* (Julier et al., 2007). Dans notre étude, un QTL lié à la date de floraison sur une seule année de notation co-localise avec le QTL lié à la hauteur du plant noté sur deux années bien qu'il n'y ait pas de corrélation détectée entre l'ensemble des données de la hauteur du plant et de la date de floraison. Par contre, la hauteur du plant est corrélée négativement avec la remontée florale. Le QTL majeur lié à la remontée florale co-localise avec celui lié à la hauteur du plant de façon négative, indiquant que les individus remontant sont de tailles inférieures aux individus non-remontants.

I.4. Détection d'une région impliquée dans la croissance végétative et reproductive

Chez le fraisier, pour un génotype non remontant, les conditions de photopériode et de température favorisant le développement reproducteur sont défavorables au développement végétatif, et inversement (Battey et al., 1998). De plus, les génotypes remontants produisent peu de stolons (Simpson and Sharp, 1988). Ces observations montrent un antagonisme entre les développements végétatifs et reproducteurs (Simpson and Sharp, 1988). Cet antagonisme est largement répandu dans le cycle de vie des plantes pérennes (Battey et al., 1998).

Deux caractères liés à la croissance végétative du plant de fraisier ont été analysés : la hauteur du plant et la production de stolons. Les résultats des analyses QTL ont montré qu'une même région est impliquée dans la variation de ces deux caractères et que cette même région influence également le développement reproducteur à travers le caractère 'remontée florale'. Ainsi, chez le fraisier octoploïde, une même région est responsable de l'antagonisme entre croissance végétative et reproductive.

Les développements végétatif et reproductif d'une plante peuvent entrer en compétition à deux niveaux.

(1) Cette compétition peut avoir lieu au niveau de l'allocation des ressources abiotiques, comme les nutriments, l'azote et le carbone. Les plantes polycarpiques doivent, en parallèle de la production de bourgeons floraux, maintenir un pool de bourgeons végétatifs pour assurer la pérennité de la plante. Ainsi, deux pools de bourgeons floraux et végétatifs sont en compétition pour les ressources nutritives. La croissance et le développement végétatif d'une plante dépend du partage du carbone assimilé par les organes sources photosynthétiques entre les différents tissus puits : les fleurs, les racines et les fruits (Farrar and Jones, 2000). La compétition entre ces organes puits influence la croissance du plant (Veliath and Ferguson, 1972; Fisher, 1977; Bohnert and Bangerth, 1988).

(2) La compétition entre les développements végétatifs et reproductifs peut également se jouer au niveau du devenir des méristèmes, puisque les méristèmes engagés dans le processus de floraison ne peuvent plus assurer la croissance végétative (Kawamura and Takeda, 2006). Dans beaucoup d'espèces, la croissance et la reproduction peuvent être limitées par la disponibilité des méristèmes plutôt que par les ressources abiotiques (Watson, 1984; Geber, 1990).

Cette compétition entre les organes végétatifs et reproducteurs a, par exemple, été montrée chez *M. truncatula*, à travers la co-localisation entre les QTL de date de floraison et de longueur de la tige. La co-localisation de ces deux QTLs avec les gènes *FT* et *CO-like* a permis d'émettre l'hypothèse d'un seul gène pouvant expliquer ces deux caractères (Julier et al., 2007). Par la suite, une étude de génétique d'association a permis de mettre en évidence l'association entre le gène *CO-like* avec la date de floraison et la longueur de la tige chez la luzerne, espèce autotétraploïde montrant une forte synténie avec *M. truncatula* (Herrmann et al., 2010).

II. Le déterminisme moléculaire de la remontée florale chez les fraisiers diploïde et octoploïde

II.1. Le gène *KSN*, homologue à *TFL1* d'*Arabidopsis thaliana*, est responsable de la 'remontée florale' chez le fraisier diploïde

II.1.1. Contexte de l'étude du gène *FvKSN*

Une étude préliminaire de synténie entre les cartes de liaison génétique du rosier et du fraisier diploïde (non publiée), issue de la collaboration entre les INRA de Bordeaux et d'Angers, avait permis de mettre en évidence des marqueurs transférables d'une espèce à l'autre. Deux de ces marqueurs se cartographiaient à proximité des locus *SFL* et *RB* (Recurrent blooming) responsables de la remontée florale pour le fraisier diploïde et le rosier, respectivement. Ce résultat suggérait que des régions orthologues entre le fraisier diploïde et le rosier étaient impliquées dans la remontée florale chez ces deux espèces.

Les séquences du gène *KSN* chez le rosier et le fraisier ont montré une similarité de séquences et ont toutes deux été cartographiées sur les locus de remontée florale.

II.1.1. Influence de la population ou de l'âge de la plante sur l'expression du gène de remontée florale

Deux populations ont été utilisées pour la cartographie du gène *FvKSN* chez le fraisier diploïde. La première était la population de référence issue du croisement interspécifique entre *F. vesca* x *F. bucharica* et qui incluait 75 individus représentés par des plants multipliés végétativement tous les trois ans. La deuxième était issue d'une autofécondation d'un génotype hétérozygote, Ilaria-1, pour différents caractères dont la remontée florale et la production de stolons. Cette dernière population était représentée par 158 plantules semées en 2010. Si chez la deuxième population, le locus *SFL* co-localisait parfaitement avec le gène *KSN*, les individus hétérozygotes *KSN/ksn* présentaient des phénotypes soit remontants soit non-remontants chez la première population, ce qui suggérait que l'allèle *KSN* ne réprimait pas la floraison et n'était donc pas dominant chez certains génotypes. Le choix du génotype remontant ou l'âge du plant pourraient ainsi jouer un rôle sur l'expression de la remontée florale chez ces individus hétérozygotes. L'hypothèse de l'âge pourra être testée en suivant le phénotypage sur la deuxième population l'année prochaine, lorsque les plants seront alors âgés d'un an et demi et celle du génotype remontant sera testée en étudiant la remontée florale dans de nouveaux fonds génétiques.

II.1.2. Le gène *KSN*, homologue du répresseur floral *TFL1* chez *A. thaliana*

Chez *A. thaliana*, *TFL1* est un gène clef qui affecte les phases développementales et l'architecture d'*A. thaliana*. (Shannon and Meekswagner, 1991). *TFL1* contribue à la maintenance de l'état indéterminé du méristème inflorescentiel et retarde la transition florale (Ratcliffe et al., 1998). Le rôle de *TFL1* dans la transition entre la phase végétative et la phase reproductive semble largement conservé au sein des espèces. Des gènes *TFL1-like* ont été trouvés chez de nombreuses espèces. Chez *Antirrhinum*, le gène *CEN* (CENTRORADIALIS) conduit à la conversion de du méristème inflorescentiel en croissance indéterminée en un méristème floral en croissance déterminée (Bradley et al., 1996). Chez la tomate, le gène *SP* (SEFL PRUNING) conditionne également la croissance déterminée et indéterminée du plant et est nécessaire pour réguler l'alternance entre les cycles reproductifs et végétatifs le long de la tige composée (Pnueli et al., 1998; Pnueli et al., 2001). Les gènes *CET2* et *CET4* du tabac sont exprimés dans les méristèmes végétatifs et sont impliqués dans l'architecture florale (Amaya et al., 1999). Chez le pois, *DET* (DETERMINATE) maintient l'état indifférencié du méristème apical alors que *LF* (LATE FLOWERING) retarde la transition florale en prolongeant la phase végétative (Foucher et al., 2003). Chez le pommier, appartenant à la famille des Rosacées tout comme le fraisier, *MdTFL1* et *MdTFL1a* semblent coder pour des répresseurs floraux impliqués dans la maintenance du méristème inflorescentiel (Mimida et al., 2009). Chez la vigne, la surexpression de *VvTFL1* affecte la détermination du méristème floral (Carmona et al., 2007).

Notre étude a montré que chez le fraisier diploïde, le gène *FvKSN*, homologue du répresseur floral *TFL1* chez *A. thaliana*, est responsable du caractère 'remontée florale'. Chez les génotypes remontants, une délétion de 2 pb dans le premier exon du gène *FvKSN* conduit à la traduction d'une protéine tronquée non fonctionnelle, incapable de réprimer la floraison. La délétion de 2 pb de *FvKSN* est associée au phénotype remontant pour la collection de diversité génétique constituée de 37 génotypes *F. vesca*.

Ainsi, une mutation de l'homologue du gène *TFL1*, identifié chez de nombreuses espèces comme un répresseur de la transition florale, semble responsable d'une initiation florale en continu chez le fraisier diploïde et le rosier.

Afin de valider la fonction du gène *FvKSN*, des résultats préliminaires sur l'analyse d'expression par qRT-PCR ont été obtenus chez deux génotypes, remontant et non remontant (données non présentées). La délétion de 2 pb dans l'exon n'a pas empêché la transcription du gène *Fvksn*. Une différence du niveau de l'expression du gène *FvKSN* entre les individus remontants et non-remontants ne devrait pas être observée. Il nous a donc semblé plus pertinent de réaliser directement la validation fonctionnelle du gène *FvKSN* par transgénèse.

II.2. Le gène *FvFT*, homologue à l'activateur floral *FT* chez *A. thalianas*, se localise dans la région d'intérêt chez le fraisier octoploïde

Le gène *FT* joue un rôle majeur dans la transition de la phase végétative vers la phase reproductive et agit au niveau du méristème apical (Boss et al., 2004; Putterill et al., 2004). Le gène *FT* est un activateur de la transition florale largement conservé entre les monocotylédones et les dicotylédones (Turck et al., 2008). La surexpression des gènes homologues de *FT* montre une conservation de la fonction avec une floraison précoce chez *Arabidopsis*, le riz, *citrus*, la tomate, le peuplier, le tournesol, le poirier et le pommier (Kobayashi et al., 1999; Kojima et al., 2002; Endo et al., 2005; Hsu et al., 2006; Lifschitz et al., 2006; Carmona et al., 2007; Matsuda et al., 2009; Blackman et al., 2010; Trankner et al., 2010; Zhang et al., 2010). La transcription des homologues de *FT* chez la vigne et le maïs augmente juste avant l'induction florale (Carmona et al., 2007; Danilevskaya et al., 2008). Chez la pomme de terre, l'homologue de *FT* fonctionne comme un intégrateur des voies de signalisation de la floraison mais également de la tubérisation (Rodriguez-Falcon et al., 2006; Fan et al., 2010). Ainsi, *FT* joue un rôle essentiel dans le devenir du méristème apical en activant la transition du méristème de l'état végétatif à l'état reproducteur.

Chez le fraisier octoploïde, un gène candidat positionnel par cartographie comparée à partir du fraisier diploïde a pu être mis en évidence. Le gène *FvFT* cartographié chez le fraisier diploïde à une position orthologue du QTL majeur chez le fraisier octoploïde constitue un bon gène candidat, à cause de son rôle clef dans le devenir du méristème apical. En effet, chez le fraisier octoploïde, le QTL majeur recouvre une région qui inclue *FT* et où s'exerce une compétition entre croissance végétative et reproductive. L'hypothèse de l'implication de cette région dans le devenir du méristème apical peut donc être posée.

La recherche d'un haplotype de *FaFT* présent uniquement chez les individus remontants du fraisier octoploïde n'a pour le moment pas été fructueuse. Plusieurs approches complémentaires pourront être développées pour préciser si c'est bien le gène *FT* qui est impliqué dans la remontée florale: (1) l'élargissement des populations Capitola x CF1116 et Mara des Bois x Pajaro permettront de mieux préciser la localisation du QTL; (2) le clonage de l'ADNc du gène *FT* d'un ensemble de génotypes remontants et non remontants (une partie des individus du bin-set) permettra de mieux voir les haplotypes disponibles au sein de la population; (3) le clonage du promoteur de *FT* permettra de voir s'il existe du polymorphisme qui pourrait être lié à la remontée florale; (4) enfin, si ces démarches n'aboutissaient pas, la création d'une banque BAC de Capitola, génotype parental remontant, pourrait permettre de repérer les séquences liées à la remontée florale, quel que soit le mécanisme sous jacent.

III. Validation fonctionnelle du gène *FvKSN* par transgénèse

Le travail réalisé sur la transgénèse du fraisier lors de ma thèse est essentiellement prospectif. Un grand nombre de protocoles de transformation du fraisier a été publié (Qin et al., 2008). L'objectif est de mettre en place la technique de transgénèse du fraisier au laboratoire d'accueil. Cette technique permettra la validation fonctionnelle de gènes d'intérêt du fraisier mais également d'espèces rosacées fruitières telles que le cerisier et le pêcher.

Dans un premier temps, afin de valider la fonction de *FvKSN*, les premières transformations envisagées consistent à rendre un génotype remontant présentant une protéine non fonctionnelle *ksn*, non remontant par l'apport d'un transgène incluant l'allèle fonctionnel *KSN*. Par la suite, il est également envisagé de rendre non remontant un fraisier remontant par extinction du gène *FvKSN*. Pour tester la technique, deux expériences de transformation ont été initiées avec un total de 354 explants transformés. A ce jour, un explant transformé présente une régénération. Le protocole est à améliorer et différentes conditions sont à tester.

Quelques pistes sont envisagées pour améliorer le protocole :

Durée d'incubation

La plupart des explants transformés ont nécrosé, perdant totalement leur coloration verte, contrairement aux explants témoins qui sont restés parfaitement verts. La durée d'incubation de 20 min avec *A. tumefaciens* pour les explants transformés semble avoir joué un rôle important.

Au cours de cette incubation, un nombre excessif de bactéries impose un fort stress aux explants, diminuant ainsi leur potentiel de régénération. Cependant, diminuer la concentration en *A. tumefaciens* diminuerait en même temps la fréquence de transfert de matériel génétique vers le végétal, et donc le taux de plants transformés. Alsheikh et al. (2002) ont testé l'effet de différentes densités bactériennes d'*A. tumefaciens* (DO de 0,05-0,1-0,2 et 0,4) à 600 nm, sur des explants de feuilles et de pétioles issus des génotypes *Fragaria vesca* et *Fragaria vesca semperflorens* (remontant). Une DO de 0,05 semble insuffisante pour produire des explants transformés, tandis qu'une DO de 0,4 semble être totalement inhibitrice de la transformation et/ou de la régénération. La densité optimale semble être 0,1, même si les pétioles présentent aussi des pousses transformées quand ils sont traités à une DO de 0,2.

Husaini (2010) a montré qu'une période de co-culture plus longue (72h au lieu de 48h) donne un pourcentage de régénération, ainsi qu'un taux de transformants, plus élevés.

En conclusion, un allongement de la période de co-culture alliée à une diminution de la DO (0,1) serait une combinaison à tester en vue d'améliorer le rendement de transformation.

- **Antibiotiques**

Aux côtés de la période d'incubation, la présence d'antibiotiques relativement phytotoxiques dans les milieux sur lesquels les explants transformés ont été cultivés semble également avoir joué un rôle important.

Élimination de la souche bactérienne grâce à l'utilisation de la carbénicilline et de céfotaxime. Dans mon étude, deux antibiotiques ont été utilisés pour éliminer et/ou stopper la souche bactérienne : la carbénicilline (à des concentrations de 250 puis 150 mg/l) et la céfotaxime (90 puis 30 mg/l). Alsheikh et al. (2002) ont étudié l'effet de divers antibiotiques sur différents explants de *Fragaria vesca semperflorens*. Pour les feuilles en particulier, aucune régénération n'a eu lieu pour une concentration en céfotaxime supérieure à 10 mg/l mais aucune contre-indication n'a pu être mise en évidence pour la carbénicilline : pour des concentrations allant de 10 à 300 mg/l, le taux de régénération avoisine les 100%. Ces résultats peuvent donc expliquer la mort des explants, en particulier les explants foliaires, avant même qu'ils n'aient montré de signes de régénération. En conclusion, il faudra envisager la réduction de la concentration en céfotaxime dans les milieux de régénération et de sélection.

Concentration en hygromycine. Par ailleurs, les premiers cals apparaissent sur les explants témoins au bout de six semaines et nous n'avons pas encore réussi à obtenir de pousses à partir de ceux-ci. Dans la littérature, les cals apparaissent dès quatre semaines de culture sur les pétioles et sur les feuilles, et des pousses commencent à se former sur ces cals au bout de huit semaines (Alsheikh et al., 2002). Oosumi et al. (2006) ont montré que ce délai avant l'apparition des pousses pouvait varier en fonction de la concentration en hygromycine. La concentration la plus adaptée semble être 0,5 mg/l. Afin d'améliorer le rendement de transformation et d'accélérer le processus de régénération, il serait envisageable de diminuer dès le début la concentration en hygromycine.

Par ailleurs, pour Husaini et al (2010), des plants transgéniques complets ont été obtenus en 20 à 24 semaines

IV. Discussion générale, conclusion et perspectives

IV.1. Stratégie utilisée pour isoler les gènes impliqués dans la floraison chez le fraisier

L'approche gène candidat se base sur l'hypothèse que les gènes sont conservés au sein des organismes. Cette approche nécessite que le mécanisme qui nous intéresse ait été bien décrit chez une espèce modèle. De ce fait, aucun gène 'original' de fonction inconnue ne peut être mis en évidence par ce type d'approche. Dans notre cas, cette stratégie s'est révélée efficace pour isoler des gènes candidats impliqués dans la floraison. Il est cependant nécessaire de coupler cette stratégie avec d'autres approches pour valider l'implication des gènes candidats isolés dans l'expression du caractère.

D'autres stratégies auraient pu être envisagées. Le clonage positionnel permet d'isoler le gène responsable du caractère. Mais cette approche est longue et nécessite des ressources génétiques importantes. Chez le fraisier, cet approche a été initiée pour identifier le locus SFL (Battey et al., 1998) mais n'a pas abouti à l'isolement du gène d'intérêt.

L'approche d'expression différentielle a pour objectif d'identifier, sans a priori les gènes impliqués dans un processus sous l'hypothèse qu'il soit régulé de façon transcriptionnelle. Cette approche a été réalisée par Mouhu et al. (2009) pour identifier des gènes impliqués dans l'initiation florale et différentiellement exprimés entre des génotypes remontants et non remontants. Aucun des 25 gènes candidats analysés n'ont révélé des différences au niveau de leur expression entre les fraisiers remontants et non remontants.

Le développement d'une population de TILLING pourrait constituer une ressource pour la validation fonctionnelle rapide des gènes isolés chez le fraisier. Ce type de ressource est en cours de développement au laboratoire d'accueil.

IV.2. Modèle des mécanismes moléculaires responsables de la 'remontée florale' chez le fraisier

Les gènes *FT* et *TFL1* codent pour des protéines appartenant à la famille des PEBP (Phosphatidyléthanolamine binding proteins). Malgré leur similarité de séquences, *FT* et *TFL1* ont des actions opposées sur la floraison. Il a été montré que la conversion d'un seul acide aminé permettait de convertir l'activateur *FT* en répresseur et le répresseur *TFL1* en activateur (Hanzawa et al., 2005).

Notre étude a permis de mettre en évidence que le caractère 'remontée florale' est contrôlé par le gène *FvKSN*, homologue à *TFL1* chez le fraisier diploïde et par une région impliquée dans le devenir du méristème comprenant le gène *FT* chez le fraisier octoploïde.

Chez la tomate, le gène *SFT* (SINGLE FLOWER TRUST), homologue au gène *FT*, régule la transition de la phase végétative vers la phase reproductive (Molinero-Rosales et al., 2004) et l'identité du méristème floral. Il a été montré que *SFT* code pour le florigène de tomate (Lifschitz and Eshed, 2006; Shalit et al., 2009). Le gène *SP* (SELF PRUNING), homologue au gène *TFL1*, favorise la croissance indéterminée du méristème inflorescentiel et réprime la floraison (Pnueli et al., 1998). La balance entre ces deux gènes régule l'alternance entre les phases végétatives et reproductives (Lifschitz and Eshed, 2006). En modulant la balance *SFT/SP*, le florigène confère des réponses de floraison différentes entre les méristèmes apicaux primaires et secondaires, régule la croissance en répétition et les cycles typiques d'une plante pérenne et accélère la maturation des feuilles.

Le fraisier présente un mode de croissance similaire à celui de la tomate (Townsend et al., 2007) : le méristème apical initie successivement les feuilles, les stolons, et de nouveaux cœurs avant de finalement se convertir en méristème inflorescentiel puis floral. Les méristèmes axillaires maintenus dans un état végétatif prennent alors le relais du développement et assure la pérennité de la plante.

Les résultats obtenus chez le fraisier comparés aux connaissances acquises sur une plante modèle capable d'alterner entre les phases végétatives et reproductives permettent de proposer un modèle hypothétique des mécanismes moléculaires responsables de la remontée florale chez le fraisier. Tout comme chez la tomate, la balance entre *FT* et *KSN* (*TFL1*), respectivement, activateur et répresseur de la floraison, serait impliquée dans l'alternance des phases végétatives et reproductives. Le phénomène de 'remontée florale' résulterait d'une modification de l'équilibre de la balance *FT/KSN* en faveur de la phase reproductive. Cette modification serait due, chez le fraisier diploïde, à la mutation du répresseur *KSN* et, chez le fraisier octoploïde, à l'activateur *FT*.

IV.3. Conclusion et perspectives

Cette étude a montré qu'un verrou génétique différent entre les fraisiers diploïde et octoploïde, cartographié respectivement sur le groupe de liaison VI et IVb, contrôle la remontée florale. Chez le fraisier diploïde, le gène *FvKSN* responsable de la remontée florale a été identifié et code pour un homologue du répresseur floral *TFL1*. Chez les génotypes remontants, ce gène présente une délétion dans la partie codante conduisant à une protéine non fonctionnelle, incapable de réprimer la floraison. Chez le fraisier octoploïde, le QTL majeur détecté contrôlant la remontée florale est lié à la production de stolons de manière antagoniste, suggérant l'existence d'une région génomique où s'exerce une compétition entre multiplication végétative et reproduction sexuée. Cette région génomique comprend plusieurs gènes candidats potentiellement intéressants dont le gène *FT* activateur de la floraison.

Une hypothèse suggérée par ce travail est que chez le fraisier, tout comme chez la tomate, l'alternance entre phase végétative et phase reproductive est liée à l'équilibre entre les gènes *FvKSN*, homologue de *TFL1*, et *FvFT*, homologue de *FT*. La remontée florale serait la conséquence d'une modification de cet équilibre entre ces deux gènes en faveur du développement reproductif.

Cette étude a permis de mieux appréhender les mécanismes génétiques et moléculaires de la floraison, *via* le caractère 'remontée florale' chez le fraisier. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes responsables de l'équilibre entre les phases végétatives et reproductives chez une espèce pérenne.

De plus, chez le fraisier cultivé, les génotypes remontants présentant une extension de la période de floraison intéresse particulièrement les producteurs. Les résultats obtenus vont permettre la mise en place d'outils d'aide à la sélection assistée par marqueurs.

Afin de poursuivre les recherches et de valider les hypothèses émises, différentes perspectives sont envisagées.

Il serait intéressant de caractériser plus finement la floraison chez le fraisier au niveau physiologique et par rapport à son interaction avec l'environnement.

Chez le fraisier diploïde, des analyses d'expression des différents gènes de la famille *TFL1/FT* sont envisagées afin d'identifier les différents acteurs de la floraison. La validation fonctionnelle des gènes candidats par transformation génétique sera poursuivie. Ainsi, des analyses de surexpression et d'inactivation du gène *FvKSN* mais également du gène *FvFT* chez des fraisiers remontants et non remontants seront réalisées. La transformation de ces gènes chez *A. thaliana* et chez la tomate permettrait de mieux comprendre leur fonction dans la transition florale et leur implication dans l'équilibre entre les phases végétative et reproductive.

Chez le fraisier octoploïde, la saturation de la région d'intérêt sera poursuivie. L'association entre cette région localisée sur le groupe de liaison IVb et la variation du caractère 'remontée florale' sera recherchée dans une collection de ressources génétiques constituée de variétés de *F. x ananassa*. L'allèle *FT* lié au QTL majeur impliqué dans la remontée florale devra être isolé soit par clonage soit à partir d'une banque BAC. Des études d'expression allèle spécifique de *FT* pourront alors être envisagées.

Enfin, par une étude phylogénétique, il serait intéressant d'observer l'évolution des gènes *FvFT* et *FvKSN* à travers les différents niveaux de ploïdie et les différentes espèces du genre *Fragaria*.

Bibliographie

Bibliographie

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052 - 1056.
- Ahmadi, H., Bringham, R.S., and Voth, V.** (1990). Modes of inheritance of photoperiodism in *Fragaria*. *J Amer Soc Hort Sci* **115**, 146 - 452.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., and Weigel, D.** (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *Embo Journal* **25**, 605-614.
- Albani, M.C., Battey, N.H., and Wilkinson, M.J.** (2004). The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 571-579.
- Alexandre, C.M., and Hennig, L.** (2008). FLC or not FLC: the other side of vernalization. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1127-1135.
- Aljanabi, S.M., Honeycutt, R.J., McClelland, M., and Sobral, B.W.S.** (1993). A GENETIC-LINKAGE MAP OF SACCHARUM-SPONTANEUM L SES 208. *Genetics* **134**, 1249-1260.
- Alsheikh, M.K., Suso, H.P., Robson, M., Battey, N.H., and Wetten, A.** (2002). Appropriate choice of antibiotic and Agrobacterium strain improves transformation of anti biotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F-v. semperflorens*. *Plant Cell Reports* **20**, 1173-1180.
- Amasino, R.** (2009). Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biology* **10**.
- Amaya, I., Ratcliffe, O.J., and Bradley, D.J.** (1999). Expression of CENTRORADIALIS (CEN) and CEN-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. *Plant Cell* **11**, 1405-1417.
- Barritt, B.H., Bringham, R.S., and Voth, V.** (1982). INHERITANCE OF EARLY FLOWERING IN RELATION TO BREEDING DAY-NEUTRAL STRAWBERRIES. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**, 733-736.
- Basten, C.J., Weir, B.S., and Zeng, Z.-B.** (2003). QTL Cartographer, Version 1.17: A Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. (Raleigh, NC: Department of Statistics, North Carolina State University).
- Battey, N., Miere, P., Tehranifar, A., Cekic, C., Taylor, S., Shriver, K., Hadley, P., Greenland, A., Darby, J., and Wilkinson, M.** (1998). Genetic and environmental control of flowering in strawberry. *Genetic and Environmental Manipulation of Horticultural Crops*, 111 - 131.
- Ben Chaim, A., Paran, I., Grube, R.C., Jahn, M., van Wijk, R., and Peleman, J.** (2001). QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 1016-1028.
- Blackman, B.K., Strasburg, J.L., Raduski, A.R., Michaels, S.D., and Rieseberg, L.H.** (2010). The Role of Recently Derived FT Para logs in Sunflower Domestication. *Current Biology* **20**, 629-635.
- Blanc, G., Barakat, A., Guyot, R., Cooke, R., and Delseny, I.** (2000). Extensive duplication and reshuffling in the arabidopsis genome. *Plant Cell* **12**, 1093-1101.
- Blazquez, M.A.** (2000). Flower development pathways. *Journal of Cell Science* **113**, 3547-3548.
- Blazquez, M.A., and Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 889-892.

- Blazquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I., and Weigel, D.** (1997). LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**, 3835-3844.
- Blazquez, M.A., Ferrandiz, C., Madueno, F., and Parcy, F.** (2006). How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology* **60**, 855-870.
- Bohner, J., and Bangerth, F.** (1988). Effects of fruit-set sequence and defoliation on cell number, cell-size and hormone levels of tomato fruits (*Lycopersicon Esculentum* mill) within a truss *Plant Growth Regulation* **7**, 141-155.
- Bomblies, K., Wang, R.L., Ambrose, B.A., Schmidt, R.J., Meeley, R.B., and Doebley, J.** (2003). Duplicate FLORICAULA/LEAFY homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development* **130**, 2385-2395.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K., and Melzer, S.** (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. *Plant Journal* **24**, 591-599.
- Boss, P.K., and Thomas, M.R.** (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**, 847-850.
- Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S., and Dean, C.** (2004). Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* **16**, S18-S31.
- Bradford, E., Hancock, J.F., and Warner, R.M.** (2010). Interactions of Temperature and Photoperiod Determine Expression of Repeat Flowering in Strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**, 102-107.
- Bradley, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Rothstein, S., and Coen, E.** (1996). Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* **379**, 791-797.
- Bringhurst, R.S.** (1990). Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. *Hortscience* **25**, 879-881.
- Bringhurst, R.S., and Voth, V.** (1978). Origin and evolutionary potentiality of the day-neutral trait in octoploid *Fragaria*. *Genetics* **90**, 510.
- Bringhurst, R.S., and Voth, V.** (1984). Breeding octoploid strawberries. *Iowa State J. Res.* **58**, 371-381.
- Bringhurst, R.S., Voth, V., and van Hook, D.** (1960). Relationship of root starch content and chilling history to performance of California strawberries. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **75**, 373-381.
- Brown, T., and Wareign, P.F.** (1965). The genetic control of the everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica* **14**, 97 - 112.
- Busch, M.A., Bomblies, K., and Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in Arabidopsis. *Science* **285**, 585-587.
- Byrne, D., and Jelenkovic, G.** (1976). Cytological diploidization in cultivated octoploid strawberry *Fragaria x ananassa* *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **18**, 653-659.
- Carmel-Goren, L., Liu, Y., Lifschitz, E., and Zamir, D.** (2003). The *SELF-PRUNING* gene family in tomato. *Plant Mol. Biol.* **52**, 1215-1222.
- Carmona, M.J., Calonje, M., and Martinez-Zapater, J.M.** (2007). The FT/TFL1 gene family in grapevine. *Plant Molecular Biology* **63**, 637-650.
- Casasoli, M., Derory, J., Morera-Dutrey, C., Brendel, O., Porth, I., Guehl, J.M., Villani, F., and Kremer, A.** (2006). Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. *Genetics* **172**, 533-546.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., and Liu, D.M.** (1999). Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.

- Cekic, C., Battey, N.H., and Wilkinson, M.J.** (2001). The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 540-546.
- Cerdan, P.D., and Chory, J.** (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**, 881 - 885.
- Chandler, J., and Dean, C.** (1994). Factors influencing the vernalization response and flowering time of late flowering mutants of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh *Journal of Experimental Botany* **45**, 1279-1288.
- Chardon, F., and Damerval, C.** (2005). Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. *Journal of Molecular Evolution* **61**, 579-590.
- Chen, M., and Ni, M.** (2006). RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates *CONSTANS* expression and photoperiodic flowering. *Plant J* **46**, 823 - 833.
- Clarke, J.H.** (1937). Inheritance of the so-called everbearing tendency in the strawberry. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **35**, 67-70.
- Coen, E.** (2001). Goethe and the ABC model of flower development. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **324**, 523-530.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signalling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030 - 1033.
- Crepet, W.L., and Niklas, K.J.** (2009). Darwin's second 'abominable mystery': Why are there so many angiosperm species? *Am. J. Bot.* **96**, 366-381.
- Da Silva, J., and Sobral, B.** (1996). Genetics in polyploids. In *The Impact of Plant Molecular Genetics* (Boston), pp. 3-37.
- Danilevskaya, O.N., Meng, X., Hou, Z.L., Ananiev, E.V., and Simmons, C.R.** (2008). A genomic and expression compendium of the expanded PEBP gene family from maize. *Plant Physiology* **146**, 250-264.
- Darnell, R.L., and Hancock, J.F.** (1996). Balancing vegetative and reproductive growth in strawberry. In the IV North American Strawberry Conference, C.K.C. M.V. Pritts, and T.E. Crocker (Eds.), ed (Gainesville, FL: Hort. Sci. Dept., Univ. of Florida), pp. 144-150.
- Darrow, G.M.** (1966). *The strawberry. History, breeding and physiology.* (New York: Holt, Rinehart and Winston).
- Darrow, G.M., and Waldo, G.F.** (1934). Responses of strawberry varieties and species to duration of the daily light period. *U.S. Dept. Agr. Tech. Bull.* , 453.
- Davies, J.K., Jensen, E., Juntila, O., Rivier, L., and Crozier, A.** (1985). Identification of endogenous gibberellins from *Salix Pentandra*. *Plant Physiology* **78**, 473-476.
- Davis, T.M., and Yu, H.** (1997). A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Journal of Heredity* **88**, 215-221.
- De Vilmorin, H.L.** (1899). Perpetual strawberries. *Royal Horticultural Society* **22**.
- Downs, R.J., and A.A., P.** (1955). Differences in photoperiodic responses of everbearing and June-bearing strawberries. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **66**, 234-236.
- Dubnau, J., and Struhl, G.** (1996). RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* **379**, 694-699.
- Duchesne, A.N.** (1766). *Histoire Naturelle des Fraisiers.* Paris, 442 pp.
- Durner, E.F., and Poling, E.B.** (1987). Flower bud induction, initiation, differentiation and development in the Earliglow strawberry *Scientia Horticulturae* **31**, 61-69.
- Durner, E.F., Barden, J.A., Himelrick, D.G., and Poling, E.B.** (1984). Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, Junebearing and everbearing strawberries. *J Amer Soc Hort Sci* **109**, 396 - 400.

- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T., and Omura, M.** (2005). Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research* **14**, 703-712.
- Fan, C.Y., Yin, J.M., Wang, B., Zhang, Y.F., and Yang, Q.** (2010). Molecular Cloning and Expression Analysis of a FT Homologous Gene from *Solanum tuberosum*. *Agricultural Sciences in China* **9**, 1133-1139.
- Farrar, J.F., and Jones, D.L.** (2000). The control of carbon acquisition by roots. *New Phytologist* **147**, 43-53.
- Federova, N.J.** (1946). Crossability and phylogenetic relations in the main European species of *Fragaria* (*Acad. Sci. USSR*), pp. 545-547.
- Ferrandiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., and Yanofsky, M.F.** (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**, 725-734.
- Fisher, K.J.** (1977). Competition effects between fruit trusses of the tomato plants. *Sci Hortic* **8**, 37-42.
- Fletcher, S.W.** (1917). *The strawberry in North America; history, origin, botany, and breeding.* (New York: Macmillan).
- Folta, K.M., and Davis, T.M.** (2006). Strawberry genes and genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 399-415.
- Foster, T., Kirk, C., Jones, W.T., Allan, A.C., Espley, R., Karunairetnam, S., and Rakonjac, J.** (2007). Characterisation of the DELLA subfamily in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Tree Genetics & Genomes* **3**, 187-197.
- Foucher, F., Chevalier, M., Corre, C., Soufflet-Freslon, V., Legeai, F., and Hibrand-Saint Oyant, L.** (2008). New resources for studying the rose flowering process. *Genome* **51**, 827-837.
- Foucher, F., Morin, J., Courtiade, J., Cadioux, S., Ellis, N., Banfield, M.J., and Rameau, C.** (2003). DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell* **15**, 2742-2754.
- Garner, W.W., and Allard, H.A.** (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants *Monthly Weather Review* **48**, 415-415.
- Gaut, B.S., and Doebley, J.F.** (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6809-6814.
- Geber, M.A.** (1990). The cost of meristem limitation in *Polygonum Arenastrum* negative genetic correlations between fecundity and growth. *Evolution* **44**, 799-819.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A., and Dean, C.** (2001). The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* **107**, 525 - 535.
- Grattapaglia, D., and Sederoff, R.** (1994). Genetic-linkage maps of *Eucalyptus Grandis* and *Eucalyptus Urophylla* using a pseudo-testcross - Mapping strategy and RAPD markers *Genetics* **137**, 1121-1137.
- Grennan, A.K.** (2006). Gibberellin metabolism enzymes in rice. *Plant Physiology* **141**, 524-526.
- Guttridge, C.G.** (1985). *Fragaria x ananassa*. *CRC Handbook of Flowering* **III**, 16 - 33.
- Hamann, K.K., and Poling, E.B.** (1997). The influence of runner order, night temperature and chilling cycle on the earliness of 'Selva' plug plant fruit production. *Acta Hort.* **439**, 597-603.

- Hancock, J.F., Lavin, A., and Retamales, J.B.** (1999). Our southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. *Hortscience* **34**, 814-816.
- Hancock, J.F., Hokanson, S.C., Callow, P.W., Sakin, M., Haghghi, K., and Flore, J.A.** (1992). Performance of Californian and Eastern United-States strawberry cultivars under conditions mimicking Eastern production systems *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**, 991-995.
- Hancock, J.F., Luby, J.J., Dale, A., Callow, P.W., Serce, S., and El-Shiek, A.** (2002). Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: Inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica* **126**, 177-184.
- Hancock, J.F., Finn, C.A., Hokanson, S.C., Luby, J.J., Goulart, B.L., Demchak, K., Callow, P.W., Serce, S., Schilder, A.M.C., and Hummer, K.E.** (2001). A multistate comparison of native octoploid strawberries from North and South America. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**, 579-586.
- Hanzawa, Y., Money, T., and Bradley, D.** (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *PNAS* **102**, 7748 - 7753.
- Hayama, R., and Coupland, G.** (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 13-19.
- He, Y., Michaels, S.D., and Amasino, R.M.** (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* **302**, 1751 - 1754.
- Hedman, H., Kallman, T., and Lagercrantz, U.** (2009). Early evolution of the MFT-like gene family in plants. *Plant Molecular Biology* **70**, 359-369.
- Heide, O.** (1977). Photoperiod and temperature interactions in growth and flowering of strawberry. *Physiol Plant* **40**, 21 - 26.
- Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant Journal* **46**, 183-192.
- Henderson, I.R., Shindo, C., and Dean, C.** (2003). The need for winter in the switch to flowering. *Annual Review of Genetics* **37**, 371-392.
- Herrmann, D., Barre, P., Santoni, S., and Julier, B.** (2010). Association of a CONSTANS-LIKE gene to flowering and height in autotetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 865-876.
- Hicks, K.A., Sundas, A., and MeeksWagner, D.R.** (1996). *Arabidopsis* early-flowering mutants reveal multiple levels of regulation in the vegetative-to-floral transition. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **7**, 409-418.
- Horvath, A., Sánchez Sevilla J. F., F., P., Carrasco R. S., Leone A., Höfer M., Barreneche T., and Denoyes-Rothan, B.** (submitted). Structured diversity in octoploid strawberry cultivars: importance of the old European germplasm. submitted.
- Howad, W., Yamamoto, T., Dirlwanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., Monforte, A.J., Georgi, L., Abbott, A.G., and Arus, P.** (2005). Mapping with a few plants: Using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics* **171**, 1305-1309.
- Hsu, C.Y., Liu, Y.X., Luthe, D.S., and Yuceer, C.** (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* **18**, 1846-1861.
- Huang, T., Bohlenius, H., Eriksson, S., Percy, F., and Nilsson, O.** (2005). The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* **309**, 1694-1696.
- Hughes, O., and Lamparter, T.** (1999). Prokaryotes and phytochrome. the connection to chromophores and signaling. *Plant Physiology* **121**, 1059-1068.
- Hummer, K.E., Nathewet, P., and Yanagi, T.** (2009). Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae). *American Journal of Botany* **96**, 713-716.

- Husaini, A.M.** (2010). Pre- and post-agroinfection strategies for efficient leaf disk transformation and regeneration of transgenic strawberry plants. *Plant Cell Reports* **29**, 97-110.
- Hytonen, T., Elomaa, P., Moritz, T., and Junttila, O.** (2009). Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *Bmc Plant Biology* **9**.
- Igasaki, T., Watanabe, Y., Nishiguchi, M., and Kotoda, N.** (2008). The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 family in Lombardy poplar. *Plant and Cell Physiology* **49**, 291-300.
- Imaizumi, T., and Kay, S.A.** (2006). Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci* **11**, 550 - 558.
- Ito, H., and Saito, T.** (1962). Studies on the flower formation in the strawberry plant I. Effects of temperature on flower formation. *Tohoku J. Agric. Res.* **13**, 191-203.
- Izawa, T., Takahashi, Y., and Yano, M.** (2003). Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 113-120.
- Jackson, S., and Chen, Z.J.** (2010). Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 153-159.
- Jaeger, K.E., and Wigge, P.A.** (2007). FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Current Biology* **17**, 1050-1054.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., and Dean, C.** (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**, 344 - 347.
- Jonkers, H.** (1965). On the flower formation, the dormancy and the early forcing of strawberries. Thesis.
- Julier, B., Huguet, T., Chardon, F., Ayadi, R., Pierre, J.B., Prosperi, J.M., Barre, P., and Huyghe, C.** (2007). Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 1391-1406.
- Jung, C., and Muller, A.E.** (2009). Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science* **14**, 563-573.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* **286**, 1962-1965.
- Kawamura, K., and Takeda, H.** (2006). Cost and probability of flowering at the shoot level in relation to variability in shoot size within the crown of *Vaccinium hirtum* (Ericaceae). *New Phytologist* **171**, 69-80.
- Keller, E.T., Fu, Z., and Brennan, M.** (2004). The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochemical Pharmacology* **68**, 1049-1053.
- Kempin, S.A., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1995). MOLECULAR-BASIS OF THE CAULIFLOWER PHENOTYPE IN ARABIDOPSIS. *Science* **267**, 522-525.
- Kim, S.Y., Zhu, T., and Sung, Z.R.** (2010). Epigenetic Regulation of Gene Programs by EMF1 and EMF2 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**, 516-528.
- King, R.W., Hisamatsu, T., Goldschmidt, E.E., and Blundell, C.** (2008). The nature of floral signals in Arabidopsis. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of FLOWERING LOCUS T (FT). *Journal of Experimental Botany* **59**, 3811-3820.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960-1962.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., and Yano, M.** (2002). Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to

- flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1096-1105.
- Komeda, Y.** (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 521-535.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., and Vanderveen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* **229**, 57-66.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., and Soppe, W.** (1998). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 345-370.
- Kowalski, S.P., Lan, T.H., Feldmann, K.A., and Paterson, A.H.** (1994). QTL mapping of naturally-occurring variation in flowering time of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* **245**, 548-555.
- Krizek, B.A., and Fletcher, J.C.** (2005). Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics* **6**, 688-698.
- Lagercrantz, U.** (2009). At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *Journal of Experimental Botany* **60**, 2501-2515.
- Lamb, R.S., Hill, T.A., Tan, Q.K.G., and Irish, V.F.** (2002). Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* **129**, 2079-2086.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., and Newberg, L.A.** (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations *Genomics* **1**, 174.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., and Newberg, L.A.** (2009). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations (vol 1 pg 174, 1987). *Genomics* **93**, 398-398.
- Lawson, E.J.R., and Poethig, R.S.** (1995). SHOOT DEVELOPMENT IN PLANTS - TIME FOR A CHANGE. *Trends in Genetics* **11**, 263-268.
- Lee, J., and Lee, I.** (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2247-2254.
- Leitch, I.J., and Bennett, M.D.** (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* **2**, 470-476.
- Lerceteau-Kohler, E., Guerin, G., Laigret, F., and Denoyes-Rothan, B.** (2003). Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 619-628.
- Levy, Y.Y., and Dean, C.** (1998a). Control of flowering time. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 49-54.
- Levy, Y.Y., and Dean, C.** (1998b). The transition to flowering. *Plant Cell* **10**, 1973-1989.
- Levy, Y.Y., Mesnage, S., Mylne, J.S., Gendall, A.R., and Dean, C.** (2002). Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* **297**, 243 - 246.
- Lifschitz, E., and Eshed, Y.** (2006). Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3405-3414.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J.P., and Eshed, Y.** (2006). The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**, 6398-6403.
- Lin, C.T.** (2000). Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiology* **123**, 39-50.
- Lorenz, K., Lohse, M.J., and Quitterer, U.** (2003). Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* **426**, 574-579.
- Luby, J.J., Hancock, J.F., Dale, A., and Serce, S.** (2008). Reconstructing *Fragaria x ananassa* utilizing wild *F-virginiana* and *F-chiloensis*: inheritance of winter injury, photoperiod sensitivity, fruit size, female fertility and disease resistance in hybrid progenies. *Euphytica* **163**, 57-65.
- Magalhaes, J.V., Garvin, D.F., Wang, Y.H., Sorrells, M.E., Klein, P.E., Schaffert, R.E., Li, L., and Kochian, L.V.** (2004). Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* **167**, 1905-1914.
- Maltoni, M.L., Faedi, W., Simpson, D.W., Dradi, R., and Persano, S.** (1996). Influenza dell'ambiente sulla espressione del carattere rifioritura in *Fragola*. *Italus Hortus* **3**, 30-36.
- Mandel, M.A., Gustafsonbrown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature* **360**, 273-277.
- Masterson, J.** (1994). Stomatal size in fossil plants - Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**, 421-424.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., and Schmid, M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology* **17**, 1055-1060.
- Matsuda, N., Ikeda, K., Kurosaka, M., Takashina, T., Isuzugawa, K., Endo, T., and Omura, M.** (2009). Early Flowering Phenotype in Transgenic Pears (*Pyrus communis* L.) Expressing the CiFT Gene. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **78**, 410-416.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M.** (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120-1130.
- Michaels, S.D., and Amasino, R.M.** (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 949-956.
- Michaels, S.D., and Amasino, R.M.** (2000). Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell and Environment* **23**, 1145-1153.
- Michaels, S.D., and Amasino, R.M.** (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**, 935-941.
- Michaels, S.D., Himmelblau, E., Kim, S.Y., Schomburg, F.M., and Amasino, R.M.** (2005). Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 149-156.
- Mimida, N., Kotoda, N., Ueda, T., Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Iwanami, H., Moriya, S., and Abe, K.** (2009). Four TFL1CEN-Like Genes on Distinct Linkage Groups Show Different Expression Patterns to Regulate Vegetative and Reproductive Development in Apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant and Cell Physiology* **50**, 394-412.
- Mimida, N., Goto, K., Kobayashi, Y., Araki, T., Ahn, J.H., Weigel, D., Murata, M., Motoyoshi, F., and Sakamoto, W.** (2001). Functional divergence of the TFL1-like gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes to Cells* **6**, 327-336.

- Ming, R., Del Monte, T.A., Hernandez, E., Moore, P.H., Irvine, J.E., and Paterson, A.H.** (2002). Comparative analysis of QTLs affecting plant height and flowering among closely-related diploid and polyploid genomes. *Genome* **45**, 794-803.
- Molinero-Rosales, N., Latorre, A., Jamilena, M., and Lozano, R.** (2004). SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* **218**, 427-434.
- Moon, Y.-H., Chen, L., Pan, R.L., Chang, H.-S., Zhu, T., Maffeo, D.M., and Sung, Z.R.** (2003). EMF Genes Maintain Vegetative Development by Repressing the Flower Program in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 681-693.
- Moore, J.N., and Hough, L.F.** (1962). Relationships between auxin levels, time of floral induction and vegetative growth of the strawberry. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **81**, 255-264.
- Mouhu, K., Hytonen, T., Folta, K., Rantanen, M., Paulin, L., Auvinen, P., and Elomaa, P.** (2009). Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biology* **9**, 122.
- Mouradov, A., Cremer, F., and Coupland, G.** (2002). Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* **14**, S111-S130.
- Mutasa-Gottgens, E., and Hedden, P.** (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1979-1989.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant Journal* **46**, 880-889.
- Nishiyama, M., and Kanahama, K.** (2002). Effects of temperature and photoperiod on flower bud initiation of day-neutral and everbearing strawberries. In *Proceedings of the Fourth International Strawberry Symposium, Vols 1 and 2*, T. Hietaranta, M.M. Linna, P. Palonen, and P. Parikka, eds, pp. 253-255.
- Notaguchi, M., Daimon, Y., Abe, M., and Araki, T.** (2005). Studies on the graft-transmissibility of promotion of flowering by FT in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **46**, S95-S95.
- Odabaei, G., Chatterjee, D., Jazirehi, A.R., Goodglick, L., Yeung, K., and Bonavida, B.** (2004). Raf-1 kinase inhibitor protein: Structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis. In *Advances in Cancer Research, Vol 91*, pp. 169-200.
- Onouchi, H., Igeno, M.I., Perilleux, C., Graves, K., and Coupland, G.** (2000). Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell* **12**, 885-900.
- Oosumi, T., Gruszewski, H.A., Blischak, L.A., Baxter, A.J., Wadl, P.A., Shuman, J.L., Veilleux, R.E., and Shulaev, V.** (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* **223**, 1219-1230.
- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V., and Martienssen, R.A.** (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* **19**, 141-147.
- Ourecky, D.K., and Slate, G.L.** (1967). Behaviour of the everbearing characteristic in strawberries. *Proc Am Soc Hort Sci* **91**, 236-241.
- Parcy, F.** (2005). Flowering: a time for integration. *International Journal of Developmental Biology* **49**, 585-593.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I., and Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-566.

- Pena, L., Martin-Trillo, M., Juarez, J., Pina, J.A., Navarro, L., and Martinez-Zapater, J.M.** (2001). Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology* **19**, 263-267.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., and Causse, M.** (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* **7**, 275-291.
- Plomion, C.** (1995). Cartographie génétique chez les végétaux et utilisation des cartes de liaison.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., and Lifschitz, E.** (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* **13**, 2687-2702.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D., and Lifschitz, E.** (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* **125**, 1979-1989.
- Poethig, R.S.** (1990). Phase-change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* **250**, 923-930.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., and Campbell, C.S.** (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* **266**, 5-43.
- Powers, L.** (1954). Inheritance of period of blooming in progenies of strawberries. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **64**, 293-298.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P.** (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Putterill, J., Laurie, R., and Macknight, R.** (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* **26**, 363 - 373.
- Qin, Y.H., da Silva, J.A.T., Zhang, L.X., and Zhang, S.L.** (2008). Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances* **26**, 219-232.
- Qu, L., and Hancock, J.F.** (2001). Detecting and mapping repulsion-phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 136-143.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., and Wagner, D.** (1995). Phytochromes - Photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680.
- Rabinowicz, P.D., and Slovin, J.P.** (2007). *Fragaria vesca*, a useful tool for Rosaceae genomics. In 6th North American Strawberry Symposium (Ventura, CA: American Society for Horticultural Science), pp. 112-117.
- Ratcliffe, O.J., Nadzan, G.C., Reuber, T.L., and Riechmann, J.L.** (2001). Regulation of flowering in Arabidopsis by an FLC homologue. *Plant Physiology* **126**, 122-132.
- Ratcliffe, O.J., Kumimoto, R.W., Wong, B.J., and Riechmann, J.L.** (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell* **15**, 1159-1169.
- Ratcliffe, O.J., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E.S., and Bradley, D.J.** (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* **125**, 1609-1615.
- Reeves, P.A., He, Y., Schmitz, R.J., Amasino, R.M., Panella, L.W., and Richards, C.M.** (2007). Evolutionary conservation of the FLOWERING LOCUS C-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* **176**, 295 - 307.
- Richardson, C.W.** (1914). A preliminary note on the genetics of *Fragaria*. *Jour. Genet.* **3**, 171-177.
- Risser, G., and Navatel, J.-C.** (1997). *La fraise - Plant et variétés.* (Paris).

- Rodriguez-Falcon, M., Bou, J., and Prat, S.** (2006). Seasonal control of tuberization in potato: Conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 151-180.
- Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A., Ainouche, A., Ainouche, M.L., Olbricht, K., Staudt, G., Richard, L., and Denoyes-Rothan, B.** (2009). Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**, 515-530.
- Rousseau-Gueutin, M., Lerceteau-Kohler, E., Barrot, L., Sargent, D.J., Monfort, A., Simpson, D., Arus, P., Guerin, G., and Denoyes-Rothan, B.** (2008). Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* **179**, 2045-2060.
- Roux, F., Touzet, P., Cuguen, J., and Le Corre, V.** (2006). How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* **11**, 375-381.
- Rozen, S., and Skaletsky, H.J.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, M.S.e. Krawetz S, ed (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 365-386.
- Salisbury, F.B., and Ross, C.W.** (1992). *Plant Physiology*. (Belmont, California: 4th ed. Wadsworth Publishing Company).
- Samach, A., and Wigge, P.A.** (2005). Ambient temperature perception in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 483-486.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., and Coupland, G.** (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**, 1613-1616.
- Sargent, D.J., Rys, A., Nier, S., Simpson, D.W., and Tobutt, K.R.** (2007). The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 373-384.
- Sargent, D.J., Davis, T.M., Tobutt, K.R., Wilkinson, M.J., Battey, N.H., and Simpson, D.W.** (2004). A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 1385-1391.
- Sargent, D.J., Fernandez-Fernandez, F., Ruiz-Roja, J.J., Sutherland, B.G., Passey, A., Whitehouse, A.B., and Simpson, D.W.** (2009). A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Molecular Breeding* **24**, 293-303.
- Sargent, D.J., Cipriani, G., Vilanova, S., Gil-Ariza, D., Arus, P., Simpson, D.W., Tobutt, K.R., and Monfort, A.** (2008). The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* **51**, 120-127.
- Sato, H., Heang, D., Sassa, H., and Koba, T.** (2009). Identification and characterization of FT/TFL1 gene family in cucumber. *Breeding Science* **59**, 3-11.
- Scott, D.H., and Lawrence, F.J.** (1975). Strawberries. In *Advances in fruit breeding*, P.U. Press, ed (Urbana, Illinois), pp. 71-97.
- Searle, I., and Coupland, G.** (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *Embo Journal* **23**, 1217-1222.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R.A., and Coupland, G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signalling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**, 898 - 912.

- Senanayake, Y.D.A., and Bringhurst, R.S.** (1967). Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. *J. Bot.* **54**, 221-228.
- Serce, S., and Hancock, J.F.** (2005). Inheritance of day-neutrality in octoploid species of *Fragaria*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**, 580-584.
- Serrano, G., Herrera-Palau, R., Romero, J.M., Serrano, A., Coupland, G., and Valverde, F.** (2009). *Chlamydomonas* CONSTANS and the Evolution of Plant Photoperiodic Signaling. *Current Biology* **19**, 359-368.
- Shalit, A., Rozman, A., Goldshmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., Eshed, Y., and Lifschitz, E.** (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8392-8397.
- Shannon, S., and Meekswagner, D.R.** (1991). A mutation in the *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell* **3**, 877-892.
- Shaw, D.V.** (2003). Heterogeneity of segregation ratios from selfed progenies demonstrate polygenic inheritance for day neutrality in strawberry (*Fragaria xananassa* Duch.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**, 504-507.
- Sheldon, C.C., Finnegan, E.J., Rouse, D.T., Tadege, M., Bagnall, D.J., Helliwell, C.A., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2000). The control of flowering by vernalization. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 418-422.
- Shitsukawa, N., Ikari, C., Shimada, S., Kitagawa, S., SakaMoto, K., Saito, H., Ryuto, H., Fukunishi, N., Abe, T., Takumi, S., Nasuda, S., and Murai, K.** (2007). The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the VRN1 gene. *Genes & Genetic Systems* **82**, 167-170.
- Shulaev, V., Sargent, D.J., Crowhurst, R.N., and Todd Mockler, Richard E. Veilleux, Otto Folkerts, Arthur L. Delcher, Pankaj Jaiswal, Aaron Liston, Shrinivasrao P. Mane, Paul Burns, Keithanne Mockaitis, Thomas M. Davis, Janet P. Slovin, Nahla Bassil, Roger P. Hellens, Clive Evans, Roderick V. Jensen, Andrew C. Allan, Todd P. Michael, Joao Carlos Setubal, Jean-Marc Celton, D. Jasper G. Rees, Kelly Williams, Sarah H. Holt., Allan Dickerman, Juan Jairo Ruiz Rojas, Mithu Chatterjee, Bo Liu, Herman Silva, Lee Meisel, Avital Adavo Sergei Filichkin,, Riccardo Velasco, Michela Troggo, Roberto Viola, Mark Borodovsky,, Tia-Lynn Ashman, Asaph Aharoni, Jeffery Bennetzen, Palitha Dharmawardhana, Justin Elser, Rajani Raja, Henry D. Priest, Douglas W. Bryant Jr., Samuel E. Fox, Scott A. Givan, Sushma Naithani, Alan Christoffels, David Y. Salama, Jade Carter, Elena Lopez Girona, Anna Zdepski, Wenqin Wang, Randall A. Kerstetter, Steven L. Salzberg, Wilfried Schwab, Schuyler S. Korban, Jahn Davik, Amparo Monfort, Beatrice Denoyes-Rothan, Pere Arus, Ron Mittler, Barry Flinn, Kevin M. Folta (submitted). Short and Sweet: The Genome of a Diploid Strawberry.**
- Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle, H.S., Folta, K.M., Iezzoni, A., Main, D., Arus, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T.M., Gardiner, S.E., Potter, D., and Veilleux, R.E.** (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiol* **147**, 985 - 1003.
- Silverstone, A.L., Tseng, T.S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski, N.E., and Sun, T.P.** (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**, 987-1000.
- Simpson, D.W.** (1992). The inheritance of components of fruiting season, yield and vigor in short-day strawberries and the relationship between pistillate flowers and flowering time. *Plant Breeding* **109**, 177-182.
- Simpson, D.W., and Sharp, D.S.** (1988). The inheritance of fruit yield and stolon production in everbearing strawberries. *Euphytica* **38**, 65-74.

- Simpson, G.G.** (2004). The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 570-574.
- Simpson, G.G., and Dean, C.** (2002). Flowering - Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time? *Science* **296**, 285-289.
- Slovin, J., and Rabinowicz, P.** (2007). *Fragaria vesca*, a useful tool for Rosaceae genomics. In 6th North American Strawberry Symposium, A.S.f.H. Science, ed (Ventura, CA), pp. 112-117.
- Slovin, J.P., Schmitt, K., and Folta, K.M.** (2009). An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the Rosaceae. *Plant Methods* **5**.
- Smith, H.M.S., Campbell, B.C., and Hake, S.** (2004). Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes PENNYWISE and POUND-FOOLISH. *Current Biology* **14**, 812-817.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Pires, J.C., Kovarik, A., Tate, J.A., and Mavrodiev, E.** (2004). Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 485-501.
- Soltis, P.S., and Soltis, D.E.** (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 7051-7057.
- Song, K.M., Lu, P., Tang, K.L., and Osborn, T.C.** (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7719-7723.
- Sonsteby, A., and Heide, O.M.** (2007a). Long-day control of flowering in everbearing strawberries. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **82**, 875-884.
- Sonsteby, A., and Heide, O.M.** (2007b). Quantitative long-day flowering response in the perpetual-flowering F-1 strawberry cultivar Elan. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **82**, 266-274.
- Sonsteby, A., and Heide, O.M.** (2008a). Temperature responses, flowering and fruit yield of the June-bearing strawberry cultivars Florence, Frida and Korona. *Scientia Horticulturae* **119**, 49-54.
- Sonsteby, A., and Heide, O.M.** (2008b). Long-day rather than autonomous control of flowering in the diploid everbearing strawberry *Fragaria vesca* ssp *semperflorens*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **83**, 360-366.
- Spigler, R.B., Lewers, K.S., Main, D.S., and Ashman, T.L.** (2008). Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome. *Heredity* **101**, 507-517.
- Stam, P.** (1993). Construction of integrated genetic-linkage maps by means of a new computer package - JOINMAP. *Plant Journal* **3**, 739-744.
- Stewart, P.J., and Folta, K.M.** (2010). A Review of Photoperiodic Flowering Research in Strawberry (*Fragaria* spp.). *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**, 1-13.
- Sugimoto, T., Tamaki, K., Matsumoto, J., Yamamoto, Y., Shiwaku, K., and Watanabe, K.** (2005). Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. *Plant Breeding* **124**, 498-501.
- Sun, T.P., and Gubler, F.** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 197-223.
- Sung, S., and Amasino, R.M.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**, 159 - 164.

- Sung, S.B., Schmitz, R.J., and Amasino, R.M.** (2006). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis. *Genes & Development* **20**, 3244-3248.
- Sussex, I.M.** (1989). Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**, 225-229.
- Tan, F.C., and Swain, S.M.** (2006). Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. *Physiologia Plantarum* **128**, 8-17.
- Thompson, J.N., Nuismer, S.L., and Merg, K.** (2004). Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 511-519.
- Townsend, T., Albani, M., Wilkinson, M., Coupland, G., and Battey, N.** (2007). *The Diversity and Significance of Flowering in Perennials*. (Blackwell Publishing Ltd).
- Trankner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M.V., Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., Gau, A., Schlangen, K., Malnoy, M., and Flachowsky, H.** (2010). Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* **232**, 1309-1324.
- Tremblay, R., and Colasanti, J.** (2007). *Floral Induction*. (Blackwell Publishing Ltd).
- Turck, F., Fornara, F., and Coupland, G.** (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves central stage. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 573 - 594.
- Van Dijk, H.** (2009). Ageing effects in an iteroparous plant species with a variable life span. *Ann. Bot.* **104**, 115-124.
- Veit, J., Wagner, E., and Albrechtova, J.T.P.** (2004). Isolation of a FLORICAULA/LEAFY putative orthologue from *Chenopodium rubrum* and its expression during photoperiodic flower induction. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 573-578.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troglio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagne, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouze, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., and Viola, R.** (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**, 833-+.
- Veley, K.M., and Michaels, S.D.** (2008). Functional Redundancy and New Roles for Genes of the Autonomous Floral-Promotion Pathway. *Plant Physiol.* **147**, 682-695.
- Veliath, J.A., and Ferguson, A.C.** (1972). The effect of deblossoming on fruit size, yield, and earliness in tomato. *J Hort Sci* **7**, 278-279.
- Watson, M.A.** (1984). Developmental constraints - Effect on population-growth and patterns of resource-allocation in a clonal plant. *American Naturalist* **123**, 411-426.
- Weebadde, C.K., Wang, D., Finn, C.E., Lewers, K.S., Luby, J.J., Bushakra, J., Sjulín, T.M., and Hancock, J.F.** (2008). Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. *Plant Breed* **127**, 94 - 101.
- Weigel, D., and Nilsson, O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**, 495-500.

- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., and Meyerowitz, E.M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* **69**, 843-859.
- Wendel, J.F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**, 225-249.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., and Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science* **309**, 1056-1059.
- Wilkie, J.D., Sedgley, M., and Olesen, T. (2008). Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3215-3228.
- William, D.A., Su, Y.H., Smith, M.R., Lu, M., Baldwin, D.A., and Wagner, D. (2004). Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1775-1780.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., and Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1175-1189.
- Yamaguchi, S., and Kamiya, Y. (2000). Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant and Cell Physiology* **41**, 251-257.
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., and Dubcovsky, J. (2006). The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19581-19586.
- Yan, L.L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V., and Dubcovsky, J. (2004). The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* **303**, 1640-1644.
- Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2003). Living by the calendar: How plants know when to flower. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 265-275.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S.F., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K.D., Rose, D.W., Mischak, H., Sedivy, J.M., and Kolch, W. (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**, 173-177.
- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Yoo, S.Y., Lee, J.S., and Ahn, J.H. (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 770-778.
- Yoo, S.Y., Kardailsky, I., Lee, J.S., Weigel, D., and Ahn, J.H. (2004). Acceleration of flowering by overexpression of MFT (MOTHER OF FT AND TFL1). *Molecules and Cells* **17**, 95-101.
- Yu, H., Xu, Y.F., Tan, E.L., and Kumar, P.P. (2002). AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16336-16341.
- Zeevaart, J.A.D. (1976). Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **27**, 321-348.
- Zeevaart, J.A.D. (2008). Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 541-547.
- Zhang, H.L., Harry, D.E., Ma, C., Yuceer, C., Hsu, C.Y., Vikram, V., Shevchenko, O., Etherington, E., and Strauss, S.H. (2010). Precocious flowering in trees: the FLOWERING LOCUS T gene as a research and breeding tool in Populus. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2549-2560.
- Zhou, Y., Sun, X.D., and Ni, M. (2007). Timing of photoperiodic flowering: Light perception and circadian clock. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 28-34.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide – Coloration au nitrate d'argent.....	261
Annexe 2 : Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM®-T	271
Annexe 3 : Liste des 14 couples d'amorces permettant de révéler 33 marqueurs 'simple dose' (SD) sur la population de cartographie octoploïde issue du croisement Capitola x CF1116.	278
Annexe 4 : Liste des 24 couples d'amorces permettant de révéler les 74 marqueurs 'simple dose' chez la population de cartographie octoploïde issue du croisement Mara des bois x Pajaro.	279
Annexe 5 : Article "Tracking the evolutionary history of polyploidy in <i>Fragaria</i> L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes" Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A. , Ainouche, A., Ainouche, M.L., Olbricht, K., Staudt, G., Richard, L., and Denoyes-Rothan, B. (2009).....	281

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 1 sur 9

1. Objet et domaine d'application

Ce protocole a pour but de décrire les étapes nécessaires à la:

- ⇒ réalisation de l'insertion d'un fragment d'ADN double brin au sein du vecteur de clonage pGEM[®]-T.
- ⇒ transformation de bactéries thermocompétentes (souches d'E.Coli).
- ⇒ sélection des bactéries recombinantes.
- ⇒ conservation des bactéries ainsi transformées.

2. Documents de référence

Guide d'utilisation du kit de clonage pGEM[®]-T Vector Systems (Promega).

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Diffusable à tout le monde.

4. Hygiène et sécurité

- La manipulation des bactéries doit se faire en condition stérile sous une hôte à flux laminaire vertical, à proximité d'une flamme (le port des gants en latex est proscrit), les mains lavées à l'éthanol à 70%.
- Toutes les autres manipulations de ce protocole nécessitent le port d'une blouse et de gants.
- Autoclaver les solutions contaminées par les bactéries.
- Jeter dans les poubelles réservées aux déchets biologiques tout le matériel souillé.

5. Principe de la méthode

Système dédié au clonage de produits PCR:

- ⇒ le vecteur pGEM[®]-T est coupé par une enzyme de restriction (Eco RV).
- ⇒ des nucléotides de type "thymidine" sont alors ajoutés à chaque extrémité pour améliorer l'efficacité de la ligation du produit PCR (jusqu'à quelques kb).
- ⇒ au sein des plasmides, les vecteurs contiennent à la fois un gène de résistance à l'ampicilline et les promoteurs des ARN polymérases flanquant notamment la région codante pour l' α -peptide de la β -galactosidase. L'ajout de X-gal et d'IPTG au sein des boîtes agar-LB (+ ampicilline) permet d'identifier par leur couleur les clones recombinés (insertion du produit PCR) qui présentent un α -peptide inactivé. Les colonies sont blanches pour les clones recombinés et bleues* pour les non-recombinés.

N.B.: la β -galactosidase produit une coloration bleue en présence de X-gal et d'IPTG.*

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 2 sur 9

6. Matériels nécessaires

- tubes (type Eppendorf) de 0,5 ml
- centrifugeuse de paillasse
- tubes (type Eppendorf) de 1,5 ml
- bac à glace
- bain-marie à 42°C
- agitateur à 37°C
- boîtes de Petri
- pipette en verre (thermoformée en rateau) pour étalement sur boîte
- étuve à 37°C
- Parafilm[®]
- pointes de pipette blanche, plaques PCR 96 puits et couvercles stériles
- films adhésifs stériles pour plaque 96 puits

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

° Solution stock IPTG à 0,1M:

- ⇒ peser 0,24 g d'IPTG (IPTG, Dioxane-Free, réf. Cat. V3955, 1 g, Promega).
- ⇒ compléter avec de l'eau MilliQ, volume final de 10 ml.
- ⇒ filtrer en 0,2 µm stérilement.
- ⇒ aliquoter en tubes de 1,5 ml et conserver à + 4°C (ou - 20°C).

° Solution stock X-Gal à 50 mg/ml:

- ⇒ peser, à l'abri de la lumière, 100 mg de 5bromo-4chloro-3méthyl-B-D-galactoside (X-GAL, réf. cat. GCGXA00-6X, 5 g, Eurobio) à dissoudre dans 2 ml d'eau MilliQ.
- Rq: l'eau MilliQ a remplacé le N,N'diméthyl formamide, toxique (voir fiche n° 69 de l'INRS).
- ⇒ aliquoter en tubes de 2 ml recouvert de papier aluminium avec 500 µl de la solution et conserver à - 20°C.

° Boîtes de Petri avec milieu LB + Ampicilline:

- ⇒ pour 500 ml d'eau MilliQ, dans un flacon à bouchon bleu de 1 litre, mélanger 10 g de milieu LB déjà prêt (contenant 5 g de tryptone, 2,5 g d'extrait de levure et 2,5 g de NaCl).
- ⇒ ajouter 7,5 g d'agar (solution à 15 g/litre de LB).
- ⇒ passer le tout à l'autoclave, bouchon à demi vissé.
- ⇒ laisser refroidir le milieu à température ambiante jusqu'à ce que celle-ci avoisine les 50°C.

N.B.: Se placer en conditions stériles, sous hôte à flux laminaire vertical, près de la flamme, mains lavées à l'alcool à 70%.

- ⇒ ajouter 1ml d'ampicilline à 50 mg/ml (concentration finale à 100 µg/ml).
- ⇒ couler le milieu LB dans des boîtes de Petri (25 à 30 ml par boîtes).
- ⇒ laisser refroidir les boîtes jusqu'à solidification du milieu et conserver les boîtes à + 4°C (milieu orienté vers le haut afin d'éviter la condensation).

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 3 sur 9

° Boîtes de Petri avec milieu LB + ampicilline + IPTG + X-Gal:
 ⇒ l'ajout de 100 µl de solution stock d'IPTG et de 40 µl de solution stock de X-Gal se fera en même temps que l'étalement des bactéries sur le milieu.

° Solution SOC:

- ⇒ dans un flacon à bouchon bleu, mettre 4 g de milieu LB dans 97 ml d'eau MilliQ; passer à l'autoclave.
- ⇒ ajouter 1 ml de Mg₂₊ 2M (pour la solution stock, prendre 20,33 g de MgCl₂-6H₂O et 24,65 g de MgSO₄-7H₂O et compléter à 100 ml avec de l'eau MilliQ; filtrer en 0,2 µm stérilement).
- ⇒ ajouter 1 ml de glucose 2M (filtré stérile).
- ⇒ compléter à 100 ml avec de l'eau MilliQ.
- ⇒ filtrer le milieu complet en 0,2 µm.

° Glycérol à 50% autoclavé

° Ampicilline à 50 mg/ml (aliquotée et congelée)

° Kit de ligation: pGEM[®]-T Vector System I, de Promega ; réf. Cat.: A3600

Composition du kit (pour 20 réactions): - pGEM[®]-T Vector à 50 ng/µl (1,25 µg dans 25 µl)

- Control Insert DNA (12 µl)
- T4 DNA Ligase (100 U, 3U/µl)
- 2X Rapid Ligation Buffer (200 µl)

A noter: il existe une seconde référence, pGEM[®]-T Vector System II, de Promega ; réf. Cat.: A3610 ; ce kit inclus 6 x 200 µl de bactéries compétentes.

° Glace

8. Contraintes de la méthode

- Pour optimiser la ligation, on peut toujours se référer au ratio insert:vecteur (3:1).
- Bien respecter les conditions du choc thermique (préchauffage du bain-marie, timing).

9. Contenu du mode opératoire

Préambule:

-1/ la ligation avec le vecteur pGEM[®]-T peut se faire avec:

- un produit PCR
- un produit PCR purifié (cf. mode opératoire dédié)

Dans le cas d'un produit PCR purifié, un traitement supplémentaire s'impose :

- ⇒ rajout de dATP: dans un tube de 200 µl stérile, délivrer - 7 µl de produit PCR purifié
 - 1 µl de tampon Sigma 10X
 - 1 µl de dATP 2mM
 - 1 µl de Taq Sigma → volume final: 10 µl

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM®-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 4 sur 9

- ⇒ sur un thermocycleur, laisser 25 minutes à 70°C (élongation).
- ⇒ ramener le volume final à 4 µl en passant le tube au Speed-Vac (chaleur sur *Medium*, entre 4 à 6 minutes, en contrôlant le volume régulièrement).
- ⇒ pour la suite du protocole, on peut augmenter le taux de réussite de ligation en passant les produits PCR (purifiés ou non) sur le thermocycleur 5 min à 65°C.

1^{er} jour:

° Ligation du vecteur pGEM®-T avec un produit PCR:

- ⇒ préparer un tube de 0,5 ml par ligation (le faible volume réduit l'adhésion de l'ADN aux parois du tube).
- ⇒ décongeler le tampon et le vecteur ; placer dans la glace.
- ⇒ vortexer vigoureusement le 2X Rapid Ligation Buffer avant chaque utilisation.
- ⇒ centrifuger brièvement le tampon et le vecteur.
- ⇒ dans le tube de 0,5 ml, et pour un volume final de 5 µl, mettre:
 - 2,5 µl de 2X Rapid Ligation Buffer
 - 0,5 µl de vecteur pGEM®-T
 - 1,5 µl de produit PCR*
 - 0,5 µl de T4 DNA Ligase
- ⇒ homogénéiser le milieu de ligation par pipetage.
- ⇒ incuber 1 heure à température ambiante, ou, de préférence, une nuit à + 4°C.

N.B.: afin d'optimiser la réaction de ligation, il faut que le ratio insert:vecteur soit proche de 3:1 ; la quantité de produit PCR (insert) à mettre est de:

$$\frac{(\text{ng de vecteur} \times \text{taille de l'insert en kb}) \times \text{ratio insert:vecteur}}{\text{taille du vecteur en kb}} = \text{ng d'insert}$$

exemple: produit PCR de 550 pb (0,55kb), et vecteur de 3,0 kb

$$\text{ng d'insert} = \frac{(25 \text{ ng} \times 0,55 \text{ kb}) \times 3}{3,0 \text{ kb}} = 25 \times 0,55 = 13,75$$

Rq.:* le produit PCR peut être issu d'ADN récupéré après migration sur gel d'acrylamide (frais ou sec).
 ⇒ voir protocoles dédiés

2^{ème} jour (fin de matinée):

° Transformation des bactéries par choc thermique:

- ⇒ sortir le nombre nécessaire de boîtes de Petri "LB + Agar + Ampic" (stockées à + 4°C) et les laisser à température ambiante.
- ⇒ allumer le bain-marie programmé sur 42°C (un contrôle de cette θ° doit être effectué avant l'étape du choc thermique).
- ⇒ allumer l'agitateur à 37°C.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 5 sur 9

- ⇒ centrifuger brièvement les tubes de ligation afin de bien récupérer tout le volume.
- ⇒ transférer 2 µl de produit de ligation dans un tube stérile de 1,5 ml; mettre dans la glace.
- ⇒ sortir autant d'aliquotes de bactéries compétentes que de ligations; laisser 5 minutes dans la glace.
- ⇒ sous la hotte, transférer doucement les 200 µl de bactéries compétentes fraîchement décongelées dans le tube de 1,5 ml contenant le produit de ligation.
- ⇒ homogénéiser le milieu en tapotant délicatement le tube; placer dans la glace 20 minutes.
- ⇒ faire subir aux bactéries un choc thermique en les plaçant 45 à 50 secondes dans le bain-marie à 42°C; NE SURTOUT PAS REMUER !
- ⇒ remettre immédiatement les tubes dans la glace 2 min.
- ⇒ sous la hotte, ajouter dans chaque tube 950 µl de milieu SOC à température ambiante.
- ⇒ mélanger l'ensemble par retournements et faire un petit pulse.
- ⇒ placer les tubes sur un portoir incliné dans l'agitateur à 37°C.
- ⇒ laisser incuber 1H30 (appareil programmé sur 150 RPM).

2^{ème} jour (début d'après-midi):

° Etalement sur boîte de Petri:

- ⇒ stopper l'incubation.
- ⇒ centrifuger les tubes à 4000 tours pendant une minute; rajouter 30 secondes si le culot obtenu est faible.
- ⇒ placer les tubes dans la glace ainsi que l'IPTG et le X-Gal congelés (estimer les besoins en quantité).
- ⇒ sous la hotte, dans un bécher contenant de l'alcool à 96%, éliminer une partie du surnageant: ne garder que 50 à 100 µl pour concentrer le culot.
- ⇒ remettre le culot en suspension en tapotant le fond du tube; laisser en attente dans la glace.
- ⇒ identifier les boîtes de Petri (date, nom du gène ou du marqueur, nom de l'espèce ou du génotype).
- ⇒ préparer un bécher contenant de l'alcool à 96% propre.
- ⇒ avant chaque étalement, nettoyer la pipette en verre à l'alcool et la passer à la flamme; laisser refroidir un peu.
- ⇒ près de la flamme, délivrer dans chaque boîte:
 - 100 µl d'IPTG
 - 40 µl de X-Gal (bien l'homogénéiser à chaque fois)
 - la totalité du culot bactérien resuspendu (maximum 100 µl)
- ⇒ étaler sur l'ensemble de la boîte jusqu'à épuisement complet.
- ⇒ après étalement, refermer et retourner la boîte, le milieu de culture présenté vers le haut (la condensation de gouttes d'eau pouvant provoquer la contamination de colonie à colonie).

3^{ème} jour (le matin, en arrivant):

- ⇒ afin d'accentuer la coloration bleue, placer les boîtes 1 heure à + 4°C.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM®-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 6 sur 9

3^{ème} jour (suite):

° Isolation des colonies de bactéries recombinantes:

- La sélection des colonies recombinantes se fait sur le principe de **double sélection**:

⇒ 1/ le vecteur pGEM®-T possède un gène de résistance à l'ampicilline; de ce fait, seules les colonies issues de bactéries ayant intégré le vecteur lors de la transformation seront capables de pousser sur le milieu pourvu d'ampicilline.

⇒ 2/ le vecteur pGEM®-T possède le gène de la β -galactosidase qui produit une coloration bleue en présence de X-gal et d'IPTG. Le vecteur est linéarisé au milieu de la séquence de ce gène avant la ligation avec l'insert; de ce fait, seules les colonies ayant intégré le vecteur recombinant seront dépourvues de l'activité β -galactosidase et seront sélectionnées pour leur absence de coloration bleue.

- Cette étape décrit la préparation de la plaque PCR visant à vérifier la présence de l'insert voulu au sein de la colonie.

⇒ repérer les bactéries recombinées en les entourant et en les numérotant.

⇒ après avoir défini le nombre de clones potentiels (voir tableau 2, page suivante):

1/ imprimer et préparer le plan de la plaque (96 puits) de repiquage.

2/ préparer un mélange de milieu LB/glycérol/ampicilline dans un tube de 50 ml (voir tableau 1 ci-dessous), sachant qu'il y a, pour 1 ml de mélange, 848 μ l de milieu LB, 150 μ l de glycérol et 2 μ l d'ampicilline, et qu'il faut 100 μ l de ce mélange par puits.

Tableau 1:

nombre de plaques 96 puits	nombres de repiquages (marge incluse)	Volume final	Milieu LB	Glycérol	Ampicilline
3	300	30 ml	25,44 ml	4,5 ml	60 μ l
2	200	20 ml	16,96 ml	3,0 ml	40 μ l
1	110	11 ml	9,32 ml	1,65 ml	22 μ l
1/2 (48 puits)	60	6 ml	5,08 ml	0,9 ml	12 μ l

⇒ annoter la plaque PCR de 96 puits.

⇒ délivrer 100 μ l du mélange par puits; quand c'est possible, laisser un puits témoin négatif.

⇒ prélever une colonie à l'aide d'une pointe blanche de pipette; la déposer dans un puits.

⇒ après avoir complété une colonne de 8 puits, jeter une à une les pointes dans une poubelle spécifique aux déchets biologiques.

⇒ procéder boîte par boîte.

⇒ quand une plaque est terminée, refermer avec un couvercle en plastique stérile (surtout ne pas mettre de film adhésif).

⇒ mettre à l'étuve à 37°C toute la nuit.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 7 sur 9

N.B.: le nombre de bactéries à récupérer variera selon de niveau de ploïdie:

Tableau 2:

niveau de ploïdie	nombre minimal de colonies (clones) à repiquer	haplotypes recherchés
2n = 2x	24	2 (au maximum)
2n = 4x	48	4 (au maximum)
2n = 6x	72	6 (au maximum)
2n = 8x	96	8 (au maximum)

4^{ème} jour:

o Vérification de la présence des fragments clonés et de leurs tailles:

⇒ 2 possibilités pour la PCR de contrôle: 1/ utiliser les amorces ayant servi pour la PCR de départ.
 2/ utiliser les amorces SP6 et T7 qui s'hybrident avec le vecteur pGEM[®]-T, en bordure de la zone de ligation; dans ce cas, rajouter 180 pb à la taille du fragment initial.

- Préparation du mix: volume final de 10 µl

	[C] Initiale	[C] finale	VF 10 µl
H2O qsp			7,11
Tampon	10X	1X	1,0
MgCl ₂ dans Tp	25 mM	1,5 mM	0
dNTP	5 mM	0,2 mM	0,40
Amorce SP6 (par ex.)	10 µM	0,2 mM	0,20
Amorce T7 (par ex.)	10 µM	0,2 mM	0,20
Taq Sigma	5 U/µl	0,05 U/µl	<u>0,09</u>
MIX			9 µl
ADN (repiquage)			1,00

- Programme PCR: sur appareil *Applied BioSystems 9700*, conditions VMax

Annealing: 55°C

94°C	6 min	} 35 cycles
94°C	45 sec	
55°C	45 sec	
72°C	1 min 30 sec	
72°C	5 min	
15°C	∞	

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 8 sur 9

Rq: la 1^{ère} dénaturation est majorée à 6 minutes afin de lyser les bactéries.

⇒ lorsque le mix est terminé et distribué, se placer sous la hotte avec la plaque 96 puits cultivée et délivrer les échantillons dans le mix (plaque PCR et plaque de bactéries dans la glace).

⇒ refermer la plaque 96 puits avec un film adhésif stérile puis rajouter le couvercle de la plaque; conserver la plaque à -20°C ou -80°C.

⇒ recouvrir la plaque PCR avec un film *Easy Peel* thermo-soudé.

⇒ vortexer la plaque et centrifuger quelques secondes.

⇒ lancer le programme PCR (durée de la PCR: 2H25).

⇒ le contrôle de l'amplification se fait sur gel d'agarose à 1,5% avec 3 µl de produit PCR et 3 µl de bleu de migration 1X.

5^{ème} jour:

◦ Réamplification des clones pour envoi séquençage:

- Préparation du mix: volume final de 45 µl

	[C] Initiale	[C] finale	VF 45 µl
H2O qsp			35,67
Tampon	10X	1X	4,5
MgCl2 dans Tp	25 mM	1,5 mM	0
dNTP	5 mM	0,2 mM	1,8
Amorce SP6 (par ex.)	10 µM	0,2 mM	0,90
Amorce T7 (par ex.)	10 µM	0,2 mM	0,90
Taq Sigma	5 U/µl	0,05 U/µl	<u>0,23</u>
MIX			44 µl
ADN (repiquage)			1,00

N.B.: programme PCR identique.

⇒ en fin de préparation de mix (avant l'ajout des amorces), sortir les plaques de cultures pour les décongeler.

⇒ une fois décongelées, centrifuger les plaques quelques secondes.

⇒ sous la hotte, retirer délicatement le film adhésif.

⇒ délivrer les échantillons dans le mix de la plaque PCR (plaque PCR et plaque de bactéries dans la glace).

⇒ mettre ensuite un nouveau film adhésif stérile avant de reconditionner les plaques de culture à -20°C.

⇒ recouvrir la plaque PCR avec un film *Easy Peel* thermosoudé.

⇒ vortexer la plaque et centrifuger quelques secondes.

⇒ lancer le programme PCR (durée de la PCR: 2H25)

⇒ le contrôle de l'amplification se fait sur gel d'agarose à 1,5% avec 3 µl de produit PCR et 3 µl de bleu de migration 1X.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Protocole de transformation bactérienne avec le vecteur de clonage pGEM[®]-T	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/07 Page 9 sur 9
---	---	---

Rq1: les clones réamplifiés pourront être envoyés au séquençage (Genome Express, site internet: www.gexbyweb.com), en prenant 40 µl de la PCR conditionnés dans un tube de 1,5 ml. Les tubes seront identifiés avec des pastilles adhésives incluant un code-barres (cf. CapMarker, disponible sur le site de Genome Express).

Rq2: afin d'obtenir les 2 haplotypes (+ de 95% de chance) chez une espèce diploïde, il est nécessaire de séquencer 6 clones; ces haplotypes peuvent se différencier par leur taille (sur gel d'agarose, ou gel d'acrylamide en conditions dénaturantes) ou par leur structure secondaire (migration en gel d'acrylamide non dénaturant ⇒ SSCP).

Nom : Fonction : Visa :	Rédacteur Laurent RICHARD Technicien de Recherche	Vérificateur <i>Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN</i> <i>Doctorant</i>	Approbateur <i>Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN</i> <i>Doctorant</i>
-------------------------------	---	---	--

	Mode Opérateur Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; Coloration au nitrate d'argent	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/09 Page 1 sur 7
---	---	---

1. Objet et domaine d'application

- Séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide (dénaturant ou non) de fragments d'ADN amplifiés par PCR.
- Marquage moléculaire pour le génotypage d'individus.

2. Documents de référence

Bassam *et al.* (1991) – Analytical Biochemistry 196, 80-83.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Utilisateurs du laboratoire de biologie moléculaire.

4. Hygiène et sécurité

La plupart des produits utilisés dans ce protocole sont toxiques pour l'homme et l'environnement.

- ⇒ porter une blouse et des gants (changer de gants après toute manipulation directe avec l'acrylamide ou le nitrate d'argent).
- ⇒ porter des lunettes de protection durant toute manipulation de l'acrylamide (préparation et coulage du gel).
- ⇒ la préparation de la solution d'acrylamide et le traitement des plaques se font sous la hotte.
- ⇒ le coulage du gel s'effectue sur la paillasse dans un bac blanc de protection.
- ⇒ tous les déchets souillés par de l'acrylamide doivent être récupérés dans la poubelle prévue à cet effet.
- ⇒ la solution de nitrate d'argent est récupérée dans un bidon spécifique.

5. Principe de la méthode

Un gel de polyacrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse de biomolécules, telles que les protéines ou les fragments d'ADN. Les techniques traditionnelles de séquençage de l'ADN telles que les méthodes de Maxam-Gilbert ou de Sanger utilisent les gels de polyacrylamide pour séparer des fragments d'ADN : ceux-ci possèdent un pouvoir résolutif de 1 paire de bases.

Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition. Ils sont constitués d'acrylamide qui est l'unité de base et de bisacrylamide (N,N' méthylène-bisacrylamide) qui est l'agent pontant. En fonction des différents taux de ces deux substances, on obtient différents maillages et donc différentes densités de gels. La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le TEMED (N,N,N',N'-TEtraMéthylEthylèneDiamine) et le persulfate d'ammonium (APS) qui, en réagissant avec la lumière, deviennent des anions hyper réactifs enclenchant la polymérisation.

Les fragments d'ADN séparés sont ensuite révélés grâce à une coloration au nitrate d'argent.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; Coloration au nitrate d'argent	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/09 Page 2 sur 7

6. Matériels nécessaires

- 2 plaques en verre (une grande plaque et une plaque "oreilles")
- tube eppendorf de 2 ml
- 2 espaceurs
- 1 peigne (3 modèles : 46, 62 et 94 dents)
- 4 pinces noires
- 3 grosses pinces (oranges et noires)
- papier absorbant
- 1 seringue de 50 ml
- un erlenmeyer de 100 ml
- un bécher de 100 ml
- une éprouvette de 100 ml
- Parafilm
- bac à glace
- pipettes (multicanaux ou non)
- générateur à électrophorèse Bio-Rad Power Pac 3000
- cuve verticale pour électrophorèse
- thermocycleur
- plaque PCR
- film *Easy Peel*
- Thermosoudeuse
- centrifugeuse
- pointes de pipettes

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

- Ethanol à 96% 
- Rain X  
- Bind Silane 
- Solution éthanol absolu-0,5% acide acétique 
- Acrylamide/bis acrylamide, solution stock à 40%, ratio 19/1 (gel dénaturant) 
- Acrylamide/bis acrylamide, solution stock à 40%, ratio 37,5/1 (gel non dénaturant) 
- Urée
- TBE 10X
- Eau MilliQ stérile
- TEMED.  
- APS 10% (aliquotes de 850 µl, pour 2 gels)  
- Glace
- Carbonate de Sodium (NaCO_3) 
- Acide acétique glacial 
- Bleu de charge  avec formamide 
- Ladder 10pb
- Nitrate d'argent (AgNO_3), 1 tube de 1,5 g  
- Formaldéhyde  
- Thiosulfate de Sodium à 10mg/ml 

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; Coloration au nitrate d'argent	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/09 Page 3 sur 7
---	---	---

8. Contraintes de la méthode

- Les contraintes sont essentiellement liées aux conditions de température ambiante. Lorsqu'il fait chaud, la polymérisation du gel est assez rapide (45 min). Dans des conditions de forte chaleur, il est conseillé de placer la préparation à couler dans de la glace. A l'inverse, lorsqu'il fait plus frais, le temps de polymérisation est plus long. Un fond de gel, laissé dans le bécher de départ, peut donner une indication sur la polymérisation.
- Pour une électrophorèse en gel non dénaturant, installer le matériel en chambre froide.

9. Contenu du mode opératoire

° Préparation des plaques en verre

NB : les plaques auront été préalablement bien nettoyées et rincées à l'eau osmosée.

1/ Plaque "oreilles" :

- ⇒ poser la plaque sur 2 portoirs blancs.
- ⇒ à l'aide de papiers absorbants, bien nettoyer la plaque avec de l'éthanol 96% (au moins 2 fois).
- ⇒ verser un peu de Rain X sur la plaque et l'étaler sans appuyer du papier absorbant.
- ⇒ laisser sécher 10 minutes.
- ⇒ nettoyer doucement la plaque avec un papier absorbant sec, ou mouillé avec de l'eau MilliQ.

2/ Grande plaque : travailler sous la hotte

- ⇒ bien nettoyer la plaque avec de l'éthanol 96%.
- ⇒ dans un tube eppendorf de 2 ml, préparer :
 - 1,5 ml de solution éthanol absolu/0,5% acide acétique (sur paillasse, à θ° ambiante)
 - 7,5 μ l de Silane (sur paillasse, à θ° ambiante)
- ⇒ étaler rapidement avec un papier.
- ⇒ laisser sécher 5 minutes.
- ⇒ nettoyer doucement la plaque avec un papier imbibé d'eau MilliQ (ou d'éthanol 96%, mais avec beaucoup de précautions)

° Montage des plaques

- ⇒ préparer 2 espaceurs de 4 mm et un peigne (46, 62 ou 94 dents)
- ⇒ poser la grande plaque sur 2 portoirs blancs, face traitée au dessus.
- ⇒ placer les 2 espaceurs de chaque côté de la plaque; les laisser dépasser d'environ 4 mm au niveau du "haut" de la plaque.
- ⇒ poser la plaque "oreilles", face traitée à l'intérieur, sur les spacers; rectifier la position des spacers si besoin.
- ⇒ disposer 2 pinces noires de chaque côté (les plus souples en haut des plaques), juste à la limite du spacer (côté interne).
- ⇒ vérifier que le peigne se glisse facilement entre les 2 plaques avant de couler le gel ; si nécessaire, utiliser des pinces + ou - souples, ou modifier leur position.
- ⇒ surélever légèrement le haut de l'ensemble avec un dispositif adapté pour faciliter la diffusion du gel entre les plaques.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; Coloration au nitrate d'argent	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/09 Page 4 sur 7

° Préparation du gel

Rq : décongeler le Persulfate d'Ammonium (aliquotes stockés à -20°C).

1/ Gel non dénaturant : (technique de SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism)

⇒ Préparation d'un gel d'acrylamide à 8,0% :

Dans une éprouvette :

- Préparer 100 ml de gel : 5 ml TBE 10X (0,5X final)
 20 ml Acrylamide/Bis acrylamide solution à 40% (ratio 37.5/1)
 75 ml Eau milliQ

2/ Gel dénaturant :

⇒ Préparation d'un gel à 4,5% d'acrylamide final (fragments > 250 pb) :

Urée 10M (en solution) :	75 ml
Acrylamide 40% (ratio 19/1) :	11,25 ml (15ml pour du 6%)
TBE 10X :	10 ml (1X final)
Eau MilliQ	QSP 100 ml

- Parafilmer et mélanger le tout par retournement.
- Transférer dans un erlen.
- Ajouter **400 μl** de Persulfate d'Ammonium; mélanger en remuant.
- Ajouter **80 μl** de TEMED; mélanger en remuant.
- Transvaser le mélange dans un béccher (éventuellement mettre dans la glace pour éviter une polymérisation trop rapide, en été par exemple).

° Coulage du gel

⇒ préparer 3 grosses pinces et une seringue de 50 ml; disposer du papier absorbant sous chaque coin de plaque.

⇒ charger la seringue.

⇒ vider la seringue entre les 2 plaques, en commençant à droite et en balayant de gauche à droite continuellement pour éviter la formation de bulles d'air.

⇒ quand le gel arrive en bas, enlever le dispositif qui surélevait les plaques et les remettre à plat.

⇒ finir de remplir avec le gel en étant généreux au niveau de la jonction "plaque/peigne" et des coins.

Rq : s'il y a une bulle, la retirer avec un spacer ou un peigne glissé entre les plaques.

⇒ placer le peigne à l'envers jusqu'au trait noir.

⇒ répartir les 3 grosses pinces au niveau du peigne (attention de ne pas abîmer les dents); rajouter du gel si besoin.

La polymérisation prend en moyenne 1 heure; si on utilise le gel le lendemain, l'emballer avec du papier humide au niveau du peigne après polymérisation.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; Coloration au nitrate d'argent	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/09 Page 5 sur 7
---	---	---

° Montage des plaques pour le pré-run

- ⇒ retirer les pinces et le peigne.
- ⇒ laver les plaques à grande eau; enlever toute trace d'urée.
- ⇒ bien rincer le puits avec l'eau osmosée (appuyer sur le bout du tuyau pour faire pression) et enlever l'urée* (gels dénaturants*) et d'éventuels fragments d'acrylamide.
- ⇒ fixer les 2 cuves d'électrophorèse sur la potence (les électrodes doivent être du même côté).
- ⇒ placer et centrer les plaques sur la potence (plaque "oreilles" derrière); fixer l'ensemble avec 4 pinces noires aux emplacements requis.
- ⇒ fixer sur le haut des cuves la barre de pression à vis (ne pas serrer trop fort).
- ⇒ préparer 1 litre de TBE 1X, pour une migration en gel dénaturant.
TBE 0,5X, pour une migration en gel non dénaturant.
- ⇒ verser 350 ml dans la cuve du bas et 650 ml dans la cuve du haut.
- ⇒ ramener les spacers vers l'intérieur, l'un après l'autre (pour plus de facilités, desserrer un peu la barre, d'un côté, puis de l'autre).
- ⇒ resserrer et vérifier qu'il n'y a pas de fuites.
- ⇒ nettoyer à nouveau le haut du gel avec une pipette pour enlever l'urée.
- ⇒ recouvrir les cuves avec leur couvercle ; relier les électrodes au générateur (rouge/rouge ; noir/noir).

° Pré-run

- Programmation du générateur : - appuyer sur la touche *Manuel*
- appuyer sur la touche *Constant Watt* :
⇒ entrer 80W pour un gel dénaturant (160W pour 2 gels)
⇒ entrer 40W pour un gel non dénaturant (80W pour 2 gels)
- lancer le pré-run (avec la touche symbolisée par un personnage qui court) pendant 30 minutes.

N.B. : le voltage doit s'équilibrer entre 1400 et 2000V pour un gel dénaturant et autour de 1600V pour un gel non dénaturant

° Run

Dépôts et migration :

- ⇒ sous la hotte, la plaque de dépôts aura été préparée au préalable (mélange et rapport PCR/bleu de formamide : 0,75 ; 1 ; 2), ainsi que la feuille de route (ordre des dépôts).
- ⇒ dénaturer la plaque 5 minutes à 94°C (programme 94°C, valider *Proceed* 3 fois) ; mettre dans la glace. A noter : il est inutile de dénaturer le 10 pb ladder.
- ⇒ pendant ce temps, arrêter le pré-run avec la touche *Pause* (symbolisée par une main).
- ⇒ nettoyer à nouveau la ligne de base avec la pipette (enlever l'urée, les bulles).
- ⇒ desserrer un peu la barre pour mieux placer le peigne; les dents doivent affleurer la ligne de base du gel; s'aider éventuellement d'un fond noir pour mieux visualiser la ligne de base.
- ⇒ déposer le volume approprié (pipette simple ou multicanaux ; 4 µl pour les peignes 62 dents, 2 µl pour les 94). Pour les dépôts par vague, 15 minutes entre chaque série de dépôts correspondent à 10 pb sur le gel.
- ⇒ lancer le Run (en réappuyant sur la touche *Personnage*) :
- migrer environ 3 heures à 80W pour 1 gel dénaturant.
- migrer 10 minutes à 80W, puis toute la nuit à 6W pour 1 gel non dénaturant.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

	Mode Opérateur Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; Coloration au nitrate d'argent	Réf. : Version 1 Laurent date : 22/10/09 Page 7 sur 7

- ⇒ sortir le gel du bac "nitrate"; le placer dans le bac de rinçage en remuant **10 secondes** exactement.
- ⇒ mettre le gel dans le bac blanc et surveiller l'apparition des bandes.
- ⇒ pendant ce temps, replacer la solution de Fix/Stop dans un bac gris.
- ⇒ quand la bonne intensité est obtenue, mettre le gel dans la solution de Fix/Stop 5 min.
- ⇒ préparer un dernier bac d'eau de rinçage (3 litres) et rincer le gel 5 minutes.
- ⇒ égoutter le gel et le laisser sécher debout.

Le gel, une fois complètement sec, pourra être scanné dès le lendemain.

° Nettoyage

- La solution d'AgNO₃ doit être récupérée et versée dans le bidon prévu à cet effet. On ajoutera une pincée de NaCl pour le faire précipiter. Après précipitation, quelques jours plus tard, la solution pourra être vidée dans l'évier via le robinet du bidon.
- Les bacs qui ont été en contact avec le nitrate d'argent seront rincés à la javel puis à l'eau.
- Nettoyer toutes les paillasses et le sol à l'eau de javel en fin de technique (décolorant anti-AgNo₃).

° Numérisation du gel (scannage)

- ⇒ lorsque le gel a séché (attendre 12 heures), la plaque (support du gel) peut être numérisée via un scanner au format A3.
- ⇒ mettre 4 bouts de liège sur la vitre du scanner Epson Expression 10000XL. Déposer la plaque, gel vers la vitre. Poser le cache blanc sur le dessous du couvercle. Refermer.
- ⇒ ouvrir le logiciel "EPSON Scan".
- ⇒ dans la fenêtre qui s'ouvre, vérifier ou appliquer les paramètres suivants :
 - pour *Mode*, choisir *Mode Bureautique*
 - pour *Type d'image*, cocher *Niveaux de gris*.
 - pour *Taille*, choisir *A3*.
 - pour *Orientation*, c'est le mode *paysage* qui s'applique (à cause du format A3).
 - pour *Résolution*, choisir *400 dpi*.
- ⇒ sélectionner le dossier dans lequel sera enregistrée l'image ; pour cela, cliquer sur l'icône représentant un dossier placé à droite du bouton « Numériser » ; dans la fenêtre qui s'ouvre, cocher « Personnalisé ». Cliquer sur « Parcourir », puis « Poste de travail », « Documents partagés », « GEL ACRY » et enfin votre dossier (votre prénom, en règle générale). Cliquer sur « OK ».
- ⇒ cliquer sur le bouton « Aperçu » ; l'image de votre gel apparaît.
- ⇒ sélectionner la zone de scannage avec le pointeur de la souris.
- ⇒ cliquer sur le bouton « Numériser ». A la fin de la numérisation, le dossier dans lequel est enregistrée l'image s'ouvre.

Rq : l'image est sauvegardée au format jpg.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laurent RICHARD	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN	Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN
Fonction :	Technicien de Recherche	Doctorant	Doctorant
Visa :			

Couple d'amorces	allèle	état	Test Khi ²				Cartographie		
			Test 1/1	Test 3/1	Test 5/1	Test 7/1	M/F	HG	LG
EMFnCEL1-f/r	CEL1	0_1	0.641	0.000	0.000	0.000	M	IV	c
EMFnLOX1A-f/r	LOXI	1_0	0.079	0.000	0.000	0.000	F	IV	c
BFT009/010	B910225	1_0	0.119	0.000	0.000	0.000	F	II	a
	B910378	1_0	0.313	0.000	0.000	0.000	UL		
BFT017/018	B718163	1_0	0.054	0.000	0.000	0.000	F	II	a
	B718262	1_0d	0.002	0.000	0.000	0.000	F	VI	d
	B718340	1_0	0.313	0.000	0.000	0.000	UL		
BFT001/004	B104278	0_1	0.853	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
	B104252	0_1	0.134	0.000	0.000	0.000	M	V	a
	B104230	0_1	0.292	0.000	0.000	0.000	M	VII	c
BFT10/11	b011307	1_0	0.114	0.000	0.000	0.000	F	II	a
BxFT13 f/r	bx13A	1_0	0.357	0.000	0.000	0.000	F	IV	d
	bx13B	0_1	0.098	0.000	0.000	0.000	M	IV	d
	bx13C	0_1	1.000	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
	bx13D	0_1	0.644	0.000	0.000	0.000	M	IV	c
BxFT05 f/r	bx05	1_0	0.667	0.000	0.000	0.000	F	IV	b
BxFT18 f/r	bx18272	1_0	0.280	0.000	0.000	0.000	F	IV	d
	bx18270	1_0	0.194	0.000	0.000	0.000	F	IV	d
	bx18228	0_1	0.938	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
BxFT16 f/r	bx16228	1_0	0.219	0.000	0.000	0.000	UL		
	bx16206	0_1	0.262	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
ChFaM014 f/r	M014164	0_1	0.194	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
	M014160	0_1	0.194	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
UFFa1H05 f/r	u1H5251	1_0	1.000	0.000	0.000	0.000	F	IV	b
	u1H5249	1_0	0.875	0.000	0.000	0.000	F	IV	b
	u1H5247	0_1	0.070	0.000	0.000	0.000	M	IV	a
	u1H5245	1_0	0.753	0.000	0.000	0.000	F	IV	a
	u1H5237	0_1	0.000	0.000	0.002	0.047	UL		
Fvp2G07 f/r	B2G7288	1_0	0.389	0.000	0.000	0.000	F	IV	c
	B2G7280	0_1	0.072	0.000	0.000	0.000	M	IV	d
	B2G7276	1_0	0.695	0.000	0.000	0.000	UL		
Fvp2E09 f/r	B2E9188	0_1	0.389	0.000	0.000	0.000	M	II	a
	B2E9154	1_0	0.875	0.000	0.000	0.000	UL		

Annexe 3 : Liste des 14 couples d'amorces permettant de révéler 33 marqueurs 'simple dose' (SD) sur la population de cartographie octoploïde issue du croisement Capitola x CF1116. L'état 1_0 ou 0_1 (présent chez le parent femelle ou le parent mâle, respectivement) est précisé. La ségrégation de chaque marqueur a été testée avec un test de Khi² pour différents ratios de ségrégation (1:1 ; 3:1 ; 5:1 ; 7:1). La ségrégation observée correspond à la ségrégation attendue lorsque P>0,01. Le groupe de liaison où se cartographie chaque marqueur est indiqué (F ou M pour carte de liaison génétique femelle ou mâle, respectivement). Les marqueurs ne se regroupant pas dans un groupe de liaison sont indiqués par UL (unlinked).

	Nom de la bande	Etat	1:1	3:1	5:1	cartographie
ARSFL4	*ars4225	(1_0)	0,592	0,000	0,000	IV y f
	*ars4180c	(1_0)	0,666	0,000	0,000	IV x f
BFACT015	*b015278c	(0_1)	0,522	0,000	0,000	z m
	*b015206	(1_0)	0,163	0,000	0,000	
	*b015204	(0_1)	0,453	0,000	0,000	
BFACT32	*b032185	(1_0)	0,592	0,000	0,000	
	*b032180	(0_1)	0,329	0,000	0,000	
BFACT039	*b039206c	(0_1)	0,281	0,000	0,000	z m
	*b039198r	(0_1)	0,281	0,000	0,000	z m
	*b039178c	(1_0)	0,453	0,000	0,000	II b f
	*b039172	(1_0)	0,748	0,000	0,000	
	*b039170r	(1_0)	0,453	0,000	0,000	II b f
	*b039166	(1_0)	0,238	0,000	0,000	
BFACT041	*b041220c	(1_0)	0,659	0,000	0,000	IV y f
BFACT048	*b048268c	(0_1)	0,311	0,000	0,000	y m
	*b048260c	(1_0)	0,144	0,001	0,000	x f
	*b048248	(0_1)	1,000	0,000	0,000	
	*b048238r	(0_1)	0,000	0,796	0,089	y m
	*b048236r	(1_0)	0,655	0,000	0,000	x f
	*M21200	(0_1)	0,574	0,000	0,000	
ChFaM021	*M21198	(1_0)	0,910	0,000	0,000	
ChFaM036	*M36212	(1_0)	0,233	0,000	0,000	
	*M36194	(0_1)	0,233	0,000	0,000	
EMFv007	*v007400	(1_0)	0,001	0,131	0,000	
	*v007230c	(1_0)	0,335	0,000	0,000	IV x f
	*v007224c	(0_1)	0,286	0,000	0,000	x m
	*v007222r	(1_0)	0,281	0,000	0,000	IV x f
	*v007215r	(0_1)	0,286	0,000	0,000	x m
	*v007210c	(1_0)	0,522	0,000	0,000	IV z f
	*v007205c	(0_1)	0,453	0,000	0,000	II c m
	*v007171c	(1_0)	0,394	0,000	0,000	IV y f
EMFv008	*v008219r	(0_1)	0,394	0,000	0,000	x m
	*v008205c	(1_0)	0,286	0,000	0,000	IV x f
	*v008182c	(0_1)	1,000	0,000	0,000	II c m
	*v008175c	(1_0)	0,831	0,000	0,000	IV z f
EMFv023	*v023190c	(1_0)	0,211	0,001	0,000	VII b f
	*v023188r	(1_0)	0,211	0,000	0,000	VII b f
EMFvi102	*i102290c	(0_1)	0,914	0,000	0,000	II c m
	*i102285c	(1_0)	0,915	0,000	0,000	IV z f
	*i102224	(0_1)	0,748	0,000	0,000	
EMFvi132	*i132280c	(1_0)	1,000	0,000	0,000	IV z f
	*i132260c	(0_1)	0,831	0,000	0,000	II c m
Fvi20	*g020188	(1_0)	0,047	0,000	0,000	
	*g020162	(0_1)	0,912	0,000	0,000	
	*c005130	(1_0)	0,238	0,000	0,000	
	*c005108r	(0_1)	0,522	0,000	0,000	x m
	*c005105c	(1_0)	0,592	0,000	0,000	IV x f
BxFT048	*bx48340c	(1_0)	0,448	0,000	0,000	IV x f
	*bx48338r	(1_0)	0,329	0,000	0,000	IV x f
BxFT055	*bx55256	(1_0)	0,725	0,000	0,000	
	*bx55254c	(0_1)	0,558	0,000	0,000	II c m
BxFT056	*bx56236c	(1_0)	0,196	0,000	0,000	IV uk f
	*bx56222c	(0_1)	0,518	0,000	0,000	IV b f
	*bx56216c	(1_0)	0,914	0,000	0,000	IV y f
	*bx56206c	(1_0)	0,666	0,000	0,000	IV b f
BxFT058	*bx58248r	(1_0)	0,745	0,000	0,000	IV b f
BxFT059	*bx59350c	(1_0)	0,907	0,000	0,000	IV b f
	*bx59250c	(0_1)	0,419	0,000	0,000	IV c m
	*bx59238r	(1_0)	0,907	0,000	0,000	IV b f
	*bx59218r	(0_1)	0,419	0,000	0,000	IV c m
	*bx59216r	(1_0)	0,908	0,000	0,000	IV y f
	*bx59184c	(1_0)	0,419	0,000	0,000	IV uk f
BxFT060	*bx60288c	(1_0)	0,522	0,000	0,000	x f
BxFT063	*bx63240c	(1_0)	1,000	0,000	0,000	IV b f
	*bx63232r	(1_0)	1,000	0,000	0,000	IV b f
	*bx63224c	(1_0)	0,122	0,001	0,000	IV uk f
	*bx63900	(1_0)	0,269	0,000	0,000	
BxFT064	*bx64222r	(1_0)	0,913	0,000	0,000	IV b f
	*bx64216c	(1_0)	0,913	0,000	0,000	IV b f
	*bx64198c	(1_0)	0,513	0,000	0,000	IV y f
BxFT066	*bx66218c	(1_0)	0,377	0,000	0,000	IV uk f
	*bx66200r	(0_1)	0,008	0,000	0,000	x m
BxFT068	*bx68226c	(0_1)	0,748	0,000	0,000	IV c m
	*bx68218c	(1_0)	0,670	0,000	0,000	IV y f

Annexe 4 : Liste des 24 couples d'amorces permettant de révéler les 74 marqueurs 'simple dose' chez la population de cartographie octoploïde issue du croisement Mara des Bois x Pajaro. L'état 1_0 ou 0_1 (présent chez le parent femelle ou le parent mâle, respectivement) est précisé. La ségrégation de chaque marqueur a été testée avec un test de χ^2 pour différents ratios de ségrégation (1 : 1 ; 3 : 1 ; 5 : 1 ; 7 : 1). La ségrégation observée correspond à la ségrégation attendue lorsque $P > 0,01$. Le groupe de liaison où se cartographie chaque marqueur est indiqué (F ou M pour carte de liaison génétique femelle ou mâle, respectivement). Les marqueurs ne se regroupant pas dans un groupe de liaison sont indiqués par UL (unlinked).



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympev

Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes

M. Rousseau-Gueutin^a, A. Gaston^a, A. Aïnouche^b, M.L. Aïnouche^b, K. Olbricht^{c,1},
G. Staudt^d, L. Richard^a, B. Denoyes-Rothan^{a,*}

^aINRA, UR 419, Unité de Recherche sur les Espèces Fruitières, Domaine de la Grande Ferrade, 71 Avenue Edouard Bourlaux – BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France

^bCNRS, UMR 6553 Ecobio, Université de Rennes-1, Bât 14A, Campus scientifique de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France

^cJKI – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pflanzgarten Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

^dBächelhurst 10A, D- 79249 Merzhausen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2008

Revised 23 December 2008

Accepted 29 December 2008

Available online 4 January 2009

Keywords:

Fragaria

Polyploidy

Reticulate evolution

Low-copy nuclear genes

GBSSI

DHAR

Duplicated gene

ABSTRACT

Phylogenetic utility of two nuclear genes (*GBSSI-2* and *DHAR*) was explored in genus *Fragaria* in order to clarify phylogenetic relationships among taxa and to elucidate the origin of the polyploid species. Orthology of the amplified products was assessed by several methods. Our results strongly suggest the loss of one *GBSSI* duplicated copy (*GBSSI-1*) in the *Fragariinae* subtribe. Phylogenetic analyses provided new insights into the evolutionary history of *Fragaria*, such as evidence supporting the presence of three main diploid genomic pools in the genus and demonstrating the occurrence of independent events of polyploidisation. In addition, the data provide evidence supporting an allopolyploid origin of the hexaploid *F. moschata*, and the octoploids *F. chiloensis*, *F. iturupensis* and *F. virginiana*. Accordingly, a new pattern summarizing our present knowledge on the *Fragaria* evolutionary history is proposed. Additionally, sequence analyses also revealed relaxed constraints on homoeologous copies at high ploidy level, as demonstrated by deletion events within *DHAR* coding sequences of some allo-octoploid haplotypes.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polyploidy or whole genome duplication has long been recognized to be a major force in evolution (Ohno, 1970). This process has been observed in plants, invertebrates (Adamowicz et al., 2002; Curole and Hedgecock, 2005), lower vertebrates (Leggatt and Iwama, 2003; Holloway et al., 2006) and even humans (Gu et al., 2002; McLysaght et al., 2002; Spring, 2002; Panopoulou et al., 2003). Polyploidy is especially prevalent in plants, where it is known as a major speciation process that has recurrently affected various lineages (Otto and Whitton, 2000; Cui et al., 2006). In addition to the plethora of examples represented by polyploid complexes, all the sequenced plant genomes previously considered as “diploids” (e.g. *Arabidopsis*, rice, poplar or grape vine) have revealed superimposed traces of past genome duplication events (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Bowers et al., 2003; Paterson et al., 2004; Tuskan et al., 2006; The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007).

The success of polyploidy is mainly attributed to genetic and genomic causes involving higher genetic diversity and fixed heterozygosity at duplicated loci (Wendel, 2000; Comai, 2005), structural dynamics (Pontes et al., 2004; Chantret et al., 2005; Grover et al., 2007) and novel patterns of gene regulation and expression (Adams et al., 2003; Osborn et al., 2003; Salmon et al., 2005; Albertin et al., 2006; Keyte et al., 2006; Tate et al., 2006; Akhunov et al., 2007; Flagel et al., 2008). Polyploidy has important phenotypic consequences (Comai et al., 2000; Schranz and Osborn, 2004; Gaeta et al., 2007) that allow new polyploid species responding to natural (Brochmann et al., 2004; Soltis et al., 2004; Aïnouche et al., in press) and artificial (Paterson, 2005; Udall and Wendel, 2006) selection challenges.

Reconstructing the evolutionary history of plant polyploid species using molecular data has to deal with the presence and the evolutionary fate of multiple genes copies resulting from both individual gene duplication within a genome (i.e. paralogous) and whole-genome duplication in nuclear genomes (i.e. homoeologous). Identification of homoeologues in polyploids is critical for reliable phylogeny reconstruction, identification of parental lineages and mode of polyploid formation (auto versus allopolyploid) (Doyle et al., 2004; Popp and Oxelman, 2007; Fortune et al., 2008). In this context of polyploidy, the use of low-copy nuclear genes is

* Corresponding author. Fax: +33 5 57 12 24 39.

E-mail address: denoyes@bordeaux.inra.fr (B. Denoyes-Rothan).

¹ Present address: Hansabred Radeburger Landstrasse 12, D-01108 Dresden, Germany.

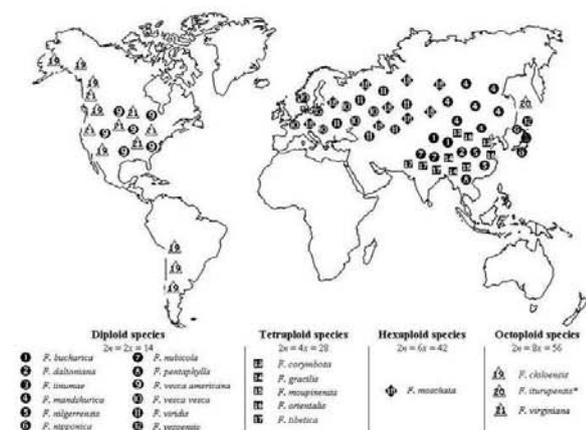


Fig. 1. Geographic repartition of *Fragaria* species and sub-species used in this study. The asterisk symbol indicates that two ploidy levels (octoploid and decaploid) have been reported for *F. iturupensis*.

of particular interest for reconstructing reticulate evolution since they are biparentally inherited (Small et al., 2004). Assuming retention of the duplicated copies, the sequences duplicated by polyploidy should be each other's closest relatives in an autopolyploid species or be distributed in different clades in an allopolyploid species (Wendel and Doyle, 1998; Fortune et al., 2007). Another significant advantage of low-copy nuclear genes is their elevated rate of sequence evolution relative to organellar genes (Small et al. 2004), which improve the resolution of relationships among low taxonomic levels (Álvarez and Wendel, 2003; Small et al., 1998, 2004; Ghiselli et al., 2007; Steele et al., 2008). In addition, these low-copy nuclear genes are less prone to concerted evolution than ribosomal DNA (rDNA) and are less homoplasious (Sang, 2002; Senchina et al., 2003; Lihová et al., 2006; Popp and Oxelman, 2007). However, these markers are still poorly exploited because of the difficulties in isolating and characterizing orthologous loci (Doyle et al., 2003; Small et al., 2004).

The genus *Fragaria* (Rosaceae) is comprised of a limited number of wild species (about 22, Staudt, 2008) ranging from diploids ($2n = 2x = 14$) to decaploids ($2n = 10x = 70$). An additional taxon is the main cultivated strawberry crop, *F. x ananassa* (8x), which originated following accidental hybridization between two New World octoploid strawberry species, *F. chiloensis* and *F. virginiana*. The wild species of *Fragaria* are distributed throughout the Holarctic zone with a few endemic zones into the tropics. All species are restricted to single continents or specific areas (Fig. 1), except the diploid species *F. vesca*, which is found in both Eurasia and America (Staudt, 1962, 1989). Ten diploid species are distributed in Eastern, South Eastern and Central Asia and the three others in Europe and Western Siberia (Staudt, 1962, 1989, 1999, 2003, 2005, 2006, 2008; Staudt and Dickoré, 2001; Staudt and Olbricht, in press). Five tetraploid species ($2n = 4x = 28$) are restricted to Eastern and South Eastern Asia (Staudt and Dickoré, 2001; Staudt, 2003), while the hexaploid species ($2n = 6x = 42$) occurs in Europe and Western Siberia (Staudt, 1962, 1989, 2008). Concerning the three octoploid species, one, *F. iturupensis*, is endemic to the Far East Asia (Southern Kurils) (Staudt, 1973, 1989; Staudt and Olbricht, in press) ($2n = 8x = 56$), and the two others, *F. chiloensis* and *F. virginiana*, are present in America with different distributions in South and North America (Staudt, 1962, 1989). Recently, a decaploid number ($2n = 10x = 70$) has been reported for three accessions of *F. iturupensis* originating from Mount Atsunupuri (Hummer et al., in press). Only two phylogenetic analyses have been performed to date in

Fragaria based on chloroplast (cp) DNA RFLPs (Harrison et al., 1997a) or combined sequence data sets from the cpDNA *trnL-trnF* region and the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) (Potter et al., 2000). However, due to a limited taxon sampling, and to a low level of sequence variation of these regions, few insights were provided with regard to the phylogenetic relationships among most *Fragaria* species.

In this paper, we explore the utility of two low-copy nuclear genes, *GBSSI-2* (or *Waxy*) and *DHAR* (Dehydro Ascorbate Reductase), to elucidate the evolutionary history of genus *Fragaria* (Rosaceae) and particularly the putative parental lineages of the polyploid species. The *GBSSI* gene has provided high phylogenetic resolution in several plant systems including polyploids (Ingram and Doyle, 2003; Smedmark et al., 2003; Mason-Gamer, 2001, 2004; Winkworth and Donoghue, 2004; Fortune et al., 2007, 2008). In the Rosaceae family, the *GBSSI* gene is present in two copies, *GBSSI-1* and *GBSSI-2*, which can be readily distinguished by specific indels (Evans et al., 2000; Evans and Campbell, 2002). The *DHAR* gene is known to be present in a few copies in flowering plants: one copy in *Oryza sativa* (Urano et al., 2000) and spinach (Shimaoka et al., 2000), two copies in tomato (Zou et al., 2006), and three active copies and a pseudogene in *Arabidopsis thaliana* (Dixon et al., 2002). In this latter species, the three active copies include two cytosolic copies, which are similar in sequence and structure, but differ from the third one (chloroplastic copy) by the number of introns. This gene is studied here for the first time in the Rosaceae family. The use of two independent nuclear loci and nearly all the wild *Fragaria* species increased the relevance and the confidence of our phylogenetic inferences and provided new insights on polyploid origins.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Twenty wild species belonging to the *Fragaria* genus are represented in our sampling (Table 1). It includes 11 diploid species ($2n = 2x = 14$), five tetraploid species ($2n = 4x = 28$), one hexaploid species ($2n = 6x = 42$) and three octoploid species ($2n = 8x = 56$). For the widely distributed *F. vesca*, two subspecies (from North America and Asia) were included (Fig. 1). Additionally, most of the *Fragaria* diploid species were each represented by two individuals. In total, 30 samples belonging to twenty wild *Fragaria* species were used in this study. Outgroup species were chosen based on their close relationships with the *Fragaria* genus (Harrison et al. 1997a; Potter et al., 2000, 2002, 2007; Eriksson et al., 2003). They included *Potentilla andicola*, *P. megalantha*, *P. nepalensis* and *P. recta*.

2.2. DNA isolation

Genomic DNA was isolated from 90 mg of fresh leaves from each individual using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen), following instructions provided by the manufacturer. When no amplification was observed after PCR, an additional step of purification using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) was performed.

2.3. Primer pairs design and PCR amplification

The oligonucleotide primers were developed based on selected *Fragaria* EST (Expressed Sequence Tag) contigs with high homology to *GBSSI* and *DHAR* proteins available in GenBank. For each gene, two oligonucleotides were designed in the coding regions surrounding introns (Primer3 program), which were inferred firstly after alignment of the contigs with the corresponding genes of *A.*

Table 1

List of the *Fragaria* species included in this study. The ploidy level, the geographic origin and distribution, and the accession number are given for each taxon.

Taxon	Ploidy level	Origin	Geographic distribution	Accession Nos. ^b
<i>F. bucharica</i> ^a	2x	Ushu, (Pakistan)	Western Himalayan region	FRA0003 ¹
<i>F. daltoniana</i> ^a	2x	Nepal	Himalaya	FRA0032 ¹
<i>F. iinumae</i> ^a	2x	Honshu, Amo-Tage, (Japan)	West of Japan	FRA0039 ¹
<i>F. mandshurica</i> ^a	2x	East of Baikal, Chita region, (Russia)	Northeastern Asia	FRA0047 ¹
<i>F. nigerrensis</i>	2x	Guizhou, (China)	Central Asia into China	PI602577 ²
<i>F. nipponica</i> ^a	2x	Japan	Honshu and Yakushima isl.	FRA0086 ¹
<i>F. nubicola</i> ^a	2x	East-Tibet, Yadong, (China)	Central Asia	FRA0087 ¹
<i>F. pentaphylla</i>	2x	Province Sichuan, (China)	Asia (China and Tibet)	FRA0096 ¹
<i>F. vesca</i>	2x	Saint-Armand, Montreal, (Canada)	Eastern North America	FRA0141 ¹
<i>F. vesca americana</i> ^a				
<i>F. vesca vesca</i> ^a	2x	Issyk River, South of Alma Ata (Kazakhstan)	Europe and Asia	FRA 159 ¹
<i>F. viridis</i> ^a	2x	Usolje-Sibirskoje, Baikal region, (Russia)	Europe and Asia	FRA0274 ¹
<i>F. yezoensis</i>	2x	Kurisle Islands, Kharimkotan, (Russia)	Japan	FRA0300 ¹
<i>F. corymbosa</i>	4x	Ciao Utar shan, Province Hebei, (China)	Northern China	FRA0025 ¹
<i>F. gracilis</i>	4x	Province Qinghai, Xining, Huzhu Co., (China)	Northwest China	FRA0034 ¹
<i>F. moupinensis</i>	4x	South-West China	Southwest China	FRA0076 ¹
<i>F. orientalis</i>	4x	Mont Mavershan, Prov. Heilongjiang, (China) SouthEast Tibet, Namchabarwa, (China)	Northeastern Asia	FRA0090 ¹
<i>F. tibetica</i>	4x		Eastern Himalayan region	FRA0127 ¹
<i>F. moschata</i>	6x	Russia	Europe and Russia	PI551869 ²
<i>F. chiloensis</i>	8x	Cuzco, (Peru)	Western North and South America, Hawaii	PI551736 ²
<i>F. virginiana</i>	8x	Blodgett, Benton County, Oregon, (US)	North America	PI602933 ²
<i>F. iturupensis</i>	8x ^c -10x ^d	Iturup Island, Sakhalin, (Russia)	East Asia	PI641091 ²

^a Presence of a second genotype from the CIREF Création Vari etale.^b Origin of the samples: ¹JKI, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Dresden, Germany. ²National clonal germplasm repository corvallis, Oregon, US.^c After Staudt (1973).^d After Hummer et al. (in press).

thaliana and secondly by comparison of the genomic DNA (gDNA) and the complementary DNA (cDNA). The relative positions of the primers used to amplify these regions in either the gDNA or cDNA of *Fragaria* are presented in supplemental data (Fig. 1s) they were designed in the second (F2: 5'-TGGTCTTGGTGATGTTCTTGG-3') and the fifth (R2: 5'-GTGTAGTTGGTTCCTTGTAAATCC-3') exon regions. For *DHAR*, they were designed in the second (Fa: 5'-CAAAGGGTTCCTTCTCACITTTGG-3') and the fourth (Ra: 5'-TTCTTGAATGGCCAAAGAGC-3') exon regions. PCR amplification of each of these two regions yielded a single band on agarose gels for all diploid accessions.

All amplifications were carried out in a total volume of 15 μ l containing 3 μ l of 5 \times Taq polymerase buffer, 0.6 μ l of 5 mM dNTP, 0.3 μ l of each primer (10 mM) and 0.14 μ l of Roche Taq Proof reading (5 U/ μ l), and 10 ng template DNA. Cycling conditions were 94 $^{\circ}$ C for 3 min, followed by 35 rounds of 94 $^{\circ}$ C for 45 s, 55 $^{\circ}$ C for 45 s, 72 $^{\circ}$ C for 1 min 30 s, and a final extension of 72 $^{\circ}$ C for 5 min.

2.4. Orthology assessment

To identify the orthology of sequences of the two low-copy nuclear genes, *GBSSI* and *DHAR*, we analyzed for both gene sequence similarities and performed phylogenetic analyses. For the *DHAR* gene, location on orthologous loci was carried out using comparative mapping. The *GBSSI* and the *DHAR* low-copy nuclear genes were chosen after preliminary investigations on 14 genes (Rousseau-Gueutin, unpublished data) following the strategy described in Small et al. (2004) and after observing the molecular variability of the *GBSSI* and *DHAR* sequences in *Fragaria*.

The two copies of the *GBSSI* gene found in the Rosaceae family, *GBSSI-1* and *GBSSI-2* can be readily distinguished by specific indels in the third (about 50 bp) and fifth intron (about 300 pb) (Evans et al., 2000; Evans and Campbell, 2002). In order to reveal the copies present in *Fragaria* species and to verify orthology, two additional primer pairs surrounding the indels were designed. The first was designed in the third (F1, 5'-ACAAAGATGCATGGGA CACC-3') and the sixth (R1, 5'-CAGAGAAGTATTCGTTGCTGTTC

-3') exon regions, whereas the second primer pair was designed in the second (F3, 5'-ACAGATGGGTCTCTGGGAACC-3') and the seventh (R3, 5'-GAAGAGCAGTGTGCCAATCA-3') exon regions. Sequence orthology analysis was based on phylogenetic analysis using exon sequences of the two *GBSSI* copies published from Rosaceae (Evans et al., 2000) and corresponding sequences generated in this study for *Potentilla* and *Fragaria* diploid species. In this analysis, *Pisum sativum* (Dry et al., 1992) and *Rhamnus catharticus* (Evans et al., 2000) sequences were used as outgroups.

The *DHAR* gene had never been studied in the Rosaceae family. To identify the amplified copies and to infer the orthology of sequences, different methods were employed. Comparative mapping analysis of this locus was conducted using diploid and octoploid genetic reference maps of *Fragaria* (Rousseau-Gueutin et al., 2008). Based on the high level of macrosynteny and colinearity found between the diploid and the cultivated octoploid genomes in the latter study, we can hypothesize orthology of the *DHAR* sequences if they share similar positions in both genomes. These positions are identified using mapping procedure previously described (Rousseau-Gueutin et al., 2008). Then, to verify their orthology and to identify the amplified copies present in *Fragaria* species, a phylogenetic analysis was performed on a dataset that included available *DHAR* coding sequences from eudicots (Shimaoka et al., 2000; Dixon et al., 2002; Zou et al., 2006) together with corresponding sequences generated in this study from *Potentilla* and *Fragaria*. A sequence from *Triticum aestivum* (Chen et al., 2003) was used as outgroup. Finally, the identification of the copy was verified by studying the putative presence of a chloroplast targeting peptide located in the 5' untranslated region of the chloroplastic copy. For this purpose, one primer was developed in the 5' UTR (Futr, 5'-CCACCTTTC GCTTCTCTCTCTC-3', see Fig. 1s). Using "Futr" and "Ra" primers, the subsequent products were sequenced from the *Fragaria* gDNA (Acc. No. FM165182) and cDNA (Acc. No. FM165183). Coding regions of the resulting DNA sequences were translated into amino acid sequences prior to be analyzed with the ChloroP software (Emanuelsson et al., 1999).

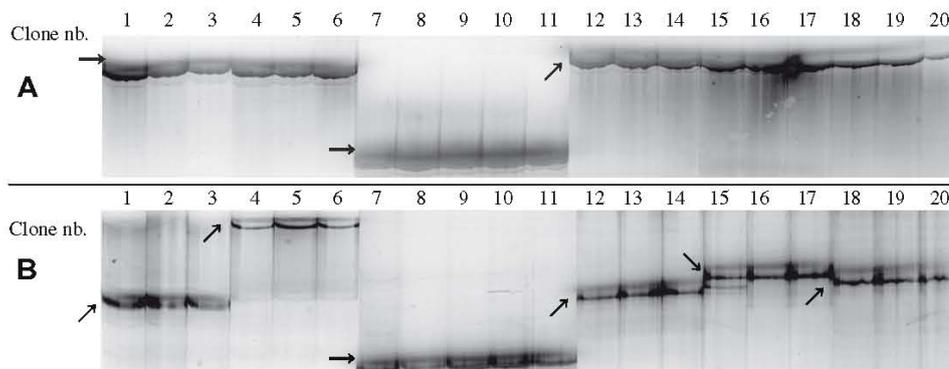


Fig. 2. Patterns of 20 cloned *DHAR* fragments from the octoploid species *F. chiloensis* observed on denaturing (A) and non-denaturing (B: SSCP) polyacrylamide gels. For this octoploid species, three different cloned fragments were distinguished on denaturing polyacrylamide gel (A) compared to six on non-denaturing gel (B). The six different cloned fragments observed on the PCR-SSCP autoradiograph were confirmed by sequencing.

2.5. Sequencing of cloned fragments in all species

Cleaned PCR products (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) were cloned into pGEM®-T (pGEM®-T Vector System 1, Promega) following instructions provided by the manufacturer. Because proofreading polymerase produces blunt ends, an A-tailing reaction was performed using Taq DNA polymerase before the ligation. Ligation, transformation and plating were done according to the protocols provided by the manufacturer.

The *Fragaria* species are expected to contain two, four, six or eight homoeologous sequences according to their ploidy level, 2x, 4x, 6x or 8x, respectively. In order to obtain all the homoeologous sequences from each polyploidy individual, a large number of colonies were selected for recombinant plasmids. PCR on these recombinant plasmids were performed using the SP6 and T7 universal primers and their products were checked on 1.5% agarose gel for the presence of inserts. Using SSCP technique on acrylamide gel (Fig. 2), preliminary polymorphism analyses of these amplicons were carried out in order to select recombinant plasmids that represent different cloned fragments in each DNA sample. Finally, 8, 24, 48 and 64 cloned fragments were sequenced for each individual plant per accession of the diploid, tetraploid, hexaploid and octoploid species, respectively. DNA sequencing was performed by GENOME Express company (France) using the SP6 and T7 universal primers.

2.6. Sequence alignment and analyses

All the sequences obtained were aligned using Multalin (Corpet, 1988). Sequences encountered only once and presenting minor differences with sequences encountered several times after different amplifications of the same extract were considered as arising from errors introduced during amplification, and subsequently not included in the analyses. As a given GBSSI-2 or *DHAR* sequence type was often recovered several times in a single genomic DNA extract, only one sequence per type was used in the phylogenetic analyses. The different GBSSI-2 or *DHAR* sequence types detected for all the studied accessions were subjected to alignment using BioEdit (Hall, 1999) for each gene separately. The resulting alignments were adjusted manually. Indels were coded as additional character states (absent: 0; present: 1) in BioEdit, regardless of their length. They were included in the subsequent sequence analyses to exploit their phylogenetic information following the procedure of Barriol (1994). All the sequences reported here have been deposited in EMBL database (EMBL Acc. Nos. FM165080–

FM165183). The number of variable sites among all *Fragaria* samples for each gene was calculated for the exon and intron regions using options of PAUP· v4.0b10 (Swofford, 2001). To determine the presence of a frameshift within some coding sequences, all coding sequences were translated (Smith et al., 1996) and compared with the published reading frames of *A. thaliana*.

2.7. Phylogenetic analyses

The data matrices generated for the *GBSSI-2* and the *DHAR* regions were subjected to phylogenetic analyses using parsimony. Sequence data were analyzed using PAUP· v4.0b10 (Swofford, 2001) with heuristic search and the default search options. The phylogenetic analyses were performed using sequences from *Potentilla* species (*Potentilla andicola*, *P. megalantha*, *P. nepalensis* and *P. recta*), the closest relatives of *Fragaria*, as outgroup. Bootstrap analyses were performed with 1000 replicates (Felsenstein, 1985). Parsimony analyses of each gene were conducted with diploid and polyploid sequences. From these phylogenetic analyses, each of the different haplotypes present in one accession was designated by a clone name using the same nomenclature for all the analyses. Each haplotype is differentiated by a capital letter and a number corresponding to the clade or subclade to which it belongs. When more than one haplotype of an accession was found in the same clade or subclade, it was differentiated by a second letter. Following the clone name, an exponent number indicates the number of identical cloned sequences obtained for this haplotype. Congruence between the *GBSSI-2* and *DHAR* datasets containing diploid species was assessed using the Incongruence Length Difference (ILD) test of Farris et al. (1994) implemented in PAUP· v4.0b10 as partition homogeneity tests.

2.8. Sequence variation and relative rate tests

Substitution rates (synonymous: *Ks*, non-synonymous: *Ka*) among orthologous (comparison between Z or X1 sequences from different octoploid species) and homoeologous (comparison between X1 and Z sequences from the same octoploid species) coding sequences in octoploid species were computed using DNAsp software (Rozas et al., 2003). In addition, relative rate tests (Tajima, 1993) were performed to examine the substitution rate heterogeneity among orthologous and homoeologous sequences in allo-octoploid species, with *P. andicola* sequence as outgroup, using the Mega 4 software (Tamura et al., 2007).

3. Results

3.1. Copy number of the GBSSI and DHAR genes and identification of the copy amplified in *Fragaria*

To elucidate the copy number of the *GBSSI* and *DHAR* genes in *Fragaria*, diploid *Fragaria* species were first surveyed. One to four bands per species on denaturing and non-denaturing (SSCP) polyacrylamide gels, respectively, were amplified (data not shown). Each of these two genes was sequenced in four representative *Fragaria* species (*F. iinumae*, *F. nilgerrensis*, *F. nubicola* and *F. vesca*) and was subjected to copy number estimation and copy identification by sequence comparison, phylogenetic analyses, and comparative genetic mapping experiments (the latter only for the *DHAR* gene).

3.1.1. *GBSSI* gene

In the Rosaceae family, the two copies of the *GBSSI* gene, *GBSSI*-1 and *GBSSI*-2, can be identified by their third and/or fifth intron sizes (Evans et al., 2000). After amplification using different combinations of primer pairs surrounding these introns (F1R1, F2R2, F3R3 in Fig. 1s), one band, corresponding to the size of the *GBSSI*-2 gene, was always observed on agarose gel. This single band was observed whatever the primer pairs, the diploid species of *Fragaria* and *Potentilla* and the PCR stringency conditions (annealing temperature of 55 and 50 °C) (Fig. 2s).

Orthology of the *Fragaria* and *Potentilla* diploid sequences was assessed using phylogenetic analysis. The data matrix was obtained from our *GBSSI* sequences from *Fragaria* and *Potentilla* diploids and from *GBSSI* (1 and 2) coding region sequences of Rosaceae species available in GenBank. This matrix had a length of 288 nucleotides, of which 157 were constant and 95 were phylogenetically informative. The resulting phylogenetic tree (Fig. 3) grouped all the Rosaceae *GBSSI* sequences into two well-supported clades with bootstrap values of 97 and 98%, respectively. These clades represent paralogous genes and were inferred to correspond to “*GBSSI*-1” and “*GBSSI*-2” according to Evans et al. (2000). In the

GBSSI-2 clade, all our *Fragaria* and *Potentilla* diploid sequences formed a well-supported clade with 100% of bootstrap value, providing evidence that these sequences are orthologues of the *GBSSI*-2 copy of Evans et al. (2000). This result was further supported from a broader analysis combining all our *Fragaria* sequences and those published for the Rosaceae (data not shown).

3.1.2. *DHAR* gene

On agarose gel, only one band of the *DHAR* gene was observed whatever the diploid species of *Fragaria* and *Potentilla*. Support for orthology arose from the comparative mapping of the *DHAR* gene on the diploid and octoploid reference genetic maps. Polymorphism of the *DHAR* sequences in the two diploid and octoploid populations used for the construction of these reference genetic maps was identified using SSCP technique. Polymorphic bands were mapped as described in Rousseau-Gueutin et al. (2008). Results of the mapping showed that the *DHAR* gene was located on two homoeologous linkage groups of the octoploid homoeology group (HG) VII and also on its corresponding homologous linkage group in the diploid *Fragaria* genome (LG VII) (Fig. 4). The similar position of this gene in the different linkage groups VII suggested the orthology of the *DHAR* loci. Orthology was further confirmed by a phylogenetic analysis conducted using *DHAR* sequences from diploid *Fragaria* and *Potentilla* species and from other eudicot species available on TAIR/TIGR/Genbank databases. We built a data matrix from *DHAR* (cytosol and chloroplast) coding region sequences (exon 1–4). The matrix had a length of 421 nucleotides, of which 150 were constant and 226 were phylogenetically informative. The resulting phylogenetic tree (Fig. 5) grouped the eudicots *DHAR* sequences into two clades, which are both well supported with bootstrap values of 81% and 100%, respectively. These clades were inferred to correspond to “*DHAR* (cytosol)” and “*DHAR* (chloroplast)”, according to their functional destination (Dixon et al., 2002). These two clades correspond to groups of paralogous sequences. In the “*DHAR* (cytosol)” clade, all our *Fragaria* and *Potentilla* diploid sequences fell in a well-supported subclade

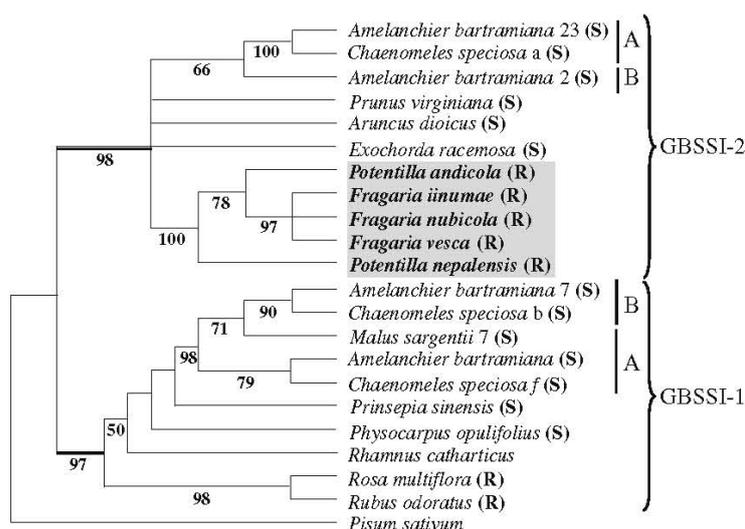


Fig. 3. Strict consensus tree of the nine most parsimonious trees obtained with *Fragaria* *GBSSI* exon sequences (in this study) and corresponding published *GBSSI*-1 and *GBSSI*-2 sequences from representatives of the main Rosaceae subfamilies. The tree is rooted with *Pisum* and *Rhamnus* sequences. The main brackets at right delimit groups of orthologous sequences, *GBSSI*-1 and *GBSSI*-2. Short vertical lines (A and B) indicate a second duplication of the *GBSSI* gene occurring in some species belonging to the Spireaeoideae subfamily. Letters following each species (between brackets) designate the subfamilial classification: R, Rosoideae; S, Spireaeoideae. Bootstrap values obtained from 1000 replicates are shown under the branches in bold. *Fragaria* and *Potentilla* sequences obtained in this study are underlined in grey. Accession numbers of the other sequences obtained in the GenBank databases are as follows: *Amelanchier* (AF285973–AF285976), *Chaenomeles* (AF285977–AF285979), *Malus* (AF285983), *Aruncus* (AF285999), *Physocarpus* (AF285989), *Prinsepia* (AF285990), *Prunus* (AF285991), *Exochorda* (AF286003), *Rosa* (AF285993–AF285994), *Rhamnus* (AF285992), *Pisum* (X88789).

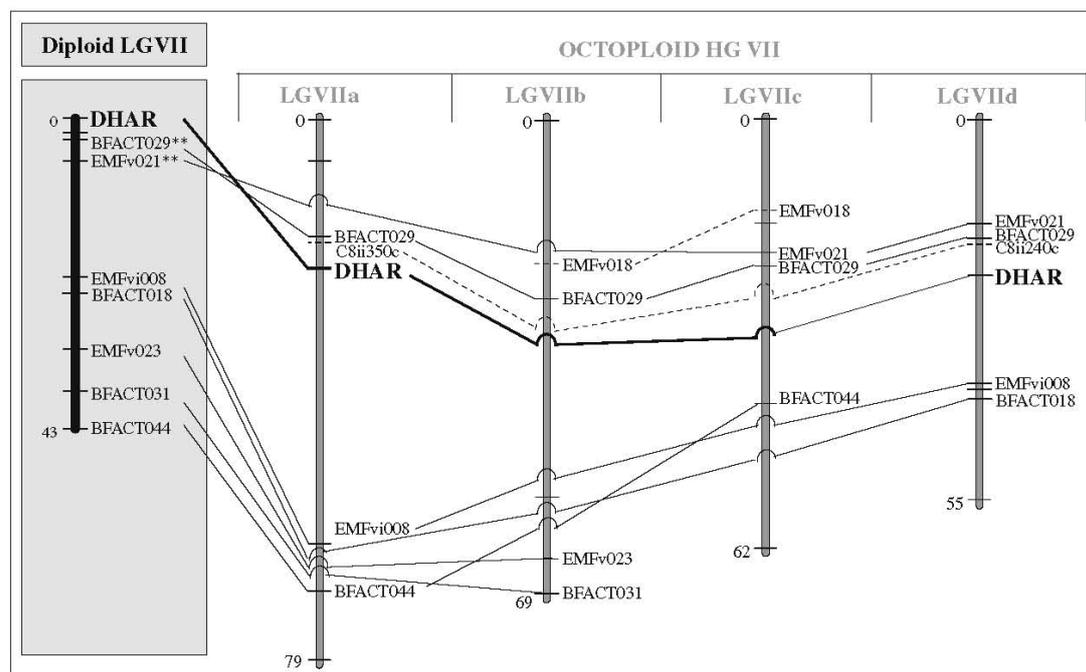


Fig. 4. Comparative genetic mapping of the *DHAR* sequences between the diploid and octoploid *Fragaria* populations (Rousseau-Gueutin et al., 2008). The *DHAR* gene (in bold) located on the Linkage Group (LG) VII of the diploid map is orthologous to the loci of the *DHAR* gene located on two homoeologous LG of the octoploid Homoeology Group (HG) VII. The genetic distances are expressed in centimorgan. Only microsatellites (SSRs) involved in comparisons of the linkage groups are indicated. Connections between microsatellites located on the four homoeologous LG of the octoploid species and on their diploid orthologous LG are indicated by continuous lines. Connections between microsatellites located exclusively on the four homoeologous LG of the octoploid species are indicated by dotted lines.

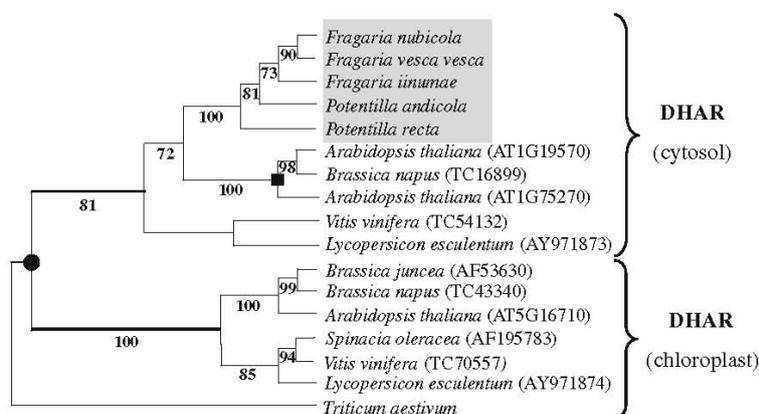


Fig. 5. Strict consensus tree of the most parsimonious trees obtained with *Fragaria* *DHAR* exon sequences (in this study) and corresponding published *DHAR* sequences (expression in cytosol and chloroplast) from eudicots. The tree is rooted with a *Triticum aestivum* sequence. The main brackets at right delimit groups of orthologous sequences (*DHAR* expressed in the cytosol or the chloroplast). Bootstrap values obtained from 1000 replicates are shown under the branches in bold. *Fragaria* and *Potentilla* sequences obtained in this study are underlined in grey. Accession numbers of the other sequences obtained in the GenBank databases are as follows: *Arabidopsis thaliana* (AT1G19570; AT1G75270; AT5G16710), *Brassica juncea* (AF53630), *Brassica napus* (TC16899; TC43340), *Lycopersicon esculentum* (AY971873; AY971874), *Spinacia oleracea* (AF195783), *Vitis vinifera* (TC54132; TC70557) and *Triticum aestivum* (AY074784). A black circle indicates the duplication of the *DHAR* gene that predated monocot and dicot divergence. A black square indicates the duplication of the *DHAR* gene in *A. thaliana* due to its recent polyploidization.

(100% of bootstrap value), which is a sister to the Brassicaceae *DHAR* cytosolic copy, providing evidence that these sequences are orthologous. Identification of sequences exclusively from the *DHAR* cytosolic copy in *Fragaria* and *Potentilla* diploids was further supported by the analysis of all our sequences (data not shown).

To identify the amplified copy, the putative presence of a chloroplast targeting peptide in the 5' untranslated region and the po-

sition of introns were determined by sequencing fragments obtained from *Fragaria* cDNA and gDNA with the “*DHAR-Futr*” and “*DHAR-Ra*” primer pairs described above (Fig. 1s). We observed that the position of introns differs between the *Arabidopsis* and *Fragaria* cytosolic *DHAR* genes. Moreover, no chloroplast transit peptide was found, suggesting that our *Fragaria* *DHAR* fragments coded for a cytosolic protein.

Table 2
Sequence characteristics and variation of *GBSSI-2* and *DHAR* regions in *Fragaria*.

	<i>GBSSI-2</i>	<i>DHAR</i>
Exons + introns:		
Length: min–max (mean)	517–584 (578.29)	591–731 (726.38)
% GC min–max (mean)	39.86–41.59 (40.82)	39.59–41.7 (40.48)
Variable characters	86	76
Number of indels (size)	8 (1–36 bp)	9 (1–140 bp)
% Pairwise divergence (min–max)	0–3.503	0–5.081
Exons:		
Length: min–max (mean)	289–290 (289.08)	318–414 (411.72)
% GC min–max (mean)	47.41–48.79 (47.97)	45.41–47.58 (46.1)
% Pairwise divergence (min–max)	0–3.189	0–3.623

3.2. Sequence identification and characteristics

For the *GBSSI-2* and *DHAR* amplified regions, a total of 347 and 373 unambiguous cloned sequences were obtained from 20 *Fragaria* and three *Potentilla* species, respectively. Additionally, eight sequences from a second genotype of eight diploid *Fragaria* species were obtained by direct sequencing in order to verify the sequence homogeneity among genotypes within each diploid species. From these cloned sequences, a total of 49 and 47 sequences were identified for *GBSSI-2* and *DHAR*, respectively. Length variation of those sequences ranged from 517 to 584 bp (mean about 578 bp) for *GBSSI-2* and from 591 to 731 bp (mean about 726 bp) for *DHAR* (Table 2).

For the *GBSSI-2* gene, alignment of *Fragaria* and *Potentilla* (outgroup) sequences required the inference of eight insertion/deletion events (indels) ranging from 1 to 36 nucleotides in the ingroup accessions and of 12 indels in the three outgroups. This resulted in a *GBSSI-2* aligned data matrix of 620 nucleotides. When the gapped characters were excluded and converted into coded characters, the new data matrix contained 549 characters, of which 390 were constant, and 86 were phylogenetically informative. Among the latter, 28 nucleotides were located in exons and 58 were in the introns. Of the 159 variable sites, 118 were located in introns and 41 in exons.

For the *DHAR* region, alignment of *Fragaria* and *Potentilla* (outgroup) sequences required the inference of nine insertion/deletion events (indels) ranging from one to 140 (haplotype Y1a of *F. chiloensis*) nucleotides in the ingroup accessions and of 12 indels in the two outgroups. This resulted in a *DHAR* aligned data matrix of 756 nucleotides. When the gapped characters were excluded and converted into coded characters, the new data matrix contained 610 characters, of which 423 were constant, and 76 were phylogenetically informative. Among these, 26 nucleotides were located in the exons and 50 in the introns. Of the 187 variable sites, 120 were located in introns and 67 in exons.

3.3. Phylogenetic analyses

3.3.1. Maximum Parsimony analysis of the *GBSSI-2* in diploid and polyploid *Fragaria*

The Maximum Parsimony (MP) analysis based on *GBSSI-2* sequences (exons and introns) of diploid and polyploid *Fragaria* species was performed using the 49 identified haplotypes. This analysis used the three *Potentilla* species (*P. andicola*, *P. megalantha*, *P. nepalensis*) as outgroup and resulted in eight equal most-parsimonious trees (CI = 0.892; RI = 0.936). The strict consensus tree (Fig. 6) shows the genus *Fragaria* displays a basal polytomy including three well supported clades, hereafter named X, Y and Z.

Within the clade X (82% of bootstrap), the sequence of *F. nilgerrensis* (X2) was positioned as sister to the well-supported monophyletic group (subclade X1; 93% bootstrap) containing the unresolved

sequences from five diploid species, *F. daltoniana* (X1), *F. nubicola* (X1a and X1b), *F. nipponica* (X1), *F. pentaphylla* (X1a and X1b) and *F. yezeensis* (X1a and X1b), and from four tetraploid species, *F. corymbosa* (X1a, X1b, X1c), *F. gracilis* (X1a and X1b), *F. moupinensis* (X1a, X1b, X1c, X1d) and *F. tibetica* (X1a and X1b). In the subclade X1, two moderately supported groups were observed with, respectively 60% and 62% of bootstrap values: the first one composed of the two haplotypes of the diploid *F. nubicola* (X1a and X1b) and one haplotype of the tetraploid *F. tibetica* (X1a) and the second one, of the haplotype of the diploid *F. nipponica* (X1) and two haplotypes of each tetraploid, *F. corymbosa* (X1a and X1b) and *F. gracilis* (X1a and X1b).

The clade Y (63% of bootstrap) was divided into two sister subclades, Y1 and Y2. Y1 was composed of the haplotypes of three diploid species, *F. bucharica*, *F. mandshurica* (Y1a and Y1b), and *F. vesca* (Y1 in *ssp. vesca* and Y1a, Y1b in *ssp. americana*), of one tetraploid species, *F. orientalis* (Y1a, Y1b, Y1c), of the only hexaploid species, *F. moschata* (Y1a, Y1b), and of the three octoploid species, *F. iturupensis* (Y1), *F. chiloensis* (Y1), and *F. virginiana* (Y1). In this subclade, the haplotypes Y1 of the three octoploids, *F. chiloensis*, *F. virginiana*, and *F. iturupensis*, were related to the haplotypes of the diploids *F. vesca ssp. vesca* (Y1), *F. vesca ssp. americana* (Y1a and Y1b) and *F. mandshurica* (Y1a), while all haplotypes of *F. orientalis* (Y1a, Y1b, Y1c) were linked to the haplotype Y1b of *F. mandshurica*. The other supported subclade, Y2, (89% of bootstrap) comprised haplotypes of the diploid species *F. viridis* (Y2a and Y2b) and of the hexaploid *F. moschata* (Y2a and Y2b).

The clade Z (68% of bootstrap) included the two haplotypes of the diploid species *F. iinumae* (Za and Zb). Interestingly, all other sequences in this clade represented a second set of haplotypes of the three octoploid species, *F. iturupensis*, *F. chiloensis*, and *F. virginiana*. Among these allelic variants, *F. iturupensis* exhibited three different haplotypes of which one (Za) was closely related to the haplotypes of the diploid *F. iinumae* (87% of bootstrap), and two (Zb, Zc) were linked to the haplotypes of the other octoploids, *F. chiloensis* and *F. virginiana*, within two moderately supported groups (64% and 56% of bootstrap).

3.3.2. Maximum Parsimony analysis of the *DHAR* gene for diploid and polyploid *Fragaria*

The Maximum Parsimony (MP) analysis based on *DHAR* sequences (exons and introns) of diploid and polyploid *Fragaria* species was performed using the 47 identified haplotypes. This analysis used two *Potentilla* species (*P. andicola*, *P. recta*) as outgroup and resulted in four equally most-parsimonious trees (CI = 0.916; RI = 0.962). The strict consensus tree (Fig. 7) of the *DHAR* gene showed that *Fragaria* sequences fell into the same three main clades described previously in the *GBSSI-2* phylogenetic analyses, X (63% bootstrap), Y (100% bootstrap), and Z (100% bootstrap). The clade Z was placed as sister to a large monophyletic group including the clades X and Y, and a small one containing only the haplotypes of *F. viridis* (a and b). Relationships among these clades remained unresolved in the strict consensus tree.

Within the clade X, haplotypes of *F. bucharica* (a and b) were branched at the base of this clade with a moderate support (63%), and were sister to all the other sequences of this clade. These latter sequences formed two sub-clades, X1 and X2. The haplotype of *F. nilgerrensis* (X2) was sister to the well-supported subclade X1 (89% bootstrap) containing all the remaining sequences, where the haplotype of *F. daltoniana* (X1) was in its turn sister to a monophyletic subgroup composed of haplotypes from: the diploid species, *F. nipponica* (X1), *F. nubicola* (X1), *F. pentaphylla* (X1a and X1b), *F. yezeensis* (X1), and of the haplotypes of the four tetraploids, *F. corymbosa* (X1a and X1b), *F. gracilis* (X1a and X1b), *F. moupinensis* (X1a, X1b, X1c, X1d) and *F. tibetica* (X1a and X1b). Among these haplotypes, relationships varied from moderately to well sup-

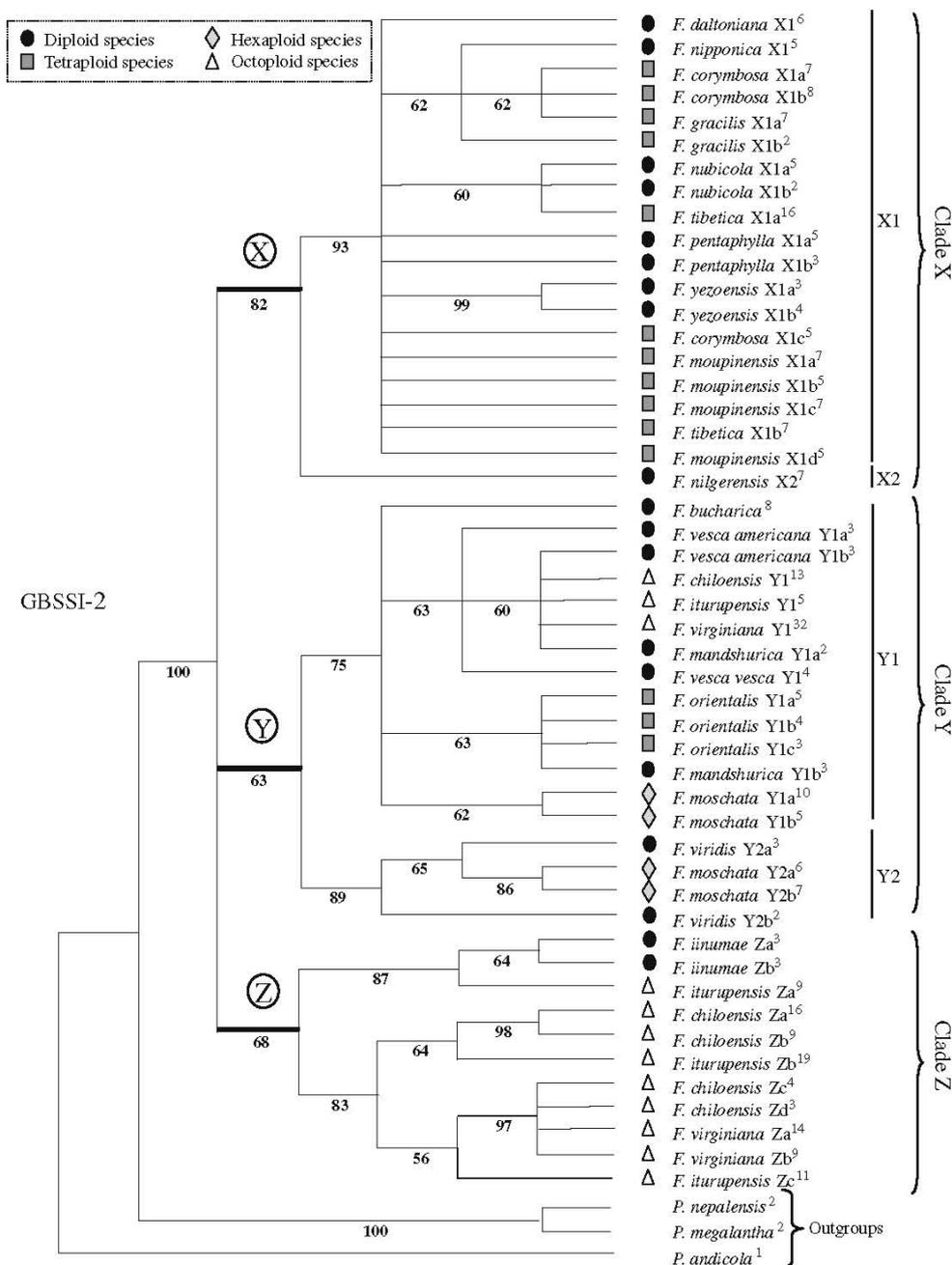


Fig. 6. Strict consensus tree of the eight most parsimonious trees obtained with *Fragaria* GBSSI-2 sequences (exons + introns). The tree is rooted with three *Potentilla* sequences. Bootstrap values obtained from 1000 replicates are shown under the branches. The haplotypes are differentiated by a letter (X, Y or Z) and a number (1 or 2) corresponding to the clade and the subclade, respectively. When more than one haplotype of one genotype was found into the same clade or subclade, a second letter (a–c or d) differentiates them. Following the haplotype name, the number in exponent represents the number of identical clone sequences.

ported, such as between: the haplotypes of the diploid *F. nubicola* (X1) and the tetraploid *F. tibetica* (X1a and X1b) with 71% bootstrap value; the haplotypes of the diploid *F. pentaphylla* (X1a and X1b) and the tetraploid *F. moupinensis* (X1a and X1b) with 62% bootstrap value. Finally, the X DHAR clade almost corresponds to the X GBSSI-2 clade with respect to taxonomic composition, except for the placement of *F. bucharica*.

The composition of the clade Y (100% bootstrap value) demonstrated, on one side, close relationships between part of the hap-

lotypes of the three octoploid species (*F. iturupensis*, *F. chiloensis* and *F. virginiana*), the tetraploid *F. orientalis* (Y1a) and haplotypes of the diploid species *F. vesca* (ssp. *vesca* and ssp. *americana*), and on the other side unresolved but very similar haplotypes of the diploid *F. mandshurica* (Y1), the tetraploid *F. orientalis* (Y1b and Y1c), the hexaploid *F. moschata* (Y1) and the octoploid *F. iturupensis* (Y1b).

Within clade Z, a second set of haplotypes found in the three octoploid species, *F. chiloensis* (Za and Zb), *F. iturupensis* (Za and

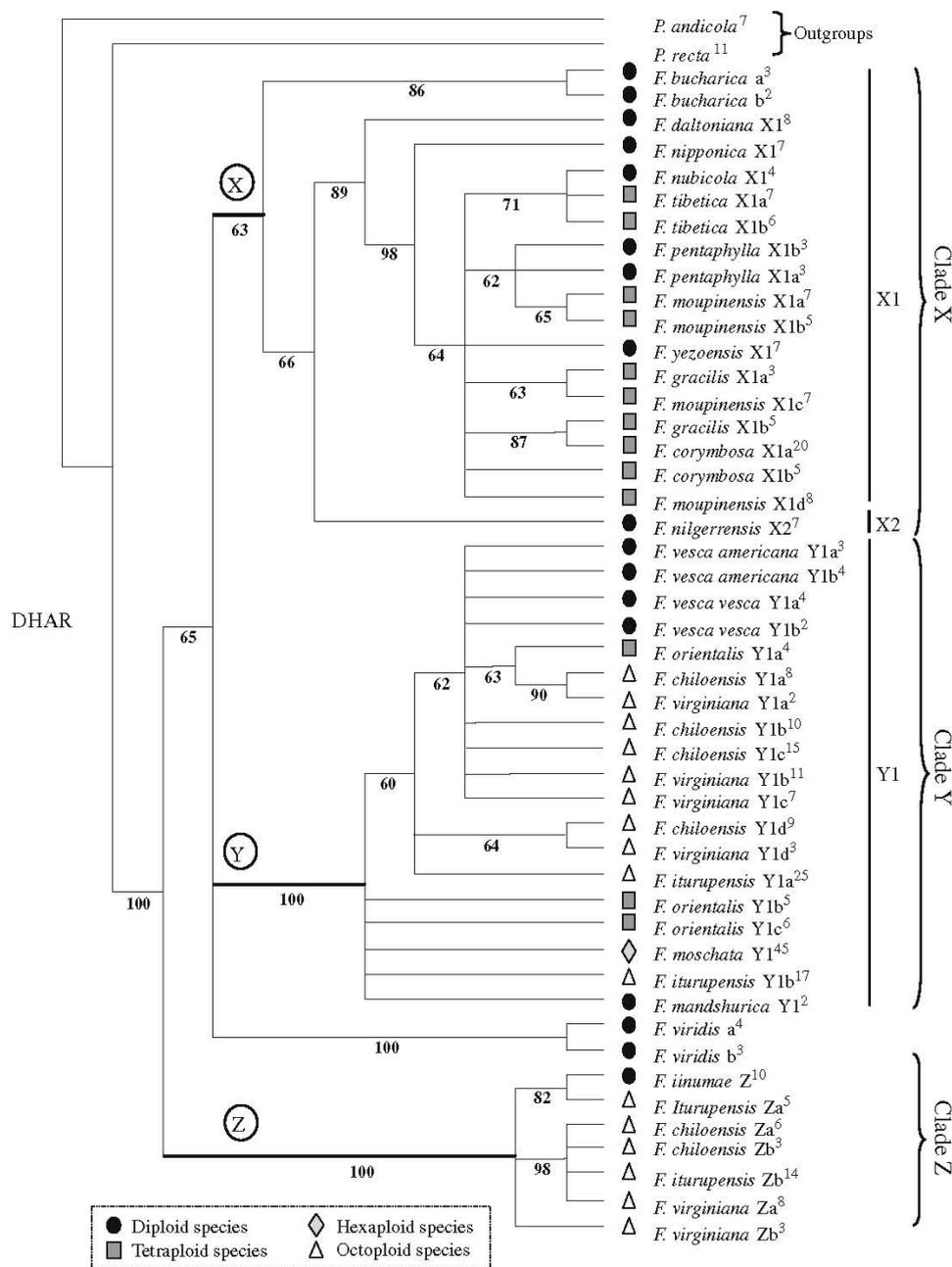


Fig. 7. Strict consensus tree of the four most parsimonious trees obtained with *Fragaria* DHAR sequences (exons + introns) from 20 *Fragaria* species. The tree is rooted with two *Potentilla* sequences. Bootstrap values obtained from 1000 replicates are shown under the branches. The haplotypes are differentiated by a letter and a number corresponding to the clade (X, Y, or Z) and the subclade (1 or 2). When more than one haplotype of one genotype was found into the same clade or subclade, a second letter (a–c or d) differentiates them. Following the haplotype name, the number in exponent represents the number of identical clone sequences.

Zb), and *F. virginiana* (Za and Zb), was unambiguously related to the haplotypes of the diploid species *F. iinumae* (Z).

To assess the congruence between the GBSSI-2 and DHAR datasets, the Incongruence Length Difference (ILD) test was used on all diploid taxa and resulted in a value of $P = 0.01$. Following this initial screen, the ILD test was used again to investigate the nature of the incongruence. To determine if *F. bucharica* was the main cause of the incongruence between data partitions, its sequence was re-

moved from the initial analysis based on the GBSSI-2 and DHAR datasets. After its removal, the ILD test resulted in a no significant incongruence ($P = 0.15$).

3.3.3. Comparison of the GBSSI-2 and DHAR phylogenetic trees constructed with diploid and polyploid *Fragaria* sequences

Comparison of the GBSSI-2 and DHAR topologies revealed a similar general evolutionary pattern, as illustrated by the composition

Table 3
Comparison of orthologous and homoeologous sequences between and within allo-octoploid species for the *GBSSI-2* and *DHAR* gene.

	Substitutions exons/introns	Indels exons/introns	Ks ^c	Ka ^c	Ka/Ks ^c	Relative rate test χ^2 ^d	Relative rate test p ^d
<i>GBSSI-2</i> gene							
Orthologous copies ^a							
<i>F. chiloensis</i> Zd vs. <i>F. iturupensis</i> Zc	3/8	0/1	0.0292	0.0046	0.1575	2	0.1573
<i>F. chiloensis</i> Zd vs. <i>F. virginiana</i> Zb	0/1	0/0	0	0	*	1	0.3173
<i>F. iturupensis</i> Zc vs. <i>F. virginiana</i> Zb	3/9	0/1	0.0292	0.0046	0.1575	1	0.3173
<i>F. chiloensis</i> Y1 vs. <i>F. iturupensis</i> Y1	0/1	0/0	0	0	*	1	0.3173
<i>F. chiloensis</i> Y1 vs. <i>F. virginiana</i> Y1	0/0	0/0	0	0	*	*	*
<i>F. iturupensis</i> Y1 vs. <i>F. virginiana</i> Y1	0/1	0/0	0	0	*	1	0.3173
Homoeologous copies ^b							
<i>F. iturupensis</i> Zc vs. <i>F. iturupensis</i> Y1	4/14	0/1	0.0145	0.0139	0.9586	0.69	0.4054
<i>F. virginiana</i> Zb vs. <i>F. virginiana</i> Y1	7/8	0/0	0.0442	0.0186	0.4208	0.33	0.5637
<i>F. chiloensis</i> Zd vs. <i>F. chiloensis</i> Y1	7/7	0/0	0.0442	0.0186	0.4208	0.09	0.7630
<i>DHAR</i> gene							
Orthologous copies ^a							
<i>F. chiloensis</i> Za vs. <i>F. iturupensis</i> Zb	1/1	0/0	0.0105	0	0	0	1
<i>F. chiloensis</i> Za vs. <i>F. virginiana</i> Za	1/1	0/0	0.0105	0	0	0	1
<i>F. iturupensis</i> Zb vs. <i>F. virginiana</i> Za	2/0	0/0	0.0211	0	0	0	1
<i>F. chiloensis</i> Y1d vs. <i>F. iturupensis</i> Y1a	0/1	0/0	0	0	*	1	0.3173
<i>F. chiloensis</i> Y1d vs. <i>F. virginiana</i> Y1d	0/0	0/0	0	0	*	*	*
<i>F. iturupensis</i> Y1a vs. <i>F. virginiana</i> Y1d	0/1	0/0	0	0	*	1	0.3173
Homoeologous copies ^b							
<i>F. iturupensis</i> Zb vs. <i>F. iturupensis</i> Y1a	12/19	0/3	0.0883	0.0127	0.1438	0.86	0.3531
<i>F. virginiana</i> Za vs. <i>F. virginiana</i> Y1d	10/20	0/3	0.0652	0.0127	0.1947	0.57	0.4497
<i>F. chiloensis</i> Zb vs. <i>F. chiloensis</i> Y1d	11/22	0/3	0.0766	0.0127	0.1658	0.53	0.4652

^a Two sequences from octoploid species were considered as orthologous when they present in the same clade Z or subclade Y1.

^b Two sequences from the same octoploid species were considered as homoeologous if they were represent in different clades (Y and Z).

^c Values of substitutions rates (synonymous: Ks, non-synonymous: Ka) in coding regions.

^d Values of substitution rate heterogeneity among *GBSSI-2* or *DHAR* sequences (using Tajima's relative rate test).

of the three main clades (X, Y, and Z). One of the major results is that octoploid haplotypes are distributed exclusively in clades X1 and Z, suggesting the presence of two divergent sequences (homoeologues) in the octoploid species.

Three remarkable incongruences between the two gene phylogenies were encountered: (1) the basal position of the diploid *F. iinumae* supported by the *DHAR* gene, but not resolved in the *GBSSI-2* phylogeny; (2) the incongruent position of *F. viridis* haplotypes belonging to the clade Y and closely related to *F. moschata* in the *GBSSI-2* phylogeny, whereas these haplotypes stand aside from clades X and Y based on the *DHAR* data; and (3) the conflicting position of *F. bucharica*, which is alternatively a member of the clade X in the *GBSSI-2* tree or of the clade Y in the *DHAR* tree.

3.4. Evolution of orthologous and homoeologous sequences in allo-octoploid species

Evolution of orthologues and homoeologues was examined, respectively (1) by comparisons of the orthologous sequences between the three octoploid species within each subclade Y1 and Z, and (2) by comparisons of the homoeologous sequences between the two subclades Y1 and Z within each allo-octoploid species *F.*

chiloensis, *F. iturupensis* and *F. virginiana* (Table 3). For both *GBSSI-2* and *DHAR* sequences, we observed more nucleotide substitutions between the homoeologous sequences than between the orthologous sequences. These substitutions were mostly distributed in the introns. In the exons, the synonymous substitutions (Ks) were more frequent than non-synonymous ones (Ka) between the orthologous or homoeologous sequences. Application of Tajima relative rate test indicated no significant rate heterogeneity between orthologous or homoeologous sequences in the two different genes (Table 3). We examined whether the two genes evolve under similar evolutionary constraints by comparing Ka/Ks ratios (Table 3). The low values (<1) of this ratio between orthologous copies in both genes suggested high selective constraints on these sequences. Between homoeologues, Ka/Ks ratio was closer to neutral expectations in the *GBSSI* gene (ranging from 0.420 to 0.959) than in the *DHAR* gene (values ranging from 0.144 to 0.195). Moreover, two different deletion events were observed in the *DHAR* coding sequences of two haplotypes of the *F. virginiana* and *F. chiloensis* species (Fig. 8). The first deletion event was observed in one of the six haplotypes sequenced in *F. virginiana* (Y1c haplotype). This haplotype exhibited a 7 bp deletion in the fourth exon, which caused a frameshift leading to a stop codon in the next 13 amino acids. The second deletion event was ob-

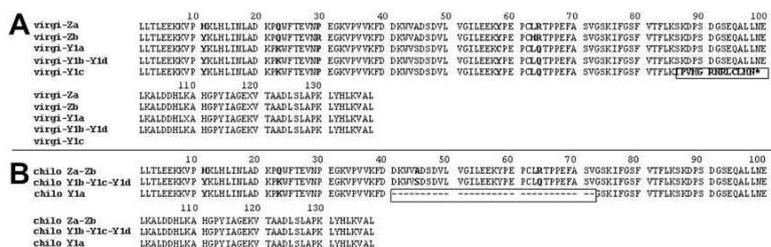


Fig. 8. Comparison of different homoeologous *DHAR* copies through the alignment of amino acid sequences obtained in the octoploid species *F. virginiana* (A) and *F. chiloensis* (B). The amino acid substitutions among haplotypes are represented in bold characters and the impact of deletion events on amino-acid sequences is boxed. These deletions lead to a pseudogene in *F. virginiana* Y1c haplotype (A) and to a truncated gene in *F. chiloensis* Y1a haplotype (B).

served in one of the six haplotypes sequenced in *F. chiloensis* (Y1a haplotype). The deletion resulted from a loss of 96 nucleotides in the third exon, which did not lead to a frameshift.

4. Discussion

Previous studies investigated the phylogenetic relationships within the *Fragaria* genus using cpDNA and rDNA (Harrison et al., 1997a; Potter et al., 2000). They revealed major lineages that we confirmed in this study, but provided limited information to resolve the origin of polyploid species. In this study, the origin and evolution of *Fragaria* polyploid species was assessed using phylogenetic analyses based on two low-copy nuclear genes, *GBSSI-2* and *DHAR*. After presenting the orthology assessment and the evolutionary dynamics of the two low-copy nuclear genes, the phylogenetic relationships between the diploid and polyploid *Fragaria* species will be discussed. References to other published cytological, morphological, geographical and molecular data will be made to summarize our knowledge on the *Fragaria* evolutionary history.

4.1. Orthology assessment and evolutionary dynamics of the nuclear genes

Assessing sequence orthology is an important concern when using nuclear genes to reconstruct organismal history, since paralogous sequences may lead to erroneous phylogenetic inferences (Cronn and Wendel, 1998; Small and Wendel, 2000; Sang, 2002; Small et al., 2004; Creer, 2007). In this study, orthology of our *GBSSI* and *DHAR* sequences was first analyzed using phylogenetic analyses including orthologous and paralogous from various species (Figs. 3 and 5). From these phylogenetic analyses, we observed that all our *Fragaria* and *Potentilla* sequences belonged to the same gene copy, *GBSSI-2* and *DHAR* cytosol, respectively, which supported their orthologous status. Orthology also was inferred by comparative genetic mapping between related taxa (Fig. 4). This approach was developed in *Fragaria* by comparing two linkage maps from an octoploid strawberry and its diploid relatives. This comparison of linkage maps revealed high levels of conserved macrosynteny and colinearity (Rousseau-Gueutin et al., 2008). As a consequence, our result for the *DHAR* marker can be regarded as the study of the orthology of the *DHAR* gene between diploid genomes involved in the origin of the *Fragaria* octoploids. The presence of a shared genomic position of the *DHAR* gene among the diploid and octoploid *Fragaria* species highly supports the orthology of our sequences.

In addition to orthology assessment, phylogenetic analyses allowed the study of the evolutionary dynamics of nuclear genes. Concerning the *GBSSI* gene, two *GBSSI* paralogues, mainly different on their introns size, have been described in Rosaceae such as *Rosa* and *Rubus* (Evans et al., 2000). In this study, only the *GBSSI-2* copy was found in all *Fragaria* and *Potentilla* species considered. This discrepancy can be attributed to the loss of the *GBSSI-1* copy in the *Fragariinae* subtribe. This hypothesis is further supported by the observation of only one band, which matched the *GBSSI-2* copy according to its size, whatever the primer pairs (Fig. 2s) and PCR conditions tested. Concerning the *DHAR* gene, a duplication event that predated the Rosids-Asterids divergence is suggested by the observation of two primary clades, which diverged from each other at the base of the tree (Fig. 5). In addition, the occurrence of two cytosolic *DHAR* sequences (copy 1 and 2) more closely related to each other than to other dicot sequences implies a second duplication in *Arabidopsis*. This duplication may be related to the recent polyploidization event the *Arabidopsis* lineage underwent about 14 to 25 Mya ago (Blanc et al., 2003; Bowers et al., 2003; Blanc and Wolfe, 2004). Finally, a loss of the chloroplastic *DHAR* copy is suggested in the *Fragariinae* subtribe by the occurrence of all *Fragaria* and *Potentilla* sequences in the “*DHAR* cytosol” clade. How-

ever, the only amplification of the cytosolic copy in *Fragaria* and *Potentilla* could also result from the specificity of our primer pairs to this copy.

Based upon the above phylogenetic results, a loss of one duplicated copy, in either the *GBSSI* or *DHAR* gene, could have occurred in the earliest steps of the *Fragariinae* evolution. It would be interesting to test a broader sample of genes to determine the frequency of this process and its impact on genome dynamics in the *Fragariinae*.

4.2. Phylogenetic relationships within *Fragaria* and origin of the polyploid species

Compared to the previous phylogenetic analyses based on five and eight diploid species (Harrison et al., 1997a; Potter et al., 2000), our study included almost all described diploid species and confirms the distribution of the *Fragaria* diploid species into three main clades, hereafter named X, Y and Z. The first clade (Z) is composed of only one diploid species, *F. iinumae* (occurring in Western Japan). This result is in agreement with previous observation based upon combined ITS and *trn* sequences (Potter et al., 2000). The second clade (X) includes six diploid species *F. daltoniana*, *F. nilgerrensis*, *F. nipponica*, *F. nubicola*, *F. pentaphylla* and *F. yezoensis*, all originating from Eastern and Central Asia, mainly in the Sino-Himalayan region (i.e. the Himalayas, Tibet and central China) (Staudt and Dickoré, 2001). Within clade X, *F. nilgerrensis* appeared as a well-differentiated evolutionary unit (subclade X2), which is sister to the group composed of the five other species (subclade X1). This high divergence of *F. nilgerrensis* lends support to previous observation of Harrison et al. (1997a) and is consistent with its high interspecific sterility with other *Fragaria* species (Dowrick and Williams, 1959). Within the subclade X1, a low level of DNA variation was observed among five diploids species. This suggests that the diversification within this group occurred only recently. To clarify this issue, further genetic analyses at the population level are needed. In the third clade (Y), both genes supported the Eurasian and American representatives of *F. vesca* and the Northasian *F. mandshurica* as close relatives in the subclade Y1, and provided some support linking the Eurasian *F. viridis* (subclade Y2) to the latter species.

Only the position of *F. bucharica* (native from the Western Himalayan region) remains unclear, with regard to its placement in clades Y (75% bootstrap support: Fig. 6) or X (63% bootstrap support: Fig. 7) in the *GBSSI-2* and *DHAR* trees, respectively. This hard incongruence, indicated by the ILD test ($P = 0.01$), could be explained by different evolutionary processes, such as hybridization, introgression or lineage sorting (Wendel and Doyle, 1998; Small et al., 2004; Mort et al., 2007). In the case of *F. bucharica*, the hybrid origin seems the likely event because of its overlapping geographic distribution with both members of the X and Y lineages. Additional data from more informative nuclear regions are needed to better resolve the position of *F. bucharica*.

To elucidate the origin of a polyploid species, analyses of sequences obtained from the different homoeologues should provide critical information. For low-copy nuclear genes, assuming retention of the duplicated copies, duplicated sequences from an autopolyploid species are expected to form a clade with the parental diploid species, whereas homoeologous copies from an allopolyploid species are expected to branch, respectively, with the diploid progenitors when included in the analysis (Doyle et al., 2004; Popp and Oxelman, 2007; Fortune et al., 2007). However, it is a real challenge to obtain the different copies of a polyploid accession. Here, we developed a SSCP approach to detect the different copies in a polyploid individual. This very powerful technique has been efficient in revealing different haplotypes in population genetic or genetic mapping studies (Ortí et al., 1997; Sunnucks et al., 2000; Zhang and Hewitt, 2003). However, it has only been used on dip-

loid individuals, whose haplotypes fail to separate on acrylamide gel with denaturing conditions (Ortí et al., 1997; Plomion et al., 1999; Meusnier et al., 2002; Godinho et al., 2006). As far as we know, this is the first reported attempt to use SSCP on a cloned polyploid DNA fragment in order to discriminate different copies in a given polyploid species (Fig. 2). This discrimination allowed us to reduce our sequencing efforts to elucidate the origin of the *Fragaria* polyploid species by sampling a representative number of different haplotypes.

The five tetraploid species, *F. orientalis*, *F. corymbosa*, *F. gracilis*, *F. moupinensis* and *F. tibetica* are distributed into two clades from both GBSSI-2 and DHAR sequences (Figs. 6 and 7), which suggests at least two independent events of polyploidization. The first clade Y included only the tetraploid *F. orientalis*, which shows a typical Eurasian-American distribution, whereas the second clade X is composed of the other four tetraploid species, which are distributed today in East and Southeast Asia. Within the subclade Y1, the grouping of *F. orientalis* with the diploid species *F. vesca* and *F. mandshurica* is consistent with previous results from cpDNA and rDNA analyses (Potter et al., 2000). Based on present data, the genomic composition of *F. orientalis* could be Y1Y1Y1Y1 or Y1'Y1'Y1''Y1'' in auto- or allopolyploid hypotheses, in which Y1 would correspond to *F. vesca* or *F. mandshurica* genome, and Y1' and Y1'' would represent the *F. vesca* and *F. mandshurica* genomes (Fig. 9). Contribution of *F. mandshurica* as one of the parent donor of *F. orientalis* is strengthened by the evidence of overlapping geographical distribution (Eastern Asia, Manchuria and Korea) between these two species (Staudt, 1989, 2003). The other four tetraploid species (*F. corymbosa*, *F. gracilis*, *F. moupinensis* and *F. tibetica*) are clearly related to the well-supported diploid gene pool complex of the subclade X1 represented by *F. nipponica*, *F. nubicola*, *F. pentaphylla* and *F. yezoensis* (Figs. 6 and 7). Although the sequence divergence among haplotypes within clade X1 was too low to allow an accurate identification of the diploid parental genomes of the tetraploid species, there are moderately supported clues for relationships between diploid and tetraploid species. From our phylogenetic analyses, the diploid *F. pentaphylla* or *F. nubicola* could be one of the potential ancestral candidates of the tetraploids *F. moupinensis* and *F. tibetica*, respectively. The other possible diploid candidates, if any, remain obscure, making it diffi-

cult to draw inferences of the auto- versus allopolyploid formation of these tetraploid species. Therefore, based on present data, the genomic composition of the four tetraploid species, *F. corymbosa*, *F. gracilis*, *F. moupinensis* and *F. tibetica*, could be X1X1X1X1 or X1'X1'X1''X1'' in auto- or allopolyploid hypotheses, in which X1 would represent only one diploid genome belonging to the subclade X1, and X1' and X1'' would represent two different diploid genomes of the subclade X1 (Fig. 9).

Our results using GBSSI-2 sequences support an allopolyploid origin of the hexaploid *F. moschata*, since its copies were found in two subclades, the subclade Y1 represented by *F. vesca* and *F. mandshurica* and the subclade Y2 represented by *F. viridis*. However, this allopolyploid origin was not corroborated by the DHAR data, in which only one copy linked to *F. vesca* and *F. mandshurica* (subclade Y1) was recovered. The failure to recover a copy that may link *F. viridis* (subclade Y2) to *F. moschata*, despite using other primer pairs and extensive cloning, could be due to PCR selection, mutations within homoeologous primer sites, large inserts in one copy or physical elimination of one homoeologous copy (Cronn et al., 1999; Shaked et al., 2001; Kashkush et al., 2002). The involvement of *F. viridis* in the origin of the hexaploid *F. moschata* is strongly supported by previous analyses of the *psbJ-psbL* and *rpl20-rps18* intergenic cpDNA regions (Lin and Davis, 2000). In addition, these results suggest *F. viridis* as the female donor. Furthermore, the allopolyploidy of *F. moschata* has been suggested by Staudt (1959) based on morphological and geographical observations. He proposed that the hexaploid *F. moschata* came from a natural cross between the diploid species *F. vesca* and *F. viridis*, which co-occur in overlapping geographical areas (Turczaninov, 1969; Staudt, 2003). The unreduced gamete of one parent would have provided two haploid sets of chromosomes, followed by doubling of the resulting triploids. As a consequence, the genomic constitution of *F. moschata* could be either Y1Y1Y1Y1Y2Y2 or Y1Y1Y2Y2Y2Y2, with *F. viridis* being the most likely maternal donor (Fig. 9).

Using both phylogenetic analyses, the distribution of copies of each of the three octoploid species, *F. chilensis*, *F. iturupensis*, and *F. virginiana*, into the two lineages Y1 and Z gives evidence of their allopolyploid origin. These three species resulted from hybridization events that combined genomes originating from

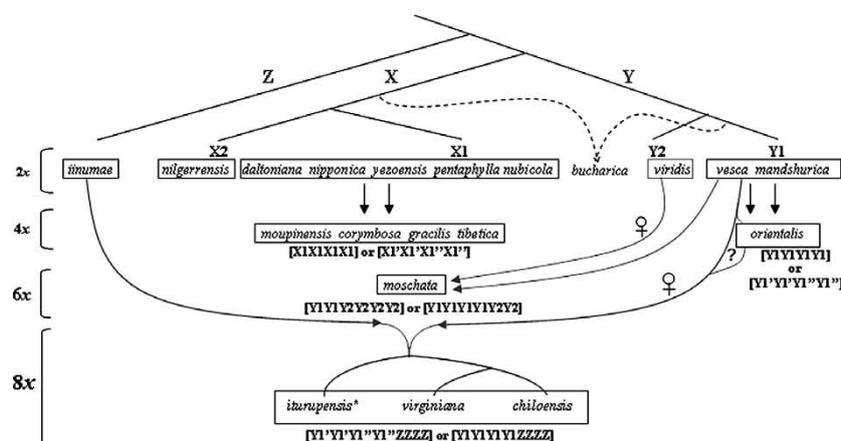


Fig. 9. Evolutionary history of diploid and polyploid *Fragaria* species, as inferred from GBSSI-2 and DHAR nuclear genes sequences. On each line is represented species from a specific ploidy level ($2n = 2x, 4x, 6x,$ and $8x$). The genomic and subgenomic entities (X1, X2, Y1, Y2 and Z) constituting the *Fragaria* genomic pool are indicated on the corresponding branches. Dashed lines indicate the hypothetical hybrid origin of *F. bucharica*. For the tetraploid species, an eventual allopolyploid origin from two species belonging to the same subgenomic entity (X1 or Y1) is indicated by the addition of an accent after the name of the genome (X1', Y1'). The genome origin of the allopolyploid species is represented by grey lines. The origin of the maternal genome is indicated by the female symbol, according to suggestions from plastid data (Potter et al., 2000). The hypothetical genomic composition of each polyploid species is given between brackets. The question mark points out the possible contribution of *F. orientalis* to the genome constitution of the octoploid species. The asterisk symbol indicates that two ploidy levels (octoploid and decaploid) have been reported for *F. iturupensis* (Staudt, 1973; Hummer et al., in press).

the subclade Y1 represented by the two diploid species *F. vesca* and *F. mandshurica* and the clade Z represented by *F. iinumae* (Figs. 6, 7 and 9). These results lend strong support to previous hypotheses on the origin of the octoploid species based on cytological (Federova, 1946; Senanayake and Bringham, 1967) or molecular data (unpublished results cited in Folta and Davis, 2006). However, the suggestion of a possible contribution of *F. bucharica* to the octoploid formation (Folta and Davis, 2006; Shulaev et al., 2008) found no supporting evidence from either *GBSSI-2* or *DHAR* sequence data. Interestingly, previous cpDNA data from Potter et al. (2000) showed that the octoploid species *F. virginiana*, *F. chiloensis* and the cultivated strawberry, *F. x ananassa*, share a common plastid genome with the diploids, *F. vesca* and *F. mandshurica*. Taken together, all data strongly support the concept that the “*vesca-mandshurica*” genomic pool (Y1) is very likely the maternal genome donor in the allopolyploidisation process of the octoploid strawberries and that *F. iinumae* is involved as paternal parent. From those results and from the observation that polyploidy and speciation in the Rosaceae family are linked through the regular production of unreduced gametes (Dickinson et al., 2007), the octoploid species may have arisen by fusion of unreduced gametes of a tetraploid maternal donor from clade Y1 and a tetraploid paternal donor from clade Z. Accordingly, the genomic formula of the tetraploid maternal donor would be Y1Y1Y1Y1 or Y1'Y1'Y1'Y1', as hypothesized above for *F. orientalis*, which then appears as a potential ancestral candidate to the octoploid species. On the other side, the genomic composition of the other ancestral tetraploid candidate would be most presumably ZZZZ. However, no tetraploid species derived from the diploid *F. iinumae* has been detected to date. Based on present data, genomic formula for the octoploid species (*F. iturupensis*, *F. virginiana* and *F. chiloensis*) may be hypothesized as follows: Y1Y1Y1Y1ZZZZ or Y1'Y1'Y1'Y1'ZZZZ. This genomic composition needs however to be further adjusted to each species, especially in the case of *F. iturupensis* for which both octoploid and decaploid numbers have been reported (Staudt, 1973; Hummer et al., in press). A detailed survey at the population level is needed to provide more accurate genetic and genomic information on this species, which has most probably played an important role in the origin of the present polyploid New World strawberries. In any case, present molecular data clearly demonstrate a common reticulate origin of the three highest polyploid *Fragaria* species. Additionally, our results point to the particular phylogenetic position of *F. iturupensis* haplotypes in the Z and Y1 lineages (see Figs. 6 and 7), which is suggestive of an early origin comparative to the American octoploids. Moreover, geographic distribution in Northeastern Asia also suggests *F. iturupensis* as part of the allopolyploid genomic pool from which originated the polyploid genotypes, prior to spreading across the Bering Strait to Northwestern North America. Following this migration, the octoploid populations extended their distribution and diversified southward, as *F. chiloensis*, and eastward and southward, as *F. virginiana*, where they adapted to moist and dry environments, respectively, (Harrison et al., 1997b; Potter et al., 2000). Additional variable molecular markers and extensive population sampling are needed to test this phylogeographic pattern and the unique versus multiple origins of the octoploid *Fragaria* species.

4.3. Evolution of orthologous and homoeologous *GBSSI-2* and *DHAR* genes in allo-octoploid *Fragaria* species

As gene duplications in polyploid species result in functional redundancy, differential selective pressure may act on the duplicated copies (Lynch and Conery, 2000; Lynch and Force, 2000; Hovav et al., 2008; Flagel et al., 2008). We estimated the evolution of the duplicated copies in the octoploid species by comparing the selective pressure between orthologous and homoeologous

GBSSI-2 and *DHAR* sequences in allo-octoploid species (Table 3). No significant difference of the evolutionary rate was observed between the homoeologous and the orthologous sequences, although the homoeologous sequences seemed to evolve faster than orthologous sequences. In addition to a differential selective pressure, one or many homoeologous copies can accumulate considerable mutations within the coding or regulatory regions (Force et al., 1999; Lynch and Force, 2000; Moore and Purugganan, 2005; Grover et al., 2007). Although no relaxation of selective constraints following genome duplication was observed on the genes studied based on Ka/Ks comparisons, two independent deletion events, leading to a pseudogene and a truncated gene, have been encountered in the coding sequences of *F. virginiana* and *F. chiloensis* *DHAR* copies (Fig. 8). Each deletion event was specific to one octoploid species, indicating their occurrence during the divergence of *F. virginiana* and *F. chiloensis* rather than just after the allopolyploidization event. Such reduction of genomic redundancy may have contributed to the diploidization process during evolution of the polyploid (Paterson et al., 2005; Comai, 2005). It has been widely shown that duplicated copies can be lost, silenced, undergo sub-functionalisation or acquire novel functions (Blanc and Wolfe, 2004; Paterson et al., 2004; Adams and Wendel, 2005; Chen and Ni, 2006; Hovav et al., 2008; Flagel et al., 2008). It would be of interest to further investigate whether the function of this haplotype has been retained, modified or lost.

Finally, the two nuclear genes *GBSSI-2* and *DHAR* investigated in this study provided new insights on the main genomic entities (X, Y, Z) constituting the *Fragaria* genomic pool and on the origin of the polyploid species. The data clearly emphasized a reticulate evolutionary pattern (hybridization and/or polyploidization) within genus *Fragaria*. Accordingly, new hypotheses are suggested and summarized here regarding relationships, mode of formation and origins of species, based on data available from this study and from the literature (cited above). The best understanding of the phylogenetic relationships among taxa and their genomic constitution in the genus *Fragaria* will be of great importance to light genomic studies and to facilitate the use of the natural genetic diversity in the strawberry breeding programs.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Barbara J. Smith (USDA-ARS, Poplarville) for her English text corrections. The authors are grateful to the Federal Research Centre for Cultivated Plants (Dresden, Germany) and the National Clonal Germplasm Repository (Corvallis, US) for providing *Fragaria* and *Potentilla* accessions. Additional thanks to Mathieu Fouche and Jerome Pouzoulet for their help in the design of low-copy primer pairs, and to Daniel Roca and Nicole Pedepat for their assistance in the greenhouse. This work was supported by grants from the Région Aquitaine, INRA and Cifre-Création Variétale Fraises Rouges (FR). We thank Dr K. Hummer (USDA-ARS, Corvallis) for information on the ploidy level of *F. iturupensis*, and to the anonymous reviewers for their constructive comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ympev.2008.12.024.

References

- Adamowicz, S.J., Gregory, T.R., Marinone, M.C., Hebert, P.D.N., 2002. New insights into the distribution of polyploid *Daphnia*: the Holarctic revisited and Argentina explored. *Mol. Ecol.* 11, 1209–1217.
- Adams, K.L., Wendel, J.F., 2005. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends Genet.* 21, 539–543.

- Adams, K.L., Cronn, R., Percifield, R., Wendel, J.F., 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4649–4654.
- Ainouche, M.L., Fortune, P.M., Salmon, A., Parisod, C., Grandbastien, M.A., Fukunaga, K., Ricou, M., Misset, M.T., in press. Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae). *Biol. Invasions*, doi:10.1007/s10530-008-9383-2.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R., Dvorak, J., 2007. Mechanisms and rates of birth and death of dispersed duplicated genes during the evolution of a multigene family in diploid and tetraploid wheats. *Mol. Biol. Evol.* 24, 539–550.
- Albertin, W., Balliau, T., Brabant, P., Chevre, A.-M., Eber, F., Malosse, C., Thiellement, H., 2006. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* 173, 1101–1113.
- Álvarez, I., Wendel, J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417–434.
- Barriel, V., 1994. Phylogénies moléculaires et insertions-délétions de nucléotides. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris. Sciences de la Vie* 317, 693–701.
- Blanc, G., Wolfe, K.H., 2004. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16, 1667–1678.
- Blanc, G., Hokamp, K., Wolfe, K.H., 2003. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res.* 13, 137–144.
- Bowers, J.E., Chapman, B.A., Rong, J., Paterson, A.H., 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422, 433–438.
- Brochmann, C., Brysting, A.K., Alsos, I.G., Borgen, L., Grundt, H.H., Scheen, A.C., Elven, R., 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 521–536.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M.F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhou, B., 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the *Hardness* locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17, 1033–1045.
- Chen, Z.J., Ni, Z., 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* 28, 240–252.
- Chen, Z., Young, T.E., Ling, J., Chang, S.-C., Gallie, D.R., 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3525–3530.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–846.
- Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens, Y., Byers, B., 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell* 12, 1551–1568.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Creer, S., 2007. Choosing and using introns in molecular phylogenetics. *Evol. Bioinform.* 3, 99–108.
- Cronn, R., Wendel, J.F., 1998. Simple methods for isolating homeologous loci from allopolyploid genomes. *Genome* 41, 756–762.
- Cronn, R.C., Small, R.L., Wendel, J.F., 1999. Duplicated genes evolve independently after polyploid formation in cotton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14406–14411.
- Cui, L., Wall, P.K., Leebens-Mack, J.H., Lindsay, B.G., Soltis, D.E., Doyle, J.J., Soltis, P.S., Carlson, J.E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V.A., Ma, H., dePamphilis, C.W., 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* 16, 738–749.
- Curole, J.P., Hedgecock, D., 2005. Estimation of preferential pairing rates in second-generation autotetraploid pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Genetics* 171, 855–859.
- Dickinson, T.A., Lo, E., Talent, N., 2007. Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant Syst. Evol.* 266, 59–78.
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R., 2002. Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859–30869.
- Dowrick, G.J., Williams, H., 1959. Species crosses in the genus *Fragaria*. John Innes Horticultural Institution, 9–10.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., Harbison, C., 2003. Chloroplast-expressed glutamine synthetase in glycine and related Leguminosae: phylogeny, gene duplication, and ancient polyploidy. *Syst. Bot.* 28, 567–577.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., Rauscher, J.T., Brown, A.H.D., 2004. Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (Glycine subgenus Glycine). *New Phytol.* 161, 121–132.
- Dry, I., Smith, A., Edwards, A., Bhattacharyya, M., Dunn, P., Martin, C., 1992. Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato. *Plant J.* 2, 193–202.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Von Heijne, G., 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978–984.
- Eriksson, T., Hibbs, M.S., Yoder, A.D., Delwiche, C.F., Donoghue, M.J., 2003. The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the TRNL/F region of chloroplast DNA. *Int. J. Plant Sci.* 164, 197–211.
- Evans, R.C., Campbell, C.S., 2002. The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated *GBSSI* genes. *Am. J. Bot.* 89, 1478–1484.
- Evans, R.C., Alice, L.A., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Dickinson, T.A., 2000. Granule-bound starch synthase (*GBSSI*) gene in the Rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 388–400.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315–320.
- Federova, N.J., 1946. Crossability and phylogenetic relations in the main European species of *Fragaria*. (*Compt. Rend. Doklady*) Acad. Sci. USSR 52, 545–547.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Flagel, E., Udall, J., Nettleton, D., Wendel, J.F., 2008. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biol.* 6, 16.
- Folta, K.M., Davis, T.M., 2006. Strawberry genes and strawberry genomics. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 399–415.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.-I., Postlethwait, J., 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531–1545.
- Fortune, P.M., Pourtau, N., Viron, N., Ainouche, M.L., 2008. Molecular phylogeny and reticulate origins of the polyploid *Bromus* species from section *Genea* (POACEAE). *Am. J. Bot.* 95, 454–464.
- Fortune, P.M., Schierenbeck, K.A., Ainouche, A.K., Jacquemin, J., Wendel, J.F., Ainouche, M.L., 2007. Evolutionary dynamics of *Waxy* and the origin of hexaploid *Spartina* species (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 1040–1055.
- Gaeta, R.T., Pires, J.C., Iniguez-Luy, F., Leon, E., Osborn, T.C., 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* 19, 3403–3417.
- Ghiselli, F., Milani, L., Scali, V., Passamonti, M., 2007. The *Leptynia hispanica* species complex (Insecta Phasmida): polyploidy, parthenogenesis, hybridization and more. *Mol. Ecol.* 16, 4256–4268.
- Godinho, R., Domingues, V., Crespo, E.G., Ferrand, N., 2006. Extensive intraspecific polymorphism detected by SSCP at the nuclear *C-mos* gene in the endemic Iberian lizard *Lacerta schreiberi*. *Mol. Ecol.* 15, 731–738.
- Grover, C.E., Kim, H., Wing, R.A., Paterson, A.H., Wendel, J.F., 2007. Microcolinearity and genome evolution in the *AdhA* region of diploid and polyploid cotton (*Gossypium*). *Plant J.* 50, 995–1006.
- Gu, X., Wang, Y., Gu, J., 2002. Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate evolution. *Nat. Genet.* 31, 205–209.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* 41, pp. 95–98.
- Harrison, R.E., Luby, J.J., Furnier, G.R., 1997a. Chloroplast DNA restriction fragment variation among strawberry (*Fragaria* spp.). *Taxa. J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122, 63–68.
- Harrison, R.E., Luby, J.J., Furnier, G.R., Hancock, J.F., 1997b. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. *Am. J. Bot.* 84, 612–620.
- Holloway, A.K., Cannatella, D.C., Gerhardt, H.C., Hillis, D.M., 2006. Polyploids with different origins and ancestors form a single sexual polyploid species. *Am. Nat.* 167, E88–E101.
- Hovav, R., Udall, J.A., Rapp, R., Flagel, L., Wendel, J.F., 2008. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. *PNAS* 105, 6191–6195.
- Hummer, K., Nathewet, P., Yanagi, T. in press. Decaploidy in *Fragaria iturupensis* Staudt (Rosaceae). *Am. J. Bot.*
- Ingram, A.L., Doyle, J.J., 2003. The origin and evolution of *Eragrostis tef* (Poaceae) and related polyploids: evidence from nuclear *Waxy* and plastid *rps16*. *Am. J. Bot.* 90, 116–122.
- Kashkush, K., Feldman, M., Levy, A.A., 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160, 1651–1659.
- Keyte, A.L., Percifield, R., Liu, B., Wendel, J.F., 2006. Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Heredity* 97, 444–450.
- Leggatt, R.A., Iwama, G.K., 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13, 237–246.
- Lihová, J., Shimizub, K.K., Marhold, K., 2006. Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (Brassicaceae): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 759–786.
- Lin, J., Davis, T.M., 2000. S1 analysis of long PCR heteroduplexes: detection of chloroplast indel polymorphisms in *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.* 101, 415–420.
- Lynch, M., Conery, J.S., 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151–1155.
- Lynch, M., Force, A., 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459–473.
- Mason-Gamer, R.J., 2001. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences. *Syst. Bot.* 26, 757–768.
- Mason-Gamer, R.J., 2004. Reticulate evolution, introgression, and intertribal gene capture in an Allohexaploid Grass. *Syst. Biol.* 53, 25–37.
- McLysaght, A., Hokamp, K., Wolfe, K.H., 2002. Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat. Genet.* 31, 200–204.
- Meusnier, I., Valero, M., Destombe, C., Gode, C., Desmarais, E., Bonhomme, F., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2002. Polymerase chain reaction-single strand conformation

- polymorphism analyses of nuclear and chloroplast DNA provide evidence for recombination, multiple introductions and nascent speciation in the *Caulerpa taxifolia* complex. *Mol. Ecol.* 11, 2317–2325.
- Moore, R., Purugganan, M., 2005. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 122–128.
- Mort, M.E., Archibald, J.K., Randle, C.P., Levens, N.D., O'Leary, T.R., Topalov, K., Wiegand, C.M., Crawford, D.J., 2007. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *Am. J. Bot.* 94, 173–183.
- Ohno, S., 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.
- Ortí, G., Hare, M.P., Avise, J.C., 1997. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol. Ecol.* 6, 575–580.
- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V., Martienssen, R.A., 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19, 141–147.
- Otto, S.P., Whitton, J., 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 40, 401–437.
- Panopoulou, G., Hennig, S., Groth, D., Krause, A., Poustka, A.J., Herwig, R., Vingron, M., Lehrach, H., 2003. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an Amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Res.* 13, 1056–1066.
- Paterson, A.H., 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. *Genetica* 123, 191–196.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Chapman, B.A., 2004. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9903–9908.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Van de Peer, Y., Vandepoole, K., 2005. Ancient duplication of cereal genomes. *New Phytol.* 165, 658–661.
- Plomion, C., Hurme, P., Frigerio, J.M., Ridolfi, M., Pot, D., Pionneau, C., Avila, C., Gallardo, F., David, H., Neutelings, G., Campbell, M., Canovas, F.M., Savolainen, O., Bodénès, C., Kremer, A., 1999. Developing SSCP markers in two *Pinus* species. *Mol. Breed.* 5, 21–31.
- Pontes, O., Neves, N., Silva, M., Lewis, M.S., Madlung, A., Comai, L., Viegas, W., Pikaard, C.S., 2004. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 18240–18245.
- Popp, M., Oxelman, B., 2007. Origin and evolution of North American polyploid Silene (Caryophyllaceae). *Am. J. Bot.* 94, 330–349.
- Potter, D., Luby, J.J., Harrison, R.E., 2000. Phylogenetic relationships among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Syst. Bot.* 25, 337–348.
- Potter, D., Gao, F., Esteban Bortiri, P., Oh, S.-H., Baggett, S., 2002. Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast matK and trnL-trnF nucleotide sequence data. *Plant Syst. Evol.* 77–89.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., Campbell, C.S., 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst. Evol.* 266, 5–43.
- Rousseau-Gueutin, M., Lerceteau-Köhler, E., Barrot, L., Sargent, D.J., Monfort, A., Simpson, D., Arùs, P., Denoyes-Rothan, B., 2008. Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* 179, 2045–2060.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Salmon, A., Ainouche, M.L., Wendel, J.F., 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol. Ecol.* 14, 1163–1175.
- Sang, T., 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 121–147.
- Schranz, M.E., Osborn, T.C., 2004. De novo variation in life history traits and responses to growth conditions of resynthesized polyploid *Brassica napus* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 91, 174–183.
- Senanayake, Y.D.A., Bringham, R.S., 1967. Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. *J. Bot.* 54, 221–228.
- Senchina, D.S., Alvarez, I., Cronn, R.C., Liu, B., Rong, J., Noyes, R.D., Paterson, A.H., Wing, R.A., Wilkins, T.A., Wendel, J.F., 2003. Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in gossypium. *Mol. Biol. Evol.* 20, 633–643.
- Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M., Levy, A.A., 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13, 1749–1759.
- Shimaoka, T., Yokota, A., Miyake, C., 2000. Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 41, 1110–1118.
- Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle, H.S., Folta, K.M., Iezzoni, A., Main, D., Arùs, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T.M., Gardiner, S.E., Potter, D., Veilleux, R.E., 2008. Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiol.* 147, 985–1003.
- Small, R.L., Wendel, J.F., 2000. Phylogeny, duplication, and intraspecific variation of Adh sequences in new world diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 73–84.
- Small, R.L., Cronn, R.C., Wendel, J.F., 2004. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* 17, 145–170.
- Small, R.L., Ryburn, J.A., Cronn, R.C., Seelanan, T., Wendel, J.F., 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *Am. J. Bot.* 85, 1301–1315.
- Smedmark, J.E.E., Eriksson, T., Evans, R.C., Campbell, C.S., 2003. Ancient allopolyploid speciation in Geinae (Rosaceae): evidence from nuclear granule-bound starch synthase (GBSSI) gene sequences. *Syst. Biol.* 52, 374–385.
- Smith, R.F., Wiese, B.A., Wojzynski, M.K., Davison, D.B., Worley, K.C., 1996. BCM search launcher—an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res.* 6, 454–462.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Pires, J.C., Kovarik, A., Tate, J.A., Mavrodiev, E., 2004. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biol. J. Linnean Soc.* 82, 485–501.
- Spring, J., 2002. Genome duplication strikes back. *Nat. Genet.* 31, 128–129.
- Staudt, G., 1959. Cytotaxonomy and phylogenetic relationships in the genus *Fragaria*. Ninth International Botanical Congress, Montréal, pp. 377.
- Staudt, G., 1962. Taxonomic studies in the genus *Fragaria*. Typification of *Fragaria* species known at the time of Linnaeus. *Can. J. Bot.* 40, 869–886.
- Staudt, G., 1973. *Fragaria iturupensis*, eine neue Erdbeerart aus Ostasien. *Willdenowia* 7, 101–104.
- Staudt, G., 1989. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Hort.* 265, 23–34.
- Staudt, G., 1999. Notes on Asiatic *Fragaria* species: *Fragaria nilgerrensis* Schltdl. ex J. Gay. *Bot. Jahrb. Syst.* 121, 297–310.
- Staudt, G., 2003. Notes on Asiatic *Fragaria* species: III. *Fragaria orientalis* Losinsk and *Fragaria mandshurica* spec. nov. *Botanische Jahrbucher fur Systematik* 124, 397–419.
- Staudt, G., 2005. Notes on Asiatic *Fragaria* species: IV. *Fragaria iinumae*. *Botanische Jahrbucher fur Systematik* 126, 163–175.
- Staudt, G., 2006. Himalayan species of *Fragaria* (Rosaceae). *Botanische Jahrbucher fur Systematik* 126, 483–508.
- Staudt, G., 2008. Strawberry biogeography, genetics and systematics. In VI International symposium, 3–7 March 2008, Huelva.
- Staudt, G., Dickoré, W.B., 2001. Notes on Asiatic *Fragaria* species: *Fragaria pentaphylla* Losinsk and *Fragaria tibetica* spec. nov. *Bot. Jahrb. Syst.* 123, 341–354.
- Staudt, G., Olbricht, K. in press. Notes on Asiatic *Fragaria* species V: *Fragaria nipponica* Makino and *Fragaria iturupensis* Staudt. *Bot. Jahrb. Syst.*
- Steele, P.R., Guisinger-Bellian, M., Linder, C.R., Jansen, R.K., 2008. Phylogenetic utility of 141 low-copy nuclear regions in taxa at different taxonomic levels in two distantly related families of rosids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 1013–1026.
- Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J., Taylor, A.C., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9, 1699–1710.
- Swofford, D.L., 2001. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F., 1993. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* 135, 599–607.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tate, J.A., Ni, Z., Scheen, A.C., Koh, J., Gilbert, C.A., Chen, Z.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2006. Evolution and expression of homoeologous loci in *Tragopogon* miscellus (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics* 173, 1599–1611.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463–467.
- Turczaninow, N., 1969. *Flora Baicalensis-Dahurica, Seu descriptio plantarum in regionibus cis- et transbaicalensibus atque in Dahuria sponte nascentium*. Ed. Asher, Amsterdam.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., DeJardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Überbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D., 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596–1604.
- Udall, J.A., Wendel, J.F., 2006. Polyploidy and crop improvement. *Crop Sci.* 46, S3–S14.
- Urano, J.I., Nakagawa, T., Maki, Y., Masumura, T., Tanaka, K., Murata, N., Ushimaru, T., 2000. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 466, 107–111.

- Wendel, J.F., 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42, 225–249.
- Wendel, J.F., Doyle, J.J., 1998. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. In: Soltis, D., Soltis, P., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants II*. Chapman and Hall, New-York, pp. 265–296.
- Winkworth, R.C., Donoghue, M.J., 2004. *Viburnum* phylogeny: evidence from the duplicated nuclear gene GBSSI. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 109–126.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12, 563–584.
- Zou, L.P., Li, H.X., Ouyang, B., Zhang, J.H., Ye, Z.B., 2006. Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. *Plant Sci.* 170, 120–127.

Etude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la remontée florale chez le fraisier (*Fragaria*)

La transition florale est un événement clef dans la vie d'une plante. Chez le fraisier, la compréhension des mécanismes génétiques de cette transition est un enjeu majeur pour mieux contrôler la production de fruits. La transition florale peut être étudiée à travers la remontée florale, qui est la capacité d'une plante à fleurir tout au long de la période végétative. Le fraisier cultivé octoploïde, *F. x ananassa*, comme le fraisier diploïde, *F. vesca*, présentent des génotypes remontants capables de fleurir en continu. L'objectif de cette thèse est de comprendre le déterminisme génétique et moléculaire de la remontée florale chez *Fragaria*.

Ce travail a montré que chez les fraisiers diploïde et octoploïde, le caractère 'remontée florale' est contrôlé par deux verrous génétiques différents localisés à des positions non orthologues. Chez le fraisier diploïde, le gène *FvKSN* responsable de la remontée florale a été identifié et code pour un homologue du répresseur floral *TFL1*. Chez les génotypes remontants, ce gène présente une délétion dans la partie codante conduisant à une protéine non fonctionnelle, incapable de réprimer la floraison. Chez le fraisier octoploïde, le QTL majeur détecté contrôlant la remontée florale est lié à la production de stolons de manière antagoniste, suggérant l'existence d'une région génomique où s'exerce une compétition entre multiplication végétative et la reproduction sexuée. Cette région génomique comprend plusieurs gènes candidats intéressants dont *FT*, activateur de la floraison.

Une hypothèse suggérée par ce travail est que chez le fraisier, l'alternance entre phase végétative et phase reproductive est liée à l'équilibre entre les gènes *FvKSN*, homologue de *TFL1*, et *FvFT*, homologue de *FT*. La remontée florale serait la conséquence d'une modification de cet équilibre entre ces deux gènes en faveur du développement reproductif.

Mots clefs : transition florale, remontée florale, approche QTL, approche gène candidat, *Fragaria*

Study and understanding of genetic and molecular mechanism of the continuous flowering in strawberry (*Fragaria*)

The floral transition is a key event in plant life. In strawberry, understanding the genetic mechanisms of floral transition is a major issue for better control of fruit production. This transition is studied through the continuous flowering, which is the ability to flower throughout the growing season. Both, the octoploid cultivated strawberry, *F. x ananassa*, as the woody diploid strawberry, *F. vesca*, displayed continuous flowering genotypes. The objective of this work is to decipher the genetic and molecular mechanism of the continuous flowering in *Fragaria*.

This work has shown that in diploid and octoploid strawberry the continuous flowering is controlled by two different genetic 'keys' located at non-orthologous position. In diploid strawberry, the gene *FvKSN* responsible of continuous flowering was identified and encodes a homologous to the *TFL1* floral repressor. In the continuous flowering genotypes, this gene has a deletion in the coding region leading to a nonfunctional protein unable to repress flowering. In the octoploid strawberry, the major QTL controlling both the recurrent flowering and the runner production was identified. These traits were antagonist, which suggests competition between vegetative propagation and sexual reproduction in this region. This genomic region contains several interesting candidate genes whose *FT*, an activator of flowering.

A hypothesis could be proposed. In strawberry, the switch between vegetative and reproductive phase is linked to balance between two genes, *FvKSN*, homologous to *TFL1* and *FvFT* homologous to *FT*. Continuous flowering would be the consequence of balance modification between this two genes to the benefit of floral development.

Key words: floral transition, continuous flowering, QTL approach, candidate genes, *Fragaria*
