



Vers une meilleure compréhension du mode d'action des strigolactones et de leur interaction avec les autres hormones du développement

Alexandre De de Saint Germain Saint Germain

► To cite this version:

Alexandre De de Saint Germain Saint Germain. Vers une meilleure compréhension du mode d'action des strigolactones et de leur interaction avec les autres hormones du développement. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. $\langle$ NNT : 2012PA112326 $\rangle$. $\langle$ tel-01089021 $\rangle$

HAL Id: tel-01089021

<https://theses.hal.science/tel-01089021v1>

Submitted on 1 Dec 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Discipline : Biologie

Par

Alexandre de SAINT GERMAIN

Vers une meilleure compréhension du mode d'action des strigolactones et de leur interaction avec les autres hormones du développement

Soutenue le **30 Novembre 2012** devant le jury d'examen :

Michel DRON
Mondher BOUZAYEN
Michel HERNOULD
Florian FRUGIER
Colin TURNBULL
Catherine RAMEAU

Professeur, IBP de Orsay – Président du jury
Professeur, INRA de Toulouse – Rapporteur
Professeur, Université de Bordeaux – Rapporteur
Directeur de recherche, ISV de Gif-sur-Yvette – Examineur
Professeur, Imperial College London (Grande-Bretagne) – Examineur
Directrice de recherche, INRA de Versailles – Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord je tiens à exprimer mes plus profonds remerciements et ma plus chaleureuse amitié à Catherine Rameau qui a assuré la direction de ma thèse. Ces quatre années passées à tes côtés, ont été riches d'enseignement et marquées d'un travail passionnant et fructueux. Merci pour la confiance que tu m'accordes chaque jour dans mes choix de recherche, parfois peut-être trop ambitieux. Merci de m'avoir fait découvrir le métier de chercheur dans de si bonnes conditions. Et surtout merci pour la correction du manuscrit.

Un grand merci à Yvan Kraepiel de m'avoir orienté vers le laboratoire de Catherine, merci également pour tes conseils avisés dans mes choix de carrière.

Merci à Sandrine Bonhomme pour ton soutien de tous les jours et pour tes encouragements, ainsi que pour le temps passé à corriger ce manuscrit. Ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés dans l'équipe « Pois ».

Merci à Nils Braun d'avoir été mon premier maître de stage et de m'avoir donné l'envie d'encadrer d'autres stagiaires à mon tour. Merci pour le temps que tu as passé à m'initier aux techniques de biologie moléculaire.

Merci à Jean Paul Pillot pour ton sérieux dans la culture des plantes, ton grand sens de l'observation et toutes tes autres qualités professionnelles.

Merci à Beate pour tes conseils en biologie moléculaire.

Merci également à tous nos collaborateurs : à notre brillant chimiste et notre « dealer » officiel de strigolactones François-Didier Boyer (alias FDB), à Bernard Rousseau et à Sébastien pour leur accueil au CEA et pour la mise en place des manipulations. Merci Bernard pour ton humour ! Merci à Yves Dessaux pour ses conseils en termes d'enzymologie. Merci à Abdel et à Marion de nous avoir fait profiter de leurs compétences et de leur plateforme de TILLING.

Je voudrais remercier tout particulièrement le Pr. Christine Beveridge de l'Université du Queensland de Brisbane de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je la remercie pour tous ses conseils scientifiques, pour l'ensemble des discussions scientifiques passionnées et enthousiastes que nous avons pu avoir ensemble ainsi que pour l'accueil amical que j'ai reçu. Mes remerciements s'adressent également aux membres de son équipe et en tout premier lieu à Liz DUN et Phil BREWER, mais aussi Mike et Kerry pour leur bonne humeur communicative. Un grand merci à Mandy pour m'avoir accueilli à mon arrivée dans cet immense pays et de m'avoir appris les rudiments de la culture locale.

Je remercie très chaleureusement le Pr. John Ross de l'Université de Tasmanie pour son incroyable accueil et son amitié. Merci de m'avoir fait découvrir la Tasmanie qui est pour moi l'un de mes plus beaux souvenirs d'Australie. Merci pour les moments d'échanges scientifiques et humains. Merci également aux membres de son équipe Eloïse et Nathan, et aussi Jim Weller.

Je remercie les stagiaires que j'ai encadrés : Emeline Huvelle, Deborah Bellet, Jennifer Barboiron-Allègre, Allan de Carvahlo, Cindy Gassaut et Yasmine Ligerot qui ont tous participé activement à la réussite de ce projet de thèse avec beaucoup d'efficacité et de sympathie.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes du bâtiment 7 pour leurs conseils, leur sympathie et l'ambiance exceptionnelle de travail qui règne dans les laboratoires de notre bâtiment. Vous m'avez fait apprécier et découvrir la recherche telle que j'en rêvais : c'est-à-dire une atmosphère d'échanges, de curiosité et d'émulation scientifique. Merci donc à Hakim pour ses conseils en biochimie, à Nathalie pour son investissement dans les expériences de biochimie et l'ensemble des thésards avec qui j'ai passé de très bons moments, notamment lors des JJC du DGAP : Charlotte, Laurie, Nawel, Laurence, Nicolas G., Nicolas M., Hossein. Merci aux membres de l'équipe qui se sont succédé et que je n'ai pas encore remerciés : Amal, Soraya et bien sur l'irremplaçable Hélène.

Je salue toute l'équipe d'enseignement de biologie animale de L1, de la prépa CAPES d'Orsay et de la prépa AGREG d'Orsay avec qui j'ai effectué mon monitorat. Merci à Line Duportet, Florence Mougel, Solange Bertrand, Hélène Vincent-Schneider, Patrick Pla et Guislaine Refregier.

Merci à mes amis pour leur soutien de tous les jours et l'intérêt porté à mes travaux parfois sujet à quelques moqueries, encore merci pour ce surnom de « roi du petit pois » !

Un énorme merci à mes parents, et tout particulièrement à ma mère pour ses corrections. Merci à eux de m'avoir soutenu dans mes choix professionnels car certains furent difficiles. Merci à eux de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussé à toujours donner le meilleur de moi-même afin de réaliser mes projets.

Merci à la femme qui partage ma vie de m'avoir soutenu durant les moments de doutes et de stress.

Merci d'avoir toujours les mots justes. Merci pour ton amour qui me permet d'aller toujours plus loin. Je ne te remercierai jamais assez pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour.

Merci à ma grand-mère qui me manque terriblement, et qui n'a malheureusement pas eu la chance d'assister à ma soutenance. Je te dédie cette thèse.

Je présente par avance mes excuses aux personnes que j'aurais oubliées de remercier.

Enfin, je remercie Michel Dron, Mondher Bouzayen, Michel Hernould, Florian Frugier, Colin Turnbull et Catherine Bellini d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

A la mémoire de ma grand-mère

Sommaire

Introduction générale.....	3
I. L'origine de la diversité de l'architecture aérienne des végétaux	5
I. A. La croissance en hauteur des plantes.....	7
I. B. La ramification : une composante majeure de l'architecture végétale.	13
I. C. Le modèle pois.....	23
II. Les strigolactones, une nouvelle hormone contrôlant l'architecture végétale et notamment la ramification	31
II. A. L'histoire d'une découverte : l'importance de la génétique moderne associée à la physiologie.....	31
II. B. Un mode d'action des Strigolactones sur le contrôle de la ramification qui fait débat !37	
II. C. Les strigolactones, une hormone aux effets pléiotropes	41
III. Les strigolactones : des molécules de signalisation de la rhizosphère	45
III. A. Les strigolactones stimulent la ramification des hyphes des champignons endomycorhiziens à arbuscules	45
III. B. Les strigolactones stimulent la germination des graines de plantes parasites <i>Striga</i> et <i>Orobanche</i> (syn. <i>Phelipanche</i>)	47
III. C. Les strigolactones : un squelette commun et une variété de groupements.....	51
IV. La biosynthèse des strigolactones et sa régulation.....	57
IV. A. Les strigolactones sont des dérivés de caroténoïdes	57
IV. B. Les enzymes chloroplastiques qui clivent les caroténoïdes	59
IV. C. La régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse chloroplastique : CCD7, CCD8 et D27.....	63
IV. D. La régulation transcriptionnelle par les facteurs abiotiques : lumière et minéraux.....	65
IV. E. Les strigolactones : une molécule présente chez la plupart des plantes terrestres.	67
V. L'étude de la perception et de la transduction des strigolactones inspirée d'autres hormones	73
V. A. Identification de mutants insensibles aux strigolactones	73
V. B. MAX2 une protéine intégrant la perception de nombreux mécanismes/une protéine à multiples fonctions.....	75
V. C. La perception des hormones végétales faisant intervenir le protéasome.....	77
V. D. Hypothèse sur le mécanisme de perception des SL.....	81
VI. Objectifs de la thèse	83
Chapitre I : PsBRC1, un facteur de transcription contrôlant la ramification et dont l'expression est régulée par les strigolactones	89
I. Introduction.....	89

II. Article : The Pea TCP Transcription Factor <i>PsBRC1</i> Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching : Plant Physiology 2012 Jan;158(1):225-38.	91
III. Article : Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control : Plant Physiology 2012 Jan;158(1):487-98.	111
IV. Article : Dynamics of strigolactone function in pea : soumis dans Molecular Plant.	127
V. Article : Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching : Plant Physiology 2012 Aug;159(4):1524-44.....	167
VI. Conclusions et perspectives	195
Chapitre II : RMS3, un putatif récepteur des strigolactones	199
I. Introduction.....	199
II. Article : The pea <i>RMS3</i> gene encodes an α/β hydrolase involved in strigolactone response and controls a root-to-shoot mobile signal SL-independent (en préparation)	201
III. PERSPECTIVES.....	231
IV. <i>RMS3LIKE1</i> et <i>RMS3LIKE2</i> : deux homologues de <i>RMS3</i> aux fonctions inconnues	233
A. Matériel et méthodes.....	233
B. Résultats	237
C. Discussion	251
Chapitre III : Les strigolactones interviennent dans la régulation de la taille des plantes.....	255
Chapitre IV : Identification des homologues des gènes de biosynthèse des strigolactones chez le pois.	283
Avant-propos.....	283
I. Introduction.....	283
II. Matériel et méthodes.....	287
III. D27 une isomérase dont l'expression est finement régulée.....	291
A. Résultats	291
B. Discussion	295
IV. <i>MAX1</i> , une duplication du gène chez le pois qui complexifie la détermination du rôle de la protéine dans la biosynthèse des strigolactones.	299
A. Résultats	301
B. Discussion	311
V. <i>LBO1</i> , un bon candidat pour la réalisation des dernières étapes de la biosynthèse des strigolactones.	315
A. Résultats	315
B. Discussion	321
VI. Discussion sur la biosynthèse des strigolactones.....	323

Conclusion et perspectives	325
I. Vers une compréhension de la perception des strigolactones	325
II. Vers une compréhension de la dynamique de la croissance des plantes	329
III. Vers le développement de nouvelles applications.....	331
IV. Perspectives.....	337
Références	339
Annexes	351

Liste des figures

Introduction.

Figure 1. Diversité de l'architecture de l'appareil végétatif aérien de quelques plantes cultivées.....	2
Figure 2. Exemple de variations morphologiques chez des plants de riz issus d'expériences de mutagenèse par insertion d'ADN-T.....	2
Figure 3. Structure canonique des différentes phytohormones.....	4
Figure 4. Organisation de l'apex caulinaire et de la tige.....	6
Figure 5. Régulation de l'élongation de la tige par les gibbérellines (GA), les brassinostéroïdes (BR), l'auxine, les strigolactones (MAXs) et le cytosquelette	10
Figure 6 . Expérience de Snow (1937)	18
Figure 7. Réponse à l'évitement de l'ombre chez <i>Petunia hybrida</i>	20
Figure 8. Architecture d'une plante de pois.....	22
Figure 9. Illustration de la macrosynténie entre le pois et Medicago	26
Figure 10. Mutants hyperbranchés de différentes espèces.	30
Figure 11. Expériences de greffes avec les mutants <i>rms</i> de pois.....	32
Figure 12. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des strigolactones et de la perception incluant les enzymes et protéines impliquées.	32
Figure 13. Illustration de l'effet de l'application du GR24 sur la dormance des bourgeons axillaires de pois (plante sauvage et mutant <i>ccd8 (=rms1)</i>).	34
Figure 14. Effet du GR24 sur l'inhibition de la dormance des bourgeons axillaires des mutants <i>rms1</i> et <i>rms4</i>	34
Figure 15. Hypothèses sur la place des strigolactones dans le modèle du contrôle de la ramification	36
Figure 16. Effet des strigolactones sur les protéines PIN1.	38
Figure 17. Modèle du second messenger pour l'activation du bourgeon	38
Figure 18.Effet des strigolactones sur le système racinaire.....	40
Figure 19. Rôle des strigolactones dans la régulation du cambium	40
Figure 20. Illustration des différentes interactions entre la plante et les éléments de la rhizosphère.....	44
Figure 21. Etapes de la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscule	46
Figure 22. Stimulation de la ramification des hyphes chez le champignon <i>Gigaspora margarita</i> par une fraction contenant le 5-Déoxy-strigol	46
Figure 23. Plantes parasites <i>Striga hermonthica</i> sur maïs (gauche) et <i>Orobanche</i> sur carotte (droite).....	48
Figure 24. Répartition des zones les plus soumises à l'infestation par le striga en Afrique....	48
Figure 25. Cycle de vie de la plante parasite <i>Orobanche minor</i>	50
Figure 26. Structure chimique d'une strigolactone : le strigol.....	50
Figure 27. Structure des strigolactones naturelles identifiées actuellement chez les plantes et de l'analogue synthétique GR24.	52
Figure 28. Voie de biosynthèse des caroténoïdes et voies connexes chez <i>Arabidopsis</i>	56

Figure 29. Voie de biosynthèse de la carlactone, précurseur des strigolactones.	58
Figure 30. Modèle simplifié de la régulation de la biosynthèse des strigolactones et de la dormance des bourgeons axillaires chez le pois.	64
Figure 31. Modèle de contrôle de la quantité de strigolactones en réponse à une carence en phosphates.	66
Figure 32. Modèle de la diffusion des strigolactones dans le milieu qui régulent la densité des individus chez la mousse <i>Physcomitrella patens</i>	68
Figure 33. Proposition de schéma pour l'évolution des gènes liés aux strigolactones dans la Lignée Verte	70
Figure 34. Phylogénie des protéines MAX2 chez les plantes terrestres.	70
Figure 35. Structure chimique de 2 karrikinés actives en comparaison avec la strigolactone synthétique GR24.	74
Figure 36. Modèle d'action de la voie d'ubiquitination et dégradation des protéines via le complexe SCF.	78
Figure 37. Structure des protéines GID1, SLY1 et DELLA.	78
Figure 38. Schéma de la signalisation des gibbérellines	80
Figure 39. Résumé des champs d'investigation de la thèse	84

Chapitre I.

Figure I.1. Schéma interprétatif de l'effet du GR24 sur le niveau des transcrits du gène <i>PsBRC1</i> sur les bourgeons axillaires de pois.	194

Chapitre II

Figure II 1. Marquage de GR24 sur le cycle D (synthèse de 3'-3H-GR24)	230
Figure II. 2. Modèle de signalisation des karrikinés et des strigolactones durant le développement de la plante.	232
Figure II. 3. Photographie des différents organes de plantes de pois cultivar Tèrese âgées de 30 jours, prélevés pour l'étude de la localisation de l'expression des gènes.	234
Figure II. 4. Diagramme des gènes <i>RMS3LIKE1</i> et <i>RMS3LIKE2</i> et structure des protéines produites.	236
Figure II. 5. Structure secondaire des protéines RMS3LIKE	236
Figure II. 6. Arbre phylogénétique des protéines <i>RMS3LIKE</i>	238
Figure II. 7. Séquence polymorphe du gène <i>RMS3LIKE1</i> entre Tèrese et Torsdag.	242
Figure II. 8. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>RMS3LIKE1</i> (haut) et <i>RMS3LIKE2</i> (bas) dans différents organes de plantes de pois âgées de 30 jours par QPCR.	242
Figure II. 9. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>RMS3LIKE1</i> dans les stipules des mutants <i>rms</i> de pois par QPCR.	244
Figure II. 10. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>RMS3LIKE1</i> dans les épicotyles des mutants <i>rms</i> de pois avec et sans traitement au GR24 par QPCR.	244
Figure II. 11. <i>RMS3LIKE1</i> montre un épissage alternatif.	244

Figure II. 12. Schéma de la position des amorces permettant de différencier les formes <i>RMS3LIKE1.1</i> et <i>RMS3LIKE1.2</i>	246
Figure II. 13. Etude de l'accumulation des transcrits de <i>RMS3LIKE1.1</i> et <i>RMS3LIKE1.2</i> par PCR semi-quantitative dans différentes organes de plante de pois (cv. Tèrese).....	246
Figure II. 14. Alignement des protéines RMS3 et RMS3LIKE de pois, de riz et d' <i>Arabidopsis</i>	248
Figure II. 15. 6 familles de mutants <i>rms3like1</i> obtenus par TILLING	250
Figure II. 16. Comparaison de la taille des plantes F2 issues du rétrocroisement Caméor x <i>rms3like1</i>	250

Chapitre IV

Figure IV. 1. Schéma de la biosynthèse des strigolactones et de sa régulation	282
Figure IV. 2. Diagramme du gène <i>PsD27</i>	290
Figure IV. 3. Alignement des séquences protéiques des protéines D27	290
Figure IV. 4. Arbre phylogénétique des protéines D27	290
Figure IV. 5. Polymorphisme de la région 3'UTR entre le cultivar Tèrese et le cultivar Torsdag.	292
Figure IV. 6. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>PsD27</i> dans différents organes de plantes de pois par Q-PCR.....	292
Figure IV. 7. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>PsD27</i> dans les épicotyles des mutants <i>rms</i>	294
Figure IV. 8. Diagramme des gènes <i>MAX1</i>	300
Figure IV. 9. Alignement des protéines MAX1 de pois, de riz et d' <i>Arabidopsis</i>	302
Figure IV. 10. Structures et séquences conservées chez les protéines CYP450.	302
Figure IV. 11. Arbre phylogénétique des protéines MAX1	304
Figure IV. 12. Séquence nucléotidique de l'EXON 1 du gène <i>PsMAX1-A10</i> montrant 2 nucléotides polymorphes entre le cultivar Tèrese et le cultivar Champagne.	304
Figure IV. 13. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>PsMAX1-A10</i> dans différents organes de plante de pois par Q-PCR.....	306
Figure IV. 14. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>PsMAX1-A12</i> dans différents organes de plante de pois par QPCR.....	306
Figure IV. 15. Mutants de TILLING <i>Psmax1-A12</i>	308
Figure IV. 16 . Le 5-déoxystrigol serait le précurseur de toutes les strigolactones naturelles	310
Figure IV. 17. Diagramme montrant l'épissage alternatif du gène <i>AtMAX1</i> et les 2 protéines produites.	312
Figure IV. 18. Diagramme du gène <i>PsLBO1</i> et alignement des séquences protéiques de pois et d' <i>Arabidopsis</i>	314
Figure IV. 19. Arbre phylogénétique des protéines LBO1.....	314
Figure IV. 20. Quantification de l'accumulation des transcrits de <i>PsLBO1</i> dans différents organes de pois par QPCR.	316
Figure IV. 21. Trois mutants alléliques <i>Pslbo1</i> obtenus par TILLING.....	318

Chapitre IV

Figure V. 1. Modèle de la voie de signalisation des strigolactones	324
Figure V. 2. Déduction de la structure d'un potentiel dérivé actif de strigolactones.....	326
Figure V. 3. Modèle de l'harmonisation de la croissance des plantes par les strigolactones en fonction des paramètres environnementaux	328

Liste des tableaux

Introduction.

Tableau 1. Gènes impliqués dans le contrôle de la ramification chez différentes espèces (Pois, <i>Arabidopsis thaliana</i> , Pétunia, Riz).....	34

Chapitre II.

Tableau II 1. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING <i>RMS3LIKE1</i>	234
Tableau II. 2. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène <i>RMS3LIKE1</i>	248

Chapitre IV

Tableau IV. 1. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING <i>PsMAX1-A10</i>	286
Tableau IV. 2. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING <i>PsMAX1-A12</i>	288
Tableau IV. 3. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING <i>PsLBO1</i> . 288	
Tableau IV 4. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène <i>PsMAX1-A12</i>	308
Tableau IV. 5. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène <i>PsMAX1-A10</i>	310
Tableau IV 6. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène <i>PsLBO1</i>	318

Liste des annexes

Annexe 1. Séquence de <i>PsD27</i>	351
Annexe 2. Séquence de <i>PsLBO1</i>	352
Annexe 3. Séquence de <i>PsMAX1-A10</i>	353
Annexe 4. Séquence <i>PsMAX1-A12</i>	354
Annexe 5. Séquences Protéiques <i>PsMAX1-A10</i> et <i>PsMAX1-A12</i>.....	356
Annexe 6. Séquence <i>RMS3LIKE1</i>	357
Annexe 7. Séquence de <i>RMS3LIKE2</i>	358
Annexe 8. Séquences Protéiques <i>RMS3LIKE1</i> et <i>RMS3LIKE2</i>.....	359
Annexe 9. Carte génétique du pois	360
Annexe 10. Listes des amorces utilisées	361

Liste des abréviations

ADN : Acides DésoxyriboNucléiques

ADN-T : ADN transféré (d'*Agrobacterium tumefasciens*)

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acides RiboNucléiques

At = *Arabidopsis thaliana*

axr1 = *auxin resistant 1*

BR = Brassinostéroïdes

BRC = *BRANCHED*

CCD = Carotenoid Cleavage Dioxygenase

CK = Cytokinines

CYC = *CYCLOIDEA*

cm = centimètre

D=*DWARF*

DAD= *DECREASED APICAL DOMINANCE*

dL = décilitre

DNase = DésoxyriboNucléase

dNTP = désoxyRiboNucléotides Triphosphate

EF1α= elongation factor 1α

EMS = EthylMethylSulfonate

F = Forward

GA= Acide Gibbérellique

h = heures

HTD= *HIGH TILLERING DWARF*

HPLC = High performance liquid chromatography

IAA = indole-3-acetic acid

kb = kilobase

L = litre

Lj=*Lotus japonicus*

μL = microlitre

μg=microgramme

M= Molaire

Mb = Mégabase

MAX= *MORE AXILLARY GROWTH*

mL = millilitre

mm=millimètre

mM = milimolaire

MS-MS = tandem mass spectrometry

nM = nanomolaire

nm = nanomètre

PAT = Polar Auxin Transport

pb = paires de bases

PCR = Polymerase Chain Reaction

Ps = *Pisum sativum*

Q-PCR = Quantitative PCR

qsp = quantité suffisante pour

R = Reverse

RMS = *RAMOSUS*

RNase = ribonucléases

RT = Reverse Transcription

RT-PCR = Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

SL = Strigolactones

SNP = Single-Nucleotide Polymorphism

Taq = ADN polymérase de *Thermus aquaticus*

TB1=*TEOSINTE BRANCHED1*

TCP = *TB1-CYC-PCF1*

TILLING = Targeting Induced Local Lesions in Genomes

TIR1 = Transport Inhibitor Response-1

U = unité

UTP = uridine tri-phosphate

UPLC = UltraPerformance liquid chromatography

yuc = *yucca*

WT = *Wild Type*

°C= degré Celsius

INTRODUCTION GENERALE

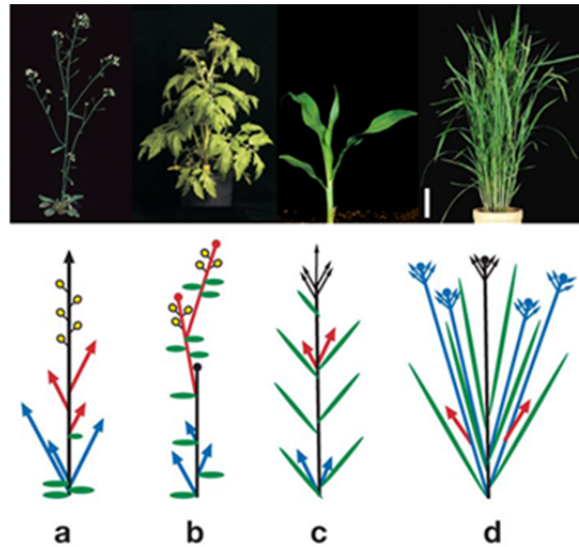


Figure 1. Diversité de l'architecture de l'appareil végétatif aérien de quelques plantes cultivées

(a : *Arabidopsis thaliana*, b : Tomate, c : Maïs d : Riz) (McSteen and Leyser, 2005).

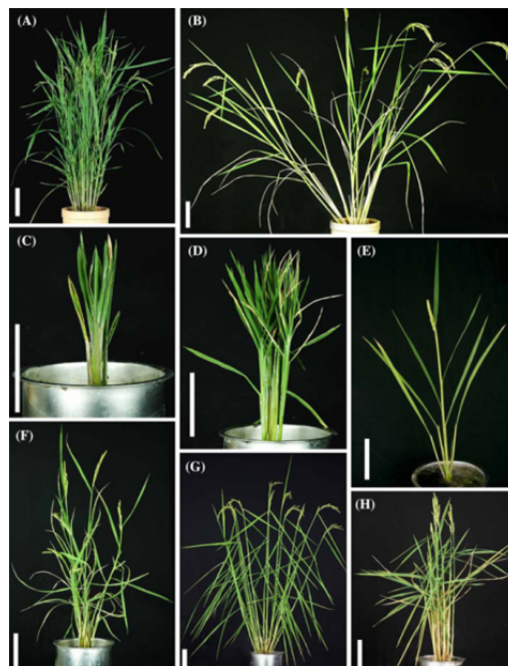


Figure 2. Exemple de variations morphologiques chez des plants de riz issus d'expériences de mutagénèse par insertion d'ADN-T.

A Plante sauvage. **B** Mutant *lazy* montrant un étalement des talles. **C** Plante extrêmement naine, avec des feuilles courtes, épaisses, larges et de couleur verte foncée. La forme de la feuille et le ratio limbe/gaine foliaire différent de celui du type sauvage. **D** Plante extrêmement naine avec des feuilles courtes, étroites, sombres et vertes foncées. **E**. Plante avec une seule talle. **F** Plante semi-naine avec un modèle de croissance anormale torsadée possédant de courtes feuilles en spirale, avec des épis anormaux et des petites graines. **G** Plante semi-naine avec des talles dressées. **H** Le collier de feuilles est épais, avec un angle feuille-tige de 90°. Les panicules sont relativement courtes. Barre d'échelle = 10 cm. (Chern et al., 2007).

Introduction générale

Le monde végétal présente une formidable diversité dans l'architecture des plantes qui est largement déterminée par des facteurs génétiques mais aussi par des facteurs environnementaux, comme la qualité et la quantité de lumière, ou la présence de nutriments dans le milieu. Incapables de se mouvoir, les végétaux ne peuvent adopter une stratégie d'évitement face aux contraintes biotiques et abiotiques auxquelles ils sont soumis perpétuellement. La stratégie retenue par ces derniers est donc une étonnante plasticité de leur développement. Les végétaux montrent une remarquable capacité à intégrer les signaux environnementaux et à adapter rapidement leur croissance en fonction de ces différents paramètres.

Le développement des plantes ne se fait pas de façon aléatoire mais se déroule de manière coordonnée, harmonieuse et reproductible. Le développement est coordonné puisque l'apparition des organes de la plante se fait de manière séquentielle ; lors de sa germination, la plante commence par mettre en place des racines puis développe sa partie aérienne (tige/ feuilles) et enfin les fleurs. Le développement est harmonieux car la taille relative des différents organes est proportionnée. Enfin le développement est reproductible, c'est-à-dire que pour une espèce donnée, l'architecture des individus sera globalement comparable si les conditions sont identiques.

La mise en place de l'architecture végétale se fait donc selon un plan propre à chaque espèce et qui dans des conditions environnementales sans contraintes correspond au programme génétique des individus, c'est dire à l'information de base contenue dans leur génome et nécessaire à la construction de l'individu. La grande diversité de forme des végétaux observés dans la nature peut donc s'expliquer en partie par la nature diverse des génomes (Figure 1 et 2).

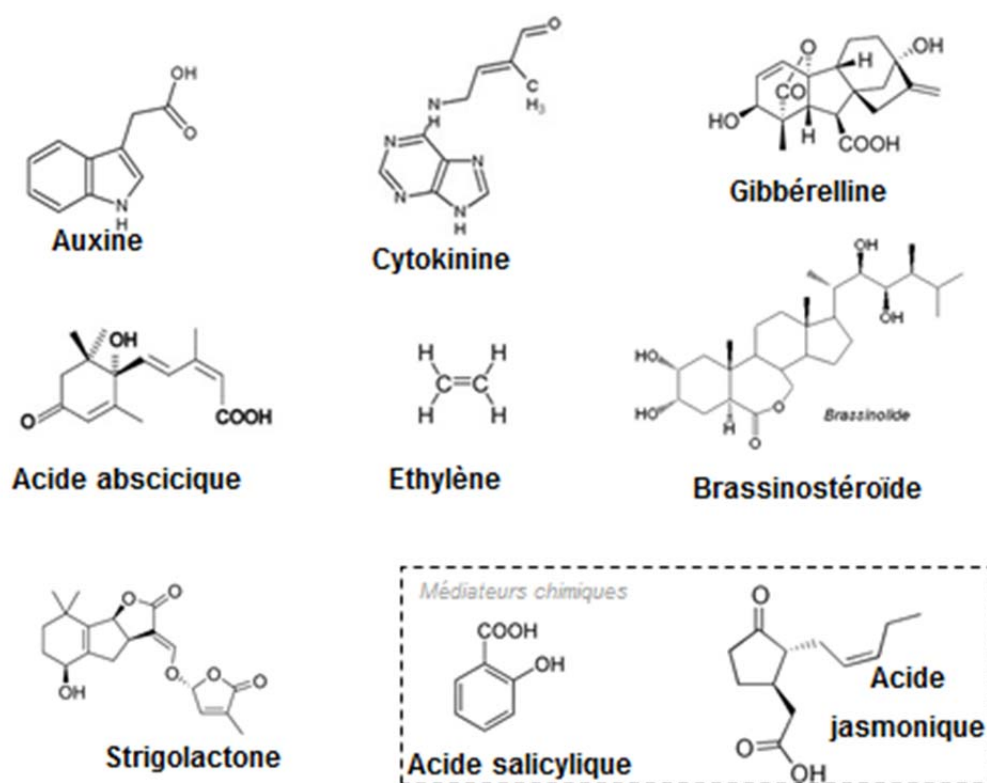


Figure 3. Structure canonique des différentes phytohormones

Les végétaux étant des organismes pluricellulaires, la mise en place de l'architecture des végétaux fait intervenir des signaux endogènes qui coordonnent le développement de la plante permettant ainsi un ajustement aux conditions environnementales. L'étude du développement des plantes a permis de mettre en évidence une dizaine d'hormones. Chez les végétaux on définit une hormone comme une molécule de faible poids moléculaire agissant à faible concentration sur des processus développementaux précis de la plante et ce à plus ou moins longue distance du site de biosynthèse. Les hormones majeures du développement identifiées à l'heure actuelle sont l'auxine, les cytokinines, les gibbérellines et les brassinostéroïdes (Wang and Li, 2008). Il existe d'autres hormones végétales jouant un rôle secondaire dans le contrôle de l'architecture des plantes. Il s'agit de l'éthylène, de l'acide abscissique et de l'acide jasmonique, molécules essentiellement impliquées dans les réponses de stress et de défenses. On peut encore citer d'autres signaux qui interviennent dans des réponses développementales de la plante mais qui sont essentiellement impliquées dans des réponses de défense, comme l'acide salicylique (Figure 3). Il semblerait que d'autres hormones restent encore à découvrir comme le suggère la découverte récente d'une nouvelle classe d'hormones végétales, les strigolactones (SL) (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Des expériences de greffes entre plantes mutantes et plantes sauvages mettent aussi en évidence l'existence de signaux transmissibles par greffes et de nature encore inconnue (Exemple : *bypass*) (Sieburth and Lee, 2010).

I. L'origine de la diversité de l'architecture aérienne des végétaux

La croissance caulinaire s'effectue au niveau de régions particulières : les méristèmes. On en distingue deux types : le méristème apical qui assure la croissance en hauteur de la plante, et les méristèmes axillaires qui sont initiés à l'aisselle des feuilles. Une fois initiés, les méristèmes axillaires vont développer quelques entre-nœuds très courts pour former les bourgeons axillaires. Au cours de la vie de la plante, ces bourgeons vont soit poursuivre leur croissance et mettre en place de nouveaux axes feuillés, les rameaux, soit entrer en dormance. Le contrôle de l'émergence de ces bourgeons, qui a été l'objet de l'étude de ma thèse, est une composante essentielle de la diversité d'architecture des plantes. Cette étude se limitera aux plantes annuelles et plus particulièrement au pois (*Pisum sativum*).

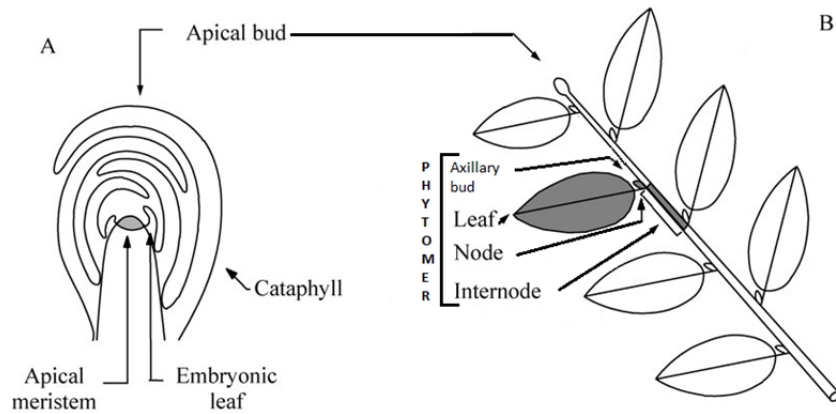


Figure 4. Organisation de l'apex caulinaire et de la tige.

Chaque axe feuillé (B) se termine par un méristème apical fréquemment protégé dans un bourgeon apical (A). Chaque tige comprend une succession de phytomères ou métamères, à savoir l'ensemble constitué par un entrenœud, un nœud (c'est-à-dire le point d'insertion des feuilles sur une tige) situé à son extrémité et une ou plusieurs feuilles correspondantes associées aux bourgeons latéraux (en gris) (Barthelemy and Caraglio, 2007)

I. A. La croissance en hauteur des plantes

I.A. 1. Processus de croissance des plantes et élongation des entre-nœuds

La croissance primaire des plantes est le résultat de 2 processus : l'organogénèse et l'extension. La formation de nouveaux organes est issue du fonctionnement de cellules indifférenciées qui constituent le méristème apical. Localisé à l'extrémité de la tige, le méristème apical présente une masse de cellules indifférenciées qui offre de multiples potentialités : cette masse de cellules est à l'origine du développement de primordia de feuilles qui vont ensuite se développer sur la tige. L'insertion des feuilles se faisant sur la tige au niveau d'une zone que l'on appelle le nœud, on donne le nom d'entre-nœud à la zone de tige qui sépare 2 nœuds. Selon les espèces et la phyllotaxie une, deux ou plusieurs feuilles peuvent être insérées à chaque nœud et un ou plusieurs bourgeons peuvent s'y développer.

Ainsi, une tige peut être considérée comme une succession d'unités végétatives composées d'un entre-nœud et d'un nœud auquel est associé une feuille et un bourgeon axillaire. Cette structure est l'unité structurale de base de la plante et est communément appelé le phytomère. Durant le développement de la plante, la superposition et la répétition des phytomères assurent la construction de celle-ci. L'agencement de ces phytomères entre eux ainsi que leur taille va participer pour une grande part à la diversité d'architecture des plantes (Barthelemy and Caraglio, 2007) (Figure 4).

Le méristème apical caulinaire peut croître de façon indéterminée et produire indéfiniment une succession de phytomères, ou croître de façon déterminée et produire un nombre fixé de phytomères qui se termine par la formation de structures reproductives. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 1), le méristème apical caulinaire maintient un rythme de croissance indéterminée, produisant d'abord les phytomères de la rosette, constitués d'une grande feuille, d'un segment de tige très court, et d'un méristème axillaire morphologiquement indétectable à l'œil nu. A la transition florale, plusieurs phytomères sont produits, constitués d'une petite feuille et d'un segment de tige très allongée. La série de phytomères qui suit, se compose d'une feuille cryptique, d'un segment de tige allongée, et d'un méristème axillaire déterminé qui forme une fleur composée de verticilles successifs : sépales, pétales, étamines et carpelles. Contrairement à certaines espèces, telles que le pois (modèle sur lequel je travaille), seuls quelques méristèmes axillaires se développent à l'aisselle des feuilles, mais des méristèmes supplémentaires, les méristèmes

accessoires, peuvent apparaître plus tard, à côté du méristème axillaire original (McSteen and Leyser, 2005)

La taille des plantes, qui est principalement liée à l'élongation de la tige, mais aussi au nombre d'entre-nœuds et à la précocité de floraison est aussi un facteur essentiel de l'architecture des plantes et un trait agronomique très important. La diminution de la taille des plantes a contribué fortement à l'augmentation du rendement des céréales comme l'a montré ce qu'on a appelé « la révolution verte ». L'élongation de la tige est bien visible chez les espèces modèles comme le riz ou *Arabidopsis thaliana* mais il existe des différences dans les modalités de l'élongation entre ces deux espèces. La tige de riz se compose de nœuds creux et des nœuds articulés, qui sont généralement appelés chaumes, et dans une large mesure, la tige contribue à la hauteur de la plante. L'élongation des entre-nœuds chez le riz provient du méristème apical caulinaire et des quatre ou cinq plus hauts nœuds qui s'allongent en réponse à la croissance et au développement des méristèmes intercalaires dans les nœuds lors de la transition florale. Chez *Arabidopsis*, les entre-nœuds de la hampe florale sont dérivés du méristème apical reproductif, et peuvent tous s'allonger.

De nombreux mutants nains, en particulier de riz et de blé, mais aussi de pois, ont été identifiés et caractérisés en raison de leur importance agronomique. D'après l'étude approfondie de mutants avec des phénotypes nains, deux hormones végétales, les gibbérellines et les brassinostéroïdes (BR), sont considérées comme des régulateurs majeurs qui déterminent la hauteur des plantes ((Wang and Li, 2008)).

I.A. 2. Régulation de l'élongation des entre-nœuds

Régulation par les gibbérellines

Les gibbérellines ont été initialement découvertes chez le riz dès les années 30 par l'étude d'une maladie du riz qui provoquait une élongation excessive des entre-nœuds des plantes infestées (Kurosaw, 1926). L'agent responsable de cette maladie était un champignon, *Gibberella fujikuroi*, qui produit une toxine nommée Gibbérelline A par une équipe japonaise et qui provoque l'élongation des entrenœuds de la plante (<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>). En 1950 les chercheurs déterminent la structure de cette molécule (Macmillan et al. 1958). Aujourd'hui, on a recensé plus de 136 gibbérellines différentes (Sun, 2008). De nombreux mutants présentant un phénotype de nanisme ont été collectés dans plusieurs espèces, et souvent très bien caractérisés, notamment chez le pois (Lester et al., 1997; Lester et al., 1999). L'analyse de ces mutants a

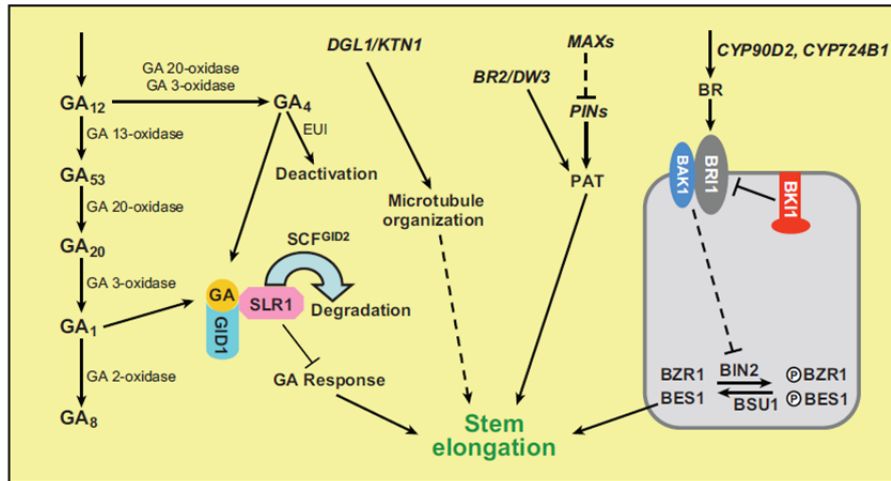


Figure 5. Régulation de l'élongation de la tige par les gibbérellines (GA), les brassinostéroïdes (BR), l'auxine, les strigolactones (MAXs) et le cytosquelette

BAK1, LRR-RLK BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1; BES1, Bri1-EMS-suppressor 1; BKI1, BRI1 kinase inhibitor 1; BIN2, BR-INSENSITIVE 2; BR2, Branchytic 2; BRI1, BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1; BSU1, BRI1 suppressor 1; BZR1, Brassinazole-resistant 1; DW3, Dwarf3; DGL1, Dwarf and Gladius Leaf1; EUI, ELONGATED UPPERMOST INTERNODE; GID, GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF; KTN1, ATPase katanin-like protein; MAX, More Axillary Branching; SLR1, Slender1; PAT, polar auxin transport; PIN, PIN-FORMED; SCF, Skp1-Cul1/Cdc53-F-box. (Wang and Li, 2008)

permis de montrer que les gènes affectés étaient impliqués dans la biosynthèse et la perception des gibbérellines (Peng et al., 1997; Sakamoto et al., 2004). Chez le riz, les gibbérellines agissent sur l'élongation des entre-nœuds à la fois en stimulant la division cellulaire et en stimulant l'élongation cellulaire (Sauter et al., 1992). L'élongation cellulaire est stimulée par une diminution des forces de tension au niveau de la cellule ce qui entraîne l'extension de la paroi (Cho and Kende, 1997). Les gibbérellines stimulent la division cellulaire en agissant sur le cycle cellulaire au niveau du méristème intercalaire de la tige, méristème situé à la base de l'entre-nœud des Monocotylédones et qui assure la croissance de ce dernier. Chez les Dicotylédones aucun équivalent précis du méristème intercalaire des Monocotylédones n'a été décrit. Chez le riz, cette activation se fait par la stimulation de l'expression de certaines kinases dépendantes des cyclines (CYCA) qui activent la transition G1 → S (Fabian et al., 2000) (Figure 5).

Régulation par les brassinostéroïdes

Les brassinostéroïdes sont des composés naturels dont la structure est proche des hormones stéroïdiennes animales qui ont un effet sur la croissance et le développement des plantes à de très faibles concentrations. Les plantes de riz déficientes en brassinostéroïdes ou dans leur perception présentent un phénotype anormal : feuilles malformées mais surtout un nanisme typique. Tout comme pour les gibbérellines, les brassinostéroïdes promeuvent l'élongation des entre-nœuds en stimulant la prolifération cellulaire via l'expression des cyclines D et en stimulant l'élongation cellulaire (Yang and Hwa, 2008)(Figure 5).

Régulation par d'autres facteurs

Outre les gibbérellines et les brassinostéroïdes, de nombreux autres paramètres régulent la taille des plantes : on peut citer le transport polarisé de l'auxine et l'organisation des microtubules. Une perte de fonction du transporteur d'auxine MDR (MULTI DRUG RESISTANT) chez *Arabidopsis* provoque une réduction de la taille des plantes (Multani et al., 2003). La taille des plantes est également affectée par une désorganisation du réseau de microtubules. Il a été montré que le mutant nain de riz *dgl1* était affecté dans une protéine qui participe à l'organisation du cytosquelette (Komorisono et al., 2005). Ces résultats sont synthétisés dans la figure x dans laquelle les SL interviennent en régulant négativement le transport polarisé de l'auxine (PAT). Un des chapitres de la thèse sera consacré au rôle des SLs sur l'élongation des entre-nœuds (Figure 5).

I. B. La ramification : une composante majeure de l'architecture végétale.

On définit la ramification comme le fait qu'une unité morphologique donne naissance à une ou plusieurs unités nouvelles de même nature fondamentale qu'elle-même. En principe, l'unité génératrice et les unités apparues restent associées en un ensemble dit système ramifié. La ramification est donc un processus qui accroît le nombre d'unités morphologiques de la plante, et qui nécessite chez les plantes vasculaires la formation d'une structure spécialisée qui sera à l'origine de la ramification : le bourgeon axillaire. Il est typiquement situé sur la tige, à l'aisselle de la feuille sur la surface adaxiale. Plus anecdotiquement, on peut observer la formation de branches sur les racines, sur les feuilles ou sur des sites variables (ramifications adventives). C'est le bourgeon axillaire qui prend une part importante dans la détermination de l'architecture de toute la plante. Le degré de ramification des plantes dépend donc de 2 facteurs : l'initiation de méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles et la régulation de la reprise d'activité des bourgeons axillaires.

I.B.1. Processus de mise en place de la ramification : l'initiation du méristème axillaire

Le méristème apical caulinaire (SAM) maintient une activité permanente mais il est capable de donner un destin particulier à certains domaines qui pourront former des organes latéraux. Cependant, la formation des domaines qui seront à l'origine de ces organes latéraux est soumise à 2 hypothèses : chez la plupart des plantes, les cellules qui composent le méristème axillaire sont dérivées directement du méristème apical de la tige (préformation), mais chez *Arabidopsis* et quelques autres espèces, des cellules différenciées de l'aisselle des feuilles subissent une dédifférenciation et retrouvent un potentiel méristématique afin de former le méristème axillaire (formation *de novo*) (McSteen and Leyser, 2005).

La formation d'un méristème axillaire pour les espèces dont le méristème est initié bien après la formation du primordium de la feuille qui les sous-tend, comme chez *Arabidopsis*, se réalise en plusieurs étapes (Grbic and Bleecker, 2000):

- Tout d'abord on observe des divisions anticlines au niveau des couches les plus externes du méristème apical.
- Puis, au niveau des couches les plus profondes, les cellules se divisent de manière péricline. L'ensemble de ces mitoses orientées crée des couches de cellules. Ces

- couches cellulaires, parallèles entre elles, présentent une forme ovoïde et constituent la « zone en coquille » qui isole le méristème axillaire du reste du SAM ou des cellules de l'entrenœud.
- Une série de divisions orientées dans des plans différents et localisées dans tout le méristème axillaire provoque son émergence.
- Ensuite, les premières traces vasculaires apparaissent.
- Enfin, le méristème axillaire acquiert une structure identique à celle du méristème apical caulinaire et commence à fonctionner comme celui-ci ou reste inactif : on parle alors de dormance des bourgeons axillaires. Un des enjeux actuels des études sur le mode d'action des SL est de mieux comprendre ce qui différencie un méristème axillaire d'un méristème apical et à partir de quel stade du développement du bourgeon axillaire, celui-ci va avoir le même comportement que le bourgeon apical. Cet aspect est abordé dans le chapitre II sous forme d'article (Dun et al., submitted).

I.B.2. Le contrôle génétique de la ramification

Le fonctionnement du méristème axillaire fait l'objet de nombreuses analyses physiologiques, génétiques et moléculaires afin de comprendre son fonctionnement et donc sa capacité à générer diverses architectures végétales. Dans le contrôle génétique de la mise en place de la ramification, il est important de distinguer 2 types de gènes : d'une part les gènes contrôlant l'initiation des bourgeons axillaires et d'autre part, les gènes qui contrôlent la dormance des bourgeons axillaires.

Initiation des méristèmes axillaires

La formation et l'initiation de ces méristèmes sont régulées par un ensemble de facteurs de transcription. La découverte des gènes impliqués dans la formation des bourgeons axillaires a été permise grâce à l'obtention de nombreux mutants de ramification ne présentant pas de méristèmes axillaires chez des espèces comme la tomate, le riz ou le maïs. L'un d'eux est le mutant *monoculm1* (*moc1*) de riz ne présentant aucune ramification. Le gène affecté est un membre de la famille des facteurs de transcription de type GRAS et ce gène est indispensable à l'initiation des bourgeons axillaires végétatifs et floraux (Li et al., 2003). L'orthologue de ce gène, *LATERAL SUPPRESSOR* (*LS* chez la tomate, *LAS* chez *Arabidopsis*), a été découvert à l'origine chez la tomate (Williams et al., 1960 ; Rick & Butler, 1956). Le gène *LAS* est exprimé dans une bande spécifique au niveau de la frontière du

primordium foliaire dérivé du méristème apical. Ce domaine d'expression est similaire pour les gènes *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)*, *CUC1–CUC3* et *LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)* d'*Arabidopsis*. Cela suggère que l'identité de la région donnant un méristème axillaire est déterminée très tôt au cours du développement et que les gènes *CUC* et *LAS* ont un rôle primordial dans l'établissement de cette identité (Schmitz et al., 2002; Greb et al., 2003).

Un autre facteur de transcription est impliqué dans l'initiation des méristèmes, il s'agit d'un facteur de type R2R3 MYB identifié la première fois chez la tomate : *BLIND (BI)* (Schumacher et al., 1999) puis chez *Arabidopsis* : *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS (RAX)1/2/3* (Keller et al., 2006; Muller et al., 2006). A la différence de *MOC1/LAS/Ls*, *RAX1/BI* n'intervient pas dans le développement des méristèmes floraux. *MOC1/Ls/LAS* et *RAX1/BI* semblent agir dans des voies séparées mais leur action dans l'initiation des méristèmes axillaires est redondante. Des études récentes ont montré que *RAX1* régulait l'expression de *CUC2* dans un domaine où aura lieu la formation des méristèmes axillaires. Les gènes *CUC* stimulent l'expression du gène *STM (SHOOT MERISTEMLESS)*, un déterminant central du méristème. Les gènes *CUC1* et *CUC2* sont également régulés par un micro ARN : mir164 (Laufs et al., 2004).

Les facteurs de transcription *LAX1/Ba1* (identifiés respectivement chez le riz et le maïs) de type hélice boucle hélice sont également impliqués dans l'initiation des méristèmes axillaires. Ces facteurs de transcription régulent la formation des méristèmes végétatifs et floraux par une voie indépendante de *MOC1/LAS/Ls*, *RAX1/BI* (Wang and Li, 2008).

A ce jour, aucune interaction entre les voies de régulation contrôlant l'initiation des méristèmes axillaires et celles régulant le démarrage des bourgeons axillaires n'a été mise en évidence.

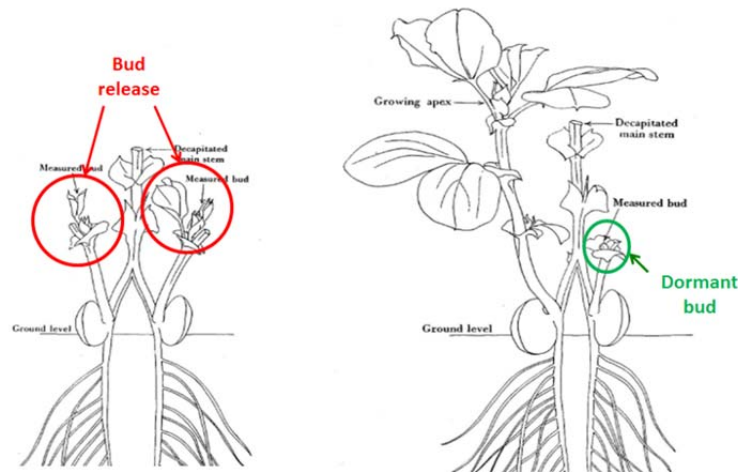


Figure 6 . Expérience de Snow (1937)

Expérience de décapitation à 2 tiges : Lorsque la tige principale (ici une plante de haricot) est décapitée, cela provoque la levée de dormance des bourgeons axillaires de 2 ramifications cotylédonaire. Si les 2 apex de ces ramifications cotylédonaire sont décapités, il y aura démarrage de ramifications (gauche). Si un apex d'une ramification cotylédonnaire reste en place, on observe une inhibition du bourgeon axillaire non seulement sur la ramification non décapitée mais aussi sur l'autre ramification cotylédonnaire qui a été décapitée. Ceci suggère qu'un signal (ou plusieurs) peut descendre et remonter une tige pour inhiber le développement des bourgeons de l'autre tige. Cette expérience a été à l'origine de l'hypothèse du messenger secondaire de l'auxine pour inhiber la ramification puisque l'auxine ne se déplace que dans une direction basipète.

I.B.3. Le contrôle hormonal de la dormance des bourgeons axillaires : la théorie classique de la dominance apicale

Depuis plus de 80 ans, il était classiquement admis que le phénomène de dominance apicale, phénomène dans lequel le bourgeon apical se développe au détriment des bourgeons axillaires, était exclusivement déterminé par deux hormones : l'auxine et les cytokinines. La dominance apicale se caractérise par le fait que l'apex de la plante, producteur d'auxine, empêche le développement des bourgeons axillaires sous-jacents. Lors de l'excision du bourgeon apical, cette inhibition est levée : les bourgeons axillaires sous-jacents jusque-là dormants se développent et mettent en place de nouvelles ramifications (Thimann and Skoog, 1933). L'application d'auxine sur l'apex décapité restaure la dormance (Cline, 1991). A l'inverse, les cytokinines produites par les racines stimulent la ramification. Lors de la décapitation, le niveau des cytokinines augmente dans la sève xylémienne (Bangerth et al., 1994) et le niveau d'expression des gènes *IPT* (Isopentenyl transferase, impliqués dans la voie de biosynthèse des cytokinines) augmente fortement dans les tiges (Tanaka et al., 2006). De nombreux mutants affectés dans la voie de biosynthèse de l'auxine ou dans le transport de l'auxine présentent un phénotype hyper-ramifié. C'est le cas des mutants de perception de l'auxine *axr1* qui présentent un phénotype pléiotropique (McSteen, 2009). Le mutant surproducteur d'auxine, le mutant *yucca* montre une forte dominance apicale (Cheng et al., 2006).

L'idée d'une action directe de l'auxine sur l'inhibition du développement des bourgeons axillaires est contrariée dès 1937 par Snow. Notamment, grâce à des expériences de décapitation sur des tiges cotylédonaire, il a pu montrer sur des plantes présentant des rameaux en vis-à-vis (et de taille comparable), que le bourgeon apical de l'un d'eux pouvait inhiber les bourgeons axillaires de son propre rameau mais également ceux du rameau en vis-à-vis. Cette observation indique que le signal inhibiteur peut remonter un rameau. Ce signal ne peut correspondre à l'auxine puisque son transport est connu comme étant basipète.

Nous verrons que ce modèle de la dominance apicale gouvernée par l'action de 2 hormones, l'auxine et les cytokines, est effectivement bien plus complexe et fait intervenir un autre messenger comme mis en évidence par Snow. Actuellement, l'hypothèse est que le messenger secondaire de l'auxine est une SL dont la biosynthèse est stimulée par l'auxine (Brewer et al., 2009).

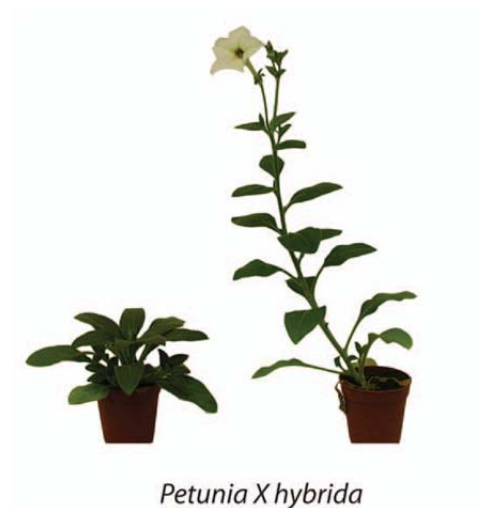


Figure 7. Réponse à l'évitement de l'ombre chez *Petunia hybrida*

Plante contrôle (à gauche) et plante soumise à des ratios faibles de lumière Rouge clair/Rouge sombre (à droite). La plante exposée à de faibles ratios présente, une élévation de la tige et des pétioles, une floraison précoce, une diminution du nombre de branches et des feuilles plus verticales (Keuskamp et al., 2010).

I.B.4. Un contrôle environnemental de la ramification

La diversité de morphologie des végétaux, et notamment la ramification, ne peut pas être expliquée en totalité par le patrimoine génétique de l'espèce. En effet, l'environnement exerce une pression très forte sur la ramification des plantes. Il suffit d'observer la forme des plantes qui ont poussé dans des conditions de lumière très différentes (Figure 7) ou des conditions extrêmes : ainsi un arbre soumis à un vent permanent unidirectionnel montre un nombre de ramification beaucoup plus important sur le côté non exposé au vent : c'est le port en drapeau.

Un autre élément qui régule la ramification et qui n'est pas des moindres : il s'agit de la qualité de la lumière. La ramification est inhibée lorsque la plante est soumise à l'ombre exercée par les plantes voisines. Lorsque la densité des plantes est importante, la qualité de la lumière change, et notamment on observe une augmentation de la quantité de lumière rouge sombre issue de la réflexion de la lumière du soleil sur les feuilles des plantes voisines. En réponse à des ratios bas de lumière rouge clair/rouge sombre on observe une elongation de la tige mais une diminution de la surface foliaire et surtout une diminution de la ramification (Kebrom et al., 2010)(Figure 7).

La disponibilité en éléments minéraux est également un facteur qui joue sur la ramification. Une baisse de la disponibilité en nitrate dans le sol provoque une diminution de la ramification (Yoneyama et al., 2007) mais le mécanisme moléculaire qui permet le contrôle de l'architecture végétale par les nutriments est mal connu. Cependant, il est clair que les hormones végétales assurent la communication entre la disponibilité des nutriments et l'appareil végétatif. Une étude a permis de montrer que les nitrates accroissaient l'expression des gènes de biosynthèse de cytokinines, *IPT*, ce qui induit une augmentation de la quantité de cytokinines dans la plante, hormone qui stimule la levée de dormance des bourgeons (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004). Il a été également montré que le bore influence également la ramification ; chez le pois, un déficit en bore provoque la levée de dormance des bourgeons axillaires (Wang et al., 2006). Nous verrons que les SL semblent avoir un rôle essentiel dans le contrôle de l'architecture de la plante en réponse aux éléments minéraux du sol (principalement le phosphate) lié vraisemblablement à son/leurs rôles dans des interactions symbiotiques dans la rhizosphère (Paragraphe IV C).

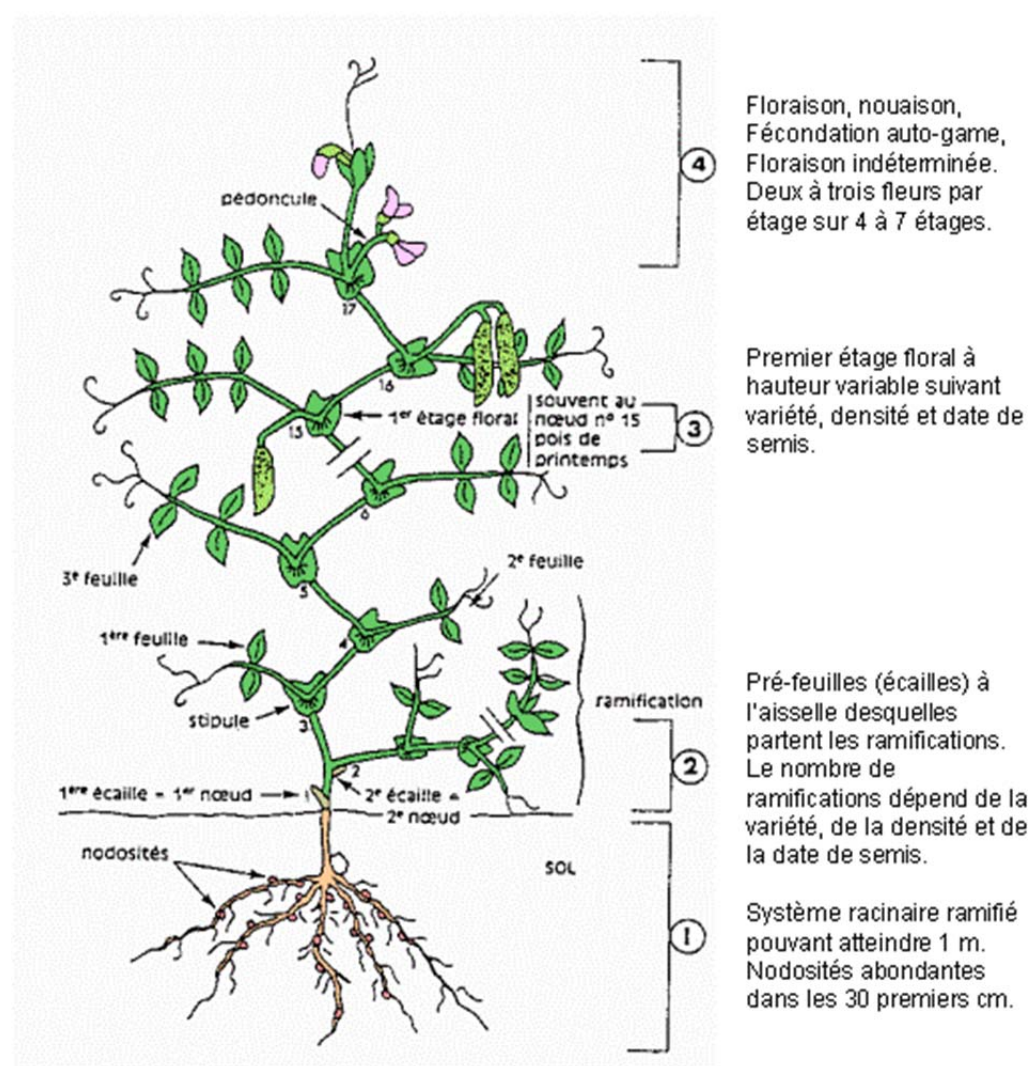


Figure 8. Architecture d'une plante de pois
(Boyardieu, 1991)

I. C. Le modèle pois.

Le pois (*Pisum sativum*, famille des Fabacées) est une espèce cultivée polyvalente présente à travers le monde. Le pois est la troisième plus grande espèce de légumineuses après le soja et le haricot. Il est cultivé sur plus de 6 millions d'hectares dans le monde (www.faostat.fao.org). Le pois est une importante source de protéines, et c'est pour cette raison que plus de 10 millions de tonnes de pois protéagineux sont produits à travers le monde (essentiellement en Europe et au Canada) (www.faostat.fao.org). Le pois est consommé principalement comme graine sèche (pois protéagineux : alimentation pour bétail) ou pour la consommation humaine sous forme de graines immatures (appelées petits pois) et sous forme de jeunes pousses.

Depuis une 20^{aine} d'années, la recherche fondamentale dans le domaine végétal repose essentiellement sur une plante : *Arabidopsis thaliana* qui est le modèle choisi pour les expériences de biologie et de génétique moléculaire. En parallèle apparaissent d'autres plantes modèles pour l'étude des processus particuliers du développement des plantes comme *Medicago truncatula* ou *Lotus japonicus* dans le cadre de l'étude de la symbiose, ou encore des modèles de Dicotylédone comme le riz ou *Brachypodium distachyon*. Certaines plantes sont cependant plus appropriées à certaines études. C'est le cas du pois dans le cadre des expérimentations de physiologie végétale. Le choix du modèle pois offre de nombreux avantages, dont la facilité de la mise en place de certaines expériences ou même la réalisation de manipulations quasi impossibles chez *Arabidopsis*.

En effet, dans le cadre des études génétiques, Gregor Mendel, par l'étude de la ségrégation des caractères héréditaires dans les descendances, a rendu cette plante célèbre et le pois est devenu le modèle de la génétique Mendélienne et de nombreux mutants de développement ont été obtenus chez cette espèce. Le pois a l'avantage d'être une espèce diploïde ce qui facilite l'étude des ségrégations. Les croisements manuels sont facilités par le fait que les fleurs sont de grande taille. Ainsi, les 7 caractères étudiés par Mendel, facilement observables par des non-spécialistes (couleur des fleurs, longueur de la tige, couleur des graines, forme de la graine, couleur des gousses, forme des gousses, disposition des fleurs) sont devenus très populaires et ont permis d'enseigner à de nombreuses générations les règles de la transmission des caractères héréditaires sous le nom de lois de Mendel. Ces caractères ont d'ailleurs une très grande importance en termes de caractéristiques

agronomiques et de consommation. Depuis ces découvertes, de nombreux outils de génétique ont été établis chez le pois et notamment de cartographie génétique. De nombreuses cartes génétiques du pois ont été développées notamment à l'INRA. Ces cartes sont composées de 7 groupes de liaisons sur lesquels sont disposés de nombreux marqueurs (marqueurs CAPS, RAPD, RFLP, microsatellites ect...)(Bordat et al., 2011) mais aussi les gènes identifiés à ce jour (notamment les gènes de Mendel) et ceux correspondants aux différents mutants obtenus chez le pois facilitant l'approche gène candidat.

Le pois est également une plante très bien adaptée aux études physiologiques sur le développement de la plante du fait de son architecture simple qui en fait l'un des meilleurs modèles dans cette discipline. La présence d'entre-nœuds longs et de bourgeons axillaires facilement accessibles sont des avantages considérables pour l'étude de l'architecture des plantes (Figure 8). Ceci permet de réaliser des quantifications précises des différents phénotypes caulinaires et aussi de quantifier les différents effets hormonaux par des expériences de dose réponse, comme la mesure de l'élongation des entre-nœuds, la mesure de la ramification, l'épaisseur de la tige etc.... ce qui est difficile sur l'appareil caulinaire d'*Arabidopsis* qui est concentré sur une rosette. Ainsi, sur *Arabidopsis*, les quantifications se font plutôt sur l'inflorescence, c'est-à-dire après l'initiation florale. Autre avantage, le pois est une plante idéale pour réaliser des expériences de greffes qui permettent d'étudier les signaux transmissibles. C'est d'ailleurs cette technique qui a permis de mettre en évidence l'existence d'un nouveau signal (autre que l'auxine et les CK) réprimant la ramification chez le pois (Beveridge et al., 1997), ces expériences sont possibles (Turnbull et al., 2002) mais difficiles à mettre en place chez *Arabidopsis*. Les greffes chez le pois ont été également utilisées pour comprendre l'action d'autres hormones végétales comme les brassinostéroïdes (Symons and Reid, 2004).

Le pois est également un excellent modèle pour l'étude de la ramification car la dormance des bourgeons est totalement inhibée et lorsque l'on réalise une décapitation, il y a une levée de dormance complète. Ceci explique pourquoi le pois a été le modèle choisi par Thimann et Skoog pour mettre au point leur théorie de la dominance apicale (Thimann and Skoog, 1933)

Du fait de la taille importante de ses organes, les hormones, souvent présentes à très faibles concentrations, peuvent être quantifiées relativement facilement dans un organe donné. La sève brute provenant des racines peut être facilement récoltée avec une simple

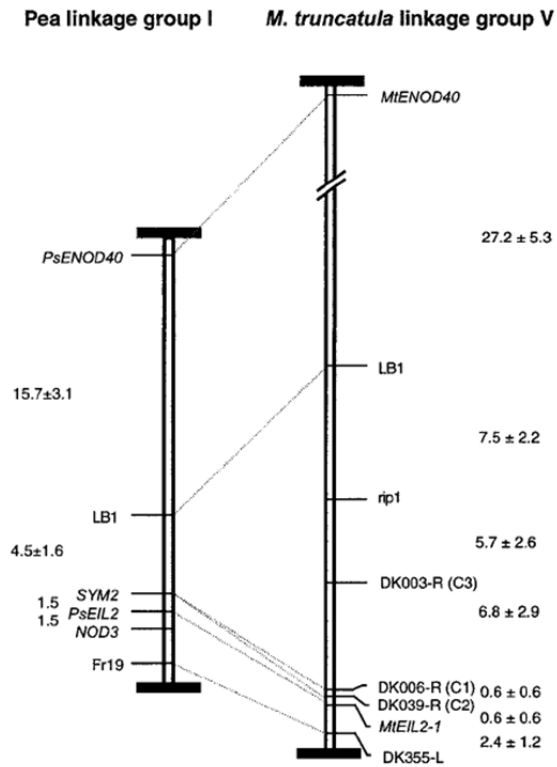


Figure 9. Illustration de la macrosynténie entre le pois et *Medicago*

Comparaison de la région de SYM2 de pois (groupe de liaison I) et la région orthologue chez *Medicago* (groupe de liaison V). La macrosynténie est observée entre les marqueurs ENOD40 et Fr19/DK355-L (Gualtieri et al., 2002).

seringue (jusqu'à 1 mL par plante) pour quantifier les hormones xylémiennes comme les CK. Le système racinaire assez développé permet également une étude facilitée de la composition des exsudats racinaires. Il est également facile de réaliser des expériences de « girdling » qui consiste à interrompre les flux phloémiens en supprimant les tissus vivants les plus périphériques de la tige sans interrompre la croissance de celle-ci (Ferguson and Beveridge, 2009).

Le pois est cultivable de diverses façons : en terre, en hydroponique ou encore en aéropinique ce qui offre une diversité de traitements hormonaux, car outre une application directe de l'hormone sur les tissus étudiés, il est possible d'apporter l'hormone par les racines *via* le milieu hydroponique. Le cycle de développement du pois, pour certains génotypes, n'est pas plus long que celui d'*Arabidopsis* (3 mois de graine à graine).

Si le pois reste le meilleur modèle pour les expérimentations de physiologie, il n'offre pas les avantages qu'offre le modèle *Arabidopsis thaliana* pour les expériences de biologie moléculaire. Le principal inconvénient est la difficulté de la transformation par *Agrobacterium* qui n'a été réalisée avec succès que dans quelques rares cas (Grant and Cooper, 2006). De plus le génome de cette plante n'est malheureusement pas séquencé. Mais, avec les nouvelles générations de séquençage en masse et la réduction des coûts, il paraît envisageable que des équipes relèvent le défi de séquencer ce gros génome. Le principal obstacle à ce travail est non seulement la taille du génome, 4 800 Mbp, soit 30 fois celle d'*Arabidopsis* mais surtout la présence de nombreuses séquences répétées de type (rétro)transposon (90 % du génome) qui rend difficile le contigage des fragments séquencés. Jusqu'à aujourd'hui, le clonage des gènes chez le pois s'est fait essentiellement par une approche gène candidat qui impose d'attendre une identification préalable dans d'autres modèles comme le riz ou *Arabidopsis*. C'est la stratégie que nous avons adoptée et qui ne permet pas de découvrir de nouveaux gènes, mais permet de mieux comprendre la fonction physiologique de gènes choisis. Cette approche gène candidat qui montre un véritable succès chez le pois est facilitée par le développement de nouvelles techniques comme le TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), mis en œuvre sur la plate-forme d'Evry (Dalmais et al., 2008), et qui permet d'identifier des mutants dans des gènes d'intérêt parmi une population de mutants EMS, ou encore la mise en place d'une banque de chromosomes bactériens artificiels (BAC). Mais surtout les génomes de 3 espèces de légumineuses ont été presque entièrement séquencés : *Medicago truncatula*, qui est l'espèce

la plus proche du pois, le lotier (*Lotus japonicus*) et le soja (*Glycine max*), espèce à intérêt agronomique fort. Or, ces espèces possèdent de fortes relations de synténie (existence d'une forte similitude dans l'organisation des génomes chez des plantes appartenant à une même famille botanique) entre-elles, surtout entre le pois et *Medicago*, ce qui facilite l'approche gène candidat (Cannon et al., 2009; Bordat et al., 2011). La mise en évidence de zones de microsynténie entre le pois et *Medicago*, comme dans la région du gène *SYM2*, est un outil particulièrement intéressant dans le clonage de gènes de pois (Gualtieri et al., 2002) (Figure 9). Chez le pois, avec les projets de séquençage en masse d'ARN de pois développés récemment par le centre INRA de Dijon, on dispose aujourd'hui de la séquence de plus de 40000 gènes (J. Burstin, communication personnelle).

Les avantages du pois énumérés ci-dessus seront illustrés ci-après par l'ensemble des travaux menés par le laboratoire en collaboration avec le laboratoire australien de Christine Beveridge (Univ. Queensland, Brisbane) sur le contrôle de la ramification chez le pois et qui ont conduit à la découverte d'une nouvelle classe d'hormone, les strigolactones.

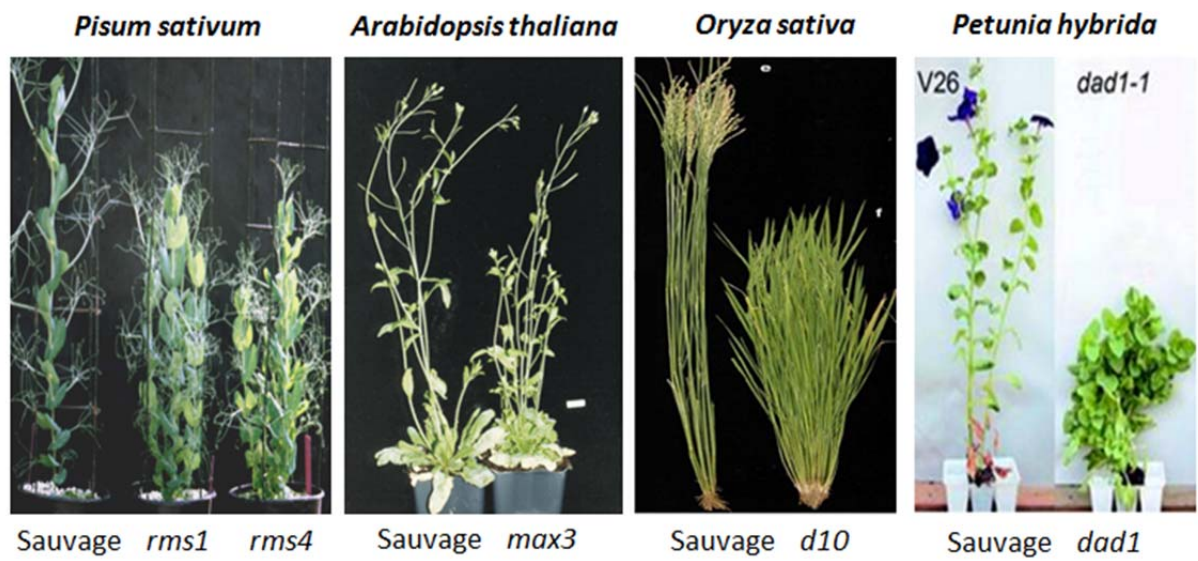


Figure 10. Mutants hyperbranchés de différentes espèces.
(Image personnelle ; (Booker et al., 2003; Snowden et al., 2005; Zou et al., 2005)

II. Les strigolactones, une nouvelle hormone contrôlant l'architecture végétale et notamment la ramification

II. A. L'histoire d'une découverte : l'importance de la génétique moderne associée à la physiologie

Comme on vient de le voir, depuis les années 30 avec les travaux de Thimann et Skoog, le contrôle de la ramification était expliqué par le modèle de la dominance apicale. Au cours des 20 dernières années, différents mutants hyperramifiés ont progressivement été identifiés chez plusieurs espèces (pois, pétunia, riz, *Arabidopsis*) (Figure 10). Il s'agit d'une classe particulière de mutants qui présentaient une très forte augmentation du nombre de leurs ramifications et qui n'étaient pas très affectés pour d'autres caractères (on verra cependant que par la suite l'étude fine de ces mutants a permis de révéler d'autres phénotypes). Ainsi chez le pois, on a pu identifier 5 gènes *RAMOSUS* (*RMS*) impliqués dans la ramification (*RMS1* à *RMS5*) (Beveridge, 2000). Des expériences de greffes et des quantifications d'hormones chez ces mutants ont permis de mettre en évidence l'existence d'un nouveau signal inhibiteur de la ramification qui pouvait se déplacer uniquement dans une direction racine-tige et qui ne semblait être ni l'auxine ni les cytokinines (Beveridge et al., 2000).

Ainsi, lorsque l'on greffe des tiges du mutant hyper-ramifié *rms1* sur un porte greffe sauvage, on observe une inhibition de la ramification. Cela montre qu'il existe un signal produit par les tissus du porte-greffe de génotype sauvage *RMS1* et transmissible dans les tissus du greffon *rms1*, capable d'inhiber la ramification de celui-ci (Beveridge, 2000). Il suffit même de greffer quelques centimètres de tige sauvage entre un greffon et un porte-greffe *rms1* pour inhiber la ramification de la tige mutante, ce qui suggère que le signal agit à très faible concentration (Foo et al., 2001). Par contre, si on réalise la même expérience avec le mutant *rms4*, la ramification est maintenue, suggérant que *RMS4* intervient dans la réponse au signal alors que *RMS1* serait plutôt impliqué dans la biosynthèse du signal (Beveridge et al., 2000) (Figure 11). Ces expériences ont permis de proposer un nouveau modèle du contrôle de la ramification où *RMS1* et *RMS5* contrôlent la synthèse de ce signal et *RMS3* et *RMS4* interviennent dans la réponse à ce signal (Dun et al., 2009). Les greffes et les quantifications hormonales ont abouti à l'hypothèse d'un rôle particulier pour la protéine *RMS2* qui serait impliquée dans un signal de rétrocontrôle de la synthèse du signal inhibiteur (Voir paragraphe IV sur la biosynthèse). D'autres expériences montrent qu'un greffon sauvage

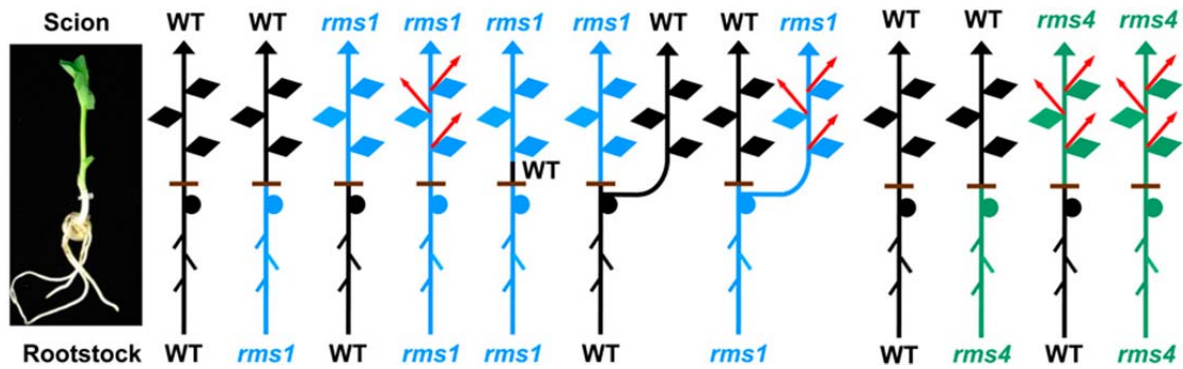


Figure 11. Expériences de greffes avec les mutants *rms* de pois.

Les éléments noirs correspondent aux parties de la plante sauvage (WT = Wild type) les éléments bleus correspondent aux parties du mutant *rms1* et les éléments verts correspondent aux parties du mutant *rms4*. La flèche verticale symbolise la croissance apicale, les flèches latérales en rouge la croissance axillaire, l'absence de flèches latérales signifie une absence de ramifications. Les lignes horizontales correspondent aux sites de greffes (Beveridge et al., 2009).

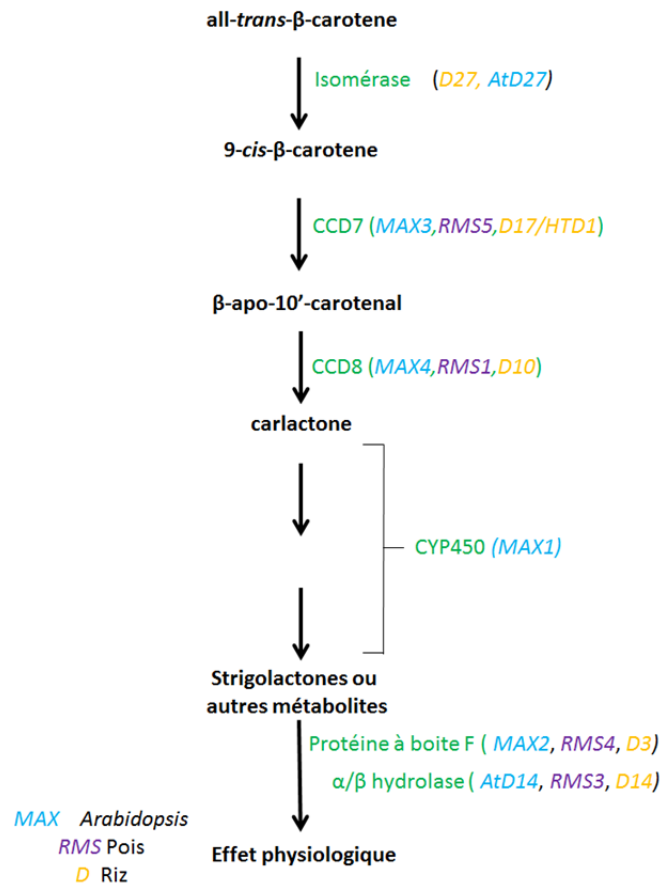


Figure 12. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des strigolactones et de la perception incluant les enzymes et protéines impliquées.

(donc produisant le signal inhibiteur) est incapable d'inhiber la ramification du greffon *rms1* greffé sur le même porte greffe *rms1* (Figure 11). Ces résultats indiquent que ce signal inhibiteur ne peut se déplacer que vers le haut de la plante vraisemblablement dans la sève brute xylémienne (Foo et al., 2001).

Le clonage, grâce au modèle *Arabidopsis*, des gènes *RMS1* et *RMS5* impliqués dans la biosynthèse du signal inhibiteur, a permis de montrer qu'ils codaient des CAROTENOÏD CLEAVAGE DIOXYGENASE, CCD8 et CCD7 respectivement. Il s'agit de 2 enzymes adressées au chloroplaste qui permettent le clivage du β -carotène en un apo-carotène. Ces résultats ont suggéré que le signal inhibiteur recherché était un dérivé de caroténoïdes (Sorefan et al., 2003; Johnson et al., 2006) (Figure 12).

Le clonage du gène de réponse *RMS4* qui code une protéine à boîte F (F-box leucine-rich repeat protein)(Johnson et al., 2006; Stirnberg et al., 2007) suggère que la voie de transduction du signal aboutissant à l'inhibition de la ramification fait intervenir la dégradation de protéines via le protéasome (Stirnberg et al., 2007)(Figure 12).

La poursuite des travaux sur les autres espèces a permis de montrer que les gènes de la ramification sont bien conservés chez les plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *MAX* (*MORE AXILLARY GROWTH*), *MAX4*, *MAX3* et *MAX2* sont les homologues respectifs de *RMS1*, *RMS5* et *RMS4* du pois (Johnson et al., 2006) ; on retrouve aussi certains de ces homologues chez le pétunia (Snowden et al., 2005) et chez le riz (Zou et al., 2006; Arite et al., 2007) (Figure 12)(Tableau 1). Chez *Arabidopsis* un autre gène a été cloné, *MAX1*, qui code une autre enzyme de la voie de biosynthèse du signal inhibiteur, une cytochrome P450 mono oxygénase (Booker et al., 2005)(Figure 12)(Tableau 1). Très récemment, une nouvelle enzyme D27, a été mise en évidence chez le riz (Lin et al., 2009) puis chez *Arabidopsis* (Waters et al., 2012) et son rôle dans la biosynthèse du signal inhibiteur a été élucidé (Alder et al., 2012) (Figure 12). La fonction de ces protéines sera détaillée dans le paragraphe IV de ce chapitre et une étude de ces gènes chez le pois sera présentée dans le chapitre IV.

Fonction	Protéine codée	Pois	Arabidopsis	Riz	Pétunia
Synthèse du signal	Isomérase	?	<i>AtD27</i>	<i>D27</i>	?
	CCD8	<i>RMS1</i>	<i>MAX4</i>	<i>D10</i>	<i>DAD1</i>
	CCD7	<i>RMS5</i>	<i>MAX3</i>	<i>HTD1/D17</i>	<i>DAD3</i>
	Cytochrome P450	2 homologues	<i>MAX1</i>	5 homologues	?
Réception et transduction du signal	α/β hydrolase	<i>RMS3</i>	<i>D14</i>	?	?
	Protéine à boîte F	<i>RMS4</i>	<i>MAX2</i>	<i>D3</i>	2 homologues
Rétrocontrôle	?	<i>RMS2</i>	?	?	?

Tableau 1. Gènes impliqués dans le contrôle de la ramification chez différentes espèces (Pois, *Arabidopsis thaliana*, Pétunia, Riz)

(*RMS*=*RAMOSUS*, *MAX*=*MORE AXILLARY GROWTH*, *D*=*DWARF*, *HTD*=*HIGH TILLERING DWARF*, *DAD*= *DECREASED APICAL DOMINANCE*, ? = non identifié)

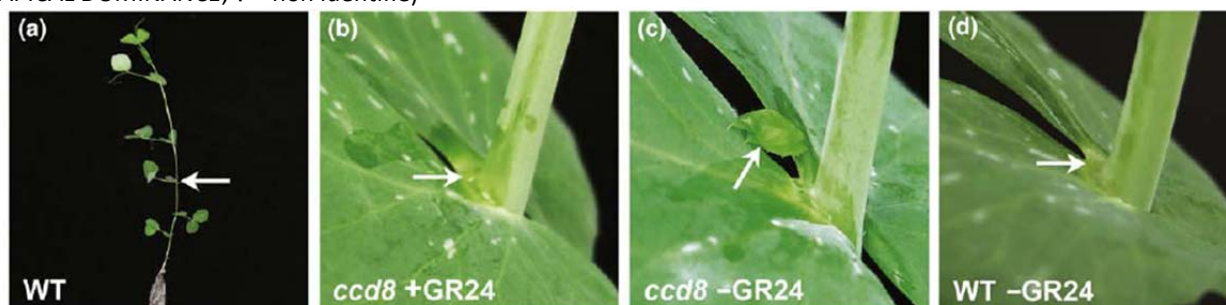


Figure 13. Illustration de l'effet de l'application du GR24 sur la dormance des bourgeons axillaires de pois (plante sauvage et mutant *ccd8* (= *rms1*)).

Les plantes WT (d) et mutants *ccd8* qui sont déficientes en SLs (b-c) intactes ont été traitées au nœud 5 (a) avec 5 μ L d'une solution à 0 nM (c-d) ou 1 μ M (b). Les bourgeons au nœud 5 restent dormants chez le WT (d), mais on observe une levée de dormance chez le mutant *ccd8* (c). Le GR24 inhibe complètement la levée de dormance des bourgeons chez les mutants *ccd8*. Les photographies ont été prises 5 jours après le traitement. Les flèches indiquent la localisation du bourgeon au nœud 5 (Dun et al., 2009).

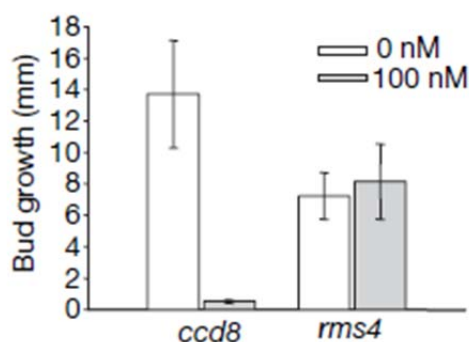


Figure 14. Effet du GR24 sur l'inhibition de la dormance des bourgeons axillaires des mutants *rms1* et *rms4*

Le GR24 (0 ou 100 nM) est appliqué directement sur les bourgeons axillaires au nœud 4. La croissance des bourgeons est mesurée 8 jours après le traitement (n = 9) (Gomez-Roldan et al., 2008).

C'est en 2008, que 2 études menées en parallèles sur le riz et le pois ont pu enfin déterminer la nature de ce signal inhibiteur de la ramification et démontrer qu'il s'agissait des strigolactones (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Les strigolactones sont des composés connus depuis de nombreuses années pour leur action dans la rhizosphère : en effet, ces molécules étaient connues pour stimuler la germination des graines de plantes parasites comme le striga ou l'orobanche (Cook et al., 1966) mais elles sont aussi impliquées dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Akiyama et al., 2005) (Voir paragraphe III). En 2005, Matusova et al. montrent que les strigolactones sont des dérivés de caroténoïdes qui sont produits *via* des enzymes de types CCD. C'est cet article qui a certainement été déterminant dans l'identification du signal. Les chercheurs ont donc émis l'hypothèse que le dérivé de caroténoïdes inhibiteur de la ramification pouvait être les strigolactones. En appliquant la strigolactone synthétique (GR24) à de très faibles concentrations (100 nM) sur les bourgeons axillaires des mutants de biosynthèse de pois *rms1* le démarrage des bourgeons axillaires était inhibé (Gomez-Roldan et al., 2008) (Figure 13 et 14). De la même manière, l'addition de GR24 dans le milieu de culture des plantules de riz réduit le tallage secondaire des mutants *d10* (Umehara et al., 2008). Par contre, l'application de GR24 sur les bourgeons axillaires des mutants *rms4* n'a aucun effet, ce qui confirme l'implication de RMS4 dans la perception de ce signal. Ces résultats furent confortés par des études de quantification de strigolactones dans les mutants *rms1* et *d10* qui présentaient une déficience en strigolactone alors que les mutants de réponse *rms4* et *d3* ne l'étaient pas. Ces mutants présentaient même une quantité plus élevée de strigolactones (résultat qui était explicable par le signal de rétrocontrôle) (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008).

Les strigolactones sont donc des molécules agissant à faible concentration sur des processus développementaux précis de la plante, à très longue distance, de faible poids moléculaire. Les strigolactones répondent donc bien à la définition d'une hormone végétale et ont donc été considérées comme la 8^{ème} classe d'hormone après les brassinostéroïdes. (La structure de ces molécules sera détaillée dans le paragraphe IV).

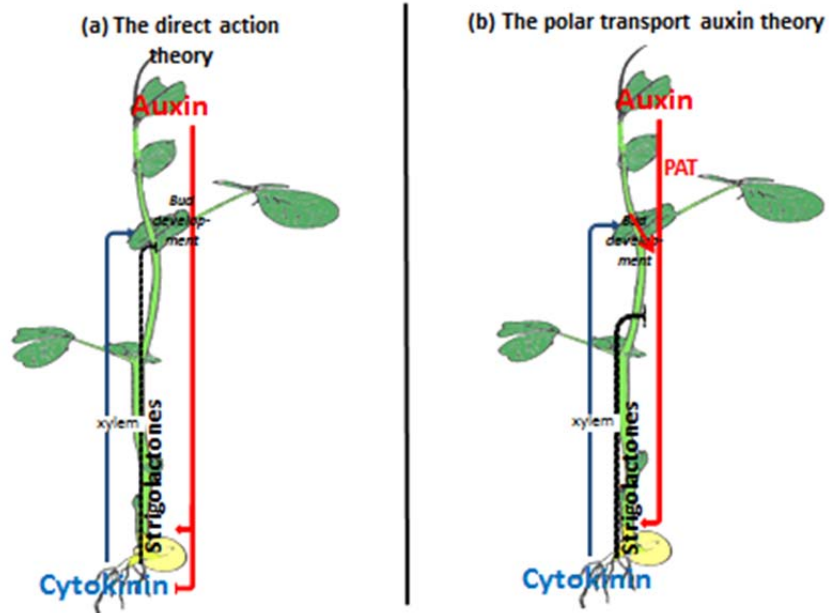


Figure 15. Hypothèses sur la place des strigolactones dans le modèle du contrôle de la ramification

(a) hypothèse de l'action d'un second messenger (b) hypothèse de la canalisation de l'auxine

II. B. Un mode d'action des Strigolactones sur le contrôle de la ramification qui fait débat !

Deux théories s'affrontent pour expliquer comment les strigolactones pourraient interagir avec l'auxine dans le modèle de la dominance apicale, processus qui fait également intervenir les cytokinines. Ces deux théories font toujours débat auprès de la communauté scientifique. Ainsi, certains prônent un mode d'action direct des strigolactones en aval de l'auxine (Brewer et al., 2009) et d'autres un mode d'action indirect (et en amont de l'auxine) qui ferait intervenir le transport polarisé de l'auxine (Crawford et al., 2010). Au laboratoire nous pensons que les 2 hypothèses ne sont pas exclusives et que comme les GA et les CK, les SL, en plus de leur action directe sur l'inhibition de la ramification, peuvent aussi réguler le transport polarisé de l'auxine.

II. B. 1. Hypothèse indirecte : les strigolactones agissent sur la canalisation de l'auxine (Figure 15 et 16)

Cette hypothèse repose sur l'observation d'une plus forte expression des protéines PIN1 à la membrane chez les mutants déficients en SLs que chez le sauvage et sur le fait que les capacités du transport polarisé de l'auxine (PAT) seraient limitées. Le PAT permet le transport de l'auxine depuis le méristème apical, son lieu de production principal, jusqu'au système racinaire, assurant le contrôle de la dormance du bourgeon axillaire (Bennett and Leyser, 2006; Leyser, 2009). Le PAT étant limité au niveau de la tige principale, les bourgeons latéraux produisant de l'auxine et ne pouvant l'exporter vers la tige, ces derniers restent dormants. Lorsque les capacités de transport de l'auxine augmentent, les bourgeons axillaires peuvent exporter leur auxine dans la tige et il en résulte la levée de dormance des bourgeons, par exemple lors de la décapitation. Les strigolactones diminueraient les capacités de transport de l'auxine, par un mécanisme encore inconnu. Dans ce modèle, les cytokinines stimulent la levée de dormance en entrant directement dans les bourgeons lorsque le système vasculaire est établi (Stirnberg et al., 2010).

Chez le pois, l'auxine inhibe localement au niveau de la tige l'expression des gènes de biosynthèse des cytokinines (*ISOPENTENYL TRANSFERASE (IPT)*) et stimule l'expression du gène qui code pour la *CYTOKININ OXIDASE (CKX)*, enzyme impliquée dans la dégradation des cytokinines. Les cytokinines stimulent la division et la différenciation cellulaire ce qui provoque la levée de dormance des bourgeons (Tanaka et al., 2006; Shimizu-Sato et al., 2009).

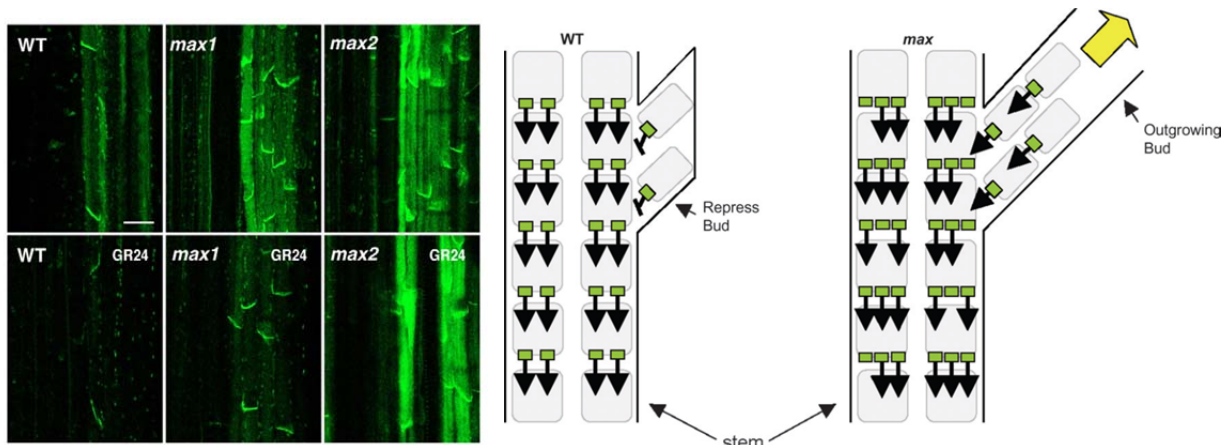


Figure 16. Effet des strigolactones sur les protéines PIN1.

(Gauche) Effet du GR24 sur l'accumulation des protéines PIN1 (Crawford et al., 2010)

Localisation des protéines PIN1:GFP sur une section longitudinale de la base d'une inflorescence d'Arabidopsis âgée de 6 semaines chez une plante sauvage (gauche), *max1* (centre) et *max2* (droite). Les sections sont incubées avec 0.1% d'acétone (haut) ou avec 5 μ M de GR24 (bas) et observées après 6h.

(Droite) Modèle de régulation des strigolactones sur le transport polarisé de l'auxine (Ongaro and Leyser, 2008)

Dans la tige de plante sauvage (WT), les strigolactones répriment le transport de l'auxine : les capacités du transport de l'auxine sont limitées et saturées par l'auxine provenant de l'apex. Les bourgeons ne peuvent donc pas exporter dans la tige l'auxine qu'ils produisent, et restent donc dormants.

Chez les mutants *max* déficients en strigolactones ou incapables de percevoir les strigolactones, les capacités de transport de l'auxine sont augmentées et les bourgeons peuvent exporter leur auxine. Il y a ainsi levée de dormance des bourgeons axillaires (flèche jaune). Les carrés verts représentent les transporteurs d'efflux d'auxine (PIN1) et les flèches, les flux d'auxine.

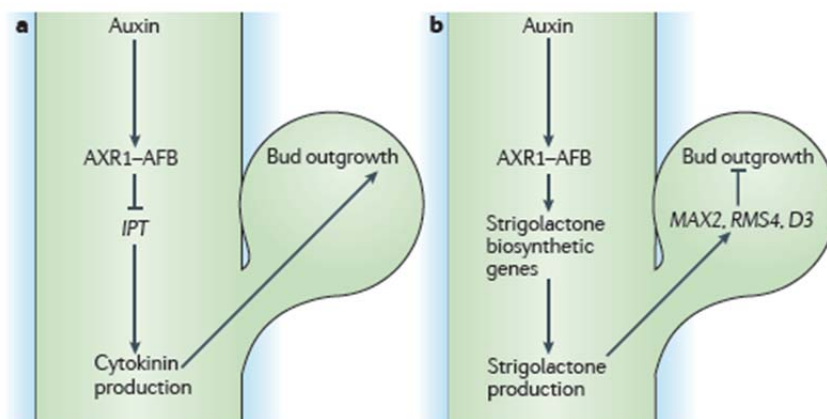


Figure 17. Modèle du second messager pour l'activation du bourgeon

Dans ce modèle, l'auxine régule la production d'un second messager qui migre directement dans le bourgeon afin de contrôler son activité. Les cytokinines et les strigolactones sont les candidats pour être ces seconds messagers, l'auxine régulant la biosynthèse de ces hormones via la voie classique AXR1-AFB. (AUXIN RESISTANCE PROTEIN 1-AUXIN SIGNALLING F-BOX PROTEIN)

a. L'auxine régule la biosynthèse des cytokinines en réprimant l'expression des gènes de biosynthèse *IPT* (ADENYLATE ISOPENTENYLTRANSFERASE) spécifique du nœud. Le niveau local de cytokinine est augmenté lorsque la plante est décapitée (=suppression de la source d'auxine). Les CK peuvent être transportées dans le bourgeon. Les cytokinines peuvent promouvoir directement la levée de dormance des bourgeons axillaires.

b. L'auxine régule la biosynthèse des strigolactones en stimulant l'expression des gènes de biosynthèse qui codent pour les CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7 (CCD7) et CCD8, ce qui provoque l'augmentation du niveau de strigolactones et empêche l'activation des bourgeons via des mécanismes de perception impliquant MAX2, RMS4 ou D3 (Domagalska and Leyser, 2011).

L'hypothèse d'une action des SL sur le transport polarisé de l'auxine est fondée sur le fait que les mutants *max* présentent une forte accumulation des protéines PIN1, protéines responsables du transport polarisé basipète de l'auxine dans la tige (Vanneste and Friml, 2009) et que la dormance des bourgeons axillaires peut être levée par application d'un inhibiteur du transport de l'auxine : l'acide naphtyphthalamique (NPA) (Bennett and Leyser, 2006). D'autres éléments renforcent cette théorie, comme l'utilisation de modèles mathématiques qui a permis de montrer que le transport de l'auxine pouvait expliquer le contrôle de la dormance des bourgeons axillaires (Prusinkiewicz et al., 2009). De plus (Crawford et al., 2010), montrent que la production de PIN1 et donc le transport de l'auxine pouvait être réduit par l'application de GR24 mais aussi que le transport de l'auxine est modifié dans les mutants *max* (Figure).

Cependant, l'augmentation du transport de l'auxine dans les mutants *max*, pourrait être dû en réalité, à une réponse de rétrocontrôle dû à l'augmentation des teneurs en auxine des mutants *max*, étant donné que l'on sait que l'auxine régule elle-même son propre transport (Vieten et al., 2005). De plus, si l'exportation d'auxine par le bourgeon axillaire est nécessaire pour sa croissance, le fait que ce soit le déclencheur initial du démarrage est contesté (Waldie et al., 2010).

II. B. 2. Hypothèse directe : les strigolactones sont le second messager du contrôle de la ramification

La seconde hypothèse repose sur le fait que l'auxine régule le niveau de strigolactones de la plante *via* l'expression des gènes de biosynthèse de strigolactones, notamment *CCD8* (Sorefan et al., 2003; Foo et al., 2005). De plus, dans les expériences de décapitation, les strigolactones peuvent inhiber la levée de dormance des bourgeons sans application d'auxine sur l'apex décapité (Brewer et al., 2009). En effet, c'est le ratio strigolactones/cytokinines qui détermine le devenir des bourgeons axillaires.

Des expériences sur le pois ont montré qu'il était possible d'inhiber le démarrage des bourgeons axillaires, dont l'inhibition a été levée par la décapitation, directement par l'application de strigolactones sur le bourgeon (Brewer et al., 2009). De plus l'application exogène de fortes concentrations d'auxine sur des plantes sauvages de pois, montre que le transport de l'auxine n'est pas saturé dans la tige de plantes sauvages (Brewer et al., 2009). De plus, même si la décapitation permet la levée de dormance des bourgeons,

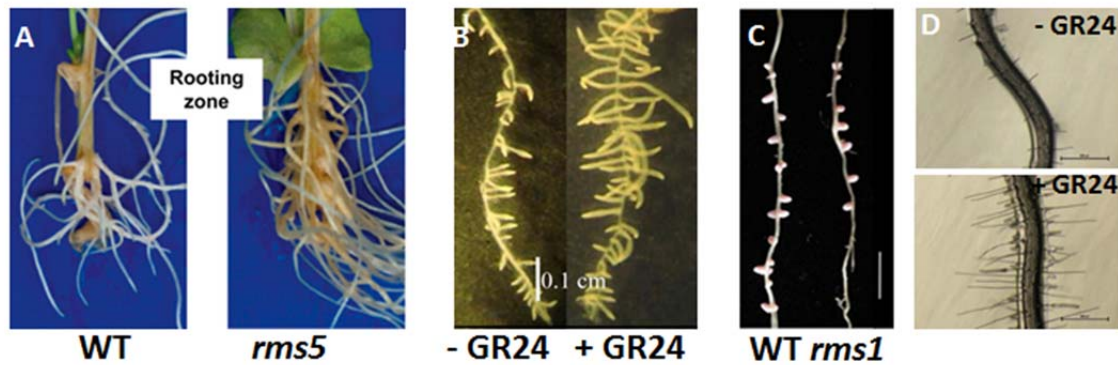


Figure 18. Effet des strigolactones sur le système racinaire

II.A. Les strigolactones inhibent le développement des racines adventives (Rasmussen et al., 2012)

Tige de pois coupée et trempée dans une solution nutritive chez le type sauvage (WT) (gauche) et le mutant *rms5* (droite)

II.B. Les strigolactones stimulent la mise en place des racines latérales (Ruyter-Spira et al., 2010)

Racine d'*Arabidopsis* 8 jours après traitement montrant une augmentation de la longueur et de la densité des racines latérales chez les plantes traitées avec le GR24.

II.C. Les strigolactones stimulent la mise en place des nodosités chez le pois (Foo and Davies, 2011).

Nodules de racines d'une plante de pois sauvage (WT) et d'une plante mutante déficiente en strigolactones (*rms1*) (les racines secondaires ont été supprimées) barre d'échelle : 1 cm.

II.D. Les strigolactones stimulent la mise en place du chevelu racinaire (Kapulnik et al., 2011)

Exemple de segment de racine primaire de plantules d'*Arabidopsis* WT âgées de 48 heures non traité (contrôle) et traité avec du GR24 (3 μ M), barre d'échelle : 500 μ m.

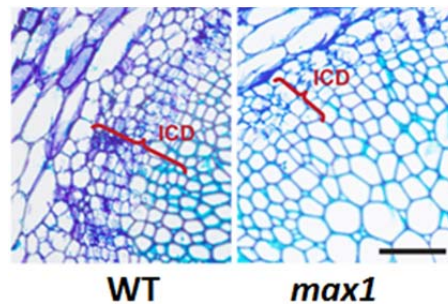


Figure 19. Rôle des strigolactones dans la régulation du cambium

Section transversale d'une inflorescence d'*Arabidopsis* juste au-dessus de la rosette chez une plante sauvage (WT) et une plante mutante déficiente en strigolactone (*max1*) La zone de tissu dérivée du cambium est indiquée par une accolade ({}). Barre d'échelle : 50 μ m. (Agusti et al., 2011).

des expériences de « girdling » (qui consiste à supprimer les vaisseaux vivants du phloème et ainsi à bloquer les flux basipètes de la plante) ont montré que la suppression des flux basipètes d'auxine ne pouvait pas lever la dormance des bourgeons axillaires, ce qui supporte l'existence d'un second signal beaucoup plus rapide que l'auxine, et dont la nature serait électrochimique (Morris et al., 2005) mais qui n'a pas encore été mis en évidence.

Les deux hypothèses ne sont pas incompatibles. En effet, les deux hormones peuvent interagir par une boucle de régulations dans laquelle les strigolactones inhibent le transport de l'auxine et l'auxine active la synthèse des strigolactones.

II. C. Les strigolactones, une hormone aux effets pléiotropes

Avec la découverte d'une nouvelle hormone, de nouvelles fonctions des strigolactones dans de nombreux processus physiologiques des plantes sont mises en évidence.

II. C. 1. Rôle sur l'architecture de l'appareil racinaire (Koltai, 2011)

L'analyse de mutants d'*Arabidopsis* de biosynthèse et de perception des strigolactones, ainsi que les traitements hormonaux ont révélé que cette molécule affectait le développement racinaire.

Les mutants *max3*, *max4* (mutant de biosynthèse de strigolactones) et le mutant *max2* (mutant de perception de strigolactones) présentent un nombre de racines latérales plus important que le type sauvage en conditions suffisantes de phosphate. De plus, l'application de GR24 en conditions suffisantes de phosphate réduit la formation des racines latérales (Figure 18 B). Cependant en conditions limitantes en phosphate, les strigolactones ont un effet opposé (Ruyter-Spira et al., 2010). Ainsi, les strigolactones seraient impliquées dans la formation des racines latérales mais aussi dans la croissance de la racine primaire, en fonction de la disponibilité en phosphate dans le milieu (Kapulnik et al., 2011). Les strigolactones stimulent également la mise en place du chevelu racinaire (=poils racinaires (Kapulnik et al., 2011) (Figure 18 D). Le rôle des strigolactones sur l'architecture racinaire est très complexe et nécessite encore beaucoup d'investigations mais il semblerait que cette action dépende fortement de la disponibilité en nutriments.

Le mutant de biosynthèse des strigolactone *rms1* chez le pois montrent également une réduction du nombre de nodosités (Figure 18 C). Les nodosités sont des structures racinaires sphériques dans lesquelles sont hébergées des bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* qui permettent la fixation de l'azote atmosphérique N₂ par la plante. Cette symbiose est

caractéristique des légumineuses. L'étude réalisée par (Foo and Davies, 2011) montre que les strigolactones régulent positivement le nombre de nodosités.

Les racines adventives sont des racines qui se mettent en place à partir de tissu non racinaire comme la tige ou les feuilles. Ce processus a une importance considérable dans la propagation d'espèces à intérêt commercial, comme dans l'industrie forestière ou horticole. L'identification d'un régulateur de la mise en place de ces structures est donc très importante. Les mutants de pois *rms* possèdent un nombre de racines adventives plus important que le type sauvage (Figure 18 A). Ainsi, les strigolactones régulent négativement la mise en place de ces racines adventives (Rasmussen et al., 2012). De plus, l'utilisation d'inhibiteur de la biosynthèse des strigolactones, comme la fluridone (un inhibiteur de la synthèse des terpenoïdes), permet de stimuler la formation de racines adventives (Rasmussen et al., 2012).

II. C. 2. Rôle dans la mise en place du cambium interfasciculaire

Les strigolactones interviennent également dans la croissance des tissus secondaires d'*Arabidopsis*, indépendamment de la dominance apicale. La strigolactone synthétique GR24 stimule l'activité cambiale et les mutants *max* présentent une réduction de la taille du cambium, visible sur des sections transversales de tige réalisées juste au-dessus de la rosette (Agusti et al., 2011) (Figure 19). De plus l'action des strigolactones sur l'activité cambiale est directe et ne fait pas intervenir le transport polarisé de l'auxine. Les strigolactones permettraient de coordonner la croissance des plantes en agissant sur la croissance secondaire ou croissance en épaisseur et sur la ramification.

II. C. 3. Rôle dans la régulation de la photosynthèse

Une analyse transcriptomique réalisée sur des racines de tomates traitées au GR24 et dont les résultats ont été validés dans les tissus foliaires par Q-PCR a révélé que les strigolactones régulaient de façon positive l'expression de gènes impliqués dans la collecte de la lumière (Mayzlish-Gati et al., 2010). Les mutants de tomate déficients en strigolactones montrent une quantité de chlorophylle moins importante, ainsi qu'une expression des gènes associés à la collecte de lumière réduite en comparaison avec le type sauvage. Ces mutants montrent également une réduction de l'expression des gènes codant pour des composants des photosystèmes I et II, des précurseurs des protéines de liaison à la chlorophylle, des molécules de transferts d'électrons ou encore certaines sous unités de la

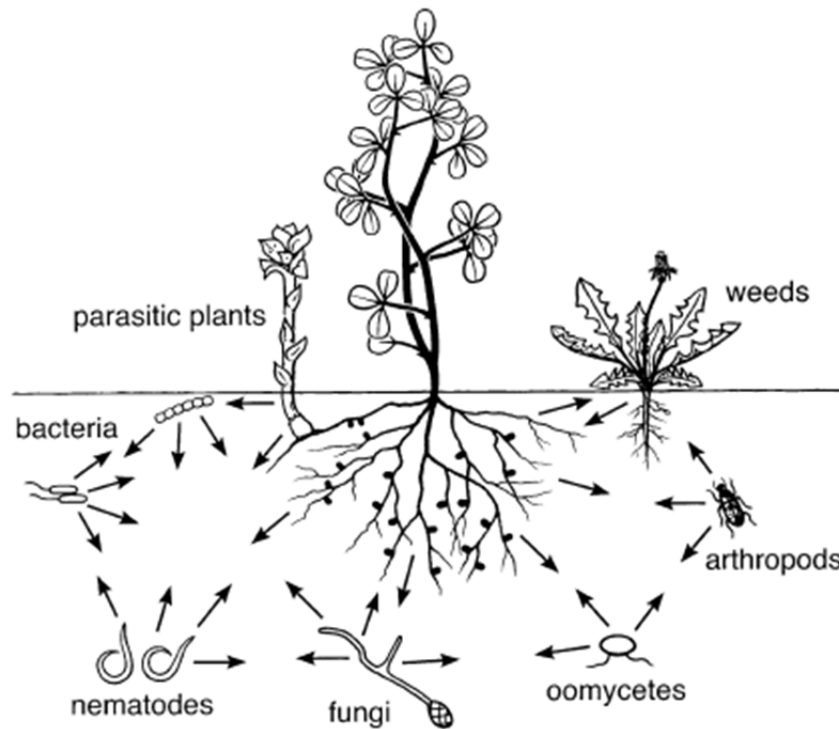


Figure 20. Illustration des différentes interactions entre la plante et les éléments de la rhizosphère

Les flèches indiquent les molécules sécrétées par les différents partenaires, des interactions entre plantes et micro-organismes qui aboutissent à la mise en place d'interactions symbiotiques ou parasitiques (Hirsch et al., 2003).

RuBisCO (Mayzlish-Gati et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, l'étude du mutant *max2* montre que la protéine MAX2 intervient dans le contrôle de la photomorphogénèse (Shen et al., 2007). Tous ces résultats suggèrent que les strigolactones participent à la régulation de la capture de la lumière afin d'optimiser le développement de la plante.

III. Les strigolactones : des molécules de signalisation de la rhizosphère

L'appareil racinaire des plantes assure la fonction d'ancrage au sol, l'apport d'eau ainsi que la nutrition minérale des végétaux. Outre ces fonctions évidentes, les racines secrètent de nombreux composés dit métabolites secondaires ou exsudats qui diffusent dans l'environnement proche des racines : la rhizosphère. On définit la rhizosphère comme la partie du sol qui est en étroite relation, directe ou indirecte, avec les racines de la plante. La rhizosphère est le siège de nombreuses interactions inter et intra spécifiques qui sont souvent initiées et établies grâce à ces métabolites secondaires. Les exsudats racinaires ont différentes propriétés : phytotoxiques, antimicrobiennes, antibiotiques et insecticides, qui vont donc conditionner la nature et la densité des relations entre les racines et les organismes du sol. Ces signaux chimiques, perçus par les différents organismes (arthropodes, champignons, bactéries, graines de plantes parasites etc....) assurent la communication au sein de la rhizosphère, entraînant des relations plus ou moins bénéfiques (Hirsch et al. 2003)(Figure 20). Ce paragraphe représente une part importante de l'introduction et n'est pas indispensable à la compréhension de l'étude réalisée durant ma thèse sur l'action des strigolactones en tant qu'hormone végétale. Nous avons voulu montrer l'importance des strigolactones en agronomie et que les recherches sur les SL peuvent avoir de nombreuses applications (Voir discussion finale).

III. A. Les strigolactones stimulent la ramification des hyphes des champignons endomycorhiziens à arbuscules

La fonction d'absorption chez les plantes s'effectue au niveau du système racinaire, mais cette absorption est le plus souvent réalisée en symbiose (échange à bénéfice réciproque) avec des champignons dits mycorhiziens. Il existe plusieurs types de symbioses mycorhiziennes, dont la symbiose endomycorhizienne à arbuscules qui se caractérise par une colonisation des racines de façon inter et intracellulaire par les hyphes des champignons de types *Gloméromycètes*. Cette symbiose ancestrale, que l'on date de 540 millions

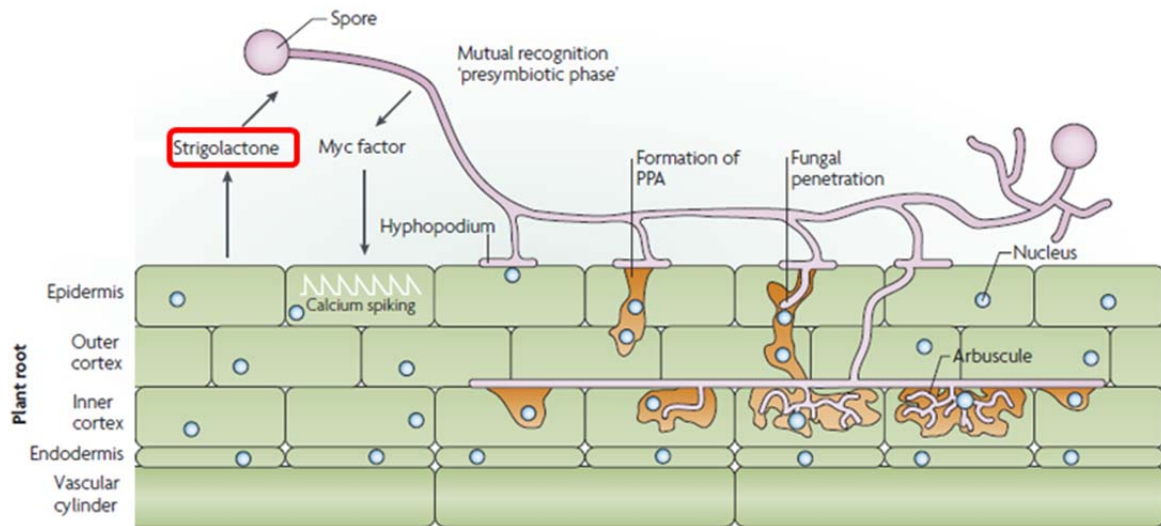


Figure 21. Etapes de la mise en place de la symbiose mychrizienne à arbuscule

Les plantes exsudent des strigolactones qui induisent la germination des spores et la ramification des hyphes. Le champignon produit des facteurs Myc, ce qui conduit à des oscillations calciques dans les cellules de l'épiderme racinaire, et active les gènes associés à la symbiose de la plante. Le champignon développe alors une structure particulière l'appressorium. Des stimulations chimiques et mécaniques permettent alors la formation d'un appareil de pré-pénétration (PPA). Les hyphes du champignon s'étendent entre le PPA et l'appressorium, ce qui guide le champignon vers le cortex et forme des arbuscules (Parniske, 2008).

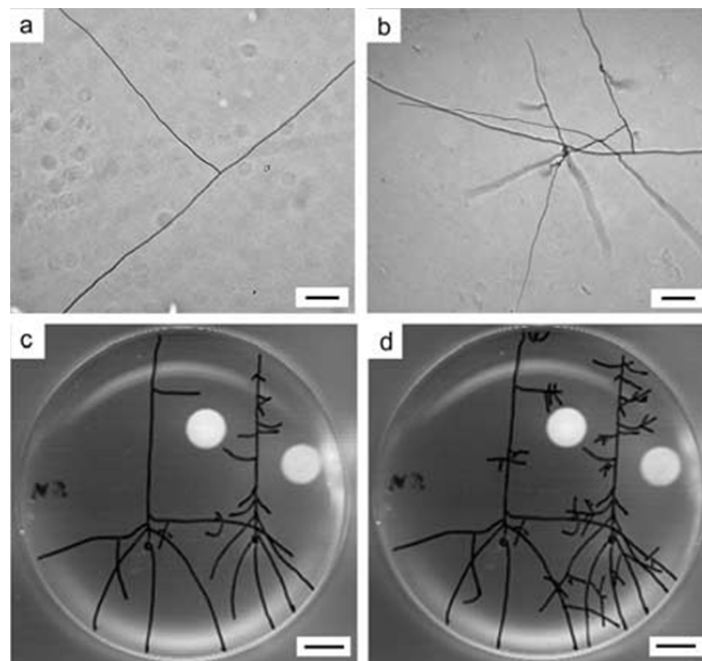


Figure 22. Stimulation de la ramification des hyphes chez le champignon *Gigaspora margarita* par une fraction contenant le 5-Déoxy-strigol

a et c : hyphe traité avec de l'éthanol 70% b et d : hyphe traité avec la fraction contenant le 5 Déoxy-strigol (Akiyama et al., 2005)

d'années (âge approximatif de l'apparition des premières plantes terrestres) (Remy et al., 1994), concerne plus de 80% des plantes terrestres.

L'établissement de symbioses à arbuscules est dépendant de facteurs synthétisés et exsudés par les plantes hôtes dans la rhizosphère. Le champignon émet également des composés, les facteurs *Myc*, qui permettent à la plante de reconnaître le potentiel symbionte (Parniske, 2008) (Figure 21). Les facteurs qui stimulent la croissance et la ramification des hyphes de ces champignons sont appelés « branching factors ». En 2005, Akiyama et al. identifient ce « branching factor » chez le lotier, *Lotus japonicus*. Ils isolent une fraction active qui contient une nouvelle strigolactone, le 5-Déoxy-strigol. Ultérieurement, des tests avec d'autres strigolactones et sur d'autres espèces de champignons à arbuscules, notamment *Gigaspora rosea*, ont montré que cette famille de molécules pouvait stimuler la ramification des hyphes à des concentrations extrêmement faibles (de l'ordre de 10^{-12} M) (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008) (Figure 21).

III. B. Les strigolactones stimulent la germination des graines de plantes parasites *Striga* et *Orobanche* (syn. *Phelipanche*)

Dans le monde végétal, l'autotrophie n'est pas le seul mode de nutrition ; certaines plantes présentent un mode de vie parasitaire : c'est le cas de l'*Orobanche* ou du *Striga*, deux genres de plantes de la famille des Scrofulariacées (Figure 23) qui sont des biotrophes obligatoires et qui causent beaucoup de dégâts dans l'agriculture moderne.

Le genre *Orobanche*/*Phelipanche* regroupe des espèces dites holoparasites, c'est-à-dire qu'elles puisent toute leur énergie de leur plante hôte, étant donné qu'elles sont totalement dépourvues de chlorophylle. Actuellement, on a dénombré plus d'une centaine d'espèces d'orobanches qui infestent les Monocotylédones comme les Dicotylédones. Parmi le genre *Orobanche*/*Phelipanche*, seulement *Phelipanche*(*Orobanche*) *ramosa*, *Orobanche cumana*, *Orobanche crenata* et *Orobanche aegyptiaca* parasitent des plantes d'intérêt agricole, la plus connue étant *P. ramosa* (Humphrey et al., 2006). Les orobanches provoquent des dégâts importants sur tout le pourtour méditerranéen et en Asie du sud-ouest où près de 16 millions d'hectares seraient infestés (Humphrey et al., 2006). En Europe, les dégâts causés par 7 espèces d'orobanches se font ressentir notamment sur les cultures de légumineuses



Figure 23. Plantes parasites *Striga hermonthica* sur maïs (gauche) et *Orobanche* sur carotte (droite)

(source : [USDA APHIS PPQ Archive](#))

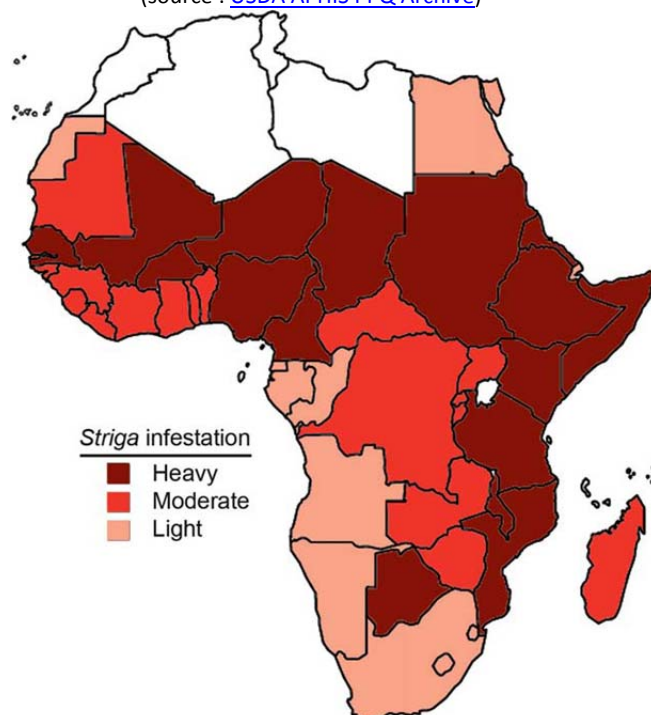


Figure 24. Répartition des zones les plus soumises à l'infestation par le striga en Afrique
L'infestation par le Striga en Afrique est la plus grave dans les zones les plus exposées à l'insécurité alimentaire

comme la fève (*Vicia faba*), le pois chiche (*Cicer arietinum*) et le pois (*Pisum sativum*), mais aussi chez d'autres légumes de consommation courante comme la tomate (*Solanum lycopersicum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et la carotte (*Daucus carota*) ou encore les oléagineux comme le tournesol (*Helianthus annuus*) ou le colza. Les pertes causées peuvent aller de 20 à 100% (Westwood et al., 2010). En France, les dégâts sur le colza sont de plus en plus importants, notamment dans la région Poitou-Charentes.

Le genre *Striga* regroupe des espèces qui possèdent de la chlorophylle et ne sont pas des parasites stricts : elles sont dites hémiparasites. Une partie de leur énergie provenant de la photosynthèse, l'interaction avec la plante hôte permet l'absorption de l'eau et des minéraux. Les strigas regroupent une trentaine d'espèces qui infestent presque essentiellement les Monocotylédones et notamment les plantes d'intérêts agronomiques telles que le sorgho ou le millet, des cultures très développées dans les régions sèches d'Afrique et qui sont à la base de l'alimentation de ces pays (Figure 24). Sur les 28 espèces identifiées, les dégâts les plus importants sont causés par *S. hermonthica* et *S. asiatica* (Westwood et al., 2010).

La lutte contre le striga est donc un enjeu économique majeur dans les pays africains. Près de 300 millions de personnes en Afrique sub-saharienne subissent les dommages causés par le striga et plus de 50 millions d'hectares de céréales sont infestés par le striga sur le continent (Ejeta et al., 2007). L'organisation mondiale de l'agriculture et de l'alimentation (FAO) estime que sur le continent africain, le striga cause des pertes annuelles supérieures à 7 milliards de dollars et en général les rendements seraient diminués de près de 50% (Ejeta et al., 2007) (Figure 24).

Les cycles vitaux de ces 2 genres de plantes parasites sont très proches : à maturité, les plantes parasites produisent un nombre considérable de graines qui peuvent rester en dormance pendant plusieurs années dans le sol et qui ne vont germer que lorsque les conditions de température et d'humidité sont idéales, mais surtout lorsque ces graines ont détecté à proximité la présence d'un système racinaire d'une plante hôte. Des molécules exsudées dans la rhizosphère par les racines de plantes hôtes signalent la présence de celles-ci aux graines de plantes parasites et stimulent ainsi leur germination. Ce mécanisme permet donc de favoriser considérablement les chances de rencontre avec une plante hôte. Il s'agit d'un mécanisme de survie retenu par les plantes parasites. En effet, les graines de ces

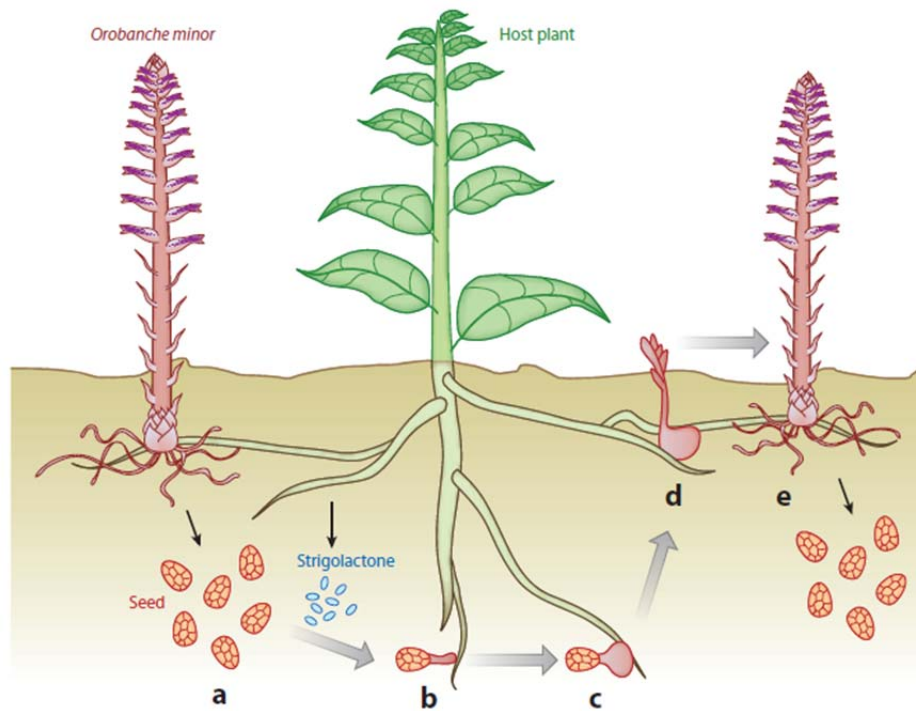


Figure 25. Cycle de vie de de la plante parasite *Orobancha minor*.
(Xie and Yoneyama, 2010).

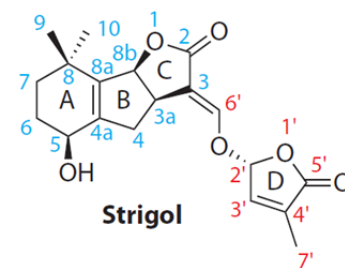


Figure 26. Structure chimique d'une strigolactone : le strigol.
Les lettres majuscules permettent l'indentification des 4 cycles de la molécule et les chiffres permettent la numérotation des différents carbones (Xie and Yoneyama, 2010).

plantes sont de très petite taille (150 à 300 μm), et facilement disséminables par le vent, mais elles sont dépourvues de toutes réserves, d'où la nécessité de trouver extrêmement rapidement une plante hôte, source de nutriments nécessaires au développement dès que la germination est enclenchée. Ayant détecté la présence d'une plante hôte, la graine va développer une radicule qui s'allonge en direction de la racine hôte et forme un haustorium à son contact. Cette structure va permettre l'approvisionnement de la jeune plante parasite en eau et en nutriments. Le parasite s'établit ensuite dans les vaisseaux du xylème permettant un approvisionnement optimal et assurant la mise en place d'un appareil végétatif aérien, puis la production de nouvelles graines, qui vont pouvoir être disséminées dans l'environnement, achevant le cycle de développement (Xie and Yoneyama, 2010)(Figure 25).

Parmi les molécules exsudées par les plantes hôtes et stimulant la germination des graines parasites, il y a principalement les strigolactones. Cette famille de molécules a été identifiée et caractérisée pour la première fois comme agissant sur la germination des graines de plantes parasites en 1966 par Cook. A partir des exsudats de 300 000 plantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum*), il a identifié le strigol, une molécule capable de faire germer des graines de *Striga hemontica*. L'induction de la germination des graines de plantes parasites est permise même avec de très faibles quantités de strigolactones (10^{-12} - 10^{-15}M) (Besserer et al., 2006). Ceci en fait donc un bon test pour détecter la présence de strigolactones dans un échantillon, très souvent utilisé dans l'étude des exsudats racinaires. Ainsi le pourcentage de germination des graines de striga ou d'orobanche sera proportionnel à la quantité de strigolactones présentes dans l'échantillon.

III. C. Les strigolactones : un squelette commun et une variété de groupements

Toutes les strigolactones identifiées présentent à la base la même structure chimique tétracyclique : un squelette tricyclique ABC avec un cycle A à 6 carbones, un cycle B à 5 carbones, un cycle lactone C à 4 carbones couplé à un cycle buténolique D (portant une fonction lactone) par un pont éno-éther (Figure 26). Les différences entre strigolactones se caractérisent par les substitutions présentes sur les cycles A et B (groupements méthyl, hydroxyle, acétate). Les cycles C et D ne montrent quasiment aucune variation ou substitution et des études (dont certaines réalisées au laboratoire) montrent que c'est cette

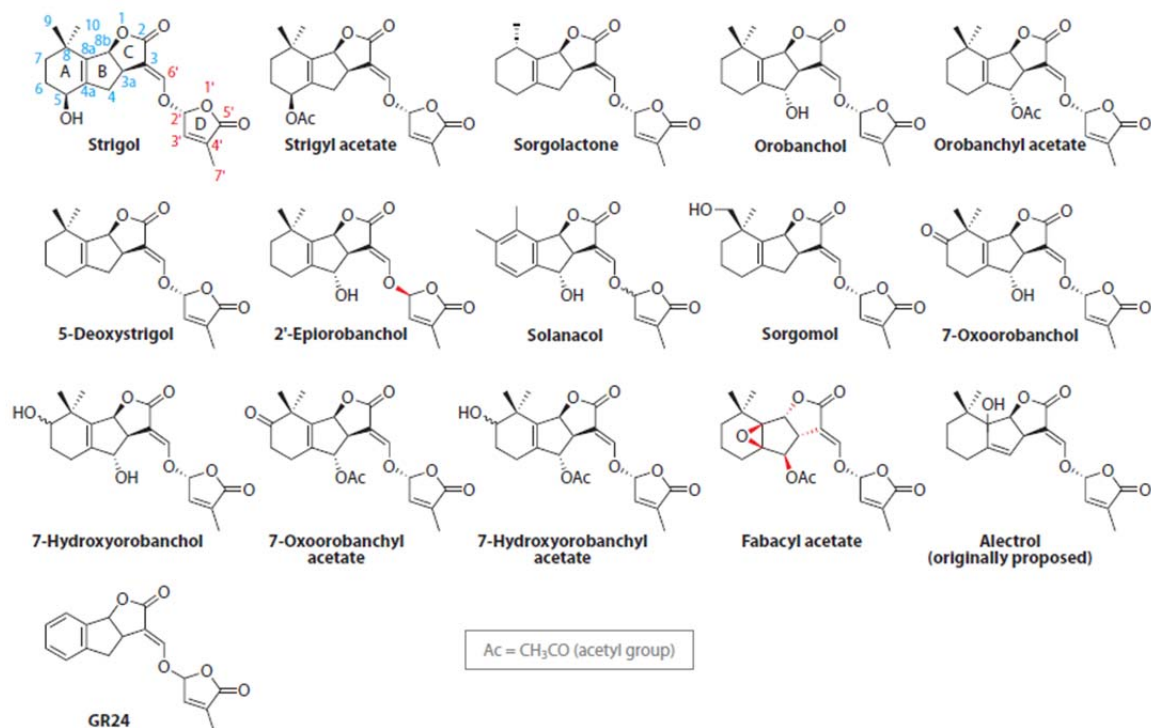


Figure 27. Structure des strigolactones naturelles identifiées actuellement chez les plantes et de l'analogue synthétique GR24.
(Xie and Yoneyama, 2010)

partie qui serait responsable de l'activité biologique de la molécule pour les différentes fonctions biologiques (Akiyama et al., 2010). La diversité de structure des strigolactones et les caractéristiques nécessaires à l'activité hormonale font l'objet d'une étude approfondie dans le chapitre II avec l'article de (Boyer et al., 2012).

Jusqu'à présent l'identification de strigolactones nécessitait l'utilisation d'un très grand nombre de plantes du fait de la faible teneur en strigolactones des plantes et des techniques d'analyse peu sensibles. Il a été montré que des concentrations de l'ordre du pico ou du femto molaire (10^{-12} - 10^{-15} M) étaient capables de stimuler la germination des graines de plantes parasites (Besserer et al., 2006).

Aujourd'hui avec le développement des techniques de spectrométrie de masse et l'augmentation de leur sensibilité, plus d'une quinzaine de strigolactones ont été mises en évidence chez les plantes (Xie and Yoneyama, 2010)(Figure 27). Le fait que cette hormone soit présente dans de nombreux groupes de plantes vasculaires suggère que ces molécules sont produites (au moins ancestralement) dans l'ensemble du taxon des plantes vasculaires. Chez le pois (*Pisum sativum* L.), 5 strigolactones différentes ont été identifiées : le didehydro-orobanchol, l'orobanchol, l'orobanchyl acétate (alectrol), le 5-déoxystrigol, présent chez la plupart des espèces (Yoneyama et al., 2008) et le fabacyl acétate. Cette dernière strigolactone est unique car elle présente un groupe époxyde sur les cycles AB (Xie et al., 2009) et semble être spécifique des légumineuses.

En général, chaque plante ne synthétise pas une seule strigolactone mais un cocktail de quelques strigolactones différentes (en général 4-5), cocktail qui diffère selon les espèces (Humphrey et al., 2006). Cette particularité laisse penser à certains auteurs, que ce cocktail de strigolactones sécrété dans la rhizosphère serait la signature spécifique de chaque plante et permettrait de communiquer avec les différents acteurs de la rhizosphère en signalant sa présence, voir même en empêchant la croissance des autres plantes : il s'agit du mécanisme d'allélopathie (Humphrey et al., 2006).

D'autres seconds métabolites des plantes ont été identifiés qui stimulent la germination des graines de plantes parasites, et montrent des homologies de structure avec les strigolactones comme le peagol et le peagoldione ou encore le dihydrosorgoleone (Xie and Yoneyama, 2010). Chez le colza, une étude récente a montré que ce ne sont pas les strigolactones exsudées par la plante qui stimulent la germination des graines de plantes parasites, mais des dérivés de glucosinolates (Auger et al., 2012)

Conclusion :

Les strigolactones sont une famille d'hormones d'une quinzaine de membres dont il reste probablement des membres à identifier. Cette famille de molécules possède une triple action chez les plantes : hormonale, dans les relations symbiotiques et les relations parasites. Ces molécules présentent une diversité de structure importante et celle-ci fera l'objet d'une étude structure activité pour le contrôle de la ramification qui sera détaillée dans le Chapitre II avec l'article (Boyer et al., 2012).

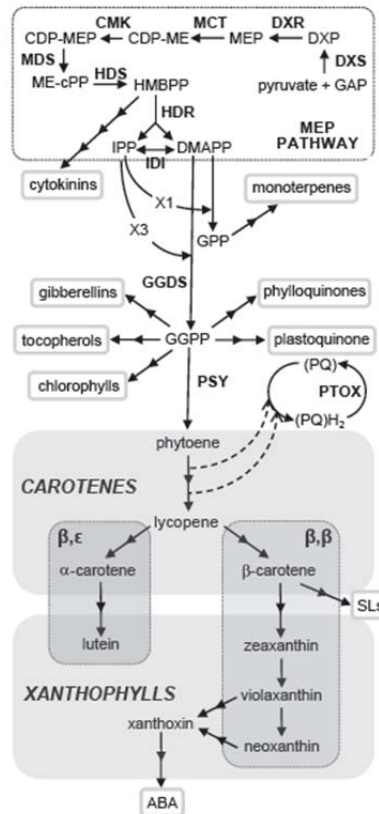


Figure 28. Voie de biosynthèse des caroténoïdes et voies connexes chez *Arabidopsis*
GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; **DXP**, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; **MEP**, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate ; **CDP-ME**, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; **CDP-MEP**, **CDP-ME** 2-phosphate; **ME-cPP**, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; **HMBPP**, 4-hydroxy- 3-methylbut-2-enyl diphosphate; **IPP**, isopentenyl diphosphate; **DMAPP**, dimethylallyl diphosphate; **GPP**, geranyl diphosphate; **GGPP**, geranylgeranyl diphosphate; **ABA**, abscisic acid; **SLs**, strigolactones. Les Enzymes sont indiqué en gras : **DXS**, **DXP** synthase; **DXR**, **DXP** reductoisomerase; **MCT**, **MEP** cytidyltransferase ; **CMK**, **CDPME** kinase; **MDS**, **ME-cPP** synthase; **HDS**, **HMBPP** synthase; **HDR**, **HMBPP** reductase; **IDI**, **IPP** isomerase ; **GGDS**, **GGPP** synthase; **PSY**, phytoene synthase; **PTOX**, plastidial terminal oxidase(Ruiz-Sola and Rodriguez-Concepcion, 2012).

IV. La biosynthèse des strigolactones et sa régulation

Les expériences qui ont conduit à la découverte des strigolactones en tant qu'hormone végétale ont permis de mieux comprendre la biosynthèse de cette molécule. Ainsi, on a découvert qu'il s'agissait d'un dérivé de caroténoïdes et que les gènes codant pour les enzymes intervenant dans les premières étapes de la biosynthèse s'exprimaient essentiellement dans les parties racinaires de la plante (Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006). Il a été montré que l'expression de ces gènes est finement régulée par d'autres hormones et les paramètres environnementaux (Sorefan et al., 2003; Foo et al., 2005; Umehara et al., 2010). Les expériences de greffes avec un simple fragment de tige sauvage ont montré que l'on pouvait inhiber la ramification d'une plante déficiente en strigolactones et donc que cette hormone était active à de très faibles concentrations (Booker et al., 2004). Les quantifications ont confirmé que cette hormone était présente en faible quantité dans la plante, quantités très fortement dépendante de la nutrition minérale de la plante (Xie and Yoneyama, 2010).

IV. A. Les strigolactones sont des dérivés de caroténoïdes

Chez les plantes, les caroténoïdes ont un rôle prépondérant dans la collecte de la lumière et dans la photoprotection, mais aussi dans la coloration (Ruiz-Sola and Rodriguez-Concepcion, 2012). Ils sont également les précurseurs des apocaroténoïdes hormonaux comme l'acide abscissique ou les strigolactones (Figure 28).

Avant d'être identifiées comme des dérivés de caroténoïdes, les strigolactones étaient considérées comme des sesquiterpènes (Bouwmeester et al., 2003). Les sesquiterpènes sont des terpènes composés de 3 motifs isoprènes : c'est-à-dire 15 carbones. Les terpènes sont des molécules impliquées dans la photosynthèse (pigments) dans la protection des plantes (métabolites secondaires) mais aussi ce sont des précurseurs d'hormones végétales (cytokinines, gibbérellines, acides abscissique etc...)(Figure 28). Du fait des faibles concentrations de strigolactones présentes dans les plantes, il était impossible de réaliser un marquage isotopique permettant de déterminer leur origine biosynthétique. C'est donc une approche mutant qui a permis de montrer que les strigolactones étaient issues de la voie des mévalonates, et plus précisément de la voie des caroténoïdes ((Matusova et al., 2005)). Ainsi les strigolactones seraient issues du β -carotène, des enzymes seraient capables de cliver ces caroténoïdes en apocaroténoïdes, et ces enzymes seraient proches de celles qui participent

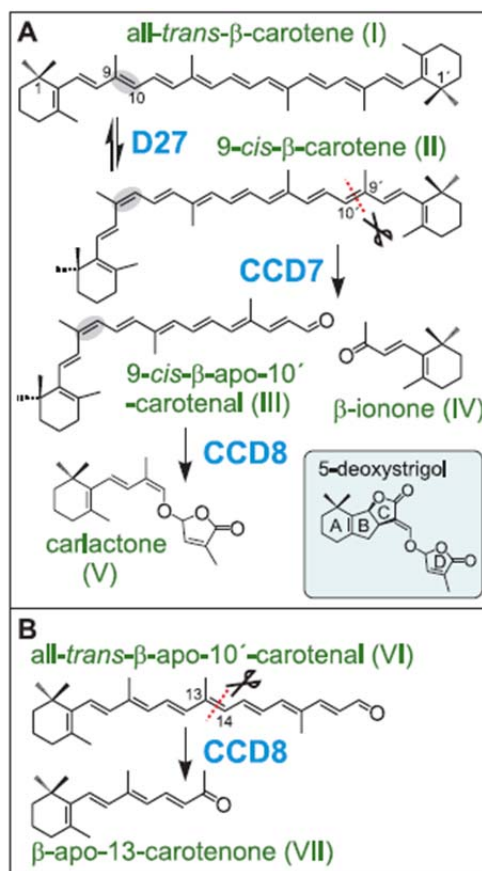


Figure 29. Voie de biosynthèse de la carlactone, précurseur des strigolactones.

- (A) D27 catalyse l'isomérisation de la double liaison C9-C10 du all-trans- β -carotène (I; C40), en 9-cis- β -carotène (II) qui est clivé par CCD7 au niveau de la position C9'-C10' en 9-cis- β -apo-10'-carotenal (C27; III) et β -ionone (C13; IV). CCD8 convertit le composé III en carlactone (V) qui contient donc le cycle D et le pont enol-ether présent chez le 5-deoxystrigol (encadré)
- (B) CCD8 catalyse également la conversion du all-trans- β -apo-10'-carotenal en β -apo-13-carotenone, mais cette réaction est 10 fois plus lente que la cis isomérisation (Alder et al., 2012).

à la synthèse de l'acide abscissique mais les deux voies sont totalement indépendantes (Matusova et al., 2005).

IV. B. Les enzymes chloroplastiques qui clivent les caroténoïdes

Parallèlement à l'étude de la biosynthèse des strigolactones dans le système mycorhizien, des études de la ramification sur des mutants de pois ont permis de mettre à jour des enzymes, CCD7 et CCD8, qui participeraient à la synthèse d'un signal inhibiteur de la ramification (Beveridge, 2006) et c'est la mise en relation de ces travaux qui a permis de déterminer la nature du signal inhibiteur mais aussi d'élucider les premières étapes de la conversion du betacarotène en strigolactones (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008).

Ainsi les enzymes CCD7 et CCD8 codées respectivement chez le pois par les gènes *RMS5* et *RMS1*, *D10* et *D17* chez le riz ou encore *MAX3* et *MAX4* chez *Arabidopsis* interviennent dans la biosynthèse des strigolactones. Ceci a été montré par le fait que les mutants de ces 2 gènes étaient déficients en strigolactones endogènes (chez le pois et le riz) et que le phénotype sauvage pouvait être restauré par l'application de strigolactones synthétiques exogènes (Figure 12). Ces CCDs (Carotenoid Cleavage Dioxygenase) appartiennent à une très grande famille d'enzymes présentes chez de nombreux êtres vivants. Ainsi chez *Arabidopsis*, on peut compter 9 membres qui à l'exception de CCD1 sont retrouvées dans les plastes et clivent les caroténoïdes (Auldrige et al., 2006). *In vitro*, les enzymes CCD7 clivent spécifiquement le β -carotène au niveau de la double liaison entre les carbones C9' et C10' afin d'obtenir le 10'-apo- β -caroténal. Ce produit est ensuite clivé au niveau de la double liaison entre C13 et C14 produisant ainsi le 13'-apo- β -caroténone, et on a longtemps pensé que ce composé était le précurseur des strigolactones (Schwartz et al., 2004; Alder et al., 2008). Mais avec les travaux d'Alder et al en 2012 et la découverte d'un nouveau gène de biosynthèse, *D27* (Lin et al., 2009), préalablement placé en aval des 2 CCDs, une nouvelle voie de biosynthèse des strigolactones a été proposée.

Le mutant *dwarf27* (*d27*) de riz présente un phénotype nain et hyper ramifié comme les mutants *d10* et *d17*, déficients en strigolactones et l'application de GR24 sur le mutant restaure le phénotype sauvage. Ces données ont permis de conclure que ce mutant affectait un gène de la voie de biosynthèse des strigolactones (Lin et al., 2009). Mais la nature de la réaction chimique catalysée par D27 n'était pas caractérisée. Une approche *in vitro* a été réalisée afin de déterminer la nature des réactions chimiques réalisées par les enzymes *D27*,

CCD7 et *CCD8*. En exprimant les gènes d'*Arabidopsis*, de pois et de riz codant pour ces protéines dans le système bactérien *E. coli*, Alder et al ont montré que la protéine D27 était une isomérase placée en amont de *CCD7* qui convertit le all-trans- β -carotène en 9-cis- β -carotène qui est le substrat de l'enzyme *CCD7*. D27 est donc une all-trans/9-cis- β -carotène isomérase. Comme précédemment décrit *CCD7* clive le β -carotène en β -apo-10'-caroténal, mais Alder et al ont montré que *CCD7* clive stéréo-spécifiquement la double liaison C'9-C'10 en trans. Ceci montre que cette position est décisive pour la réaction de biosynthèse des strigolactones. D27 produit donc un dérivé de caroténoïde unique substrat de *CCD7* (Alder et al., 2012) (Figure 12).

C'est donc la configuration cis du β -apo-10'-caroténal au niveau de la double liaison C9-C10 qui détermine la réaction catalysée ensuite par *CCD8*. *CCD8* réagit avec les 2 isomères de β -apo-10'-caroténal : *CCD8* clive la forme trans en β -apo-13-caroténone (Auldridge et al., 2006), et (Alder et al., 2012) ont montré que *CCD8* clive la forme cis en carlactone. La réaction de formation de la carlactone étant 10 fois plus rapide que la formation de la caroténone, il a été conclu que la carlactone était le précurseur de la biosynthèse de strigolactones (Figure 29). La place de *D27* dans la biosynthèse des strigolactones a très récemment été confirmée chez *Arabidopsis* par une approche de greffes (Waters et al., 2012). La caractérisation de l'homologue de pois de *D27* et notamment la régulation de son expression a fait l'objet d'une étude durant ma thèse, détaillée dans le chapitre IV.

Les étapes qui conduisent à la production de strigolactones à partir de la carlactone ne sont malheureusement pas encore connues et d'autres acteurs restent probablement à découvrir. Cependant, parmi les mutants de biosynthèse de strigolactones identifiés, il existe chez *Arabidopsis* un mutant, *max1*, affecté dans le gène codant le cytochrome P450 CYP711A (Stirnberg et al., 2002; Booker et al., 2005). Très peu d'éléments sont connus sur la fonction de cette enzyme dans la voie de biosynthèse, cependant des expériences de greffe ont permis de montrer que cette enzyme se situait en aval des enzymes *CCD7* et *CCD8* (Turnbull et al., 2002) (Figure 12). Une présentation plus approfondie de *MAX1* et une étude de la fonction de ce gène chez le pois réalisée durant ma thèse afin de déterminer la fonction de cette enzyme est présentée dans le chapitre IV.

IV. C. La régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse chloroplastique : CCD7, CCD8 et D27

IV.C.1. La régulation de l'expression des gènes de biosynthèse CCD7 et CCD8 par l'auxine

Les gènes *RMS1/CCD8* et *RMS5/CCD7* sont co-régulés (Johnson et al., 2006) et sont fortement exprimés dans les racines des plantes et les tissus vasculaires de la tige. L'étude détaillée de l'expression du gène *CCD8/RMS1* chez le pois montre une très rapide et forte diminution du taux de transcrits après décapitation ; cette expression est restaurée par une application d'auxine exogène sur l'apex décapité (Beveridge et al., 2000; Foo et al., 2005). Plusieurs études ont montré que l'auxine induit l'expression des gènes de biosynthèse des strigolactones *MAX3* et *MAX4* chez *Arabidopsis*, *RMS5* et *RMS1* chez le pois, et *HTD1* et *D10* chez le riz (Bainbridge et al., 2005; Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006; Zou et al., 2006; Arite et al., 2007; Hayward et al., 2009) (Figure 30). Chez *Arabidopsis* cette régulation par l'auxine est largement dépendante d'AXR1 (AUXIN RESISTANT1). AXR1 est requis pour une activité optimale du complexe SCF^{TIR1} (Skp1-Cul1/Cdc53-F-box) E3ubiquitin ligase, qui inclut le récepteur à l'auxine TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) et intervient dans la stabilité des protéines AUX/IAA, et en particulier le répresseur transcriptionnel IAA12. Le mutant de réponse à l'auxine *bodenlos* (*iaa12*) montre un niveau faible des transcrits *MAX3* et *MAX4* ainsi qu'un phénotype hyperbranché qui peut être compensé par l'application de strigolactones. Ces résultats montrent une régulation des gènes *MAX3* et *MAX4* dépendante d'IAA12 (Hayward et al., 2009). L'étude de l'expression du gène *D27* montre que ce dernier est soumis au même rétrocontrôle que les gènes *MAX3* et *MAX4* (Waters et al., 2012).

IV.C.2. La régulation par un signal de rétrocontrôle : RMS2

L'analyse des mutants *rms* de pois a révélé que ces derniers présentaient des teneurs faibles en cytokinines dans leur sève xylémienne (Foo et al., 2007) mais aussi un niveau d'expression des gènes de biosynthèses *CCD7* et *CCD8* beaucoup plus élevé que chez la plante sauvage (Beveridge et al., 1997; Beveridge et al., 1997). Des expériences de greffes montrèrent que ces deux paramètres étaient régulés par un signal à longue distance provenant des parties aériennes de la plante et qui serait donc un signal de rétrocontrôle (Beveridge, 2000). Parmi les mutants de gènes *RMS* non encore cloné, *rms2* (*ramosus2*) est le meilleur candidat pour être impliqué dans la régulation de ce rétrocontrôle. *rms2* est le

seul

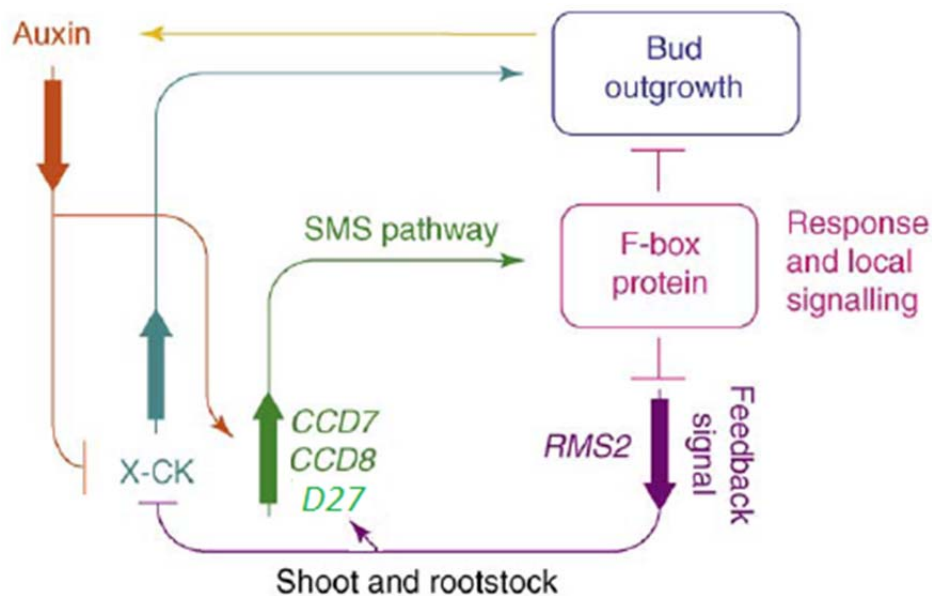


Figure 30. Modèle simplifié de la régulation de la biosynthèse des strigolactones et de la dormance des bourgeons axillaires chez le pois.

Les lignes terminées par une flèche représentent les stimulations et les lignes terminées par un trait plat les répressions. Les flèches épaisses représentent le sens des flux des signaux dans la plante. Les strigolactones (signal autrefois appelé SMS) sont synthétisées par les enzymes D27, CCD7 et CCD8 au niveau des racines mais aussi au niveau des tiges, puis migrent vers le haut de la plante où elles sont perçues au niveau du bourgeon par un mécanisme qui implique la protéine à boîte F, RMS4. Ceci inhibe le développement du bourgeon axillaire et diminue la force du signal de rétrocontrôle. Le signal de rétrocontrôle qui est partiellement dépendant de RMS2, migre vers les parties basses de la plante et va stimuler l'expression des gènes de biosynthèse de strigolactones et diminuer les quantités de cytokines racinaires qui activent la levée de dormance. L'auxine produite dans l'apex stimule la biosynthèse des strigolactones et diminue les niveaux de cytokinines racinaires (adapté de Dun et al., 2009).

mutant *rms* pour lequel on n'observe pas une diminution des teneurs en cytokinines dans la sève brute, ni une augmentation de l'expression des gènes de biosynthèse *CCD7* et *CCD8*. D'autres éléments prouvent l'existence d'un signal de rétrocontrôle, notamment le fait que les doubles mutants *rms1 rms2* et *rms4 rms2* présentent une plus forte ramification que les simples mutants et des teneurs en cytokinines élevées dans la sève brute (Figure 30). Ce mutant n'est connu que chez le pois.

Chez les mutants de riz *d10* et *d3*, on remarque également que le taux de transcrits du gène de biosynthèse *D10* est très élevé par rapport au niveau observé chez le type sauvage. L'application de GR24 restaure le niveau de transcrits du gène *D10* à un niveau normal (Umehara et al., 2008). Ces résultats prouvent l'existence d'un signal de rétrocontrôle présent dans différentes espèces, qui régule la biosynthèse des strigolactones et que ce rétrocontrôle est induit par la perception des strigolactones ou plus exactement par une non-perception des strigolactones.

IV.C.3. La régulation de l'expression de D27 par les facteurs de transcription de type GRAS.

Les facteurs de transcription de type GRAS (GAI, RGA, SCR) sont connus pour leur rôle dans le contrôle du développement des plantes, les plus connus étant les protéines DELLA qui interviennent dans la voie de signalisation des gibbérellines (Hirsch et al., 2009).

Parmi ces protéines, certaines sont impliquées dans la régulation de la biosynthèse des strigolactones : il s'agit des protéines NODULATION SIGNALING PATHWAY NSP1 et NSP2 (Liu et al., 2011). Ces protéines avaient été préalablement décrites chez les Fabacées comme des facteurs de transcription permettant la mise en place des nodosités.

Chez *Medicago truncatula* et le riz, les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 stimulent la biosynthèse des strigolactones en se fixant sur le promoteur du gène codant l'enzyme DWARF27 ce qui active la transcription du gène. Mais à la différence de ce qui est observé chez le riz, les mutants *nsp1* et *nsp2* de *Medicago* ne présentent pas une augmentation de leur ramification. Pourtant dans les deux espèces, les mutants présentent une diminution de la quantité de strigolactones exsudées.

IV. D. La régulation transcriptionnelle par les facteurs abiotiques : lumière et minéraux.

Les teneurs en éléments nutritifs semblent jouer un rôle très important dans la régulation de la biosynthèse des strigolactones et notamment les phosphates et les nitrates.

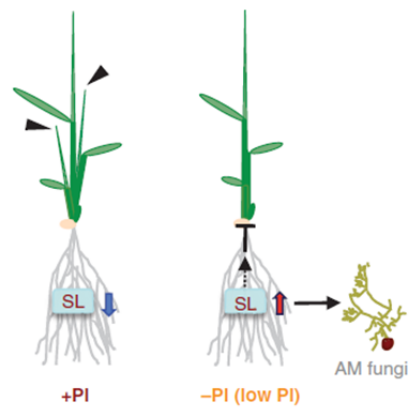


Figure 31. Modèle de contrôle de la quantité de strigolactones en réponse à une carence en phosphates

Gauche : quand la quantité de phosphates est suffisante, le niveau de strigolactones est bas dans la plante ce qui provoque une levée de dormance des bourgeons axillaires (têtes de flèches). Droite : lorsque les quantités de phosphates sont basses, le niveau de strigolactones dans les racines est élevé ce qui contribue à l'inhibition de la levée de dormance des bourgeons. Les flèches épaisses indiquent une augmentation ou une diminution des quantités de strigolactones (Umehara et al., 2010).

Lorsque le milieu est fortement carencé en phosphates, les plantes exsudent de fortes quantités de strigolactones et la biosynthèse des strigolactones est fortement augmentée chez des espèces comme le sorgho, la tomate ou le trèfle (Yoneyama et al., 2007; Yoneyama et al., 2007; Lopez-Raez et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, les mêmes observations ont été réalisées (Kohlen et al., 2010). De même lors d'une carence en nitrate, il a été montré chez certaines espèces non légumineuses que la biosynthèse des strigolactones était stimulée (Umehara et al., 2010).

Comment les phosphates induisent une augmentation de la quantité endogène de strigolactones ? L'étude de l'expression de gènes de biosynthèse de strigolactones chez le riz montre que les niveaux bas de phosphates induisent l'expression des gènes de biosynthèse *D10* et *D17* mais aussi des 5 homologues du gène *MAX1* présents chez le riz (Umehara et al., 2010)(Figure 31).

La baisse de phosphates induit une augmentation de la production de strigolactones qui jouent un rôle double dans le mécanisme d'adaptation à cette carence. D'une part la production de SLs a pour conséquence de stimuler la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, ce qui va permettre d'augmenter l'absorption des phosphates via les mycorhizes (Akiyama et al., 2005), et d'autre part les strigolactones endogènes optimisent la ramification en inhibant celle-ci, et ainsi diminuent la part de phosphates allouée à la ramification permettant de mieux répartir les phosphates dans la plante (Umehara et al., 2010).

IV. E. Les strigolactones : une molécule présente chez la plupart des plantes terrestres.

Les gènes responsables de la biosynthèse des strigolactones mais aussi ceux impliqués dans leur perception semblent être présents dans plusieurs espèces (riz, *Arabidopsis*, pétunia ou pois). Des études sur de nombreux autres modèles de plantes laissent à penser que cette hormone est bien présente chez tous les végétaux terrestres et même chez les Bryophytes, plantes non vasculaires. La question des fonctions hormonales de cette famille de molécules chez ces espèces s'est donc posée.

IV.E.1. Une molécule ancestrale qui permet la communication entre mousses

Les gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de strigolactones CCD7 et CCD8 ont été identifiés chez la mousse *Physcomitrella patens* (*P. patens*), un nouveau modèle en

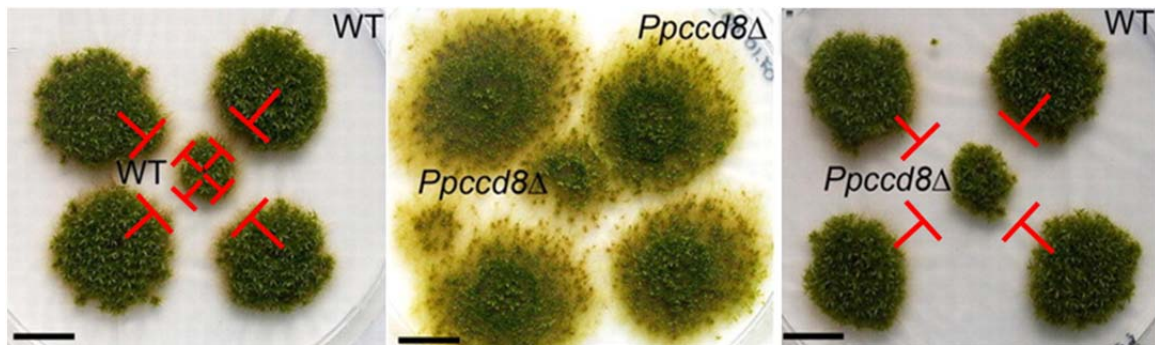


Figure 32. Modèle de la diffusion des strigolactones dans le milieu qui régulent la densité des individus chez la mousse *Physcomitrella patens*

Gauche : Les mousses secrètent une molécule qui inhibe la croissance des autres. **Centre** : Les mousses mutantes pour le gène *CCD8* ne secrètent pas le signal diffusible, les strigolactones, il n'y a pas d'inhibition de la ramification. **Droite** : les mousses de type sauvage situées à la périphérie secrètent un signal, la mousse mutante *Ppccd8* située au centre perçoit ce signal et diminue sa croissance (Proust et al., 2011).

biologie végétale dont le génome a été séquencé (Cove et al., 2006). Cette espèce appartient au taxon des Bryophytes, taxon dont la divergence avec les plantes vasculaires est très ancienne, probablement juste après la conquête du milieu aérien par les végétaux. L'étude du modèle *P. patens* est donc très importante pour comprendre les mécanismes ancestraux de divergence des espèces végétales mais aussi pour comprendre la colonisation du milieu aérien par les végétaux.

Il a également été montré que la mousse *P. patens* produit des strigolactones, ce qui suggère que cette hormone est apparue il y a plus de 450 millions d'années, époque à laquelle on estime la divergence entre les Bryophytes et les plantes vasculaires. Deux rôles fondamentaux des strigolactones ont été suggérés chez la mousse: un rôle dans le développement en inhibant la ramification des filaments et un rôle écophysiologique (Proust et al., 2011). Pour cette deuxième fonction, les strigolactones excrétées dans le milieu par les mousses permettent la régulation du développement des mousses voisines (Figure 32). Les strigolactones informeraient donc de la présence d'autres plantes à proximité et agiraient comme un mécanisme de communication entre individus, rappelant le quorum sensing décrit chez les bactéries : on parle ainsi de « quorum sensing-like » (Proust et al., 2011). Cette fonction est-elle le rôle ancestral des strigolactones ?

IV.E.2. Une origine des strigolactones et des gènes de biosynthèse très anciens

Une récente étude (Delaux et al., 2012) décrit des investigations pour comprendre l'apparition des strigolactones dans la lignée verte et déterminer le rôle ancestral de ces molécules (Figure 33). L'équipe a pu isoler des strigolactones chez les mousses mais aussi chez les hépatiques (Liverworts) et également chez les algues de type Charophytes qui seraient l'ancêtre commun le plus récent des Embryophytes. Les strigolactones seraient donc probablement apparues chez les Charales (Delaux et al., 2012). Des applications de GR24 sur des plantes de ces différents taxons indiquent que la première fonction des strigolactones ne serait pas de promouvoir la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules mais serait la mise en place des rhizoïdes.

De nombreuses études sur d'autres végétaux ont permis d'identifier les gènes de biosynthèse des strigolactones *CCD7* et *CCD8* chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) (Vogel et al., 2010; Kohlen et al., 2012), *CCD8* chez le chrysanthème (*Dendranthema grandiflorum*) (Liang et al., 2010) ou encore *CCD7* et *CCD8* chez le kiwi

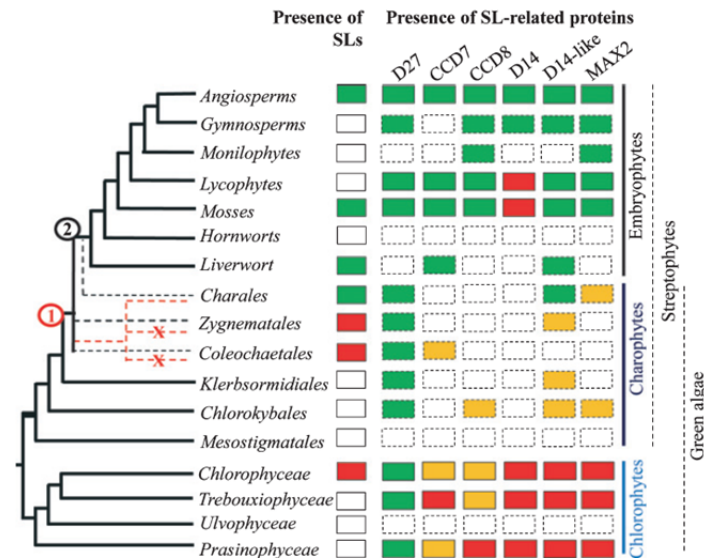


Figure 33. Proposition de schéma pour l'évolution des gènes liés aux strigolactones dans la Lignée Verte

La présence et l'absence de SL et de protéines connues pour être impliquées dans la synthèse de SL et la signalisation sont respectivement indiquées par des cases vertes et rouges. Les cases orange indiquent des homologues putatifs protéiques. Les cases blanches indiquent une absence d'information. Les cases en pointillé indiquent que les données ont été obtenues à partir de séquences de type EST seulement. (1) et (2) indiquent les deux hypothèses de l'apparition des SL dans la lignée verte. (1) les lignes rouges en pointillés montrent l'apparition proposée des SL chez l'ancêtre commun putatif des Charophytes et des Embryophytes. Dans cette hypothèse, les SL sont par la suite perdues chez les Coleochaetales et Zygnematales (X rouge). (2) les lignes noires en pointillé indiquent l'apparition proposée des SL chez les Charales, avec les Charales comme clade sœur des Embryophytes. (Delaux et al., 2012)

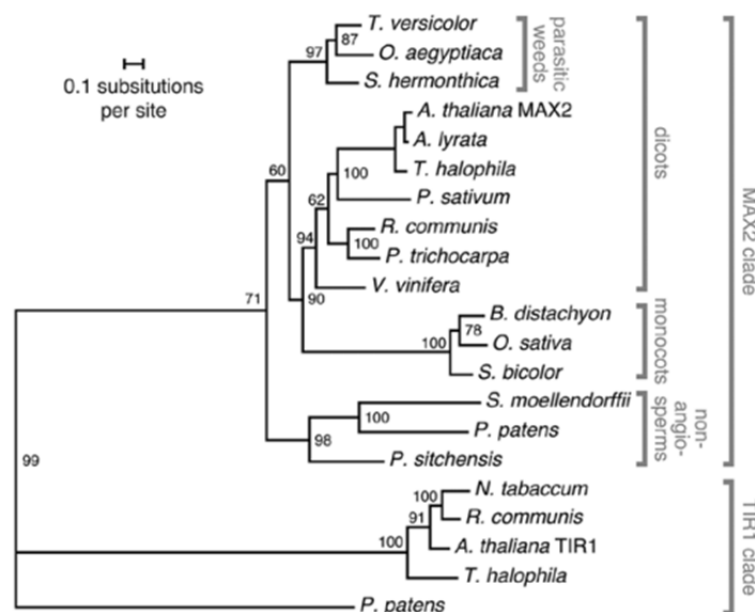


Figure 34. Phylogénie des protéines MAX2 chez les plantes terrestres (Waters et al., 2011)

(*Actinidia chinensis*) (Ledger et al., 2010), et qu'une mutation dans ces gènes provoque un phénotype hyperramifié comme chez le pois ou les autres espèces mentionnées ci-dessus.

IV.E.3. L'implication de MAX2 dans le développement de l'ensemble des plantes terrestres

On voit que les gènes de biosynthèse des strigolactones *CCD7* et *CCD8* sont présents chez de très nombreuses espèces mais c'est également le cas pour la protéine MAX2 impliquée dans la perception des strigolactones (Johnson et al., 2006). Un homologue proche de MAX2 est présent chez la mousse *P. patens*, ce qui suggère que *PpMAX2* serait également requis pour la perception des strigolactones chez la mousse (Waters et al., 2011). Mais, ceci doit être confirmé. Ce travail est en cours au laboratoire qui a obtenu un mutant par recombinaison homologue pour ce gène. De plus, des homologues du gène MAX2 ont été identifiés chez des espèces de plantes parasites dont la germination est induite par les strigolactones comme *Orobancha aegyptica* ou *S. hermonthica*. Il semblerait donc que la perception des strigolactones par les graines de plantes parasites implique également MAX2 (Waters et al., 2011)(Figure 34).

V. L'étude de la perception et de la transduction des strigolactones inspirée d'autres hormones

V. A. Identification de mutants insensibles aux strigolactones

L'approche « mutants » qui a permis de dévoiler la nature du signal inhibiteur de la ramification et quelques-uns des gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des strigolactones, a permis également de mettre en évidence des mutants incapables de percevoir ou de répondre aux strigolactones. Jusqu'à présent seulement 2 gènes ont été identifiés pour leur implication dans la perception des strigolactones *MAX2/RMS4* et *D14* (Beveridge and Kyoizuka, 2010)(Figure 12).

MAX2 code pour une protéine à boîte F (F-Box Protein), (Stirnberg et al., 2002) une famille de protéines qui compte plus de 700 membres chez *Arabidopsis* (Xu et al., 2009), ce qui suggère un mode de perception des strigolactones qui implique un complexe SCF et la voie de dégradation des protéines via le protéasome (Stirnberg et al., 2007). (Voir fonctionnement du complexe SCF dans le paragraphe V.C.). Le fait que le mutant *max2* soit insensible au GR24 et que la protéine MAX2 appartienne à la même famille que TIR1, le récepteur de l'auxine, fait de cette protéine un très bon candidat pour être le récepteur des strigolactones mais aucune étude ne l'a encore prouvé.

L'autre gène impliqué dans la réponse aux strigolactones a été mis en évidence, avec l'identification chez le riz du mutant *d14* (ou encore *d88* ou *htd2*) (Arite et al., 2009; Gao et al., 2009; Liu et al., 2009). Le gène code un membre de la super famille des α/β hydrolases. Le mutant *d14* présente un phénotype hyperbranché et est insensible aux strigolactones comme *d3*, ce qui place D14 en aval de la biosynthèse des strigolactones (Arite et al., 2009) .

Deux hypothèses ont été proposées quant à la fonction de la protéine D14. La ressemblance entre D14 et GID1, récepteur des gibbérellines (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), appartenant toutes 2 à la superfamille des α/β hydrolases suggèrent que D14 pourrait lier les strigolactones et serait le récepteur de cette hormone. Cependant, D14 pourrait également activer les strigolactones en un composé biologiquement actif, de la même manière que SAPB2, une enzyme également de la super famille des α/β hydrolases et qui active l'acide salicylique en un signal actif (Kumar and Klessig, 2003; Forouhar et al., 2005).

D14 et MAX2 apparaissent donc être les meilleurs candidats pour être le récepteur des strigolactones.

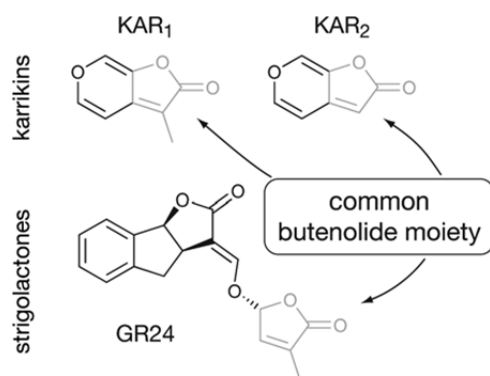


Figure 35. Structure chimique de 2 karrikines actives en comparaison avec la strigolactone synthétique GR24.
(Waters et al., 2012)

V. B. MAX2 une protéine intégrant la perception de nombreux mécanismes/une protéine à multiples fonctions.

V. B. 1. MAX2 est impliquée dans la sénescence foliaire et la photomorphogénèse

Le gène *MAX2* a non seulement été caractérisé pour son implication dans la perception des strigolactones permettant le contrôle de la ramification des plantes (Stirnberg et al., 2007) mais des mutants *max2* d'*Arabidopsis* ont également été identifiés dans 2 autres cribles génétiques indépendants : un crible de mutants de sénescence foliaire (mutant *ore9*) (Woo et al., 2001) et un crible de réponse à la lumière rouge (Shen et al., 2007). Les mutants *oresara9* (*ore9*) présentent une sénescence foliaire plus tardive que le type sauvage, ce qui suggère qu'ORE9/MAX2 est impliqué dans le programme de sénescence.

Un autre crible a permis d'identifier des mutants *pps* (*pleiotropic photosignaling*), hyposensibles à la lumière rouge et mutés dans le gène *MAX2*. *MAX2* serait donc un régulateur positif de la photomorphogénèse des plantules d'*Arabidopsis*, et plus particulièrement de la déétiolation des plantules (Shen et al., 2007). Plus de précisions ont été apportées récemment sur l'implication de *MAX2* dans l'allongement des hypocotyles : en effet *MAX2* serait l'intégrateur de plusieurs signaux hormonaux. *MAX2* régulerait la biosynthèse des gibbérellines et de l'acide abscissique et contrôlerait la germination des graines en réponse aux signaux lumineux et ceci indépendamment des strigolactones (Shen et al., 2012). La protéine *MAX2* pourrait donc réguler divers paramètres physiologiques de la plante, ce qui suggère qu'il existe une diversité des cibles interagissant avec cette protéine à boîte F, expliquant les phénotypes pléiotropes des mutants *max2*.

V. B. 2. MAX2 est impliquée dans la perception des karrikinés

Une autre étude montre que *MAX2* n'est pas spécifique des strigolactones, et que *MAX2* est également impliquée dans la perception des karrikinés (Nelson et al., 2011). Les karrikinés sont des molécules produites lors de feux de forêts et qui stimulent la germination des graines dormantes dans le sol. La production de fumées contenant ces composés permet ainsi de faire germer très rapidement les graines suite à un incendie et ainsi de renouveler le couvert végétal immédiatement (Flematti et al., 2004). Les karrikinés sont une petite famille de molécules dont la karrikinolide KAR1 fait partie mais de nouveaux composés ont été identifiés, qui présentent une partie commune avec la structure des

strigolactones puisqu'elles partagent en commun le cycle D (Figure 35). Ces molécules agissent à des concentrations de l'ordre de 1 nM. C'est, de nouveau, un crible indépendant des précédents visant à trouver des mutants insensibles aux karrikinés qui a permis de montrer que MAX2 intervenait dans la perception de ces molécules. Ces mutants, présentant un phénotype hyperbranché et une élévation de l'hypocotyle par rapport au type sauvage, se sont avérés alléliques de *max2* (Nelson et al., 2011).

V. C. La perception des hormones végétales faisant intervenir le protéasome

La compréhension du mode de perception des autres hormones végétales peut être utile à la compréhension du mode de perception des strigolactones et permet de proposer des mécanismes de perception hypothétiques. Ainsi les mécanismes de perception des gibbérellines, de l'auxine et du jasmonate impliquent chacun une protéine à boîte F et un complexe SCF. Le mécanisme de perception des gibbérellines a la particularité de faire intervenir une protéine de la famille des alpha/beta hydrolase, tout comme les strigolactones.

V.C.1. Le modèle gibbérellique

Les gibbérellines sont les hormones responsables de la régulation de la taille des plantes mais de nombreuses autres fonctions ont été attribuées à cette famille d'hormones : germination des graines, maturation des fruits etc....Les mécanismes de biosynthèse des gibbérellines sont très bien connus (Sun, 2008) et il en est de même pour le mécanisme de perception de cette hormone. En effet, différentes approches « mutants » successives ont permis de mettre en exergue différents acteurs de la signalisation gibbérellique : parmi les mutants nains insensibles aux GAs, les mutants récessifs permettent d'identifier les régulateurs positifs et les mutants dominant aident à identifier des régulateurs négatifs de la voie de signalisation des GAs (Hartweck, 2008).

- GID1 le récepteur des gibbérellines.

Le récepteur des gibbérellines a été identifié par l'étude du mutant de riz *gid1* insensible aux gibbérellines. Des expériences *in vitro* montrèrent que les gibbérellines étaient capables de se lier aux protéines GID1 de riz et d'*Arabidopsis* (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006). Cette protéine appartenant à la superfamille des alpha/beta hydrolases a été caractérisée comme le récepteur soluble des GAs (les caractéristiques de cette protéine seront détaillées dans le chapitre II, étant donné que D14 appartient à cette famille d'enzymes).

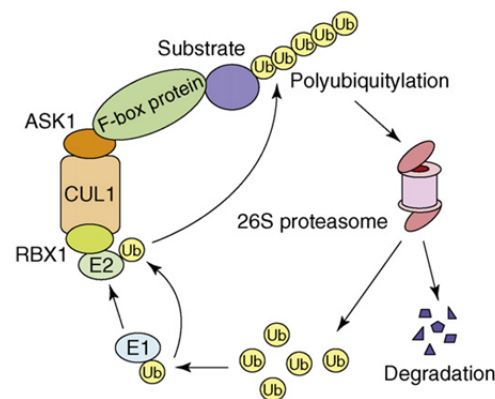


Figure 36. Modèle d'action de la voie d'ubiquitination et dégradation des protéines via le complexe SCF.

Le complexe SCF est composé des protéines CUL1, RBX1, ASK1, et F-box et permet la polyubiquitination d'une protéine substrat cible. La protéine à boîte F sert de lien entre le complexe Culin et la protéine cible, qui est poly ubiquitinée et adressée au protéasome 26S (Somers and Fujiwara, 2009).

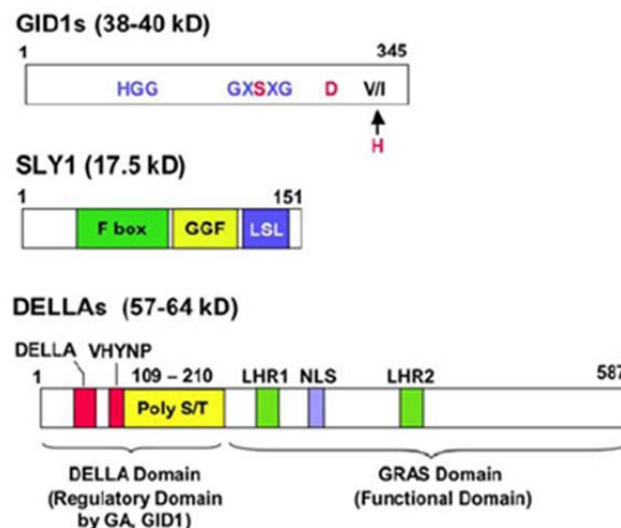


Figure 37. Structure des protéines GID1, SLY1 et DELLA.

GID1 : Les domaines conservés HSL sont présentés en bleu. GID1 contient 2 des 3 résidus (en rouge) requis pour l'activité catalytique HSL. Pour GID1 le résidu H est remplacé par un V ou I.

SLY1: la spécificité du substrat est probablement due aux motifs GGF et LSL en C term, qui sont conservés chez SLY1 et GID2

DELLAs: DELLA et VHYNP, sont 2 domaines très conservés chez les protéines DELLAs, requis pour la liaison avec le récepteur GID1 et pour la dégradation induite par les gibbérellines. Poly S/T, les multiples résidus Ser/Thr residues; LHR, Leu heptad repeat; NLS, nuclear localization signal. Le domaine C-terminal GRAS est le domaine fonctionnel de la protéine qui contient un site de liaison à la protéine SLY1 (Sun, 2008).

- SLEEPY1/GID2 : protéine à boîte F

Les mutants *sly1* et *gid2*, identifiés respectivement chez *Arabidopsis* et chez le riz sont insensibles aux gibbérellines et mutés dans les homologues d'un gène codant pour une protéine à boîte F. SLY/GID2 est un élément du complexe SCF^{SLY} qui a pour fonction de cibler les protéines devant être dégradées par le protéasome en les marquant par une chaîne de poly-ubiquitine. Cette ubiquitination se fait par l'action successive de l'enzyme E1 (Ubiquitin activating enzyme) qui lie une molécule d'ubiquitine et ainsi l'active. Cette molécule est ensuite transférée à l'enzyme E2 (Ubiquitin conjugating enzyme) et enfin la molécule d'ubiquitine est fixée de façon covalente à la protéine ciblée pour être dégradée par le complexe enzymatique E3 (Ubiquitin protein ligase). C'est l'action de cette dernière enzyme qui assure la spécificité de la cible. Le complexe SCF ou ubiquitine ligase E3 est composé de 4 sous unités : une unité CULLIN/Cdc53, une unité Skp1/ASK1, une unité RBX1/ROC/Hrt1 et la protéine à boîte F GID2, qui donne son nom au complexe : SCF^{GID} (Somers and Fujiwara, 2009)(Figure 36 et 37).

Les répresseurs DELLA

Les protéines DELLA sont les régulateurs négatifs de la réponse aux gibbérellines. Les protéines DELLA appartiennent à la famille de protéines régulatrices de type GRAS. Les premiers mutants furent identifiés chez *Arabidopsis* : il s'agit des mutants *rga* et *gai*. Ces protéines possèdent donc un domaine GRAS en C terminal et un domaine DELLA en N terminal. Chez *Arabidopsis*, 5 gènes codent pour des protéines DELLA [RGA, GAI, RGA-Like1 (RGL1), RGL2 and RGL3]. Chacune d'elles joue un rôle distinct dans la réponse aux gibbérellines et a donc une implication dans différents processus développementaux (Sun, 2008) (Figure 37).

- Les GA induisent la dégradation des protéines DELLA par protéolyse.

La liaison des gibbérellines à GID1 induit un changement de forme de la protéine qui permet la liaison à la protéine DELLA. La liaison se fait entre la partie N-terminale de GID1 et le domaine DELLA. Puis de façon encore inconnue, cet hétérodimère se lie à la protéine SLY/GID2 du complexe SCF^{SLY/GID2} ce qui entraîne la dégradation des protéines DELLA ubiquitinées, via le protéasome. Cette dégradation libère des facteurs de transcription comme les protéines PIF3 et PIF4 (Phytochrome Interacting Factor) ce qui active la transcription des gènes cibles. PIF4 et PIF3 sont des membres de la famille des protéines hélices-boucles-hélices qui ont un domaine de liaison à l'ADN (Sun, 2008)(Figure 38). La

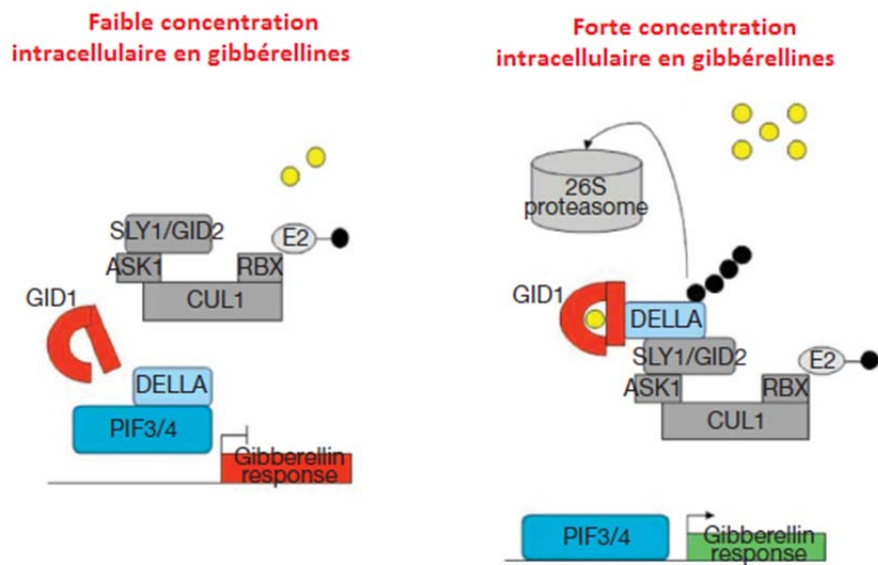


Figure 38. Schéma de la signalisation des gibbérellines

Lors d'une augmentation de la quantité de gibbérellines, l'hormone se lie au récepteur GID1 ce qui provoque la formation du complexe GID1–DELLA. Cette interaction provoque l'interaction entre le domaine C-terminal de la protéine DELLA et le complexe SCF^{SLY1/GID2} conduisant à la dégradation de la protéine DELLA. Cette dégradation libère les protéines PIFs permettant leur liaison aux promoteurs des gènes de réponses aux gibbérellines (Santner and Estelle, 2009).

dégradation des protéines DELLA régule donc l'activité de ces facteurs de transcription. Les gibbérellines régulent l'abondance de ces facteurs de transcription et donc la réponse à la lumière.

V.C.2. Les modèles auxine et acide jasmonique

L'auxine est considérée comme la principale hormone végétale du fait de son implication dans de multiples processus physiologiques. Du fait de son importance, beaucoup de travaux ont été réalisés pour comprendre le mode de perception de cette hormone. La liaison de l'auxine directement à son récepteur TIR1, protéine à boîte F du complexe SCF, favorise l'interaction de TIR1 avec les protéines AUX/IAA (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). Les protéines AUX/IAA sont alors ubiquitinées par le complexe SCF et deviennent les cibles du protéasome. Cette dégradation lève l'inhibition que ces protéines exerçaient sur les facteurs de transcription de type ARFs, induisant ainsi l'expression des gènes de réponse à l'auxine (Chapman and Estelle, 2009).

Le jasmonate est une hormone appartenant à la famille des oxylipines, impliquée dans les processus développementaux mais c'est également une molécule qui a un rôle important dans les réactions de défense des plantes. La voie de signalisation de l'acide jasmonique est très semblable à la voie auxinique. COI1 est une protéine à boîte F qui lie le jasmonate activé, c'est-à-dire l'isoleucine jasmonyl, comme TIR1 lie l'auxine. Cette liaison provoque la dégradation des protéines JAZ (JASMONATE ZIM-domain), analogues fonctionnels des répresseurs AUX/IAA, ce qui lève l'inhibition exercée sur les facteurs de transcription MYC2 qui peuvent être considérés équivalents des protéines ARFs (Staswick, 2008).

V. D. Hypothèse sur le mécanisme de perception des SL.

Deux gènes ont donc été identifiés pour leur implication dans la perception des strigolactones : *MAX2* et *D14*. Etant donné que ces gènes codent respectivement pour une protéine à boîte F et une alpha/beta hydrolase, dont on connaît des homologues « proches » qui ont une fonction de récepteur d'une hormone végétale, on peut penser que ces deux protéines *MAX2* et *D14* pourraient être les protéines qui lient les strigolactones, en s'inspirant des modèles auxiniques et gibbérelliques.

VI. Objectifs de la thèse

La découverte d'une nouvelle hormone végétale soulève de nombreuses questions et offre la possibilité d'explorer de nombreux champs d'investigation. En effet, le mode d'action des strigolactones que ce soit en tant qu'hormone végétale qui modifie l'architecture végétale ou pour son rôle dans la rhizosphère n'est pas du tout décrit. La première question qui se pose est donc de savoir comment cette hormone est perçue au niveau de la plante ? Notamment quels sont les éléments de la voie de signalisation des strigolactones telles que le récepteur ou encore les facteurs de transcription impliqués dans la réponse à cette hormone ?

Les mutants *rms* outre leurs caractéristiques hyperbranchées présentent une réduction de l'élongation de leurs entre-nœuds, phénotype qui n'a jamais été relié aux mutations affectant la biosynthèse ou la perception des strigolactones. Comment expliquer la réduction de la taille des entre-nœuds des mutants *rms* ?

Au niveau de la biosynthèse des strigolactones, beaucoup d'étapes sont encore inconnues. Il est fort probable que d'autres enzymes interviennent dans la production de cette hormone, d'où l'intérêt de réaliser des recherches sur plusieurs plantes modèles afin de mieux comprendre ces mécanismes.

C'est donc autour de trois questions principales que s'articule mon projet de thèse :

- Comment sont perçues les strigolactones ?
- Comment les strigolactones agissent sur l'élongation des entre-nœuds de pois ?
- Quels gènes sont impliqués dans la biosynthèse des strigolactones chez le pois ?

La plante est un organisme complexe qui montre une formidable adaptabilité de sa croissance en fonction de l'environnement. Or seules quelques hormones sont impliquées dans la régulation du développement des plantes, la finesse de cette régulation repose donc sur de nombreuses interactions hormonales. Au cours de mes investigations, j'ai donc essayé d'établir de nouvelles relations entre les strigolactones et les autres hormones du développement, comme les cytokinines ou les gibbérellines.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai travaillé sur le modèle pois et plus particulièrement sur les mutants *rms*.

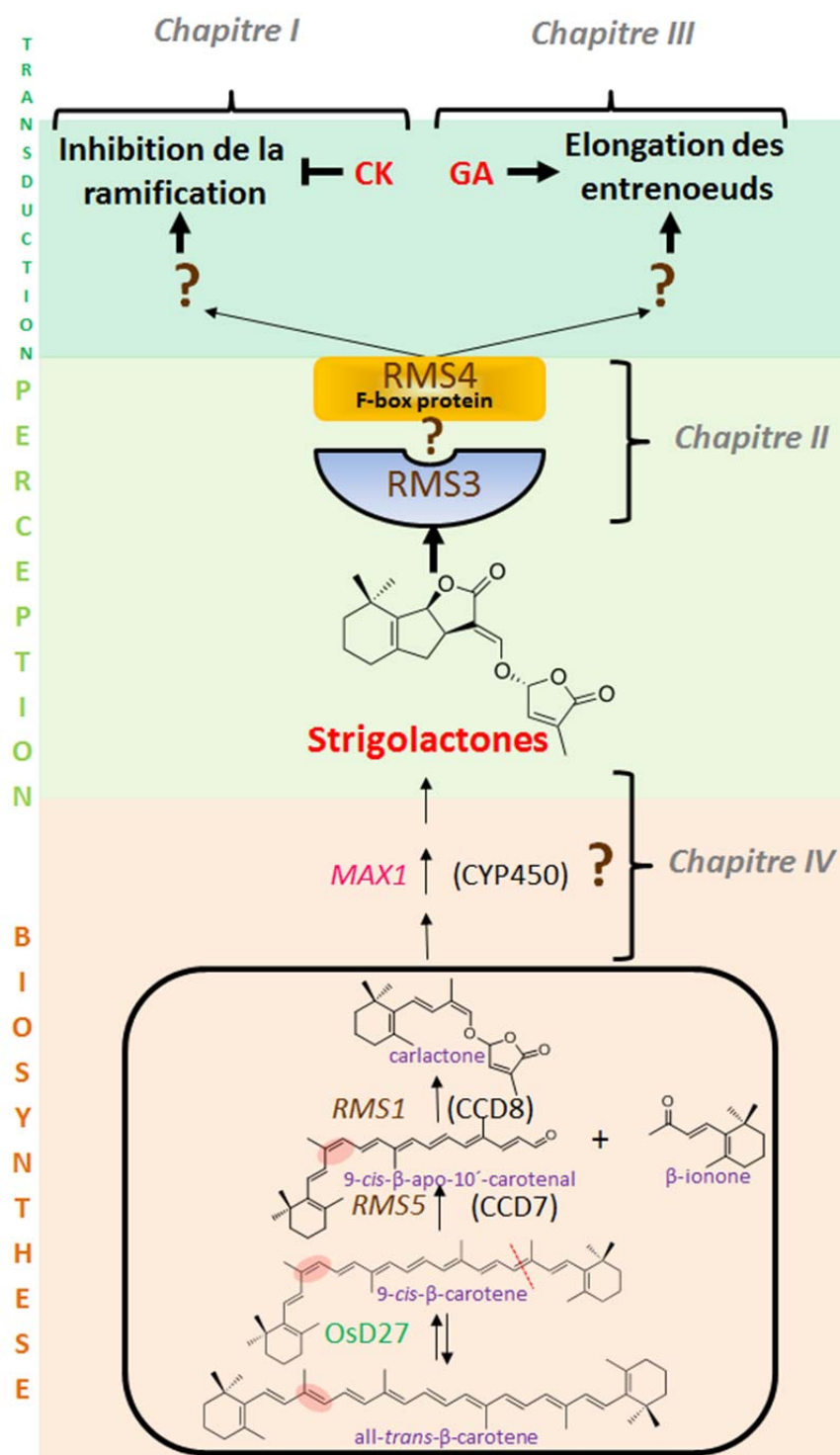


Figure 39. Résumé des champs d'investigation de la thèse

Une étude bibliographique a suggéré l'implication du facteur de transcription TB1, connu pour son rôle dans la domestication du maïs à partir de son ancêtre le téosinte, dans le mécanisme de signalisation des strigolactones (Aguilar-Martinez et al., 2007). La première partie de mon travail a donc été de caractériser la fonction de cette protéine chez le pois et de montrer son rôle dans la transduction du signal strigolactone. Ce travail a été valorisé par la publication d'un article en co-premier auteur dans *Plant Physiology* (Braun et al., 2012). Ce travail s'est poursuivi en collaboration avec le laboratoire de Christine Beveridge de l'université du Queensland en Australie dans lequel je me suis rendu pour une période de 5 mois (octobre 2010-mars 2011). Durant ce temps, j'ai poursuivi l'intégration du facteur de transcription TB1 dans le modèle établi par le laboratoire australien et notamment afin de bien comprendre l'interaction avec les cytokinines. Ce travail a pu être valorisé par une autre publication dans *Plant Physiology* (Dun et al., 2012) et une autre publication a été soumise à l'automne 2012 pour un numéro spécial « New Signalling Molecules » dans la revue *Molecular Plant*. Un des résultats de mon travail est la mise en évidence d'un excellent marqueur de réponse aux strigolactones chez le pois. J'ai proposé d'utiliser cet outil pour une étude des relations structure/activité des strigolactones sur le contrôle de la ramification par François-Didier Boyer (ICSN) en collaboration avec notre laboratoire. J'ai donc participé à ce travail qui a été publié dans *Plant Physiology* (Boyer et al., 2012). Tous ces résultats sont détaillés dans le chapitre I de ce manuscrit.

La poursuite du travail s'est orientée sur le gène *RMS3* identifié depuis de nombreuses années chez le pois (Beveridge et al., 1996) mais qui n'était pas encore cloné à mon arrivée dans le laboratoire et qui ne correspondait pas au gène *TB1*. Un autre candidat, le gène *D14* cloné chez le riz, est apparu en 2009 (Arite et al., 2009). Le mutant *d14* présentait les mêmes caractéristiques que le mutant *rms3* (phénotype hyper-ramifié, non réponse aux SLs) et le gène *D14* constituait donc un excellent candidat pour être l'homologue de *RMS3*, ce que j'ai démontré. Nous avons poursuivi la caractérisation physiologique des mutants *rms3*, la caractérisation moléculaire du gène et la caractérisation biochimique de la protéine pour tester l'hypothèse du rôle de *RMS3* dans la perception des strigolactones. Ces résultats font l'objet de l'écriture d'un article qui devait être soumis d'ici la fin de l'année dans le journal *Plant Cell* mais dont l'écriture est remise en question avec la publication en sept 2012 Cette partie fait l'objet du chapitre II.

Le chapitre III s'intéresse à comprendre pourquoi les mutants *rms* présentent un nanisme en plus d'une hyperramification. Plusieurs hypothèses ont été testées pour tenter de comprendre ce phénotype et de tester une éventuelle interaction entre SL et GA. Après avoir vérifié que les strigolactones agissaient bien sur l'élongation des entre-nœuds, nous avons testé si cet effet était médié par les gibbérellines soit via la biosynthèse soit via les protéines DELLA. Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec une stagiaire de M2 et font l'objet d'un manuscrit qui sera soumis en fin d'année 2012.

Le chapitre IV se focalise sur les gènes de la biosynthèse des strigolactones chez le pois. Très peu d'éléments sont connus sur les étapes de biosynthèse situées entre les produits des CCD et les strigolactones. Mais quelques enzymes supposées être impliquées dans ces réactions ont été découvertes chez d'autres espèces sans pour autant dévoiler les réactions qu'elles catalysent parce que le modèle végétal ne s'y prêtait pas. Ainsi, l'objectif était d'obtenir les homologues chez le pois, des gènes découverts chez *Arabidopsis* ou le riz mais aussi d'obtenir les mutants de pois pour ces gènes par TILLING, afin de réaliser des quantifications hormonales facilitées par le modèle pois. Je me suis donc intéressé au gène *MAX1* identifié chez *Arabidopsis* et au gène *LBO1* identifié par une approche microarray par l'équipe de Christine Beveridge, toujours chez *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* produit relativement peu de SLs au niveau des racines et des exsudats racinaires, lié vraisemblablement au fait que la plante ne développe pas de symbiose avec les champignons Gloméromycètes. Par conséquent il est très difficile d'analyser les SLs chez les mutants d'*Arabidopsis* et les résultats n'ont toujours pas abouti à la caractérisation de nouvelles étapes de la biosynthèse. L'obtention de mutant de pois par notre laboratoire pourrait permettre d'élucider les étapes de la biosynthèse des strigolactones.

Enfin, la dernière partie est une discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus lors de ces travaux de thèse et qui permettent d'envisager un rôle des strigolactones dans l'harmonisation de l'architecture des végétaux. J'ai fait le choix de ne pas faire de chapitre « matériel et méthodes » puisque les plantes et les protocoles utilisés sont décrits dans les manuscrits de chaque article. Les méthodes supplémentaires sont données en début des parties correspondantes.

Chapitre I : PsBRC1, un facteur de transcription contrôlant la ramification et dont l'expression est régulée par les strigolactones

I. Introduction

La première partie de mon travail de thèse (commencée durant mon stage de Master2 au laboratoire) était de mieux comprendre le mécanisme de perception des strigolactones au niveau du bourgeon axillaire. L'objectif était de trouver des gènes spécifiques du bourgeon impliqués dans cette perception et notamment des facteurs de transcription. Le travail s'est donc focalisé sur le gène *TEOSINTE BRANCHED 1 (TB1)*. Ce gène contrôlant l'inhibition du développement des bourgeons a été tout d'abord identifié chez le maïs (Doebley et al., 1997). Le locus *TB1* aurait contribué à la domestication du maïs à partir de son ancêtre, le téosinte et expliquerait la différence de ramification entre les deux plantes. Le téosinte présente un nombre de branches très élevé avec des épis de petite taille tandis que le maïs, lui se compose d'une unique tige axiale portant de très gros épis. Cette différence de morphologie serait due à une forte expression dans le bourgeon du gène *TB1* chez le maïs par rapport au téosinte (Hubbard et al., 2002). Une étude récente a d'ailleurs montré qu'un rétro-élément (type transposon) s'était inséré dans la séquence régulatrice du gène du maïs *TB1*, et qu'il a été la cible de la sélection humaine au cours de la domestication du maïs. Cet allèle contenant l'insertion était déjà présent dans les populations de téosinte avant la sélection maïs à basse fréquence, soulignant l'importance de la variation génétique dans l'évolution de la diversité morphologique (Studer et al., 2011).

En se basant sur le fait que le gène *TB1* de maïs et *AtBRC1* d'*Arabidopsis* induisent l'arrêt de la croissance des bourgeons axillaires de façon réversible (Aguilar-Martinez et al., 2007), tout comme les strigolactones (Brewer et al., 2009), nous avons supposé que l'expression de ce gène pouvait être sous le contrôle des strigolactones et donc être responsable de la transduction du signal SL dans le contrôle de la ramification. Pour cela nous avons réalisé diverses investigations qui sont décrites dans les articles suivants : le premier article décrit l'obtention du gène et sa régulation transcriptionnelle, et la caractérisation du mutant chez le pois (Braun et al., 2012). Dans les 3 autres articles, cet excellent marqueur de réponse aux strigolactones est utilisé pour mieux comprendre l'interaction avec les cytokinines (Dun et al., 2012) et la dynamique du bourgeon axillaire (Dun et al., soumis), mais aussi dans les études structure fonction des strigolactones (Boyer et al., 2012).

II. Article : The Pea TCP Transcription Factor *PsBRC1* Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching : Plant Physiology 2012 Jan;158(1):225-38.

Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadi I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, Luo D, Bendahmane A, Turnbull C, Rameau C.

Résumé :

Dans cet article la fonction du gène *PsBRC1*, l'homologue chez le pois (*Pisum sativum*) du gène *TEOSINTE BRANCHED1* du maïs (*Zea mays*) et du gène *BRANCHED1*(*AtBRC1*) d'*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) a été étudiée. Le mutant de pois *Psbrc1* montre un phénotype hyperramifié, est capable de synthétiser des strigolactones (SL), mais ne répond pas à l'application de SL. A la différence du mutant *rms1* (déficient en SL), le mutant *Psbrc1* ne présente pas un phénotype nain et la ramification au niveau des nœuds supérieurs est moins importante. Le gène *PsBRC1* est principalement exprimé dans le bourgeon axillaire. L'accumulation des transcrits est augmentée par l'application directe de la SL synthétique, le GR24, et est réprimée par les cytokinines (CK). Les résultats suggèrent que *PsBRC1* pourrait avoir un rôle dans l'intégration des signaux SL et CK et que les SL agiraient directement dans le bourgeon afin de réguler sa levée de dormance. Cependant, le mutant *Psbrc1* répond à l'application de cytokinines et à la décapitation en augmentant la taille des bourgeons axillaires/ramification, ce qui prouve que les cytokinines agissent également indépendamment de *PsBRC1* sur la poursuite de la croissance du bourgeon. Contrairement à d'autres mutants SL, la mutation *Psbrc1* n'entraîne pas une diminution de la teneur en cytokinines dans la sève xylémienne ni une forte augmentation des niveaux de transcrits *RMS1*, ce qui suggère que le rétrocontrôle dépendant de *RMS2* n'est pas activé dans ce mutant. De manière surprenante, le double mutant *rms1 Psbrc1* montre une forte augmentation du nombre de ramifications au niveau des nœuds cotylédonaire, alors que la ramification au niveau des nœuds supérieurs n'est pas significativement plus élevée que la ramification dans le mutant *rms1*. Ce phénotype indique une régulation spécifique de la ramification localisée à ces nœuds chez le pois.

The Pea TCP Transcription Factor PsBRC1 Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching^{1[W]}

Nils Braun^{2,3}, Alexandre de Saint Germain², Jean-Paul Pillot, Stéphanie Boutet-Mercey, Marion Dalmais, Ioanna Antoniadis, Xin Li, Alessandra Maia-Grondard, Christine Le Signor, Nathalie Bouteiller⁴, Da Luo, Abdelhafid Bendahmane, Colin Turnbull, and Catherine Rameau*

Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA UMR1318 INRA-AgroParisTech, F-78000 Versailles, France (N. Braun, A.d.S.G., J.-P.P., S.B.-M., A.M.-G., C.R.); School of Life Sciences, Sun Yat Sen University, Guangzhou 510275, China (X.L., D.L.); Unité de Recherche en Génomique Végétale, INRA/CNRS, 91057 Evry cedex, France (M.D., N. Bouteiller, A.B.); INRA Dijon, 21065 Dijon cedex, France (C.L.S.); and Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom (I.A., C.T.)

The function of *PsBRC1*, the pea (*Pisum sativum*) homolog of the maize (*Zea mays*) *TEOSINTE BRANCHED1* and the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) *BRANCHED1* (*AtBRC1*) genes, was investigated. The pea *Psbrcl* mutant displays an increased shoot-branching phenotype, is able to synthesize strigolactone (SL), and does not respond to SL application. The level of pleiotropy of the SL-deficient *ramosus1* (*rms1*) mutant is higher than in the *Psbrcl* mutant, *rms1* exhibiting a relatively dwarf phenotype and more extensive branching at upper nodes. The *PsBRC1* gene is mostly expressed in the axillary bud and is transcriptionally up-regulated by direct application of the synthetic SL GR24 and down-regulated by the cytokinin (CK) 6-benzylaminopurine. The results suggest that *PsBRC1* may have a role in integrating SL and CK signals and that SLs act directly within the bud to regulate its outgrowth. However, the *Psbrcl* mutant responds to 6-benzylaminopurine application and decapitation by increasing axillary bud length, implicating a *PsBRC1*-independent component of the CK response in sustained bud growth. In contrast to other SL-related mutants, the *Psbrcl* mutation does not cause a decrease in the CK zeatin riboside in the xylem sap or a strong increase in *RMS1* transcript levels, suggesting that the *RMS2*-dependent feedback is not activated in this mutant. Surprisingly, the double *rms1 Psbrcl* mutant displays a strong increase in numbers of branches at cotyledonary nodes, whereas branching at upper nodes is not significantly higher than the branching in *rms1*. This phenotype indicates a localized regulation of branching at these nodes specific to pea.

Early studies on shoot branching were based on decapitation experiments that emphasized the role of the shoot apex in the inhibition of axillary bud outgrowth (Thimann and Skoog, 1933). In the classical theory of apical dominance, auxin from the apex was proposed to act indirectly to suppress bud outgrowth, while cytokinin (CK) coming from the roots promoted

bud outgrowth (Snow, 1937; Sachs and Thimann, 1967; Cline, 1991). More than a decade ago, with the identification and characterization of high-branching mutants in pea (*Pisum sativum*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), rice (*Oryza sativa*), and *Petunia hybrida*, long-distance signaling was shown to be an important process in the control of shoot branching (Ongaro and Leyser, 2008; Beveridge et al., 2009; McSteen, 2009; Beveridge and Kyoizuka, 2010). In pea, grafting revealed the existence of two novel long-distance signals controlling shoot branching that were different from auxin and CK (Beveridge et al., 2000, 2009; Beveridge, 2006): a root-to-shoot branching inhibitor (Beveridge et al., 1997b; Morris et al., 2001), which was subsequently identified as a strigolactone (SL) or derived compound (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008), and a shoot-to-root feedback signal, which was shown to be auxin independent and has still to be identified (Beveridge et al., 1997a, 2000). To date, the genetic and physiological model of branching control in pea includes five *RAMOSUS* genes (*RMS1*–*RMS5*). Branching of the pea SL-deficient *rms1* and *rms5* mutants is suppressed when scions of these mutants are grafted on wild-type rootstock or when the syn-

¹ This work was supported by the European Union FP6 Grain Legumes Integrated Project (to N. Braun, M.D., N. Bouteiller, A.B., C.L.S., and C.R.), the ERA-PG 027 COGS project (to N. Braun and C.R.), and the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (to A.d.S.G.).

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: Université Pierre et Marie Curie, UR5 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France.

⁴ Present address: Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA UMR1318 INRA-AgroParisTech, F-78000 Versailles, France.

* Corresponding author; e-mail catherine.rameau@versailles.inra.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Catherine Rameau (catherine.rameau@versailles.inra.fr).

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.182725

thetic SL GR24 is applied on axillary buds. In contrast, the *rms3* and *rms4* SL-response mutants are not rescued when grafted to wild-type rootstocks, and they do not respond to GR24 application (Table I; Beveridge et al., 1996, 2009; Dun et al., 2009). All *rms* mutants, except *rms2*, have high levels of *RMS1* transcripts in epicotyls compared with the wild type (Foo et al., 2005). Moreover, these branching mutants, with the exception of *rms2*, have greatly reduced amounts of CK in xylem sap (X-CK) compared with wild-type plants (Table I; Beveridge et al., 1997a; Morris et al., 2001; Foo et al., 2007). The reduced X-CK in several *rms* branching mutants appears to be mediated by a shoot-to-root mobile signal (Beveridge et al., 1997a; Beveridge, 2000). Because *rms2* is the only *rms* mutant that does not show down-regulation of X-CK, it has been proposed that *RMS2* may play a role in the generation of this feedback signal. It was hypothesized that the same signal may also regulate *RMS1* transcript levels (Foo et al., 2005), because X-CK and *RMS1* transcript levels are typically anticorrelated (Dun et al., 2009). The *rms2* mutant does respond to SL (Dun et al., 2009). This mutant, having low transcript levels of *RMS1* and slightly elevated X-CK in comparison with the wild type, may branch because of low SL levels and/or high CK content.

Among these five *RMS* genes, three have been cloned and correspond to branching genes identified in other species. The *RMS1* and *RMS5* genes encode the CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE (CCD) enzymes CCD8 and CCD7, respectively (Sorefan et al., 2003; Johnson et al., 2006). The *RMS4* gene encodes an F-box protein and corresponds to the Arabidopsis *MAX2* gene (Stirnberg et al., 2002; Johnson et al., 2006). While *RMS4* transcripts are found in all tissues, the SL biosynthesis *RMS1* and *RMS5* genes are highly expressed in roots and in the basal stem (Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006) and were shown to be finely regulated along the stem (Dun et al., 2009).

In the current model of shoot branching in pea, auxin, originating from the main shoot apex, regulates SL levels by maintaining *RMS1* and *RMS5* transcript levels (Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006) and down-regulates CK in both xylem sap (Bangerth, 1994; Li et al., 1995) and the stem (Tanaka et al., 2006). Auxin regulation of SL synthesis genes, and bud outgrowth inhibition by SL application in decapitated plants, suggest that SL is the second messenger by which

auxin controls branching in decapitation experiments (Brewer et al., 2009). SL and CK would act locally within the axillary bud to control its outgrowth. Another hypothesis has been proposed where SLs would act upstream of auxin by modulating its transport in the main shoot by limiting the accumulation of PIN auxin efflux carrier protein on the plasma membrane of cells involved in the polar auxin transport stream (PATS; Domagalska and Leyser, 2011). Consistent with this, the Arabidopsis branching *max* mutants show increased polar PIN accumulation and increased auxin transport (Bennett et al., 2006; Prusinkiewicz et al., 2009; Crawford et al., 2010). The rice SL-deficient *d27* mutant also shows increased auxin transport (Lin et al., 2009), but this difference is not always observed in pea (Beveridge, 2000, 2006; Beveridge et al., 2000; Dun et al., 2006). In the auxin transport model, the auxin exported from active apices, moving in the PATS, would prevent auxin export from dormant buds and, therefore, would block their outgrowth, this process being amplified by the canalization positive feedback. Buds would compete to export auxin into the main stem, and SL, by dampening auxin transport in the PATS, would enhance this competition (Crawford et al., 2010; Domagalska and Leyser, 2011).

How SL and CK interact to control axillary bud outgrowth is still not understood, and the role of auxin is still a matter of debate. However, the discovery of SL as a plant hormone allows novel approaches. In particular, the discovery of genes responding to SL application and deciphering SL signaling pathways are essential for a better understanding of the control of branching. Axillary buds have to integrate many factors that influence switching between dormant and growing states during plant ontogeny, and they can respond differently according to their position along the main stem (Cline, 1991). It is very likely that several pathways control axillary bud outgrowth and that important molecular processes within the bud are involved in this control, in particular to integrate the multiple long-distance signals. In this paper, *PsBRC1*, the pea homolog of *TEOSINTE BRANCHED1* (*TB1*) from maize (*Zea mays*; Doebley et al., 1997) and of *BRANCHED1* (*AtBRC1*) from Arabidopsis (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007), was integrated into the pea model. This gene is almost exclusively expressed in the axillary bud and may provide the link between systemic signaling and events occurring within the axillary bud to control bud outgrowth.

Table I. Summary of the physiological characteristics of the different pea branching mutants

RMS1 expression indicates *RMS1* mRNA accumulation in epicotyl, and Response to GR24 indicates the inhibition effect of GR24 on bud outgrowth.

Characteristic	<i>rms1</i>	<i>rms5</i>	<i>rms3</i>	<i>rms4</i>	<i>rms2</i>	<i>Psbrc1</i>
<i>RMS1</i> expression	High	High	High	High	Low	Low
Response to GR24	Yes	Yes	No	No	Yes	No
X-CK	Low	Low	Low	Low	High	Wild type/high
Plant height	Dwarf	Dwarf	Dwarf	Dwarf	Dwarf	Near wild type

The *TB1* gene from maize, which affects plant and inflorescence architecture, is a well-known target for artificial selection during maize domestication from its wild and highly branched ancestor teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). It is a striking example of how human selection modified gene expression to change plant architecture. In maize, the repression of branching results from higher *TB1* transcript levels in axillary buds in comparison with those in teosinte (Doebley et al., 1997; Wang et al., 1999). Recently, it has been demonstrated that the corresponding gene in barley (*Hordeum vulgare*; *INTERMEDIUM-C*) has also been targeted in human selection to regulate not only tillering but also fertility of the lateral spikelet (Ramsay et al., 2011). In monocots, only one homolog of the TB1/CYCLOIDEA (CYC) clade has been identified that regulates axillary bud outgrowth, whereas in Arabidopsis, two homologs (*AtBRC1* and *AtBRC2*) were shown to control shoot branching. These genes belong to the TCP family of transcription factors specific to plants and named for the first three identified members, TB1, CYC in *Antirrhinum majus*, and PCF-coding genes in rice. Phylogenetic analysis of this family comprising 24 members in Arabidopsis (Martín-Trillo and Cubas, 2010) has identified two distinct classes, classes I and II, with roles in plant development and morphogenesis processes as diverse as the establishment of floral symmetry, plant architecture (Doebley et al., 1997; Aguilar-Martínez et al., 2007), leaf morphogenesis (Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003; Ori et al., 2007) and senescence (Schommer et al., 2008), embryo growth (Tatematsu et al., 2008), and circadian rhythm (Pruneda-Paz et al., 2009; Giraud et al., 2010). Globally, class I TCP proteins appear to promote cell division, whereas class II proteins, containing TB1/*AtBRC1*, repress organ growth by inhibiting cell proliferation (Martín-Trillo and Cubas, 2010). For example, class I TCP proteins, PCF1 and PCF2, were shown to promote *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (*PCNA*) gene expression, activating the G1-to-S transition by binding to cis-acting elements in the promoter of *PCNA* (Kosugi and Ohashi, 1997). Class II TCP proteins, CINCINNATA in *Antirrhinum* and TCP4 in Arabidopsis, control leaf morphology by repressing cell proliferation specifically in the leaf margins (Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003; Crawford et al., 2004). In yeast, TCP4 has been shown to function in a dose-dependent manner and to block the cell cycle at the G1-to-S transition (Aggarwal et al., 2011).

In rice, the high-tillering *fine culm1* (*fc1*) mutant is mutated in the rice homolog of *TB1* (Takeda et al., 2003; Arite et al., 2007). Both the absence of response of the *fc1* mutant to GR24 application and the similarity of the phenotype of the *fc1 d17* double mutant to the SL-deficient *d17* mutant phenotype suggested that *FC1/OsTB1* acts downstream of the SL pathway in rice (Minakuchi et al., 2010). Here, we show that the regulation of pea *PsBRC1* exhibits several similarities to and differences from those described in rice and Arabidopsis. *PsBRC1* is strongly transcriptionally up-

regulated by SL, which is not the case for the rice *FC1* (Minakuchi et al., 2010). In contrast to Arabidopsis (Aguilar-Martínez et al., 2007), branching is increased in the pea *Psbrcl* mutant in response to decapitation and to CK application. We propose that *PsBRC1*, acting in axillary buds, may integrate at the transcriptional level the SL and CK pathways to regulate axillary bud outgrowth. However, the response to decapitation and to direct CK application of the *Psbrcl* mutant also suggests a *PsBRC1*-independent component of the CK response in pea.

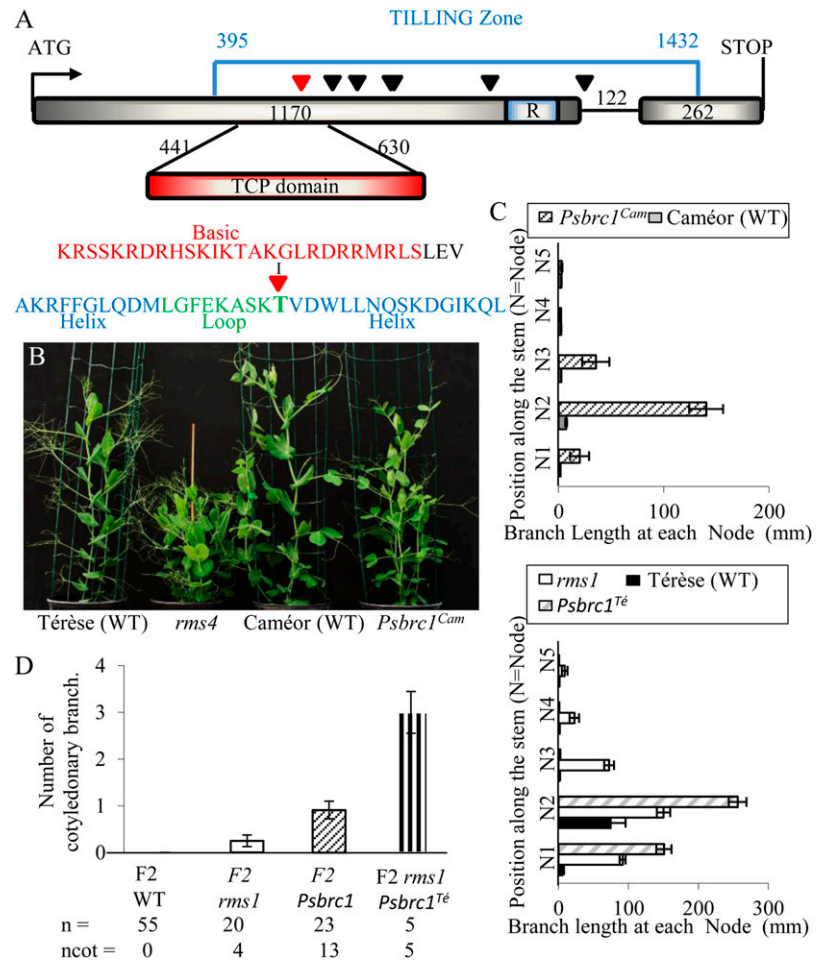
RESULTS

The Pea *Psbrcl* Mutant Phenotype Shows That *PsBRC1* Inhibits Bud Outgrowth

To isolate a pea homolog of *TB1/AtBRC1*, the sequence of the *Lotus japonicus* *CYC5* gene, *LjCYC5* (GenBank accession no. DQ202478; Feng et al., 2006) was used, as it was the closest homolog to Arabidopsis *TCP18/AtBRC1*. A 400-bp pea homolog sequence was first amplified with degenerate primers. The complete sequence was obtained using PCR walking and RACE PCR (GenBank accession no. JF274232, BankIt1431647; see "Materials and Methods").

Phylogenetic analysis based on the protein sequences of the TCP domain of several members of both the *CYC-TB1* group and the PCF group placed the pea sequence in the same clade as *TB1* and *AtBRC1*; consequently, the gene was named *PsBRC1* (Supplemental Fig. S1). The single intron in *PsBRC1* deduced from alignment of the genomic and cDNA sequences was located at the site of the last intron in *AtBRC1* (data not shown). *PsBRC1* was then mapped using the recombinant inbred line population (Térèse × Torsdag; Laucou et al., 1998) to the pea linkage group IV close to *Fa* in a region where no *RMS* genes were ever mapped (Rameau et al., 1998). Consequently, a targeting-induced local lesions in genomes (TILLING) approach was initiated using the mutagenized population from the genotype Caméor (Triques et al., 2007; Dalmais et al., 2008). The genomic sequence comprising the two conserved TCP and R domains was screened for mutations (Fig. 1A). Ten mutations in *PsBRC1* were identified, three giving a silent mutation, one in the intron, and six leading to a change of amino acid (Supplemental Table S1). Among these six mutations, only one gave a clear branching phenotype cosegregating with the mutation (family 4654). In all segregating populations, this mutation always cosegregated with a strong branching phenotype as in the BC2-F2 population (4654 × Caméor), where the 14 *Psbrcl* mutant plants displayed a thin stem with a strong branching phenotype at nodes 1 and 2, in contrast to the nine wild-type plants, which had a small branch only at node 2 (Supplemental Fig. S2A). This mutation was located in the TCP domain and resulted from a Thr-to-Ile amino acid change in the loop/helix II transition (T195I).

Figure 1. Structure of the *PsBRC1* gene and phenotype of the corresponding mutant. A, Gene structure of *PsBRC1* and locations of mutations. Bases are numbered from the start codon. The TCP domain (from bp 441 to 630) is shown in red, and the corresponding protein sequence is indicated below. Point mutations are indicated by triangles (black and red for the one studied here), boxes correspond to exons, and the blue area corresponds to the TILLed sequence. B, Comparison of a wild-type (WT) Tèrese plant (left) with *rms4* (middle left), wild-type Caméor (middle right), and *Psbrc1^{Cam}* (right). C, Branch length at each node of wild-type Caméor, *Psbrc1^{Cam}*, wild-type Tèrese, *rms1*, and *Psbrc1^{Te}*. Data are means $\pm$ SE ($n = 12$). D, Means of the number of cotyledonary branches per individual observed in a segregating F2 population of 103 plants between M3T-884 (*rms1*) and a *Psbrc1^{Cam}* F2 plant (*Psbrc1^{Cam}* $\times$ Tèrese). n = the number of plants observed per genotypic class; $ncot$ = the number of plants with at least one cotyledonary branch. Data are means $\pm$ SE ($n = 12$).



These data strongly support the hypothesis that the T195I mutation in the *PsBRC1* gene was the cause of the high-branching phenotype.

The mutant plant from family 4654 was backcrossed three times with the Caméor parent line (BC3 [4654 $\times$ Caméor]; denoted *Psbrc1^{Cam}*) and twice with the wild-type Tèrese line in which all other branching mutations are available (mutant line denoted *Psbrc1^{Te}*; see “Materials and Methods”). The phenotype of *Psbrc1^{Cam}* was first compared with its wild-type progenitor Caméor. Strong basal branching at nodes 1 and 2 was observed in the *Psbrc1^{Cam}* mutant, with often two branches at node 2, whereas the wild-type Caméor sometimes showed only a single branch at node 2. Branching at upper nodes (above node 3) was very low in *Psbrc1^{Cam}* (Fig. 1, B and C, top diagram). The low branching at upper nodes observed in *Psbrc1^{Cam}* was particularly evident in the *Psbrc1^{Te}* mutant and was one major difference from the *rms1* mutant, which showed, in comparison, long branches at each node (Fig. 1C, bottom diagram; Supplemental Fig. S2D). Another difference between the mutants was that plant height was only slightly reduced for *Psbrc1^{Cam}* and *Psbrc1^{Te}* in comparison with their respective wild types, whereas *rms1* showed a strong reduction in

internode length (Fig. 1B; Supplemental Fig. S2B). The width of the main stem was reduced in both *rms1* and *Psbrc1^{Cam}* mutants (Supplemental Fig. S2C).

rms1 Psbrc1 double mutant plants were obtained from a cross between the *rms1* mutant derived from the wild-type Tèrese (line M3T-884) and a *Psbrc1* F2 plant derived from the cross Tèrese $\times$ *Psbrc1^{Cam}*, also containing the *afila* mutation (absence of leaflets as in the wild-type Tèrese). In the F2 generation, 103 plants were genotyped for both genes and phenotyped. A striking feature of double mutant plants was the high number of cotyledonary branches per plant. In this particular genetic background, approximately half of the *Psbrc1* plant displayed cotyledonary branches, which is rarely seen for *Psbrc1^{Cam}* in the Caméor genetic background, whereas only four out of 20 *rms1* plants (that were all heterozygous for *PsBRC1*) branched at this cotyledonary node (Fig. 1D). A more precise phenotyping was performed on five or six F3 families fixed for *rms1*, *Psbrc1*, or both mutations in a comparable genetic background (see “Materials and Methods”). As observed previously, at upper nodes, *rms1* plants were significantly more branched than *Psbrc1^{Te}* plants, whereas the double mutant genotype was not significantly more branched than *rms1* at these

nodes (Supplemental Fig. S2D; $P < 0.05$ by LSD test). At node 2, total branch length was similar in the three genotypes, whereas at nodes below, and particularly at the cotyledonary node, branching of *rms1 Psbrc1* double mutant plants was significantly higher than in either single mutant (Supplemental Fig. S2D). Consequently, it appeared that at basal nodes, a transgressive phenotype was observed in the double mutant, whereas at upper nodes, branching of the double mutant was not significantly different from that observed for *rms1*.

PsBRC1 Is a Target in the SL Signaling Pathway

To test whether *PsBRC1* was expressed mainly in axillary buds, as shown in maize, *Arabidopsis*, rice, and tomato (*Solanum lycopersicum*; Hubbard et al., 2002; Takeda et al., 2003; Aguilar-Martínez et al., 2007; Martin-Trillo et al., 2011), wild-type plants were dissected into different organs/parts and *PsBRC1* transcript levels were quantified by real-time PCR. Transcripts were only detected in axillary buds, floral buds, nodal tissue, and the shoot apex. Maximum transcript levels were found in axillary buds. Floral buds, shoot apex, and nodal tissue contained very low levels of transcripts, 100 to 1,000 times less than in axillary buds (Supplemental Table S2).

The response of the *Psbrc1^{Cam}* mutant to SL was analyzed by application of the synthetic SL GR24 (500 nM) to the axillary bud at node 3 of both *Psbrc1^{Cam}* and *rms1* mutants and their respective wild types. Bud length was measured 10 d later (Fig. 2A). No inhibitory effect of GR24 was observed for the wild-type Térése and Caméor, in which axillary buds are very small at this node. In contrast to the strong inhibition of axillary bud outgrowth in the SL-deficient *rms1* mutant, no significant effect of GR24 was observed for the *Psbrc1^{Cam}* mutant (Student's *t* test, $P = 0.89$). Grafting experiments confirmed the SL insensitivity of *Psbrc1^{Cam}*, as branching was not inhibited when the *Psbrc1^{Cam}* mutant scion was grafted on wild-type rootstock, in contrast to the SL-deficient *rms1* scion grafted on wild-type rootstock (Supplemental Fig. S3). *Psbrc1^{Cam}* rootstocks were able to inhibit branching in the *rms1* scion, indicating that *Psbrc1^{Cam}* very likely produces SL and/or the active derived compound (Supplemental Fig. S3). To confirm that *Psbrc1^{Cam}* was able to synthesize SL, we quantified SL in root exudates of *Psbrc1^{Cam}*, *Psbrc1^{Te}*, and their corresponding wild types (Fig. 2B). The principal SL detected in root exudates of all genotypes was fabacyl acetate. Amounts of this compound were 3- to 6-fold higher ($P < 0.05$, Student's *t* test) from both *Psbrc1* genotypes than in their corresponding wild-type background lines (Fig. 2B). Other compounds, particularly epiorobanchyl acetate, were detected in most samples, but levels were too low for accurate quantitation.

The *PsBRC1* transcript level was quantified in axillary buds of the different SL-related mutants using

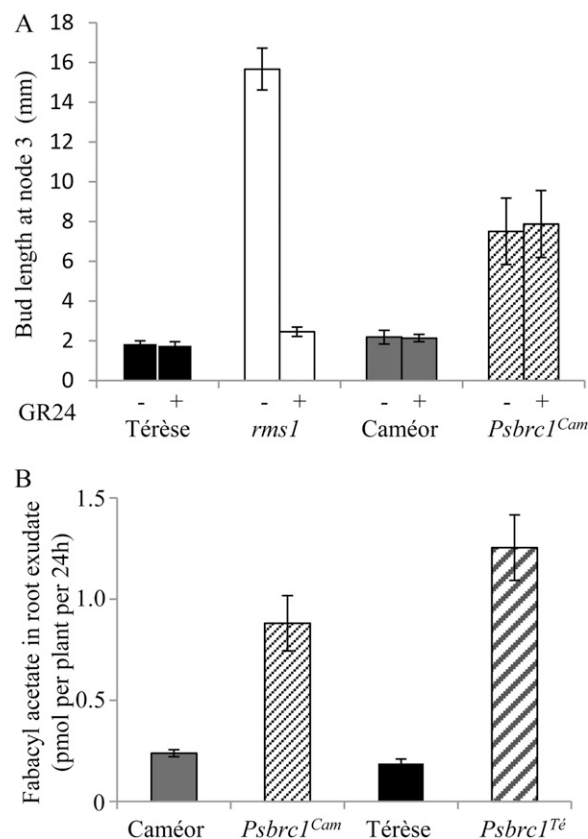


Figure 2. A, Effects of GR24 application on bud growth. Bud length at node 3 of wild-type Térése (black bars), *rms1* (white bars), wild-type Caméor (gray bars), and *Psbrc1^{Cam}* (hatched bars) was measured 10 d after treatment was applied to buds of stage 5 intact plants with solution containing 0 or 500 nM GR24. Data are means $\pm$ SE ($n = 12$). B, SL levels in root exudates of wild-type and *Psbrc1* plants. Exudates were collected into water for 24 h from 20-d-old hydroponically grown plants, and SLs were quantified by LC-MS using MRM transitions at mass-to-charge ratio 405 to 231 for fabacyl acetate and 406 to 232 for the *d*₁-fabacyl acetate internal standard. Data are means $\pm$ SE, based on analyses of two independent pools of 12 plants for each genotype.

real-time PCR (Fig. 3A). Dissected axillary buds were sampled from node 4 of the *rms1*, *rms2*, and *rms4* mutants and the wild-type line (Térése) at a stage when buds had a comparable size (before they start to grow in mutants). *PsBRC1* levels were 10 times lower in *rms1* and *rms4* than in the wild type (Fig. 3A; Supplemental Fig. S4, A and B). These results indicated that *PsBRC1* may act downstream of the SL signaling pathway and downstream of *RMS4*. In contrast, the *PsBRC1* transcript level was similar to the wild-type level in axillary buds of the *rms2* mutant (Fig. 3A). The *rms2* mutant displays strong basal branching in comparison with *rms1* (Dun et al., 2009), and at node 4, from where the buds were sampled, the axillary buds of *rms2* plants were only 2.3 mm long, whereas they reached 14 mm in *rms1* (data not shown). The *rms2* phenotype of inhibited

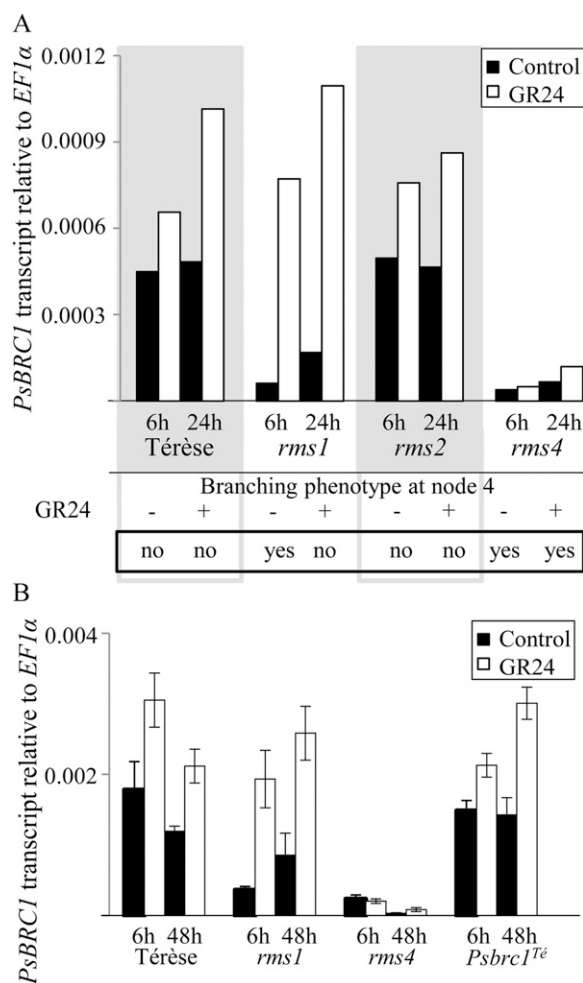


Figure 3. Effects of GR24 on *PsBRC1* transcript levels. *PsBRC1* transcript levels were determined relative to *EF1 α* in axillary buds at node 4 after GR24 application (white bars) or mock treatment (black bars). RNA was extracted from dissected buds from pools of 30 plants at the six-node stage and quantified by real-time PCR. The data are representative of two to three independent experiments. A, Six and 24 h after GR24 application in wild-type Tèrese, *rms1*, *rms2*, and *rms4* plants. The branching phenotype at node 4 after GR24 application is given below for each genotype. B, Six and 48 h after GR24 application in wild-type Tèrese, *rms1*, *rms4*, and *Psbrcl1^{Te}* plants. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$).

buds at node 4 is explained by a (basal) branch-derived feedback signal, possibly auxin, which increases *RMS1* expression and presumably SL synthesis in *rms2* plants (Dun et al., 2009). This SL moves up the stem and, because the *rms2* mutant is able to synthesize and to respond to SL, it could explain why in this branching mutant *PsBRC1* transcript levels were not low at this upper node.

To further characterize the relationship between SL and *PsBRC1* expression, *PsBRC1* transcript levels were followed from 6 h up to 24 h after SL application (Fig. 3A). Transcript levels increased in axillary buds of wild-type, *rms1*, and *rms2* plants after GR24 applica-

tion (500 nM) but not in *rms4* (Fig. 3A; Supplemental Fig. S4A). In wild-type and *rms2* axillary buds, a 2-fold increase was observed 24 h after GR24 application. In *rms1* mutant buds, *PsBRC1* mRNA levels increased 10-fold at 6 and 24 h after GR24 treatment (Fig. 3A; Supplemental Fig. S4A). In *rms4*, there was no effect of GR24 treatment, with *PsBRC1* transcript levels remaining very low throughout (Fig. 3A; Supplemental Fig. S4A). To test if the induction of *PsBRC1* by GR24 is affected in *Psbrcl1*, the *Psbrcl1^{Te}* mutant was included in one experiment with the wild-type Tèrese, *rms1*, and *rms4*. *PsBRC1* transcript levels were followed from 6 to 48 h after GR24 application (Fig. 3B). *PsBRC1* transcript levels were very low in *rms1* and *rms4* axillary buds compared with wild-type and *Psbrcl1^{Te}* axillary buds. In several experiments, transcript levels of *PsBRC1* were not reduced in the *Psbrcl1^{Cam}* mutant in comparison with levels in the corresponding wild-type Caméor (Figs. 3B and 4A; Supplemental Fig. S4B), whereas they were reduced in SL-deficient and SL-response mutants. Again, *PsBRC1* transcript levels remained very low in *rms4*, whereas a strong increase was observed after GR24 treatment in *rms1*. In the wild type and the *Psbrcl1^{Te}* mutant, a 2-fold increase of *PsBRC1* by GR24 was generally observed, in contrast to the noninduction in the *rms4* background (Fig. 3B). All these results indicate that *PsBRC1* transcription and its induction by GR24 are not affected in the *Psbrcl1* mutant.

CK Regulates *PsBRC1* at the Transcriptional Level Independently of SL

To investigate whether CK regulates the transcription of *PsBRC1*, axillary buds at node 4 of *Psbrcl1^{Cam}*, *rms1*, and *rms4* mutants and their corresponding wild types were harvested 6 h after direct application of the synthetic CK 6-benzylaminopurine (BAP; 50 μ M), and *PsBRC1* transcript levels were quantified using real-time PCR (Fig. 4A; Supplemental Fig. S4B). In all genotypes, BAP application led to a strong reduction of *PsBRC1* transcript levels. This included the *rms1* SL-deficient and the *rms4* SL-response mutants, in which *PsBRC1* transcript levels were already low. The CK effect on *PsBRC1* expression in *rms4* buds shows that CK can transcriptionally regulate *PsBRC1* independently of SL.

The *Psbrcl1^{Cam}* Mutant Responds to Exogenous CK Application and to Decapitation

To test whether *PsBRC1* is needed for axillary bud growth, CK was applied to bud 4 of wild-type Tèrese and Caméor and *rms4* and *Psbrcl1^{Cam}* mutants and buds were measured 5 and 7 d after application (Fig. 4B). For all lines, axillary buds did not grow much without CK treatment, as in this experiment, to have a better comparison between wild-type and mutants, the primary bud at upper nodes in mutants was removed prior to the treatment, as were the basal lateral

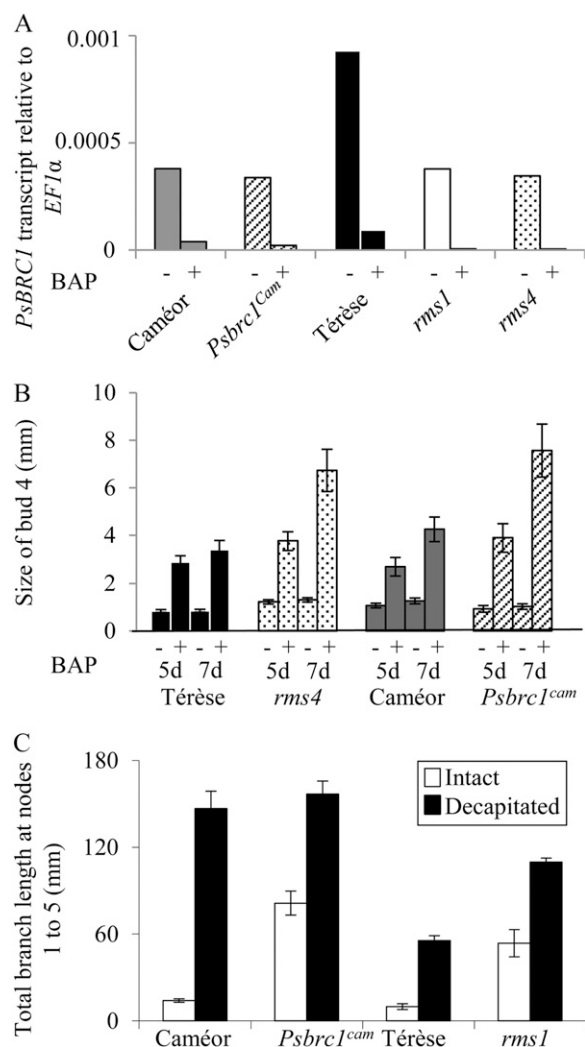


Figure 4. Effects of BAP on *PsBRC1* transcript levels and on bud growth. A, *PsBRC1* transcript levels were determined relative to *EF1α* in axillary buds at node 4 after BAP (50 μ M) application in wild-type Caméor, *Psbrcl1^{Cam}*, wild-type Tèrese, *rms1*, and *rms4*. RNA was extracted from the dissected buds of 30 plants at the six-node stage and quantified by real-time PCR. The data are representative of three independent experiments. B, Effects of BAP (50 μ M) treatment on bud growth at node 4 in wild-type Tèrese, *rms4*, wild-type Caméor, and *Psbrcl1^{Cam}*. Measurements were done 5 d after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 12$). C, Effects of decapitation above node 5 on total branch length at nodes 1 to 5. Intact and decapitated plants of *Psbrcl1^{Cam}*, wild-type Caméor, *rms1*, and wild-type Tèrese were used. Data are means $\pm$ SE ($n = 8$).

branches for all genotypes. All genotypes responded to BAP application by displaying a strong increase in bud/branch length compared with the mock-treated buds, particularly for *rms4* and *Psbrcl1^{Cam}* mutants. Another way to test the response to CK is decapitation, which, by depleting the source of auxin, has been shown to induce a rapid and massive decrease of *RMS1* SL biosynthesis gene expression, together with rapid increases in CK level in xylem sap and in

transcript levels of CK biosynthesis genes in nodal tissue (Bangerth, 1994; Foo et al., 2005; Tanaka et al., 2006; Foo et al., 2007). Decapitation of *rms1* and *Psbrcl1^{Cam}* mutants and their corresponding wild types resulted in increased branch lengths in all genotypes (Fig. 4C). Because the *Psbrcl1^{Cam}* mutant has been shown to be insensitive to GR24 application, its response to decapitation suggests that this response may be largely due to CK level variation occurring after decapitation or to CK-independent effects of auxin depletion.

PsBRC1 and the RMS2-Dependent Feedback Signal

The SL biosynthesis gene *RMS1/CCD8* is highly regulated at the transcriptional level. In particular, the absence of SL response because of SL deficiency (in *rms1* and *rms5*) or the lack of response (in *rms3* and *rms4*) induces a feedback signal that strongly up-regulates *RMS1* transcript levels (Beveridge et al., 1997a, 1997b; Beveridge, 2000; Foo et al., 2005). The *RMS2* gene may control this feedback signal, as *RMS1* transcript levels are not up-regulated in the *rms2* mutant. *RMS1* transcript accumulation was quantified in epicotyls from *rms1*, *rms2*, *rms4*, and *Psbrcl1^{Cam}* mutants and their corresponding wild types (Fig. 5A; Supplemental Fig. S4E).

Consistent with previous findings, *RMS1* mRNA was more abundant in *rms1* and especially in *rms4* mutants compared with wild-type Tèrese. In contrast, *rms2* and *Psbrcl1^{Cam}* mutants contained three and six times lower transcript levels compared with their respective wild-type lines, suggesting that the feedback signal is not activated in the *Psbrcl1* background. As the same feedback signal appears to control X-CK (Beveridge et al., 1997a; Beveridge, 2000; Foo et al., 2005, 2007), X-CK of wild-type and *Psbrcl1^{Cam}* plants was measured in two separate experiments (Fig. 5B). The main compounds detected were trans-zeatin riboside and dihydrozeatin riboside. Smaller amounts of isopentenyl adenosine, trans-zeatin, cis-zeatin riboside, isopentenyl adenine, and dihydrozeatin were also present. The profiles of CKs and absolute amounts were very similar in both experiments, with no statistically significant differences between wild-type and *Psbrcl1^{Cam}* genotypes (Student's *t* test, $P = 0.49$). This contrasts with *Arabidopsis max* and pea *rms* branching mutants, which, with the exception of *rms2*, have highly depleted X-CK levels (Table I; Beveridge et al., 1997a; Foo et al., 2007). Levels of X-CK were also quantified in *rms1 Psbrcl1* double mutant plants in comparison with wild-type and single mutant plants derived from the same cross, to have a comparable genetic background and to have enough plants for sap collection (see "Materials and Methods"). X-CK levels in the F3 *rms1 Psbrcl1* double mutant plants were not significantly different from X-CK levels from F3 *rms1* plants, whereas X-CK levels from F3 *Psbrcl1* and *Psbrcl1^{Te}* were particularly high in comparison with wild-type Tèrese and F3 wild-type plants. The greatly

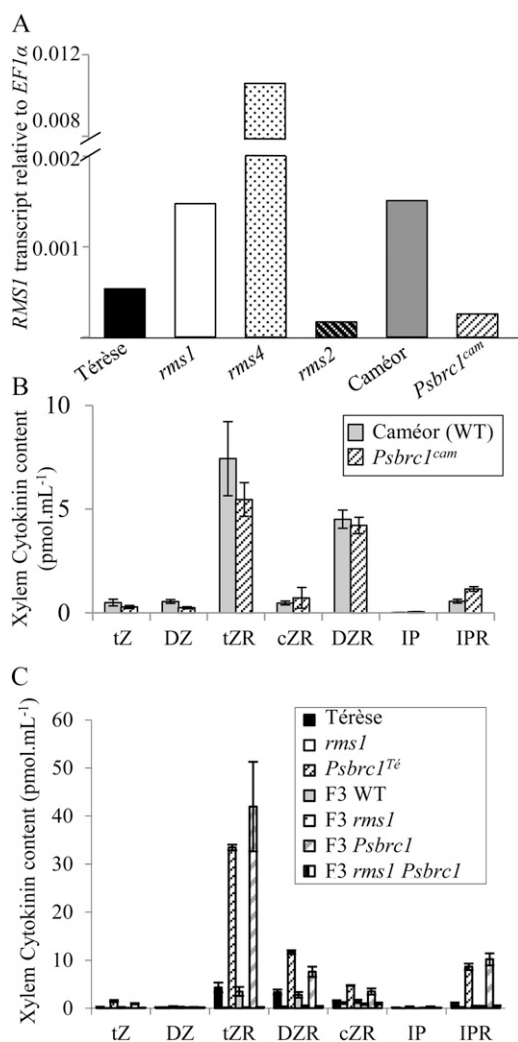


Figure 5. The RMS2-dependent feedback signal is not activated in *Psbrcl1*. A, *RMS1* transcript levels were determined in epicotyls of *rms1*, *rms2*, *rms4*, and their corresponding wild-type Térèse as well as *Psbrcl1*^{Cam} and its corresponding wild-type Caméor. RNA was extracted from plants at stage 6. The data are representative of three independent experiments. B and C, CK contents of root xylem sap. tZ, trans-Zeatin; DZ, dihydrozeatin; tZR, trans-zeatin riboside; DZR, dihydrozeatin riboside; cZR, cis-zeatin riboside; IP, isopentenyl adenine; IPR, isopentenyl adenosine. B, Wild-type (WT) Caméor and the *Psbrcl1*^{Cam} mutant. C, Wild-type Térèse, M3T-884 (*rms1*), *Psbrcl1*^{Té}, and F3 plants with wild-type, *rms1*, *Psbrcl1*, and *rms1 Psbrcl1* genotypes derived from four F2 (M3T-884 × F2 [Térèse × *Psbrcl1*^{Cam}]) populations (see “Materials and Methods”). Measurements were made from pools of 3 mL of sap harvested from 20 to 40 plants. Data are means ± SE (*n* = 3).

increased X-CK in *Psbrcl1*^{Té} in this experiment was not seen in the previous analysis with *Psbrcl1*^{Cam} and its wild-type Caméor and may relate to genetic background. Overall, these results indicate that the feedback regulation of X-CK is restored in the *Psbrcl1 rms1* double mutant but is absent or misregulated in *Psbrcl1* single mutants.

DISCUSSION

The Phenotype of *Psbrcl1* Differs from the Phenotype of the SL-Deficient *rms1* Mutant

Despite its large genome and recalcitrance to transformation, pea is an excellent model plant for genetic and physiological studies. The TILLING approach is particularly adapted for reverse genetics in such model plants (Triques et al., 2007; Dalmais et al., 2008) and has been applied in this work to identify a novel branching mutant in the TCP transcription factor *PsBRC1*. The *Psbrcl1* mutant showed a strong branching phenotype in comparison with its wild-type progenitor Caméor, particularly at basal nodes; buds at upper nodes were larger or gave small branches in comparison with the wild-type. When compared with the SL-deficient *rms1* mutant, the *Psbrcl1* mutant displayed very few long branches at upper nodes. Moreover, its height was less affected compared with *rms1* and other *rms* mutants, which are relatively dwarf. In rice, the *fc1* mutant is also less affected in height and in tiller number than the *dwarf* (*d*) SL mutants (Arite et al., 2007). In tomato, the phenotype of *SIBRC1b* RNA interference lines is also less strong than the phenotype of the *Slccd7* lines (Martin-Trillo et al., 2011), which supports the idea that the milder phenotype of *Psbrcl1* compared with *rms1* is likely not due to a leaky mutation. In addition, the Thr mutated to Ile in the studied *Psbrcl1* pea mutant (T195I) is located in the loop/helix II transition and appears highly conserved in the class I TCP family and in the class II CYC/TB1 clade (Martín-Trillo and Cubas, 2010). The relatively mild branching phenotype could also explain why the intensive screenings for high-branching mutants in pea ethyl methanesulfonate-mutagenized populations previously failed to identify the *Psbrcl1* pea branching mutant.

The difference of phenotypes between the SL-deficient *rms1* and *Psbrcl1* mutants may be explained by the very localized expression of the *PsBRC1* gene, mostly expressed in axillary buds, in contrast to the SL biosynthesis *RMS1* and *RMS5* genes, which are highly expressed in roots and also significantly in stems, where they are regulated by different long-distance signals. Novel roles for SL in plant architecture, other than shoot branching, have been recently suggested for dwarfism (Lin et al., 2009) and root architecture (Koltai et al., 2009; Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011). The relative dwarfism of *rms* mutants (in rice, the SL mutants were originally called *dwarf*) is not yet understood, but it is very likely that SL controls stem growth, and this control may be independent of *PsBRC1*. In the auxin transport theory, it is proposed that SL modulates polar auxin transport (PAT) in the stem and that axillary buds compete for exporting auxin into the PAT stream in the main stem. The *Psbrcl1* mutant appears less branched at upper nodes than the SL-deficient *rms1* mutant, which could suggest that competition between buds is higher in the *Psbrcl1*

mutant compared with the other *rms* mutants. In pea, differences in auxin transport between SL-related mutants and the wild type are modest (Beveridge et al., 2000), in contrast to Arabidopsis. It would be interesting to test if the Arabidopsis *Atbrc1* mutant has increased auxin transport, as observed in *max* mutants (Bennett and Leyser, 2006), as this would reveal whether the relative pleiotropy of the SL-deficient and SL-response mutants in comparison with *Atbrc1* is related to a difference in PAT. In Arabidopsis, two *TB1* homologs have been identified, *AtBRC1* and *AtBRC2*, with a role in the control of shoot branching (Aguilar-Martínez et al., 2007). The presence of a second *BRC1* homolog in pea and gene redundancy could also explain the weaker phenotype of *Psbrc1* in comparison with the SL mutants. Nevertheless, we were unable to amplify another pea *BRC* homolog, and in Arabidopsis, the double *Atbrc1 Atbrc2* mutant displays the same branching phenotype as the strongest *Atbrc1* mutant (Aguilar-Martínez et al., 2007).

***PsBRC1* Acts Downstream of the SL Pathways to Control Axillary Bud Outgrowth**

The fact that the *Psbrc1* mutant did not respond to SL application suggests that *PsBRC1* may be involved in the SL signaling pathway to repress axillary bud outgrowth. In support of *BRC1* acting in the SL pathway, we showed that *PsBRC1* expression in axillary buds was rapidly enhanced by SL treatment. *PsBRC1* transcript levels were very low in axillary buds of SL-deficient (*rms1*) or SL-response (*rms4*) mutants in comparison with wild-type buds but were rapidly up-regulated by SL application, particularly in *rms1*, in which it was already very low, and in the wild type, *rms2*, and *Psbrc1*. As expected for a SL-response mutant, *PsBRC1* transcript levels remained very low after SL treatment in buds of the *rms4* response mutant. Although *RMS4* has not been proven to act in the SL pathway, it has all the features expected of a protein involved in SL signaling (branching phenotype of *rms4*, F-box protein, nonresponse to GR24 application of the *rms4* mutant, strong feedback up-regulating *RMS1* expression in the *rms4* mutant). As such, the *RMS4*-dependent response of *PsBRC1* to SL is consistent with *PsBRC1* acting in the SL signaling pathway for branching inhibition. The expression of *PsBRC1* in the *Psbrc1* mutant was similar to its expression in the wild type, and the increase of *PsBRC1* expression after GR24 application was not affected in the *Psbrc1* mutant, despite the fact that the branching of this mutant was not repressed by GR24 application. These data indicate that *PsBRC1* transcript levels do not simply correlate negatively with the activity of axillary buds and suggest a direct effect of the *PsBRC1* transcription factor in the repression of axillary bud outgrowth. In rice, the homolog of the maize *TB1* gene, *FC1*, was found not to be transcriptionally up-regulated by SL (Minakuchi et al., 2010). In Arabidopsis, expression of *AtBRC1* was strongly down-regulated in the *max1* to

max4 mutants (Aguilar-Martínez et al., 2007), suggesting that SL up-regulates transcript levels of *AtBRC1* in Arabidopsis, as we observed for *PsBRC1*. In contrast, the other homolog, *AtBRC2*, is not down-regulated in the *max1* and *max2* mutants; *FC1* and *AtBRC2* appear to be similarly unresponsive to SL, while *AtBRC1* and *PsBRC1* are both transcriptionally up-regulated by SL.

To confirm that *PsBRC1* and *RMS1* act in the same pathway, *rms1 Psbrc1* double mutant plants were produced and their phenotype analyzed alongside the single mutant plants in a comparable genetic background. In Arabidopsis and rice, the corresponding double mutants have the same level of branching as single mutants (Aguilar-Martínez et al., 2007), suggesting that the *FC1/AtBRC1* TCP transcription factors act in the SL pathway. In pea, surprisingly, total branch length was strongly enhanced in the *rms1 Psbrc1* double mutant plants, mainly because of strong development of the cotyledonary branches. When branching was quantified according to the position along the stem, branching of *rms1 Psbrc1* was similar to branching in *rms1* at upper nodes (node 3 and above) but transgressive at basal nodes (cotyledonary node and node 1). These results suggest a possible specific regulation of branching at basal nodes in pea. Unlike in Arabidopsis, these buds are differentiated very early in the embryo at the axils of particular leaves (cotyledons and scale leaves) and their development generally occurs below the soil surface. In pea, the *RMS6* gene has been shown to control bud outgrowth only at these nodes (Rameau et al., 2002). Future studies will have to decipher how branching is regulated at these basal nodes and how *RMS6*, SL, and *PsBRC1* interact to have a better understanding of the phenotype of the *rms1 Psbrc1* double mutant.

CK Regulates Bud Outgrowth via *PsBRC1* and Sustained Bud Growth Independently of *PsBRC1*

Our results showed that *PsBRC1* transcript levels decrease after direct application of CK to the axillary bud for all genotypes tested, including the SL-response *rms4* and *Psbrc1* mutants. These results demonstrate that CK controls *PsBRC1* expression independently of the SL pathway. Thus, *PsBRC1* could integrate the SL and CK pathways at the transcriptional level within the bud and bud outgrowth would occur where *PsBRC1* falls below a certain transcript level. In rice, similar results have been obtained, with a strong decrease of *FC1* expression 3 h after BAP treatment (Minakuchi et al., 2010).

We tested the phenotypic response of CK application on axillary buds at node 4 of *Psbrc1^{Cam}*, *rms4*, and their corresponding wild-type progenitors. CK treatment induced bud outgrowth for all genotypes, including *Psbrc1^{Cam}*. This response indicates that CK may promote axillary bud outgrowth and/or growth independently of the SL signaling pathway and from *PsBRC1*. The phenotypic response to decapitation was consistent with the CK response of *Psbrc1^{Cam}* and of the

SL-deficient *rms1* mutant. This result differs from that observed in *Arabidopsis*, where *Atbrc1* mutants showed no response to decapitation (Aguilar-Martínez et al., 2007). This difference between pea and *Arabidopsis* could be explained by the stage of development when the decapitation was performed (a floral shoot was decapitated in the case of *Arabidopsis* compared with decapitation of a vegetative shoot in pea) and by the different growth habits of these species (Cline, 1996). If *PsBRC1* integrates the SL and CK signals to control axillary bud outgrowth, the CK response of the *Psbrcl^{Cam}* mutant could be interpreted as the CK response having at least two components, one involving early bud outgrowth (*PsBRC1* dependent) and the other involving sustained growth (*PsBRC1* independent; Dun et al., 2009). Indeed, branching involves many steps, from axillary meristem initiation and axillary bud formation to axillary bud outgrowth and sustained growth of branches. Simple quantification of the lengths of buds/lateral branches does not in itself distinguish the different growth stages.

The RMS2-Dependent Feedback Signal Originates between RMS4 and *PsBRC1*

The existence of a mobile graft-transmissible auxin-independent shoot-to-root feedback signal that up-regulates *RMS1* and *RMS5* transcription and down-regulates X-CK export from roots was previously proposed (Beveridge et al., 2009; Dun et al., 2009). Because the *rms2* mutant showed low *RMS1* expression and high X-CK content in the xylem sap, in contrast to the other *rms* mutants (Table I), it was suggested that the shoot-to-root feedback signal was *RMS2* dependent (Beveridge et al., 2000). Experiments with grafted plants bearing two shoots of different genotypes and different phenotypes indicated that the feedback signal was more likely generated by the branching shoot to suppress X-CK and up-regulate *RMS1* expression, even in the presence of a nonbranching wild-type shoot. Moreover, experiments with mutants lacking axillary meristems in an *rms4* background demonstrated that branching per se was not the cause of the feedback (Foo et al., 2001, 2007). It was instead suggested to be regulated by the absence of perception of SL (Foo et al., 2005; Dun et al., 2009), as various mutants unable to produce (*rms1* and *rms5*) or to respond to (*rms3* and *rms4*) SL have reduced export of X-CK from the roots (Beveridge et al., 1997a; Morris et al., 2001; Foo et al., 2007) and increased expression of SL biosynthesis genes (Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006; Arite et al., 2007; Hayward et al., 2009). Here, we showed that *Psbrcl^{Cam}* lacks the feedback up-regulation of *RMS1* gene expression and that the substantial down-regulation of X-CK content in SL biosynthesis and signaling mutants was not found in *Psbrcl^{Cam}* plants (Table I). Instead, X-CK was either nearly normal in *Psbrcl^{Cam}* or substantially increased in *Psbrcl^{Te}* mutant plants, with the response appearing to depend on genetic background in our experiments.

Similarly, in rice, *D10* expression was not increased in the *fc1* mutant, whereas it was highly expressed in other SL-related mutants (Arite et al., 2007; Minakuchi et al., 2010). As discussed above, our results suggest that *PsBRC1* acts downstream of *RMS4* in the SL signaling pathway. The absence of feedback in *Psbrcl* could suggest that the SL-mediated feedback regulation is generated between the action of *RMS4* and *PsBRC1*. This is further supported by the feedback down-regulation of X-CK in *Psbrcl rms1* double and *rms1* single mutants but not in *Psbrcl^{Te}* single mutants.

Advances in plant hormone signaling have highlighted the role of the ubiquitin-proteasome pathway and targeted protein turnover (Santner and Estelle, 2009). Because the *MAX2/RMS4* gene encodes an F-box protein (Stirnberg et al., 2002; Johnson et al., 2006), it is likely that the SL signaling pathway involves similarly targeted protein degradation. In the GA signaling pathway, DELLA proteins are repressors that act directly downstream of the GA receptor. Microarray analysis has identified early GA- and DELLA-responsive genes (Zentella et al., 2007). Among the GA-repressed and DELLA-induced targets are genes encoding GA biosynthetic enzymes, indicating the direct involvement of DELLA proteins in feedback

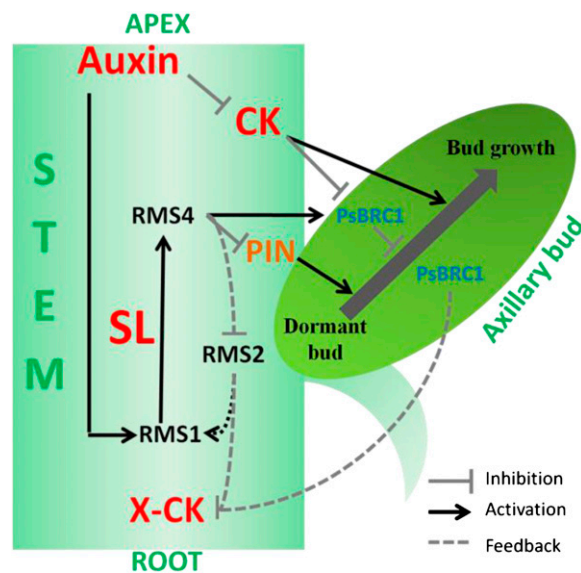


Figure 6. Model for the hormonal control of branching in pea integrating the function of *PsBRC1* in the axillary bud and the auxin transport canalization-based model (Domagalska and Leyser, 2011). *PsBRC1* integrates the SL and CK pathways to control bud outgrowth. CK also increases bud growth via a *PsBRC1*-independent pathway. Auxin maintains *RMS1* transcript levels, and hence SL synthesis, and down-regulates CK levels. The *RMS2*-dependent feedback, which up-regulates SL biosynthesis and down-regulates xylem CK, is activated when there is a lack of SL signaling via *RMS4* and may be independent of *PsBRC1*. SLs reduce PIN accumulation to the plasma membrane via *RMS4* but independently of *PsBRC1* and, by reducing the effectiveness of the canalization feedback loop, enhance the competition between active buds.

regulation. Proteins targeted for degradation in the SL signaling pathway, still to be identified, and possibly acting as repressors of *PsBRC1* may similarly regulate the feedback signal in pea controlling SL biosynthesis and X-CK.

SL quantification in root exudates of *Psbrcl* genotypes in comparison with their wild type show that this mutant is not deficient in SL biosynthesis and explains the grafting results. The higher level of fabacyl acetate found in root exudates of the two *Psbrcl* lines in comparison with their wild type, despite the low *RMS1* expression in epicotyl, is surprising and indicates a possible misregulation of SL biosynthesis in the mutant. In the rice *fc1* mutant, the level of 2'-epi-5-deoxystrigol in root exudates was slightly higher but not significantly different from the wild type (Minakuchi et al., 2010). Dun et al. (2009), using a hypothesis-driven modeling approach, suggested that SL biosynthesis is tightly regulated by multiple feedback signals in both shoot and root. More experimental data (e.g. *RMS1* expression in *Psbrcl* roots and SL quantification in shoot, xylem, and root) are needed to have a complete understanding of the signal network controlling shoot branching.

CONCLUSION

This study shows that the *PsBRC1* transcription factor acts locally in the axillary bud and strongly supports that it acts downstream of SL to repress bud outgrowth. Two models are currently proposed to explain how auxin and SLs interact to control branching: the auxin transport canalization model and the second messenger model (Brewer et al., 2009; Domagalska and Leyser, 2011). The precise comparison of the *Psbrcl*^{Te} mutant phenotype with the SL synthesis (*rms1*) mutant suggests that processes within the stem may be affected in SL synthesis mutants but not in *Psbrcl*^{Te}, one of these processes being PAT. The model that best fits with our data would be one in which both regulatory systems, not mutually exclusive, as indicated previously (Domagalska and Leyser, 2011), would coexist (Fig. 6). The degree of branching of a plant is an important component of its fitness, and it is very likely that different pathways are involved in its tight control according to bud position on the stem, developmental stage, and environmental conditions. SL would act locally in axillary buds via *PsBRC1* and would also coordinate branching across the plant (Leyser, 2011) by controlling auxin transport independently of *PsBRC1*. The study of *PsBRC1* gives an example of a transcription factor with more limited phenotypic effects than its upstream signaling genes. It indicates that the SL signaling pathway may be shared among multiple developmental modules, as proposed by Doebley and Lukens (1998). Future studies will decipher these different components of SL function.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of *PsBRC1*, Phylogenetic Analysis, and Mapping

Two degenerate primers, Cyc5F [5'-GGGA(T/C)CG(G/A)AGAATGAG (G/A)(T/C)T(G/T/C)TC-3'] and Cyc5R [5'-CTT(G/T)(T/C)TCTT(G/T)C (T/C)CTT(G/T)C(T/C)CT-3'], were designed in the conserved TCP domain of the *Lotus japonicus* *LjCYC5* gene. These primers were tested on pea (*Pisum sativum* 'Térèse') genomic DNA, and a fragment of 400 bp was amplified. The 5' region was obtained with one round of 5' RACE PCR using gene-specific nested primers 642Dn (5'-CCACTTTTCTTGTCTTGTATTT-3'), 527Dn (5'-TGTTTGATTCCGCTCTTCG-3'), and 497Dn (5'-TAACCAGTCCA-CAGTTTTCG-3') followed by PCR walking with three specific primers, 497Dn, 198R (5'-GCTAGATCTTTCTTCTTGATC-3'), and 143R (5'-GCT-TCTGCAGGAACAAGAC-3'), and the restriction enzyme *DraI* (Fermentas). The 3' sequence of *PsBRC1* was obtained by thermal asymmetric interlaced-PCR (Liu and Whittier, 1995) with gene-specific nested primers 198F (5'-GATCCAAAGGAAAAGATCTAGC-3') and 527Un (5'-CGAAAGACG-GAATCAAACA-3') and the RAPD primer E1 (5'-CCCAAGGTCC-3'). The amplicon obtained was sequenced using 642Un (5'-AAATCAAGAACAA-GAAAAAGTGG-3') and allowed to identify a 1,100-bp sequence. The full 1,576-bp sequence contains a 22-bp 5' untranslated region and 187 bp of the 3' untranslated region.

Subsequent mapping was realized in the recombinant inbred line population Térèse × K586 (Laucou et al., 1998) using a cleaved-amplified polymorphic sequence (CAPS) marker. The amplification was realized with primers 198F and 527Dn, and the product was digested using *SfeI* (Fermentas), cutting the sequence corresponding to the peptidic CTRYAG sequence only in the Torsdag/K586 genotype.

Obtaining the *Psbrcl* Mutant by TILLING Screening

Psbrcl mutants were identified from an ethyl methanesulfonate population containing 4,800 pea lines using TILLING screening (McCallum et al., 2000). PCR and digestion were performed as described by Dalmais et al. (2008). A 1-kb first amplicon was amplified with primers *PsCycN1F* (5'-GTCTTGTTCCTGCA-GAAGC-3') and *PsCycN1R* (5'-GTGCAAGTACATGTTAGAAATGG-3') at an annealing temperature of 60°C. From this one, a second amplicon of 900 bp was amplified with primers *PsCycN2Ftag* (5'-ACGACGTTGTAAAAC-GACCTGCTTCTGGTAAAGGC-3') and *PsCycN2Rtag2* (5'-ATAACAATTT-CACACAGGTTTTCCAAGGACTCGTG-3') at an annealing temperature of 58°C. The gene-specific inner primers carried a universal M13 tail (underlined). To confirm mutations, PCR products were sequenced (GATC Biotech) and sequence analysis was performed (Chromas version 1.4523 software). *PsBRC1* partial genomic sequence and TILLING mutations were integrated in UTILLdb (<http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>).

Mutation of the 4654 family was followed using a CAPS marker amplified with primers 4654-8F (5'-GTCTTGTTCCTGCAAGCTG-3') and 4654-317R (5'-CCAAGCTTGAAACTCCTTCAC-3') and digested with *TasI* enzyme (Fermentas).

Plant Materials, Growing Conditions, and Phenotype Measurement

Plants used in this study were derived from various cultivars of pea. The *rms1-10* (M3T-884) and *rms4-3* (M3T-946) mutants were obtained in cv Térèse (Rameau et al., 1997). The *rms2-1* allele obtained in Torsdag (Arumingtyas et al., 1992; Beveridge et al., 1997b) was back-crossed in the Térèse background, and BC7 (Térèse × K524) was used in this study. The *Psbrcl* mutant families derived from the TILLING approach were obtained from cv Caméor (Dalmais et al., 2008).

The *Psbrcl* mutant was first back-crossed with its wild-type progenitor Caméor. For the segregation analysis, a BC2-F2 (4654 × Caméor) population was genotyped for the T195I mutation with a CAPS marker (see below) and was phenotyped when plants had 10 leaves expanded. A BC3 mutant line (*Psbrcl*) was used for further study and was named *Psbrcl*^{Cam}. To have a better comparison with the *rms1* mutant used in this study (line M3T-884), the *Psbrcl* mutant was also back-crossed twice in line Térèse (BC2 [Térèse × *Psbrcl*]), and this line was named *Psbrcl*^{Te}. To analyze the phenotype of *rms1 Psbrcl* double mutant plants and compare it with the branching phenotype of single mutants in a comparable genetic background, a cross between M3T-884 (*rms1*) and an

F2 plant (Térèse $\times$ *Psbr1*) that was *Psbr1* and *afila* (without leaflets, as in Térèse) was done. More than 100 F2 plants were genotyped and phenotyped for *RMS1* and *PsBRC1*, and several F3 families were also analyzed for their branching phenotypes.

For CK quantifications in sap of double mutants, 28 *rms1*, 27 *Psbr1*, and 40 *rms1 Psbr1* plants were selected in the F3 generation derived from four F2 (M3T-884 $\times$ F2 [Térèse $\times$ *Psbr1*^{Cam}]) plants; these F2 plants were fixed for one mutation and heterozygous for the other one and gave in the F3 generation one-quarter single mutants, one-quarter double mutants, and one-half plants with the same genotype as the parental plant (sap was not collected from the later plants). Approximately 30 wild-type plants from two F2 wild-type plants for both genes were also used as well as the wild-type Térèse, the *rms1* mutant (M3T-884), and the *Psbr1*^{Te} line.

For genotyping the T195I mutation in *PsBRC1* in the different crosses, a CAPS marker was designed. The amplified PCR fragment using primers 4654-8F (5'-GTCTTGTTCTGCAGAAGCTG-3') and 4654-317R (5'-CCAAGCTT-GAACTCCTTCAC-3') was digested with *TasI* enzyme (Fermentas). The CAPS marker for genotyping *RMS1* was based on amplification of the PCR fragment using primers RMS1-118F (5'-TTGGTTGGACTTCACCTTGAGG-3') and RMS1-984R (5'-CACAAACATCAGCAATGACAGC-3') and digestion with the *Cfr13I* enzyme (Fermentas).

Plants were grown in pots filled with clay pellets, peat, and soil (1:1:1) supplied regularly with nutrient solution in a heated glasshouse (15°C night and 22°C day) under a 16-h photoperiod (the natural daylength was extended or supplemented during the day when necessary using sodium lamps). For harvesting axillary buds at node 4 or epicotyls, plants were sown individually in 4-dL pots. For longer culture, one or two plants were cultivated per 2-L pot.

Nodes were numbered acropetally from the first scale leaf as node 1. The stage indicated corresponds to the number of nodes with fully expanded leaves.

Hormonal Treatment

The synthetic SL GR24 (kindly provided by F.D. Boyer, Institut de Chimie des Substances Naturelles) was applied on buds as 10 μ L of a solution containing 50% ethanol, 1% polyethylene glycol 1450 (Sigma), 0.1% dimethyl sulfoxide (Sigma), and 0.1% acetone containing or not (mock treatment) 500 nM GR24.

The CK BAP (Sigma) was applied to buds as 10 μ L of a solution containing 50% ethanol, 1% polyethylene glycol 1450 (Sigma), and 0.5% dimethyl sulfoxide (Sigma) containing or not (mock treatment) 50 μ M BAP.

Gene Expression Analysis

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Tissue samples were harvested and ground into liquid nitrogen. Total RNA was isolated from 20 to 30 buds or 10 to 15 epicotyls using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. DNase treatment was performed using the Qiagen RNase-Free DNase Set (79254) and the RNeasy Mini Kit (74904) and eluted in 50 μ L of RNase-free water. RNA was quantified using NanoDrop 1000 and migrated on gels to check RNA nondegradation. The absence of contamination with genomic DNA was checked using 35 cycles of PCR with *RMS1* primers (see below).

Total cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using 50 units of RevertAid H⁺ Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fermentas) in 30 μ L following the manufacturer's instructions with poly(T)₁₈ primer. cDNA was diluted 10 times before subsequent analysis.

Real-Time PCR Analysis

Quantitative reverse transcription-PCR analyses were performed using SYBR ROX RealMasterMix (5Prime) with the following specific primers: for *PsBRC1*, *BRC1* forward (5'-AGGCAAGAGAAAGAGCAAGG-3') and *BRC1* reverse (5'-TTGCATTGCTTTGAGTTGA-3' [amplicon of 128 bp]); for *RMS1*, *RMS1* forward (5'-TTGCTCAGGGCTGAACCAAC-3') and *RMS1* reverse (5'-CACTTCCACACTTGCCACAATC-3' [amplicon of 113 bp]). Cycling conditions for amplification were 95°C for 10 min, 50 cycles of 95°C for 5 s, 62°C for 5 s, and 72°C for 15 s, followed by 0.1°C s⁻¹ ramping up to 95°C for fusion curve characterization. Three biological repeats were analyzed in duplicate. To calculate relative transcript levels, the comparative cycle method based on nonequal efficiencies was used (Pfaffl, 2001). Transcript levels for the different

genes were expressed relative to the expression of the *EF1 α* gene (Johnson et al., 2006).

CK Quantification

Xylem sap was harvested from roots of 30-d-old plants by applying vacuum to the freshly cut epicotyl with a syringe. Independent pools of 3 mL of sap were used to quantify CKs as described (Morris et al., 2001).

SL Sampling and Analysis

Pea plants were germinated in vermiculite for 6 d and then transferred to aerated hydroponic complete nutrient solution culture, with 12 plants in 6 L of solution in a growth cabinet set at 23°C, 55% relative humidity during the day and 15°C, 65% relative humidity at night, with a 16-h photoperiod and light intensity of 300 μ mol m⁻² s⁻¹ provided by cool-white fluorescent lamps supplemented with tungsten lamps. At 19 d after germination, the solution was replaced with water, then 24 h later, batches of 12 plants were transferred to 900 mL of water into which exudate was collected for 24 h. Deuterium-labeled SL internal standards (20 ng each of d₁-orobanchol, d₁-orobanchyl acetate, d₁-epiorobanchyl acetate, d₁-fabacyl acetate, d₆-5-deoxystrigol, and d₆-epi-5-deoxystrigol; all generous gifts of Koichi Yoneyama) were added to each sample. SLs were extracted with 0.6 volume of ethyl acetate, followed by back-extraction with 0.1 M KH₂PO₄. The ethyl acetate fraction was dried with anhydrous MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness at 35°C. Samples were redissolved in dry acetone, transferred to autosampler vials, redried, dissolved in acetonitrile:water (30:70, v/v), and filtered (0.45 μ m) prior to analysis by liquid chromatography-mass spectrometry multiple reaction monitoring (MRM) in positive ion electrospray mode using the Agilent 1100 LC System and an Applied Biosystems Sciex QTrap mass spectrometer. The column was Phenomenex 3 μ m C18 Luna 100 $\times$ 2 mm, heated to 40°C with a flow rate of 200 μ L min⁻¹. The initial mobile phase was 45.5% acetonitrile in 0.1% aqueous formic acid. After 1 min, a linear gradient to 77% acetonitrile over 19 min was applied, then increased to 95% acetonitrile for 3 min. Appropriate MRM transitions were monitored for each labeled standard and corresponding unlabeled SL. For the quantifications reported here, the transitions were mass-to-charge ratio 406 to 232 for d₁-fabacyl acetate and 405 to 231 for fabacyl acetate. Two biological replicates representing pools of 12 plants were analyzed for each genotype. SL content was calculated from MRM peak areas by the stable isotope ratio method.

Statistical Analysis

For the statistical analysis, Student's *t* test and ANOVA were performed using Statgraphics Plus 5.1. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession number JF274232 for *PsBRC1*.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Phylogenetic tree of representative TCP proteins.

Supplemental Figure S2. Comparison of branching mutant plant architecture.

Supplemental Figure S3. Grafting experiment.

Supplemental Figure S4. Independent experiments for real-time PCR.

Supplemental Table S1. List of the mutations identified in the *PsBRC1* gene using TILLING.

Supplemental Table S2. Relative expression of *PsBRC1* in different plant organs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the participants of the ERA-PG COGS project; C. Beveridge, L. Dun, and P. Brewer for helpful discussions; S. Bonhomme, L. Dun, and C.

Beveridge for their comments on the manuscript; and M. Bennett for assistance with the development of SL analysis methods.

Received July 1, 2011; accepted October 28, 2011; published November 1, 2011.

LITERATURE CITED

- Aggarwal P, Padmanabhan B, Bhat A, Sarvepalli K, Sadhale PP, Nath U (2011) The TCP4 transcription factor of Arabidopsis blocks cell division in yeast at G1→S transition. *Biochem Biophys Res Commun* **410**: 276–281
- Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* **19**: 458–472
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyoizuka J (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* **51**: 1019–1029
- Arumintyas EL, Floyd RS, Gregory MJ, Murfet IC (1992) Branching in *Pisum*: inheritance and allelism tests with 17 *ramosus* mutants. *Pisum Genet* **24**: 17–31
- Bangerth F (1994) Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta* **194**: 439–442
- Bennett T, Leyser O (2006) Something on the side: axillary meristems and plant development. *Plant Mol Biol* **60**: 843–854
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C, Leyser O (2006) The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**: 553–563
- Beveridge C (2000) Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regul* **32**: 193–203
- Beveridge CA (2006) Axillary bud outgrowth: sending a message. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 35–40
- Beveridge CA, Dun EA, Rameau C (2009) Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol* **151**: 985–990
- Beveridge CA, Kyoizuka J (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 34–39
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C (1997a) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots: evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* **11**: 339–345
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC (1996) Branching in pea (action of genes *Rms3* and *Rms4*). *Plant Physiol* **110**: 859–865
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C (1997b) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft transmissible signal(s). *Plant Physiol* **115**: 1251–1258
- Beveridge CA, Symons GM, Turnbull CG (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol* **123**: 689–698
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 482–493
- Cline M (1991) Apical dominance. *Bot Rev* **57**: 318–358
- Cline M (1996) Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Ann Bot (Lond)* **78**: 255–266
- Crawford BC, Nath U, Carpenter R, Coen ES (2004) CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of Antirrhinum. *Plant Physiol* **135**: 244–253
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska MA, Leyser O (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**: 2905–2913
- Dalmaís M, Schmidt J, Le Signor C, Moussy F, Burstin J, Savoie V, Aubert G, Brunaud V, de Oliveira Y, Guichard C, et al (2008) UTILDB, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol* **9**: R43
- Doebley J, Lukens L (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* **10**: 1075–1082
- Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485–488
- Domagalska MA, Leyser O (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 211–221
- Dun EA, Ferguson BJ, Beveridge CA (2006) Apical dominance and shoot branching: divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol* **142**: 812–819
- Dun EA, Hanan J, Beveridge CA (2009) Computational modeling and molecular physiology experiments reveal new insights into shoot branching in pea. *Plant Cell* **21**: 3459–3472
- Feng X, Zhao Z, Tian Z, Xu S, Luo Y, Cai Z, Wang Y, Yang J, Wang Z, Weng L, et al (2006) Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4970–4975
- Finlayson SA (2007) Arabidopsis Teosinte Branched1-like 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot Teosinte Branched1. *Plant Cell Physiol* **48**: 667–677
- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge CA (2005) The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**: 464–474
- Foo E, Morris SE, Parmenter K, Young N, Wang H, Jones A, Rameau C, Turnbull CG, Beveridge CA (2007) Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 1418–1428
- Foo E, Turnbull CG, Beveridge CA (2001) Long-distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol* **126**: 203–209
- Giraud E, Ng S, Carrie C, Duncan O, Low J, Lee CP, Van Aken O, Millar AH, Murcha M, Whelan J (2010) TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 3921–3934
- Gomez-Roldan V, Feras F, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, et al (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol* **151**: 400–412
- Hubbard L, McSteen P, Doebley J, Hake S (2002) Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* **162**: 1927–1935
- Johnson X, Brich T, Dun EA, Goussot M, Haurogné K, Beveridge CA, Rameau C (2006) Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014–1026
- Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combier JP, Bécard G, Belausov E, et al (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta* **233**: 209–216
- Koltai H, Dor E, Hershenhorn J, Joel D, Weininger S, Lekalla S, Shealtiel H, Bhattacharya C, Eliahu E, Resnick N, et al (2009) Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *J Plant Growth Regul* **29**: 129–136
- Kosugi S, Ohashi Y (1997) PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**: 1607–1619
- Lauco V, Haurogne K, Ellis N, Rameau C (1998) Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theor Appl Genet* **97**: 905–915
- Leyser O (2011) Auxin, self-organisation, and the colonial nature of plants. *Curr Biol* **21**: R331–R337
- Li C, Guevera E, Herrera J, Bangerth F (1995) Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. *Physiol Plant* **94**: 465–469
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, et al (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* **21**: 1512–1525
- Liu YG, Whittier RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**: 674–681
- Martin-Trillo M, Cubas P (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* **15**: 31–39
- Martin-Trillo M, Grandio EG, Serra F, Marcel F, Rodríguez-Buey ML, Schmitz G, Theres K, Bendahmane A, Dopazo H, Cubas P (2011) Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching. *Plant J* **67**: 701–714
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000) Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**: 439–442

- McSteen P (2009) Hormonal regulation of branching in grasses. *Plant Physiol* **149**: 46–55
- Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, Umehara M, Luo L, Kobayashi K, Hanada A, Ueno K, Asami T, Yamaguchi S, et al (2010) FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol* **51**: 1127–1135
- Morris SE, Turnbull CG, Murfet IC, Beveridge CA (2001) Mutational analysis of branching in pea: evidence that Rms1 and Rms5 regulate the same novel signal. *Plant Physiol* **126**: 1205–1213
- Nath U, Crawford BC, Carpenter R, Coen E (2003) Genetic control of surface curvature. *Science* **299**: 1404–1407
- Ongaro V, Leyser O (2008) Hormonal control of shoot branching. *J Exp Bot* **59**: 67–74
- Ori N, Cohen AR, Etzioni A, Brand A, Yanai O, Shleizer S, Menda N, Amsellem Z, Efroni I, Pekker I, et al (2007) Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat Genet* **39**: 787–791
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257–263
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pruneda-Paz JL, Breton G, Para A, Kay SA (2009) A functional genomics approach reveals CHE as a component of the Arabidopsis circadian clock. *Science* **323**: 1481–1485
- Prusinkiewicz P, Crawford S, Smith RS, Ljung K, Bennett T, Ongaro V, Leyser O (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 17431–17436
- Rameau C, Bodelin C, Cadier D, Grandjean O, Miard F, Murfet IC (1997) New *ramosus* mutants at loci *Rms1*, *Rms3* and *Rms4* resulting from the mutation breeding program at Versailles. *Pisum Genet* **29**: 7–12
- Rameau C, Dénoue D, Fraval F, Hauragné K, Josserand J, Laucou V, Batge S, Murfet IC (1998) Genetic mapping in pea. 2. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. *Theor Appl Genet* **97**: 916–928
- Rameau C, Murfet IC, Laucou V, Floyd RS, Morris SE, Beveridge CA (2002) Pea rms6 mutants exhibit increased basal branching. *Physiol Plant* **115**: 458–467
- Ramsay L, Comadran J, Druka A, Marshall DF, Thomas WT, Macaulay M, MacKenzie K, Simpson C, Fuller J, Bonar N, et al (2011) INTERMEDIUM-C, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene TEOSINTE BRANCHED 1. *Nat Genet* **43**: 169–172
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, et al (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol* **155**: 721–734
- Sachs T, Thimann K (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Am J Bot* **54**: 136–144
- Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071–1078
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* **6**: e230
- Snow R (1937) On the nature of correlative inhibition. *New Phytol* **36**: 283–300
- Sorefan K, Booker J, Hauragné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, et al (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* **17**: 1469–1474
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* **129**: 1131–1141
- Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi C (2003) The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J* **33**: 513–520
- 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
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**: 1028–1036
- Tatematsu K, Nakabayashi K, Kamiya Y, Nambara E (2008) Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **53**: 42–52
- Thimann KV, Skoog F (1933) Studies on the growth hormone of plants. III. The inhibitory action of the growth substance on bud development. *Proc Natl Acad Sci USA* **19**: 714–716
- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, Aubourg S, Rameau C, Caboche M, Bendahmane A (2007) Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J* **51**: 1116–1125
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200
- Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley J (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**: 236–239
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, et al (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037–3057

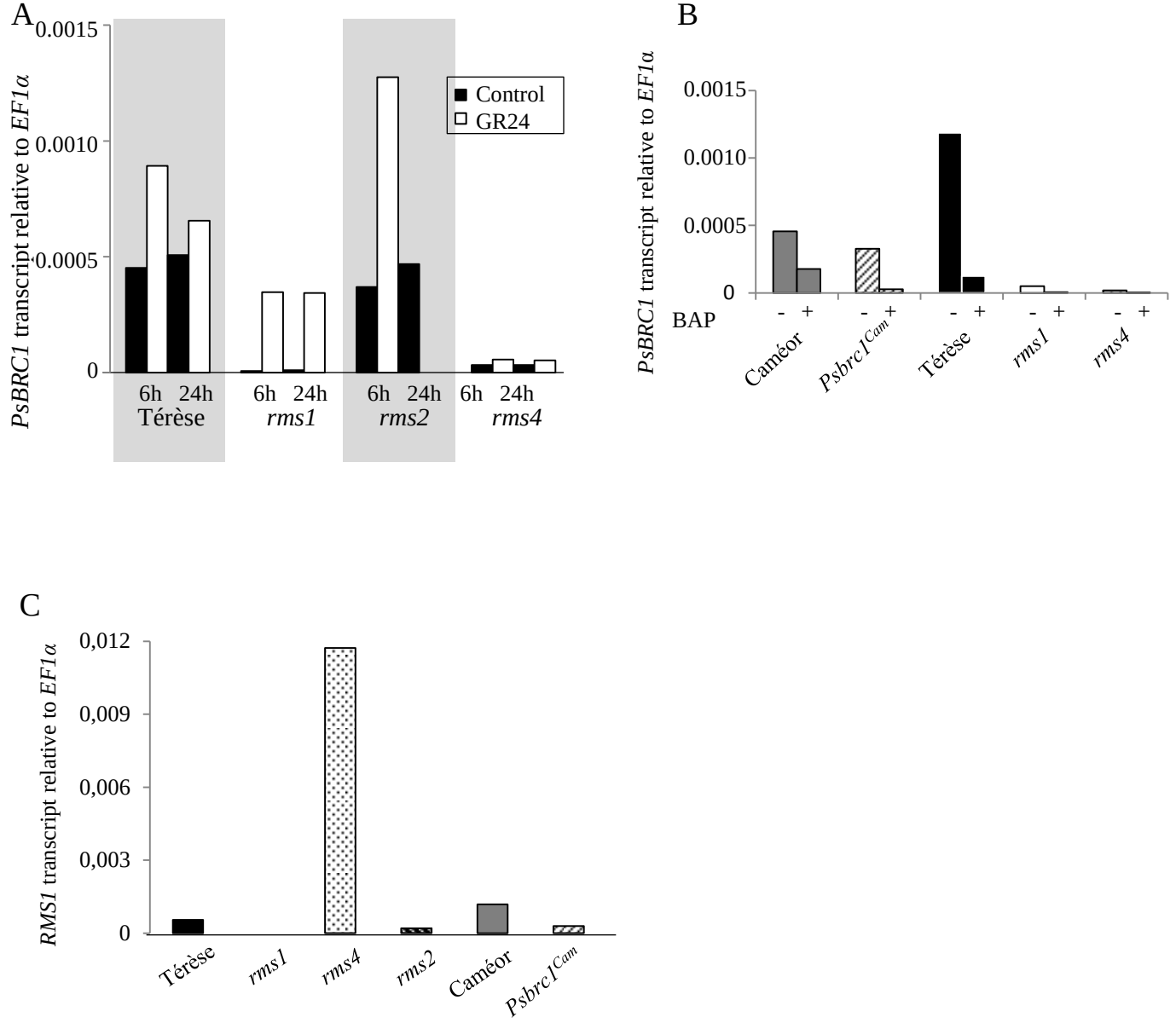


Figure S4. Independent experiments for real-time PCR. A, Effect of GR24 on *PsBRC1* transcript levels. *PsBRC1* transcript levels relative to *EF1α* in axillary bud at node 4 after GR24 applications or mock treated at 6 h and 24 h after treatment of WT Tèrese, *rms1*, *rms2* and *rms4* plants. RNA was extracted from dissected buds from pools of 30 plants at the six-node stage and quantified by real-time PCR. B, Effect of BAP on *PsBRC1* transcript levels *PsBRC1* transcript levels relative to *EF1α* in axillary bud at node 4 after BAP (50 μ M) applications in WT Caméor, *Psbrcl^{Cam}*, WT Tèrese, *rms1* and *rms4*. RNA was extracted from the dissected buds of 30 plants at the six-node stage and quantified by real-time PCR. C, *RMS1* transcript levels in epicotyls of *rms1*, *rms2*, *rms4* and their corresponding WT Tèrese and of *Psbrcl^{Cam}* and its corresponding WT Caméor. RNA was extracted from plant at stage 6.

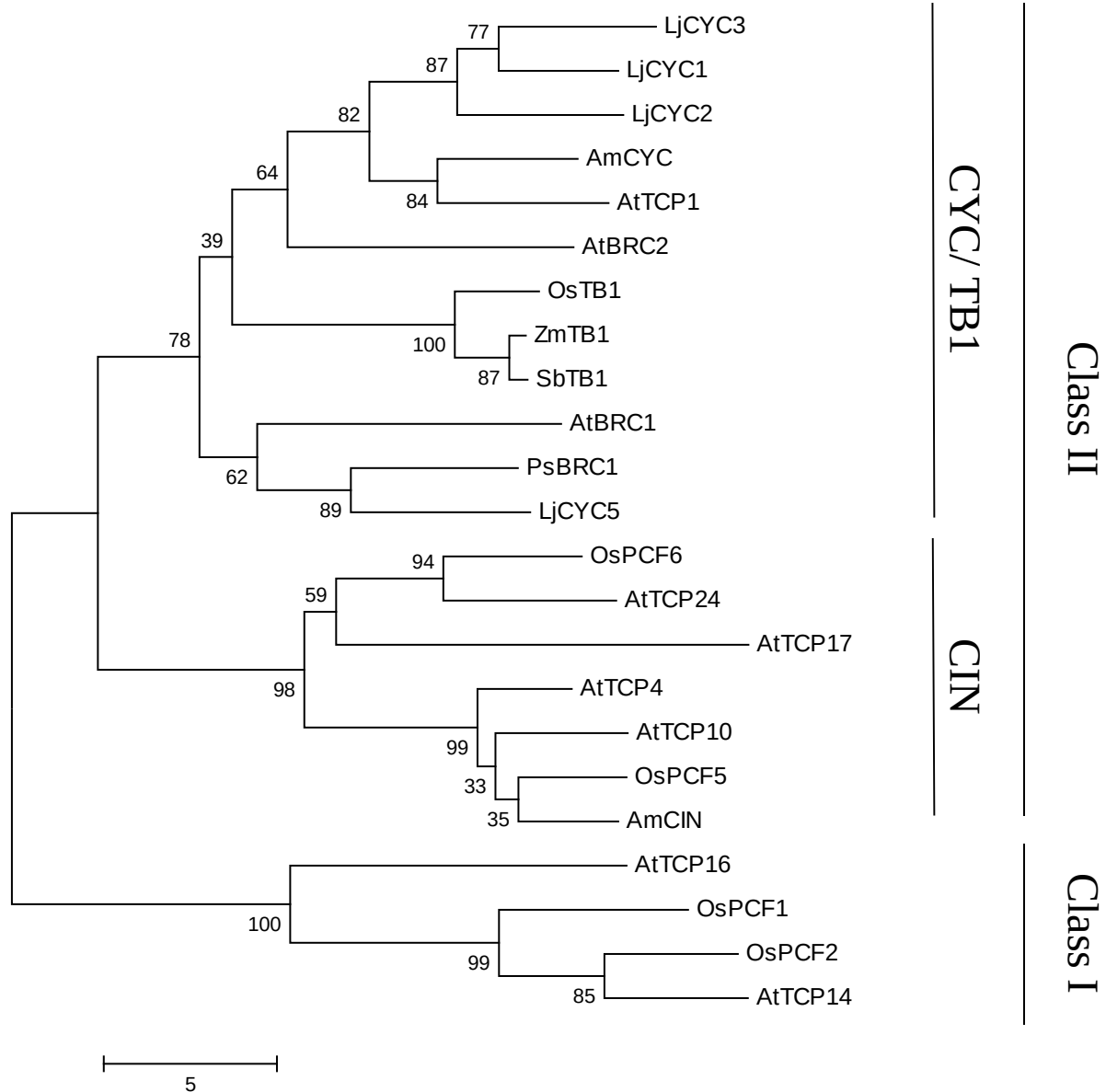


Figure S1. Phylogenetic tree of representative TCP proteins from *Arabidopsis thaliana* (At), PsBRC1 from pea and members of other plant species, *Antirrhinum majus* (Am), *Lotus japonicus* (Lj), rice (Os), maize (Zm), *Sorghum bicolor* (Sb). Evolutionary relationships were analyzed using a selection of predicted amino acid sequences of the TCP domains aligned with the program CLUSTALX (Thompson et al., 1997). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) and the optimal tree was generated. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura et al., 2007). *Arabidopsis* and rice TCP genes named after (Martin-Trillo and Cubas, 2010); LjCYC1, LjCYC2, LjCYC3, and LjCYC5 (GenBank accession nos DQ202475, DQ202476, DQ202477 and DQ202478).

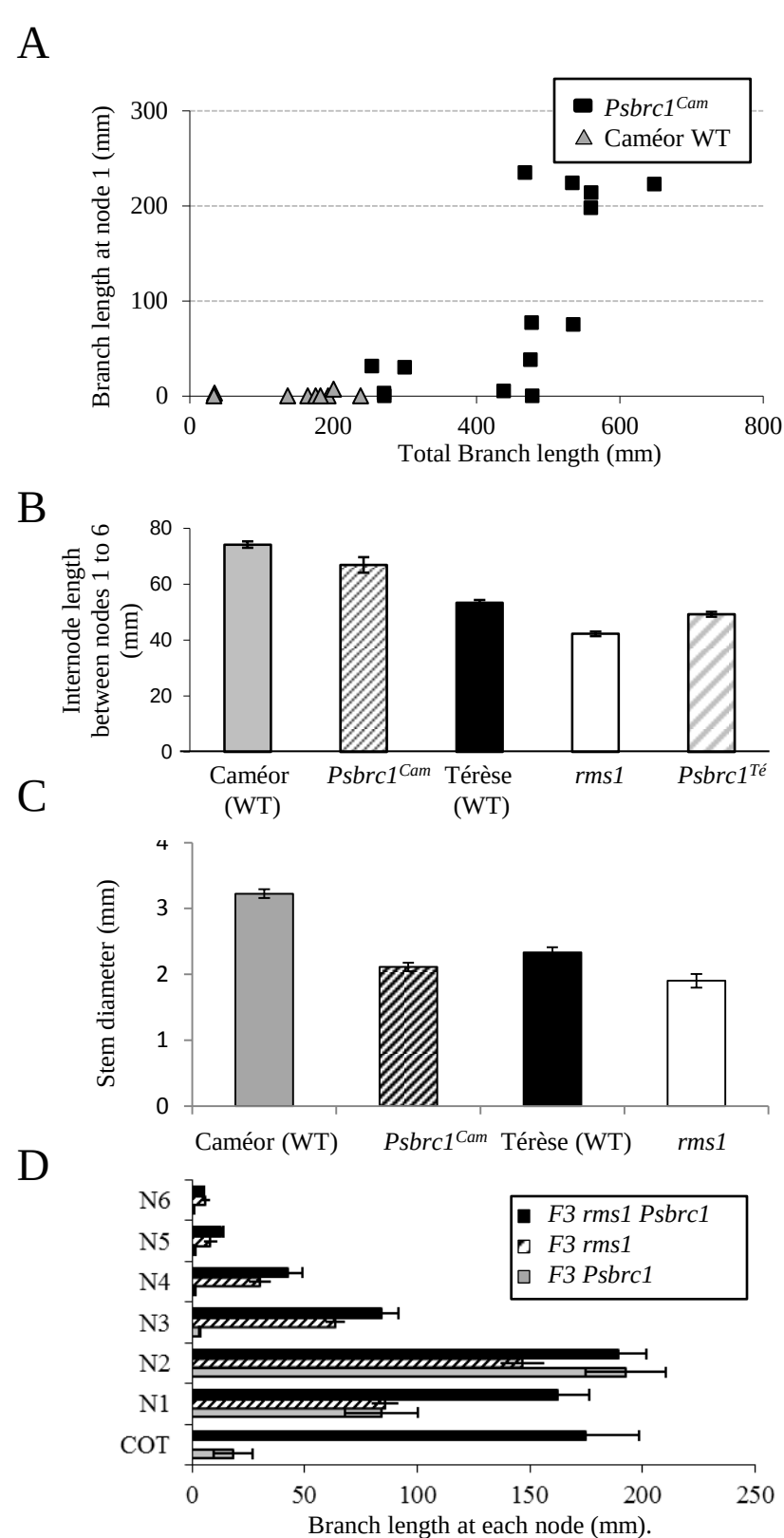


Figure S2. Comparison of branching mutants plant architecture. **A**, Comparison of branching mutants' plant architecture. A, Branching at node 1 plotted against Total lateral branch length for homozygote *Psbrc1* mutant and WT segregants from a BC2-F2 (4654 x Caméor) population; **B**, Comparison of internode length between nodes 1 to 6 of WT Caméor, *Psbrc1^{Cam}*, WT Térèse, *rms1* (M3T-884) and *Psbrc1^{Té}*. Data are means $\pm$ SE (n= 12). **C**, Stem diameter at node 3 of WT Caméor, *Psbrc1^{Cam}*, WT Térèse, *rms1* (M3T-884) plants. Data are means $\pm$ SE (n= 12). **D**, Branching phenotype of different F3 families from the cross (M3T-884 x (Térèse x *Psbrc1^{Cam}*)); 8 individuals per family; means for 6 *Psbrc1* families, 5 *rms1* families and 6 *rms1 Psbrc1* families.

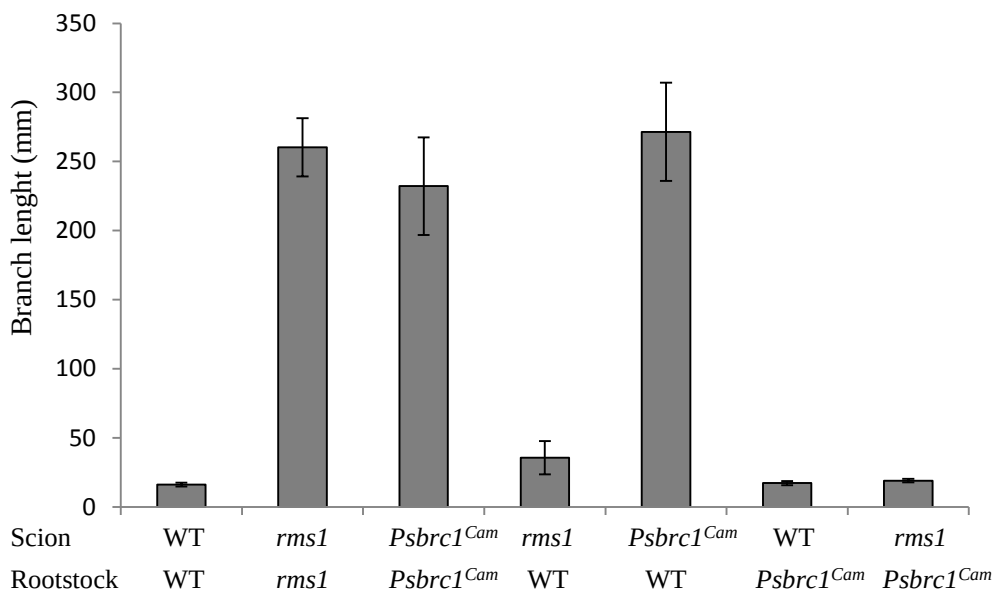


Figure S3. Grafting experiment showing that *PsBRC1* acts in the shoot and that the *Psbrc1^{Cam}* mutant is not strigolactone deficient. Different combinations of grafts between scion and rootstock of 7d-old plants of WT Caméor, *rms1* (M3T-884), and *Psbrc1^{Cam}* as indicated below. Total branch lengths from nodes 1 to 6 were measured 39 days after grafting. Data are means +/- SE (n= 12).

III. Article : Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control : Plant Physiology 2012 Jan;158(1):487-98.

Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA.

Résumé :

Les Cytokinines (CK) ont depuis longtemps été caractérisées en tant que promoteur de la levée de dormance des bourgeons axillaires chez les plantes, mais le mode d'action de cette hormone et son interaction avec les autres hormones végétales n'était pas clair. La découverte récente des strigolactones (SL), inhibiteur de la ramification recherché depuis très longtemps, nous a permis de déterminer comment les CK et les SL coordonnaient la levée de dormance des bourgeons axillaires chez le pois (*Pisum sativum*). Nous avons constaté que les plantes déficientes en SL étaient plus sensibles à la stimulation de la croissance des bourgeons à de faibles concentrations de CK appliquées localement que les plantes de type sauvage. Contrairement aux plantes mutantes, les bourgeons de plantes de type sauvage sont presque totalement résistants à la stimulation par les CK appliqués par le système vasculaire. Indépendamment du fait que les hormones ont été fournies localement ou dans le flux xylémien, les SL et les CK agissent de façon antagoniste sur la levée de dormance des bourgeons. Ces données suggèrent que les SL n'affectent pas l'export des CK dans les bourgeons axillaires et vice-versa. Au contraire, ces données combinées avec des expériences de dose-réponse suggèrent que les SL et les CK peuvent agir directement dans la levée de dormance des bourgeons. Ces hormones peuvent converger en un même point dans la voie de signalisation de la levée de dormance des bourgeons. L'expression du gène *BRANCHED1* de pois, un facteur de transcription de type TCP exprimé fortement dans les bourgeons et qui agit en aval des SL dans la ramification, est contrôlée par les CK et les SL sans que la synthèse de protéine soit nécessaire et de manière proportionnelle à la croissance des bourgeons.

Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control^{1[W]}

Elizabeth A. Dun, Alexandre de Saint Germain, Catherine Rameau, and Christine A. Beveridge*

University of Queensland, School of Biological Sciences, St Lucia, Queensland, 4072 Australia (E.A.D., C.A.B.); and Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA UMR1318 INRA-AgroParisTech, F-78000 Versailles, France (A.d.S.G., C.R.)

Cytokinin (CK) has long been implicated as a promoter of bud outgrowth in plants, but exactly how this is achieved in coordination with other plant hormones is unclear. The recent discovery of strigolactones (SLs) as the long-sought branch-inhibiting hormone allowed us to test how CK and SL coordinately regulate bud outgrowth in pea (*Pisum sativum*). We found that SL-deficient plants are more sensitive to stimulation of bud growth by low concentrations of locally applied CK than wild-type plants. Furthermore, in contrast with SL mutant plants, buds of wild-type plants are almost completely resistant to stimulation by CK supplied to the vasculature. Regardless of whether the exogenous hormones were supplied locally or to the xylem stream, SL and CK acted antagonistically on bud outgrowth. These data suggest that SLs do not affect the delivery of CK to axillary buds and vice versa. Rather, these data combined with dose-response experiments suggest that SLs and CK can act directly in buds to control their outgrowth. These hormones may converge at a common point in the bud outgrowth regulatory pathway. The expression of pea *BRANCHED1*, a TCP transcription factor expressed strongly in buds and thought to act downstream of SLs in shoot branching, is regulated by CK and SL without a requirement for protein synthesis and in a manner that correlates with observed bud growth responses.

Shoot branching is a major determinant of plant shoot architecture. Many factors contribute to the ability of an axillary bud to grow out to form a branch, including developmental, positional, genetic, hormonal, and environmental factors. Auxin, cytokinin (CK), and strigolactones (SLs) are implicated in the hormonal regulation of bud outgrowth; auxin and SLs as inhibitors of bud outgrowth and CK as a promoter of bud outgrowth (Dun et al., 2009a; Leyser, 2009; Beveridge and Kyozuka, 2010). Many studies over a number of decades have investigated the antagonistic action of auxin and CK in bud outgrowth control (Shimizu-Sato et al., 2009) and, more recently, the relationships between auxin and SL (Brewer et al., 2009; Crawford et al., 2010; Liang et al., 2010), but how SL and CK integrate to antagonistically control bud outgrowth remains unclear.

Prior to their identification as hormones involved in shoot branching, certain properties of SLs were characterized based on studies of the long-distance branch-inhibiting signal in a series of increased branching

mutants. These mutants include *ramosus* (*rms*) in pea (*Pisum sativum*), *more axillary growth* (*max*) in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), *decreased apical dominance* (*dad*) in *Petunia hybrida*, and *dwarf* (*d*) and *high tillering dwarf* (*htd*) in rice (*Oryza sativa*; for review, see Dun et al., 2009a; Beveridge and Kyozuka, 2010; Domagalska and Leyser, 2011). Grafting studies demonstrated that the branch-inhibiting signal can be synthesized in root or shoot tissue, moves upward to inhibit bud outgrowth, and that a subset of the branching mutants are unable to synthesize the signal (now named SL synthesis mutants; *rms1/max4/dad1*, *rms5/max3/dad3*, *max1*), while others are unable to respond to it (SL-insensitive mutants; *rms4/max2*, *rms3*, *dad2*; Beveridge et al., 1996, 1997b; Napoli, 1996; Morris et al., 2001; Turnbull et al., 2002; Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2005; Simons et al., 2007). These studies also indicated that the branch-inhibiting signal or its precursor(s) may be translocated over long distances and may act locally in, or near, axillary buds. These characteristics hold true for SLs; treatment of SL in hydroponics, growth medium, or supply of SL to the stem or bud can inhibit bud outgrowth in the SL synthesis mutants but not in the SL-insensitive mutants (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Dun et al., 2009b).

The SL biosynthesis pathway is gradually being pieced together. SLs are derived from the carotenoid pathway; a carotenoid precursor (likely β -carotene) is sequentially cleaved by CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7 (CCD7) and CCD8, encoded by *RMS5/MAX3/DAD3/HTD1/D17* and *RMS1/MAX4/*

¹ This work was supported by the Australian Research Council and a Dufresnoy grant from the French Academy of Agriculture.

* Corresponding author; e-mail c.beveridge@uq.edu.au.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Christine A. Beveridge (c.beveridge@uq.edu.au).

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.186783

DAD1/D10, respectively (Xie et al., 2010). D27 is a novel iron-containing protein that likely acts in the plastid after CCD7 and CCD8 (Lin et al., 2009). Grafting studies indicate that *MAX1*, encoding a cytochrome P450, then acts on a mobile intermediate (Booker et al., 2005). *D14* (encoding an α/β -fold hydrolase) and *RMS4/MAX2/D3* (encoding an F-box protein) may function downstream of SL synthesis and are required for response to SLs (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006; Arite et al., 2009; Gao et al., 2009; Liu et al., 2009).

Auxin originating from the shoot tip has long been known to repress the outgrowth of axillary buds located at nodes below (Thimann and Skoog, 1933, 1934). However, since auxin moves strictly downward in the polar auxin transport stream and does not enter the axillary buds that it inhibits, second messengers for auxin were proposed (for review, see Dun et al., 2009a; Leyser, 2009). Prior to studies with the SL increased-branching mutants, CK was a candidate antagonistic second messenger for auxin (for review, see Cline, 1991). Evidence for this includes that auxin negatively regulates the expression of CK biosynthesis genes (*Adenosine Phosphate-Isopentyltransferase* [*IPT*] genes) and positively regulates the expression of CK metabolism genes (Nordström et al., 2004; Tanaka et al., 2006; Werner et al., 2006; Shimizu-Sato et al., 2009). Additionally, removal of auxin via decapitation of the shoot tip leads to increased CK levels, which are restored by auxin treatment (Bangerth, 1994; Shimizu-Sato et al., 2009).

Prior to the discovery of SL as a branching hormone, decapitation studies with the *rms* increased-branching mutants demonstrated that the branch-inhibiting signal is required for indole-3-acetic acid (IAA; an auxin) inhibition of decapitation-induced branching (Beveridge et al., 2000) and that auxin positively regulates the expression of the branching inhibitor biosynthesis genes (*RMS1* and *RMS5*; Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006). These findings are corroborated by gene expression studies in rice and Arabidopsis (Zou et al., 2006; Arite et al., 2007; Hayward et al., 2009) and indicate that SL may act as a second messenger for auxin. Indeed, SL treatment to axillary buds of decapitated pea plants prevents decapitation-induced outgrowth of the treated bud without the need for an apical auxin source (Brewer et al., 2009). However, IAA treatment to the apical end of Arabidopsis or chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) isolated nodal segments appears necessary for bud growth repression by basal supply of SL (Crawford et al., 2010; Liang et al., 2010). The reason for these differences in response to SL in different experimental situations is unclear. The contribution of differing CK levels to these results remains to be considered; the effectiveness of SL treatments may depend on relative CK content.

CK was implicated in shoot-branching control when exogenous applications of CKs to axillary buds were shown to stimulate their outgrowth

(Sachs and Thimann, 1967). While it is likely that the regulation of local CK biosynthesis may be an important regulator of bud outgrowth (Böhner and Gatz, 2001; Tanaka et al., 2006; Ferguson and Beveridge, 2009; Shimizu-Sato et al., 2009), the exact roles of local versus long-distance CK in the modulation of bud outgrowth remain unclear. Some studies suggest that only local CK promotes bud outgrowth (Faiss et al., 1997), whereas for *rms* SL mutants, we recently proposed that xylem sap CK promotes sustained branch growth rather than functioning in bud release (Dun et al., 2009b). This hypothesis would account for earlier work that showed no branching promotion in wild-type shoots with an intact shoot tip in response to enhanced xylem sap CK (Faiss et al., 1997). In pea, buds that are released from inhibition by SLs grow longer in the presence of elevated xylem sap CK levels (Dun et al., 2009b). The growth of activated wild-type Arabidopsis buds on isolated nodal segments in split-plate assays is accelerated by basal treatment with 6-benzylaminopurine (BA; synthetic CK) to the medium (Chatfield et al., 2000). Consequently, our hypothesis is that xylem sap CK may stimulate the continued outgrowth of fully or partially released buds, whereas local CK enhancement can stimulate initial bud release.

SLs might affect CKs in the plant; pea and Arabidopsis SL increased-branching mutants have depleted levels of CK in the xylem sap relative to wild-type plants due to long-distance feedback regulation operating in the SL branching pathway (Beveridge et al., 1997a, 1997b; Morris et al., 2001; Foo et al., 2007). However, CK levels in the shoot of pea and Arabidopsis SL mutants are no different from those in the wild type (Foo et al., 2007). CK might also affect SL biosynthesis; *MAX4* promoter::*GUS* reporter studies in Arabidopsis suggest that CK can prevent auxin-induced up-regulation of *MAX4* SL biosynthesis gene expression in root tissue (Bainbridge et al., 2005).

TEOSINTE BRANCHED1 (*TB1*) in monocots and its homolog *BRANCHED1* (*BRC1*) in Arabidopsis and pea encodes a TCP (for TB1, CYCLOIDEA, and PCF domain) transcription factor that is expressed specifically in nongrowing inhibited axillary buds; *tb1* and *brc1* mutants have increased bud outgrowth phenotypes (Doebley et al., 1997; Takeda et al., 2003; Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Braun et al., 2011). The TCP family of transcription factors is implicated in many different plant development and morphogenic processes (Doebley et al., 1997; Nath et al., 2003; Aguilar-Martínez et al., 2007; Schommer et al., 2008; Tatematsu et al., 2008; Pruneda-Paz et al., 2009). Several TCP family members control cell proliferation through regulation of the cell cycle, but few TCP targets have been identified (for review, see Martín-Trillo and Cubas, 2010). Being bud-specific genes necessary for the inhibition of outgrowth, *TB1* and *BRC1* are good candidates for functioning downstream of SLs, potentially functioning as integrators of

different hormonal and environmental regulatory factors.

TB1 and *BRC1* action downstream of SLs is supported by (1) the lack of bud outgrowth inhibition by SL treatment in the Arabidopsis and pea *brc1* mutants (Brewer et al., 2009; Braun et al., 2011) and the rice *Ostb1* mutant (Minakuchi et al., 2010); (2) reduced expression of *PsBRC1* and *AtBRC1* in SL mutant buds (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Braun et al., 2011); and (3) the promotion of *PsBRC1* expression by SL treatment in pea (Braun et al., 2011). However, in rice, no reduction in *Ostb1* expression was observed in the SL mutant buds tested, and *Ostb1* expression was not affected by SL treatment (Minakuchi et al., 2010). In pea and rice, *PsBRC1* and *Ostb1* expression is repressed by CK treatment (Minakuchi et al., 2010; Braun et al., 2011). This repression is unlikely to require SLs, as the CK response of *PsBRC1* and *Ostb1* is RMS4/D3 independent.

Exactly how SLs integrate with local and long-distance CKs to antagonistically control bud outgrowth is unclear, and the extent of their antagonism in bud outgrowth assays is untested. In this paper, we elucidate how local and long-distance xylem sap CK integrates with SLs to regulate bud outgrowth and examine the effect of these competing hormones on the expression of *PsBRC1*, supporting a model for SL and CK action at the bud via *PsBRC1*.

RESULTS

SL-Deficient *rms1* Buds Are More Sensitive to CK Supplied to the Vasculature Than Are Wild-Type Buds

Our previous study showed that wild-type buds are less sensitive than SL-insensitive *rms4* buds to CK supplied to the vasculature (Dun et al., 2009b). To examine the degree of this CK insensitivity of wild-type buds and to compare responses to xylem-delivered and locally supplied CKs, we performed dose-response experiments where increasing concentrations of the synthetic CK BA were supplied to the vasculature or directly to the bud of wild-type and SL mutant plants. We utilized growth conditions and a genetic background that enabled us to select a node, node 3, where the bud does not normally grow into a branch in SL mutant or wild-type pea plants.

Vascular supply of increasing doses of BA caused little increase in wild-type bud length over 7 d at node 3, the first node above the site of supply. Fifty and 500 μM BA caused a similarly small but significant increase in bud length, whereas 0.05, 0.5, and 5 μM BA caused no significant effect on bud growth (Fig. 1A). When applied directly to wild-type buds, 50 μM BA was the lowest concentration tested that stimulated growth, and this was enhanced at 500 μM BA (Fig. 1B). *rms1* SL-deficient buds showed a greater outgrowth response to vascular supply of BA than wild-type buds, both in the magnitude of the growth response and in the

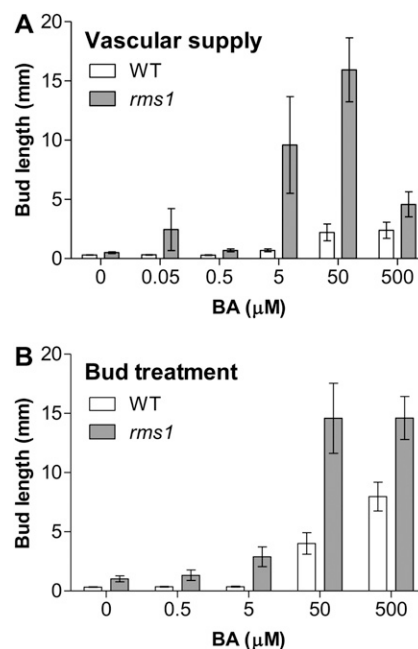


Figure 1. SL-deficient plants are more responsive to CK than wild-type (WT) plants. The synthetic CK, BA, was supplied to the stem vascular stream below node 3 (A) or applied directly to the bud at node 3 (B) of 9-d-old wild-type and *rms1-2* (Torsdag) pea plants. Bud length at node 3 was measured 7 d after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 7$ –12).

sensitivity to the concentration of BA supplied (Fig. 1A). In response to vascular supply of 5 μM BA, *rms1* buds grew to a length about four times greater than that of 50 or 500 μM BA-treated wild-type buds. In response to BA applied directly, we also found that *rms1* buds responded with longer bud lengths and at lower doses than did wild-type buds (Fig. 1B). Again, *rms1* buds showed a significant growth response to direct treatment of 5 μM BA (Fig. 1B; $P < 0.01$), whereas 50 μM BA was required for this response in the wild type.

It must be noted that vascular supply of 500 μM BA, while increasing bud lengths, appeared to be toxic to the plant, causing stem thickening and a 63% and 67% reduction in overall plant height in the wild type and *rms1*, respectively, in the 7 d since treatment (data not shown). Since this highest tested dose of BA supplied to the vasculature appeared toxic and yet resulted in little outgrowth, we conclude that wild-type buds are somewhat resistant to the stimulatory effect of BA supplied to the vasculature. Additionally, although wild-type buds respond better to locally applied BA than to that supplied to the vasculature at a distance (Fig. 1), wild-type buds appeared less responsive to the stimulatory effect of BA when applied directly to the bud compared with *rms1* SL mutant buds. Therefore, we conclude that SL deficiency alleviates resistance to BA supplied locally or at a distance.

To confirm that the lack of wild-type bud response to the vascular supply of CK is not specific to the synthetic CK, BA, we compared the effect of vascular

supply of the predominant endogenous CK in pea xylem sap, trans-zeatin riboside (tZR; Beveridge et al., 1997a), with that of BA. As expected, wild-type buds were resistant to the vascular supply of both tZR and BA, while *rms1* SL-deficient buds exhibited growth responses to both forms of CK (Supplemental Fig. S1A). The highest tested dose of BA and tZR again appeared toxic to the plants, with 1,000 μM BA causing 46% and 50% reductions, and tZR causing 26% and 46% reductions, in wild-type and *rms1* plant height, respectively, in the 7 d since treatment (Supplemental Fig. S1B). As the genotypic differences were maintained between BA and tZR responses, all further experiments were conducted with BA.

SL Reduces the CK Promotion of Bud Growth

Since SL deficiency appears to lead to increased CK responses, particularly when the CK treatment method is vascular supply, the ability of the synthetic SL, GR24, to reduce CK bud growth responses was examined. Vascular supply of GR24 in combination with BA reduced the BA-induced bud growth of SL-deficient *rms1* plants, but not that of SL-insensitive *rms4* plants, at the node above vascular supply (Fig. 2A). This indicates that GR24 reduces the CK response through the RMS4 SL response pathway. As found in Figure 1 and Supplemental Figure S1A, vascular supply of BA caused little bud growth in wild-type plants; however, vascular supply of GR24 did not prevent this tiny amount of bud growth (Fig. 2A). This indicates that the buds of wild-type plants treated through the vasculature with BA are not responding in the same

way as other buds, including wild-type buds treated directly with BA. Instead, the relatively small effect of vascular supply of CK in the wild type may not have been genuine bud growth.

In contrast to Figure 1B, where *rms1* SL-deficient buds showed a greater response than wild-type buds to direct treatment with BA, particularly at lower doses, on this occasion we found that wild-type and *rms1* buds responded equally well to direct treatment with a high (50 μM) dose of BA (Fig. 2B). When applied directly to wild-type and *rms1* buds, GR24 in combination with BA significantly reduced the BA-induced bud growth (Fig. 2B; $P < 0.01$). Again, as expected, bud growth in SL-insensitive *rms4* plants treated with or without BA showed no inhibition by GR24 treatment. Therefore, it appears that RMS4-dependent SL signaling and CK act antagonistically to regulate bud growth.

To determine if the apparent antagonistic relationship between SL and CK in the control of bud growth functions in the classical dose-dependent manner expected of hormone signaling, dose-response experiments were performed. We used *rms1* SL-deficient plants for these experiments because their buds show a growth response to vascular supply of BA and to GR24 (Gomez-Roldan et al., 2008). We again utilized the bud at node 3 that does not grow into a branch under our growth conditions unless stimulated to do so. Accordingly, in contrast to Gomez-Roldan et al. (2008), where a bud that would normally grow into a branch was examined, increasing doses of GR24 in the absence of BA had only a minor effect on *rms1* node 3 bud length (Fig. 3A). Increasing concentrations of GR24 resulted in a dose-dependent reduction of BA-induced bud growth (Fig. 3A). Likewise, increasing concentrations of BA supplied to the vasculature decreased the bud-inhibiting effectiveness of GR24 (Fig. 3B). Therefore, it appears that GR24 and BA act antagonistically in a dose-dependent manner on bud growth when both are supplied to the vasculature.

Since buds of wild-type plants (which have endogenous SLs) did not respond much to the vascular supply of BA in comparison with buds of SL-deficient or -insensitive mutant plants, and vascular supply of the synthetic SL, GR24, reduced BA-induced bud growth in SL-deficient plants, we hypothesized that systemic SLs might influence the delivery of CKs, including BA, to axillary buds. We also considered that the converse hypothesis may be true: CKs, including BA, might affect the delivery of SLs, including GR24, to axillary buds. To test these hypotheses, we determined (1) if vascular supply of GR24 could reduce BA-induced outgrowth when BA was applied directly to the axillary bud and (2) if GR24 applied directly to the axillary bud could reduce BA-induced growth when BA was supplied to the vasculature. If either hormone acts by preventing the delivery of the other from the bud to the stem, it would be expected that in order to do so, it would need to function in the stem and not solely in the bud itself. These experiments were con-

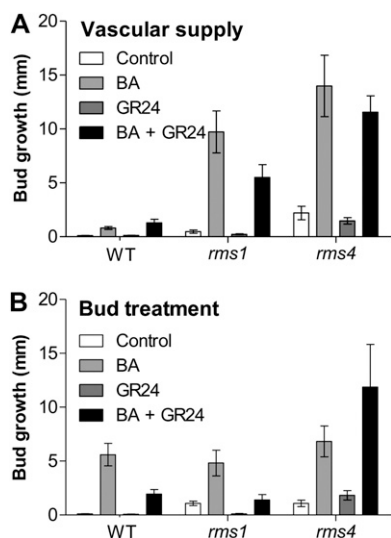


Figure 2. SL reduces the stimulatory effect of BA on bud outgrowth in an RMS4-dependent manner. The synthetic SL, GR24 (1 μM), and/or BA (50 μM) were supplied to the vasculature below node 3 (A) or applied directly to the bud at node 3 (B) of 10-d-old wild-type (WT), *rms1-2*, or *rms4-1* (Torsdag) pea plants. Bud growth at node 3 was measured 7 d after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 7-12$).

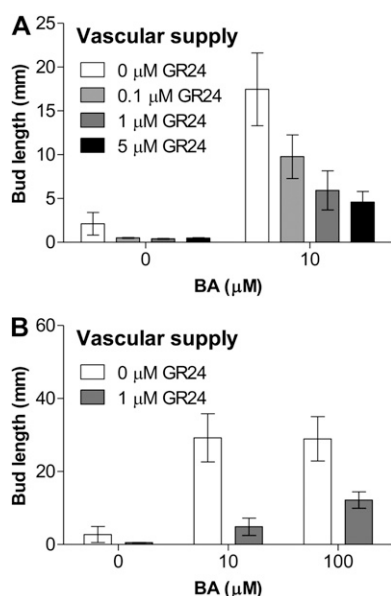


Figure 3. SL reduces the stimulatory effect of CK on bud outgrowth in SL-deficient plants in a dose-dependent manner. GR24 and/or BA were supplied to the vasculature below node 3 of 9-d-old (A) and 10-d-old (B) *rms1-2* (Torsdag) pea plants. Bud length at node 3 was measured 7 d after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 14$ [A] and 9–12 [B]).

ducted using the *rms1* SL-deficient mutant, so that the exogenously supplied GR24 would be the only SL available to the plant. We were not able, however, to create the converse situation, where the exogenously supplied BA was the only CK available.

We found that GR24 supplied to the vasculature significantly reduced bud growth stimulated by BA application to the bud (Fig. 4A; $P < 0.01$) and that GR24 applied to the bud was effective at inhibiting growth induced by the vascular supply of BA (Fig. 4B; $P < 0.01$). While it is possible that the vascular supply of GR24 limited the endogenous supply of CK to the bud, this does not account for the significant reduction in BA-induced growth observed after vascular supply of GR24 (Fig. 4A). It is unlikely, therefore, that SLs act primarily to inhibit bud outgrowth by affecting CK delivery to buds. Similarly, it is unlikely that CKs promote bud outgrowth by affecting SL delivery to buds.

SL and CK Act Antagonistically on the Same Gene Target, *PsBRC1*

The physiological data presented here (Figs. 1–4; Supplemental Fig. S1A) support the notion that SL and CK act antagonistically on bud outgrowth control, potentially acting on a common target, possibly at the bud. It was recently reported that the expression of the TCP transcription factor already implicated in bud outgrowth control, *PsBRC1*, is up-regulated by GR24 and down-regulated by BA in pea axillary buds (Braun et al., 2011). Here, we show that the expression

of *PsBRC1* in buds treated with BA, GR24, or BA and GR24 (Fig. 5) is negatively correlated with bud growth (Fig. 2B). As seen in Braun et al. (2011), the expression of *PsBRC1* was decreased in SL mutant buds compared with wild-type buds, addition of BA reduced the expression of *PsBRC1* in buds of wild-type and SL mutant plants, and addition of GR24 increased the expression of *PsBRC1* in buds in an *RMS4*-dependent manner (Fig. 5). Combined treatment of BA and GR24 resulted in an intermediate level of *PsBRC1* expression in wild-type and *rms1* buds (Fig. 5), which correlates nicely with the intermediate growth responses observed for this treatment combination (Fig. 2B). These data support the premise that SLs and CK act antagonistically on bud outgrowth control by regulating the expression of *PsBRC1* in axillary buds.

To determine if BA or GR24 regulates *PsBRC1* expression directly without the need for de novo protein synthesis, we tested the ability of BA or GR24 to regulate the expression of *PsBRC1* in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX; Koshiba et al., 1995; Arite et al., 2007). Treatment of wild-type and *rms1* SL-deficient buds with CHX alone caused 77% and 69% increases, respectively, in *PsBRC1* transcript abundance (Fig. 6), indicating that the transcription of *PsBRC1* is normally repressed, or that the *PsBRC1* transcript is normally destabilized, by a rapidly turned over protein. The reduction of protein synthesis by CHX treatment did not prevent BA from

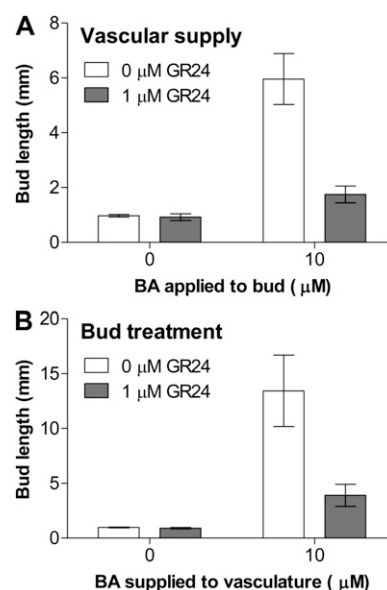


Figure 4. SL reduces CK-induced outgrowth whether supplied locally or to the vasculature of SL-deficient plants. A, Zero or 1 μM GR24 was supplied to the vasculature below node 3, while 0 or 10 μM BA was supplied directly to the bud at node 3, of 10-d-old *rms1-2* (Torsdag) pea plants. B, Zero or 1 μM GR24 was supplied to the bud at node 3, while 0 or 10 μM BA was supplied to the vasculature below node 3, of 10-d-old *rms1-2* (Torsdag) pea plants. Bud length at node 3 was measured 7 d after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 14$).

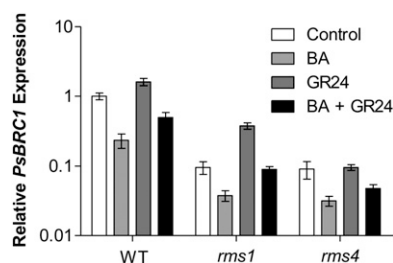


Figure 5. SL and CK act antagonistically on the same target gene, *PsBRC1*. The bud at node 3 of 8-d-old wild-type (WT), *rms1-2*, or *rms4-1* (Torsdag) pea plants was treated for 6 h with or without GR24 (1 μ M) and/or BA (50 μ M). Expression of *PsBRC1* in the bud at node 3 is represented relative to the wild-type control; *EF1 α* was used as the internal reference gene. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 30 plants).

reducing the expression of *PsBRC1* (Fig. 6A), indicating that the synthesis of a rapidly turned over protein is not required for BA to exert its effect. Likewise, CHX treatment did not prevent the synthetic SL, GR24, from increasing the expression of *PsBRC1* (Fig. 6B). These data suggest that CK and SL may interact quite closely with *PsBRC1* or with stable proteins that, in turn, interact directly with *PsBRC1* to control bud outgrowth in pea.

Physiological experiments show that although buds of wild-type plants are somewhat resistant to stimulation by CK supplied to the vasculature relative to buds of SL mutants, they do exhibit a small increase in length in response to CK supplied to the vasculature (Figs. 1A and 2A; Supplemental Fig. S1A). To determine if this small increase in bud length or lack of sustained bud growth in the wild type is due to *PsBRC1* not being regulated by vascularly derived BA, *PsBRC1* expression was examined in wild-type buds 24 h after BA treatment either directly to the bud or to the vasculature (Fig. 7). Supplying BA to the vasculature or to the buds directly caused comparable reductions in the expression of *PsBRC1* in the bud (Fig. 7). Markers for bud dormancy, *PsDRM1*, *PsDRM2* (Stafstrom et al., 1998), and *PsAD1* (Madoka and Mori, 2000), also showed similar responses to BA, whether supplied directly to the bud or to the vascular stream. Within the same 24-h time frame, comparable buds treated with BA, directly or supplied to the vasculature, showed the same increase in bud length. However, as found previously (Figs. 1A and 2A; Supplemental Fig. S1A), wild-type buds did not show continued growth when BA was supplied to the vasculature compared with direct treatment (data not shown). These data suggest that the difference in the longer term growth response between wild-type buds treated directly with BA and those treated from a distance is not due to a failure to initiate molecular responses in the bud. They also suggest that CK supplied to the vasculature does indeed make it to the bud and that the small increase in wild-type bud size after BA is supplied to the vasculature (Figs. 1A and 2A; Supplemental Fig. S1A) is genuine growth.

CK Biosynthesis Genes Are Up-Regulated in SL Mutants

SL-deficient and response mutants in pea (and other species) have depleted CK levels in the xylem sap derived from the roots (Beveridge et al., 1997a, 1997b, 2009; Foo et al., 2007; Waldie et al., 2010) yet normal levels of CKs in shoot tissue (Foo et al., 2007). To examine the possibility that SLs might regulate bud outgrowth by affecting the expression of CK biosynthesis genes, *PsIPT1* and *PsIPT2* expression was observed in tissue containing internode and node 3 (including bud) from wild-type, *rms1* SL-deficient mutant, and *rms4* SL response mutant plants (Fig. 8). Interestingly, the expression of *PsIPT1*, but not *PsIPT2*, was increased in *rms1* and *rms4* SL mutants compared with wild-type plants, consistent with the possibility that SLs negatively regulate the expression of CK biosynthesis genes in the shoot.

CK Biosynthesis Genes Are Not Affected by GR24 in Wild-Type Isolated Segments

To determine if the increase in *PsIPT1* CK biosynthesis gene expression observed in the pea SL mutants (Fig. 8) is directly due to the loss of SL response, we tested if GR24 can regulate the expression of *PsIPT1* or *PsIPT2* within a short time frame by incubating isolated segments from internode 4 of young wild-type pea seedlings with or without 1 μ M GR24 and/or 10 μ M IAA for 4 h (Fig. 9). Auxin (IAA) was used as a control, as it is known to reduce the expression of *PsIPT1* and *PsIPT2* in intact, decapitated, and in vitro studies (Tanaka et al., 2006). As expected, the expression of *PsIPT1* and *PsIPT2*

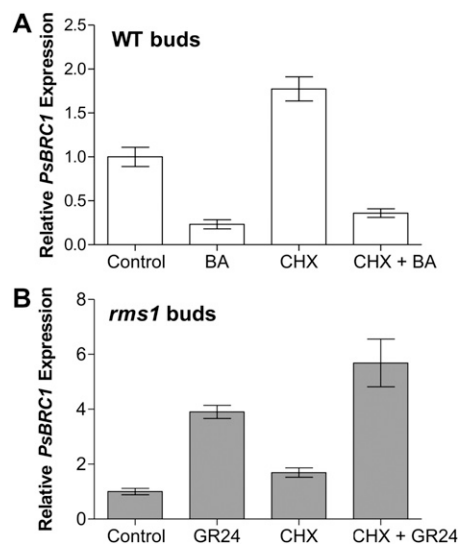


Figure 6. SL and CK regulate *PsBRC1* without the need for de novo protein synthesis. The bud at node 3 of 8-d-old wild-type (WT; A) and *rms1-2* (Torsdag; B) pea plants was treated for 6 h with or without GR24 (1 μ M), BA (50 μ M), and/or CHX (10 μ M). Expression of *PsBRC1* in the bud at node 3 is represented relative to controls; *EF1 α* was used as the internal reference gene. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 30 plants) and are from the same experiment as in Figure 5.

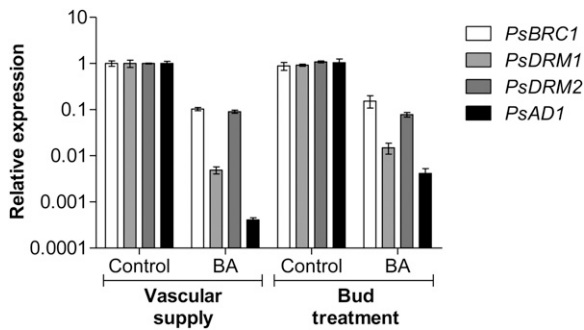


Figure 7. CK supplied locally or from a distance decreases the expression of *PsBRC1* and bud dormancy markers 24 h after treatment. Zero or 50 μM BA was supplied to the vasculature below node 3 or applied directly to the bud at node 3 of 9-d-old wild-type Torsdag pea plants. Expression of *PsBRC1*, *PsDRM1*, *PsDRM2*, and *PsAD1* in the bud at node 3 24 h after treatment is represented relative to the vascular supply control treatment; *EF1 α* was used as the internal reference gene. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 28–30 plants).

was increased in isolated segments incubated in control buffer compared with that observed in intact plants, as a segment has no apical source of auxin (Fig. 9). Incubation with IAA reduced the expression of *PsIPT1* and *PsIPT2* in segments relative to incubation with control solution, returning expression to levels similar to those observed in comparable intact plants. With or without IAA, the synthetic SL, GR24, had no effect within the 4-h time frame on the expression of *PsIPT1* or *PsIPT2*. Therefore, we conclude that any regulation of *PsIPT* expression by SL is either indirect (i.e. takes longer than 4 h) or is specific to node or bud tissues, which were not tested here.

DISCUSSION

SL Mutants Show an Increased Response to Local and Long-Distance Vascularly Supplied CK

By using buds on SL mutant plants that do not normally grow into a branch under certain conditions, we were able to directly compare the responses of wild-type and SL mutant plants to CK. SL mutant buds showed increased bud growth responses to CK (BA or tZR) treatments than wild-type buds when CK was supplied to the stem (Figs. 1A and 2; Supplemental Fig. S1A). At the node above the site of supply, wild-type buds showed a poor response to CK (BA and tZR) supplied to the vasculature, increasing to only a few millimeters in length. It is unlikely that higher concentrations of CK supplied to the stem would induce increased outgrowth of wild-type buds, as the highest tested concentrations of CK appeared toxic to the plant, leading to stem thickening and reduced overall plant height (Supplemental Fig. S1B). Wild-type buds, however, did grow in response to BA supplied locally to the bud (Figs. 1B and 2B), but SL mutant buds showed increased bud growth

responses at lower concentrations of applied BA (Fig. 1B).

The increased-branching phenotypes of CK-over-producing plants, for example *altered meristem program1* (Chaudhury et al., 1993), are likely due to increases in CK local to the bud. Other studies have found that long-distance supply of CK from rootstocks of CK-overproducing 35S-*ipt* transgenic lines is not able to increase branching in nontransgenic wild-type shoots (Faiss et al., 1997). This is consistent with our finding that wild-type buds show a poor response to vascularly supplied CK. However, our results with SL mutants show that CKs delivered in the vasculature over a long distance can enhance branching. The distinction between local and long-distance CK and the differences between wild-type and SL mutants in CK response need to be explored in the future. Our results here support the premise that long-distance CK requires buds to be released from SL inhibition in order to induce branch growth (Dun et al., 2009b).

It is unclear how buds distinguish between vascular and local supply of CK. It could be that vascular supply of CK to wild-type plants results in less delivery of CK to the bud compared with that in SL mutants, due to some indirect effect such as a difference in water supply to, or transpiration of, wild-type and mutant buds; indeed, nongrowing SL mutant buds were larger than corresponding nongrowing wild-type buds (see size of control-treated buds in Figs. 1 and 2 and Supplemental Fig. S1A). However, this suggestion is not supported by the dose-response experiment, where a 10-fold difference in vascular CK supply caused no enhancement of growth beyond the lowest dose that caused a small growth response (Fig. 1A). Alternatively, it could be that SL mutant buds are at a more responsive stage than wild-type buds due to a more direct consequence of reduced SL signaling (Dun et al., 2006). Grafting experiments in pea suggest that long-distance supply of CK in the xylem is only effective at inducing the branch growth of buds that are already released from inhibition by SL (Dun et al., 2009b).

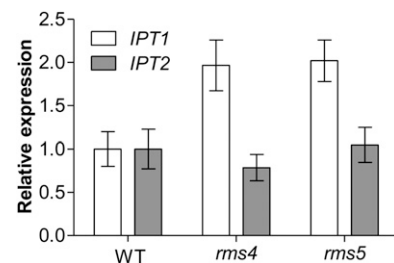


Figure 8. *PsIPT1* but not *PsIPT2* expression is increased in SL mutant stem tissue. Internode 3 and node 3 (including bud) were harvested from 12-d-old (four to five leaves expanded) wild-type (WT), *rms4-1*, and *rms5-3* (Torsdag) pea plants. Expression is represented relative to the wild type; *18S* was used as the internal reference gene. Data are means $\pm$ SE ($n = 7$ –8).

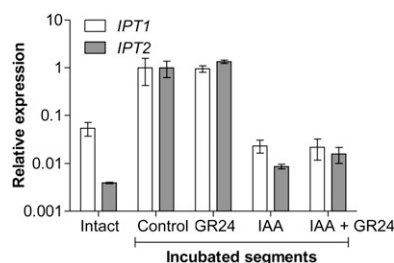


Figure 9. GR24 does not affect *PsIPT1* or *PsIPT2* expression in isolated wild-type stem tissue segments within 4 h. Twelve-millimeter segments from internode 4 of 12-d-old wild-type Torsdag pea plants were incubated for 4 h with 0 or 1 μM GR24 or with 0 or 10 μM IAA; equivalent internode tissue was also harvested from intact plants as another control (Intact). Expression is represented relative to the incubated segment control; *T8S* was used as the internal reference gene. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of seven plants).

Interactions between SL and CK Occur at the Bud

Using physiological approaches, we show that GR24 and BA do not affect each other's delivery to the shoot to control bud outgrowth (Fig. 4). When BA was supplied to the vasculature, GR24 was effective at reducing BA-induced bud growth whether supplied to the vasculature or to the bud (Figs. 2A, 3, and 4). Similarly, when the bud was treated directly with BA, GR24 reduced the BA-induced bud growth whether supplied to the vasculature or to the bud (Figs. 2B and 4). These results suggest that the presence of SL in the main stem transport pathway is not integral to its function; SL can function at the bud to inhibit CK-induced bud outgrowth. This is consistent with the idea that *PsBRC1* expression in axillary buds is a target of SL and CK to achieve bud outgrowth regulation.

There is evidence to suggest that SLs might affect CK levels. SL-deficient and response mutants in pea and Arabidopsis have decreased levels of CK in the xylem sap derived from the roots (Beveridge et al., 1997a, 1997b, 2009; Foo et al., 2007; Waldie et al., 2010). However, levels of CK are normal in shoot tissue of pea and Arabidopsis SL mutants (Foo et al., 2007). This differs from rice *D10*-RNA interference (RNAi) plant lines (presumed SL deficient) that had increased levels of CK in nodal tissue adjacent to branches that grew longer in *D10*-RNAi plants than in the wild type (Zhang et al., 2010). However, *IPT8* was the only CK biosynthesis gene tested to be elevated in expression in the rice *D10*-RNAi plant lines in comparison with wild-type controls at a node where the branches grew (Zhang et al., 2010). Here, we show that despite normal levels of CK in the shoot tissue (Foo et al., 2007), the expression of *PsIPT1*, but not *PsIPT2*, is elevated in SL mutants (Fig. 8). This increased *PsIPT1* gene expression could correspond to increased CK biosynthesis in the shoot, perhaps as a mechanism to compensate for the reduced contribution of CK from the roots of SL mutants. Indeed, pea SL mutants have normal levels of CK in the shoot. However, the in-

creased expression of *PsIPT1* is likely a long-term consequence of SL deficiency/insensitivity rather than a direct effect, as GR24 had no effect of *PsIPT1* expression within 4 h in an isolated stem segment assay (Fig. 9). It must be noted that the effect of GR24 on *PsIPT1* expression was only tested in an in vitro system using wild-type segments, which should be SL deficient prior to GR24 treatment, due to the removal of the apical supply of auxin (Foo et al., 2005), and which may behave differently to intact plants (Dun et al., 2006). Nevertheless, even in auxin-treated segments, where *PsIPT* gene expression was restored to near intact levels, no effect of GR24 on *PsIPT* gene expression was observed.

Although not tested here, it is also possible that CK might affect SL biosynthesis. Studies in Arabidopsis showed that BA can prevent the auxin-induced up-regulation of GUS activity in the root of *MAX4* promoter::*GUS* transgenic plants (Bainbridge et al., 2005). In any case, any effects of SL on CK levels or CK on SL levels are unlikely to be their primary function in bud outgrowth control. Rather, the physiological data indicate increased CK sensitivity in SL mutants, and as discussed below, that GR24 can decrease, and BA can increase, the expression of *PsBRC1* in the bud (Fig. 5).

PsBRC1 Is Regulated by SL and CK

Here, we show that the SL and CK bud outgrowth regulatory pathways function antagonistically, potentially converging on a common target transcription factor, *PsBRC1*, previously shown to function in bud outgrowth control at the bud. At the physiological level, we show that the antagonistic action of SL and CK can occur directly in buds and that an antagonistic interaction between these hormones does not, in itself, require the vascular stream transport pathway. At the molecular level, we show that this antagonism is likely achieved, at least in part, through the regulation of *PsBRC1* expression in the bud.

Several observations support the premise that *TB1* and *BRC1* play an important and integral role in bud outgrowth regulation, acting specifically at the axillary bud. Expression levels of *TB1*, a monocot homolog of *BRC1*, were previously demonstrated to underlie differences in branching between maize (*Zea mays mays*) and its ancient progenitor teosinte (*Zea mays parviglumis*; Doebley et al., 1997). Additionally, *tb1* and *brc1* mutants in various species have increased-branching phenotypes, and *TB1* and *BRC1* are expressed predominantly in axillary buds (Takeda et al., 2003; Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Minakuchi et al., 2010; Braun et al., 2011).

The expression of *TB1* and *BRC1* appears to be under close hormonal control. *BRC1* expression is reduced in buds of Arabidopsis and pea SL mutant plants (Fig. 5; Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Braun et al., 2011), and *BRC1* expression in pea is increased by exogenous treatment with the synthetic SL, GR24

(Figs. 5 and 6B; Braun et al., 2011). Additionally, where tested, treatments that promote bud outgrowth, such as decapitation, which affects the levels of several plant hormones, or CK treatment, decrease *TB1* or *BRC1* expression in rice, pea, and *Arabidopsis* (Figs. 5, 6A, and 7; Aguilar-Martínez et al., 2007; Minakuchi et al., 2010; Braun et al., 2011).

We have further dissected the integration of SL and CK signaling by *BRC1* by examining the effects of single and joint applications of these hormones on bud outgrowth and gene expression and by determining whether each hormone acts directly or indirectly in regulating *PsBRC1* expression. We found that the expression of *PsBRC1* in axillary buds of pea a short time (6 h) after direct treatment with BA and/or GR24 correlates with final bud outgrowth phenotypes, including the intermediate outgrowth response observed when the hormones are applied together (Figs. 2B and 5). This supports the premise that SL and CK regulate bud outgrowth via the regulation of this gene in the bud.

We also found that the expression of *PsBRC1* and bud dormancy markers in buds of wild-type plants treated with BA to the vasculature or bud correlates with the current bud growth status at the time of harvest (Fig. 7). However, further research is required to determine why buds of wild-type plants supplied with BA to the vasculature do not continue growth into a branch.

By treatment with the translation inhibitor CHX (Koshiba et al., 1995; Arite et al., 2007), we show that GR24 and BA regulation of *PsBRC1* expression does not require protein synthesis (Fig. 6B). This finding also indicates that SL and CK probably do not interact to regulate bud outgrowth by modulating the level or transport of one or the other hormone or some other hormone or process upstream of *PsBRC1*.

BRC1 Provides an Effective Control System in Buds

The integration of different hormonal signals by a single protein, *BRC1*, provides an effective control system for bud outgrowth. We propose that SL mutant buds show increased response to CK due to their already decreased expression of *PsBRC1* (Fig. 5). This decreased expression of *PsBRC1* relative to the wild type would essentially prime the bud for an enhanced response to CK while not yet being sufficient to fully induce a bud outgrowth response. Indeed, the “non-growing” SL mutant buds used in this study were slightly larger than the corresponding wild-type buds (Figs. 1 and 2; Supplemental Fig. S1). Therefore, we expect that there is a certain level or threshold below which *PsBRC1* expression must drop before bud outgrowth ensues. This would in part enable the quantitative integration of multiple factors, hormonal, developmental, and environmental, that affect bud outgrowth (Kebrom et al., 2006, 2010; Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Minakuchi et al., 2010; Braun et al., 2011).

Exactly how *BRC1* and *TB1* function as integrators of many signals controlling bud outgrowth is not yet understood. Being members of the TCP protein family, *BRC1* and *TB1* possess a basic helix-loop-helix motif that facilitates DNA binding and likely function as transcriptional activators or repressors (for review, see Martín-Trillo and Cubas, 2010). Some TCPs in the same class as *BRC1* and *TB1* are involved in the regulation of cell cycle progression (Masuda et al., 2008), while others might regulate the transcription of cell cycle marker genes (Nath et al., 2003; for review, see Martín-Trillo and Cubas, 2010). In contrast, a TCP family member has also been potentially implicated in a nontranscriptional control process involving protein-protein interactions (Suzuki et al., 2001). Further studies are required to elucidate how the modulation of *BRC1* and *TB1* expression translates to a modulation of axillary bud cell proliferation and growth. However, it is tempting to speculate that the antagonistic SL and CK signals are integrated in the bud by *BRC1*, which simply suppresses cell cycle progression and hence cell division and development.

Impact of Theories on Shoot Branching

The antagonism between SL and CK in bud outgrowth control might explain conflicting findings with regard to the SL inhibition of bud outgrowth after decapitation or segment isolation and that relate to two predominant hypotheses on SL function. Bennett et al. (2006), Crawford et al. (2010), and Prusinkiewicz et al. (2009) propose that SL functions in the main stem to reduce auxin transport, which reduces auxin canalization out of axillary buds (for review, see Domagalska and Leyser, 2011). Alternatively, although not necessarily exclusively, Brewer et al. (2009) suggest that SLs may act directly in axillary buds. This latter hypothesis is supported here by the characterization of a bud-specific gene, *BRC1*, that is essential for bud growth suppression and that is tightly regulated at the level of gene expression by SL and CK. In addition to the bud-specific expression of *BRC1*, the SL and CK interaction in buds is supported by physiological evidence that vascularly supplied hormones interact equally well with locally supplied or vascularly supplied hormones to antagonistically influence bud outgrowth (Figs. 3 and 4) and that both local and vascularly supplied CK can affect *PsBRC1* expression (Fig. 7).

Using this second hypothesis, we can reinterpret findings on SL responses in isolated stem segments and decapitated plants. In both circumstances, auxin levels are depleted in the stem adjacent to the axillary bud; hence, CK levels must be substantially elevated (Shimizu-Sato et al., 2009). Consequently, in both the isolated nodal stem segment and decapitated experimental systems, both auxin and CK levels are affected, albeit presumably to different magnitudes. Moreover, even in the wild type, auxin depletion will also lead to SL depletion (Foo et al., 2005; Hayward et al., 2009). In

Arabidopsis and *chrysanthemum* isolated nodal stem segment assays, a supply of auxin is necessary for the repression of bud growth by basal supply of SL in the medium (Crawford et al., 2010; Liang et al., 2010), supporting the auxin transport model. By contrast, SL treatment directly to the uppermost bud of decapitated pea plants prevents decapitation-induced growth in the absence of an apical auxin supply (Brewer et al., 2009), supporting the direct SL model. Restoring auxin to the system will also reduce CK levels. Consequently, in view of our data on the quantitative effects of CK on SL responses, the different responses in the different systems may indeed relate to different CK levels and, hence, different responses to SL. Further studies need to explore the CK content in these different systems to gauge the impact of SL responses.

In the direct action model, where SL acts directly in buds via *BRC1*, it may do so without requiring a change in auxin status in the stem and yet may also repress auxin canalization from buds (Brewer et al., 2009). Nevertheless, there are several reports of SL affecting the localization of PIN auxin efflux carriers or auxin transport in stems (Bennett et al., 2006; Lazar and Goodman, 2006; Lin et al., 2009; Crawford et al., 2010). Given that SL function is now emerging as important in other developmental processes, such as root development, it is possible that its effect on auxin transport may be greater for those processes rather than for shoot branching.

CONCLUSION

We show that the expression of *PsBRC1* is tightly regulated by SL and CK and that the level of expression correlates with bud outgrowth responses. The results presented here support a model in which SL up-regulates the expression of *PsBRC1* while local CK represses its expression; the expression of *PsBRC1* in the bud represses the development of the axillary bud into a growing branch. In addition, long-distance supply of CK enhances the development of an axillary bud into a branch.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Growth Conditions, and Measurements

Unless otherwise stated, pea (*Pisum sativum*) plants were grown two per 2-L pot containing potting mix (Green Fingers B2 Potting Mix; www.greenfingerspottingmix.com) with approximately 2 g of Osmocote (Scotts); Flow-feed EX7 liquid nutrients (Grow Force) were supplied weekly. For the gene expression studies in Figures 5, 6, 7, and 9, plants were grown at six, six, three, and three plants, respectively, per 2-L pot filled with Green Fingers EcoZ Plus Potting Mix without Osmocote. Plants were grown in 18-h-photoperiod glasshouse conditions, as described by Ferguson and Beveridge (2009), except for Figures 5 and 6, where plants were grown under a natural photoperiod. For all experiments, the wild-type cv Torsdag (L107) was used, and the mutant lines introduced into Torsdag were *rms1-2* (*rms1-2T*), *rms4-1* (K164), and *rms5-3* (BL298).

Nodes were counted from the cotyledonary node as node 0. Bud and branch lengths were measured with digital calipers. Plant height was measured from node 1 to the shoot apex.

For statistical analyses, one-way ANOVA with Tukey's posttest and Student's *t* test were performed using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software; www.graphpad.com).

Hormone and Chemical Treatments

BA, tZR, and GR24 were supplied in a volume of 1.5 mL to the main stem vasculature below node 3 or applied in a volume of 10 μ L directly to the bud at node 3, as described by Gomez-Roldan et al. (2008) and Dun et al. (2009b), respectively, except for solutions that contained 0.09% dimethyl sulfoxide for the experiment including tZR treatments (Supplemental Fig. S1). For Figures 5, 6, and 7, treatments, including those with CHX, were applied to the bud at node 3 as described above, but solutions also contained 0.1% dimethyl sulfoxide.

In Vitro Hormone Treatments

Individual biological replicates consisting of seven 12-mm segments of stem tissue from internode 4 were incubated in 9 mL of incubation buffer with gentle shaking in the light for 4 h. For hormone treatments, incubation buffer (Theologis et al., 1985) was supplemented with GR24 or IAA, and all treatments contained 0.01% acetone and 0.01% ethanol.

Gene Expression Analyses

Stem tissue was frozen and total RNA was isolated and quantified as described by Dun et al. (2009b; Figs. 8 and 9) and bud tissue as described by Braun et al. (2011; Figs. 5–7). cDNA synthesis and real-time PCR gene expression analyses were performed as described by Dun et al. (2009b).

Primer sequences were as follows: *PsIPT1* forward (5'-ACCGTCTTGATGCTACGGAGGTGTGTC-3') and *PsIPT1* reverse (5'-TCTAATGGGTATACCC-TGCCACAGACG-3'; Tanaka et al., 2006); *PsIPT2* forward (5'-TGGCAGCAACATCATCCTCTGCCTGC-3') and *PsIPT2* reverse (5'-ACCTGTGGCCCCCA-TTATCACTAC-3'; Tanaka et al., 2006); *PsBRC1* forward (5'-TCGAAAGAC-GGAATCAAACA-3') and *PsBRC1* reverse (5'-TCCCTTGCTCTTCTCTTGC-3'); *PsDRM1* forward (5'-CCCTCAAAGATGATGGAGCGAG-3') and *PsDRM1* reverse (5'-CAACTTTACGCGCGATGAAG-3'); *PsDRM2* forward (5'-TGC-TCATTCTGGCCTATTG-3') and *PsDRM2* reverse (5'-CCACCACCACT-CCATAAC-3'); *PsAD1* forward (5'-GGTGGTGGTGGTGGTCAATG-3') and *PsAD1* reverse (5'-TCCGCAGCATGAAGATCACTG-3'); *18S* forward (5'-ACGTCCCCTGCCCTTTGTACA-3') and *18S* reverse (5'-CACTTACCGGACCATTCAT-3'; Ozga et al., 2003); *EF1 α* forward (5'-TGTGCCAGTGGGACGTGTTG-3') and *EF1 α* reverse (5'-CTCGTGGTGCATCTCAACGG-3'). In all cases, error bars represent biological se.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Effects of vascular supplied cytokinins on bud growth and stem height.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kerry Condon, Heather Vickstrom, and Dr. Philip Brewer for technical assistance with experiments and Dr. Trish Murray and Dr. Karin David for providing primer sequences for bud dormancy markers.

Received September 8, 2011; accepted October 28, 2011; published October 31, 2011.

LITERATURE CITED

Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P (2007) *Arabidopsis* *BRANCHED1* acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* 19: 458–472

- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyozuka J (2007) *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* **51**: 1019–1029
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyozuka J (2009) *d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol* **50**: 1416–1424
- Bainbridge K, Sorefan K, Ward S, Leyser O (2005) Hormonally controlled expression of the Arabidopsis *MAX4* shoot branching regulatory gene. *Plant J* **44**: 569–580
- Bangerth F (1994) Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta* **194**: 439–442
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C, Leyser O (2006) The Arabidopsis *MAX* pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**: 553–563
- Beveridge CA, Dun EA, Rameau C (2009) Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol* **151**: 985–990
- Beveridge CA, Kyozuka J (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 34–39
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C (1997a) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots: evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* **11**: 339–345
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC (1996) Branching in pea: action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiol* **110**: 859–865
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C (1997b) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiol* **115**: 1251–1258
- Beveridge CA, Symons GM, Turnbull CGN (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol* **123**: 689–698
- Böhner S, Gatz C (2001) Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. *Mol Gen Genet* **264**: 860–870
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O (2005) *MAX1* encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of *MAX3/4* to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* **8**: 443–449
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot J-P, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadi I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, et al (2012) The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol* **158**: 225–238
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 482–493
- Chatfield SP, Stirnberg P, Forde BG, Leyser O (2000) The hormonal regulation of axillary bud growth in Arabidopsis. *Plant J* **24**: 159–169
- Chaudhury AM, Letham S, Craig S, Dennis ES (1993) *amp1*: a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J* **4**: 907–916
- Cline MG (1991) Apical dominance. *Bot Rev* **57**: 318–358
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska MA, Leyser O (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**: 2905–2913
- Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485–488
- Domagalska MA, Leyser O (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 211–221
- Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA (2009a) Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends Plant Sci* **14**: 364–372
- Dun EA, Ferguson BJ, Beveridge CA (2006) Apical dominance and shoot branching: divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol* **142**: 812–819
- Dun EA, Hanan J, Beveridge CA (2009b) Computational modeling and molecular physiology experiments reveal new insights into shoot branching in pea. *Plant Cell* **21**: 3459–3472
- Faiss M, Zalubilová J, Strnad M, Schmölling T (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J* **12**: 401–415
- Ferguson BJ, Beveridge CA (2009) Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiol* **149**: 1929–1944
- Finlayson SA (2007) Arabidopsis Teosinte Branched1-like 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot Teosinte Branched1. *Plant Cell Physiol* **48**: 667–677
- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher E, Rameau C, Beveridge CA (2005) The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**: 464–474
- Foo E, Morris SE, Parmenter K, Young N, Wang H, Jones A, Rameau C, Turnbull CGN, Beveridge CA (2007) Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 1418–1428
- Gao Z, Qian Q, Liu X, Yan M, Feng Q, Dong G, Liu J, Han B (2009) *Dwarf88*, a novel putative esterase gene affecting architecture of rice plant. *Plant Mol Biol* **71**: 265–276
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, et al (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol* **151**: 400–412
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyozuka J (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol* **46**: 79–86
- Johnson X, Brich T, Dun EA, Goussot M, Haurigné K, Beveridge CA, Rameau C (2006) Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014–1026
- Kebrom TH, Brutnell TP, Finlayson SA (2010) Suppression of sorghum axillary bud outgrowth by shade, phyB and defoliation signalling pathways. *Plant Cell Environ* **33**: 48–58
- Kebrom TH, Burson BL, Finlayson SA (2006) Phytochrome B represses Teosinte Branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiol* **140**: 1109–1117
- Koshiba T, Ballas N, Wong LM, Theologis A (1995) Transcriptional regulation of *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6* early gene expression by indole-acetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* **253**: 396–413
- Lazar G, Goodman HM (2006) *MAX1*, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 472–476
- Leyser O (2009) The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant Cell Environ* **32**: 694–703
- Liang J, Zhao L, Challis R, Leyser O (2010) Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *J Exp Bot* **61**: 3069–3078
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, et al (2009) *DWARF27*, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* **21**: 1512–1525
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z (2009) Identification and characterization of *HTD2*: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* **230**: 649–658
- Madoka Y, Mori H (2000) Two novel transcripts expressed in pea dormant axillary buds. *Plant Cell Physiol* **41**: 274–281
- Martín-Trillo M, Cubas P (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* **15**: 31–39
- Masuda HP, Cabral LM, De Veylder L, Tanurdzic M, de Almeida Engler J, Geelen D, Inzé D, Martienssen RA, Ferreira PCG, Hemerly AS (2008) ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription. *EMBO J* **27**: 2746–2756
- Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, Umehara M, Luo L, Kobayashi K, Hanada A, Ueno K, Asami T, Yamaguchi S, et al (2010) *FINE CULM1 (FC1)* works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol* **51**: 1127–1135
- Morris SE, Turnbull CG, Murfet IC, Beveridge CA (2001) Mutational analysis of branching in pea: evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. *Plant Physiol* **126**: 1205–1213
- Napoli CA (1996) Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol* **111**: 27–37

- Nath U, Crawford BCW, Carpenter R, Coen E (2003) Genetic control of surface curvature. *Science* **299**: 1404–1407
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Dolezal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8039–8044
- Ozga JA, Yu J, Reinecke DM (2003) Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3 β -hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiol* **131**: 1137–1146
- Prunedo-Paz JL, Breton G, Para A, Kay SA (2009) A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **323**: 1481–1485
- Prusinkiewicz P, Crawford S, Smith RS, Ljung K, Bennett T, Ongaro V, Leyser O (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 17431–17436
- Sachs T, Thimann KV (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Am J Bot* **54**: 136–144
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* **6**: e230
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol Biol* **69**: 429–435
- Simons JL, Napoli CA, Janssen BJ, Plummer KM, Snowden KC (2007) Analysis of the *DECREASED APICAL DOMINANCE* genes of petunia in the control of axillary branching. *Plant Physiol* **143**: 697–706
- Sorefan K, Booker J, Haurogné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, et al (2003) *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev* **17**: 1469–1474
- Stafstrom JP, Ripley BD, Devitt ML, Drake B (1998) Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds: cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2. *Planta* **205**: 547–552
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HMO (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1131–1141
- Suzuki T, Sakurai K, Ueguchi C, Mizuno T (2001) Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorylation, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**: 37–45
- Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi C (2003) The *OsTB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J* **33**: 513–520
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**: 1028–1036
- Tatematsu K, Nakabayashi K, Kamiya Y, Nambara E (2008) Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **53**: 42–52
- Theologis A, Huynh TV, Davis RW (1985) Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J Mol Biol* **183**: 53–68
- Thimann KV, Skoog F (1933) Studies on the growth hormone of plants. III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. *Proc Natl Acad Sci USA* **19**: 714–716
- Thimann KV, Skoog F (1934) On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **114**: 317–339
- Turnbull CGN, Booker JP, Leyser HMO (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 255–262
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200
- Waldie T, Hayward A, Beveridge CA (2010) Axillary bud outgrowth in herbaceous shoots: how do strigolactones fit into the picture? *Plant Mol Biol* **73**: 27–36
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmölling T (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 371–381
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K (2010) The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 93–117
- Zhang S, Li G, Fang J, Chen W, Jiang H, Zou J, Liu X, Zhao X, Li X, Chu C, et al (2010) The interactions among *DWARF10*, auxin and cytokinin underlie lateral bud outgrowth in rice. *J Integr Plant Biol* **52**: 626–638
- Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L (2006) The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of *Arabidopsis* *MAX3* is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J* **48**: 687–698

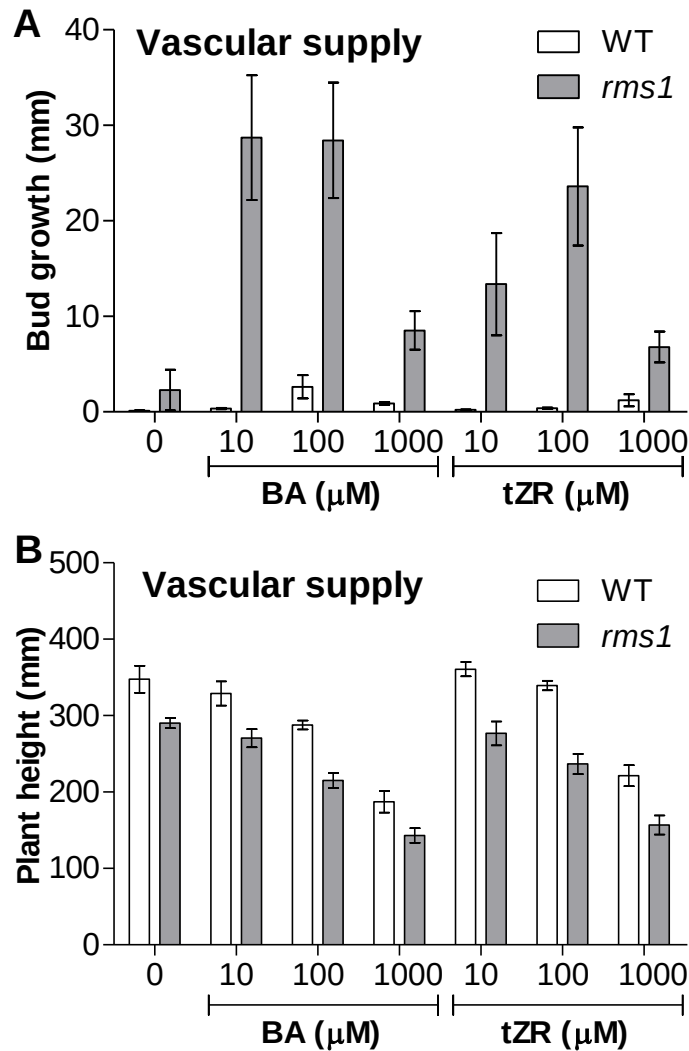


Figure S1. Buds of WT plants are less responsive to vascular supply of *trans*-zeatin riboside (tZR), a CK found endogenously in xylem sap, and 6-benzylaminopurine (BA) than SL deficient plants (A), and increasing concentrations of tZR and BA reduces WT and SL mutant plant height (B). tZR or BA was supplied to the vascular stream below node 3 of 10-day-old WT and *rms1-2* (Torsdag) pea plants. Bud growth at node 3 (A) and plant height (B) was measured 7 days after treatment. Data are means $\pm$ standard error ($n=11-12$).

IV. Article : Dynamics of strigolactone function in pea : soumis dans Molecular Plant.

Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA.

Résumé:

Les strigolactones (SL), ou des dérivés de strigolactones ont été récemment identifiés comme inhibiteurs endogènes de la ramification des plantes. Cependant, certaines caractéristiques physiologiques essentielles de la dynamique de l'action des SL restaient à caractériser. Nous montrons dans cet article que l'application successive de SL directement sur les bourgeons axillaires de chaque nœud le long de la tige, peut inhiber totalement la ramification. Nous avons trouvé que les SLs, jusqu'à un certain point peuvent modérer la croissance continue des branches en plus de la levée de dormance initiale. L'efficacité des SL à inhiber la croissance des bourgeons et des branches est en corrélation avec la capacité des SL à réguler l'expression de *PsBRC1*, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la croissance des bourgeons axillaires, en aval des SL. Conformément à un rôle dynamique de l'hormone, l'inhibition de la croissance des bourgeons par les SL n'empêche pas le bourgeon de répondre à une décapitation plus tardive, alors même que le traitement aux SL inhibe la levée de dormance des bourgeons si elles sont appliquées immédiatement après la décapitation. Comme prévu à partir de l'hypothèse de l'existence d'un réseau de contrôle de la ramification chez les plantes, l'application exogène de SL provoque un rétrocontrôle négatif sur l'expression des gènes de biosynthèse de SL dans les 2 heures. Finalement, ces résultats révèlent de nouvelles connaissances sur la dynamique du fonctionnement des SL et permettent de soutenir l'hypothèse que les SLs ou un dérivé de SL fonctionnent de façon dynamique sur l'inhibition de la ramification.

INTRODUCTION

Shoot branching is an important developmental process contributing to plant yield. It is regulated by a myriad of factors internal and external to axillary buds including hormonal, genetic, environmental, positional and developmental factors (Dun et al., 2009a; Leyser, 2009). For many years the phytohormones auxin and cytokinin (CK) have been implicated in the control of bud outgrowth, auxin as a repressor (e.g. Thimann and Skoog, 1933; Thimann and Skoog, 1934) and CK as a promoter (e.g., Sachs and Thimann, 1967). Strigolactones (SLs) were recently discovered to also function in the repression of bud outgrowth (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008), however their role in the shoot remains to be completely physiologically characterized. Various other roles for SLs in plant development are now being unraveled (e.g. root hair growth, root growth, secondary growth, adventitious root formation; Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011; Agusti et al., 2011; Rasmussen et al., 2012, reviewed in this issue by Brewer et al., 2012).

Prior to the discovery that SLs function in shoot branching inhibition, SLs were not known to have an endogenous function within the plant. SLs were instead known as chemicals exuded into the rhizosphere that stimulate beneficial symbioses with arbuscular mycorrhizae (Akiyama et al., 2005) and promote the germination of parasitic weed seeds including *Striga* spp. and *Orobanche* spp. (Cook et al., 1972). This function of SLs in the rhizosphere helped in the discovery of SL mediated branching inhibition, as increased branching mutants in rice (*Oryza sativa*) and pea (*Pisum sativum*) that were thought to lack an unknown branch-inhibiting hormone showed reduced mycorrhizal associations and their root exudates exhibited decreased capacity for stimulation of parasitic weed seed germination (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; reviewed in Dun et al., 2009a).

The majority of the SL biosynthesis and response pathway in plants remains to be determined. To date, mutant based approaches have identified several steps in the SL biosynthesis pathway. These have utilized the *ramosus* (*rms*) mutants in pea, *more axillary growth* (*max*) mutants in *Arabidopsis thaliana*, *decreased apical dominance* (*dad*) mutants in *Petunia hybrida* (petunia) and *dwarf* (*d*) and *high tillering dwarf* (*htd*) mutants in rice (reviewed in Dun et al., 2009a; Beveridge and Kyoizuka, 2010; Domagalska and Leyser, 2011). These mutants show increased branching and are generally shorter in stature than their

wild-type counterparts (e.g. Beveridge et al., 1996; Napoli, 1996; Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Zou et al., 2006), and can be classified as either SL deficient or SL response mutants based on SL measurements and responses.

The proposed biosynthetic pathway starts with a carotenoid precursor, likely β -carotene. Based on recent in vitro biochemical studies, DWARF27 (D27), a plastid-localised iron-containing protein (Lin et al., 2009), is the first enzyme in the SL pathway and functions as an isomerase to convert *trans*- β -carotene to 9-*cis*- β -carotene (Alder et al., 2012). CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE (CCD) 7 and CCD8 in the plastid, encoded by *RMS5/MAX3/DAD3/D17/HTD1* and *RMS1/MAX4/DAD1/D10* respectively (Sorefan et al., 2001; Booker et al., 2004; Snowden et al., 2005; Johnson et al., 2006; Zou et al., 2006; Arite et al., 2007; Drummond et al., 2009) then act sequentially to produce carlactone, a mobile intermediate in the SL pathway (Alder et al., 2012). A cytochrome P450, MAX1, likely acts after CCD7 and CCD8 in the synthesis of SLs (Booker et al., 2005). An α/β -fold hydrolase encoded by *D14/D88/HTD2* and an F-box protein encoded by *RMS4/MAX2/D3* may act downstream of SLs and are required for the SL branching inhibition response (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006; Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Arite et al., 2009; Gao et al., 2009; Liu et al., 2009).

BRANCHED1 (BRC1), a TCP (TB1, CYCLOIDEA, PCF domain) transcription factor strongly expressed in non-growing axillary buds, likely functions downstream of SL response to regulate bud outgrowth (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Brewer et al., 2009; Braun et al., 2012). Evidence for this includes that the increased branching observed in the Arabidopsis and pea *brc1* mutants cannot be reduced by SL treatment (Brewer et al., 2009; Braun et al., 2012), and that *BRC1* expression in the bud is down-regulated in SL mutants and up-regulated by SL treatment (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Braun et al., 2012; Dun et al., 2012). However, *BRC1* likely integrates multiple bud outgrowth regulatory pathways, not just the SL pathway, at the bud, as its expression is regulated by multiple bud growth regulatory factors especially CK (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson et al., 2010; Braun et al., 2012; Dun et al., 2012).

The SL biosynthesis and response pathway is not a simple linear pathway but rather involves feedback regulatory mechanisms (Dun et al., 2009b). If SL response is depleted, such as via mutation of SL biosynthesis or response genes, the expression of *CCD7* and *CCD8* is enhanced (e.g. Bainbridge et al., 2005; Foo et al., 2005; Snowden et al., 2005; Johnson et

al., 2006; Arite et al., 2007; Drummond et al., 2009; Dun et al., 2009b; Hayward et al., 2009) and the export of xylem-sap CK (X-CK) is reduced (Beveridge et al., 1997a; Beveridge et al., 1997b; Morris et al., 2001; Foo et al., 2007). In pea, it is suggested that this feedback regulation involves a novel long-distance signal that moves in the direction of shoot-to-root and requires *RMS2* (sequence unknown; Beveridge, 2000; Dun et al., 2009b). There is some evidence that a similar novel signalling system may occur in *Arabidopsis*, but it is minor compared with the role of auxin (Hayward et al., 2009).

Auxin is also implicated in the SL pathway as it has been demonstrated to positively regulate the expression of *CCD7* and/or *CCD8* SL biosynthesis genes in pea, *Arabidopsis*, rice and chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*); exogenous treatment with auxin enhances the expression of *CCD7* and/or *CCD8*, and removal of the apical source of auxin via decapitation leads to a substantial depletion while replacement with exogenous auxin can restore *CCD7* and/or *CCD8* expression to levels observed in intact wild-type plants (Sorefan et al., 2001; Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006; Zou et al., 2006; Arite et al., 2007; Hayward et al., 2009; Liang et al., 2010). The depletion in SL biosynthesis gene expression, and presumably SL content, after decapitation likely in part accounts for the decapitation-induced bud outgrowth response. Indeed, decapitation-induced outgrowth at the node below the site of decapitation can be repressed by directly treating the bud with GR24, a synthetic SL (Brewer et al., 2009). A cautionary note is worthwhile with respect to this decapitation response. Morris et al. (2005) and Renton et al. (2012) have demonstrated that auxin changes after decapitation are too slow to be responsible for the initiation of bud outgrowth that occurs a considerable distance from the site of decapitation. Furthermore, we have not explored carefully whether SL can prevent the earliest stage of bud outgrowth observed very soon after decapitation.

The bud outgrowth promoter CK is another major contributor to the decapitation response. Auxin depletion causes enhanced expression of *ADENOSINE PHOSPHATE-ISOPENTYLTRANSFERASE (IPT)* CK biosynthesis genes, local stem CK content and X-CK supplied from the roots to the shoot and depleted expression of CK metabolism genes; these changes are reversed by re-supply of apical auxin to the plant (Bangerth, 1994; Tanaka et al., 2006; Werner et al., 2006; Shimizu-Sato et al., 2009). It is likely that auxin, CK and SL coordinately regulate bud outgrowth after decapitation. Indeed, recent studies have indicated

that CK and SL coordinate bud outgrowth in pea by converging at the bud to regulate expression of *PsBRC1* (Braun et al., 2012; Dun et al., 2012).

Phenotypic mutant studies indicate that SLs can be synthesised in root and/or shoot tissue, can move upwards in the direction of root to shoot only, and that bud outgrowth inhibition requires SL response local to the bud (e.g. Napoli, 1996; Beveridge et al., 1997a; Turnbull et al., 2000; Stirnberg et al., 2007). The inability of SLs to move downwards from shoot to root was recently confirmed by SL measurement from root tissue of grafted pea plants (Foo and Davies, 2011) and SLs were detected in *Arabidopsis* xylem sap samples and may therefore move upwards in the plant to inhibit branching via this mechanism (Kohlen et al., 2011). Consistent with this, the recently identified SL transporter from petunia, PDR1, is a pleiotropic drug resistance (PDR)-type transporter and is expressed in vasculature and nodal tissues adjacent to leaf axils but not in axillary buds (Kretzschmar et al., 2012).

There are two hypotheses about the function of SLs for bud outgrowth inhibition, though they are not necessarily exclusive. One hypothesis suggests that SLs act directly in the bud to inhibit bud outgrowth (Brewer et al., 2009; Dun et al., 2012), while the other hypothesis proposes that SLs impede buds abilities to export auxin into the main stem, and hence inhibit their outgrowth (Bennett et al., 2006; Prusinkiewicz et al., 2009; Crawford et al., 2010; reviewed in Domagalska and Leyser, 2011). A recent stem auxin transport modelling study suggests that changes in auxin transport in SL mutants are more likely due to changes in the uptake and transfer of auxin to the long-distance polar stream rather than an affect of SLs on auxin movement in the polar stream itself (Renton et al., 2012). Accordingly, both models rely on SL action in buds. Direct bud application studies using the synthetic SL, GR24, in addition to bud specific gene expression studies demonstrate that SLs can inhibit bud outgrowth directly at the bud (e.g. Gomez-Roldan et al., 2008; Brewer et al., 2009; Braun et al., 2012; Dun et al., 2012). SLs supplied to the roots via hydroponics or growth media, or to the stem vasculature, can also lead to bud outgrowth inhibition (e.g. Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Brewer et al., 2009; Crawford et al., 2010), but it has yet to be determined if this is due to delivery of SLs or SL metabolites to the axillary bud or via action from a distance, such as in the stem.

The following experiments address several aspects of strigolactone function that have been postulated but until now have waited testing with SL applications. These include whether SLs are perceived in leaves adjacent to buds, whether they require an apical auxin

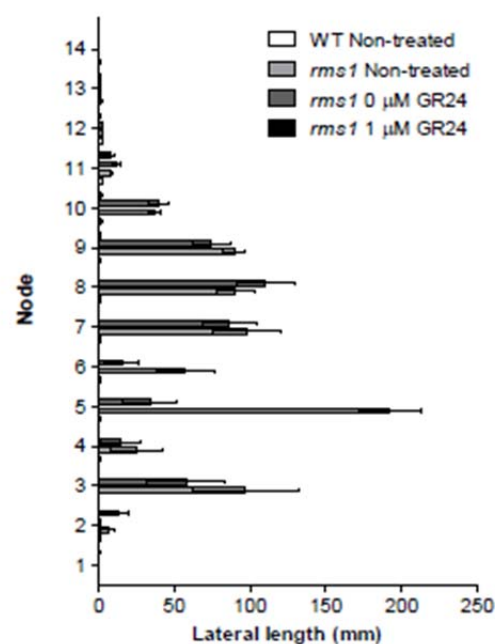


Figure 1. The outgrowth of all buds on a SL deficient *rms1* plant can be inhibited by direct application of SL. Axillary buds of wild-type (WT) or *rms1-1* plants (cultivar Parvus) were either left untreated (non-treated) or were successively treated with 0 or 1 μ M GR24 when the adjacent leaf was first open, and re-treated the following day. Bud lengths were measured when the plants were 35-d old. Data are means $\pm$ SE ($n = 14-16$).

supply for inhibition of bud outgrowth, and whether they affect only bud release or both bud release and branch growth. In so doing we also address the mechanism of how an axillary branch can undergo a transition from a readily repressible strigolactone responsive bud to a branch which essentially phenocopies the dominant main stem. We also test whether strigolactone has a dynamic role in the process of bud inhibition, release and re-inhibition.

RESULTS

Inhibition of branch growth in SL deficient pea plants

Previous experiments in pea have examined the ability of direct treatments of the synthetic SL, GR24, in inhibiting the outgrowth of one axillary bud at a particular node of SL deficient mutant plants (e.g. Gomez-Roldan et al., 2008; Dun et al., 2009b). As SL can endogenously inhibit the outgrowth of all axillary buds of wild-type pea plants, we determined if this is also the case when the synthetic SL GR24 is exogenously applied to all axillary buds. This needs to be shown, as growing axillary buds or branches can inhibit the growth of other buds or branches and hence a small inhibitory effect at one bud in mutant plants may be reinforced by other growing buds and is not representative of the case in wild-type plants where all buds are inhibited simultaneously. Axillary buds of SL deficient *rms1* plants were treated on two consecutive days as each leaf opened (two treatments per bud in total). Wild-type non-treated plants were grown alongside as a comparison. Overall, two single treatments of 1 μ M GR24 to *rms1* buds all along the stem were effective at inhibiting bud growth relative to controls, except for the bud at nodes 2 and 11 which exhibited a small amount of growth relative to wild-type control plants (Fig. 1). Since previous experiments have shown that direct GR24 treatment is effective at inhibiting outgrowth of *rms1* buds at node 2 when other buds were left untreated (e.g. Nelson et al., 2011), it is likely that the buds at node 2 grew out in this case due to release from inhibition by GR24. In contrast with our treatment method, wild-type plants have a continuous supply of SL.

GR24 is perceived in the axillary bud, not adjacent stipules

The RMS4 F-box protein is required for SL inhibition of branching, as the increased branching phenotype of *rms4* mutant plants is not affected by treatment with exogenous GR24 (Gomez-Roldan et al., 2008). Previous expression analyses found that *RMS4* is more strongly expressed in the stipules than in the roots, node or apex of pea plants (Johnson et

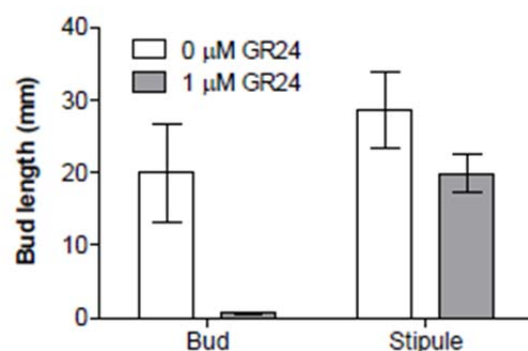


Figure 2. SL treatment to stipules does not inhibit bud outgrowth. 23-d-old *rms1-2* plants (cultivar Torsdag) were treated with 0 or 1 μM GR24 applied directly to the bud at node 10 or to the stipules. All buds were removed from nodes 1 to 9 to encourage bud growth at node 10. Node 10 bud length was measured 6 d after treatment. Data are means ± SE ($n = 11-12$).

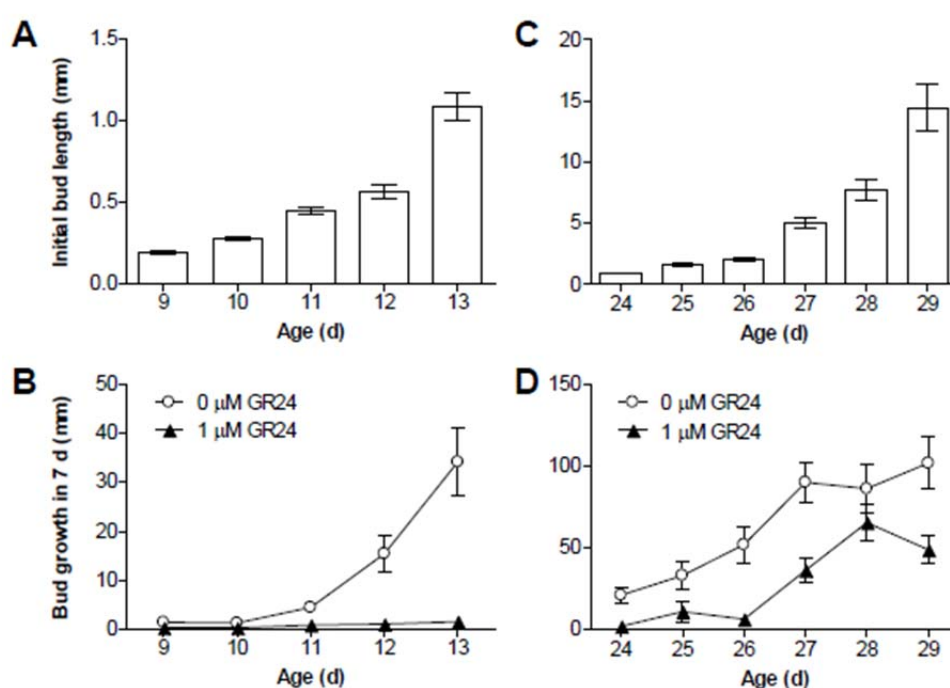


Figure 3. SL prevents the growth of small *rms1* buds and reduces the growth of small growing *rms1* branches. Buds at node 3 (A, B) or node 8 (C, D) of *rms1-1* plants (cultivar Parvus) of different ages (d; days) were treated twice with 0 or 1 μM GR24. Bud length at the time of treatment was measured (B, D) and bud growth was measured 7 d after treatment (A, C). Data are means ± SE ($n = 17-20$ [A, B] and 15-16 [C, D]).

al., 2006). Experiments conducted previously to test SL inhibition of bud outgrowth have either supplied SL to the stem vasculature, via hydroponics, or within a 5 or 10 μL volume applied to the axillary buds. The larger volume bud treatments completely cover small axillary buds and also make contact with the stipules. To rule out the possibility that SL can be perceived in the stipules to inhibit bud outgrowth, we treated the stipules or the bud specifically with a small 4 μL volume of *rms1* plants with or without GR24 being careful to ensure that the stipule treatments did not contact the axillary bud and *vice versa*. In contrast to bud treatments, treatment of GR24 to the stipules did not significantly reduce *rms1* bud length (Fig. 2). In addition, GR24 treatment to the stipules had no effect on final stipule size (data not shown). These data indicate that SL is not perceived in the stipules for bud outgrowth inhibition. The relatively high expression of *RMS4* in the stipules might instead relate to a different developmental role for SLs/*RMS4*, such as modulation of leaf senescence, light signalling or feedback regulation of SL content (e.g. Woo et al., 2001; Mayzlish-Gati et al., 2010).

GR24 affects outgrowth and continued growth of branches in a PsBRC1-dependent manner

Direct treatment of GR24 to axillary buds can inhibit branching in SL deficient mutant and decapitated pea plants (Fig. 1 and e.g. Gomez-Roldan et al., 2008; Brewer et al., 2009). To investigate if axillary buds or branches become insensitive to growth inhibition by GR24, we determined the responses of growing *rms1* buds of increasing size and developmental age to direct GR24 treatment. SL deficient *rms1* seeds were sown at daily intervals to achieve growing buds of different sizes and stages of development. Buds at a particular node were then treated at daily intervals for two days while the buds at the nodes below the treatment node were excised to encourage the growth of the test bud. Firstly we tested *rms1* SL deficient buds at node 3 with a mean size ranging from 0.19 ± 0.01 mm up to 1.09 ± 0.08 mm at the time of treatment (Fig. 3A). As expected, control treated buds continued to grow after treatment, and their growth followed an exponential pattern as seen previously in the early stages of bud growth (e.g. Brewer et al., 2009). Treatment with GR24 was effective at significantly reducing the growth of all of these small buds in the seven days since the initial treatment; bud growth was almost completely halted by GR24 treatment to these buds (Fig. 3B).

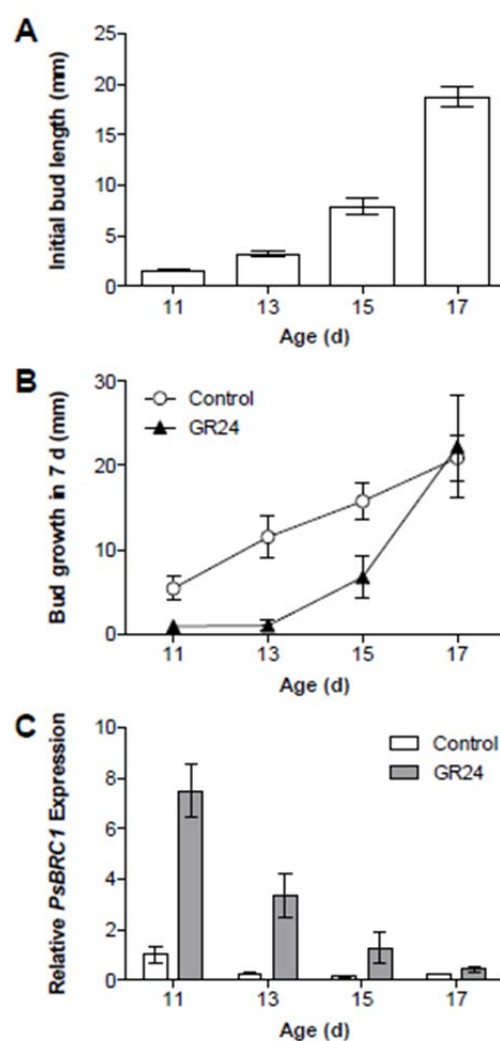


Figure 4. Growing branches eventually become resistant to SL, and the degree of SL growth inhibition responsiveness correlates with up-regulation of *PsBRC1* expression. Buds at node 3 of *rms1-10* plants (cultivar T  r  se) of difference ages (d; days) were treated with 0 or 1 μ M GR24. Lengths of buds and branches at the time of treatment (A) and growth 7 d after treatment (B) were measured. Buds and branches from equivalent plants treated at the same time were harvested 6 h after treatment and expression of *PsBRC1* was determined (C). Data are means $\pm$ SE ($n = 11-12$ [A, B] and 2-3 pools of 30 plants [C]).

To further test the responsiveness of buds of increasing size and developmental stage to GR24, another experiment was conducted with a similar design, except buds at node 8 with a larger mean size at the time of treatment, ranging from 0.88 ± 0.05 mm up to 14.23 ± 1.94 mm, were tested (Fig. 3C). In this case, GR24 was effective at inhibiting buds with a pre-treatment size up to approximately 2 mm, but only reduced rather than inhibited the growth of buds with a pre-treatment size above 5 mm (Figs. 3C and 3D). This suggests that bud outgrowth is not a simple on/off switch but perhaps a continuum and that SL functions in controlling bud growth over this broad period.

Finally, to determine if branches ever become resistant to GR24 inhibition and to determine if the diminishing effect of SL occurs in other genetic backgrounds of pea, SL deficient *rms1* seeds, on the dwarf gibberellin (GA) deficient T  r  se background, were sown every second day and grown until initial bud sizes ranged from 1.62 ± 0.40 mm up to 18.78 ± 1.79 mm (Fig. 4A). These correspond to particularly advanced branches as the internode lengths are short in dwarf lines such as T  r  se. Measuring bud growth 7 d after treatment revealed that small branches on older plants *rms1* plants transitioned from exhibiting partial to no growth inhibition in response to GR24 treatment (Fig. 4B). This suggests that as axillary branches become dominantly growing shoots they undergo a transition into a state of SL insensitivity.

We next investigated if the degree of SL responsiveness of these buds and branches could be explained by the ability of GR24 to up-regulate expression of *PsBRC1*. *PsBRC1* is a SL responsive transcription factor expressed strongly in non-growing axillary buds and weakly in the main shoot tip that is thought to be necessary downstream of SLs and CK to regulate bud outgrowth (Braun et al., 2012; Dun et al., 2012). Buds and branches from equivalent plants to those described above (Fig. 4) were treated alongside and were harvested 6 h after treatment for gene expression analyses. Careful dissection of apical buds from branches was performed to avoid dilution effect. *PsBRC1* expression (Fig. 4C) was most greatly elevated by GR24 in buds whose growth was greatly suppressed (Fig. 4B). In contrast, expression of *PsBRC1* was also induced, but not to the same extent, in small growing branches whose growth was reduced by treatment with GR24. Growing branches that exhibited no growth repression by GR24 treatment showed no GR24-induced induction of *PsBRC1* expression. Therefore, the degree of SL responsiveness of *PsBRC1* expression in axillary buds and branches might determine the degree of SL growth inhibition response. These results also

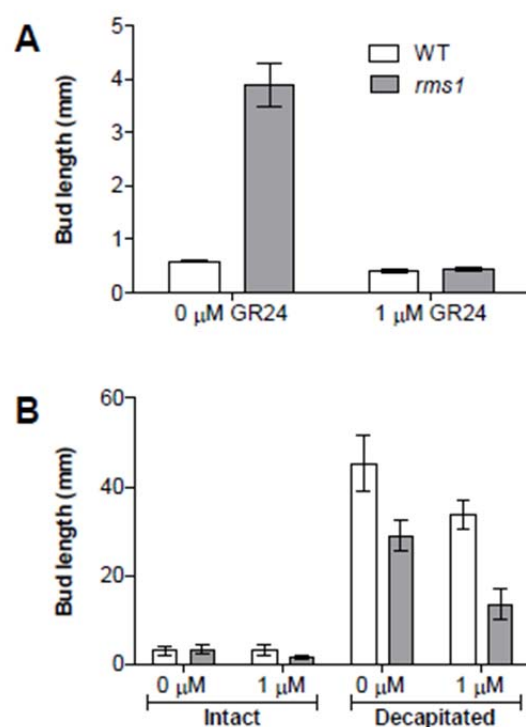


Figure 5. A bud previously inhibited by exogenous SL treatment can respond to decapitation. Buds at node 3 of 11-d-old wild-type (WT) and *rms1-1* plants (cultivar Parvus) were pre-treated with 0 or 1 μ M GR24 and were re-treated the following day. Buds were removed from nodes 1 and 2 to encourage bud growth at node 3. Node 3 bud length was measured 7 d after pre-treatment (A). 9 d after pre-treatment, all growing buds were removed from node 3 and the main shoot was either left intact or decapitated above node 3. Node 3 bud length was measured 7 d after decapitation (B). Data are means $\pm$ SE (n = 19-24 [A] and 7-12 [B]).

suggest that SL and *PsBRC1* function not only in bud release but also in regulating a bud's transition into a dominantly growing shoot as *PsBRC1* expression decreased over time alongside its decreased response to GR24.

GR24 inhibition of bud outgrowth is not permanent

Previously we demonstrated that exogenous treatment of GR24 to the uppermost axillary bud of decapitated wild-type pea plants inhibits their outgrowth (Brewer et al., 2009). Under our growth conditions, intact wild-type pea plants (cultivar Torsdag) do not normally branch presumably due to the relatively high levels of endogenous auxin and SLs and the relatively low levels of endogenous CKs. However, wild-type pea plants can be stimulated to branch by treatments that alter the relative levels of these hormones such as decapitation of the shoot tip, which modifies auxin, CK and SL content (Tanaka et al. 2006; Shimizu-Sato et al., 2009), or through application of exogenous CK. Therefore, non-growing wild-type axillary buds retain the ability to grow if stimulated. We therefore expect that SL should also act dynamically and that pretreatment of buds with high quantities of SL should not preclude a subsequent stimulation of outgrowth, such as that caused by decapitation.

To determine the long-term dynamics of GR24/SL-inhibition of bud outgrowth, we tested the ability of wild-type and SL deficient *rms1* mutant buds at node 3 to respond to decapitation nine days after treatment with GR24. As expected, control-treated SL deficient *rms1* mutant buds were significantly longer than GR24 treated buds seven days after receiving GR24 (Fig. 5A). In order to test the response of similar-sized SL and non-SL treated buds to decapitation, growing buds at node 3 of control treated SL deficient *rms1* plants were removed prior to decapitation and the growth of the secondary bud at node 3, which also received GR24, was observed. Nine days later, and sixteen days after the treatment with GR24, buds at node 3 of intact SL deficient *rms1* plants remained inhibited (Fig. 5B). In contrast, in decapitated plants, buds at node 3 of wild-type and *rms1* plants grew in response to decapitation whether they had been previously treated with control or GR24 solutions (Fig. 5B). These results show that GR24-inhibition is not permanent, although a small pre-treatment effect is possible. This dynamic nature of GR24/SL-inhibition of bud outgrowth is consistent with hormone role of SL in mediating rapid and transient signaling responses to modulate plant development.

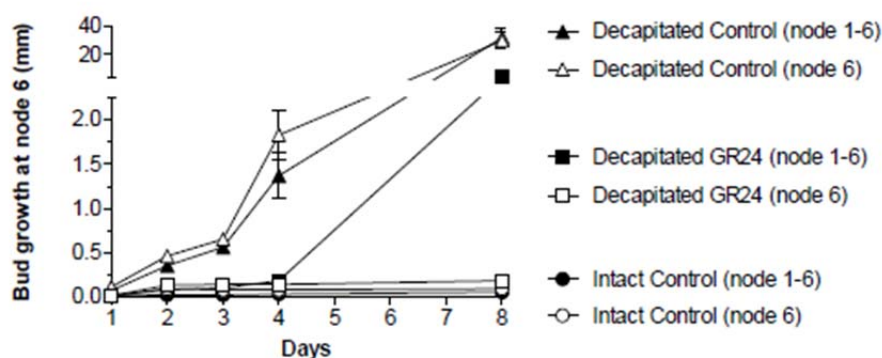


Figure 6. Strigolactone inhibition of the uppermost bud of decapitated plants is largely independent of whether remaining lower buds are treated with or without GR24. 17-d-old wild-type (WT) plants (cultivar Torsdag) were left intact or decapitated above node 6. Buds at every node (node 1 to 6) or only at node 6 were treated with 0 or 1 μ M GR24 and were re-treated for the following 4 d. After the fourth day of treatment, all buds were left untreated. Data are means $\pm$ SE ($n=12-16$).

GR24 inhibition of bud outgrowth does not require apical auxin

We showed that treatment of GR24 to axillary buds of decapitated pea plants can prevent decapitation induced outgrowth of the treated bud without the need for an apical auxin source (Brewer et al., 2009). In contrast, apical supply of naphthylacetic acid (NAA; an auxin) was required to realise bud growth repression by basally supplied GR24 in *Arabidopsis* and *chrysanthemum* isolated nodal segments (Crawford et al., 2010; Liang et al., 2010). It is unclear why there is a difference in GR24 response in these different experimental set-ups and we have previously proposed that differential increases in CKs may contribute to the different abilities to respond to GR24 as auxin, which varies in the different systems, suppresses CK which, like SL, targets *BRC1* to regulate bud outgrowth (Dun et al., 2012). In previous pea decapitation experiments, the uppermost axillary bud was treated while buds at more basal nodes grew out as normal in response to decapitation (Brewer et al., 2009). It has been suggested that the presence of these basally located growing buds enabled GR24 to inhibit the uppermost bud (Crawford et al., 2010).

To examine if GR24 can simultaneously inhibit all buds along a decapitated pea stem, buds were treated at decapitation and once daily for four subsequent days following decapitation. Plants were treated with control or GR24 solution applied to either the uppermost bud (at node 6) only, or to buds at all nodes below the site of decapitation (nodes 1 to 6). At four days after decapitation, the daily GR24 treatment inhibited growth of the uppermost bud to the same extent regardless of whether only the uppermost bud or all buds were treated (Fig. 6) suggesting that the growth of basal branches do not enhance GR24 inhibition of decapitation induced outgrowth at least during the first four days. However, four days after the final GR24 treatment (8 days after decapitation), bud inhibition began to wear off; in the case that buds were treated at nodes 1 to 6, GR24 treated buds at node 6 were longer than control treated buds of intact plants although still only a few millimeters in length (Fig. 6). This however was not the case for the uppermost node when buds at basal nodes were allowed to grow; in this case the uppermost bud remained fully inhibited by GR24 8 days after decapitation (Fig. 6). These results support the premise that GR24 inhibition of outgrowth is not permanent, especially when there is a strong stimulus for outgrowth (e.g. as a SL deficient plant ages, bud at node 2 in Fig. 1; decapitation, Fig. 5). They also suggest that the growth of basal branches do not enhance initial stages of GR24

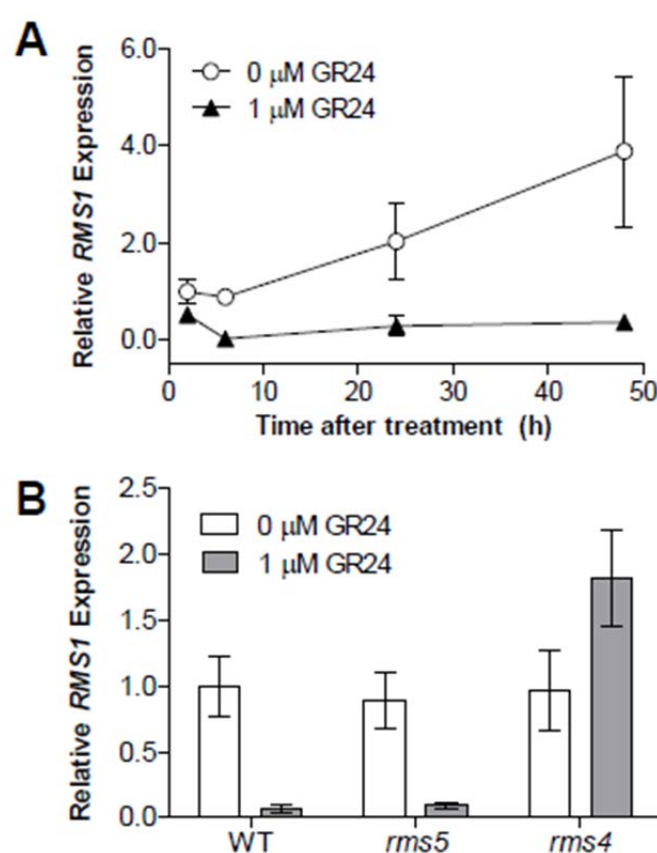


Figure 7. Exogenously supplied SL suppresses *RMS1* SL synthesis gene expression in an *RMS4*-dependent manner. 11-d-old *rms5-3* (A) or 12-d-old wild-type (WT), *rms5-3* and *rms4-1* plants (cultivar Torsdag) were supplied with 0 or 1 μ M GR24 to the vasculature below node 3. Node 3 and internode 3 (including the bud at node 3) were harvested at different time-points (A) or 6 h (B) after treatment. Expression of *RMS1* is represented relative to the 2 h control treated sample (A) and relative to the WT control treated sample (B); *18S* was used as the internal reference gene. Data are means $\pm$ SE ($n = 4-5$ [A], 5-9 [B]).

inhibition of decapitation induced outgrowth (during four days), but rather prolong the effect of GR24. This is consistent with the correlative inhibition seen between basal and aerial nodes in SL mutant plants (Ferguson and Beveridge, 2009).

Feedback regulation of SL biosynthesis genes

The bud outgrowth regulatory network model includes feedback regulation of SL biosynthesis genes (e.g. Dun et al., 2009b). It has long been proposed that feedback is up-regulated when levels of, or response to, the branching inhibitor are reduced because the expression of the branching inhibitor synthesis genes are up-regulated in the synthesis and response increased branching mutants. We tested this premise directly by supplying the synthetic SL GR24 to the stem vasculature of SL deficient *rms5* mutant plants and examining changes in *RMS1* SL synthesis gene expression at different time-points after treatment. Feedback down-regulation of *RMS1* SL synthesis gene expression in response to GR24 treatment was observed 2 h after treatment, which was the earliest time-point tested (Fig. 7A). The degree of feedback down-regulation of *RMS1* expression continued over the 48 h period tested.

To confirm that the SL response F-Box gene *RMS4* is required for feedback regulation and that feedback is not a direct effect independent of the SL response pathway, we tested the ability of GR24 to feedback down-regulate *RMS1* SL synthesis gene expression in wild-type, SL deficient *rms5* and SL insensitive *rms4* plants. Expression of *RMS1* was significantly reduced in wild-type and SL deficient *rms5* tissue above the site of supply of GR24 (Fig. 7B). As expected, supply of GR24 did not cause a reduction in *RMS1* gene expression in *rms4* SL-insensitive mutant plants (Fig. 7B). These results are consistent with findings in rice showing D3-dependent feedback down-regulation of *D10* (*OsCCD8*) expression in response to GR24 supplied via hydroponics (Umehara et al., 2008) and support the current SL branch inhibition model that incorporates *RMS4*-dependent feedback regulation of SL biosynthesis genes by SL.

DISCUSSION

In this study, we have addressed and tested several physiological assumptions that had previously been made in relation to the function of SLs in shoot architecture regulation, and have revealed new insights into the dynamics of SL function.

SL treatment to buds is more inhibitory than to stipules

Previously, Johnson et al. (2006) discovered that the pea *RMS4* SL response gene shows higher expression in leaf stipules. Here we found that treating GR24 directly to the stipules did not exert an inhibitory effect on bud outgrowth (Fig. 2) and rather that the treatment was better focused to the axillary bud. Several studies have now connected SLs with light signaling and hence it is tempting to speculate some role for *RMS4* function in stipules in respect to light-related processes (Woo et al., 2001; Yan et al., 2007; Shen et al., 200; Koltai et al., 2010; Mayzlish-Gati et al., 2010).

SL and *PsBRC1* mediate the growth of buds through to SL-independent branches

The window of the bud growth inhibition response to SL has not been previously defined. While the growth of small *rms1* pea axillary buds was largely prevented by GR24 treatment, surprisingly, even the continued growth of young growing branches was reduced by GR24 (Figs. 3 and 4; Brewer et al., 2009). As the main shoot of strigolactone mutants tend to be shorter, not longer than WT plants, it was expected that large axillary buds/branches would become insensitive to GR24 inhibition if they transition to a development state similar to the main shoot. Indeed, larger/older growing *rms1* axillary branches were insensitive to GR24 inhibition (Fig. 4). This brings us to consider how differences in SL response are mediated in a small axillary bud and then an older larger branch or main stem.

BRANCHED1 (BRC1), a TCP transcription factor thought to function downstream of SLs in the inhibition of bud outgrowth in Arabidopsis and pea (Aguilar-Martinez et al., 2007; Finlayson, 2007; Brewer et al., 2009; Braun et al., 2012; Dun et al., 2012) is predominantly expressed in suppressed axillary buds and is weakly expressed in the main shoot tip (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Braun et al., 2012). Expression of *BRC1* in axillary buds decreases as they are released from dormancy and begin growth (Fig. 4C; Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Dun et al., 2012) and a reduction of *BRC1* expression in growing axillary buds and branches is likely necessary for growth to occur. In this simple mechanism that allows axillary shoots to transition from a GR24 responsive to non-responsive state as

they grow, *PsBRC1* expression is finally not induced by GR24 in the older branches that are unresponsive to GR24 growth inhibition (Fig. 4C) and which typically show low levels of *PsBRC1* expression.

Our results indicate that SL and *PsBRC1* function is not limited to inhibition of bud release, but rather that the window of SL and *PsBRC1* function is broader and presumably continues until the transition of an axillary bud into a dominantly growing axillary branch. The effectiveness of SL at inhibiting growth and promoting *PsBRC1* expression, however, diminishes throughout this period. While *PsBRC1* is expressed in the main shoot apex in pea, it is expressed at very low levels, 500 times less than the level of expression in non-growing axillary buds (Braun et al., 2012). Future studies should explore whether enhancement of *BRC1* expression in the main shoot tip might deem it more responsive to SL.

SL reduction of continued branch growth likely occurs endogenously. For example, multiple buds on a wild-type plant are initially released to grow following decapitation, but a few branches eventually dominate and repress the growth of the other branches (e.g. Snow, 1931), possibly due to re-establishment of auxin content and the consequential increase of SL and reduction of CK in the plant. Long before the discovery that SLs regulate shoot branching, it was found that while two cotyledonary shoots initially grow in response to decapitation above the cotyledonary node, later often only one of these shoots continues growth. Snow (1929) demonstrated that the dominantly growing shoot inhibited the subordinate shoot by transmitting a signal upwards through the xylem. SLs were recently demonstrated to contribute to this repression of one branch by another, as it was shown using an Arabidopsis two-branch stem segment assay that branches were less able to become dominant in *max4* SL deficient mutant stem segments compared to wild type (Ongaro et al., 2008). We suggest that the broad window of SL responsiveness enables SLs to contribute to branch-branch repression and that SLs affect the continued growth of branches via regulation of *BRC1* expression.

GR24 inhibition of bud outgrowth does not require an apical auxin source

Previously we demonstrated that direct treatment of GR24 to the uppermost axillary bud of a decapitated wild-type plant is sufficient to inhibit its outgrowth in the absence of an apical auxin source (Brewer et al., 2009). However, GR24 is unable to inhibit cauline bud growth without an apical auxin supply in Arabidopsis nodal stem segments (Crawford et al.,

2010). This difference in response may be due to the different treatment methods: direct application to buds in the case of pea, and to the base of the segment via the growth media in the case of *Arabidopsis*. Alternatively, keeping in mind that auxin is involved in both the repression of CK (Bangerth, 1994; Nordström et al., 2004; Tanaka et al., 2006; Werner et al., 2006; Shimizu-Sato et al., 2009) and promotion of SL (Sorefan et al., 2001; Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006; Zou et al., 2006; Arite et al., 2007; Hayward et al., 2009; Liang et al., 2010), the inability of exogenous GR24 to inhibit bud growth in an isolated stem segment may be attributed to CK, as CK has been found to function antagonistically with SL (Dun et al., 2012). Indeed, elevated CK likely contributes to promotion of bud outgrowth in this isolated stem segment assay as *max4* SL synthesis mutant buds show partial bud growth inhibition when auxin is supplied apically (Bennett et al., 2006) and wild-type buds show an enhanced response to apical auxin when GR24 is supplied (Crawford et al., 2010). Since *max4* is likely unable to synthesize wild-type levels of SLs (Kohlen et al., 2011) despite treatment with auxin, the auxin inhibition response of *max4* buds is likely due to auxin repression of CK.

In the decapitated pea system where GR24 is effective at inhibiting the outgrowth of the uppermost axillary bud, branches at nodes below the uppermost inhibited treated bud were previously allowed to grow out (Brewer et al., 2009). It is possible that the growth of these lower buds supplied auxin to the main stem which may have led to a relative decrease in CK and a relative increase in endogenous SL in the plant, facilitating the GR24 inhibition of the uppermost bud. In contrast, here we found that daily supply of GR24 directly to all axillary buds of a decapitated wild-type pea plant was able to inhibit the growth of all treated buds (Fig. 6). This suggests that neither an apical or basal auxin supply is required for GR24 to inhibit bud outgrowth in pea. When GR24 was no longer supplied to the buds, the inhibition previously invoked by GR24 wore off and some apical and basal buds began to grow. In a separate experiment, we found that buds treated with GR24 many days prior to decapitation could still be stimulated to grow by decapitation (Fig. 5). This dynamic and non-permanent bud inhibition by GR24 is consistent with the dynamic nature of bud inhibition and outgrowth in wild-type plants and is also consistent with the recently proposed antagonistic action of SL and CK in bud outgrowth control (Dun et al., 2012).

Feedback regulation of SL biosynthesis

The SL direct bud outgrowth regulatory model in pea proposes that the expression of SL biosynthesis genes are feedback regulated, whereby expression of *RMS1* and *RMS5* SL biosynthesis genes is enhanced when SL content or response is repressed and *vice versa* (Dun et al., 2009b). This premise is based on many grafting and gene expression studies utilizing SL deficient and response mutants (e.g. Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006; Dun et al., 2009b; Hayward et al., 2009). This is supported by GR24 treatment and expression studies here, as supply of GR24 to *rms5* SL deficient plants caused a decrease in *RMS1* SL biosynthesis gene expression within 2 h of treatment, and expression was further depleted over time (Fig. 7). This is in agreement with results from Arabidopsis and chrysanthemum showing feedback down-regulation of *MAX4* (*AtRMS1*) and *DgCCD8* (*DgRMS1*) within 90 minutes and 6 h of GR24 treatment respectively (Mashiguchi et al., 2009; Liang et al., 2010). Additionally, consistent with findings from rice showing that feedback down-regulation of *D10* (*OsRMS1*) 24 h after GR24 treatment is D3 (*OsRMS4*)-dependent (Umehara et al., 2008), we found that GR24 was unable to reduce *RMS1* expression in the *rms4* SL response mutant within 6 h of treatment (Fig. 7). Our results from pea further strengthen the premise that expression of SL biosynthesis genes is closely and rapidly feedback regulated when SL content or response is altered in the plant.

CONCLUSION

In conclusion, here we demonstrate that GR24 function in pea is consistent with what is expected of the SL or SL-derived branch-inhibiting hormone. We found GR24 to function dynamically in bud inhibition, as would be expected of a phytohormone responding to decapitation and environmental cues. Using decapitation, we show that GR24 does not require an apical source of auxin to inhibit decapitation-induced bud growth in pea, but rather that a growing shoot at a distant node enhances the longevity of the inhibitory influence exerted by GR24, perhaps by functioning as a source of auxin or by acting as competitor for limited resources. Additionally, we show that SL-inhibition of growth is specific to axillary buds and small growing branches, and not large growing branches. Growing axillary branches transition to a state of SL insensitivity and this is likely mediated via loss of SL responsive *PsBRC1* expression. This suggests that SL regulation of bud growth is

not a simple on/off switch, but rather that growing buds and branches transition through a phase of diminishing SL responsiveness.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials, growth conditions and measurements

Unless otherwise stated, *Pisum sativum* (pea) plants were grown two per two litre pot containing potting mix (Green Fingers B2 Potting mix; www.greenfingerspottingmix.com) with approximately 2 g of Osmocote (Scotts). Flowfeed EX7 liquid nutrients (Grow Force, Australia) were supplied weekly. For Fig. 4, pea plants were grown at 1 per 4 dL pot containing clay pellets, peat and soil (1:1:1). Unless otherwise stated, plants were grown in a glasshouse as described in Ferguson and Beveridge (2009) under 18 h light / 6 h dark conditions. For Fig. 6, plants were grown in a greenhouse with 16 h day/8 h night, 24 °C (day)/18°C (night), 70% relative humidity with light provided by sodium lamp. For Fig. 5, plants were grown under a natural photoperiod at 18 °C. The wild-type cultivars Parvus (L77), Torsdag (L107) and Térèse were utilized, in addition to the *rms1-1* (WL5237) mutant line introduced into the Parvus cultivar, *rms1-2* (*rms1-2T*), *rms4-1* (K164) and *rms5-3* (BL298) mutant lines introduced into the Torsdag cultivar, and *rms1-10* (M3T-884), *rms1-11* (M3T-988) and *rms4-3* (M3T-946) introduced into the Térèse cultivar.

Nodes were counted acropetally from the cotyledonary node as node 0. Bud, branch and internode lengths (measured from node to node) were measured with digital callipers, plant height was measured from node 1 to the apex with a ruler. Bud and main stem growth was calculated as increase in length since the time of treatment.

In all cases, error bars represent biological standard error. Statistical analyses (1-way ANOVA with Tukey post-test and Students t-tests) were performed with GraphPad Prism v 5.01 (GraphPad Software, Inc.; www.graphpad.com).

Hormone treatments

The synthetic SL GR24 was applied directly to the bud as 10 µL of solution containing 50% ethanol, 2% polyethylene glycol (PEG) 1450 and 0.1% acetone as described in Dun et al. (2009b), except only 4 µL of solution was applied to buds in Fig. 2 and 0.01% dimethyl sulfoxide was included in the treatment solutions in Fig. 4. For stipule treatments, 2 µL of solution containing 0 or 1 µM GR24 and 50% ethanol, 2% PEG 1450 and 0.1% acetone (same

as bud treatment solutions) was applied to each of the two stipules at the node. GR24 was supplied to the main stem vasculature as described in Gomez-Roldan et al. (2008).

Gene expression analyses

Axillary buds were harvested, total RNA isolated and quantified, cDNA synthesised and real-time PCR gene expression analyses conducted as described in Braun et al. (2011). For Fig. 7, total RNA was isolated and quantified, cDNA synthesized and real-time PCR gene expression analyses were performed as described in Dun et al. (2009b). Primer sequences were as follows: *PsBRC1* forward (5'-TCGAAAGACGGAATCAAACA-3') and *PsBRC1* reverse (5'-TCCCTTGCTCTTCTCTTGC-3'); *EF1 α* forward (5'-TGTGCCAGTGGGACGTGTTG-3') and *EF1 α* reverse (5'-CTCGTGGTGCATCTCAACGG-3'); *RMS1* forward (5'-AAGGAGCTGTGCCCTCAGAA-3') and *RMS1* reverse (5'-ATTATGGAGATCACCACACCATCA-3') (Foo et al., 2005); *18S* forward (5'-ACGTCCCTGCCCTTGTACA-3') and *18S* reverse (5'-CACTTCACCGGACCATTCAAT-3') (Ozga et al., 2003).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Kerry Condon and Rosanna Powell for plant care and technical assistance with experiments, and Dr Philip Brewer for helpful discussions.

LITERATURE CITED

- Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P** (2007) *Arabidopsis BRANCHED1* acts as an integrator of branching wignals within axillary buds. *Plant Cell* **19**: 458-472
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, Greb T** (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20242-20247
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H** (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S** (2012) The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **335**: 1348-1351

- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J** (2007) *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* **51**: 1019–1029
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyojuka J** (2009) *d14*, a strigolactone insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol* **50**: 1416–1424
- Bainbridge K, Sorefan K, Ward S, Leyser O** (2005) Hormonally controlled expression of the Arabidopsis *MAX4* shoot branching regulatory gene. *Plant J* **44**: 569–580
- Bangerth F** (1994) Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta* **194**: 439–442
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschig C, Leyser O** (2006) The Arabidopsis *MAX* pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**: 553–563
- Beveridge CA** (2000) Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regul* **32**: 193–203
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC** (1996) Branching in pea: action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiol* **110**: 859–865
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C** (1997a) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced rootsap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiol* **115**: 1251–1258
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C** (1997b) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* **11**: 339–345
- Beveridge CA, Kyojuka J** (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 34–39
- Beveridge CA, Dun EA, Rameau C** (2009) Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol* **151**: 985–990
- Booker J, Auldrige M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O** (2004) *MAX3/CCD7* is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* **14**: 1232–1238
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O** (2005) *MAX1* encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of *MAX3/4* to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* **8**: 443–449

- Braun N, de Saint Germain A, Pillot J-P, Xin L, Dalmais M, Le Signor C, Bouteiller N, Luo D, Bendahmane A, Turnbull C, Rameau C** (2012) The pea TCP transcription factor *PsBRC1* acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol* **158**: 225-238
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA** (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 482–493
- Cook CE, Whichard LP, Wall ME, Egley GH, Coggon P, Luhan PA, McPhail AT** (1972) Germination stimulants. II. The structure of strigol - a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *J Am Chem Soc* **94**: 6198-6199
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska MA, Leyser O** (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**: 2905-2913
- Domagalska MA, Leyser O** (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Bio* **12**: 211-221
- Drummond RSM, Martínez-Sánchez NM, Janssen BJ, Templeton KR, Simons JL, Quinn BD, Karunairetnam S, Snowden KC** (2009) *Petunia hybrida* *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7* is involved in the production of negative and positive branching signals in petunia. *Plant Physiol* **151**: 1867-1877
- Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA** (2009a) Strigolactones: Discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends Plant Sci* **14**: 364–372
- Dun EA, Hanan J, Beveridge CA** (2009b) Computational modeling and molecular physiology experiments reveal new insights into shoot branching in pea. *Plant Cell* **21**: 3459-3472
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA** (2011) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol* **158**: 487-498
- Ferguson BJ, Beveridge CA** (2009) Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiol* **149**: 1929–1944
- Finlayson SA** (2007) Arabidopsis TEOSINTE BRANCHED1-LIKE 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot TEOSINTE BRANCHED1. *Plant Cell Physiol* **48**:667-677
- Finlayson SA, Krishnareddy SR, Kebrom TH, Casal JJ** (2010) Phytochrome regulation of branching in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1914-1927
- Foo E, Davies NW** (2011) Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta* **234**: 1073-1081

- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge CA** (2005) The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**: 464–474
- Foo E, Morris SE, Parmenter K, Young N, Wang H, Jones A, Rameau C, Turnbull CGN, Beveridge CA** (2007) Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 1418–1428
- Gao Z, Qian Q, Liu X, Yan M, Feng Q, Dong G, Liu J, Han B** (2009) *Dwarf 88*, a novel putative esterase gene affecting architecture of rice plant. *Plant Mol Biol* **71**: 265–276
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O** (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol* **151**: 400–412
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyoizuka J** (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol* **46**: 79–86
- Johnson X, Brcich T, Dun EA, Goussot M, Haurogné K, Beveridge CA, Rameau C** (2006) Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014–1026
- Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combier JP, Bécard G, Belausov E, Beeckman T, Dor E, Hershenhorn J, Koltai H** (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta* **223**: 209–216
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C** (2011) Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**: 974–987
- Koltai H, LekKala SP, Bhattacharya C, Mayzlish-Gati E, Resnick N, Wininger S, Dor E, Yoneyama K, Yoneyama K, Hershenhorn J, Joel CM, Kapulnik Y** (2010) A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *J Exp Bot* **61**: 1739–1749
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E** (2012) A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483**: 341–344

- Leyser O** (2009) The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant Cell Environ* **32**: 694–703
- Liang J, Zhao L, Challis R, Leyser O** (2010) Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) *J Exp Bot* **61**: 3069-3078
- Lin H, Wang RX, Qian Q, Yan MX, Meng XB, Fu ZM, Yan CY, Jiang B, Su Z, Li J, Wang Y** (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* **21**:1512-1525
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z** (2009) Identification and characterization of *HTD2*: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* **230**: 649-658
- Mayzlish-Gati E, LekKala SP, Resnick N, Wininger S, Bhattacharya C, Lemcoff JH, Kapulnik Y, Koltai H** (2010) Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato. *J Exp Bot* **61**: 3129-3136
- Morris SE, Turnbull CG, Murfet IC, Beveridge CA** (2001) Mutational analysis of branching in pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. *Plant Physiol* **126**: 1205-1213
- Morris SE, Cox MCH, Ross JJ, Krisantini S, Beveridge CA** (2005) Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiol* **138**: 1665-1672
- Napoli CA** (1996) Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol* **111**: 27–37
- Nelson DC, Scaffidi A, Dun EA, Waters MT, Flematti GR, Dixon KW, Beveridge CA, Ghisalberti EL, Smith SM** (2011) F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 8897-8902
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowski D, Norbaek R, Åstot C, Dolezal K, Sandberg G** (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8039-8044
- Ongaro V, Bainbridge K, Williamson L, Leyser O** (2008) Interactions between axillary branches of *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**: 388-400
- Ozga JA, Yu J, Reinecke DM** (2003) Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3 β -hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiol* **131**: 1137–1146

- Prusinkiewicz P, Crawford S, Smith RS, Ljung K, Bennett T, Ongaro V, Leyser O** (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 17431–17436
- Rasmussen A, Mason M, De Cuyper C, Brewer PB, Herold S, Augusti J, Geelen DNV, Greb T, Goormachtig S, Beeckman T, Beveridge CA** (2012) Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant Physiol* **158**: 1976–1987
- Renton M, Hanan J, Ferguson BJ, Beveridge CA** (2012) Models of long-distance transport: how is carrier-dependent auxin transport regulated in the stem? *New Phytol* **194**: 704–715
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, Verstappen F, Bouwmeester H** (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol* **155**: 721–734
- Sachs T, Thimann KV** (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Am J Bot* **54**: 136–144
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H** (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol Biol* **69**: 429–435
- Snow R** (1929) The transmission of inhibition through dead stretches of stem. *Ann Bot* **43**: 261–267
- Snow R** (1931) Experiments on growth and inhibition. Part I. New phenomena of inhibition. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **108**: 305–316
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ** (2005) The *Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746–759
- Sorefan K, Booker J, Haurogné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, et al** (2003) *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev* **17**: 1469–1474
- Stirnberg P, van de Sande K, Leyser HMO** (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1131–1141
- Stirnberg P, Furner IJ, Leyser HMO** (2007) *MAX2* participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J* **50**: 80–94

- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H** (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**: 1028–1036
- Thimann KV, Skoog F** (1933) Studies on the growth hormone of plants. III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. *Proc Natl Acad Sci USA* **19**: 714–716
- Thimann KV, Skoog F** (1934) On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **114**: 317–339
- Turnbull CGN, Booker JP, Leyser HMO** (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 255–262
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S** (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling** (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol* **8**: 371–381
- Woo HE, Chung KM, Park J, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG** (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1779–1790
- Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L** (2006) The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J* **48**: 687–696

V. Article : Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching : Plant Physiology 2012 Aug;159(4):1524-44.

Boyer FD, **de Saint Germain** A, Pillot JP, Pouvreau JB, Chen VX, Ramos S, Stévenin A, Simier P, Delavault P, Beau JM, Rameau C.

Résumé:

Initialement connues pour leur rôle dans la rhizosphère notamment dans la stimulation de la germination des graines de mauvaises herbes parasites des genres *Striga* et *Orobanche*, mais aussi comme signaux de reconnaissance permettant la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, les strigolactones (SL) ont été récemment redécouvertes en tant que nouvelle classe d'hormones végétales impliquées dans le contrôle de la ramification des plantes. Dans cet article, nous avons procédé à la synthèse de nouveaux analogues de SL et à notre connaissance il s'agit de la première étude de relations structure-activité des SL en tant qu'hormone chez le pois (*Pisum sativum*). Les comparaisons avec leur activité sur la germination des graines d'orobanche (*Phelipanche ramosa*) sont également présentées. Le mutant de pois *rms1*, déficient en SL a été utilisé pour les tests d'activités biologiques des SL, test basé sur la longueur des bourgeons axillaires après l'application directe de SL sur les bourgeons. Ce test a été comparé avec un test où les SL sont appliquées par les racines en utilisant la culture hydroponique et avec un test moléculaire dans lequel les niveaux des transcrits du gène *BRANCHED1*, l'homologue de pois du gène de maïs *TEOSINTE BRANCHED1* ont été quantifiés dans les bourgeons axillaires seulement 6 h après l'application de SL. Nous avons démontré que la présence d'un accepteur de Michael et d'un motif méthylbutenolide ou diméthylbutenolide dans la même molécule est essentielle à l'activité hormonale. Nous avons également établi que l'analogue le plus actif était un composé présentant 2 groupements méthyl sur le cycle D et que ce composé pouvait être utilisé pour contrôler l'architecture de la plante, sans stimuler fortement la germination des graines de *P. ramosa*.

Structure-Activity Relationship Studies of Strigolactone-Related Molecules for Branching Inhibition in Garden Pea: Molecule Design for Shoot Branching^{1[W]}

François-Didier Boyer*, Alexandre de Saint Germain, Jean-Paul Pillot, Jean-Bernard Pouvreau, Victor Xiao Chen, Suzanne Ramos, Arnaud Stévenin, Philippe Simier, Philippe Delavault, Jean-Marie Beau, and Catherine Rameau

Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Unité Propre de Recherche 2301 Centre National de la Recherche Scientifique, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France (F.-D.B., V.X.C., S.R., A.S., J.-M.B.); Unité Mixte de Recherche 1318 INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, F-78000 Versailles, France (A.d.S.G., J.-P.P., C.R.); and L'Université Nantes Angers Le Mans, Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales, Institut Fédératif de Recherche 149 Qualité et Santé du Végétal, EA 1157, 44322 Nantes cedex 3, France (J.-B.P., P.S., P.D.)

Initially known for their role in the rhizosphere in stimulating the seed germination of parasitic weeds such as the *Striga* and *Orobanch* species, and later as host recognition signals for arbuscular mycorrhizal fungi, strigolactones (SLs) were recently rediscovered as a new class of plant hormones involved in the control of shoot branching in plants. Herein, we report the synthesis of new SL analogs and, to our knowledge, the first study of SL structure-activity relationships for their hormonal activity in garden pea (*Pisum sativum*). Comparisons with their action for the germination of broomrape (*Phelipanche ramosa*) are also presented. The pea *rms1* SL-deficient mutant was used in a SL bioassay based on axillary bud length after direct SL application on the bud. This assay was compared with an assay where SLs were fed via the roots using hydroponics and with a molecular assay in which transcript levels of *BRANCHED1*, the pea homolog of the maize *TEOSINTE BRANCHED1* gene were quantified in axillary buds only 6 h after application of SLs. We have demonstrated that the presence of a Michael acceptor and a methylbutenolide or dimethylbutenolide motif in the same molecule is essential. It was established that the more active analog **23** with a dimethylbutenolide as the D-ring could be used to control the plant architecture without strongly favoring the germination of *P. ramosa* seeds. Bold numerals refer to numbers of compounds.

Strigolactones (SLs) represent the most recent class of hormones identified in plants for their role in repressing shoot branching. Their existence as a novel branching inhibitor signal was suggested through grafting experiments with high-branching mutants in pea (*Pisum sativum*; Beveridge et al., 1997; Beveridge, 2000) and in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Turnbull et al., 2002; Booker et al., 2004). Analysis of the mutated genes indicated that some of them encode Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD) enzymes, suggesting that the branching inhibitor was carotenoid derived (Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004; Matusova et al., 2005). When mutated in *CCD7* or *CCD8* genes, the plants were shown to be deficient in SLs. Treatment of these mutants by exogenous application of SLs inhibited the growth of

lateral buds and restored the wild-type phenotype. Other branching mutants (*max2/rms4*) suspected to be affected in the hormone signaling pathway rather than in hormone synthesis were found to produce normal or higher amounts of SLs, and exogenous SL treatment did not suppress lateral bud growth. In the light of these data, some authors (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Domagalska and Leyser, 2011) concluded that SLs, or closely related molecules, were indeed the long-sought plant hormones that suppress lateral branch formation.

SLs have already been known as signaling molecules in the rhizosphere in both parasitic and symbiotic interactions. They were first identified in 1966 (Cook et al., 1966, 1972) as a seed germination stimulant of the parasitic weeds *Orobanch* and *Striga*, major agricultural pests around the Mediterranean Sea and in sub-Saharan Africa, respectively, where they constitute the major cause of crop damage. More recently, SLs have been shown to play a key role in the establishment of one of the most prevalent symbioses between the vast majority of land plants and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. SLs produced by plant roots stimulate spore germination and hyphal proliferation of AM fungi (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). The hypothesis is that SLs boost their metabolism prior

¹ This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique, Institut de Chimie des Substances Naturelles-Centre National de la Recherche Scientifique, and the Université de Nantes.

* Corresponding author; e-mail boyer@icsn.cnrs-gif.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: François-Didier Boyer (boyer@icsn.cnrs-gif.fr).

[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.195826

to root colonization (Besserer et al., 2006). The AM symbiosis, which involves an ancient phylum of fungi, the Glomeromycota, arose very early in land plant evolution and is thought to have been instrumental in allowing successful plant colonization of the terrestrial environment (Simon et al., 1993). It has been proposed that the primary role of SLs was to attract these highly beneficial fungal symbionts, because of the parasitic plants having exploited this system much later to detect their host (Bouwmeester et al., 2007). SLs have also been shown to be synthesized by a nonvascular plant, the moss *Physcomitrella patens*, and to play a role in both chemical communication between plants and plant extension control (Proust et al., 2011). All these data suggest that SLs are very ancient molecules. Their role as interkingdom signaling molecules and between plants, together with their effect on shoot branching, constitute an intriguing plant signaling story.

To date, at least 15 naturally occurring SLs have been identified in root exudates of monocotyledonous and dicotyledonous plant species (Xie and Yoneyama, 2010), and most of them have been structurally characterized, very often with difficulties. It is expected that many others will be identified later (Yoneyama et al., 2009; Zwanenburg et al., 2009). Predominant SLs differ in identity in different species, although relatives tend to have similar SLs. SLs present a common four-cycle skeleton (A, B, C, and D), with cycles A and B bearing various substituents and cycles C and D being lactone heterocycles connected by an ether enol bond (Fig. 1). The first analysis of the distribution of SLs in different species suggests that 5-deoxystrigol is

generally shared by both monocots and dicots, while orobanchol and orobanchyl acetate, for which structural revisions were recently proposed (Ueno et al., 2011b; Vurro and Yoneyama, 2012), seem to be found in dicots but not in monocots. Solanacol (Xie et al., 2007; Chen et al., 2010), identified in tobacco (*Nicotiana tabacum*), is the only SL having an aromatic A-ring. The highly active synthetic analog of strigol, known as GR24 and commonly used in biological experiments, also has an aromatic A-ring (Fig. 1). All currently known natural SLs possess the same CD rings with a methyl at the C4' position, suggesting the importance of this structure for bioactivity. The identification of SLs is difficult partly because they are produced by plants in extremely low quantities and are relatively unstable. The level of the endogenous SL 2'-epi-5-deoxystrigol in rice (*Oryza sativa*) roots is about 20 pg g⁻¹ fresh weight (Umehara et al., 2008), but SL levels found in roots and in root exudates are strongly dependent on nutrient availability, notably phosphorus and nitrogen (Yoneyama et al., 2007, 2012). SLs are inherently unstable in water, particularly at pH > 7, as this nucleophilic agent cleaves the enol ether bond between the C- and D-rings (Akiyama and Hayashi, 2006) to furnish the hydroxymethylbutenolide **3** (Fig. 2) and the formyl tricyclic lactone **6** (Fig. 3). These compounds and GR24 analogs have also been found to be light sensitive (Johnson et al., 1981). Activities of SLs could be detected at concentrations as low as 10⁻¹³ M on AM fungi (Akiyama and Hayashi, 2006), 10⁻¹² M on seeds of parasitic weeds (Xie and Yoneyama, 2010), and 10⁻⁸ M for GR24 on lateral buds (Gomez-Roldan et al., 2008).

Most studies on the bioactivity of SLs investigated their action as a germination stimulant of parasitic seed weeds. The methyl substituent in the D-ring at C4' is essential for bioactivity as a germination stimulant that underlines the importance of the D-ring (Zwanenburg et al., 2009). The presence of the 4-hydroxyl group seems to enhance the activity. It was recently reported that, generally, natural hydroxy-SLs are about 10- to 100-fold more active than their acetates on *Orobanch* *minor* and broomrape (*Phelipanche ramosa*) seed germination (Xie et al., 2008; Kim et al., 2010). The results are inverted for aromatic A-ring analogs of orobanchol for seeds of parasitic weeds (Malik et al., 2011). The C2'-(R) stereochemistry was also reported to be an important structural feature for potent germination stimulation activity for strigol, sorgolactone, orobanchol, orobanchyl acetate, and GR24 derivatives (Mangnus et al., 1992; Ueno et al., 2011a, 2011b). Recently, it was demonstrated that A-ring dimethyl substitution on GR24 lowers the germination activity (Malik et al., 2010). However, germination stimulation activity of SLs may be different from one parasitic plant species to another (Sato et al., 2005; Yoneyama et al., 2010; Ueno et al., 2011b). Structure-activity relationship (SAR) studies suggest that the CD ring moiety is the essential structure for stimulating seed germination (Zwanenburg et al., 2009). This CD structure unit was also proposed to be essential for AM fungi (Akiyama and Hayashi,

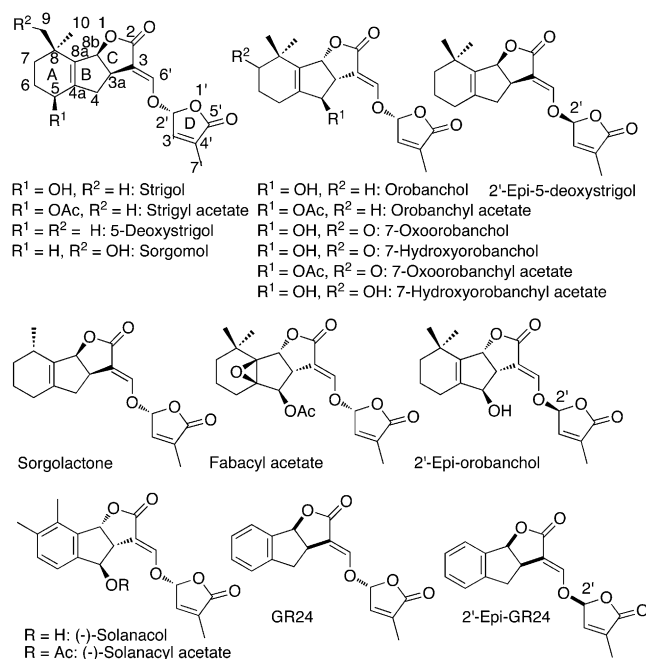


Figure 1. Natural SLs and analogs. Ac, Acetyl.

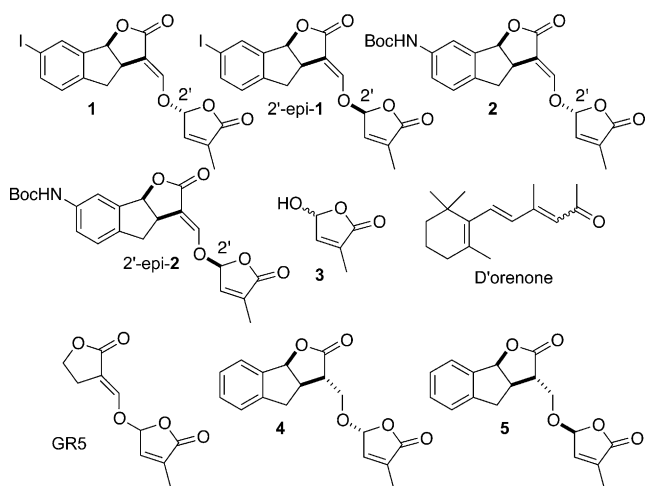


Figure 2. Known SL analogs and d'orenone. Boc, *t*-Butoxycarbonyl.

2006). Very recently, new data (Akiyama et al., 2010; Prandi et al., 2011) were made available concerning the hyphal branching activity. Structural requirements for this activity were reportedly very similar to those for germination stimulation of root parasites. However, the authors showed that the enol ether link between rings C and D can be replaced by an alkoxy or imino ether with little decrease in activity.

SL SAR studies are now required to define their role in repressing shoot branching. In this study, we used a branching bioassay developed with the pea SL-deficient mutant *rms1* to analyze the hormonal activity of various natural SLs and synthetic analogs. This biological assay was completed by a molecular assay using the pea *BRANCHED1* (*PbBRC1*) gene encoding a transcription factor of the plant-specific TCP family named from the

first three identified members, the maize TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA in *Antirrhinum majus*, and PCF-coding genes in rice. *PsBRC1* was shown to be transcriptionally up-regulated by SLs in axillary buds of the SL-deficient *rms1* mutant but not in the SL-response *rms4* mutant, indicating that it is involved in the SL-signaling pathway to repress branching (Braun et al., 2012). This work represents, to our knowledge, the first SAR study of SLs for their hormonal activity in branching inhibition. SAR studies were performed in parallel for activity on the germination of *P. ramosa*. An SL analog with strong activity for branching inhibition in pea (*Pisum sativum*) together with low activity for broomrape seed germination is revealed.

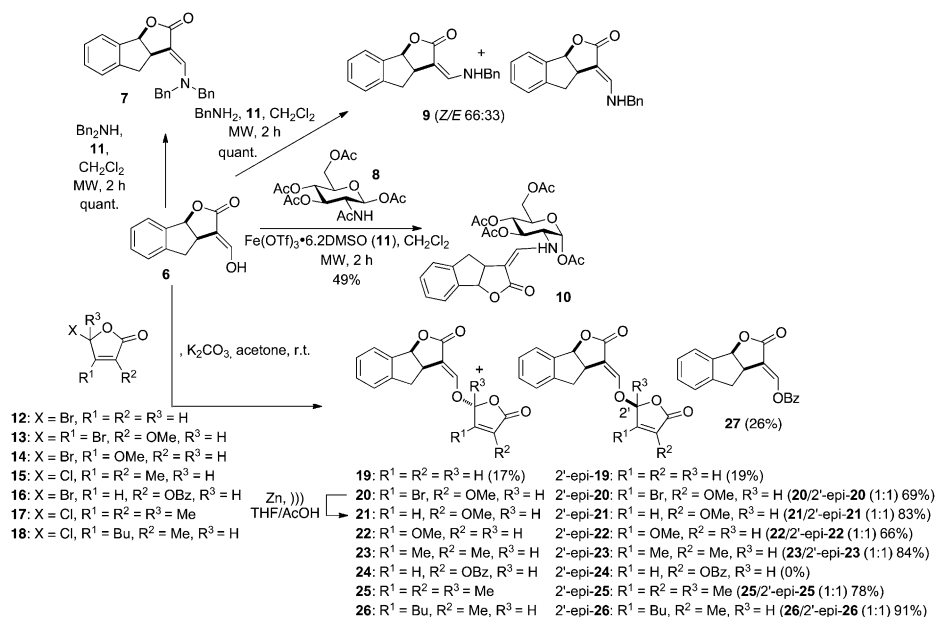
RESULTS

Synthesis of SL Analogs

The SL SAR for the inhibition of bud outgrowth can be established as for seed germination of parasitic plants (Zwanenburg et al., 2009) by simplifying the SL skeleton. The relevant question is whether the bioactiphore is the same as that for seed germination of parasitic plants or for hyphal proliferation of AM fungi.

Several natural SLs were tested along with the well-known GR24, in which the A-ring was replaced by an aromatic ring. Several GR24 analogs (**7**, **9**, **10**, **27**) lacking the D-ring were also synthesized (Fig. 3). Bold numerals refer to numbers of compounds. Reaction of tricycle **6** with benzylamine (dibenzylamine) furnished quantitatively under microwave irradiation the expected enamine **9** (**7**). The geometry of the enamine was determined by Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy correlations observed between one

Figure 3. Synthesis of D-modified GR24 analogs. Ac, Acetyl; Bn, benzyl; Bu, *n*-butyl; Bz, benzoyl; Me, methyl; MW, microwave irradiation; r.t., room temperature; Tf, trifluoromethanesulfonyl.



benzylic methylene and H4 for **7** (only *E* geometry) and H6' and H4 for the major *Z* isomer **9**, respectively. Enamine **10** was prepared by the reaction of tricycle **6** with the commercially available GlcNAc acetate **8** in the presence of anhydrous ferric triflate under microwave irradiation (Stévenin et al., 2012). The exclusive formation of the *Z* enamine **10** could be rationalized by the possible presence of a hydrogen bond between the NH and the oxygen atom at C2 in this geometry. This geometry was largely studied as in the case of the protection of the amino group of amino sugars by the acylvinyl group (Gomez-Sanchez et al., 1984) or the primary amine-labile vinylogous amide type-protecting group. Variations of the D-ring substituents were performed using D-ring precursors **12** to **18** for the coupling with enol **6**. In one case, the reaction with D-ring precursor **16** did not lead to the expected diastereoisomers **24/2'-epi-24** but to the transesterification product **27**, even with the solid/liquid conditions (K_2CO_3 /acetone) known to avoid this side reaction (Hoffmann et al., 1989).

A racemic mixture of the AB-ring-truncated synthetic analog, GR5, was also prepared by a one-pot procedure involving the coupling of lactone with the suitable butenolide **32** (Macalpine et al., 1976) via an enol ether linkage (Fig. 4). The D analog of GR5 (**30**) was furnished from γ -butyrolactone, and the 3,4-dimethylbutenolide D-ring precursor **15** was easily obtained in bulk quantities (Canevet and Graff, 1978; Johnson et al., 1981). The influence of the replacement of the enol ether linkage by a thioenol ether and an enamine was also examined. Enamine **29** was obtained from the known 3-aminomethylenedihydrofuran-2-one **28** (Zanatta et al., 2003) by bis-alkylation with compound **15** in poor

yield (8%). Preparations of **23/2'-epi-23** and SL mimic **31** were accomplished in the same way from enol **6** and commercially available 4-chlorobenzenethiol, respectively, in high (84% for **23/2'-epi-23**; Fig. 3) to moderate (51% for **31**; Fig. 4) yields. The bioisostere (**33**) of GR24 (Mangnus and Zwanenburg, 1992) was synthesized from enol **6** via treatment of the corresponding methoxymethylene derivative (Fig. 5) with sodium hydrosulfide in methanol (Just et al., 1976) to furnish the sodium thiolate directly alkylated with the 5-bromo-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**32**). The analogs substituted at C2' and C3' GR24 analogs (**25/2'-epi-25**: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{Me}$) and (**26/2'-epi-26**: $R^1 = \text{Bu}$, $R^2 = \text{Me}$, $R^3 = \text{H}$) were furnished by the coupling of enol **6** with the corresponding chloro D-ring precursor (**17** or **18**) with good yields (78% for **25/2'-epi-25**, 91% for **26/2'-epi-26**; Fig. 3).

In order to examine the influence of the enol function at the C3C6' position and that of the double bond of the D-ring on the biological activity, we synthesized derivatives **34** to **37** from 2'-epi-GR24 and derivative **38** from **5** (Fig. 6). Hydrogenation of 2'-epi-GR24 proceeded rapidly in ethyl acetate (EtOAc) in the presence of 10% palladium on carbon to give the completely reduced derivative **34** (two isomers), resulting from the concomitant hydrogenolysis of the benzylic carbon-oxygen bond. A time-controlled hydrogenation furnished the D-ring-reduced lactone **35** as a sole diastereoisomer in 54% yield. Similarly, hydrogenation of enone **5** led to bis-lactone **38** in 50% yield. The stereochemistry on the D-ring was proven by Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy correlations observed between H4' and H2'. Oxidation of 2'-epi-GR24 was performed regioselectively by the action of a diluted solution of dimethyl dioxirane to give a 7:3 mixture of epoxides **36** in high yield. Subsequent oxirane opening of **36** by methanol in an acidic medium led to alcohols **37** (7:3).

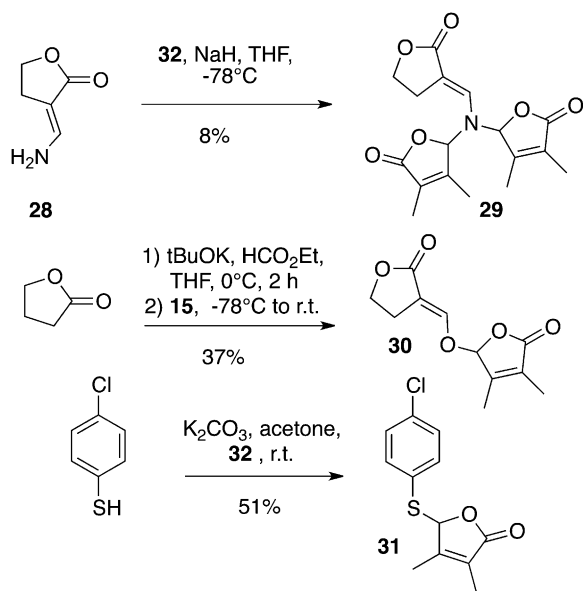


Figure 4. Synthesis of GR5 analogs and SL mimic **31**. Et, Ethyl; r.t., room temperature; tBu, *t*-butyl.

Biological Activities of SLs and Analogs

A simple bioassay was developed using the high-branching SL-deficient *rms1* mutant in garden pea to perform SAR studies on nine natural SLs and 33 analogs (structures are shown in Figs. 1–6) and to further clarify the structural requirements of this novel hormone in the control of shoot branching. Direct application of 10 μL of the solution to be tested on an axillary bud at a given node (generally node 3 or 4) was performed before its outgrowth, and the bud/branch length was measured 10 d later. The different compounds were first tested at a concentration of 1 μM and were considered inactive if no significant difference in the bud length was found compared with the mock control. For active compounds, lower concentrations were tested to analyze quantitative differences in bioactivity between molecules. Globally, when the treated bud was at node 3, its length was higher 10 d after treatment than when the treated bud was at node 4.

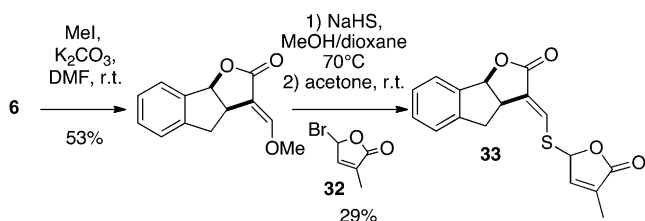


Figure 5. Synthesis of bioisostere **33** of GR24. DMF, Dimethylformamide; Me, methyl; r.t., room temperature.

Apolar SLs Are More Active Than Hydroxy-SLs

All tested natural SLs showed significant activities at a concentration of 1 μM (Table I). 5-Hydroxy-SL (strigol) and 4-hydroxy-SL (orobanchol; which was at the limit of significance in one experiment) showed less activity (Table I) than 5-acetate-SL (strigyl acetate) and 4-acetate-SL (orobanchyl acetate; e.g. at 500 nM, strigol was significantly less active than strigyl acetate [Kruskal-Wallis rank sum test, $P = 0.00047$]; Table I), as recently described for solanacol and solanacyl acetate (Chen et al., 2010). In all cases, acetate-SLs were always more active than their corresponding hydroxy-SLs, with the same dose-dependent activity for orobanchyl acetate, fabacyl acetate, and solanacyl acetate. 5-Deoxystrigol or sorgolactone without an oxygen function on the AB carbon bicycle presented high activity (Table I) better than the hydroxy-SLs (in Table I, compare 5-deoxystrigol and sorgolactone with strigol and orobanchol at 100 nM). In the case of fabacyl acetate, bud outgrowth inhibition activity was also found at the limit of significance at 10 nM (Table I). The best activity obtained with orobanchyl acetate and fabacyl acetate was in accordance with the fact that these SLs were identified in pea exudates (Gomez-Roldan et al., 2008; Xie et al., 2009). The activity differences between natural SLs observed in our bioassay may be attributed to the instability or low lipophilicity of the hydroxy-SLs, which may keep these molecules from reaching their putative receptors. We demonstrated that, in our conditions (ethanol/water), the acetate-SLs were more stable than the corresponding hydroxy-SLs (solanacol versus solanacyl acetate; Fig. 7A). D'orenone, mentioned as a putative intermediate in the SL biosynthesis pathway (Rani et al., 2008) until very recently (Alder et al., 2012), was also evaluated without success in bud outgrowth inhibition activity, even at 50 μM concentration (data not shown).

The Stereochemistry at C2' and the Enantiomeric Purity Have a Low Effect on Bioactivity

The synthesis of (+)- and (–)-solanacol and the corresponding (+)- and (–)-solanacyl acetate allowed us to compare their bioactivity and to conclude that no significant difference was observed concerning each pair of enantiomers (Fig. 8; for solanacol, $P = 0.5601$ in one experiment and $P = 0.7028$ in another one; for

solanacyl acetate, $P = 0.8$, Kruskal-Wallis rank sum test). Similarly, the stereochemistry at C2' had little influence on the bioactivity of the solanacol series (solanacol versus 2'-epi-solanacol; Table I; $P = 0.148$ for 1 μM , Kruskal-Wallis rank sum test). These results were also demonstrated for GR24 (Table II) and compound **23** possessing dimethyl substitution at C3' and C4' (Fig. 9; no significant difference except in one experiment at 10 nM; Kruskal-Wallis rank sum test, $P = 2.358\text{e-}05$) and **2** bearing protected *t*-butoxycarbonyl-amino substituents at the C7 position on the A aromatic ring (Table III; $P = 0.3524$ and $P = 0.4518$ in two different experiments, Kruskal-Wallis rank sum test). However, for the derivative bearing an iodo group at C7 on the A aromatic ring, isomer **1** was found to be more active than isomer 2'-epi-**1** (Table III; $P = 0.00183$ and $P = 0.01842$ in two different experiments, Kruskal-Wallis rank sum test).

The ABC Part of the SL Backbone Can Be Removed without Affecting Bioactivity

SAR studies on synthetic SL analogs revealed that the activity of GR24, the well-known synthetic SL with an aromatic A-ring, as well as the more simple SL analog GR5 lacking A- and B-rings was similar to the most active natural SLs orobanchyl acetate, sorgolactone, and fabacyl acetate in the same concentration

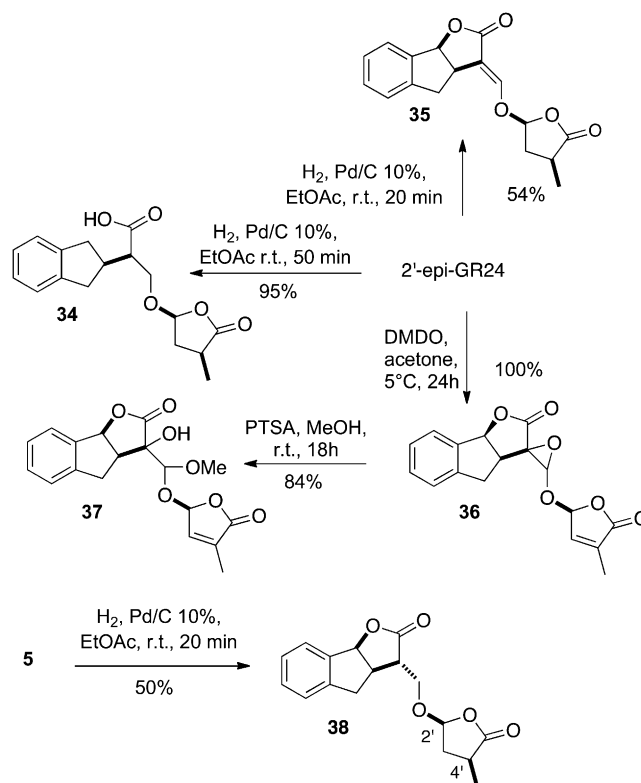


Figure 6. Synthesis of reduced and oxidized GR24 analogs. DMDO, Dimethyl dioxirane; Me, methyl; PTSA, *p*-toluenesulfonic acid; r.t., room temperature.

Table 1. Bud outgrowth inhibition activity assay results for natural SLs and derivatives

P shows comparison of the SL treatment with the control treatment (0 nM) using the Kruskal-Wallis rank sum test.

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 or 5 per Branch ^a	SE	<i>P</i>
		mm		
Strigol	1 μ M	2.56 ^b	0.22	1.138e-06
	500 nM	12.49 ^c	2.22	0.04868
	500 nM	8.47 ^c	2.81	0.8534
	100 nM	12.33 ^c	2.52	0.09966
	100 nM	13.99 ^c	3.39	0.6281
Strigyl acetate	1 μ M	1.79 ^c	0.21	2.827e-05
	500 nM	1.82 ^c	0.21	0.0002111
	100 nM	7.38 ^c	2.35	0.1297
5-Deoxystrigol	1 μ M	2.28 ^b	0.57	1.167e-07
	100 nM	3.99 ^c	1.44	0.01491
Orobanchol	500 nM	5.49 ^c	1.87	0.0005305
	100 nM	10.61 ^c	2.40	0.02416
Orobanchyl acetate	500 nM	1.71 ^c	0.16	0.001448
	500 nM	1.90 ^c	0.23	0.0003437
	100 nM	2.92 ^c	0.50	0.0003486
Sorgolactone	1 μ M	1.65 ^b	0.16	4.83e-08
	100 nM	2.32 ^c	0.36	0.0005833
	100 nM	2.37 ^d	0.23	0.001486
Fabacyl acetate	500 nM	1.69 ^c	0.15	3.606e-05
	100 nM	2.52 ^c	0.28	0.05819
	100 nM	1.62 ^c	0.14	0.002244
	10 nM	2.08 ^c	0.21	0.08477
(±)-Solanacol ^e	1 nM	2.41 ^c	0.81	0.9616
	1 μ M	6.87 ^c	1.74	0.0992
	100 nM	7.66 ^c	2.33	0.03308
(±)-2'-epi-Solanacol ^e	1 μ M	6.87 ^c	1.74	0.007101
	100 nM	14.53 ^c	2.96	0.7473
(–)-Solanacol	1 μ M	5.34 ^b	1.20	1.64e-06
	1 μ M	15.81 ^b	4.19	0.006184
	1 μ M	3.16 ^c	0.58	0.00733
(+)–Solanacol	1 μ M	4.34 ^b	0.87	6.041e-06
	1 μ M	9.58 ^b	3.16	0.000638
	1 μ M	4.68 ^b	1.44	0.0381
(±)-Solanacyl acetate ^e	1 μ M	1.59 ^c	0.14	0.005552
	1 μ M	1.59 ^c	0.14	2.654e-05
	100 nM	3.87 ^c	0.89	0.01044
	100 nM	3.13 ^c	0.57	0.03405
	10 nM	6.26 ^c	1.66	0.1213
	10 nM	2.40 ^c	0.50	0.002546
(+)–Solanacyl acetate (1 μ M)	1 nM	12.13 ^c	1.49	0.1518
	1 μ M	2.70 ^b	0.39	3.19e-06
	1 μ M	3.71 ^c	1.04	0.03391
(–)-Solanacyl acetate (1 μ M)	1 μ M	5.57 ^b	3.72	1.582e-05
	1 μ M	1.90 ^c	0.14	0.00176

^aThese data are means $\pm$ SE ($n = 24$), obtained 10 d after treatment.

^bNode 3.

^cNode 4.

^dNode 5. ^eTested previously (Chen et al., 2010).

range (Tables I, II, and VI). In some experiments, GR5 was even more active when compared with GR24 at 10 nM ($P = 0.0236$, Kruskal-Wallis rank sum test) and at some nodes in hydroponics (see below; Supplemental Figs. S1 and S2), as demonstrated recently in rice (Yamaguchi et al., 2010). The SL mimic **31**, an analog of debranones (Fukui et al., 2011) with a 3,4-dimethylbutenolide D-ring and a 4-(chlorophenyl) thio group replacing the ABC part, also presented

significant activity in branching repression at nanomolar concentrations (Table VI).

The D Part of the SL Backbone Attached to a Suitable Unsaturated System Is Essential for Bioactivity

The influence of the D-ring was established by the following results. The analogs of GR24, in which the enol ether group ($>C = CH-O-$) was replaced by an

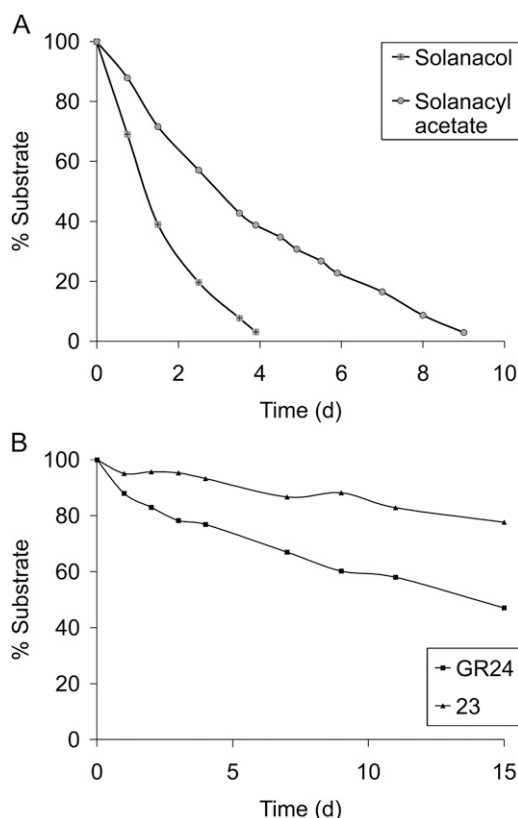


Figure 7. A, Chemical stability of solanacol and solanacyl acetate in a solution of ethanol:water (1:4, v/v) at 21°C (pH 6.7). B, Chemical stability of GR24 and **23** in a solution of ethanol:water (1:4, v/v) at 21°C (pH 6.7).

enamino group ($>C = CH-N-$) bearing either a benzyl (**7**, **9**) or a glucosyl (**10**) group (Fig. 3), were inactive at 1 μM concentration (Table IV). The D-ring precursor **3** was also found to be inactive, as was the combination of **3** with the ABC tricyclic derivative **6** or **27** (Table IV). Modifications of the substitution of the D-ring led to a drastic effect on bioactivity. Substitutions by a methoxy group at the C3' or C4' position (**20–22**) or lack of a methyl group (**19**) at the same positions led to an activity loss (Table IV). However, both compounds **23** and **31** possessing dimethyl substitution at C3' and C4' were more active than GR24 and its GR5 analog **30** (Tables IV and VI; Fig. 10; **23/2'-epi-23** were significantly more active than GR5 at 10 nM; Kruskal-Wallis rank sum test, $P = 0.01135$). This higher activity could be correlated with the relative high stability of **23** in aqueous medium in comparison with GR24 (Fig. 7B). The substitution at C2' by a methyl group (**25**) or at C3' by a butyl group (**26**) instead of a methyl group (**23**) significantly decreased bioactivity (Table IV). To study the influence of the double bonds at C3C6' and C3'C4', reduced and oxidized analogs of GR24 were evaluated. Completely reduced derivative **34**, 3,6',3',4'-tetrahydro-2'-epi-GR24 (**38**), and analogs with an oxidized enol ether group (**36**, **37**) were either inactive or only slightly active (Fig. 6; Table V). The very low

activity of epoxide **36** could be explained by the fast degradation (less than 1 h) of this compound under the test conditions (acetone/ethanol/water) via the opening of the oxirane ring and cleavage of the D-ring (data not shown). Analogs **35** with a saturated D-ring and **5**, in which the carbon double bond in the CD-connecting enol ether was reduced to a single bond, presented significant activity (Table V) at micromolar concentrations but decreased rapidly as the concentration decreased. Finally, replacing the heteroatom attached at C6 by nitrogen or sulfur (**29**, **33**; Figs. 4 and 5) showed no activity for bud outgrowth inhibition (Tables V and VI).

Bioactivity of SLs When Applied via the Root System

To investigate the effects of the most active SL analogs (GR24, GR5) and analog **23** on shoot branching when provided via the roots, we developed a hydroponic culture system in which pea seedlings were placed 6 d after sowing (before leaf expansion at node 3). SLs were added at this stage into the culture solution, and branching at each node was observed 2 weeks later. In a first experiment (Supplemental Fig. S1), GR24 and GR5 were added at a final concentration of 3 μM . Bud outgrowth was significantly repressed at the upper nodes (nodes 3 and 4) by treatment with either or both SLs. In pea, the number of axillary buds per axil differed along the stem and was highest at node 2, where four buds could be found, with one being larger than the remainder (the accessory buds; Gould et al., 1987). At the basal nodes (nodes 1 and 2), two branches per node were generally observed for our SL-deficient *rms1* mutant line. The lengths of the different basal branches were measured and analyzed separately in the *rms1* mutant grown on the hydroponic system. A significant reduction of the bud/branch length was observed only for the second branch at both nodes for GR5 and only at

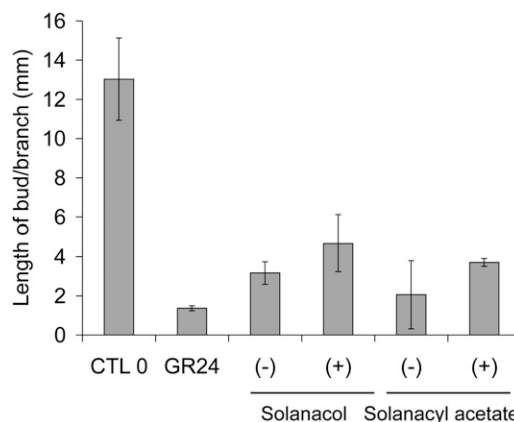


Figure 8. Activity of (+)- and (-)-solanacol and (+)- and (-)-solanacyl acetate. Lengths of axillary buds are shown at 10 d after direct application of a solution at 1 μM at node 4. Data are means $\pm$ SE ($n = 24$). CTL 0, Control 0.

Table II. Bud outgrowth inhibition activity assay results for GR24 analogs: influence of the stereochemistry at C2'

P shows comparison of the SL treatment with the control treatment (0 nM) using the Kruskal-Wallis rank sum test.

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 or 5 per Branch ^a	SE	<i>P</i>
		mm		
GR24/2'-epi-GR24 GR24	(1:1) 1 μ M	1.13 ^b	0.06	0.0001434
	1 μ M	1.81 ^c	0.17	3.658e-08
	1 μ M	2.32 ^c	0.21	7.703e-07
	1 μ M	3.16 ^c	1.03	3.123e-07
	1 μ M	5.02 ^c	1.08	0.0002323
	1 μ M	5.58 ^c	2.29	3.431e-07
	1 μ M	1.37 ^b	0.13	1.814e-05
	1 μ M	1.38 ^b	0.15	0.00296
	1 μ M	1.39 ^b	0.09	0.01278
	1 μ M	1.54 ^b	0.09	2.246e-05
	1 μ M	1.80 ^b	0.21	0.002495
	500 nM	1.40 ^b	0.18	0.00419
	500 nM	1.69 ^b	0.18	2.733e-05
	500 nM	1.89 ^b	0.29	0.001434
	500 nM	5.48 ^b	1.85	0.0006748
	100 nM	1.87 ^c	0.13	5.42e-08
	100 nM	4.39 ^c	0.38	1.598e-07
	100 nM	7.26 ^c	1.75	0.001085
	100 nM	16.78 ^c	3.76	0.001103
	100 nM	1.44 ^b	0.06	6.515e-07
	100 nM	1.57 ^b	0.13	0.001664
	100 nM	1.66 ^b	0.13	7.789e-05
	100 nM	3.15 ^b	1.10	0.006062
	100 nM	3.65 ^b	1.88	0.0007414
	100 nM	3.74 ^b	1.59	0.0001373
	100 nM	3.74 ^b	0.82	0.001448
	100 nM	4.83 ^b	1.50	0.0004835
	100 nM	6.56 ^b	2.89	0.002068
	100 nM	1.87 ^d	0.24	0.0007518
	10 nM	14.05 ^c	1.79	0.1837
	10 nM	14.99 ^c	2.39	0.2825
	10 nM	28.74 ^c	3.46	0.1188
	10 nM	1.76 ^b	0.12	2.011e-05
	10 nM	1.90 ^b	0.24	0.03709
	10 nM	3.93 ^b	1.53	0.003062
	10 nM	11.85 ^b	2.24	0.942
	1 nM	8.42 ^c	1.66	0.006272
	1 nM	19.53 ^c	0.87	0.4435
	1 nM	2.22 ^b	0.22	0.003631
	1 nM	3.36 ^b	0.70	0.6577
	0.1 nM	3.87 ^b	0.28	0.42
	0.01 nM	16.32 ^c	1.28	0.1518
2'-epi-GR24 23	1 μ M	1.23 ^b	0.08	0.0008346
	1 μ M	1.80 ^c	0.11	7.656e-08
	1 μ M	1.96 ^c	0.13	3.804e-08
	100 nM	1.49 ^c	0.07	1.217e-07
	100 nM	1.67 ^c	0.14	5.061e-08
	100 nM	1.78 ^c	0.09	9.488e-09
	100 nM	1.82 ^c	0.11	1.55e-05
	100 nM	2.01 ^c	0.13	1.344e-08
	100 nM	2.14 ^c	0.16	1.29e-06
	100 nM	2.44 ^c	0.47	1.637e-05
	10 nM	1.66 ^c	0.13	2.952e-06
	10 nM	2.13 ^c	0.13	8.939e-09
	10 nM	2.81 ^c	0.49	9.998e-06
	10 nM	3.06 ^c	0.74	4.543e-05

(Table continues on following page.)

Table II. (Continued from previous page.)

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 or 5 per Branch ^a	SE	P
2'-epi-23	10 nM	8.81 ^c	3.11	4.398e-05
	1 nM	4.43 ^c	0.83	2.531e-07
	1 nM	7.27 ^c	1.61	0.003078
	1 nM	11.94 ^c	1.93	0.5845
	1 nM	13.88 ^c	3.83	0.007361
	0.1 nM	18.70 ^c	1.44	0.1024
	0.1 nM	28.65 ^c	3.65	0.9561
	0.1 nM	2.63 ^b	0.16	0.04531
	0.01 nM	11.75 ^c	1.45	0.0814
	100 nM	1.79 ^c	0.13	3.919e-05
	100 nM	1.76 ^c	0.23	7.853e-07
	10 nM	1.84 ^c	0.11	1.931e-05
	10 nM	1.66 ^c	0.13	2.952e-06
	1 nM	11.36 ^c	2.57	0.386
	0.1 nM	18.70 ^c	1.44	0.1024

^aThese data are means $\pm$ SE ($n = 24$), obtained 10 d after treatment. ^bNode 4. ^cNode 3.
^dNode 5.

node 1 for GR24 (Supplemental Fig. S1). In a second experiment, GR24 and **23** were added at a final concentration of 1 μM . At the upper nodes, both SLs significantly repressed bud outgrowth. At the basal nodes, GR24 and **23** significantly reduced the branch length of the second one at both nodes (Fig. 11). Compound **23** also significantly reduced the growth of the main branch at node 1. To summarize, experiments with the hydroponic culture in which SLs were applied via the root system confirmed the results obtained with direct application onto the axillary bud, where GR5 and especially compound **23** showed higher bioactivity than did GR24 for branching inhibition.

A Molecular Assay Using *PsBRC1* Transcript Levels

The transcript level of *PsBRC1* was reduced in the axillary buds of SL-deficient mutants in comparison with the wild type (Braun et al., 2012). This gene, mostly expressed in the axillary bud, is transcriptionally up-regulated by SLs without the requirement of protein synthesis, and its transcript level in the axillary bud correlates with the observed bud growth responses in the SL-deficient *rms1* mutant (Braun et al., 2012; Dun et al., 2012). The activity of solanacol and solanacyl acetate, which showed a quantitative difference in bioactivity for bud outgrowth inhibition, was tested at the molecular level. Their effects on the *PsBRC1* transcript level were quantified using real-time PCR in *rms1* axillary buds 6 h after direct application of GR24, solanacol, and solanacyl acetate at a concentration of 1 μM . Bud length was measured 10 d after SL application to ensure their activity in this experiment (Fig. 12A). In comparison with the control without SL, at 1 μM , the three SLs induced a significant increase in *PsBRC1* expression (Fig. 12B). At 500 nM, only GR24 and solanacyl acetate induced significant increases in *PsBRC1* expression (Supplemental Fig. S3).

At 1 μM , solanacyl acetate triggered a higher *PsBRC1* expression than solanacol and GR24 (Fig. 12B). Consequently, phenotypic and molecular assays were in agreement for the branching control test of SLs, but differences were observed between assays. Solanacyl acetate showed higher activity than did GR24 according to the molecular assay, whereas both SLs showed the same activity in the branching assay.

Germination Stimulation Activity

The germination stimulatory activity of natural SLs and analogs was extensively studied in the past with a range of one-half-maximal effective concentration (EC_{50}) values (10^{-10} to 10^{-15} M) varying according to the root parasitic plants (*Orobanch*, *Striga*; Kim et al., 2010; Malik et al., 2011). In this study, the EC_{50} of each compound was determined with a range of concentrations tested between 10^{-16} and 10^{-4} M and the maximum percentage of germination. EC_{50} reflects the affinity of the compounds to the putative receptor over the effectiveness of the response induced. No significant

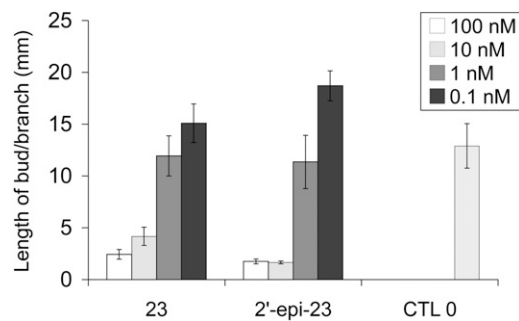


Figure 9. Comparative activity of SL analogs **23** and 2'-epi-**23**. Lengths of axillary buds are shown at 10 d after direct application at node 3. Data are means $\pm$ SE ($n = 24$). CTL 0, Control 0.

Table III. Bud outgrowth inhibition activity assay results for GR24 analogs: influence of the substitution on the A-ring

P shows comparison of the SL treatment with the control treatment (0 nM) using the Kruskal-Wallis rank sum test.

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 per Branch ^a	SE	<i>P</i>
		mm		
1	1 μ M	2.55 ^b	0.20	5.113e-07
	1 μ M	1.68 ^c	0.16	1.304e-05
	500 nM	3.93 ^b	1.06	2.996e-06
	100 nM	4.28 ^c	1.16	5.272e-05
2'-epi- 1	1 μ M	4.80 ^b	0.93	4.339e-06
	1 μ M	7.24 ^c	2.46	0.02181
2	1 μ M	4.09 ^c	1.74	0.1266
	500 nM	2.20 ^c	0.26	0.08286
2'-epi- 2	1 μ M	2.90 ^c	1.10	0.3367
	500 nM	4.90 ^c	2.80	0.1185

^aThese data are means $\pm$ SE ($n = 24$), obtained 10 d after treatment.

^bNode 3.

^cNode 4.

difference was observed for the maximum germination percentage (from 94% $\pm$ 4% to 96% $\pm$ 3%) obtained between the different SLs (ANOVA, $P < 0.05$). Activities of SLs were then compared using their EC₅₀. The most potent compounds for branching inhibition (GR24, GR5, **23**) were examined for their activity on seed germination in comparison with other SL analogs. Seeds of

P. ramosa were used, and in our hands, the best activity was observed for GR24 (EC₅₀ $\pm$ SE = $3.4 \times 10^{-12} \pm 2.1 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹; Fig. 13). The stereochemistry at C2' had no significant influence on the bioactivity in the GR24 series (GR24 versus 2'-epi-GR24, $3.4 \times 10^{-12} \pm 1.18 \times 10^{-12}$ and $2.13 \times 10^{-12} \pm 1.18 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹, respectively; Student's *t* test, $P < 0.05$; Fig. 13). As already

Table IV. Bud outgrowth inhibition activity assay results for GR24 analogs: influence of the D-ring

P shows comparison of the SL treatment with the control treatment (0 nM) using the Kruskal-Wallis rank sum test.

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 per Branch ^a	SE	<i>P</i>
		mm		
3	1 μ M	32.09 ^b	6.00	0.9167
6	500 nM	21.32 ^c	2.67	0.7579
6/3	(1:1) 500 nM	19.55 ^c	3.68	0.9019
7	1 μ M	18.38 ^b	1.03	0.195
9	1 μ M	19.63 ^b	0.86	0.6184
10	1 μ M	17.89 ^b	1.53	0.4226
27/3	(1:1) 1 μ M	29.81 ^b	3.69	0.2461
19	1 μ M	6.82 ^c	2.53	0.9097
20/2'-epi-20	(1:1) 1 μ M	6.58 ^c	2.16	0.7445
21	1 μ M	18.09 ^b	0.11	0.2672
22/2'-epi-22	(1:1) 1 μ M	17.56 ^b	1.52	0.1478
23/2'-epi-23	(1:1) 1 μ M	2.67 ^b	0.19	1.895e-08
	(1:1) 1 μ M	2.55 ^b	0.28	4.191e-06
	(1:1) 100 nM	3.22 ^b	0.29	4.328e-08
	1:1) 100 nM	1.81 ^b	0.12	5.225e-06
	(1:1) 10 nM	3.46 ^b	0.34	3.937e-08
	1:1) 10 nM	1.89 ^b	0.14	1.233e-05
	(1:1) 1 nM	8.31 ^b	2.32	0.0247
	1:1) 1 nM	4.37 ^b	1.19	0.0002118
	(1:1) 0.1 nM	8.07 ^b	1.50	0.03062
	(1:1) 1 μ M	14.90 ^b	4.14	0.09312
25/2'-epi-25	(1:1) 1 μ M	6.57 ^b	2.53	0.0002661

^aThese data are means $\pm$ SE ($n = 24$), obtained 10 d after treatment.

^bNode 3.

^cNode 4.

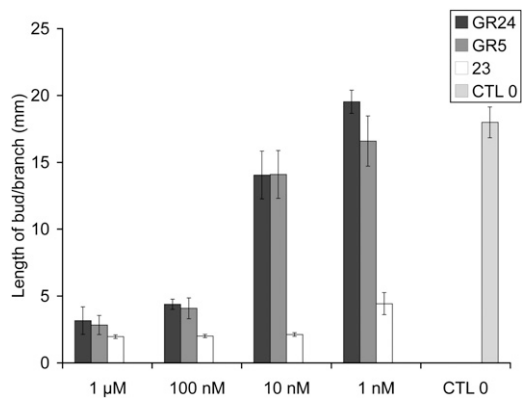


Figure 10. Dose-dependent activity of the most active SL analogs GR24, GR5, and **23** for branching inhibition. Lengths of axillary buds are shown at 10 d after direct application at node 3. Data are means ± SE (*n* = 24). CTL 0, Control 0.

described (Johnson et al., 1981), GR5 analogs (Table VII) were less active than their corresponding GR24 analogs (about 10- to 1,000-fold). Interestingly, analog **23** presented moderate activity in comparison with GR5 or GR24 (about 100 and 10,000 times less active, respectively; Supplemental Fig. S4). The reduced analogs of GR24 at C3C6' positions (**4** and **5**) and the reduced analog **35** at C3'C4' presented, in our study, moderate and good activity for the germination of *P. ramosa*, respectively (Fig. 13). In contrast, these compounds showed no activity on *Striga hermonthica* and *Orobancha crenata* seed germination (Mangnus and Zwanenburg, 1992).

DISCUSSION

Pea Branching Assays

Few SLs were tested for shoot branching inhibition so far (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Chen et al., 2010), not only because the hormonal function of SLs was discovered a few years ago but also because of the difficulty of the treatment and the relatively large amount of samples required in some species such as rice, where a hydroponic culture has to be used (Umehara et al., 2008; Fukui et al., 2011). In this SAR study, in which 42 molecules were tested, often with different concentrations, pea was proven to be an excellent model. Its simple architecture is particularly suitable for exogenous hormone applications, and access to axillary buds is very easy. One major advantage of our bioassay with direct bud application is the small quantity (less than 1 mg) of molecule needed. Using this assay, the most active compounds showed a significant activity at a concentration of 10 nM. Notable activities at 1 nM were also observed for **23**/2'-epi-**23** and **31** in some experiments. These results indicate a highly sensitive perception system for SL and a particularly potent activity as demonstrated for AM fungi (Akiyama and Hayashi, 2006) and for seed germination (Xie and Yoneyama, 2010). Certain molecules may be applied through the roots for several days using a hydroponic system, and their effect on branching at several nodes can be analyzed. Using this system, response differences between buds depending on their positions on the stem or between buds at basal nodes were shown. The SLs tested with hydroponics (GR24, GR5, **23**) were able to reduce branch lengths at

Table V. Bud outgrowth inhibition activity assay results for GR24 analogs: influence of the double bonds at C3C6' and C3'C4' and influence of the nature of the heteroatom between C and D

P shows comparison of the SL treatment with the control treatment (0 nM) using the Kruskal-Wallis rank sum test.

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 per Branch ^a	SE	<i>P</i>
		mm		
34	1 μM	15.64 ^b	1.49	0.02134
	1 μM	7.28 ^c	2.62	0.6719
35	1 μM	8.34 ^b	1.53	0.0001411
	500 nM	2.20 ^c	0.16	0.1321
	500 nM	2.10 ^c	0.10	0.07155
	100 nM	11.83 ^c	3.08	0.3319
36	1 μM	17.15 ^c	4.24	0.1831
	1 μM	10.22 ^b	1.84	0.0003181
37	1 μM	17.13 ^b	1.29	0.1482
	1 μM	5.53 ^c	2.71	0.1932
4	1 μM	4.15 ^c	0.83	0.08025
5	1 μM	5.55 ^b	1.35	9.923e-06
	1 μM	11.38 ^b	2.60	0.01761
	1 μM	1.87 ^c	0.15	0.0002597
	500 nM	1.47 ^c	0.08	0.008959
	100 nM	18.23 ^b	2.45	0.5782
38	1 μM	9.07 ^b	1.72	0.001774
33	1 μM	25.20 ^b	4.74	0.162

^aThese data are means ± SE (*n* = 24), obtained 10 d after treatment. ^bNode 3. ^cNode 4.

Table VI. Bud outgrowth inhibition activity assay results for GR5 analogs and SL mimic **31**

P shows comparison of the SL treatment with the control treatment (0 nM) using the Kruskal-Wallis rank sum test.

Compound	Concentration	Length of Bud at Node 3 or 4 per Branch ^a	SE	<i>P</i>
		mm		
GR5	1 μ M	2.76 ^b	0.27	3.842e-06
	1 μ M	2.84 ^b	0.71	6.845e-08
	1 μ M	3.45 ^b	0.31	2.456e-08
	100 nM	2.29 ^b	0.26	3.78e-05
	100 nM	4.08 ^b	0.77	1.373e-07
	100 nM	6.46 ^b	1.25	0.0003009
	100 nM	16.78 ^b	4.70	0.002689
	100 nM	1.58 ^c	0.15	1.773e-05
	100 nM	1.87 ^c	0.10	0.002514
	10 nM	6.88 ^b	2.56	0.0006954
	10 nM	13.70 ^b	2.05	0.08664
	10 nM	14.10 ^b	1.79	0.1228
	10 nM	28.35 ^b	4.40	0.3172
	10 nM	5.15 ^c	1.85	0.03928
	1 nM	16.59 ^b	1.88	0.7095
	1 nM	8.16 ^c	2.12	0.5715
29	1 μ M	24.17 ^b	4.19	0.06404
30	1 μ M	2.60 ^b	0.50	9.502e-08
	100 nM	6.15 ^b	1.29	5.678e-06
	10 nM	11.24 ^b	1.64	0.001544
31	1 nM	17.30 ^b	1.48	0.6843
	1 μ M	1.81 ^b	0.11	8.726e-08
	1 μ M	2.05 ^b	0.12	5.012e-07
	100 nM	2.00 ^b	0.11	1.348e-07
	100 nM	2.36 ^b	0.17	5.494e-06
	100 nM	1.56 ^c	0.06	1.032e-07
	10 nM	2.43 ^c	0.30	2.303e-06
	10 nM	1.65 ^c	0.07	8.542e-07
	1 nM	8.28 ^b	1.28	0.0003896
	1 nM	1.91 ^c	0.21	0.0002094
	0.1 nM	3.02 ^c	0.36	0.1417
	0.01 nM	17.24 ^b	1.42	0.11

^aThese data are means $\pm$ SE ($n = 24$), obtained 10 d after treatment.

^bNode 3.

^cNode 4.

all nodes except for those at basal nodes (nodes 1 and 2), where only the small branch was inhibited. At these particular nodes, corresponding to scale leaves, the SL-deficient *rms1* mutant displayed two branches. Here, we found that even the most active SL was not able to reduce the main branch at node 2. At node 1, only **23** significantly reduced the growth of the main branch. In pea, wild-type lines often displayed one strong basal branching at nodes 1 and 2, suggesting that even endogenous SLs are not able to inhibit outgrowth of the main axillary bud at these nodes while axillary buds at upper nodes and accessory buds at basal nodes are inhibited. Consequently, the use of synthetic SL analogs to control shoot architecture may not be efficient to repress branching for all buds according to their positions along the stem. Two (nonexclusive) hypotheses are currently proposed for the action of SL to repress branching: (1) a direct and local action in the bud via *PsBRC1* (Braun et al., 2012); (2) a systemic action by dampening auxin transport and enhancing

competition between shoot branches (Crawford et al., 2010). The fact that at basal nodes, where more than two buds are present, SL treatment generally inhibits the small branch while the strongest one is not inhibited could suggest that SL treatment increases the competition between the two branches at these nodes. Nevertheless, here, we show that the most active SL, **23**, is able to significantly inhibit the outgrowth/growth of both branches at node 1. This basal branching can also be inhibited by direct application of GR24 at high concentrations (e.g. 2 μ M; Brewer et al., 2009), whereas only one application of GR24 at 100 nM is enough to inhibit axillary bud outgrowth at nodes 3 and 4. This is why we chose these nodes for our bioassay. Consequently, according to its position along the stem, the axillary bud will be more or less responsive to a local SL treatment or via the vascular stream. Because *PsBRC1* integrates SL and cytokinin signals that act antagonistically to regulate bud outgrowth (Braun et al., 2012), it is also possible that the cytokinin response may

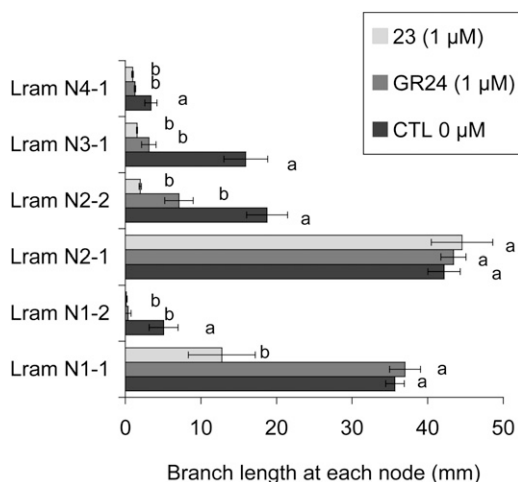


Figure 11. Bioassay on bud outgrowth using hydroponic culture. A comparison of the activity of GR24 and **23** at $1 \mu\text{M}$ is shown. Axillary bud lengths are shown at each node of *rms1* plants 2 weeks after treatment. Lram Ni-j, Ramification length at node i. j = 1 means the main branch at this node, and j = 2 means the second branch at this node when visible. Data are means $\pm$ SE ($n = 12$). Values that have the same letter (a or b) are not significantly different at $P = 0.05$. CTL 0, Control 0.

explain the difference in bud outgrowth potential according to its position on the stem.

Analysis of transcript levels of *PsBRC1* in a molecular assay was carried out to compare two SLs showing quantitatively different activities in our branching assay. Our results suggest that this molecular assay could be applied to test and compare the hormonal activity of SL analogs, particularly molecules with relatively low stability. This assay is based on transcript levels 6 h after SL application, whereas in the branching assay it is not clear how long the molecule needed to be active to repress bud outgrowth. This molecular assay could be used to investigate the lipophilicity of molecules and the penetration rate of the molecule in the tissue.

It is very likely that the activity for branching inhibition of the tested molecules is not toxicity. In our bioassay, when buds are “killed,” their color changes from green to white/yellow. To confirm the activity of the molecule in branching inhibition and to discriminate from a possible toxicity, the molecule could be tested on a SL response mutant (e.g. *rms4*). In the case of toxicity, branching inhibition should also be observed in this mutant, whereas if the molecule is active using the *rms1* SL-deficient mutant, the same molecule should not inhibit bud outgrowth in *rms4*.

SL Structural Requirements for Repressing Branching

One major breakthrough in the discovery of SLs as a plant hormone can be seen in the study by Matusova et al. (2005) showing that SLs were derived from the carotenoid pathway. A SL biosynthesis scheme from β -carotene was proposed with olefin bond cleavage by

CCD as a first step leading to the putative intermediate d'orenone, followed by several steps of reductions, allylic alcohol rearrangement, oxidation, allylic isomerizations, cyclizations, and coupling of the ABC intermediate with the D-ring precursor (Rani et al., 2008). From 5-deoxystrigol and 2'-epi-5-deoxystrigol, which may be common in many plants, further hydroxylations could lead to hydroxy-SLs and further acetylation to acetate-SLs. D'orenone was inactive in our conditions, demonstrating that this putative precursor could not be transformed to the active compound in the bud. Accordingly, a new biosynthesis scheme was proposed very recently (Alder et al., 2012) where trans- β -carotene is isomerized and then cleaved by CCD7 and CCD8 to give carlactone, a compound possessing A- and D-rings and the enol ether bridge, before being transformed in 5-deoxystrigol.

All nine natural SLs tested were active for branching inhibition, but with a quantitative difference in activity. Some synthetic SLs were as active as various natural SLs in the same range of concentrations (10^{-6} to 10^{-9} M), in which analog **23** was even more active. It appeared that lipophilicity is a major factor of the activity of natural SLs, since the hydrophobic natural SLs (5-deoxystrigol, sorgolactone, acetate-SLs) tested were more active in our bioassays than the hydroxy-SLs (strigol, orobanchol, solanacol).

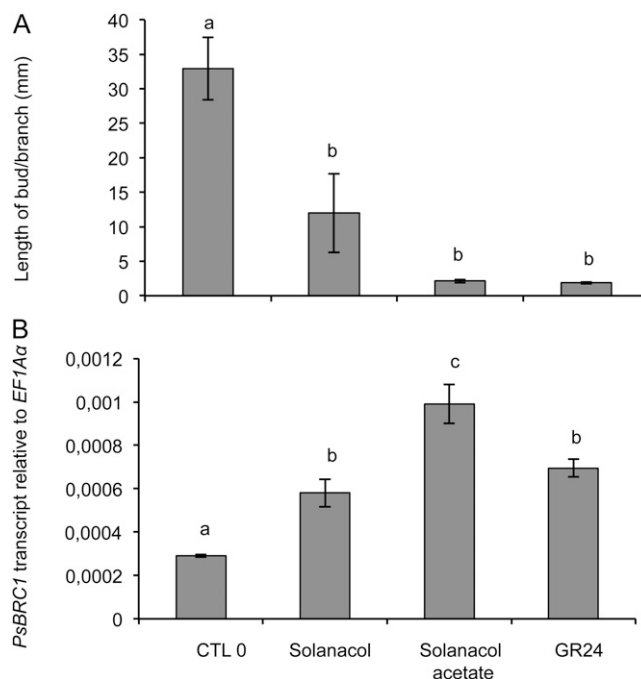


Figure 12. Effect of different SLs ($1 \mu\text{M}$) on *PsBRC1* transcript levels in axillary buds at node 3 of *rms1* plants. Plants were treated by direct application on the bud. A, Length of the axillary bud 10 d after treatment at node 3. Data are means $\pm$ SE ($n = 12$). B, *PsBRC1* transcript levels in the axillary bud 6 h after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 30 plants). Values that have the same letter (a–c) are not significantly different at $P = 0.05$. CTL 0, Control 0.

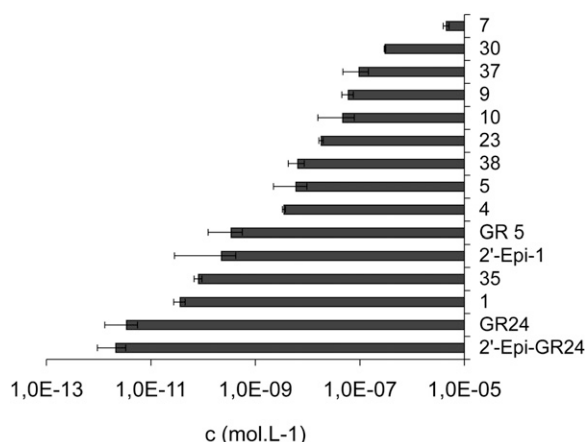


Figure 13. EC₅₀ (mol L⁻¹) of various SL analogs toward *P. ramosa* seed germination.

All natural SLs identified so far from various plants bear invariant lactone heterocycles C and D, being connected by an ether enol bond. The SL structural requirements for shoot branching inhibition were demonstrated to be essential in this part of the molecule. Small modifications in this moiety of SLs led to drastic consequences on the bioactivity. If replacements of the carbon-carbon double bond at C3C6' or C3'C4' and substitution at C2' led to a significant reduction of the bioactivity, the addition of methyl at C3' led to the very active compound **23** studied here. These results suggest that the D-ring is essential for bioactivity and that a small substitution at C3' could modulate the interaction with the putative receptor and/or favor the formation of the active compound. The modifications on the AB part were not sufficient to substantially increase or decrease bioactivity. Similarly, the stereochemistry at C2' or the absolute configuration had no effect on the bioactivity. The SAR of synthetic SLs showed that the ABC hydrophobic skeleton was not essential for the bud outgrowth inhibition activity and could easily be replaced by only the C-ring. These observations were also recently demonstrated in rice (Fukui et al., 2011), where debranones possessing only the D-ring connected to an aromatic cycle without the ABC part presented similar activity to GR24.

We could speculate that one of the functions of the ABC part is to provide a hydrophobic tail to facilitate the transport of SLs toward a putative receptor and influence the stability of the molecule. It is suggested that the SL instability is essential for their role in the rhizosphere as signaling the proximity of a host root to fungi and parasitic seeds (Parniske, 2008). *Orobanch* and *Striga* plants as well as AM fungi are obligate biotrophs and must colonize plant roots to obtain reduced carbon and to complete their life cycle. A steep SL concentration gradient may result from this instability, and spores and seeds will germinate only when located close to the host root. Whether this instability would also be essential for their hormonal role in the

shoot is unlikely. The active branching inhibitor may not be one of the known SLs, and the SLs identified to date may only be the precursors. This hypothesis was proposed with the characterization of the dwarf and high-tillering rice *d14* mutant and the cloning of the rice *D14* gene encoding a protein of the α/β -hydrolase superfamily. D14 was suggested to act either at a later step of the active branching inhibitor biosynthesis or in its signaling pathway (Arite et al., 2009).

Other roles of SLs in regulating plant architectures were recently described, such as their involvement in root growth (Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011), in the stimulation of cambium activity (Agusti et al., 2011), and in nodule formation in planta (Soto et al., 2010; Foo and Davies, 2011). Whether this SL SAR study for the control of branching applies for these novel hormonal effects will need further investigation.

Comparison with Structural Requirements of SLs for Hyphal Branching in AM Fungi and for Seed Germination of Parasitic Plants

The structural requirements of SLs for hyphal branching in AM fungi (Akiyama et al., 2010) and for seed germination of parasitic plants (Xie et al., 2008; Kim et al., 2010) have been extensively studied, revealing the importance of the stereochemistry at C2' and the absolute configuration for both functions in contrast to SL requirements for branching inhibition. Various SL mimics were synthesized and tested (Zwanenburg et al., 2009; Zwanenburg and Mwakaboko, 2011) essentially for seed germination of the parasitic plant function, due to the relative easiness and well-known expertise to perform these bioassays.

One main common structural requirement between the three SL functions is the CD-ring moiety. The truncation of the AB-rings and even the ABC-rings (see compound **31**) has no consequence on hormonal activity, whereas GR5 is inactive for hyphal branching and significantly less active for seed germination. The oxygenation of the SL backbone has a significant effect on the germination of parasitic weeds (Kim et al., 2010), contrary to the effect on AM fungi hyphal branching (Akiyama et al., 2010) or on pea branching inhibition.

Because in the putative receptor site, only nucleophilic functionalities would be available for initiating a reaction, two mechanisms involving in each case a Michael addition have been proposed for seed

Table VII. EC₅₀ of SL analogs on *P. ramosa*

Compound	EC ₅₀	SE
	M	
GR24	2.13×10^{-12}	1.18×10^{-12}
GR5	3.44×10^{-10}	2.19×10^{-10}
23	1.9×10^{-8}	1.7×10^{-9}
30	3.0×10^{-7}	1.1×10^{-8}

germination activity. Initially, Zwanenburg et al. (2009) suggested the initial binding of the SL followed by a nucleophilic attack in a Michael fashion at the enol ether bridge. Due to the activity in this recently found model of 2-aryloxyfuranone (Zwanenburg and Mwakaboko, 2011), Zwanenburg proposed an alternative mechanism. A nucleophile would add to the furanone also in a Michael fashion, followed by elimination of the group at C2 after an internal proton shift. Our results show that the enol function is important for bud outgrowth inhibition. Without this chemical function, the activity of the SL analogs decreases but always exists, as for hyphal branching in AM fungi (Akiyama et al., 2010) and for the parasitic plant model but differing according to the species (Mangnus and Zwanenburg, 1992; this study). The higher activity of **23** and **31** in comparison with other SLs in the pea branching test suggests that the mechanisms proposed by Zwanenburg and Mwakaboko (2011) for seed germination of parasitic plants may be different for branching inhibition: no internal proton shift could be involved with these last structures. Globally, important SL structure variations seem to affect bioactivity dramatically for AM fungi hyphal branching, moderately for parasitic seed germination stimulation, and weakly for the shoot branching inhibition. These observations would suggest that each system uses a distinct perception system. In accordance with our data, an alternative mechanism for the SL mode of action involving the hydrolysis of the butenolide D-ring was very recently proposed (Scaffidi et al., 2012).

This work confirmed the essential role of the D-ring for SL bioactivity for different biological functions. The γ -butyrolactones and specifically α,β -unsaturated furanones, including SLs with their D-ring, are important natural chemical mediators. Indeed, this class of compounds are found as pheromones (Tumlinson et al., 1977), allelochemicals, or *N*-acyl homo-Ser lactones, hormone-like signals by which bacteria can communicate with each other and coordinate their gene expression in a cell density-dependent manner, a process known as quorum sensing (Galloway et al., 2011). SLs represent a fascinating example of plant hormones with multiple signaling roles between different kingdoms, in parasitic interaction between plants, or between moss individuals to regulate their extension and the potential structure of moss communities (Proust et al., 2011). Whether these roles derived from their specific structures is an intriguing question (Tsuchiya and McCourt, 2012). The identification of SL receptors and signaling pathways in the different systems will help us better understand the evolution of functions of this remarkable and intriguing class of compounds.

CONCLUSION

SL structural requirements for shoot branching inhibition were determined through the study of 42

various natural SLs and analogs and are summarized in Figure 14. The presence of the D-ring is essential for hormonal activity. The stereochemistry at C2' is not an important structural feature for potent activity. The most active SL analogs for bud outgrowth repression were found to be GR5 and analogs **23** and **31** possessing a 3,4-dimethylbutenolide D-ring, and not GR24, which was previously found to be the most active SL analog for inducing arasitic weed germination (Zwanenburg et al., 2009) and for AM fungi hyphal branching (Besserer et al., 2006; Akiyama et al., 2010). These results suggest, to our knowledge for the first time, that branching signal recognition could present some distinctive features, compared with the perception of the signal for the different models. These results established that an SL analog, compound **23** or **31**, could be used to control plant architecture without favoring the parasitic plant *P. ramosa*. We have demonstrated that the presence of both an α,β -unsaturated system and a methylbutenolide or dimethylbutenolide as the D-ring in the same molecule is essential. Our SAR study establishes that SLs show potent activity in a structure-dependent manner via a receptor-mediated mechanism but with low specificity concerning the stereochemistry or the substitution of SLs. Genetic approaches using branching mutants not responding to exogenous SL applications and analogy with other hormone signaling pathways have led to two candidate proteins for the SL receptor, the F-box protein encoded by the *MAX2/RMS4/D3* gene and the D14 protein of the α/β -fold hydrolase superfamily (Arite et al., 2009; Beveridge and Kyoizuka, 2010). Once identified, the SL receptor may be used for the development of other assays to investigate ligand specificity.

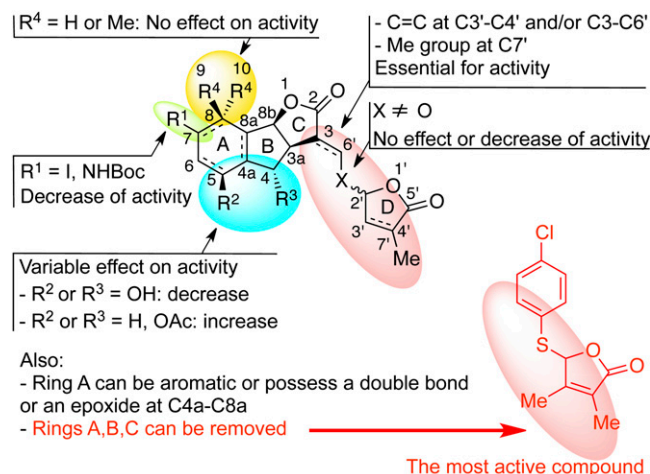


Figure 14. Effects of SL structural modifications on bud outgrowth inhibition in the pea model. Ac, Acetyl; Boc, *t*-butoxycarbonyl; Me, methyl.

MATERIALS AND METHODS

General Remarks

Infrared (IR) spectra were recorded as neat. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded as solutions in CDCl_3 , using residual protic solvent CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.24$ ppm) or CDCl_3 ($\delta_{\text{C}} = 77.23$ ppm) as an internal reference. Mass spectra were determined by electrospray ionization (ESI). All reactions were monitored by thin-layer chromatography carried out on 0.2-mm aluminum silica gel pre-coated plates using UV light and a 5% ethanolic solution of phosphomolybdic acid and heat as staining agent. Flash chromatography was performed on 40- to 63- μm (400–230 mesh) silica gel 60 with EtOAc-heptane as eluents. Commercially available reagents and solvents were purified and dried when necessary by the usual methods. Tetrahydrofuran (THF) and diethyl ether were purified by distillation, under nitrogen, from sodium/benzophenone. *N,N*-Dimethylformamide and CH_2Cl_2 were dried by distillation from calcium hydride and acetone from anhydrous CaSO_4 . Unless otherwise mentioned, all other reagents were purchased from commercial sources and were used without further purification.

GR24, 2'-epi-GR24, and derivatives **1**, 2'-epi-**1**, 2, 2'-epi-**2**, **4**, and **5** (Fig. 2) were prepared according to the procedures described (Mangnus et al., 1992; Mangnus and Zwanenburg, 1992; Thuring et al., 1997; Reizelman et al., 2003); compound **3** was prepared according to the procedure described by Fell and Harbridge (1990) and d'orenone according to the procedure of Schachtschabel and Boland (2007). (+)- and (–)-Solnanol and solnanol acetate were prepared by the procedure described previously in our laboratory (Chen et al., 2010). GR5 was synthesized by known procedures (Johnson et al., 1981), natural SLs (orobanchol, orobanchyl acetate, fabacyl acetate) were generously supplied by Prof. K. Yoneyama, and SLs (strigol, strigyl acetate, 5-deoxystrigol, sorgolactone) were derived by organic synthesis using known procedures or supplied by Bayer CropScience.

(3a*R**,8b*S**,*E*)-3-((Dibenzylamino)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-2-one **7**

Tricycle **6** (Mangnus et al., 1992; 20 mg, 0.099 mmol, 1 eq.), dibenzylamine (20 mg, 0.099 mmol, 1 eq.), and $\text{Fe}(\text{OTf})_3 \cdot 6.2\text{DMSO}$ (**11**), where Tf = trifluoromethanesulfonyl and DMSO = dimethyl sulfoxide (Antonietti and Duñach, 2008; 14 mg, 0.015 mmol, 0.15 eq.), were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (1 mL). The reaction mixture was heated to 60°C under microwave irradiation (300 W) for 2 h. The reaction mixture was cooled and poured into a separation funnel containing CH_2Cl_2 (20 mL) and NaHCO_3 (saturated aqueous 20 mL). The combined organic extracts were washed with water (10 mL), dried over Na_2SO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on a silica gel (heptane:EtOAc 9:1 to 1:1) to give the desired product **7** (38 mg, quantitative) as a white solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (s, 1 H), 7.48 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.41 to 7.17 (m, 12 H), 7.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 5.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 4.54 (d, $J = 15.6$ Hz, 2 H), 4.32 (d, $J = 15.6$ Hz, 2 H), 3.87 to 3.80 (m, 1 H), 3.25 (dd, $J = 16.2$, 9.2 Hz, 1 H), 3.03 (dd, $J = 16.2$, 4.6 Hz, 1 H). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 175.5 (C), 147.5 (CH), 142.8 (C), 139.9 (C), 136.5 (2 C), 129.9 (CH), 129.3 (4 CH), 128.3 (2 CH), 127.5 (5 CH), 126.7 (CH), 125.1 (CH), 95.1 (C), 84.6 (CH), 55.0 (br s, CH_2), 53.4 (br s, CH_2), 42.6 (CH_2), 40.2 (CH). Mass spectrometry (MS) mass-to-charge ratio (m/z) 382 (MH^+ , 100%). High Resolution Mass Spectrometry (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{NO}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 382.1807; found: 382.1797.

(3a*R**,8b*S**,*E* and *Z*)-3-((Benzylamino)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-2-one **9**

Prepared from tricycle **6** by the same procedure as for **7** to give **9** as a slightly yellow amorphous solid (58 mg, quantitative). Major isomer: ^1H -NMR (300 MHz, acetone D_6) δ 7.75 to 7.61 (br s, 1 H, NH), 7.32 to 7.07 (m, 9 H), 6.99 (d, $J = 1.3$ Hz, 1 H), 5.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 5.55 (d, AB, $J = 6.2$ Hz, 2 H), 3.74 (tt, $J = 7.9$, 3.2 Hz, 1 H), 3.23 (dd, $J = 16.4$, 8.1 Hz, 1 H), 3.23 (dd, $J = 16.4$, 2.1 Hz, 1 H). ^{13}C -NMR (75 MHz, acetone D_6) δ 174.0 (C), 149.4 (CH), 143.7 (C), 141.9 (C), 140.6 (C), 130.1 (CH), 129.5 (2 CH), 128.2 (CH), 128.1 (2 CH), 127.8 (CH), 126.8 (CH), 126.2 (CH), 94.4 (C), 86.0 (CH), 52.6 (CH_2), 41.3 (CH_2), 41.2 (CH). MS (ESI) m/z (%) 605 (50), 346 (25), 314 (100), 292 (30). HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 314.1157; found: 314.1167.

(3a*R**,8b*S**,*Z*)-3-(((1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-2-one **10**

Tricycle **6** (20 mg, 0.099 mmol, 1 eq.), 2-acetamido-1,3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside **8** (116 mg, 0.297 mmol, 3 eq.), and $\text{Fe}(\text{OTf})_3 \cdot 6.2\text{DMSO}$ (**11**; 43 mg, 0.045 mmol, 0.45 eq.) were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (1 mL). The reaction mixture was heated to 60°C under microwave irradiation (300 W) for 2 h. The reaction mixture was cooled and poured into a separation funnel containing CH_2Cl_2 (20 mL) and NaHCO_3 (sat. aq. 20 mL). The combined organic extracts were washed with water (10 mL), dried over Na_2SO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on a silica gel (heptane:EtOAc 9:1 to 1:1) to give the desired mixture of inseparable diastereoisomers **10** (26 mg, 49%) as an off-white solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48 to 7.12 (m, 10H), 6.60 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H), 6.57 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H), 6.17 (d, $J = 3.7$ Hz, 1 H), 6.10 (d, $J = 3.7$ Hz, 1 H), 5.86 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 5.85 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 5.28 (t, $J = 10.1$ Hz, 1 H), 5.22 (t, $J = 10.1$ Hz, 1 H), 5.10 to 5.02 (m, 2 H), 4.31 (t, $J = 3.7$ Hz, 1 H), 4.28 (t, $J = 3.7$ Hz, 1 H), 4.06 to 3.98 (m, 4 H), 3.83 to 3.75 (m, 2 H), 3.49–3.42 (m, 2 H), 3.41–3.32 (m, 2 H), 2.85 (d, $J = 16.5$ Hz, 1 H), 2.77 (d, $J = 16.5$ Hz, 1 H), 2.20 (s, 3 H), 2.15 (s, 3 H), 2.05 (s, 6 H), 2.01 (s, 6 H), 1.99 (s, 3 H), 1.83 (s, 3 H). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.8 (C), 173.7 (C), 170.7 (2 C), 170.0 (C), 169.9 (C), 169.8 (2 C), 169.1 (C), 169.0 (C), 145.6 (CH), 145.5 (CH), 142.3 (C), 142.0 (C), 140.1 (C), 140.0 (C), 129.9 (CH), 129.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 126.7 (CH), 126.5 (CH), 125.5 (CH), 125.2 (CH), 97.6 (C), 97.3 (C), 91.1 (CH), 91.0 (CH), 86.2 (CH), 86.1 (CH), 71.7 (CH), 71.5 (CH), 70.0 (CH), 69.9 (CH), 68.1 (2 CH), 61.7 (2 CH_2), 60.2 (CH), 60.0 (CH), 40.5 (2 CH_2), 40.3 (CH), 40.2 (CH), 21.0 (CH_3), 20.9 (3 CH_3), 20.8 (3 CH_3), 20.6 (CH_3). MS m/z 554 (MNa^+ , 100%). HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NNaO}_{11}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 554.1639; found: 554.1633.

(3a*R**,8b*S**,*E*)-3-(((*RS**)-5-Oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-2-one **19** and 2'-epi-**19**

Tricycle **6** (90 mg, 0.445 mmol, 1 eq.), 5-bromo-2(5*H*)-furanone **12** (Wolff and Hoffmann, 1988; 109 mg, 0.668 mmol, 1.5 eq.), and anhydrous K_2CO_3 (100 mg, 0.890 mmol, 2 eq.) were dissolved in anhydrous acetone (10.8 mL). The reaction mixture was stirred for 3 h and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (10 mL), filtered, evaporated under reduced pressure, and purified by chromatography on a silica gel (EtOAc:heptane 2:3 to 4:1) to give the desired products **19** (22 mg, 17%) and 2'-epi-**19** (24 mg, 19%) as white amorphous solids. **19**: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.50 to 7.48 (br s, 1 H), 7.46 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H), 7.37 (dd, $J = 5.7$, 1.3 Hz, 1 H), 7.35 to 7.20 (m, 3 H), 6.40 (dd, $J = 5.7$, 1.1 Hz, 1 H), 6.28 (t, $J = 1.1$ Hz, 1 H), 5.93 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H), 3.97 to 3.89 (m, 1 H), 3.41 (dd, $J = 17.0$ and 9.4 Hz, 1 H), 3.07 (dd, $J = 17.0$ and 3.0 Hz, 1 H). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171.4 (C), 169.0 (C), 151.2 (CH), 148.7 (CH), 142.8 (C), 139.1 (C), 130.4 (CH), 127.8 (CH), 126.8 (2 CH), 125.3 (CH), 114.0 (C), 102.2 (CH), 86.2 (CH), 39.1 (CH), 35.5 (CH_2). IR ν_{max} (film): 3,104, 2,925, 2,855, 1,793, 1,746, 1,680, 1,610 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_5$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 285.0763; found: 285.0760. 2'-Epi-**19**: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.47 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H), 7.45 to 7.43 (br s, 1 H), 7.37 (dd, $J = 5.7$, 1.3 Hz, 1 H), 7.34 to 7.19 (m, 3 H), 6.39 (dd, $J = 5.8$, 1.1 Hz, 1 H), 6.29 (t, $J = 1.1$ Hz, 1 H), 5.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 3.95 to 3.87 (m, 1 H), 3.39 (dd, $J = 17.0$, 9.2 Hz, 1 H), 3.06 (dd, $J = 17.0$, 3.0 Hz, 1 H). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171.4 (C), 169.0 (C), 151.3 (CH), 148.8 (CH), 142.7 (C), 138.8 (C), 130.3 (CH), 127.7 (CH), 126.53 (CH), 126.50 (CH), 125.4 (CH), 113.9 (C), 102.3 (CH), 86.2 (CH), 39.0 (CH), 37.5 (CH_2). IR ν_{max} (film): 3,102, 2,931, 2,856, 1,793, 1,744, 1,679, 1,610 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_5$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 285.0763; found: 285.0769.

(3a*R**,8b*S**,*E*)-3-(((*RS**)-3-Bromo-4-methoxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2*H*-indeno[1,2-*b*]furan-2-one **20** and 2'-epi-**20**

Obtained from tricycle **6** and 3,5-dibromo-2-methoxy-2(5*H*)-furanone **13** by the same procedure as for **19** to give the desired products 20/2'-epi-**20** (1:1, unseparable mixture; 50 mg, 69%) as a colorless oil. 20/2'-epi-**20** (1:1): ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 to 7.41 (m, 4 H), 7.35 to 7.21 (m, 6 H), 6.03 (d, $J = 4$ Hz, 2 H), 5.96 (d, $J = 7.9$ Hz, 2 H), 4.22 (s, 6 H), 4.00 to 3.94 (m, 2 H), 3.46 (dd, $J = 17.0$, 9.4 Hz, 2 H), 3.14 (ddd, $J = 17.0$, 11.9, 2.8 Hz, 2 H). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171.24 (C), 171.21 (C), 162.3 (2 C), 150.2 (CH), 149.6 (CH), 145.8 (2 C), 142.8 (C), 142.7 (C), 138.9 (C), 138.8 (C), 130.26 (CH), 130.24 (CH), 127.70

(CH), 127.68 (CH), 126.63 (CH), 126.59 (CH), 125.40 (CH), 125.35 (CH), 114.8 (C), 114.6 (C), 107.29 (C), 107.26 (C), 99.60 (CH), 99.57 (CH), 86.24 (CH), 86.19 (CH), 59.3 (2 CH₃), 39.1 (CH), 39.0 (CH), 37.6 (CH₂), 37.1 (CH₂). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,952, 2,856, 1,792, 1,744, 1,669, 1,608 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₃O₆BrNa [M + Na⁺]: 414.9793; found: 414.9808.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((RS*)-4-Methoxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 21 and 2'-epi-21

A mixture of compound **20a**/2'-epi-**20** (1:1; 15 mg, 0.038 mmol, 1 eq.) and zinc (14 mg, 0.206 mmol, 5.4 eq.). AcOH (one drop) in THF (0.8 mL) was sonicated for 2 h under argon and filtered on a silica gel. The silica gel was washed with EtOAc (2 × 5 mL), and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by preparative thin-layer chromatography (EtOAc:heptane 1:1) to afford the two diastereoisomers **21**/2'-epi-**21** (1:1; 10 mg, 83%) as a colorless oil. A sample of **21** (2.5 mg) was obtained by repeated PTLC (EtOAc:heptane 1:1). **21**: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.52 to 7.49 (m, 2 H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 1 H), 7.30 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 7.25 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 6.25 to 6.24 (br s, 1 H), 5.99 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 5.97 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 3.98 to 3.91 (m, 1 H), 3.92 (s, 3 H), 3.04 (dd, J = 17.0, 9.5 Hz, 1 H), 3.12 (dd, J = 17.0, 2.8 Hz, 1 H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.4 (C), 164.0 (C), 151.3 (C), 150.8 (CH), 142.7 (C), 138.9 (C), 130.3 (CH), 127.7 (C), 126.6 (CH), 125.4 (CH), 113.8 (C), 109.3 (CH), 99.8 (CH), 86.1 (CH), 59.1 (CH₃), 39.0 (CH), 37.6 (CH₂). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,937, 2,854, 1,799, 1,747, 1,681, 1,663 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₄O₆Na [M + Na⁺]: 337.0688; found: 337.0704.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((RS*)-3-Methoxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 22 and 2'-epi-22

Prepared from tricycle **6** and 5-bromo-4-methoxy-2(5H)-furanone **14** (Wolff and Hoffmann, 1988) by the same procedure as for **19** to give the desired products **22**/2'-epi-**22** (1:1, unseparable mixture; 38 mg, 66%) as a colorless oil. **22**/2'-epi-**22** (1:1): ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, J = 7.2 Hz, 2 H), 7.36 (t, J = 2.6 Hz, 2 H), 7.29 to 7.15 (m, 6 H), 5.94 (s, 2 H), 5.88 (d, J = 7.9 Hz, 2 H), 5.22 (d, J = 1.9 Hz, 2 H), 3.92 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.89 to 3.85 (m, 2 H), 3.38 (dd, J = 17.0, 9.4 Hz, 2 H), 3.05 (dd, J = 17.0, 3.0 Hz, 2 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 175.25 (C), 175.23 (C), 171.34 (C), 171.31 (C), 168.46 (C), 168.42 (C), 150.6 (2 CH), 142.84 (C), 142.81 (C), 139.0 (C), 138.9 (C), 130.18 (CH), 130.17 (CH), 127.62 (CH), 127.59 (CH), 126.7 (CH), 126.5 (CH), 125.40 (CH), 125.3 (CH), 114.0 (C), 113.9 (C), 98.3 (CH), 98.1 (CH), 91.5 (CH), 91.4 (CH), 86.12 (CH), 86.10 (CH), 60.41 (CH₃), 60.38 (CH₃), 39.00 (CH), 38.96 (CH), 37.5 (CH₂), 37.4 (CH₂). IR $\nu_{\max}$ (film): 3,124, 3,029, 2,946, 2,858, 1,792, 1,745, 1,680, 1,646 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₄O₆Na [M + Na⁺]: 337.0688; found: 337.0701.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((RS*)-3,4-Dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 23 and 2'-epi-23

Prepared from tricycle **6** and 5-chloro-3,4-dimethyl-2(5H)-furanone **15** (Canevet and Graff, 1978) by the same procedure as for **19** to give the desired products **23**/2'-epi-**23** (1:1; 85 mg, 84%) as a colorless oil. The pure isomer **23** (colorless oil) could be obtained by separation by PTLC (EtOAc:heptane 3:7). **23**: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 7.44 (d, J = 2.6 Hz, 1 H), 7.35 to 7.20 (m, 3 H), 5.90 (s, 1 H), 5.89 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 3.93 to 3.85 (m, 1 H), 3.38 (dd, J = 17.0, 9.4 Hz, 1 H), 3.04 (dd, J = 17.0, 3.4 Hz, 1 H), 2.00 to 1.98 (m, 3 H), 1.86 to 1.84 (m, 3 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.4 (C), 170.8 (C), 152.3 (C), 151.2 (CH), 142.7 (C), 139.1 (C), 130.2 (CH), 128.8 (C), 127.7 (CH), 126.7 (CH), 125.3 (CH), 113.1 (C), 102.5 (CH), 86.1 (CH), 39.1 (CH), 37.6 (CH₂), 11.6 (CH₃), 8.9 (CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 3,056, 2,927, 2,857, 1,775, 1,744, 1,677, 1,608 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₁₆O₅Na [M + Na⁺]: 335.0895; found: 335.0899.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((RS*)-2,3,4-Trimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 25 and 2'-epi-25

Prepared from tricycle **6** and 5-chloro-2,3,4-trimethyl-2(5H)-furanone **17** by the same procedure as for **19** to give the desired products **25**/2'-epi-**25** (48.7

mg, 78%; mixture of diastereoisomers, 1:1) as a white amorphous solid. The furanone **17** was prepared from 5-hydroxy-2,3,4-dimethyl-2(5H)-furanone (Surremont et al., 2010) by the procedure of Canevet and Graff (1978). **25**/2'-epi-**25**: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, J = 7.3 Hz, 2 H), 7.30 to 7.17 (m, 6 H), 7.09 (d, J = 2.6 Hz, 2 H), 5.88 (d, J = 7.9 Hz, 2 H), 3.90 to 3.83 (m, 2 H), 3.40 (dd, J = 17.0, 9.2 Hz, 2 H), 3.09 (dd, J = 17.0, 3.2 Hz, 2 H), 1.90 (d, J = 1.1 Hz, 6 H), 1.83 (d, J = 1.1 Hz, 6 H), 1.70 (s, 6 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.6 (2 C), 170.9 (2 C), 155.7 (C), 155.6 (C), 147.6 (CH), 147.5 (CH), 142.8 (C), 142.7 (C), 139.07 (C), 138.98 (C), 130.1 (2 CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 128.0 (C), 127.95 (C), 126.6 (CH), 126.5 (CH), 125.4 (CH), 125.2 (CH), 113.4 (C), 113.3 (C), 107.8 (C), 107.7 (C), 85.99 (CH), 85.97 (CH), 39.06 (CH), 38.98 (CH), 37.6 (CH₂), 37.5 (CH₂), 22.69 (CH₃), 22.62 (CH₃), 10.7 (2 CH₃), 8.9 (2 CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,928, 1,777, 1,746, 1,673 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₉H₁₉O₅ [M + H⁺]: 327.1232; found: 327.1224.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((RS*)-3-Butyl-4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 26 and 2'-epi-26

Prepared from tricycle **6** and 5-chloro-3-butyl-4-methyl-2(5H)-furanone **18** by the same procedure as for **19** to give the desired products **26**/2'-epi-**26** (80.2 mg, 91%; mixture of diastereoisomers, 1:1) as a white amorphous solid. The furanone **18** was prepared from 5-hydroxy-3-butyl-4-methyl-2(5H)-furanone (Schreiber and Wermuth, 1965) by the procedure of Canevet and Graff (1978). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48 to 7.43 (m, 4 H), 7.35 to 7.19 (m, 6 H), 6.03 (br s, 2 H), 5.93 (d, J = 7.7 Hz, 2 H), 3.96 to 3.87 (m, 2 H), 3.40 (dt, J = 17.3, 8.9 Hz, 2 H), 3.40 (dt, J = 17.3, 3.6 Hz, 2 H), 2.52 to 2.30 (m, 4 H), 1.89 (s, 6 H), 1.42 to 1.31 (m, 8 H), 0.94 (q, J = 7.2 Hz, 6 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.41 (C), 171.37 (C), 171.02 (C), 170.98 (C), 156.43 (C), 156.28 (C), 151.4 (CH), 151.3 (CH), 142.7 (C), 142.6 (C), 139.0 (C), 138.9 (C), 130.2 (2 CH), 128.5 (C), 128.4 (C), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 126.6 (CH), 126.5 (CH), 125.4 (CH), 125.2 (CH), 113.4 (C), 113.2 (C), 101.85 (CH), 101.82 (CH), 86.04 (CH), 86.02 (CH), 39.0 (2 CH), 37.63 (CH₂), 37.56 (CH₂), 29.46 (CH₂), 29.43 (CH₂), 26.03 (CH₂), 25.98 (CH₂), 22.89 (CH₂), 22.81 (CH₂), 13.9 (2 CH₃), 8.9 (2 CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,930, 1,778, 1,749, 1,681 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₁H₂₃O₅ [M + H⁺]: 355.1545; found: 355.1535.

(E)-((3aR*,8bS*)-2-Oxo-3a,4-dihydro-2H-indeno[1,2-b]furan-3(8bH)-ylidene)methylbenzoate 27

Prepared from tricycle **6** and 3-bromo-2-benzoyloxy-2(5H)-furanone **16** by the same procedure as for **19** to give the compound **27** (20 mg, 26%) as a white solid. Furanone **16** was obtained by bromation of 2-benzoyloxy-2-buten-4-olide (Limberg and Thiem, 1995) by the same procedure as for 5-bromo-3-methyl-2(5H)-furanone (Macalpine et al., 1976). Melting point, 164.2°C to 165.3°C (heptane:EtOAc). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (d, J = 2.6 Hz, 1 H), 8.09 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 8.07 (d, J = 1.2 Hz, 1 H), 7.63 (dt, J = 7.3, 1.3 Hz, 1 H), 7.51 to 7.45 (m, 3 H), 7.31 to 7.17 (m, 3 H), 5.97 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 4.14 to 4.06 (m, 1 H), 3.59 (dd, J = 16.8, 9.1 Hz, 1 H), 3.21 (dd, J = 16.8, 3.4 Hz, 1 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.0 (C), 162.1 (C), 143.9 (CH), 142.5 (C), 138.9 (C), 134.9 (CH), 130.5 (2 CH), 130.4 (CH), 129.2 (2 CH), 127.9 (CH), 127.8 (C), 126.7 (CH), 125.4 (CH), 116.7 (C), 86.1 (CH), 39.4 (CH), 37.8 (CH₂). IR $\nu_{\max}$ (film): 3,076, 2,929, 2,855, 1,756, 1,684, 1,600 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₉H₁₅O₄ [M + H⁺]: 307.0970; found: 307.0971.

(E)-5,5'-(((2-Oxodihydrofuran-3(2H)-ylidene)methyl)azanediyl)bis(3,4-dimethylfuran-2(5H)-one) 29

To a -10°C solution of 3-aminomethylenedihydrofuran-2-one **28** (Zanatta et al., 2003; 100 mg, 0.876 mmol, 1 eq.) in THF (5 mL) was added NaH (67 mg, 60% weight in mineral oil, 1.665 mmol, 1.9 eq.), and the resulting solution was stirred under argon for 30 min at this temperature and then cooled to -78°C, and the chlorobutenolide **15** (321 mg, 2.191 mmol, 2.5 eq.) was added to the reaction mixture. The solution was warmed to room temperature, stirred for 2.5 h, quenched with AcOH (0.5 mL) followed by water, and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried (MgSO₄), filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a silica gel (EtOAc:heptane 1:1) to give 22 mg of the compound **29** (8%) as an amorphous solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (t, J = 2.4 Hz, 1 H), 5.83 (s, 1 H), 5.29 (s, 1 H), 4.43 to 4.25 (m, 2 H), 3.40 to 3.29 (m, 1 H), 3.40 to 3.29 (m, 1 H), 2.11 (s, 3 H), 1.89 (t, J = 1.0 Hz, 3 H), 1.78 (s, 6 H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.8 (C), 171.8 (C), 169.4

(C), 153.4 (C), 150.8 (C), 131.8 (C), 128.0 (CH), 127.5 (C), 105.0 (C), 95.1 (CH), 86.7 (CH), 65.2 (CH₂), 25.8 (CH₂), 12.9 (CH₃), 11.5 (CH₃), 8.8 (CH₃), 8.7 (CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,923, 1,748, 1,659, 1,589 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₀NO₆ [M + H⁺]: 334.1278; found: 334.1291.

(E)-3,4-Dimethyl-5-((2-oxodihydrofuran-3(2H)-ylidene)methoxy)furan-2(5H)-one 30

Potassium *tert*-butoxide (469 mg, 0.418 mmol, 1.2 eq.) was added to a mixture of γ -butyrolactone (300 mg, 0.28 mL, 3.48 mmol, 1 eq.) and ethyl formate (0.34 mL, 4.18 mmol, 1.2 eq.) in THF (7.5 mL) at 0°C under argon and stirred for 2 h. It was then cooled to -78°C, and the chlorobutenolide **15** (562 mg, 3.83 mmol, 1.3 eq.) was gradually added. The mixture was then warmed to room temperature and stirred for 18 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure, diluted with CH₂Cl₂ (10 mL), and the organic layer was washed with an aqueous solution of acetic acid (5%, 10 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 $\times$ 10 mL), and the combined organic layers were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel (heptane:EtOAc 3:2 to 1:1) to afford **30** (292 mg, 37%) as a white solid. Melting point, 93.4°C to 93.8°C (heptane:EtOAc). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (t, J = 2.8 Hz, 1 H), 5.93 (s, 1 H), 4.35 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.88 (td, J = 7.5, 2.8 Hz, 2 H), 1.99 (t, J = 1.0 Hz, 3 H), 1.87 (t, J = 1.0 Hz, 3 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.9 (C), 170.9 (C), 152.5 (C), 150.0 (CH), 128.5 (C), 107.6 (CH), 102.3 (CH), 66.0 (CH₂), 24.1 (CH₂), 11.6 (CH₂), 8.8 (CH₂). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,987, 2,923, 1,771, 1,748, 1,685 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₁H₁₃O₅ [M + H⁺]: 225.0763; found: 225.0755.

5-((4-Chlorophenyl)thio)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-one 31

Prepared from 4-chlorobenzenethiol and 5-chloro-3,4-dimethyl-2(5H)-furanone **15** (Canevet and Graff, 1978) by the same procedure as for **19** to give the desired product **31** (361 mg, 51%) as a white solid. Melting point, 74.5°C to 76.9°C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (dt, J = 8.7, 2.1 Hz, 2 H), 7.20 (dt, J = 8.7, 2.1 Hz, 2 H), 5.83 to 5.82 (m, 1 H), 1.96 (t, J = 1.0, 3 H), 1.64 (t, J = 1.0, 3 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.6 (C), 155.2 (C), 135.4 (C), 135.2 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.2 (C), 126.2 (C), 88.1 (CH), 12.6 (CH₃), 8.5 (CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,924, 1,758, 1,673, 1,476, 1,093, 985 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₂ClO₂S [M + H⁺]: 255.0247; found: 255.0245.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((R*S*)-4-Methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)thio)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 33

To a solution of tricycle **6** (100 mg, 0.495 mmol, 1 eq.) in dry *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added MeI (0.111 mL, 1.978 mmol, 4 eq.) and dry K₂CO₃ (89 mg, 0.643 mmol, 1.3 eq.). The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature and diluted with *t*-butylmethylether (20 mL), and the resulting mixture was washed with water (3 $\times$ 20 mL). The organic phase was separated, dried (MgSO₄), filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a silica gel (EtOAc:heptane 3:7) to give 68 mg of the ether intermediate (53%) as a white solid. To a solution of ether intermediate (19 mg, 0.087 mmol, 1 eq.) in a mixture of methanol (0.4 mL) and dioxane (1 mL) was added at room temperature NaHS (10 mg, 0.87 mmol, 10 eq.). The reaction mixture was warmed to 70°C for 3 h, cooled to room temperature, and evaporated under reduced pressure. Acetone (2 mL) was added to the residue, followed by 5-bromo-3-methyl-2(5H)-furanone **32** (35 mg, 0.2 mmol, 2.3 eq.) and dry K₂CO₃ (26 mg, 0.19 mmol, 2.2 eq.). The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a silica gel (EtOAc:heptane 3:7 to 1:1) to give 8 mg of the thio compound **33** (29%) as a colorless oil (inseparable mixture of two diastereomers, 1:1). **33** (two diastereoisomers 1:1): ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, J = 7.6 Hz, 2 H), 7.47 (d, J = 2.5 Hz, 1 H), 7.46 (d, J = 2.5 Hz, 1 H), 7.33 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 7.27 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 7.22 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 7.05 to 7.04 (m, 2 H), 6.19 (dt, J = 8.2, 1.6 Hz, 2 H), 5.96 (d, J = 7.9 Hz, 2 H), 3.84 to 3.79 (m, 2 H), 3.44 (dd, J = 16.7, 3.2 Hz, 1 H), 3.42 (dd, J = 16.7, 3.2 Hz, 1 H), 3.10 (dd, J = 16.7, 4.1 Hz, 1 H), 3.09 (dd, J = 16.7, 4.1 Hz, 1 H), 2.02 (s, 2 H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.82 (C), 171.79 (C), 168.5 (2 C), 143.6 (2 CH), 142.58 (C), 142.56 (C), 138.74 (C), 138.70 (C), 134.1 (2 C), 133.7 (CH), 133.4 (CH), 130.4 (2 CH), 129.9 (2 C), 127.9 (2 CH), 126.73 (CH), 126.70 (CH), 125.38 (CH), 125.36 (CH), 85.9 (2 CH), 83.3 (CH), 83.1 (CH), 40.9 (2 CH), 36.7 (2 CH₂), 11.0 (2 CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 3,083,

3,030, 2,928, 2,853, 1,767, 1,740, 1,655, 1,621 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₅O₄S [M + H⁺]: 315.0691; found: 315.0681.

(R*)-2-(2,3-Dihydro-1H-inden-2-yl)-3-(((2S*,4S*)-4-methyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yloxy)propanoic acid 34

To a solution of 2'-*epi*-GR24 (30 mg, 0.101 mmol, 1 eq.) in EtOAc (5 mL) was added the catalyst 10% palladium on carbon (16 mg). The flask was flushed with H₂, and a positive pressure of H₂ was maintained. The mixture was stirred at room temperature under 1 atmosphere of H₂ for 2 h. Then the mixture was filtered through a layer of Celite, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a silica gel (EtOAc) to give 29.3 mg of the lactone **34** (95%) as a colorless oil. ¹H-NMR (300 MHz, acetone d₆) δ 7.21 to 7.16 (m, 2 H), 7.13 to 7.08 (m, 2 H), 5.56 (dd, J = 5.5, 4.5 Hz, 1 H), 4.05 (dd, J = 9.6, 4.5 Hz, 1 H), 3.90 (dd, J = 9.6, 8.7 Hz, 1 H), 3.10 to 2.98 (m, 2 H), 2.86 to 2.61 (m, 6 H), 1.76 to 1.65 (m, 1 H), 1.24 (d, J = 7.2 Hz, 3 H). ¹³C-NMR (75 MHz, acetone d₆) δ 178.6 (C), 174.8 (C), 143.43 (C), 143.40 (C), 127.18 (CH), 127.16 (CH), 125.1 (2 CH), 104.3 (CH), 71.2 (CH₂), 40.5 (CH), 37.9 (CH₂), 37.8 (CH₂), 37.1 (CH₂), 35.0 (CH), 16.8 (CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 3,200 to 2,480 (br), 2,938, 2,845, 1,775, 1,738, 1,706, 1,146 cm⁻¹. MS (ESI) m/z (%) 327 (100). HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₀O₅Na [M + Na⁺]: 327.1208; found: 327.1222.

(3aR*,8bS*,E)-3-(((2S*,4S*)-4-Methyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yloxy)methylene)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 35

To a solution of 2'-*epi*-GR24 (25 mg, 0.084 mmol, 1 eq.) in EtOAc (12 mL) was added the catalyst 10% palladium on carbon (2.3 mg). The flask was flushed with H₂, and a positive pressure of H₂ was maintained. The mixture was stirred at room temperature under 1 atmosphere of H₂ for 20 min. Then the mixture was filtered through a layer of Celite, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (EtOAc:heptane 1:1) to give 13.6 mg of the lactone **35** (54%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 7.45 (d, J = 2.6 Hz, 1 H), 7.32 (td, J = 7.2, 2.5 Hz, 1 H), 7.27 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 7.23 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 5.93 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 5.84 (dd, J = 5.7, 3.0 Hz, 1 H), 3.95 to 3.88 (m, 1 H), 3.41 (dd, J = 19.0, 9.4 Hz, 1 H), 3.08 (dd, J = 19.0, 3.4 Hz, 1 H), 2.84 to 2.71 (m, 2 H), 2.08 (dd, J = 8.5, 3.2 Hz, 1 H), 1.43 (d, J = 7.0 Hz, 3 H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 177.4 (C), 171.6 (C), 152.2 (CH), 142.7 (C), 138.9 (C), 130.3 (CH), 127.7 (CH), 126.6 (CH), 125.5 (CH), 113.1 (C), 103.2 (CH), 86.1 (CH), 38.9 (CH), 37.7 (CH₂), 36.0 (CH₂), 33.8 (CH), 17.2 (CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,936, 2,878, 1,788, 1,746, 1,709, 1,680, 1,592 cm⁻¹. MS (ESI) m/z (%) 623 (40), 355 (20), 323 (100). HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₆O₅Na [M + Na⁺]: 323.0895; found: 323.0897.

(2'R*,3aS*,8bS*)-3'-((S*)-4-Methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yloxy)-3a,4-dihydrospiro[indeno[1,2-b]furan-3,2'-oxiran]-2(8bH)-one 36

To a solution of 2'-*epi*-GR24 (11 mg, 0.0369 mmol, 1 eq.) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added in a solution of freshly distilled dimethyldioxirane (Adam et al., 1991) acetone (2.1 mL, approximately 0.1 M) and stirred at 5°C for 12 h. The solution was allowed to reach room temperature, and the volatiles were evaporated under reduced pressure to give 11.5 mg (quantitative) of the lactone **36** (two diastereoisomers 7:3) as a white solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (t, J = 7.0 Hz, 1 H), 7.40 to 7.27 (m, 3 H), 6.96 to 6.93 (m, 0.3 H), 6.90 to 6.87 (m, 0.7 H), 6.16 to 6.13 (m, 1 H), 6.09 (d, J = 6.6 Hz, 0.7 H), 6.05 (d, J = 7.5 Hz, 0.3 H), 5.39 (s, 0.7 H), 5.13 (s, 0.3 H), 3.47-3.18 (m, 3 H), 2.00 (s, 3 H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.7 (2 C), 170.8 (2 C), 143.6 (C), 143.2 (C), 142.2 (CH), 141.8 (CH), 138.2 (C), 137.4 (C), 135.8 (C), 135.4 (C), 131.0 (CH), 130.8 (CH), 127.9 (2 CH), 126.7 (CH), 126.6 (CH), 125.6 (CH), 125.3 (CH), 99.4 (CH), 99.1 (CH), 87.1 (CH), 86.5 (CH), 81.6 (CH), 79.9 (CH), 63.6 (C), 61.8 (C), 40.2 (CH), 35.6 (CH), 34.0 (CH₂), 33.3 (CH₂), 11.0 (CH₃), 10.9 (CH₃). IR $\nu_{\max}$ (film): 2,923, 2,854, 1,769, 1,665, 1,609 cm⁻¹. MS (ESI) m/z (%) 378 (100), 337 (40). HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₄O₆Na [M + Na⁺]: 337.0688; found: 337.0674.

(3R*,3aS*,8bS*)-3-Hydroxy-3-(methoxy((S*)-4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yloxy)methyl)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one 37

To a solution of epoxide **36** (11 mg, 0.035 mmol, 1 eq.) in a mixture CH₂Cl₂:methanol (1 mL; 1:4) was added *p*-toluenesulfonic acid (1 mg). The mixture

was stirred at room temperature for 4 h and overnight at -20°C . Then the solvents were removed under reduced pressure, and the residue was purified by chromatography on silica gel (EtOAc:heptane 1:1) to give 10.2 mg of the alcohol **37** (two isomers, 7:3; 84%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.54 to 7.21 (m, 4 H), 6.96 to 6.94 (m, 0.7 H), 6.93 to 6.91 (m, 0.3 H), 6.20 (t, $J = 1.3$ Hz, 0.7 H), 6.11 (t, $J = 1.3$ Hz, 0.3 H), 5.90 (d, $J = 5.3$ Hz, 0.7 H), 5.68 (d, $J = 7.2$ Hz, 0.3 H), 4.93 (s, 0.3 H), 4.89 (s, 0.7 H), 3.64 (s, 0.9 H), 3.57 (s, 2.1 H), 3.47 to 3.18 (m, 3 H), 1.97 (t, $J = 1.3$ Hz, 0.9 H), 1.95 (t, $J = 2.1$ Hz, 3 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) major isomer δ 175.0 (2 C), 144.2 (C), 143.4 (CH), 137.7 (C), 134.0 (C), 130.8 (CH), 127.7 (CH), 126.7 (CH), 125.2 (CH), 105.0 (CH), 101.1 (CH), 86.7 (CH), 79.9 (C), 57.1 (CH_3), 48.9 (CH), 31.1 (CH_2), 10.70 (CH_3). MS (ESI) m/z (%) 378 (100), 337 (40). HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 369.0950; found: 369.0955.

(3aR*,8bS*)-3-((((2S*,4S*)-4-Methyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one **38**

Prepared from compound **5** (Mangnus and Zwanenburg, 1992) by the same procedure as for **35** to give the desired product **38** (5 mg, 50%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.29 (d, $J = 7.3$, 1 H), 7.25 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 5.89 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 5.50 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H), 4.11 (dd, $J = 9.5$, 6.9 Hz, 1 H), 3.94 (dd, $J = 9.5$, 4.1 Hz, 1 H), 3.31 to 3.24 (m, 2 H), 3.12 (d, $J = 14.2$ Hz, 1 H), 2.68 to 2.56 (m, 3 H), 1.86 to 1.83 (m, 1 H), 1.35 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 178.5 (C), 176.2 (C), 141.8 (C), 139.0 (C), 130.1 (CH), 127.9 (CH), 126.4 (CH), 125.7 (CH), 103.1 (CH), 86.1 (CH), 69.1 (CH_2), 47.6 (CH), 42.3 (CH_2), 37.1 (CH), 36.6 (CH), 34.5 (CH_2), 17.0 (CH_3). IR ν_{max} (film): 2,925, 2,853, 1,771, 1,608 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 325.1052; found: 325.1068.

Chemical Stability

Solanacol, solanacyl acetate, GR24, and **23** were tested for their chemical stability in an aqueous solution. Aqueous solutions of the compound to be tested ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) were incubated at 21°C in the HPLC vials. The compounds were first dissolved in acetone (1 mL). Then, $50\text{ }\mu\text{L}$ of the previous solutions was diluted to the final concentration with ethanol ($175\text{ }\mu\text{L}$) and water ($750\text{ }\mu\text{L}$). Indanol ($25\text{ }\mu\text{L}$ of a 1 mg mL^{-1} solution in acetone) as an internal standard was added to each solution. The time course of degradation was monitored by ultra-performance liquid chromatography analysis using an Acquity UPLC HSS C_{18} column ($1.8\text{ }\mu\text{m}$, $2.1 \times 50\text{ mm}$) eluted first by 5% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid for 0.5 min, then by a gradient from 5% to 100% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid within 6.5 min, and by 100% acetonitrile containing 0.1% formic acid for 3 min. The column was operated at 40°C with a flow rate of 0.6 mL min^{-1} . Compounds eluted from the column were detected with a photodiode array detector. The relative quantity of remaining (no degraded) product was determined by integration comparison with the internal standard.

Plant Assays

Bud Outgrowth Inhibition Activity Assay

Pea (*Pisum sativum*) *rms1* mutant plants (allele *rms1-10* identified in the dwarf line Tèrese; Beveridge et al., 1997; Rameau et al., 1997; Sorefan et al., 2003; Gomez-Roldan et al., 2008) deficient in SLs were used for the bioassay. The compound to be tested was applied directly to the bud with a micropipette as $10\text{ }\mu\text{L}$ of solution containing 0.1% acetone with 2% polyethylene glycol 1450, 50% ethanol, and 0.4% dimethyl sulfoxide. Twenty-four plants were sown per treatment in trays (two repetitions of 12 plants). The treatment was generally done 10 d after sowing on the axillary bud at node 4 (or 3). The branches at nodes 1 to 2 were removed to encourage the outgrowth of axillary buds at the nodes above. Nodes were numbered acropetally from the first scale leaf as node 1 and the cotyledonary node as node 0. Bud growth at node 4 (node 3 and node 5 in one bioassay) was measured 8 to 10 d after treatment with digital calipers. Generally, if poor activity or no activity was found at $1\text{ }\mu\text{M}$ concentration, no replication was done. Because the treatment in itself is stressful, we observed 10 d after the treatment some plants with dead buds (small yellow/white buds). Those plants for which the treatment had a toxic effect were eliminated from the analysis.

Pea Hydroponic Culture

The high-branching SL-deficient pea *rms1* mutant plant *rms1-10* was used. The nutrient solution (100%) was prepared by adding, in 1,000 L of water, the following macronutrients: HNO_3 (0.28 L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (120 g), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (40 g), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (140 g), KNO_3 (550 g), $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (0.05 g), H_3BO_3 (15 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 0.7\text{H}_2\text{O}$ (1 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (0.25 g), and Sequestrene (10 g; Fe-EDTA solution). Pea seeds were germinated in wet sand for 6 d. Germinated seeds were placed in premade holes in the lid (35 holes per lid, 20 mm diameter) of a hydroponic polyvinyl chloride opaque pot containing the hydroponic culture solution (47 L, pH 5.8). Acetone or the compound to be tested (dissolved in acetone) was added to the hydroponic culture solution to give a final concentration of 0, 1, or $3\text{ }\mu\text{M}$ of the compound to be tested and 0.01% acetone. The hydroponic culture solution was continuously aerated by an aquarium pump and was replaced weekly. Eight days after the beginning of the treatment, branch/lateral bud lengths (nodes 1–6) were measured with an electronic caliper.

PsBRC1 Transcript Levels

The different compounds were applied directly to the bud as done in branching bioassays. The axillary buds at node 3 from 30 plants per treatment and biological repeat were dissected. Axillary buds were harvested, total RNA was isolated and quantified, complementary DNA was synthesized, and real-time PCR gene expression analyses were conducted as described (Braun et al., 2012). Quantitative real-time PCR analyses were performed using SYBR ROX RealMasterMix (5Prime). Cycling conditions for amplification were 95°C for 10 min, 50 cycles of 95°C for 5 s, 62°C for 5 s, and 72°C for 15 s, followed by $0.1^{\circ}\text{C s}^{-1}$ ramping up to 95°C for fusion curve characterization. Three biological repeats were analyzed in duplicate. To calculate relative transcript levels, the comparative cycle method based on nonequal efficiencies was used (Pfaffl, 2001). Transcript levels for the different genes were expressed relative to expression of the *EF1 α* gene (Johnson et al., 2006). Primer sequences were as follows: PsBRC1 forward (5'-TCGAAAGACGGAATCAAACA-3') and PsBRC1 reverse (5'-TCCCTTGCTCTTCTCTTTC-3'); *EF1 α* forward (5'-TGTGCCA-GTGGGACGTGTG-3') and *EF1 α* reverse (5'-CTCGTGGTGCATCTCAACGG-3').

Germination Stimulation Activity Assay

GR24 and SL analogs were resuspended in acetone at 10 mmol L^{-1} and then diluted with water at 1 mmol L^{-1} (water:acetone 99:1, v/v). Dilutions of 1×10^{-3} to $1 \times 10^{-15}\text{ mol L}^{-1}$ were then performed in water:acetone (99:1, v/v). Seeds of *Phelipanche ramosa* (from St. Martin de Fraigneau, France, 2005, on *Brassica napus*) were surface sterilized according to Dos Santos et al. (2003), resuspended in sterile water (10 g L^{-1}), and distributed on 96-well plates ($50\text{ }\mu\text{L}$, approximately 100 seeds per well). After preconditioning (7 d and 21°C , on a dark, sealed plate), GR24 ($10\times$) or other molecules were added and volumes were adjusted to $100\text{ }\mu\text{L}$ with water (water:acetone 999:1, v/v). Controls were made with water:acetone (999:1, v/v) and without seeds. Plates were incubated for germination (21°C , in the dark). After 4 d, the germinated seeds were counted with a stereomicroscope (SZX10; Olympus). Seeds were considered as germinated when the radicle protruded out of the seed coat. Each germination assay was repeated at least three times. For each compound tested, dose-response curves [$g = f(c)$, where g = germination percentage, f = function, and c = concentration (mol L^{-1})] and EC_{50} were modeled with a four-parameter logistic curve computed with SigmaPlot 10.0.

Statistical Analyses

Because deviations from normality were observed for axillary bud length after SL treatment, the Kruskal-Wallis test was used to assess the significance of treatment in comparison with the control treatment (0 nM) using R Commander version 1.7-3 (Fox, 2005; Tables I–VI).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Bioassay on bud outgrowth using hydroponic culture: comparison of the activity of GR24 and GR5.

Supplemental Figure S2. Dose-dependent activity of the SL analogs GR24 and GR5.

Supplemental Figure S3. Effect of different SLs (500 nM) on *PsBRC1* transcript levels in axillary buds at node 3 of *rms1* plants.

Supplemental Figure S4. Stimulatory activity of GR24, GR5, 23, and 30 toward *P. ramosa* seed germination.

ACKNOWLEDGMENTS

Bayer CropScience is acknowledged for the supply of strigol, sorgolactone, and 5-deoxystigol and K. Yoneyama for the supply of fabacyl acetate, orobanchol, and orobanchyl acetate. We thank S. Bonhomme and R. Beau for their comments on the manuscript.

Received March 22, 2012; accepted June 20, 2012; published June 21, 2012.

LITERATURE CITED

- Adam W, Bialas J, Hadjirapoglou L (1991) A convenient preparation of acetone solutions of dimethyldioxirane. *Chem Ber* **124**: 2377
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, Greb T (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20242–20247
- Akiyama K, Hayashi H (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot (Lond)* **97**: 925–931
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824–827
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* **51**: 1104–1117
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S (2012) The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **335**: 1348–1351
- Antonietti S, Duñach E (2008) Facile preparation of metallic triflates and triflimidates by oxidative dissolution of metal powders. *Chem Commun (Camb)* **44**: 993–995
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyoizuka J (2009) d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol* **50**: 1416–1424
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* **4**: e226
- Beveridge CA (2000) Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regul* **32**: 193–203
- Beveridge CA, Kyoizuka J (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 34–39
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C (1997) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiol* **115**: 1251–1258
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O (2004) MAX3/CDD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* **14**: 1232–1238
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci* **12**: 224–230
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadis I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, et al (2012) The pea TCP transcription factor *PsBRC1* acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol* **158**: 225–238
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 482–493
- Canevet JC, Graff Y (1978) Friedel-Crafts reaction of aromatic derivatives with 1,4-dicarbonyl-2,3-ethylenic compounds. II. Alkylations by some 5-hydroxy or 5-chloro-2,5-dihydro-2-furannones: new method for synthesis of 1h-indene-1-carboxylic acids. *Tetrahedron* **34**: 1935–1942
- Chen VX, Boyer F-D, Rameau C, Retailleau P, Vors J-P, Beau J-M (2010) Stereochemistry, total synthesis, and biological evaluation of the new plant hormone solanacol. *Chemistry* **16**: 13941–13945
- Cook CE, Coggon P, McPhail AT, Wall ME, Whichard LP, Egley GH, Luhan PA (1972) Germination stimulants. 2. Structure of strigol-potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *J Am Chem Soc* **94**: 6198–6199
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH (1966) Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**: 1189–1190
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska MA, Leyser O (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**: 2905–2913
- Domagalska MA, Leyser O (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 211–221
- Dos Santos CV, Letousey P, Delavault P, Thalouarn P (2003) Defense gene expression analysis of Arabidopsis thaliana parasitized by *Orobancha ramosa*. *Phytopathology* **93**: 451–457
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA (2012) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol* **158**: 487–498
- Fell SCM, Harbridge JB (1990) 2,5-Dimethoxy-2,5-dihydrofuran: a convenient synthon for a novel mono-protected glyoxal. Synthesis of 4-hydroxybutenolides. *Tetrahedron Lett* **31**: 4227–4228
- Foo E, Davies NW (2011) Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta* **234**: 1073–1081
- Fox J (2005) The R commander: a basic-statistics graphical user interface to R. *J Stat Softw* **14**: 1–41
- Fukui K, Ito S, Ueno K, Yamaguchi S, Kyoizuka J, Asami T (2011) New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 4905–4908
- Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR (2011) Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* **111**: 28–67
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, et al (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194
- Gomez-Sanchez A, Moya PB, Bellanato J (1984) Protection of the amino group of amino-sugars by the acylvinyl group. Part I. Glycoside formation by the Fischer reaction. *Carbohydr Res* **135**: 101–116
- Gould KS, Cutter EG, Young JPW, Charlton WA (1987) Positional differences in size, morphology, and in vitro performance of pea axillary buds. *Can J Bot* **65**: 406–411
- Hoffmann HMR, Schmidt B, Wolff S (1989) Preparation of 5-bromotetronates [4-alkoxy-5-bromo-2(5h)-furanones] and a new concept for the synthesis of aflatoxins and related structure types: tributyltin hydride versus palladium-promoted intramolecular hydroarylation. *Tetrahedron* **45**: 6113–6126
- Johnson AW, Gowda G, Hassanali A, Knox J, Monaco S, Razavi Z, Rosebery G (1981) The preparation of synthetic analogs of strigol. *J Chem Soc Perkin Trans* **1981**: 1734–1743
- Johnson X, Brich T, Dun EA, Goussot M, Haurigné K, Beveridge CA, Rameau C (2006) Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014–1026
- Just G, Chung BY, Kim S, Rosebery G, Rossy P (1976) Reactions of oxygen and sulfur anions with oxazolidine and thiazolidine derivatives of 2-mesyloxymethylglyceraldehyde acetone. *Can J Chem* **54**: 2089–2093
- Kapulnik Y, Delaux P-M, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combier J-P, Bécard G, Belausov E, et al (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta* **233**: 209–216
- Kim HI, Xie XN, Kim HS, Chun JC, Yoneyama K, Nomura T, Takeuchi Y (2010) Structure-activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobancha minor* seed germination stimulation. *J Pestic Sci* **35**: 344–347
- Limberg G, Thiem J (1995) [beta]-Elimination of protected aldono-1,4-lactones as a general approach to the synthesis of 2-keto-3-deoxyaldonic acids containing four to six carbon atoms. *Carbohydr Res* **275**: 107–115
- Macalpine GA, Raphael RA, Shaw A, Taylor AW, Wild HJ (1976) Synthesis of germination stimulant (+/-)-strigol. *J Chem Soc Perkin Trans* **1**: 410–416
- Malik H, Kohlen W, Jamil M, Rutjes FPJT, Zwanenburg B (2011) Aromatic A-ring analogues of orobanchol, new germination stimulants for seeds of parasitic weeds. *Org Biomol Chem* **9**: 2286–2293
- Malik H, Rutjes F, Zwanenburg B (2010) A new efficient synthesis of GR24 and dimethyl A-ring analogues, germinating agents for seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobancha* spp. *Tetrahedron* **66**: 7198–7203

- Mangnus EM, Dommerholt FJ, Dejong RLP, Zwanenburg B (1992) Improved synthesis of strigol analog GR24 and evaluation of the biological activity of its diastereomers. *J Agric Food Chem* **40**: 1230–1235
- Mangnus EM, Zwanenburg B (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanch* seeds by strigol and its synthetic analogs. *J Agric Food Chem* **40**: 1066–1070
- Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* **139**: 920–934
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**: 763–775
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Prandi C, Occhiato EG, Tabasso S, Bonfante P, Novero M, Scarpi D, Bova ME, Miletto I (2011) New potent fluorescent analogues of strigolactones: synthesis and biological activity in parasitic weed germination and fungal branching. *Eur J Org Chem* **2011**: 3781–3793
- Proust H, Hoffmann B, Xie X, Yoneyama K, Schaefer DG, Yoneyama K, Nogu   F, Rameau C (2011) Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **138**: 1531–1539
- Rameau C, Bodelin C, Cadier D, Grandjean O, Miard F, Murfet IC (1997) New *ramosus* mutants at loci *Rms1*, *Rms3* and *Rms4* resulting from the mutation breeding program at Versailles. *Pisum Genet* **29**: 7–12
- Rani K, Zwanenburg B, Sugimoto Y, Yoneyama K, Bouwmeester HJ (2008) Biosynthetic considerations could assist the structure elucidation of host plant produced rhizosphere signalling compounds (strigolactones) for arbuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants. *Plant Physiol Biochem* **46**: 617–626
- Reizelman A, Wigchert SCM, del-Bianco C, Zwanenburg B (2003) Synthesis and bioactivity of labelled germination stimulants for the isolation and identification of the strigolactone receptor. *Org Biomol Chem* **1**: 950–959
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, et al (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol* **155**: 721–734
- Sato D, Awad AA, Takeuchi Y, Yoneyama K (2005) Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanch*, produced by cotton. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 98–102
- Scaffidi A, Waters MT, Bond CS, Dixon KW, Smith SM, Ghisalberti EL, Flematti GR (2012) Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorg Med Chem Lett* **22**: 3743–3746
- Schachtschabel D, Boland W (2007) Efficient generation of a trisporoid library by combination of synthesis and biotransformation. *J Org Chem* **72**: 1366–1372
- Schreiber J, Wermuth CG (1965) Etude de la condensation de l'acide pyruvique avec les aldéhydes aliphatiques non substitués en alpha. I. Produits de condensation dont la chaine carbon  e est ramifi  e-semiald  hydes méthyl-alcoyl maliques et semiald  hydes méthyl-alcoyl maléiques. *Bull Soc Chim Fr* **2242**–2249
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67–69
- Sorefan K, Booker J, Haurog   K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, et al (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* **17**: 1469–1474
- Soto MJ, Fernandez-Aparicio M, Castellanos-Morales V, Garcia-Garrido JM, Ocampo JA, Delgado MJ, Vierheilig H (2010) First indications for the involvement of strigolactones on nodule formation in alfalfa (*Medicago sativa*). *Soil Biol Biochem* **42**: 383–385
- Stévenin A, Boyer F-D, Beau J-M (2012) Highly selective formation of β -glycosides of N-acetylglucosamine using catalytic iron(III) triflate. *Eur J Org Chem* **2012**: 1699–1702
- Surmont R, Verniest G, De Kimpe N (2010) Short synthesis of the seed germination inhibitor 3,4,5-trimethyl-2(5H)-furanone. *J Org Chem* **75**: 5750–5753
- Thuring J, Keltjens R, Nefkens GHL, Zwanenburg B (1997) Synthesis and biological evaluation of potential substrates for the isolation of the strigol receptor. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **759**–765
- Tsuchiya Y, McCourt P (2012) Strigolactones as small molecule communicators. *Mol Biosyst* **8**: 464–469
- Turnlinson JH, Klein MG, Doolittle RE, Ladd TL, Proveaux AT (1977) Identification of the female Japanese beetle sex pheromone: inhibition of male response by an enantiomer. *Science* **197**: 789–792
- Turnbull CGN, Booker JP, Leyser HMO (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 255–262
- Ueno K, Fujiwara M, Nomura S, Mizutani M, Sasaki M, Takikawa H, Sugimoto Y (2011a) Structural requirements of strigolactones for germination induction of *Striga gesnerioides* seeds. *J Agric Food Chem* **59**: 9226–9231
- Ueno K, Nomura S, Muranaka S, Mizutani M, Takikawa H, Sugimoto Y (2011b) Ent-2'-epi-orobanchol and its acetate, as germination stimulants for *Striga gesnerioides* seeds isolated from cowpea and red clover. *J Agric Food Chem* **59**: 10485–10490
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200
- Vurro M, Yoneyama K (2012) Strigolactones: intriguing biologically active compounds. Perspectives for deciphering their biological role and for proposing practical application. *Pest Manag Sci* **68**: 664–668
- Wolff S, Hoffmann HMR (1988) Aflatoxins revisited: convergent synthesis of the ABC moiety. *Synthesis* **760**–763
- Xie X, Kusumoto D, Takeuchi Y, Yoneyama K, Yamada Y, Yoneyama K (2007) 2'-Epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J Agric Food Chem* **55**: 8067–8072
- Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K (2008) Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry* **69**: 427–431
- Xie XN, Yoneyama K (2010) The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 93–117
- Xie XN, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K (2009) Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **70**: 211–215
- Yamaguchi S, Umehara M, Akiyama K, inventors. December 2, 2010. Plant branching inhibitor, method for producing same, and plant branching inhibitory composition. Japan Patent Application No. WO/2010/137662
- Yoneyama K, Awad AA, Xie XN, Yoneyama K, Takeuchi Y (2010) Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol* **51**: 1095–1103
- Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K (2012) How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**: 1197–1207
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y (2009) Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Manag Sci* **65**: 467–470
- Yoneyama K, Xie XN, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K (2007) Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**: 125–132
- Zanatta N, Barichello R, Pauletto MM, Bonacorso HG, Martins MAP (2003) Convenient synthesis of 3-aminomethylenedihydrofuran-2-ones. *Tetrahedron Lett* **44**: 961–964
- Zwanenburg B, Mwakaboko AS (2011) Strigolactone analogues and mimics derived from phthalimide, saccharine, p-tolylmalondialdehyde, benzoic and salicylic acid as scaffolds. *Bioorg Med Chem* **19**: 7394–7400
- Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D (2009) Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag Sci* **65**: 478–491

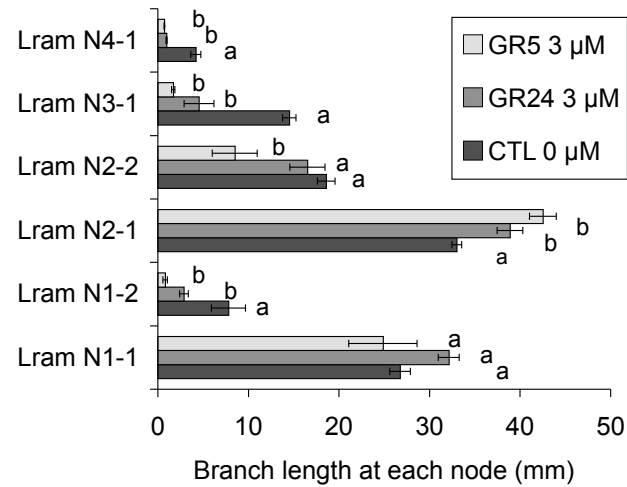


Figure S1. Bioassay on bud outgrowth using hydroponic culture; comparison of activity of GR24 and GR5. Axillary bud length at each node of *rms1* plants 2 weeks after treatment. Lram Ni-j = ramification length at node i; j=1 means the main branch at this node; j=2 means the second branch at this node when visible (data are means $\pm$ SE ($n = 12$)). CTL 0 = control 0.

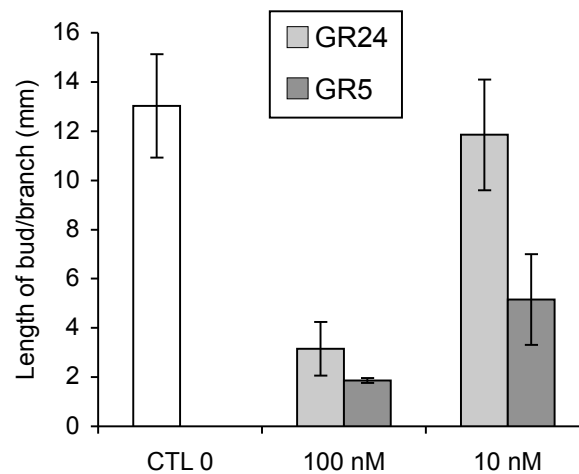


Figure S2. Dose dependent activity of the SL analogs GR24 and GR5. Length of axillary bud 10 days after direct application at node 4. Data are means $\pm$ SE ($n = 24$). CTL 0 = control 0.

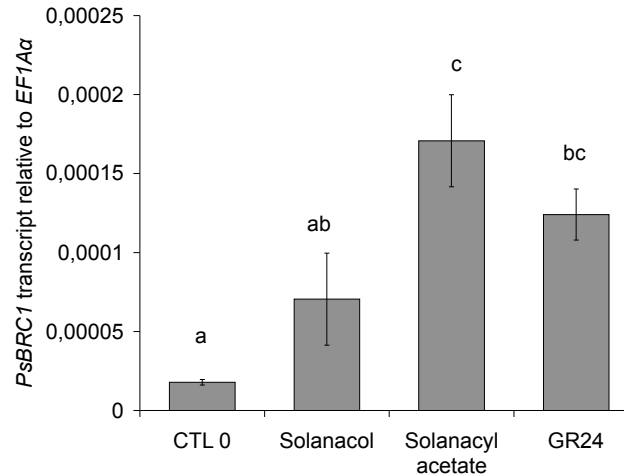


Figure S3. Effect of different strigolactones (500 nM) on *PsBRC1* transcript levels in axillary bud at node 3 of *rms1* plants. Plants were treated by were harvested direct application on the bud. Buds 6 h after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 30 plants). Values that have the same letter (a-c) are not significantly different at the $P = 0.05$ level. CTL 0 = control 0.

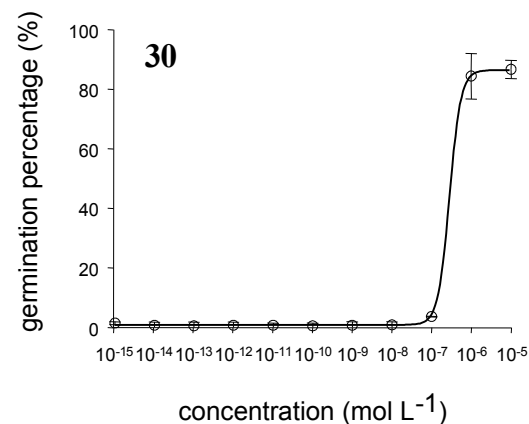
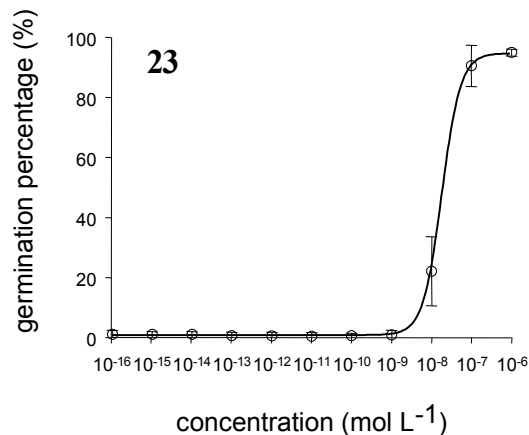
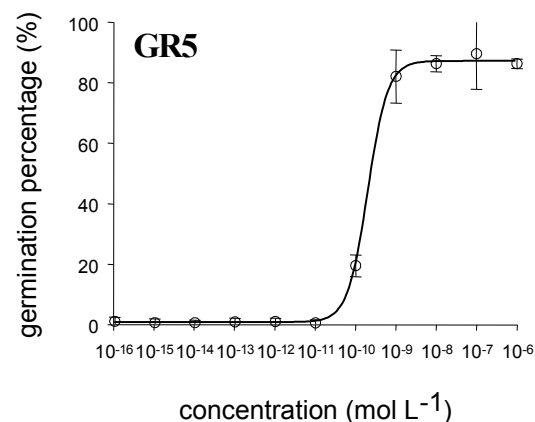
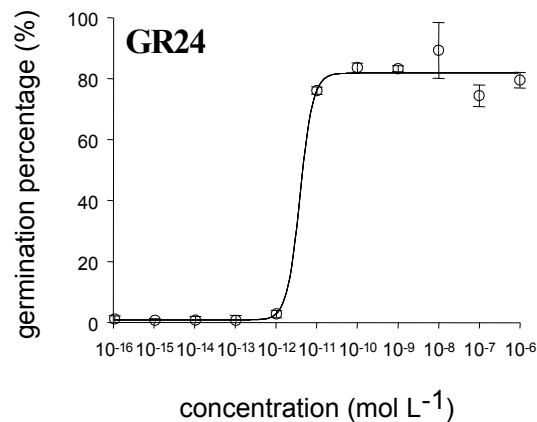


Figure S4. Stimulatory activity of GR24, GR5, 23 and 30 toward *P. ramosa* seeds germination. $G = f(c)$, G : germination percentage ; c : concentration (mol. L⁻¹); dose-reponse curves ($g = f(c)$, g : germination percentage ; c : concentration (mol. L⁻¹)) modeled with a four parameter logistic curve computed with SigmaPlot® 10.0.

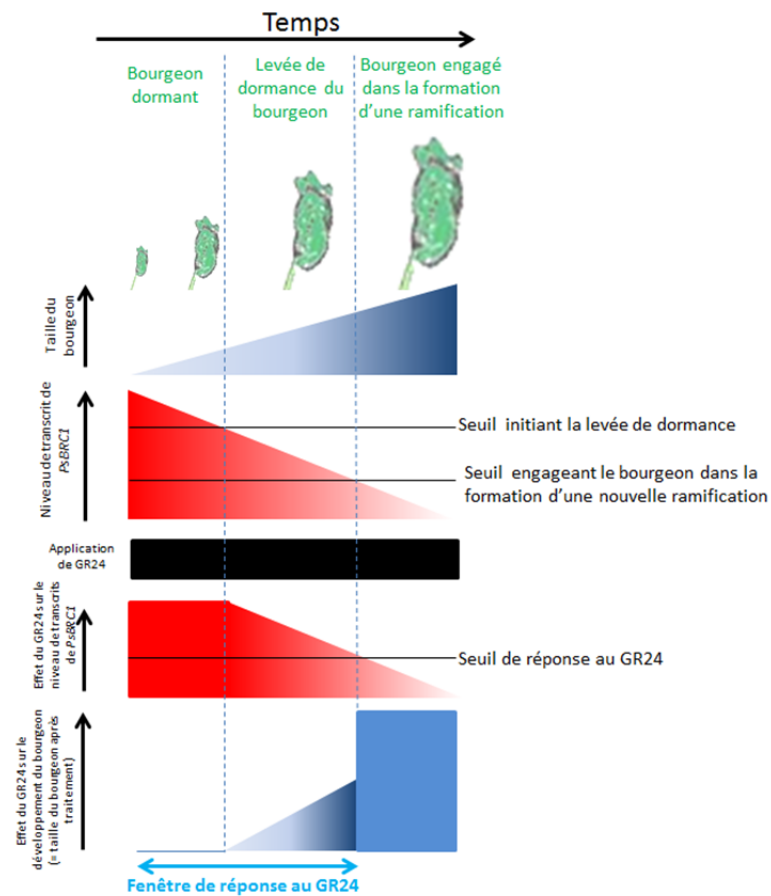


Figure I.1. Schéma interprétatif de l'effet du GR24 sur le niveau des transcrits du gène *PsBRC1* sur les bourgeons axillaires de pois

VI. Conclusions et perspectives

A ce jour, le gène *PsBRC1* mais aussi *AtBRC1* reste le meilleur marqueur de réponse aux strigolactones (avec le gène *RMS1/CCD8*). L'analyse du niveau de transcrits de *PsBRC1* dans le bourgeon axillaire permet ainsi de valider l'efficacité des traitements aux strigolactones. Malgré tout ce gène est spécifique du bourgeon et ne peut donc être utilisé comme gène de réponse aux autres effets physiologiques des strigolactones et notamment sur l'action des strigolactones dans la tige ou dans les racines. Une approche de transcriptomique tissu spécifique pourrait probablement permettre d'identifier des nouveaux gènes de réponses aux strigolactones mais aussi des acteurs de la perception des strigolactones. Les facteurs de transcription TCP, auxquels appartient BRC1, comporte d'autres membres qui sont impliqués dans les processus développementaux des plantes. Ainsi d'autres TCP, dont l'expression serait spécifique de certains tissus, pourraient être régulés par les strigolactones comme par exemple les gènes *AtTCP14* et *AtTCP15* d'*Arabidopsis* qui contrôlent la germination de la graine et l'élongation de la tige (Kieffer et al., 2011).

Le gène marqueur *PsBRC1* a permis de mieux comprendre l'interaction avec les cytokinines et d'expliquer la dynamique du développement du bourgeon. Il semblerait donc que ce soit le niveau de transcrit du gène *PsBRC1* qui détermine le devenir du bourgeon et sa sensibilité à l'application de strigolactones. Lorsque le niveau de transcrit de *PsBRC1* franchit un seuil inférieur limite, l'inhibition exercée par ce facteur de transcription n'est plus assez forte, ce qui engage le bourgeon de façon irréversible dans la formation d'une branche. Si l'application de strigolactones se fait après le démarrage du bourgeon, elle ne peut contrer cette différenciation et entraîne juste un ralentissement de la croissance de la jeune ramification (Figure I.1). Ce mécanisme d'organogénèse de la plante déterminé par le niveau de transcrit d'un facteur de transcription est un processus très bien caractérisé dans les études du développement embryonnaire chez les métazoaires, où le devenir cellulaire est déterminé par le niveau de transcription d'un gène, le plus souvent un facteur de transcription ; lui-même influencé par des substances morphogènes (= hormone de croissance) (Wolpert et al. 1999). La compréhension de la régulation de ce facteur de transcription pourra peut-être permettre de comprendre pourquoi les ramifications de la base de la plante chez le pois (noeud 2 essentiellement) sont très difficilement inhibées par un traitement SL contrairement aux ramifications supérieures. Certaines espèces de plantes, comme la

tomate sont quasi insensibles aux strigolactones dans l'inhibition de la ramification (expériences réalisées au laboratoire, données non publiées).

Comme on l'a vu, *PsBRC1* est un excellent outil pour l'étude structure fonction des strigolactones. Ce marqueur pourrait permettre d'approfondir le comportement des différentes strigolactones dans la plante et notamment de détecter des différences dans la perméabilité des molécules en réalisant différents types de traitements hormonaux (application directe sur le bourgeon ou injection directe dans le système vasculaire).

Chapitre II : RMS3, un putatif récepteur des strigolactones

I. Introduction

La question majeure de ma thèse était d'élucider le mécanisme de perception des strigolactones pour cela nous avons étudié les mécanismes de perception des autres hormones végétales qui implique des protéines à boîte F. Si on s'inspire du modèle de perception de l'auxine pour celui des strigolactones, on peut supposer que la protéine à boîte F, MAX2, lie l'hormone, comme TIR1 lie l'auxine (Kepinski and Leyser, 2005), et conduit à la dégradation de répresseurs aujourd'hui encore inconnus. Cette dégradation provoquerait l'expression de gènes de réponse aux strigolactones, comme *PsBRC1*. Dans ce cas, D14 ne serait pas directement impliqué dans la perception et on pourrait envisager que la protéine D14 qui code pour une alpha/beta hydrolase (Arite et al., 2009), active la strigolactone juste avant sa liaison à MAX2, à l'image de SABP2 alpha/beta hydrolase une responsable de l'activation de l'acide salicylique à partir du méthyl salicylate (Forouhar et al., 2005).

Par contre, si on s'inspire du modèle gibbérellique, où GID1, une alpha/beta hydrolase également est le récepteur soluble de cette phytohormone (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), ce serait la protéine D14 qui lierait la strigolactone et entraînerait la dégradation de potentiels répresseurs. Cette dégradation se ferait via la formation d'un complexe avec la protéine MAX2 (qui serait alors l'équivalent de la protéine GID2 de la voie gibbérelline). Il se pose donc la question de savoir quel mécanisme est le plus proche de celui de la perception des strigolactones ?

Pour tenter d'élucider le mécanisme de perceptions des strigolactones nous avons porté notre étude sur les mutants de réponse aux strigolactones *rms3* (Beveridge et al., 1996) et nous nous sommes inspiré du modèle gibbérellique du fait que la voie de signalisation de cette hormone implique une protéine à boîte F et une alpha/beta hydrolase (Ueguchi-Tanaka et al., 2005) comme celle des strigolactones.

II. Article : The pea *RMS3* gene encodes an α/β hydrolase involved in strigolactone response and controls a root-to-shoot mobile signal SL-independent (en préparation)

Avant-propos

L'étude sur le gène *RMS3*, qui constitue une partie importante de mon travail de thèse a subi plusieurs « rebondissements » récents. Nous nous sommes tout d'abord aperçus que la protéine RMS3 que nous avons produite dans *E. coli* pour des études de liaison avec les SL et des tests enzymatiques, n'était pas correctement purifiée. Les analyses en spectrométrie de masse menées sur la plateforme de Jouy-en-Josas (collaboration P. Jolivet, A. Guillot) ont montré une forte proportion d'une protéine chaperonne d'*E. coli* dans l'échantillon correspondant à la protéine recombinante RMS3-GST.

L'autre rebondissement est la publication sur la protéine DAD2 du Pétunia (Hamiaux et al., 2012). DAD2 is an α/β Hydrolase likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone. Current Biol *in press*.) Dans cet article, les auteurs démontrent que le gène de pétunia *DAD2* est homologue à *D14* du riz et code une α/β hydrolase. Ils montrent qu'en présence de GR24, la protéine recombinante DAD2 interagit avec la protéine à F-box PhMAX2. De plus DAD2 hydrolyse GR24 *in vitro* et les produits d'hydrolyse ne permettent pas la liaison DAD2/PhMAX2 et sont inactifs dans l'inhibition de la ramification. Les auteurs émettent l'hypothèse que DAD2 est le récepteur des SL et que pendant la réaction de catalyse, DAD2 interagit avec PhMAX2 permettant l'initiation de la voie de signalisation des SL.

Nous avons néanmoins choisi de présenter les résultats que nous avons obtenus sur le gène *RMS3* de pois sous forme d'article en anglais tels que nous envisagions de les publier même si nous avons encore plusieurs expériences à réaliser. Notre stratégie de publication devra être modifiée mais nous présenterons sous forme de discussion les perspectives envisagées à plus ou moins long terme et rajouterons une discussion qui intègre nos résultats avec ceux du papier DAD2.

The pea *RMS3* gene encodes an α/β hydrolase involved in strigolactone response and controls a root-to-shoot mobile signal SL-independent

Alexandre de Saint Germain¹, Sébastien Garcia-Argote³, Nathalie Vrielynck¹, Jean-Paul Pillot¹, Bernard Rousseau³, François-Didier Boyer² and Catherine Rameau^{1*}

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA UMR1318 INRA-AgroParisTech, F-78026 Versailles

² Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR2301, F-91198 Gif-sur-Yvette

³ CEA, iBiTec-S, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, F-91191 Gif sur Yvette

* Corresponding author : Catherine.rameau@versailles.inra.fr.

INTRODUCTION

Strigolactones (SLs) are a family of a new plant hormone involved in the inhibition of shoot branching (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). SLs are not just relevant to shoot architecture; they also act in the rhizosphere where they are key actors in both symbiotic and parasitic interactions. Being involved in the establishment of arbuscular mycorrhizal symbiosis, they affect nutrient uptake and drought resistance. They also stimulate seed germination of parasitic weeds (*Orobanche* and *Striga*) which are among the most damaging parasitic weed species worldwide (Parker, 2009). Many other developmental traits affected by SLs are being discovered such as root architecture (Koltai, 2011), stem structure (Agusti et al., 2011) and seedling morphogenesis (Nelson et al., 2012).

Mutant studies in different species revealed that multiple genes are involved in the control of shoot branching including the *RAMOSUS* (*RMS*) genes in pea, the *DECREASED APICAL DOMINANCE* (*DAD*) genes in petunia, the *MORE AXILLARY GROWTH* (*MAX*) genes in Arabidopsis, and the *DWARF* (*D*)/*HIGH-TILLERING DWARF* (*HTD*) genes in rice (Dun et al., 2009). Today 4 genes have been identified in the SL biosynthesis pathway. In pea, *RMS1* and *RMS5* encode enzymes known to cleave carotenoids, two Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD8 and CCD7 respectively) (Booker et al., 2005; Johnson et al., 2006), involved in SL biosynthesis from carotenoids (Schwartz et al., 2004). Recently, a study revealed that 9-cis- β -carotene is the substrate for CCD7 and that D27, a protein first discovered in rice to be involved in SL biosynthesis, is an isomerase that converts all-trans- β -carotene into 9-cis- β -carotene. CCD7 converts 9-cis- β -carotene into 9-cis- β -apo-10'-carotenal, which is used as a substrate by CCD8 to produce carlactone, an intermediate compound in strigolactone

biosynthesis (Alder et al., 2012). The *MAX1* gene from *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 (Booker et al., 2005). Based on grafting experiments, MAX1 is thought to act on a root-to-shoot mobile product downstream of CCD8 (Booker et al., 2005). The *Arabidopsis max1* mutant shows a high branching phenotype together with reduction in orobanchol, suggesting its role in SL biosynthesis (Kohlen et al., 2010) but the chemical function of MAX1 is still unknown.

In pea, 2 proteins have been characterized for their implication in SL response for branching inhibition, the F-box protein RMS4 and the TCP transcription factor PsBRC1. Transcript levels of *PsBRC1*, the pea homolog of the maize *TEOSINTE BRANCHED1* gene (*TB1*), is strongly induced in response to strigolactone application in axillary bud (Braun et al., 2012). RMS4 is a member of the large F-box leucine-rich repeat (LRR) protein family (Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006; Stirnberg et al., 2007). In contrast to the SL biosynthesis *rms1* mutant, and similarly to *Psbrc1*, the high branching *rms4* mutant does not respond to strigolactone application. This result suggested that the SL signaling pathway has similarities with the signaling pathways of other major plant hormones (auxin, gibberellic acid, jasmonic acid) (Santner and Estelle, 2009). These pathways involve ubiquitination of specific targeted proteins by a Skp/Cullin/F-box complex (SCF) and their subsequent degradation by the 26S proteasome (Vierstra, 2009). Hence MAX2/RMS4 is a good candidate for the SL receptor as TIR1/AFB in auxin signaling, COI1 in the jasmonate signaling and GID2 in the gibberellin signaling pathway (Santner and Estelle, 2009).

The pea *RMS3* gene is another gene that has been described as acting mostly in the shoot together with the *RMS4* gene by the physiological characterization of the high branching *rms3* and *rms4* mutants (Morris et al., 2001). Using grafting experiments, it was shown that while branching of *rms1* scion grafted on WT rootstock is completely inhibited, branching of *rms3* and *rms4* scions grafted on WT rootstock is maintained. These results suggested that RMS1 was involved in the biosynthesis of a branching inhibitor, and RMS3 and RMS4 were controlling the response to this inhibitor. Moreover RMS1 expression in *rms3-1* epicotyls was higher than in WT (Foo et al., 2005) and *rms3-2* has substantially lower concentrations of cytokinin in the xylem sap compared with WT (Beveridge, 2000). These data indicated that as for the *rms1* SL deficient mutant and for the *rms4* SL response mutant,

the shoot-to-root feedback signal was activated in the *rms3* mutants conforing the hypothesis that RMS3 was acting in the same signaling pathway as RMS4.

Here we have cloned the RMS3 gene and shown that it corresponds to the rice D14 gene encoding an α - β /hydrolase. The high-tillering rice *d14* mutant is not responding to the synthetic GR24 applications. Moreover levels of 2'-epi-5-deoxystrigol (epi-5DS), a natural SL of rice, are higher in roots and root exudates of *d14* than in WT. The rice *D14/D88/HTD2* gene encodes a protein belonging to the α - β /hydrolase superfamily (Arite et al., 2009; Gao et al., 2009; Liu et al., 2009). It was proposed that either D14 was involved in SL perception or that D14 had an enzymatic activity to convert an inactive strigolactone to an active strigolactone. These hypothesis are supported by the fact that two members of the α - β /hydrolase superfamily proteins have a substantial role in metabolism and signaling of small molecules such as plant hormones : GID1, the gibberellin (GA) receptor (Ueguchi-Tanaka et al., 2005) and SABP2 (Salicylic Acid Binding Protein 2), an esterase involved in SAR (Systemic Acquired Resistance), a plant defense mechanism induced throughout a plant by an initial infection (Forouhar et al., 2005). The GA-binding site corresponding to the catalytic triad has been adapted for GA binding in GID1 (**Ueguchi-Tanaka and Matsuoka, 2010**). These GID1 proteins have lost their enzymatic activity (Ueguchi-Tanaka et al., 2007). In contrast, SABP2 has an esterase activity using methyl salicylate (MeSA) as substrate to convert it to SA (Forouhar et al., 2005). MeSA is translocated by the phloem and in systemic tissues; MeSA is perceived by SABP2 and converted back to SA, which is the active signal in SAR (Park et al., 2007).

In this paper, we demonstrate that the pea *RMS3* gene (Beveridge et al., 1996) encodes an α - β /hydrolase and that the high branching *rms3* mutants do not respond to SL application, similarly to *rms4*, but show a significant response to grafting in contrast to *rms4*. Moreover grafting on the SL deficient *rms1* mutant suggests that the root-to-shoot signal which inhibits branching in *rms3* scion is SL independent. Metabolism studies with a tritiated-labelled GR24 show its rapid transformation *in planta* using both *rms1* and *rms3* indicating that RMS3 is not involved in this modification.

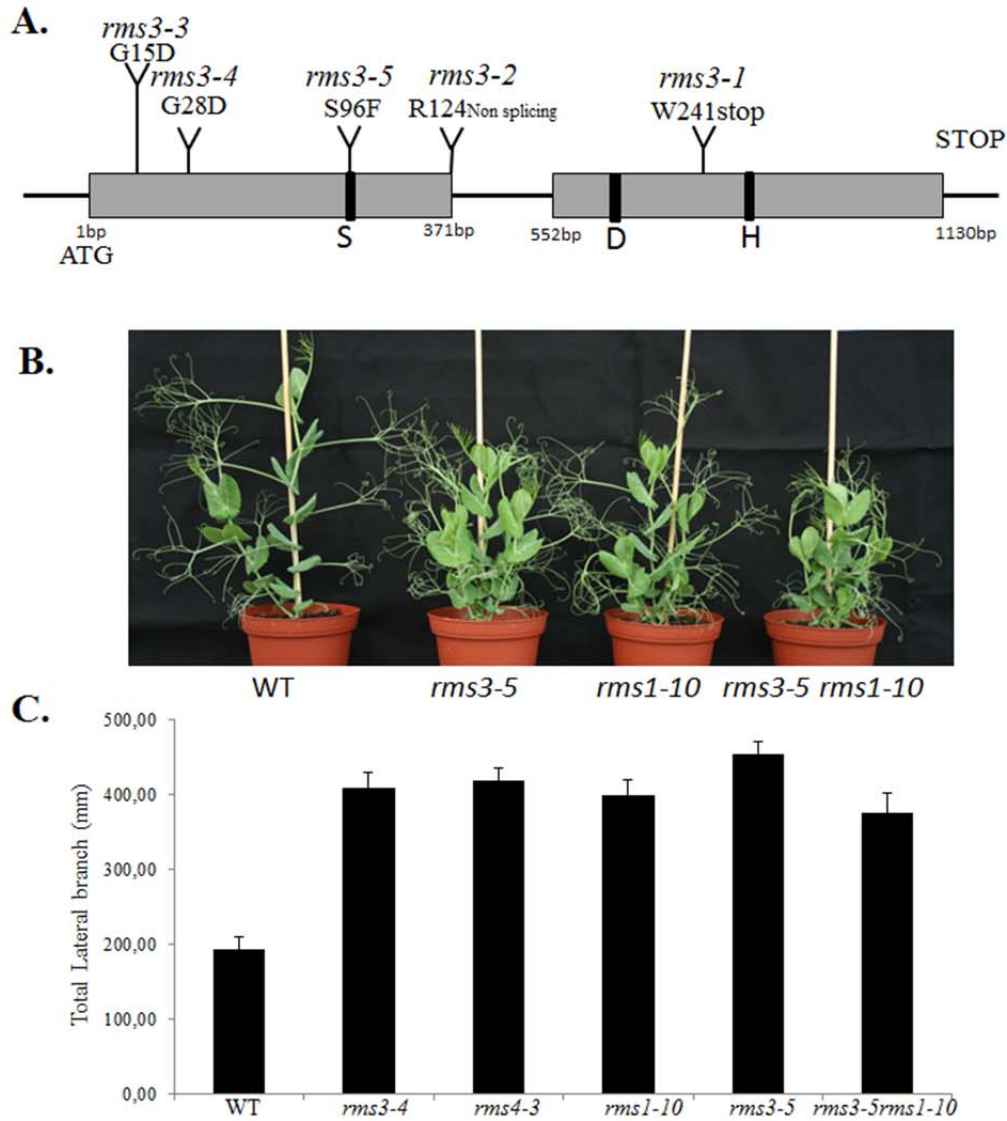


Figure 1. Genetic evidence that *RMS3* encodes an α - β /hydrolase and is involved in the SL signaling pathway

- A. Structure of the *RMS3* gene showing exons (thick line), intron (thin line) and location of the 5 mutations leading to the *rms* phenotype. Bases are numbered from the start codon.
- B. Comparison of the wild-type (WT) Térése, *rms3-5*, *rms1-10*, and *rms3-5 rms1-10* double mutant.
- C. Quantification of total lateral length in WT, single and double mutants. Data are means $\pm$ SE (n = 12).

RESULTS

1. The pea *D14* homolog, *PsD14*, is the *RMS3* branching gene

Degenerate primers, designed from a protein alignment between several *D14* homologs from *Arabidopsis* (GeneBank AEE74023.1), rice *OsD14*, *Medicago* EST (TC118743) and *Glycine max* (GeneBank AK245636), were used to obtain a pea homolog, *PsD14*. Comparison of genomic and cDNA sequences indicated the presence of a small intron of 181 bp at the same position as in rice (Fig. 1A) whereas no intron is found for the *Arabidopsis* homologue. The 267-aa translated protein with a calculated molecular mass of 29 kDa was 77 % identical to those of *AtD14* from *Arabidopsis* (AT3G03990) and phylogenetic analysis showed that *PsD14* was clearly related to the D14-clade than to the more ancestral D14-like clade (Supplemental Fig. S1). *PsD14* contains the catalytic triad (S/D/H) but the esterase/lipase signature sequence (GX SXG) is not present and is replaced by the sequence (GX SXS) (Supplemental Fig. S2) (predicted by phyre2; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>).

Because the pea *RMS3* gene was a good candidate to correspond to *PsD14*, a CAPS marker was designed for *PsD14* to map it on 50 individuals of the F2 population (T2-30 x Torsdag) segregating for *RMS3* located at the top of linkage group II (Rameau et al 1998). Co-segregation between *PsD14* and *RMS3* was observed in the F2 individuals. To confirm that *PsD14* was corresponding to *RMS3*, sequencing of *PsD14* was performed in the 5 available *rms3* mutant alleles and in the 3 corresponding WT lines. Mutations were found for each allele (Fig. 1A). In the *rms3-1* mutant line (K487), a G-to-A substitution at base position 723 results in a stop codon at position 241, six amino acids before the H of the catalytic triad (Fig. 1A). In the *rms3-2* mutant line (K564), a point mutation was found at the exon-intron junction, converting the consensus splicing donor motif AG/GT to AG/AT. Using primer pairs surrounding the intron, reverse transcriptase PCR performed on leaf cDNA and PCR on gDNA from the *rms3-2* mutant and the Torsdag WT line confirmed that the intron is not spliced in *RMS3* transcripts from *rms3-2* (Supplemental Fig. S3). Retention of the intron in *rms3-2* is predicted to result in the introduction of a stop codon, truncating *RMS3* after amino acid 124. No amplification was obtained on leaf mutant cDNA with 2 pairs of primers designed to amplify WT cDNA and not the genomic sequence (one overlapping the intron). This suggests that this mutant is able to produce only a truncated protein of 125 amino acids. In sequences from *rms3-3* (line WL6042 from WT Raman) and *rms3-4* (line T2-30 from WT T  r  se), G-to-A substitutions at base positions 44 and 83 respectively convert Gly to Asp at positions 15 and

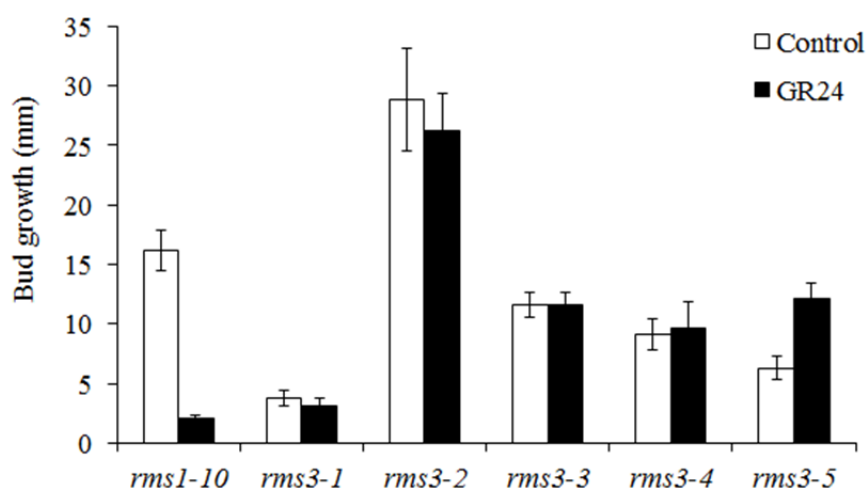


Figure 2 . The 5 *rms3* mutants do not respond to strigolactone application.

Buds at node 3 of 15-d-old plants were treated with 0 or 1 μ M GR24 and their growth measured after 7 d. Data are means $\pm$ SE (n = 12).

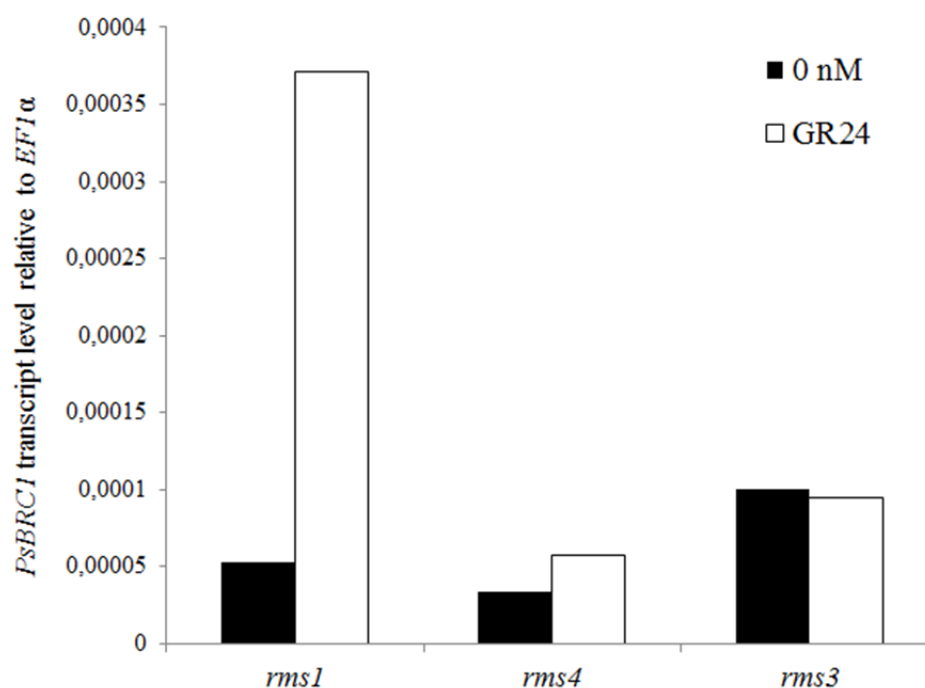


Figure 3 . GR24 does not induce *PsBRC1* transcript levels in *rms3*. *PsBRC1* transcript levels were determined relative to *EF1α* in axillary buds at node 4, 6 h after GR24 application (white bars) or mock treatment (black bars). RNA was extracted from dissected buds from pools of 30 plants at the six-node stage and quantified by real-time PCR. The data are representative of two independent experiments.

28 respectively. The C-to-T substitution at position 287 identified in the *rms3-5* line (M2T-32 from WT T  r  se) is responsible for the replacement of the S of the catalytic triad (position 96) by F. These 3 mutations are supposed to give important alterations of the protein function as the first 2 mutated G are conserved in all D14 and D14-like proteins.

Consequently the high branching phenotype of the *rms3* pea mutants (Beveridge et al., 1996), similar to the high branching phenotype of the rice *Osd14* mutant (Arite et al., 2009) and of the Arabidopsis *AtD14* (Waters et al., 2012), the colocalisation of *PsD14* and *RMS3* at the top of linkage group II and the identification of mutations in the *PsD14* sequence from 5 independent *rms3* mutant alleles strongly indicate that *PsD14* corresponds to the *RMS3* branching gene.

2. The *rms3* mutants are affected in the SL response

To test if *RMS3* is involved in SL response, a genetic analysis was first performed by comparing the phenotype of *rms3 rms1* double mutants with single mutants. Branching phenotype of double mutant was similar to branching of single mutants suggesting that they were affected in the same pathway (Fig. 1B-C).

The response to SL applications was tested in the 5 *rms3* mutant lines using the synthetic SL GR24. Whereas branching at node 3 was strongly repressed for the SL deficient *rms1* mutant, for the 5 *rms3* lines, branching was not inhibited after SL applications (Fig. 2). Same results were obtained when GR24 was fed via the roots using an hydroponic system on *rms3-4* and *rms3-5* (data not shown).

To confirm this non-response to SL, we used the *PsBRC1* gene encoding a TCP transcription factor as a molecular marker of SL-response (Braun et al., 2012). Expression of *PsBRC1* was quantified in *rms3* axillary buds 6 hours after GR24 application. The SL deficient *rms1* and SL response *rms4* mutants were added as controls. Whereas *PsBRC1* transcript levels increased in axillary buds of *rms1* after GR24 application, no significant increase was observed for *rms4* and *rms3* confirming the non-response to SL of *rms3* (Fig. 3).

3. Molecular characterization of *RMS3*

WT plants were dissected at three stages during development in different parts to quantify *RMS3* transcript levels using qRT-PCR. *RMS3* transcripts were found in all tissue analyzed but were more abundant in leaf tissue (Fig. 4) which is the expression pattern of the other SL response gene *RMS4* (Johnson et al., 2006).

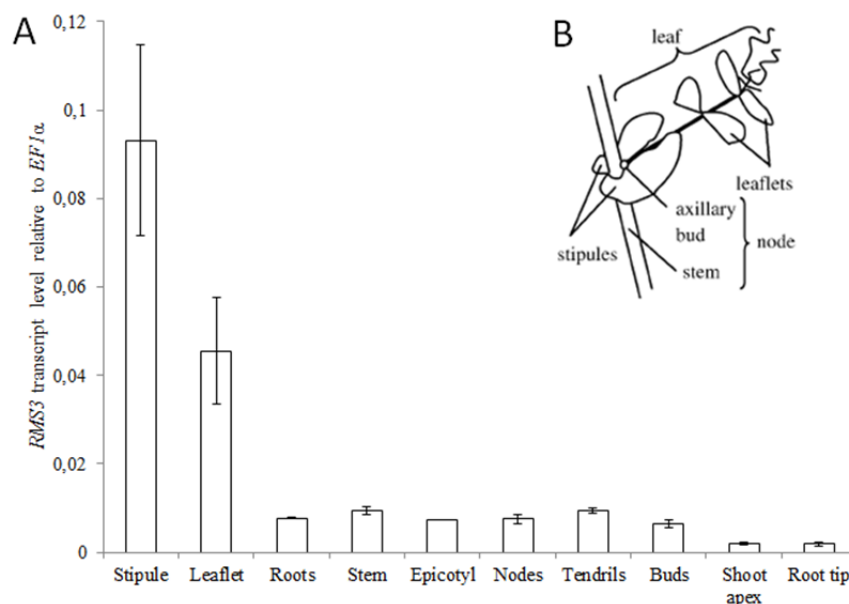


Figure 4. *RMS3* is mostly expressed in leaves
(A) *RMS3* transcript levels in the different tissues of wild-type pea plants (cv. Tèreze) determined by real-time PCR. Data are means $\pm$ SE ($n = 2$ pools of 8 plants).
(B) Drawing of a node showing the different parts of the pea compound leaf.

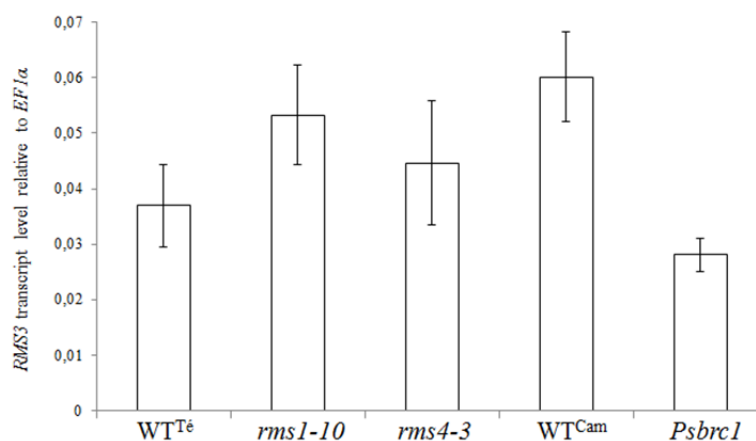


Figure 5. *RMS3* transcript levels are not changed in SL-related mutants
RMS3 transcript levels in stipule of different pea branching mutants and their corresponding WT lines (WT Tèreze for *rms1* and *rms4*; Caméor for *Psbrc1*) determined by real-time PCR. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 8 plants).

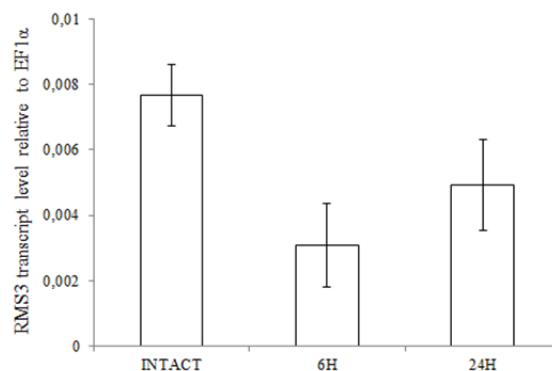


Figure 6. *RMS3* transcript levels decrease after decapitation
RMS3 transcript levels in stipule of pea plants (cv. Tèreze) 6 h and 24 h after decapitation determined by real-time PCR. Data are means $\pm$ SE ($n = 3$ pools of 8 plants).

To test if SL regulates transcriptionally *RMS3*, transcript levels were investigated in leaf of SL-related mutants. No difference in *RMS3* transcript levels was observed between WT, *rms1* and *rms4* mutants whereas *RMS3* transcript levels were slightly reduced in the *Psbrc1* mutant in comparison with its initial WT line Caméor. This suggested that SL does not regulate *RMS3* transcription (Fig. 5).

To investigate if other hormones such as auxin or CK regulate *RMS3* transcription, we first quantify *RMS3* transcript levels after plant decapitation in the stipule at the node below decapitation. 6 hours after decapitation, a significant decrease was observed but not after 24 h (Fig. 6). Decapitation induces many changes in hormone levels. In pea it has been shown that after decapitation, which strongly reduces the major auxin source, transcript levels of CK biosynthesis genes increase, transcript levels of the SL biosynthesis gene *RMS1* decrease. Further experiments are needed to test if CK for example decrease *RMS3* transcript levels.

4. A root-to-shoot signal, which is not SL, inhibits branching of *rms3* scion

RMS3 encoding an hydrolase, 2 hypothesis can explain the *rms3* non-response to GR24 application: *rms3* is branching because it cannot perceive GR24 or because it cannot produce an active GR24-derived compound. Previous grafting studies sometimes showed slight branching reduction of the *rms3* scion grafted to WT rootstock in contrast to the other SL *rms4* response mutant for which branching is never inhibited whatever the rootstock. To test if a mobile root-to-shoot SL-derived compound was able to inhibit branching of the *rms3* scion, which would suggest an enzymatic function to *RMS3*, these grafting experiments were repeated. Different genotypes of rootstocks were used to obtain different levels of SL (and/or SL-derived compound): WT, *rms4* supposed to produce higher levels of SL than WT and *rms1* which is SL-deficient.

In a first experiment with the 2 *rms3* lines in the Torsdag background (*rms3-1*, *rms3-2*), no reduction of branching was observed for *rms4* grafted on the different genotypes. For the *rms3-1* allele, branching was significantly inhibited when grafted on the *rms4* rootstock. For *rms3-2*, branching was significantly inhibited on WT and *rms4* rootstocks. Surprisingly, branching was also inhibited on the SL-deficient *rms1* rootstock (Fig. 7).

In a second experiment with the 2 *rms3* alleles in the Tèrese background (*rms3-4*, *rms3-5*), branching was strongly inhibited when the 2 *rms3* lines were grafted on *rms4* rootstock

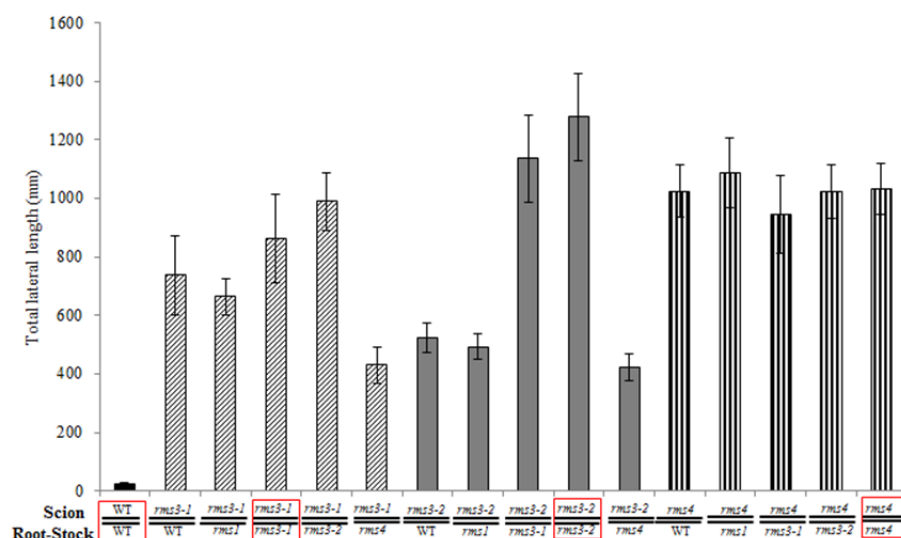


Figure 7. *rms3* mutants can respond partially to grafting on WT, *rms4* and *rms1* rootstocks. Different combinations of grafts between 7d-old plants of WT (cv. Torsdag), *rms1*, *rms4*, *rms3-1* and *rms3-2* as indicated below. Red frames indicate the control self-grafts. Total lateral length from nodes 1 to 6 were measured 39 days after grafting. Data are means $\pm$ SE (n= 12).

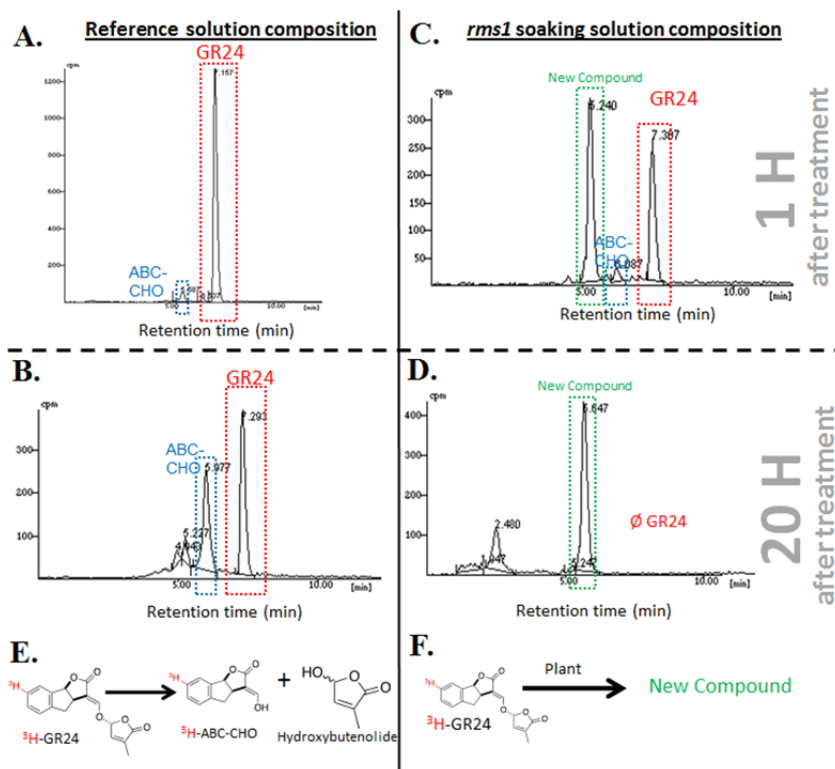


Figure 8. Identification of an unknown labeled compound derived from $\text{H}^3\text{GR24}$ in the presence of root plant. High-performance liquid chromatography (HPLC) traces of $\text{H}^3\text{GR24}$ and derived compounds in the reference solution with no plant (A and B) and in the *rms1* root soaking solution (C and D) after 1 h (A and C) and 20 h (B and D) after addition of $\text{H}^3\text{GR24}$ (10 μM). (E) Classical products of degradation of SL (tricyclic ABC and D). (F) $\text{H}^3\text{GR24}$ is transformed in a novel product in the presence of plant.

but not as strongly as *rms1* grafted on *rms4*. For one allele (*rms3-5*), which is mutated in the catalytic triad, branching was significantly inhibited when grafted on *rms1* (Supplemental Fig. S4 et Fig. S5).

These experiments suggest that a mobile root-to-shoot signal, SL-independent, is able to inhibit branching in *rms3* shoot but this inhibition is not as strong as the branching inhibition in *rms1* scion grafted on WT rootstock.

5. Metabolism studies with a labeled tritiated SL

Another way to test the catalytic activity of the RMS3 protein *in planta* is the use of a labeled SL. We synthesized a labeled tritiated SL on the A ring ($7\text{-}^3\text{H-GR24}$) for metabolism studies (Rousseau et al., unpublished results). The fate of the exogenously added tritiated labeled GR24 ($^3\text{H-GR24}$) was followed in SL deficient *rms1* plants and in *rms3* mutant plants. If RMS3 was involved in the modification of a non-active SL to a SL-derived active branching inhibitor, different labeled products should be observed between *rms1* and *rms3*.

The synthetic SL GR24 brought to the plant via the root system by hydroponic culture can inhibit shoot branching (Boyer et al., 2012). It suggests that GR24 or a derived-molecule can move from root to shoot to inhibit bud outgrowth. We soaked root plants in a solution of $1\text{ }\mu\text{M }^3\text{H-GR24}$ and examined its fate in the soaking solution and in the xylem sap after 1 h and 20 h. After 1 hour the reference solution in which no plant was soaked contained a large pic of $^3\text{H-GR24}$ and a small pic corresponding to the ABC-CHO degradation product was also observed. To confirm that this small peak is ABC-CHO compound, we performed HPLC analysis of the mix between soaking solution and synthetic ABC-OH compound (Supplemental Fig. S7). The synthetic compound is monitored by UV and ABC-OH radiolabeled compound by radioactivity counter. The 2 compounds were observed at the same time. After 20 h the pic corresponding to ABC-CHO increased and $^3\text{H-GR24}$ was still present in the reference solution. In contrast in the soaking solution where *rms1* roots were incubated, $^3\text{H-GR24}$ was still present with a large pic of a novel compound not observed previously and not corresponding to ABC-CHO. After 20h, no more $^3\text{H-GR24}$ was present in the soaking solution. Only the novel compound of retention time 5,2 min. was observed. (Fig. 8).

The same profile of $^3\text{H-GR24}$ transformation/degradation products were observed for *rms1* and *rms3* plants suggesting that RMS3 is not involved in the formation of the novel

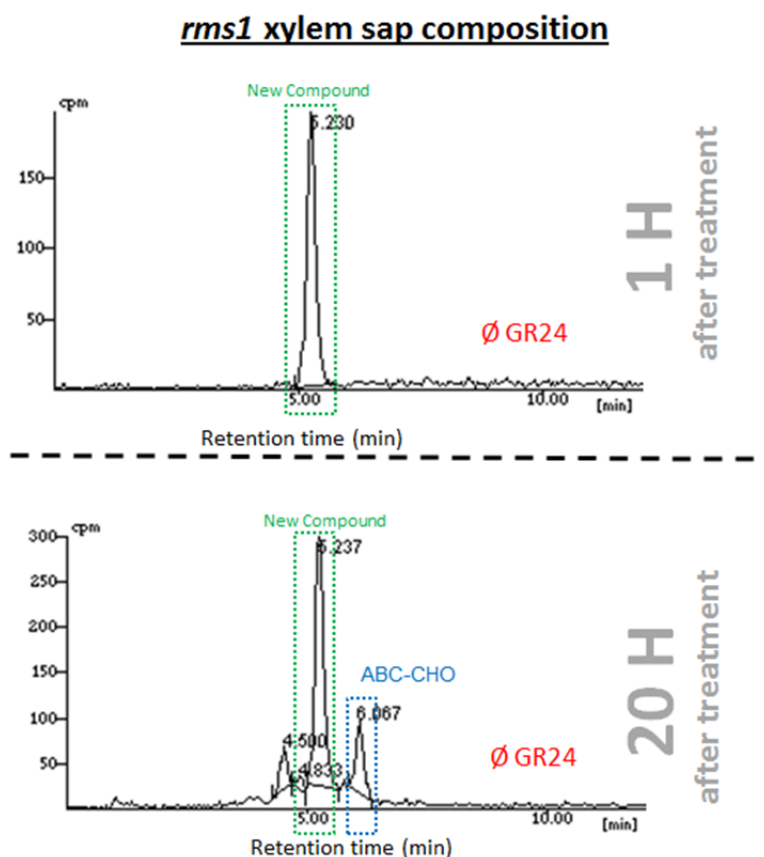


Figure 9 . Identification of an unknown labeled compound derived from H³GR24 in the xylem sap of *rms1*. High-performance liquid chromatography (HPLC) traces of H³GR24 derived compounds in the xylem sap of *rms1*, 1 h (above) and 20 h (below) after addition of H³GR24 (10 μ M) in the root soaking solution.

tritiated labeled SL (Supplemental Fig. S6). Surprisingly we could not detect any ^3H -GR24 in xylem sap even after 1 h in both *rms1* and *rms3* (Fig. 9). This could indicate that SLs cannot be transported from root-to-shoot via the xylem sap and that only SL-derived compound can move to the shoot.

To confirm the results obtained with the radiolabeled strigolactone and determinate the structure of the SL-derived compound we realized the same experiment with non-radiolabeled GR24. The simultaneous injection of non-radiolabeled soaking solution with the radiolabeled soaking solution showed the same profile (Supplemental Fig. S8) indicating an identical reaction. After the identification of the peak corresponding to the new product, we investigated the structure and the mass of this product. MS-MS analysis gave a mass of 275 and high resolution analysis gave a chemical formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (Data not shown). The determination of structure of this compound and a possible chemical mechanism has been unsuccessful.

DISCUSSION

The pea *RMS3* branching gene was previously described to act mostly in the shoot with *RMS4* and to be involved in the response to the branching inhibitor. This branching inhibitor was shown to move from root to shoot very likely in the xylem sap. Here we have confirmed that the *rms3* mutant was unable to respond to SL by direct application on the bud or via the roots using hydroponic. Nevertheless grafting experiments gave surprising results: in several experiments, branching was more or less inhibited in *rms3* scion grafted not only on WT or *rms4* rootstocks but also on the SL-deficient *rms1* rootstock. This result suggests that a signal, which is not a SL or a SL-derived signal, is able to move from the shoot and to inhibit branching of *rms3* scion but not *rms4* scion. Because mRNA or proteins have been shown to behave as long distance signals, one possibility is that the *RMS3* mRNA or the *RMS3* protein itself is the signal.

Here we demonstrated that *RMS3* is the ortholog of the rice *D14* and belongs to the α - β /hydrolase superfamily. This large family contains proteins with diverse enzymatic activities that, despite limited sequence homology, share structural homology. As for SABP2, *RMS3* proteins have conserved the catalytic triad, composed of a serine, a carboxylic acid residue (Asp) and a histidine, that catalyze nucleophilic additions to carbonyl compounds,

suggesting that RMS3 may have kept an enzymatic function, in contrast to GID1, the GA receptor. Here we tested *in planta* a possible enzymatic activity to RMS3 using a labeled tritiated synthetic SL, 7-³H-GR24. A novel labeled compound was rapidly produced when root plants were present in the root-soaking medium that does not correspond to the well-known products of degradation (tricycle ABC and D). The same results were obtained with the SL-deficient *rms1* mutant and with *rms3* mutant indicating that RMS3 is not involved in the production of this compound. The same compound was found in the xylem sap whereas 7-³H-GR24 has never been detected in the xylem sap. GR24 is relatively stable and was identified in the solution in which roots were placed. This could indicate that SLs cannot be transported from root-to-shoot via the xylem sap and that only SL-derived compound can move to the shoot. While we have never identified SL in the xylem sap of pea (A. Maïa-Grondard, pers. Comm.), the group of Bouwmeester identified only one SL, orobanchol, in the xylem sap of tomato and Arabidopsis (Kohlen et al., 2010). Because GR24 applied via the roots by hydroponics is able to inhibit shoot branching (Boyer et al., 2012), our results could suggest that strigolactones are cleaved in an active-derived compound to inhibit branching in the bud. It is also possible that GR24 is rapidly metabolized by the plant and/or that decapitation (to collect the sap) contributes to a possible rapid degradation. The experiment should also be repeated with sterile plants. High resolution analysis gave the exact mass of the compound and its possible chemical formula, C₁₆H₁₈O₄ but we still don't know its structure.

Structure-Activity-Relationship (SAR) studies for SL in the control of shoot branching indicate that the D part of the SL molecules is essential for their bioactivity (Boyer et al., 2012). The synthesis of a SL with labeling of the D ring (3'-³H-GR24) would be essential for further metabolism studies to identify putative SL-derived active compounds and deactivation products.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials, Growing Conditions, and Phenotype Measurement

Pisum sativum (pea) plants were grown in a glasshouse as described in (Braun et al., 2012). To harvest axillary buds at node 4 or epicotyls, plants were sown individually in 4-dL pots. For longer culture, one or two plants were cultivated per 2-L pot. The WT cultivars T  r  se, Raman and Torsdag are the 3 WT plants from which mutant plants were derived. The *rms1-10* (M3T-884), *rms4-3* (M3T-946), *rms3-4* (T2-30) and *rms3-5* (M2T-32) mutants were

obtained in cv T  r  se (Rameau et al., 1997). The *Psbrc1* mutant obtained in the Caméor background was backcrossed into the cultivar T  r  se (Braun et al.) and BC4 was used in this study. The *rms1-2* (*rms1-2T*), *rms2-1* (K524), *rms3-1* (K487), *rms3-2* (K564), *rms4-1* (K164) mutant lines were obtained in cultivar Torsdag, and *rms3-3* (WL6042) from the cultivar Raman.

The CAPS marker for genotyping *rms1-10* was based on amplification of the PCR fragment using primers RMS1-118F (5'-TTGGTTGGACTTCACTTTGAGG-3') and RMS1-984R (5'-CACAACAATCAGCAATGACAGC-3') and digestion with the *Cfr13I* enzyme (Fermentas).

Nodes were numbered acropetally from the first scale leaf as node 1. The stage indicated corresponds to the number of nodes with fully expanded leaves. Bud and branch lengths were measured with digital calipers.

Isolation of *RMS3*, Phylogenetic Analysis, and Mapping

Two degenerate primers, PsD14U_138 (5'-GCACCGACCA(G/A)TCNGCN-3') and PsD14L_701 (5'-CCGTTTGCATGATACA(T/C)CANGGNAC-3') were designed from a protein alignment between several D14 homologs from Arabidopsis, Medicago and Glycine max. These primers were tested on pea (*Pisum sativum* 'T  r  se') genomic DNA, and a fragment of 665 bp was amplified. The 5' region was obtained by PCR walking with three specific primers, 497Dn, 198R (5'-GCTAGATCTTTTCCTTTGGATC-3'), and 143R (5'-GCTTCTGCAGGAACAAGAC-3'), and the restriction enzyme *DraI* (Fermentas). The 3' sequence of *RMS3* was obtained by 3'RACE PCR on pea cDNA with gene-specific nested primers 198F (5'-GATCCAAAGGAAAAGATCTAGC-3') and 527Un (5'-CGAAAGACGGAATCAAACA-3') and the adaptor primer E1 (5'-CCCAAGGTCC-3'). The amplicon obtained was sequenced using 642Un (5'-AAATCAAGAACAAGAAAAAGTGG-3') and allowed to identify a 1100-bp sequence. The full 1576-bp sequence contains a 22-bp 5' untranslated region and 187 bp of the 3' untranslated region.

Subsequent mapping was realized in the recombinant inbred line population (T  r  se x Torsdag) (Laucou et al., 1998) using a cleaved-amplified polymorphic sequence (CAPS) marker. The amplification was realized with primers RMS3_115U (5'-TCACTCGCTGTGCTTACGTC-3') and RMS3_620L (5'-AAAACCGTCCTTGAAACGAA-3'), and the product was digested using *SfeI* (Fermentas), cutting the sequence corresponding to the peptidic CTRYAG sequence only in the Torsdag genotype.

Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Hormonal Treatment

The synthetic SL GR24 (kindly provided by F.D. Boyer, Institut de Chimie des Substances Naturelles) was applied on buds as 10 µL of a solution containing 50% ethanol, 1% polyethylene glycol 1450 (Sigma), 0.1% dimethyl sulfoxide (Sigma), and 0.1% acetone containing or not (mock treatment) GR24.

Gene expression analyses

cDNA were synthesized and real-time PCR gene expression analyses were performed as described in Braun et al. (2012). Primer sequences were as follows: for *RMS3*, *RMS3* forward (5'-TACCATGGTGGATTGAGCA-3') and *RMS3* reverse (5'-TCTAACGGCTGTCGGAACAT-3'); for *PsBRC1*, *BRC1* forward (5'-AGGCAAGAGAAAGAGCAAGG-3') and *BRC1* reverse (5'-TTGCATTGCTTTGAGTTTGA-3'); for *RMS1*, *RMS1* forward (5'-TTGCTCAGGGCTGAACCAAC-3') and *RMS1* reverse (5'-CACTTCCACACTTGCCACAATC-3') ; Transcript levels for the different genes were expressed relative to the expression of the *EF1α* gene (Johnson et al., 2006).

Grafting

Grafts were performed using the epicotyl-epicotyl wedge graft technique on 7-d-old seedlings as described by (Beveridge et al., 1996).

Chemical synthesis of 7-³H-GR24

In a first step, we developed a method to label the GR24 analogue of SLs at the ABC-moiety. (Thuring et al., 1996) described the synthesis of iodine derivatives of GR24. Our starting material for the labelling of GR24 will be the tricyclic lactone A available in bulk quantities by a method described by (Mangnus et al., 1992). The catalytic hydrogenolysis of iodoarenes is compatible with easily reducible functional groups (Faucher et al., 2002; Sammelson and Casida, 2003). We took advantage of this chemoselectivity to develop a general method for labelling GR24 with tritium on A-ring.

Metabolism experiments using 7-³H-GR24

Root plants were soaked in 25 mL of a solution containing 10 µM of H³-GR24 and 0.5% ethanol during 1h or 20 h at room temperature under the hood with continuous light. Xylem sap was harvested as described in (Braun et al., 2012). Control solution, soaking solution and xylem sap were analysed by HPLC coupled with radioactivity and UV detection. Control solution consisted of water containing 10 µM of H³-GR24 and 0,5% ethanol, incubated at room temperature as above.

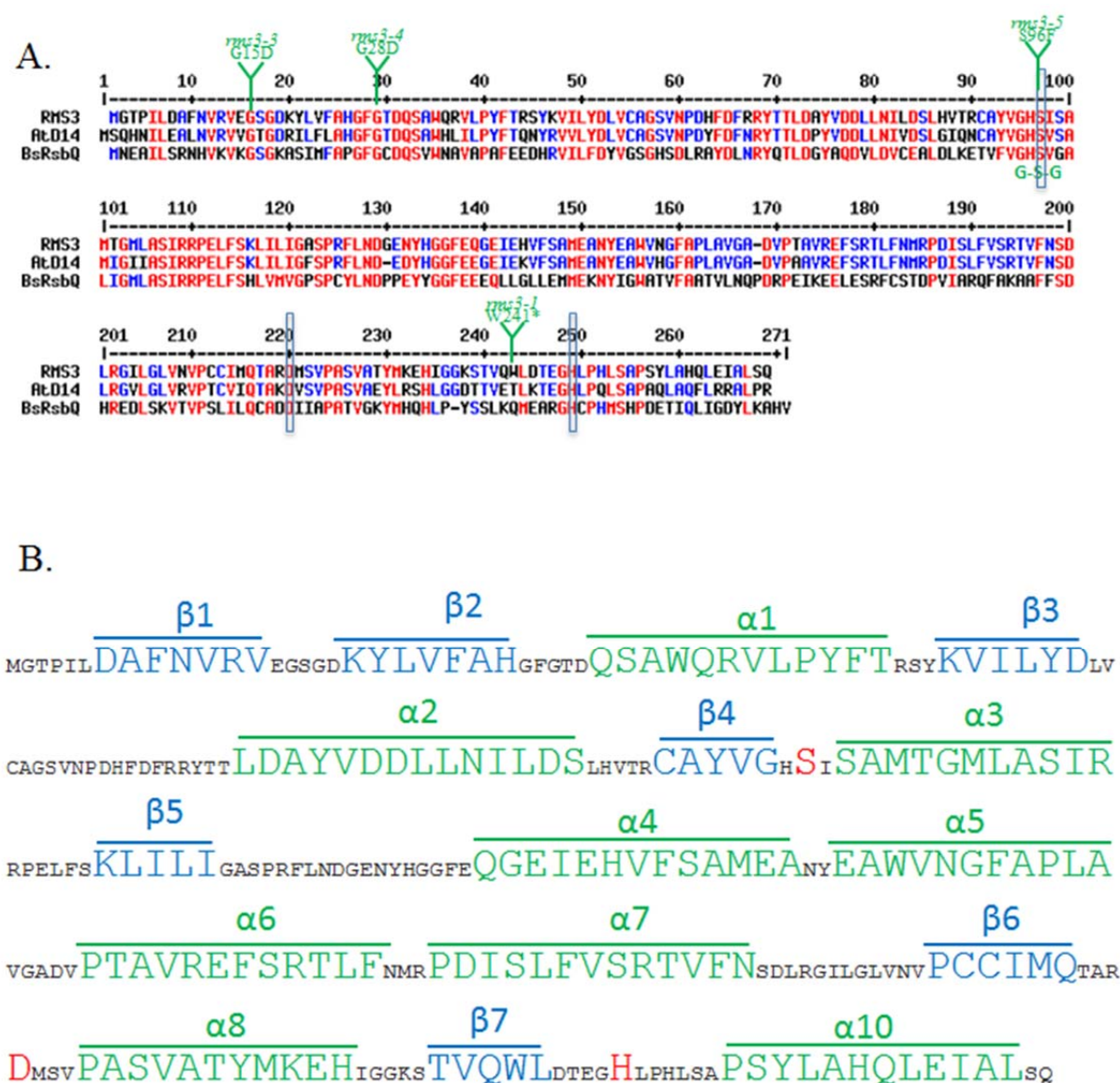


Figure S2

A. Alignment of the pea RMS3 and the Arabidopsis AtD14 proteins showing the catalytic triad (blue square) and the *rms3* mutations

B. RMS3 amino acid sequence showing the alpha helix (green), beta sheet (blue), and the catalytic triad (red).

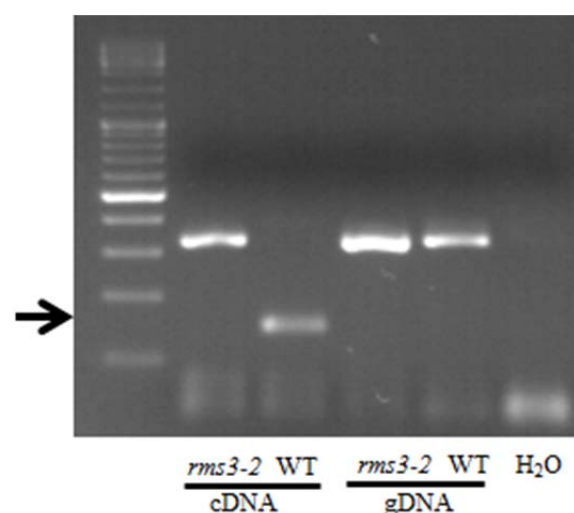


Figure S3. Analysis of the non-splicing of the intron in the *rms3-2* mutant. PCR was performed on leaf cDNA from Torsdag and *rms3-2* with water (H₂O) and genomic DNA (gDNA) as controls. The primers surrounded the intron. Arrow indicates the size expected for the cDNA if the intron is spliced. A 100-bp size marker lane is shown in the left of the gel.

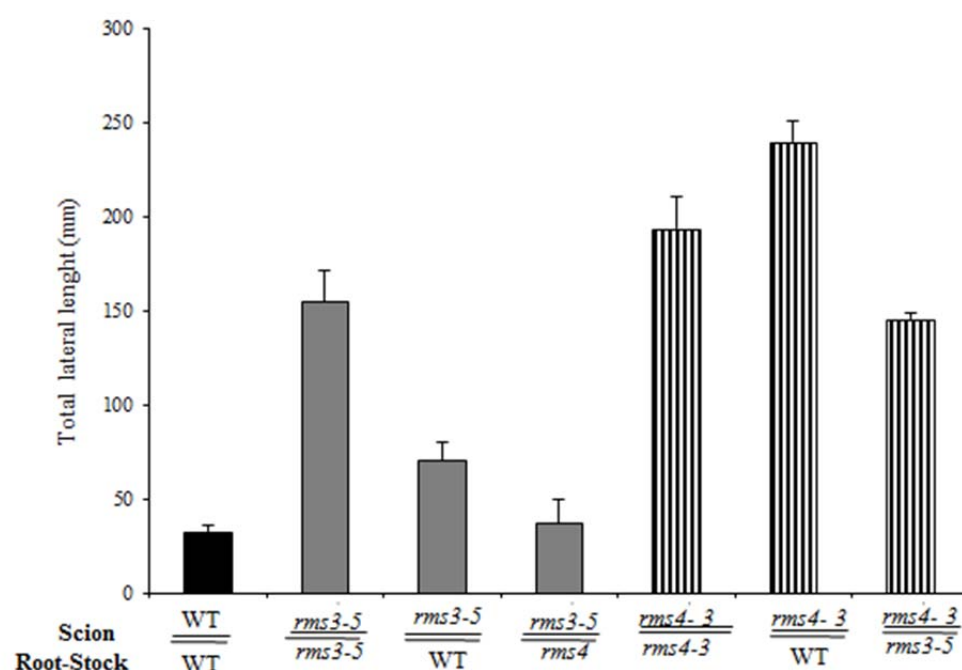


Figure S4. The *rms3-5* mutant can respond partially to grafting on WT (Térèse) and *rms4* rootstocks but not *rms4* grafting to WT and *rms3-5* rootstocks. Total lateral length from nodes 1 to 9 were measured 39 days after grafting. Data are means $\pm$ SE (n= 12).

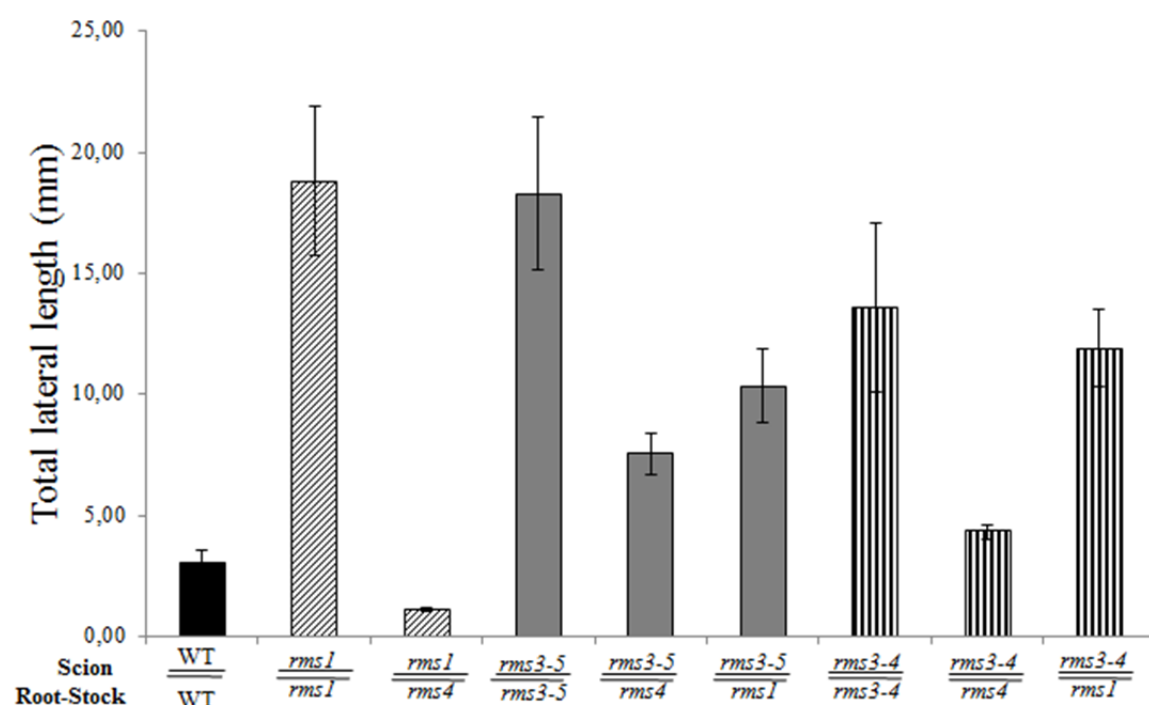


Figure S5. The *rms3-4* and *rms3-5* mutants can respond partially to grafting on *rms4* and *rms1* rootstocks but the inhibition is not as strong as *rms1* grafted on *rms4* rootstocks. Total lateral length from nodes 3 to 10 were measured 39 days after grafting. Data are means $\pm$ SE (n= 12).

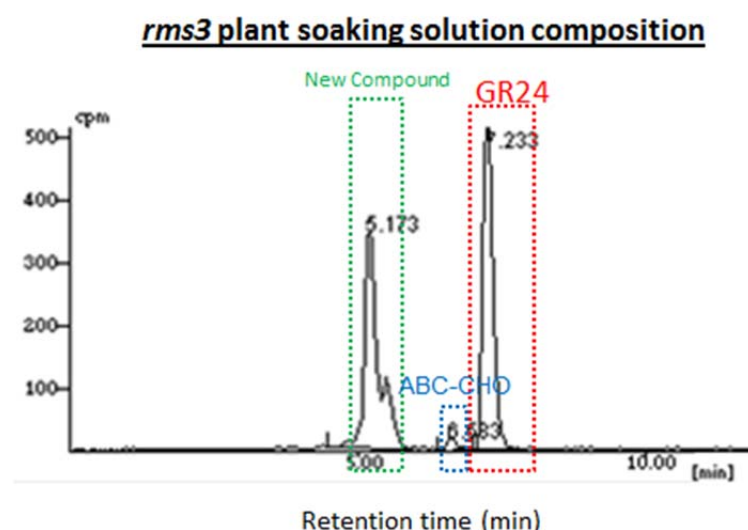


Figure S6. Identification of the unknown labeled compound derived from H^3 GR24 in the presence of *rms3* root plant. High-performance liquid chromatography (HPLC) traces of H^3 GR24 and derived compounds in the *rms3* root soaking solution, 20 h after addition of H^3 GR24 (10 μ M).

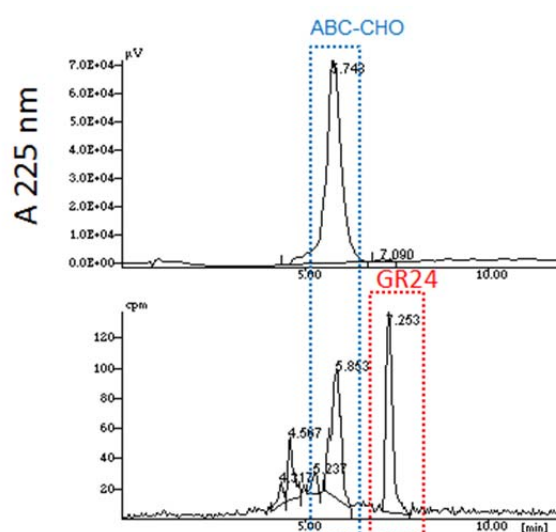


Figure S7 . HPLC analysis of the mix between soaking solution and synthetic ABC-OH compound.

High-performance liquid chromatography (HPLC) traces of mix H^3 GR24 derived compounds in *rms1* root soaking solution 20 h after addition of H^3 GR24 compound (10 μ M) and ABC-OH synthetic compounds. The synthetic compound is monitored by UV (below) and ABC-OH radiolabeled compound by radioactivity counter (above).

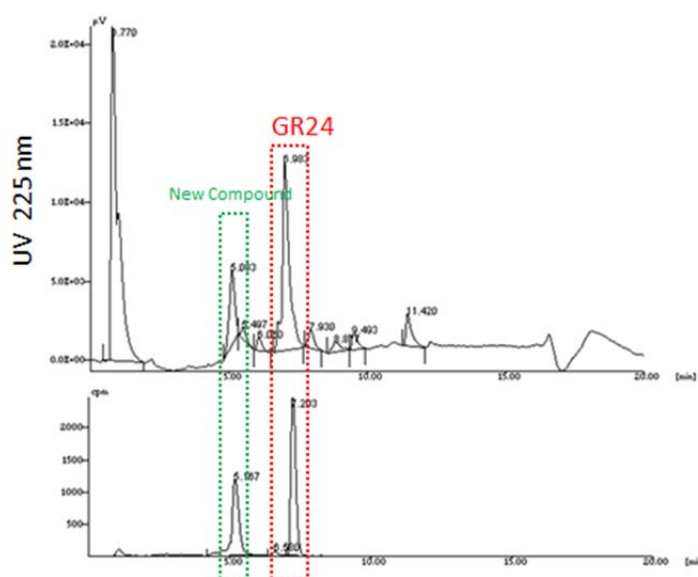


Figure S8. HPLC analysis of simultaneous injection of non-radiolabeled soaking solution with the radiolabeled soaking solution

High-performance liquid chromatography (HPLC) traces of mix H^3 GR24 or GR24 derived compounds in *rms1* root soaking solution 20 h after addition of H^3 GR24 or GR24 compound (10 μ M). The non-radiolabeled soaking solution is monitored by UV (below) and radiolabeled compound by radioactivity counter (above).

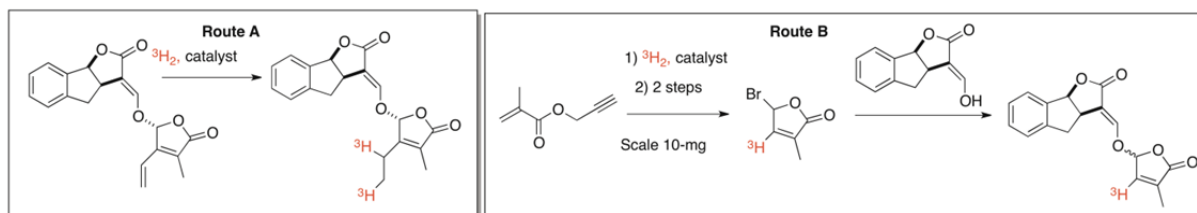


Figure II 1. Marquage de GR24 sur le cycle D (synthèse de 3'-3H-GR24)

III. PERSPECTIVES

Caractérisation de la structure des dérivés de SL identifiés dans nos expériences avec 7-³H-GR24 et dans l'article de Hamiaux et al.

Il semble que le produit de catalyse de GR24 par RMS3 mis en évidence par Hamiaux et al. et le dérivé marqué que nous avons identifié ne soient pas les mêmes composés.

Dans un premier temps, nous allons poursuivre nos expériences avec le GR24 marqué sur le cycle A (7-³H-GR24) : nous devons vérifier que la transformation du 7-³H-GR24 par la plante que nous avons observée n'est pas due à des microorganismes présents sur les racines. Des plantes de pois poussées en culture in vitro seront utilisées.

Nous voulons aussi tester si la même transformation a lieu avec des plantes d'Arabidopsis. Dans ce cas, nous pourrions utiliser différents mutants d'Arabidopsis (*max1*, *lbo1*, *Atd14-like*....) pour éventuellement identifier l'enzyme responsable.

Le 7-³H-GR24 marqué sur le cycle A ne permet pas de suivre la partie de la molécule essentielle à son activité c'est-à-dire le cycle D (Boyer et al., 2012). Dans le cadre d'un projet ANR Blanc (STRIGOPATH), la synthèse d'une SL marquée sur le cycle D (3'-³H-GR24) est en cours dans les laboratoires de FD Boyer et B. Rousseau (Figure II 1). Une telle molécule, beaucoup plus difficile à synthétiser que le 7-³H-GR24, permettrait de mieux comprendre la transformation observée du GR24 et d'identifier les produits. Une fois identifiés, ces produits pourraient être synthétisés et leur activité testée sur l'inhibition de la ramification.

Production de la protéine recombinante RMS3

S'il est très vraisemblable que DAD2/D14/RMS3 soit le récepteur des SLs, nous souhaitons reprendre nos études de liaison entre cette protéine et les SLs avec 2 objectifs :

- Tester la corrélation entre l'activité biologique dans l'inhibition de la ramification des différents analogues synthétisés par FD Boyer (Boyer et al., 2012) et leurs caractéristiques de liaison avec RMS3 en collaboration avec la plateforme ImaGif à Gif sur Yvette pour utiliser le Criblage de Thermostabilité des Protéines par Fluorescence (CTPF) ou « Fluorescence-based Thermal Shift Assay », qui propose un nouvel outil pour la caractérisation des interactions protéines/ligands.
- Utiliser les SL marquées au tritium pour mieux suivre les produits de catalyse par RMS3 afin de les identifier.

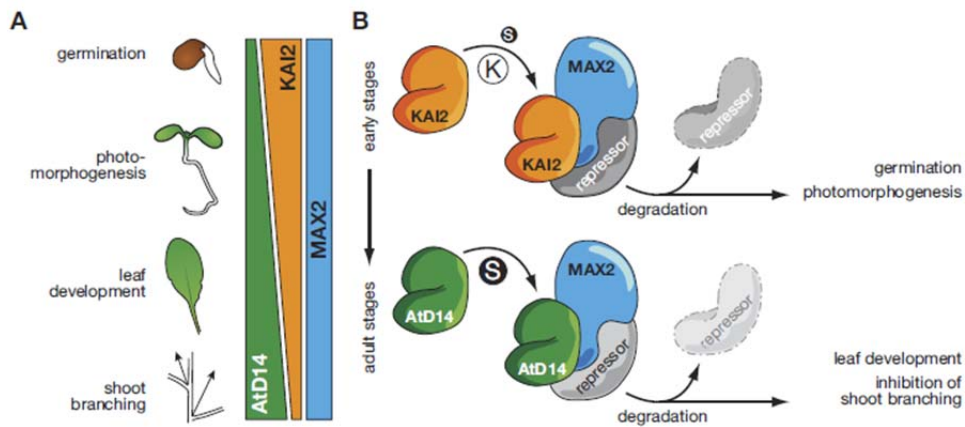


Figure II. 2. Modèle de signalisation des karrikines et des strigolactones durant le développement de la plante.

- (A)** le niveau d'expression d'*AtD14* et de *KAI2* varie au cours du développement de la plante et chaque protéine influence le développement de la plante. Durant la germination et le développement de la plantule, *KAI2* et les karrikines ont un rôle prépondérant, puis plus tard au cours du développement végétatif ce sont *AtD14* et les strigolactones qui prennent le dessus. *MAX2* est le partenaire de signalisation qui intervient en permanence.
- (B)** *MAX2*, intervient dans la dégradation de potentiels répresseurs en réponse aux karrikines ou aux strigolactones. *KAI2* et *AtD14* sont des potentiels modulateurs de l'activité de *MAX2* : dans ce modèle ces protéines sont considérées comme les récepteurs des karrikines et des strigolactones. Dans les premières phases du développement *KAI2* pourrait lier *MAX2* de façon dépendante des karrikines (K), provoquant la dégradation des protéines répresseurs liées à *MAX2*. Ce processus pourrait aussi impliquer quelque peu les Strigolactone (S). plus tard au cours du développement, *AtD14* accroît la sensibilité de *MAX2* au strigolactones, provoquant l'inhibition de la ramification. (Waters et al. 2012)

IV. *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2* : deux homologues de *RMS3* aux fonctions inconnues

L'étude de *D14* chez le riz a révélé également l'existence d'un homologue très proche de ce gène, *D14LIKE*, dont la fonction est inconnue (Arite et al., 2009). Les mutants d'*Arabidopsis* pour le gène *D14LIKE* ne présentent pas de phénotype dans les conditions normales de cultures mais la caractérisation d'un mutant, *kai2*, insensible aux karrikinés, substance issue des signaux de fumée et qui stimule la germination des graines a suggéré que cette protéine pourrait être impliquée dans la perception de ces dérivés de buténolides, voir même être le récepteur (Waters et al., 2012). Or on sait que l'autre protéine impliquée dans la perception des strigolactones MAX2/RMS4 est également impliquée dans la perception des karrikinés (Nelson et al., 2011). Cette protéine à boîte F serait donc le dénominateur commun des voies de signalisation des strigolactones et des karrikinés. Les alpha-beta hydrolases D14 et D14LIKE assureraient la spécificité de substrats, c'est-à-dire qu'il s'agirait respectivement des récepteurs des strigolactones et des karrikinés. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les karrikinés partagent des similarités de structure avec le cycle D des strigolactones. De plus, lorsque l'on observe les profils d'expression des gènes codant les alpha-beta hydrolases, on remarque que le gène *D14like* est principalement exprimé dans les premières étapes du développement de la plante : germination et émergence de la plantule, stades auxquels agissent les karrikinés et que le gène *D14* est lui exprimé dans les étapes plus tardives du développement au cours desquelles agissent les strigolactones (Waters et al., 2012)(Figure II. 2).

Un autre crible génétique sur lumière rouge a permis de révéler l'implication de D14LIKE dans la perception de ces longueurs d'onde. Lorsque les mutants *d14like* d'*Arabidopsis* (encore appelés *htl* pour *hyposensitive to light*) sont placés en lumière rouge claire ou rouge sombre, ces derniers présentent une elongation de leurs hypocotyles (Sun and Ni, 2011).

Afin d'approfondir ce modèle nous avons décidé de réaliser l'étude des 2 homologues *D14like* du pois. Pour cela nous avons obtenu des mutants pour ces gènes afin de détecter un éventuel phénotype et réalisé des applications hormonales.

A. Matériel et méthodes

Recherche des séquences *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2*, géotypage

Les primers dégénérés, D14like1_141U et D14like1_640L ont été définis à partir d'un alignement des séquences protéiques des homologues de *D14like* chez *Arabidopsis*,

Nom de la famille	<i>rms3like-1_561</i>	<i>rms3like-1_1482</i>	<i>rms3like-1_3246</i>	<i>rms3like-1_2323</i>	<i>rms3like-1_3801</i>	<i>rms3like-1_4261</i>
Amorces utilisés	RMS3-like-561__dCAPS_F et RMS3-like-561__dCAPS_R	RMS3-like-1482/3246__dCAPS_F et RMS3-like-1482/3246__dCAPS_R		RMS3-like-3801__dCAPS_F et RMS3-like-1482/3246__dCAPS_R	RMS3-like-3801__dCAPS_F2 et RMS3-like-3801__dCAPS_R2	RMS3-like-4261__dCAPS_F et RMS3-like-4261__dCAPS_R
Enzymes (nom fermentas/non usuel)	<i>HpyF3I/DdeI</i>	<i>FspBI/Bfal(MaeI)</i>		<i>MnII</i>	<i>FspBI/Bfal(MaeI)</i>	<i>TatI</i>
Tampon fermentas	TANGO	TANGO		GREEN	TANGO	TANGO
Durée de digestion	1H	1H		1H	1H	1H
Température	37°C	37°C		37°C	37°C	65°C
Motif de restriction	5'...C^TNAG...3' 3'...GANT^C...5'	5'...C^TAG...3' 3'...GAT^C...5'		5'...CCTC(N)^...3' 3'...GGAG(N)^...5'	5'...C^TAG...3' 3'...GAT^C...5'	5'...W^GACW...3' 3'...WCATG^W...5'
Tailles des fragments attendus	WT= 280 pb m= 245pb H= 280pb + 245pb	WT= 222 pb m= 250 pb H= 222pb + 250 pb		WT= 148 pb + 158pb m= 307 pb H= 148 pb + 158pb + 307pb	WT= 247 pb m= 269 pb H= 269 pb + 247 pb	WT= 230 pb m= 204 pb H= 230 pb + 204 pb

Tableau II 1. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING *RMS3LIKE1*

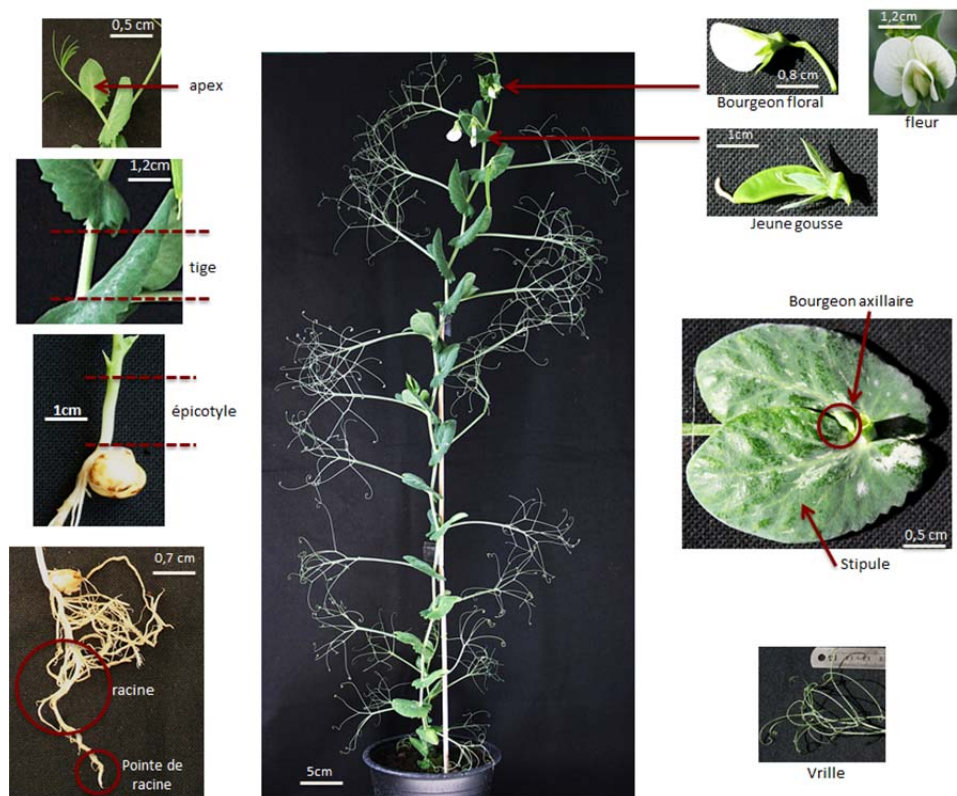


Figure II. 3. Photographie des différents organes de plantes de pois cultivar Tèrese âgées de 30 jours, prélevés pour l'étude de la localisation de l'expression des gènes

Medicago et *Glycine max*. Ces primers ont été testés sur de l'ADN génomique de pois (*Pisum sativum* Cultivar Térése).

Les amorces utilisées pour la 3' RACE PCR sont : D14_like_1F3'N1 ; D14_like1_F3'N2 et D14_like1_F3'N3 et les amorces pour la WALKING PCR sont : D14_like1_R5'1 ; D14_like1_R5'2 et D14_like1_R5'3 ainsi que les séquences adaptatrices 96_UAP 5' et 94_AUAP.

La cartographie du gène *RMS3like1* ainsi que la recherche du polymorphisme ont été réalisées avec les amorces RMS3L1_65_F et RMS3L1_1161_R. L'étude de l'épissage alternatif du gène *RMS3like1* a été réalisée avec le couple d'amorce RMS3_L1_F-100 ; RMS3_L1_R1233 qui amplifie les deux variants d'épissage mais produisant des fragments de taille différente et le couple RMS3_L1_F-100 ; RMS3_L1_R898 spécifique du variant *RMS3like1.2* (non épissé). La recherche de la séquence complète de *RMS3like2* a été réalisée avec les amorces RMS3_L2_F-50 et RMS3_L2_R937.

TILLING :

Le TILLING a été réalisé comme décrit dans (Braun et al., 2012) avec les amorces suivantes : le couple D14_N1F / D14_N1R pour la PCR1 et le couple D14N2Ftag / D14N2Rtag pour la PCR2 emboîtée. La liste des marqueurs CAPS et dCAPS utilisés pour le génotypage des mutants de TILLING *rms3like1* est présentée dans le Tableau II. 1.

Cartographie et étude phylogénétique :

La cartographie du gène *RMS3like1* a été réalisée sur la population de lignées recombinantes RIL1 issue du croisement entre Térése et Torsdag (Laucou et al., 1998) avec les amorces RMS3L1_65_F et RMS3L1_1161_R. L'analyse phylogénétique a été réalisée grâce au logiciel MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Conditions de culture :

Les plantes issues du TILLING ont été cultivées dans les conditions décrites dans (Braun et al., 2012).

Analyse de l'expression des gènes :

Le prélèvement des tissus, l'extraction d'ARN et la quantification, la synthèse des ADNc et l'analyse de l'expression des gènes par Q-PCR ont été réalisés comme décrit dans la matériel et méthode du chapitre II avec les couples d'amorces suivants pour *RMS3like1* : RMS3like1F1 et RMS3like1R1, et pour *RMS3like2* : RMS3like2F1 et RMS3like2R1. Pour l'étude de la localisation de l'expression des gènes, l'extraction d'ARN a été réalisée sur différents organes disséqués de la plante de pois comme présenté dans la Figure IV.3.

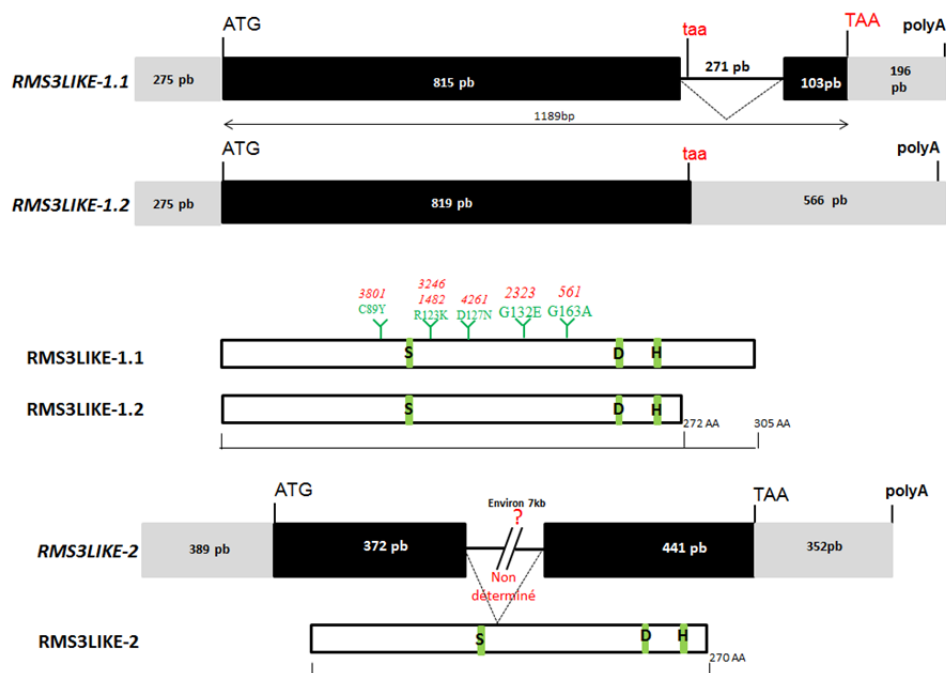


Figure II. 4. Diagramme des gènes *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2* et structure des protéines produites.

La figure montre également les deux variants d'épissage produits par le locus *RMS3like1*. La position des mutations identifiées par TILLING est indiquée sur la protéine *RMS3LIKE1*

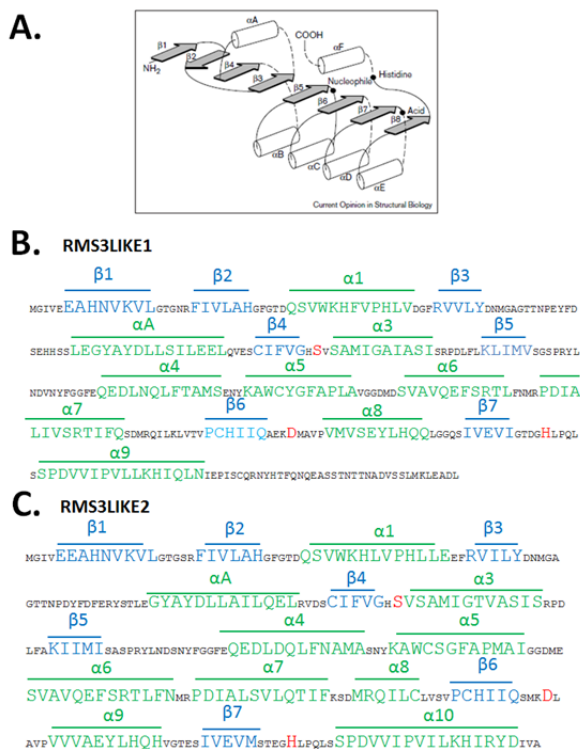


Figure II. 5. Structure secondaire des protéines *RMS3LIKE*

(A) Structure canonique des protéines alpha-béta hydrolase (Nardini et al.1996). (B) Séquence en acide aminé des protéines *RMS3like1* et (C) *RMS3like2* montrant les hélices alpha (vert), les feuillets beta (bleu) et la triade catalytique (rouge)

L'étude de la localisation de l'expression des gènes *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2* a été réalisée à partir de 2 lots indépendants (A et B) de différents organes de 6 plantes de pois du cultivar Tèrese âgées de 30 jours. Les organes étudiés sont : les stipules (du nœud 3), les racines, l'apex, la tige, l'épicotyle, les fleurs, le nœud 3, les vrilles, le bourgeon floral, les pointes de racines et le bourgeon axillaire au nœud 3.

B. Résultats

Obtention de la séquence des gènes de pois *RMS3LIKE*

L'existence d'un homologue de *D14* chez le riz, *D14like*, nous a amenés à rechercher cet homologue chez le pois. En utilisant des amorces dégénérées, D14like_141U et D14like_640L, définies à partir des séquences protéiques conservées chez plusieurs espèces modèles (*Arabidopsis*, *Medicago* et Riz) nous avons obtenu un fragment d'environ 600 pb de la séquence du gène *PsD14like* à partir de l'ADN génomique de pois du cultivar Tèrese. Le gène *PsD14like* a été renommé *RMS3like1* pour plus de commodité (Séquence des amorces en annexe 10)

La partie 3' de la séquence de *RMS3like1* manquante a été obtenue par 3'RACE suivi d'une PCR emboîtée. Une première PCR a été réalisée avec l'amorce D14_like_1F3'N1 et l'adaptateur UAP, suivi de 2 PCR emboîtées avec les amorces D14_like1_F3'N2 et D14_like1_F3'N3 couplées à l'adaptateur AUAP ce qui nous a permis d'obtenir un fragment de 250 pb. La partie 5' du gène a été obtenue par Walking PCR avec les 3 amorces spécifiques suivantes D14_like1_R5'1 ; D14_like1_R5'2 et D14_like1_R5'3 et l'ADN génomique de Tèrese digéré par l'enzyme de restriction *DraI*.

La présence d'un d'intron de 271 pb a pu être mise en évidence par comparaison des séquences obtenues par PCR sur de l'ADN génomique et de l'ADNc grâce au couple d'amorces spécifiques RMS3L1_65_F/ RMS3L1_1161_R. (Séquence annexe 6). La traduction *in silico* de la séquence de l'ADNc prédit une protéine de 305 acides aminés, d'un poids moléculaire d'environ 30 kDA qui présente une triade catalytique, S95, D217 et H246, caractéristique de la famille enzymatique des alpha/beta hydrolases (Figure II. 4) (Séquence annexe 8). Cette protéine, comme RMS3, appartient à la superfamille des estérases/lipases. La prédiction topologique de la protéine, par <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>, basée sur la cristallisation de la protéine *RbsQ* de *Bacillus subtilis* ((Brody et al., 2001; Kaneko et al., 2005) qui présente près de 40% d'identité avec *RMS3LIKE1*, montre la présence de 9 hélices alpha et 7 feuilletts beta (Figure II. 5). L'analyse de la séquence protéique n'a pas révélé

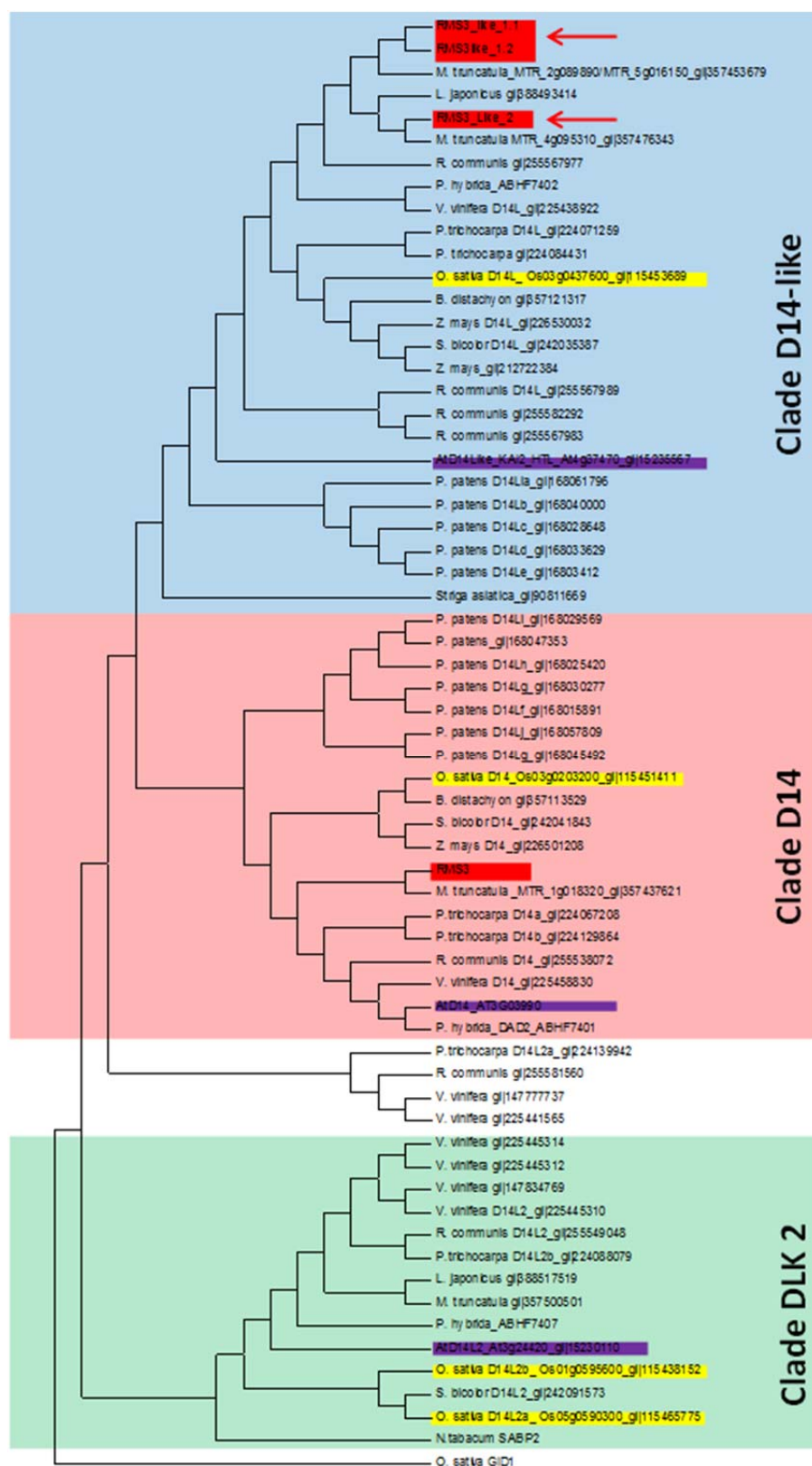


Figure II. 6. Arbre phylogénétique des protéines *RMS3LIKE*.
Arbre construit à partir des homologues de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* (Violet), Riz (Jaune),
Maïs, Vigne, Pétunia, Peuplier et Ricin obtenu par la méthode Neighbour joining

l'existence de domaine transmembranaire, de signal de localisation nucléaire ou d'autres signaux peptidiques. A noter que la séquence protéique de *RMS3like1* est plus longue de 30 acides aminés que celle des homologues d'*Arabidopsis* ou de *Medicago*. Mais ceci est dû à l'existence de deux transcrits différents (voir paragraphe sur l'identification de l'épissage alternatif du gène *RMS3LIKE1*).

Une recherche d'homologues chez *Medicago* et une analyse phylogénétique rapide nous a révélé l'existence de 2 homologues D14like chez *Medicago truncatula*, ce qui nous a amenés à penser que le pois, vue sa proximité phylogénétique avec *Medicago*, pouvait lui aussi posséder 2 homologues du gène *D14like*. En interrogeant la base de données de séquence d'ARN de pois de Dijon, nous avons découvert un deuxième homologue que l'on a dénommé *RMS3LIKE2*. La recherche de la présence d'intron a montré l'existence d'un intron putatif de grande taille (Figure II. 4) (Séquence annexe 7).. En effet l'amplification à partir des amorces RMS3_L2_F-50 et RMS3_L2_R937 donne un fragment de 155 pb sur de l'ADNc mais aucune bande sur de l'ADN génomique (données non montrées). De plus l'homologue de *Medicago* présente un intron de 7 kb. Le transcrit identifié dans la base de séquences de Dijon produit une protéine de 270 acides aminés qui présente également la triade catalytique, S95, D217 et H246 (Séquence annexe 8).et une topologie similaire à RMS3LIKE2 avec 10 hélices alpha et 7 feuillets beta (Figure II. 5).

Phylogénie des gènes RMS3LIKE

Les protéines RMS3LIKE1 et RMS3LIKE2, tout comme RMS3, présentent près de 40 % d'identité avec *RsbQ*, et possèdent toutes la triade catalytique composée, chez RMS3 de Ser96, Asp219 et His247. Les études phylogénétiques réalisées par (Waters et al., 2012) et par (Delaux et al., 2012), montrent que *D14* et *D14like* (*KAI2*) appartiennent à deux clades phylogénétiques différents : le clade *DWARF14* contenant la protéine D14 et le clade D14like contenant OsD14like1(OsDLK1) et AtD14LIKE (*KAI2*). De plus dans le clade *DWARF14*, on note la présence d'un sous clade appelé DLK2 (pour D14like2), qui résulte de la duplication des gènes au sein du clade *DWARF14*. Nous avons donc réalisé un arbre phylogénétique avec les séquences protéiques de pois que nous avons obtenues et des séquences de *Medicago* issues du blast des séquences protéiques de *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2*, ainsi que les protéines de plantes terrestres utilisées dans l'analyse phylogénétique de Waters et al., 2012, afin de mieux comprendre l'évolution de ces protéines et de valider l'obtention des bons homologues. On remarque que l'arbre obtenu avec l'ajout des séquences de

légumineuses est différent de celui obtenu dans les 2 études précédentes. Ainsi on retrouve bien le clade D14like, le clade DWARF14 et le clade DLK2 mais les clades D14like et DWARF14 sont inclus dans un même « grand clade » et DLK2 est plus éloigné ce qui diffère des études précédentes (Figure II. 6).

On peut noter chez la mousse *Physcomitrella patens* la présence de 12 homologues de *D14like* et D14 aux fonctions non-identifiées. Au laboratoire nous avons montré la présence et l'effet des SLs chez cet organisme non vasculaire. Si *D14like* intervient dans la perception des karrikinés chez *Arabidopsis thaliana* (Waters et al., 2012), nous n'avons pas mis en évidence d'effet de ces molécules sur la croissance de *Physcomitrella* ou sur la germination des spores (S. Bonhomme, communication personnelle). La question de la perception des strigolactones chez la mousse est actuellement étudiée au laboratoire par Sandrine Bonhomme et Beate Hoffman et les premiers résultats sur l'homologue du gène *MAX2*, *PpMAX2*, suggèrent que la réponse et la voie de signalisation des SLs chez la mousse ne passe pas par *PpMAX2*. De nombreuses questions se posent donc sur la fonction de ces protéines chez la mousse mais aussi sur leur implication exacte dans la perception des karrikinés et des strigolactones chez les Embryophytes et leur fonction dans la photomorphogénèse.

On trouve 2 homologues de *D14LIKE* chez le pois : *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2*, mais aussi chez *Medicago*, ce qui conforte l'obtention des bons homologues. La duplication des gènes soulève le problème de la lecture des phénotypes des mutants du fait d'une possible redondance fonctionnelle, et nécessite donc très souvent l'obtention de doubles mutants. Mais la duplication, peut entraîner une subfonctionnalisation des gènes (Charon et al., 2012) (voir Résultats chapitre IV, paragraphe IV.A).

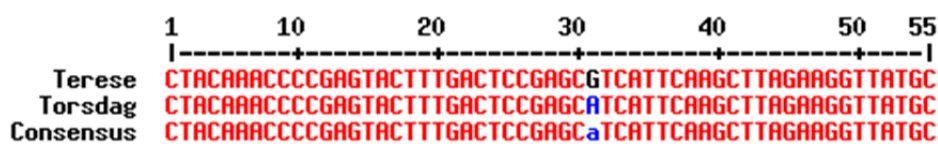


Figure II. 7. Séquence polymorphe du gène *RMS3LIKE1* entre Tèrese et Torsdag.

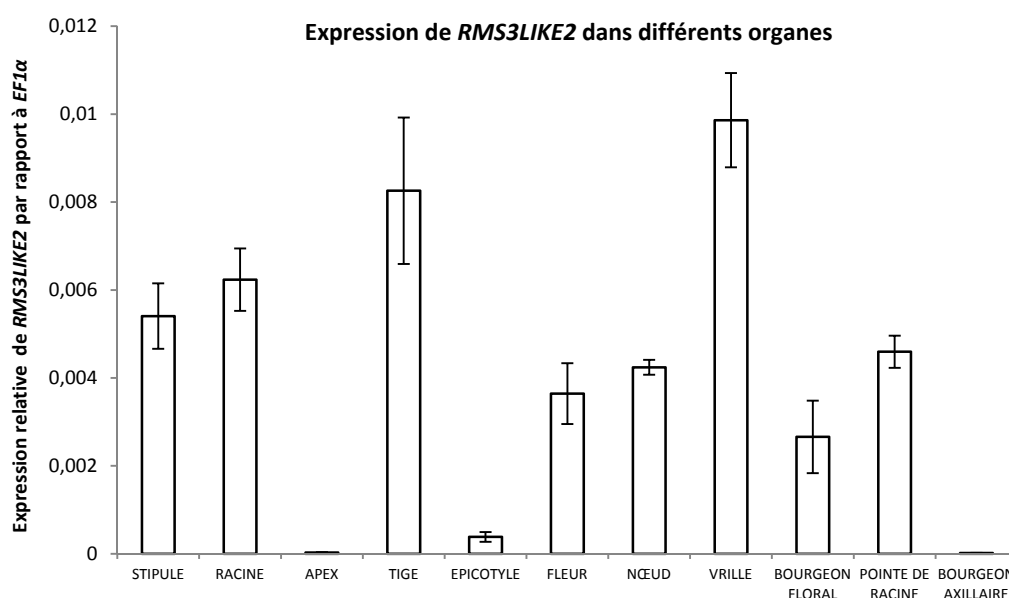
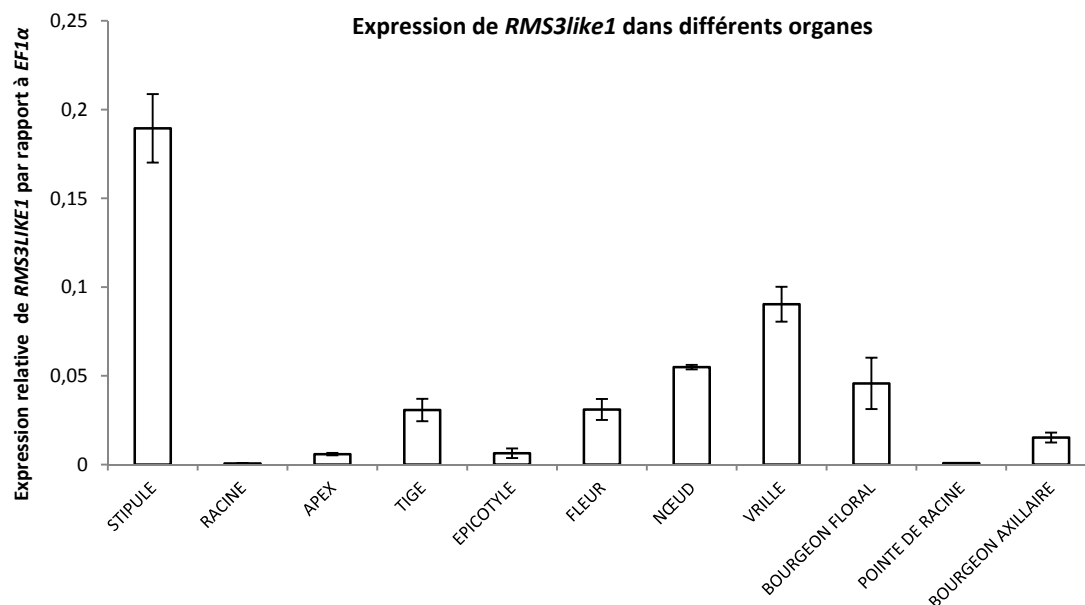


Figure II. 8. Quantification de l'accumulation des transcrits de *RMS3LIKE1* (haut) et *RMS3LIKE2* (bas) dans différents organes de plantes de pois âgées de 30 jours par QPCR. Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *EF1α*. Moyenne des résultats de deux pools de 8 plantes (Barre d'erreur=Erreur standard, n=2)

Cartographie des gènes *RMS3LIKE*

Afin de cartographier les gènes *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2*, nous avons recherché du polymorphisme de séquences entre les cultivars Tèrese, Champagne et Torsdag afin de définir un marqueur de cartographie de type CAPS ou dCAPS. Pour la recherche du polymorphisme de *RMS3LIKE1*, les amorces RMS3-like1_65F et RMS3-like1_1141R ont été utilisées. Un SNP, G197A, a été identifié entre les cultivars Tèrese et Torsdag au niveau du début du gène (Figure II. 7). Un marqueur CAPS a été défini, utilisant les amorces RMS3-like1_65F et RMS3-like1_1141R qui amplifie un fragment de 1076 pb clivé par l'enzyme *LweI* (Fermentas)/ *SfaNI* (nom usuel) chez le cultivar Tèrese en deux fragments de 130 pb et 944 pb, et non chez le cultivar Torsdag.

La cartographie a donc été réalisée sur la population de cartographie RIL1 (Tèrese X Torsdag) disponible au laboratoire. Le gène *RMS3LIKE1* est situé à la base du groupe de liaison I, entre les marqueurs P2_1000 (19.3 cM) et V3_2000 (3.9 cM). Aucune mutation de ramification n'a été identifiée auparavant dans cette zone (Annexe 9).

La cartographie du gène *RMS3LIKE2* n'a pas pu être réalisée car aucun polymorphisme n'a été trouvé au niveau de l'exon 1 ou de l'exon 2 entre les cultivars Tèrese, Torsdag et Champagne. Il est fort probable que du polymorphisme existe au niveau de l'intron non encore séquencé du gène.

Etude de l'expression de *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2*

Afin de mieux comprendre le(s) rôle(s) des gènes *RMS3LIKE* nous avons quantifié l'accumulation de leurs transcrits dans différents organes de plantes de pois par Q-PCR (Figure II. 8). On observe que ces deux gènes ont des profils d'expressions différents. Globalement, le gène *RMS3LIKE2* est beaucoup moins exprimé que le gène *RMS3LIKE1*, environ d'un facteur 10. Le gène *RMS3LIKE1* est exprimé exclusivement dans le système aérien, en particulier dans les stipules, les vrilles, le nœud et le bourgeon floral. Le gène *RMS3LIKE2* contrairement à *RMS3LIKE1* s'exprime dans les parties racinaires (racine et pointe de racine) ainsi que dans les parties aériennes surtout dans les vrilles, la tige et les stipules mais très peu dans les bourgeons axillaires et l'apex.

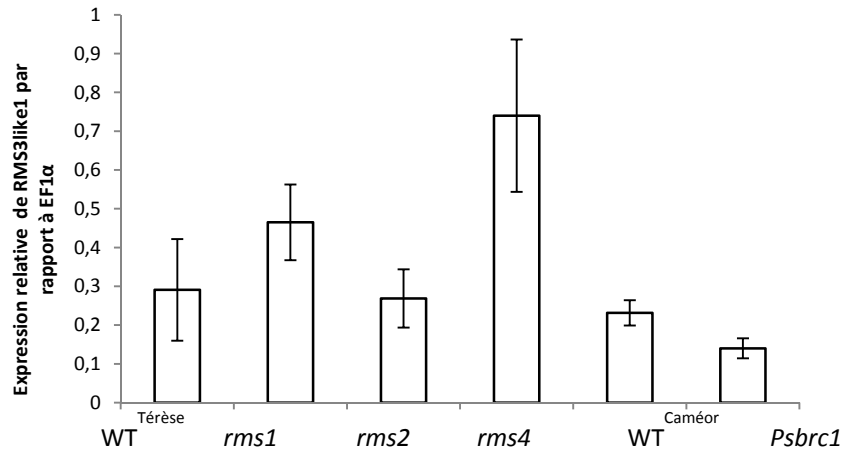


Figure II. 9. Quantification de l'accumulation des transcrits de *RMS3LIKE1* dans les stipules des mutants *rms* de pois par QPCR.

Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *EF1α*. Moyenne des résultats de deux pools de plantes (Barre d'erreur=Erreur standard n=2)

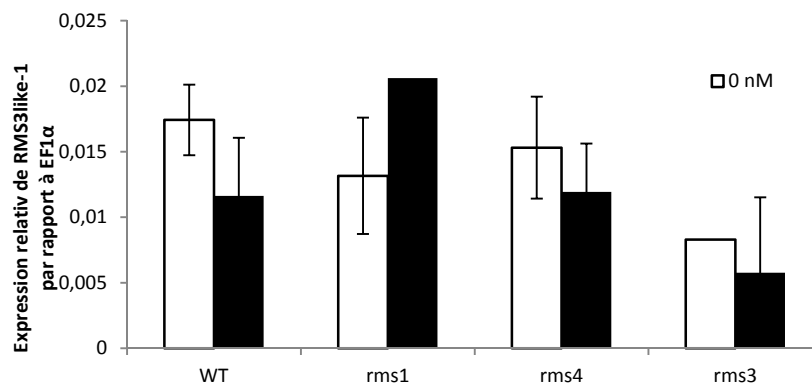


Figure II. 10. Quantification de l'accumulation des transcrits de *RMS3LIKE1* dans les épicotyles des mutants *rms* de pois avec et sans traitement au GR24 par QPCR.

Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *EF1α*. Moyenne des résultats de deux pools de plantes (Barre d'erreur=Erreur standard n=2)

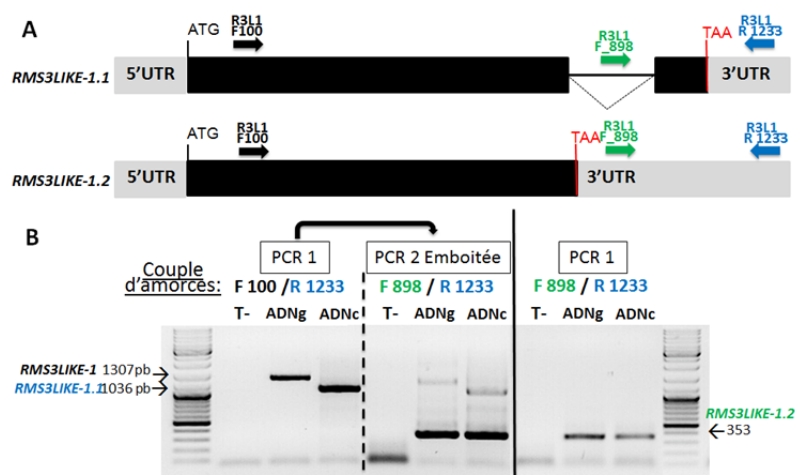


Figure II. 11. *RMS3LIKE1* montre un épissage alternatif

A : Schéma du gène *RMS3LIKE1* montrant la position des amorces utilisées pour les PCR F = forward; R = reverse.

B : Résultat des PCR. Les produits d'amplification de la PCR 1 avec les amorces R3L1F100/ R3L1R1233, qui peuvent amplifier les deux formes du gène, ont servi de matrice à la PCR 2 emboîtée, réalisée avec les amorces cR3L1F898/ R3L1R1233 qui n'amplifient que la forme non épissée. T- correspond au témoin négatif avec de l'eau. Les flèches visualisent le nombre de paires de bases des fragments amplifiés.

Afin de déterminer s'il existe une relation entre les gènes *RMS3LIKE* et les strigolactones nous avons quantifié l'accumulation des transcrits de *RMS3LIKE1* dans les stipules des mutants *rms* (Figure II. 8). Aucune différence significative n'est observable entre les différents génotypes. Il semblerait donc que l'expression de ce gène n'est pas régulée par les strigolactones. Pour confirmer cette hypothèse, une quantification des transcrits dans les épicotyles suite à une application de GR24 par les racines a été réalisée. Aucune variation significative suite au traitement hormonal n'est observée (Figure II. 10) confirmant que les strigolactones ne régulent pas l'expression du gène *RMS3LIKE1*.

Etude de l'épissage alternatif du gène *RMS3LIKE1*

Lors de la recherche du second homologue de *D14LIKE*, dans la base de données de séquençage en masse d'ARN de pois de DIJON, nous avons remarqué que la séquence du transcrit du gène *RMS3LIKE1* obtenu par notre laboratoire était différente de celle de la base de données. Nos expériences ont révélé la présence d'un intron de 271 pb, qui est épissé pour produire un transcrit de 819 pb codant pour une protéine de 305 acides aminés. Le transcrit identifié dans la base de données de Dijon présente une taille de 819 pb et code pour une protéine de 272 acides aminés car un codon stop est présent dans la séquence définie précédemment comme intronique, quelques nucléotides après la fin de l'exon 1 (Figure II. 4).

Dans l'optique de savoir s'il existe réellement un épissage alternatif du gène *RMS3LIKE1*, nous avons défini des amorces spécifiques permettant de distinguer les 2 formes. Le couple R3L1F100/R3L1R1233 permet d'amplifier en théorie par PCR les deux types de transcrits, alors que le couple R3L1F898/R3L1R1233 dont l'une des amorces est positionnée dans l'intron permet d'amplifier uniquement la forme *RMS3LIKE1.2*. On a donc réalisé une PCR avec les deux couples d'amorces sur de l'ADN génomique et de l'ADNc (Figure II. 11). Pour le couple R3L1F898/R3L1R1233 on observe un produit d'amplification de 353 pb que ce soit à partir de l'ADNc ou de l'ADN génomique, ceci prouve la présence du transcrit *RMS3L1.2*, c'est-à-dire la forme non épissée du gène. Lorsqu'on réalise l'amplification avec le couple R3L1F100/R3L1R1233, on obtient un amplicon de 1036 pb à partir de l'ADNc, comme prédit pour un transcrit ayant subi un épissage, on retrouve donc bien la forme *RMS3LIKE1.1*. Mais étant donné que ces amorces peuvent également amplifier la forme non épissée, pour l'amplification à partir de l'ADNc on devrait retrouver

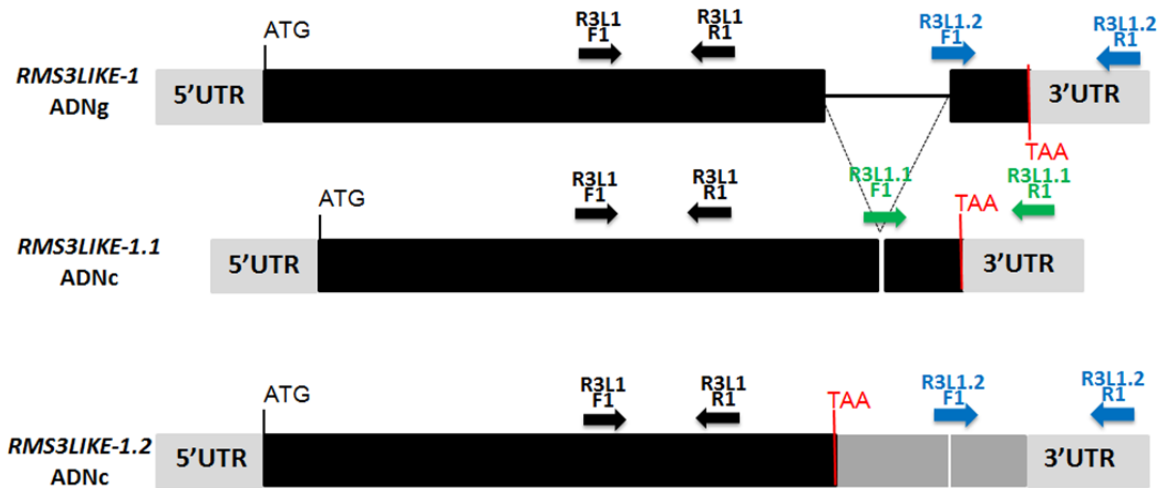


Figure II. 12. Schéma de la position des amorces permettant de différencier les formes *RMS3LIKE1.1* et *RMS3LIKE1.2*

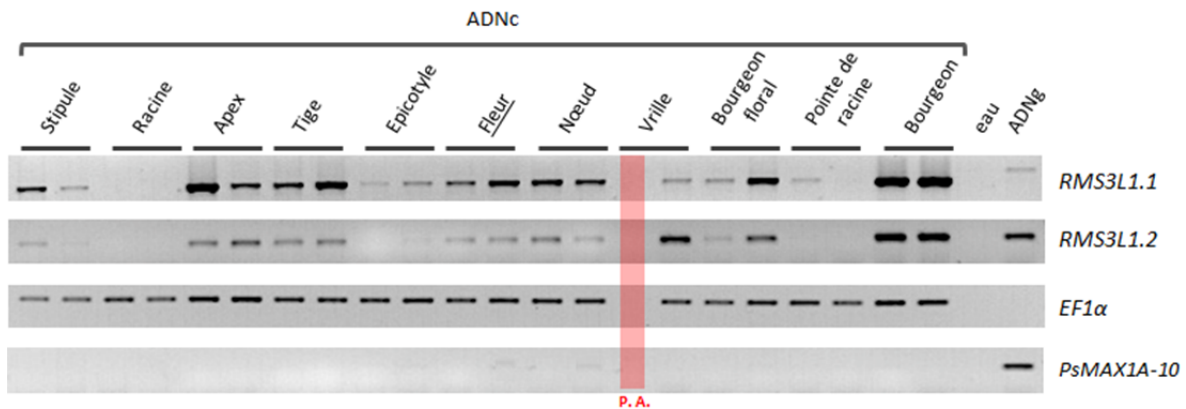


Figure II. 13. Etude de l'accumulation des transcrits de *RMS3LIKE1.1* et *RMS3LIKE1.2* par PCR semi-quantitative dans différents organes de plante de pois (cv. Tèrese).

La présence des deux bandes par organe correspond à 2 répétitions biologiques. Le gène *EF1α* est exprimé constitutivement et à un niveau constant dans tous les organes, (les amorces du gène *EF1α* ont été définies de manière à amplifier uniquement de l'ADNc). Des amorces amplifiant le gène *PsMAX1-A10* ont été définies dans un intron de ce gène de manière à amplifier uniquement de l'ADNg et ainsi vérifier une éventuelle contamination par de l'ADNg

une 2^{ème} bande d'une taille de 1386 pb correspondant au transcrit non épissé. Cette absence sur le gel est peut-être due à une compétition entre la synthèse des fragments : la synthèse de l'amplicon le plus court est probablement favorisée ce qui empêche de visualiser le fragment non épissé. Afin de valider la présence des deux formes, une nouvelle PCR en utilisant comme matrice le produit d'amplification obtenue avec les amorces F100/R1233 est réalisée avec les amorces F898/R1233 (PCR emboîtées). Le résultat montre bien la présence d'un fragment de 353 pb spécifique de la forme *RMS3like1.2*. Un contrôle avec les amorces du gène *PsMAX1-A10* définies dans un intron a permis de vérifier qu'il n'y avait pas de contamination par de l'ADNg.

Ayant confirmé que deux variants d'épissage existaient pour le gène *RMS3LIKE1* nous avons voulu savoir si les deux formes étaient exprimées de la même façon dans les différents organes de la plante ou si une forme était préférentiellement exprimée dans certains tissus. Pour cela nous avons défini un couple d'amorces qui n'amplifie que la forme *RMS3LIKE1.1*, R3L1.1_F1 et R3L1.1_R1 (l'une des amorces étant définie à cheval sur l'exon1 et sur l'exon 2) et un couple d'amorces qui n'amplifient que la forme *RMS3LIKE1.2*, R3L1.2_F1 et R3L1.2_R1 (l'une des amorces étant définie à cheval sur l'intron et sur l'exon 2) (Figure II. 12). Etant donné que le couple défini pour la forme *RMS3LIKE1.2* peut amplifier l'ADNg génomique nous avons réalisé une amplification avec des amorces définies dans l'intron du gène *PsMAX1-A10* permettant ainsi de montrer l'absence de contamination. Le gène *EF1α* sert de gène de référence et permet de normaliser les échantillons.

Globalement les deux formes du gène *RMS3LIKE1* ne sont exprimées que dans les parties aériennes, majoritairement dans les bourgeons, l'apex et la tige pour *RMS3LIKE1.1* et dans les vrilles, les bourgeons floraux et le bourgeon pour *RMS3LIKE1.2*. La forme *RMS3LIKE1.1* est dans l'ensemble plus exprimée que la forme *RMS3LIKE1.2*. Il existe néanmoins une différence de site d'expression entre les deux formes, avec *RMS3LIKE1.1* exprimé dans l'épicotyle et dans les stipules, alors que *RMS3LIKE1.2* ne l'est pratiquement pas. L'expression de *RMS3LIKE1.2* semble plus forte que celle de *RMS3LIKE1.1* dans les vrilles (Figure II. 13). Ces résultats ont été confirmés par Q-PCR (Données non montrées)

Obtention de mutants par TILLING et première caractérisation phénotypique

Afin de caractériser la fonction des gènes *RMS3LIKE1* et *RMS3LIKE2*, une recherche de mutants par TILLING a été réalisée sur la totalité des séquences des deux gènes. Plusieurs

Numéro de référence dans la base de données de TILLING de la famille de plante	Position de la mutation sur la séquence nucléique	Position de la mutation sur la séquence protéique	Type de mutation	Observation
561	G487A	G163R	Missens	Obtenu
1091		E137K	Missens	
1411		Y130Y	Silent	
1482	G368A	R123K	Missens	Obtenu
1447		A152T	Missens	Pas reçu
1520		G156E	Missens	
1697		G133E	Missens	Pas Reçu
1957		L187L	Silent	
2112		E226K	Missens	
2323	G395A	G132E	Missens	Obtenu
2584		E284K	Missens	
2774		E226K	Missens	
3246	G368A	R123K	Missens	Obtenu
3763		Y155Y	Silent	
3801	G266A	C89Y	Missens	Obtenu
3814		D138N	Missens	
4261	G379A	D127N	Missens	Obtenu
4598		L 111L	Silent	

Tableau II. 2. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène *RMS3LIKE1*
(Exemple : R157K signifie que l'arginine 157 (157ème acide aminé à partir de la méthionine de départ) a été muté en lysine)

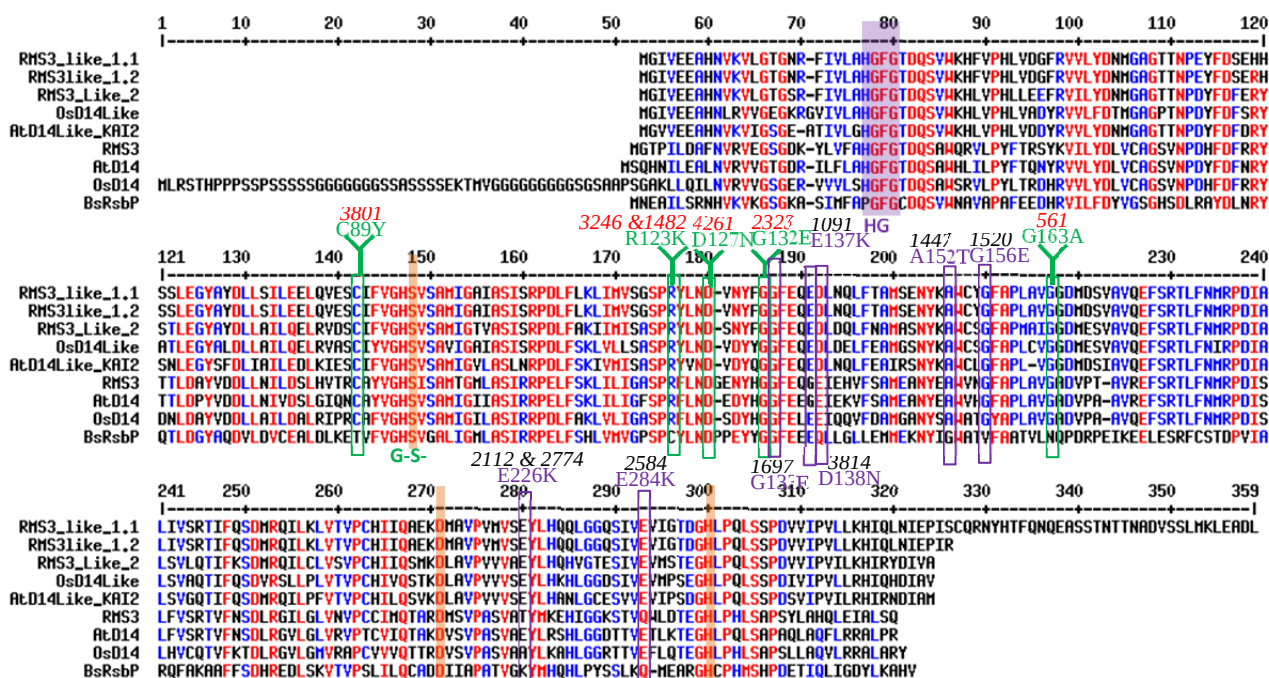


Figure II. 14. Alignement des protéines RMS3 et RMS3LIKE de pois, de riz et d'Arabidopsis.
La position des mutations identifiées par TILLING dont les mutants ont été étudiés, est indiquée par un encadré vert sur la protéine RMS3LIKE1 (avec le changement d'acide aminé qu'elle provoque). Les mutations identifiées dont les mutants n'ont pas fait l'objet d'étude sont encadrées en violet. La triade catalytique S, D et H est surlignée en (orange)

familles de mutants ont été obtenues pour le gène *RMS3LIKE1* (Tableau II. 2) et le TILLING est en cours pour le gène *RMS3LIKE2*. Le TILLING de *RMS3LIKE1* réalisé sur 1097 pb, a permis d'identifier 18 mutations dont 4 ne provoquent pas de changement d'acide aminé. Parmi les 14 mutations qui provoquent un changement d'acide aminé, aucune n'affecte la triade catalytique mais certaines affectent des acides aminés très conservés entre les protéines RMS3 et RMS3LIKE (Figure II. 14). Se basant sur ces critères de conservation d'acides aminés nous avons sélectionné les familles 561, 1482, 3246, 4261, 2323 et 3801 afin d'identifier les plantes mutantes et d'en étudier le phénotype.

Afin de réaliser le génotypage des plantes nous avons défini, à l'aide du logiciel SerialCloner, des marqueurs CAPS ou dCAPS spécifiques de chaque mutation qui permettent de différencier des plantes de type sauvage, mutante ou hétérozygote (Tableau II. 1). Le résultat du génotypage a été comparé aux phénotypes des plantes, ce qui nous a permis de remarquer que certains mutants *rms3like1* présentaient une réduction de la taille des entrenœuds par rapport au type sauvage Caméor, notamment dans les familles : 561, 1482, 3246, 2323 et 3801 (Figure II. 15). De manière à valider que les mutations *rms3like1* provoquent bien un phénotype de réduction de la taille des entrenœuds, et qu'il n'est pas dû à une autre mutation, nous avons réalisé un premier croisement des plantes mutantes avec le cultivar sauvage Caméor dont sont issus les mutants. Les plantes F2 issues du croisement Caméor x *rms3like1* (561, 1482, 3246 et 4241) ont été semées et génotypées pour le gène *RMS3LIKE1*. Une ségrégation ½ Hétérozygote (H), ¼ mutant homozygote *rms3like1* (*m*) et ¼ d'homozygotes sauvage (WT) a été observée pour la majorité des familles. Des mesures de l'entrenœud 3 à 6 et de la taille totale (de l'entrenœud 1 à l'apex) ont ensuite été réalisées pour chaque plante. La comparaison des moyennes de ces deux paramètres suivant le génotype montre qu'il n'y a pas de différence de taille entre les plantes sauvages, les hétérozygotes et les mutants *rms3like1*, sauf pour le mutant *rms3like1561* sur lequel on observe une légère diminution de la taille des plantes (Figure II. 16). La réduction de la taille des entrenœuds de plantes observées initialement ne semble donc pas être due aux mutations *rms3like1*, ce qui devra être confirmé par un nouveau rétrocroisement de l'allèle 561. Aucun phénotype au niveau de l'architecture caulinaire n'a été observé pour ces mutants. Des rétrocroisements par le type sauvage sont en cours. L'absence de phénotype peut être expliquée par la duplication du gène chez les légumineuses et une redondance fonctionnelle. Il est donc indispensable d'identifier des

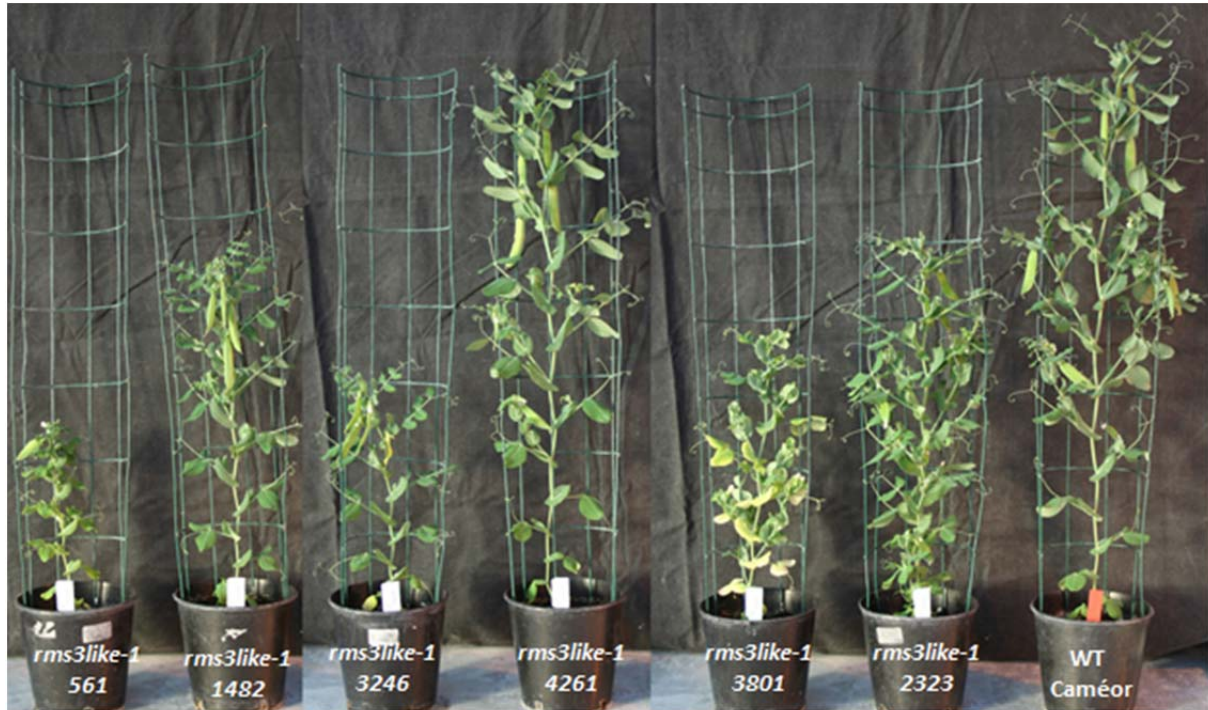


Figure II. 15. 6 familles de mutants *rms3like1* obtenus par TILLING

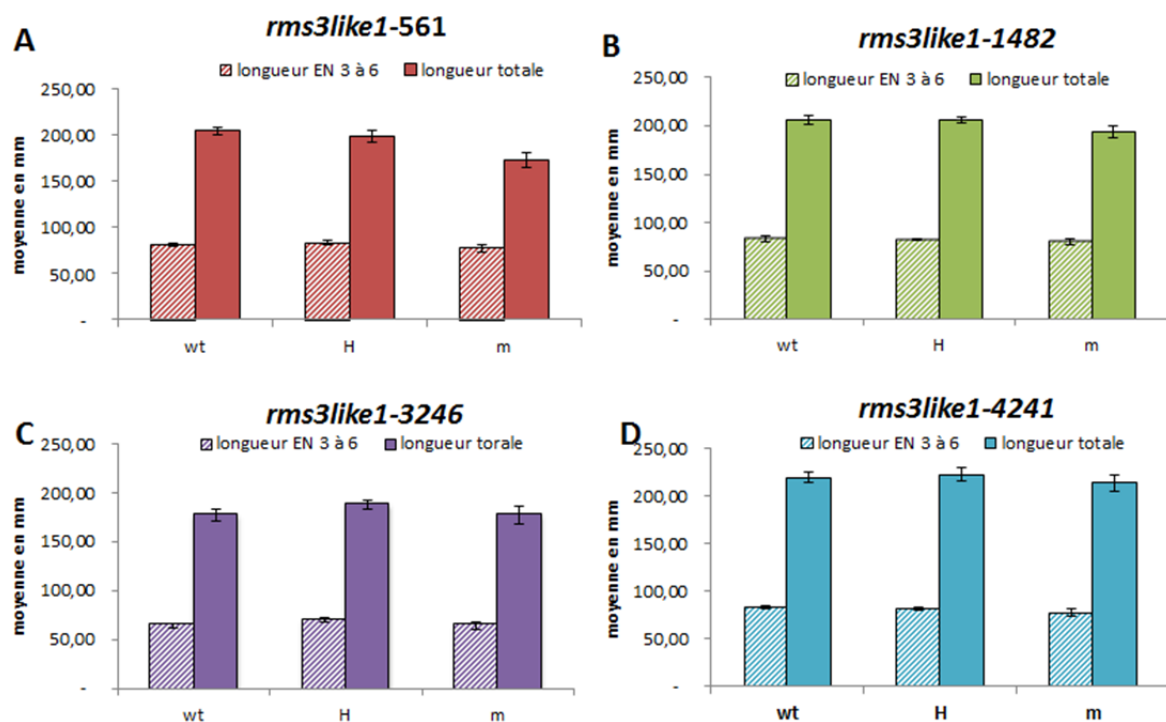


Figure II. 16. Comparaison de la taille des plantes F2 issues du rétrocroisement Caméor x *rms3like1*.

Graphique de la moyenne de longueur de l'EN 3 à 6 et de longueur totale (EN 1 à l'apex) des plantes dont l'allèle parent *rms3like1* est : *rms3like1* 561 = A ; 1482 = B ; 3246 = C et 4261 = D. Les lettres WT (= sauvage), H (= hétérozygote) et m (= *rms3like1*) correspondent au résultat du génotypage du gène *RMS3LIKE1*. (Barre d'erreur=Erreur standard, n=12)

mutants pour le gène *RMS3LIKE2* et ainsi obtenir des doubles mutants, projet en cours au laboratoire.

C. Discussion

La caractérisation de *D14LIKE* chez le pois s'est avérée plus compliquée que prévu. L'étude phylogénétique des homologues de ce gène a révélé une duplication du gène chez les légumineuses comme pour le gène *MAX1* (voir chapitre IV) ce qui peut expliquer l'absence de phénotype des mutants identifiés par TILLING pour le gène *RMS3LIKE1*. Nous procédons donc à l'identification d'un mutant pour le gène *RMS3LIKE2* afin d'obtenir des doubles mutants pour ces 2 gènes, tout en réalisant des rétrocroisements sur l'ensemble des mutants afin d'écarter l'impact de toute autre mutation. Il est fort possible que l'identification du phénotype s'avère compliqué et nécessite des conditions de culture ou des traitements hormonaux particuliers étant donné que ces gènes semblent impliqués dans divers processus développementaux comme la perception des karrikinés (Waters et al., 2012) et de la lumière rouge (Sun and Ni, 2011). L'obtention des doubles mutants ne révélera donc peut-être pas de phénotype et il nous faudra alors tester différents traitements et notamment placer nos plantes en lumière rouge et/ou appliquer des karrikinés sur les graines de pois. L'absence de dormance chez le pois, y compris chez le mutant *rms4*, risque de rendre le test de réponse aux karrikinés difficile.

La phylogénie de ces protéines n'est pas claire puisque notre arbre diffère grandement de celui obtenu lors des études de Delaux et al. 2012 et de Waters et al. 2012b mais se rapproche de l'arbre obtenu par Arite et al., 2009. Même si l'histoire évolutive que suggère notre arbre semble plus simple, nous n'avons pas incorporé les séquences de plantes aquatiques ou d'hépatiques comme *Marchantia*. De plus la présence de nombreux homologues de *D14like* chez la mousse soulève beaucoup d'interrogations sur la perception des strigolactones et des karrikinés chez cette plante, surtout que la protéine PpRMS4 de mousse ne semble pas être impliquée dans la perception des strigolactones (S. Bonhomme, communication personnelle).

La présence de deux formes de transcrits à partir du locus *RMS3LIKE1* n'est pas expliquée. Aucune différence dans les patrons d'expression entre les deux types de transcrits n'a été observée. Pour certains gènes, il a été décrit des localisations tissulaires

différentes des deux types de transcrits générés, comme par exemple pour le gène codant l'enzyme de biosynthèse de l'auxine *YUCCA4* (Kriechbaumer et al., 2012). La seule différence à signaler est que la forme non épissée est beaucoup moins abondante que la forme épissée. La différence de localisation se fait peut être au niveau protéique, ainsi les deux protéines produites auraient des localisations cellulaires différentes. Mais aucun signal d'adressage à un organe ou domaine transmembranaire n'est prédit dans les 30 acides aminés de la partie C-terminale qui diffère entre les deux protéines.

Les données d'expression de deux homologues de *D14like* ne permettent pas non plus de fournir des renseignements sur la fonction de ces protéines. Les deux gènes de pois montrent des profils différents, *RMS3LIKE1* étant exclusivement présent dans les parties aériennes, avec une très forte abondance dans les stipules alors que *RMS3LIKE2* est présent dans tous les tissus et notamment les racines. Ces observations seront à relier lorsqu'un phénotype mutant sera observé. Il serait également intéressant d'étudier l'évolution de l'expression de ces gènes au cours de la germination des graines afin de valider l'hypothèse de Waters et al. 2012b, selon laquelle, *D14like* agirait essentiellement au moment de la germination et que ce gène est beaucoup moins exprimé par la suite. Or on a détecté la présence des protéines *D14like* dans la sève élaborée de riz (Aki et al., 2008), ce qui suggère une action systémique de cette protéine, et pourrait assurer un rôle de communication au sein de la plante.

L'expression de *AtD14like/HTL* est régulée par la lumière rouge, et notamment par le facteur de transcription HY5 qui active l'expression de ce gène en se liant au motif G-box présent dans le promoteur du gène (Sun and Ni, 2011). Or on connaît l'importance de la lumière rouge dans la germination des graines, il est donc fort probable que la protéine *D14like* joue un rôle primordiale dans la germination de la graine et notamment dans la stimulation de cette germination en réponse à la lumière. L'augmentation de la quantité de protéines rendrait la graine plus sensible aux strigolactones et/ou aux karrikinés, ce qui stimulerait la germination. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la lumière rouge sur la germination des graines des mutants *rms3like1* et *rms3like2* sachant que la G-box, site de fixation de HY5, n'est présent que dans le promoteur de *RMS3LIKE1* (annexe).

Cependant, la meilleure approche afin de valider si oui ou non ces protéines sont les récepteurs des karrikinés et/ou des strigolactones, serait de réaliser des tests de liaison à partir des protéines recombinantes produites en système hétérologue.

Chapitre III : Les strigolactones interviennent dans la régulation de la taille des plantes

Préambule sur l'article en préparation :

"Strigolactones stimulate internode length independently of gibberellins"

Cet article que nous aimerions soumettre à la revue Plant Physiology est toujours en préparation car nous sommes en train de répéter certaines expériences (dans le cadre du début de la thèse de Y. Ligerot).

- Une autre observation de la taille des cellules sera réalisée afin notamment d'avoir une estimation plus précise du nombre de cellules le long de l'entre-noeud 6 avec une erreur standard.
- L'analyse des niveaux de transcrits des gènes de biosynthèse et de désactivation des GA sera répétée dans une expérience indépendante.
- L'analyse chez Arabidopsis de l'effet des GA et des SL sur l'expression de la protéine RGA-GFP sera répétée en utilisant les lignées RGA-GFP contenant les mutations *max4* et *max2*. De plus, si nous avons bien visualisé la dégradation de la protéine RGA-GFP après le traitement GA, une « opacification » de la pointe de racine n'a pas permis d'obtenir une image satisfaisante.
- L'expérience de dose-réponse d'application de GA des mutants *rms1*, *rms4* sera répétée en y incluant la lignée *Psbrc1*.

Strigolactones stimulate internode length independently of gibberellins

De Saint Germain A*, Ligerot Y*, Dun E, Pillot, JP, Beveridge C, Ross JJ, Rameau C

Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA UMR1318 INRA-AgroParisTech, F-78000 Versailles, France (A.d.S.G., Y. L., J.P.P., C.R.). School of Plant Science, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, 7001, Australia (J.J.R.). The University of Queensland, School of Biological Sciences, St. Lucia, QLD, 4072 Australia (E.A.D., C.A.B.);

* These two authors contributed equally to this paper

Introduction

Plant height is a major agronomic target in plant breeding for improving seed yield, biomass and standing ability. The plant hormone gibberellin (GA) is one of the most determinants of plant height as suggested by the different strategies designed to reduce plant height in several crops. Manipulating genetically GA biosynthesis (rice gene *sd1*) or GA signaling pathways (wheat *Rht* alleles) to generate dwarf and semi-dwarf high yield varieties in rice and wheat was particularly successful during the “green revolution” (Sasaki et al., 2002; Hedden, 2003; Salamini, 2003).

In pea, the stem *LENGTH* gene *LE* controls internode length and is involved in plant height variation. The *le-1* allele is found in most dwarf cultivars and generated one of the seven trait studied by Mendel. The *LE* gene encodes a gibberellin 3 β -hydroxylase that is able to convert GA₂₀ to the bioactive GA₁ (Lester et al., 1997; Martin et al., 1997). The enzyme encoded by *le-1* shows reduced activity and GA₁ levels in apex and internodes in elongation of *le-1* mutant plants are 10- to 20-fold less than GA₁ levels in tall *LE* plants (Lester et al., 1997).

The *dwarf3* (*dw3*) sorghum mutant corresponding to the *brachytic2* (*br2*) maize mutant has been used in sorghum plant-breeding for more than 50 years (Salamini, 2003). This mutant shows compact basal stalk internodes but enhanced stalk diameter. In the elongating internodes of the *br2* maize mutant, cells have reduced length and diameter but their number is increased. The polar auxin transport (PAT) in the *br2* mutant is reduced and the gene encodes a protein homologous to the P-glycoprotein type of ABC transporters (Multani et al., 2003). The maize *BR2* gene is orthologue of the Arabidopsis ABCB1 which functions in auxin efflux out of meristematic cells of shoot and root apices (Geisler et al., 2005). In maize, the gene controls auxin export from the intercalary meristems, auxin derived from the shoot apex (Knoller et al., 2010). These meristems, characteristics of monocots and located in nodes, corresponds to the rib-meristems of dicotyledons.

Based on genetic studies and the use of dwarf mutants in Arabidopsis, pea, rice and maize, IAA, GA and BR have been shown to be major endogenous regulators of internode length (Ross et al., 2011).

Arabidopsis being a rosette plant, stem elongate only at flowering initiation, and most studies on cell elongation are done on seedling and on hypocotyl which grows only by cell expansion (Chapman et al., 2012). Pea has been used for many years as an excellent system for understanding hormonal control of stem elongation and cross-talks. Its long internodes, the numerous mutants available and the clear separation between vegetative growth and inflorescence development in particular allows to investigate internode elongation during vegetative growth independently of flowering-dependent growth processes. Cross-talks between hormones, their complexity have been detailed in many reviews (Durbak et al., 2012; Kazan and Manners, 2012; Vanstraelen and Benkova, 2012; Wilkinson et al., 2012). Their interaction in the regulation of stem elongation in pea have been discussed in (Ross et al., 2011).

In several systems, auxin regulates GA metabolism. In pea stem, for exemple, auxin increases transcript levels of the *LE* gene (*PsGA₃ox₁*) and down-regulates transcript levels of the *SLN* catabolism gene (*PsGA₂ox₁*) (Lester et al., 1999; Ross et al., 2011). The growth repressor DELLA proteins are major actors in GA-signaling and are rapidly degraded in response to GA treatment. In Arabidopsis, it was shown that genes encoding the GA biosynthetic enzymes *GA₃ox₁* (*GA₄*) and *GA₂₀ox₂* are direct DELLA targets indicating involvement of DELLA proteins in the feedback regulation of GA biosynthesis by GA treatment (Zentella et al., 2007). Whereas 5 *DELLA* genes are present in Arabidopsis (*GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2*, and *RGL3*), the pea genome contains only 2 *DELLA* genes, the *LA* and *CRY* genes (Richards et al., 2001; Weston et al., 2008). In pea roots, *DELLA* proteins promote the expression of GA synthesis genes (*PsGA₂₀ox₁*, *PsGA₃ox₁*, and *PsGA₃ox₂*) and inhibit that of GA deactivation genes (*PsGA₂ox₁* and *PsGA₂ox₂*) (Weston et al., 2008). In pea it was clearly shown that auxin regulation of GA genes was DELLA-independent as IAA regulation of GA genes was also observed in the slender *la cry-s* line, a DELLA-deficient background (O'Neill et al., 2010; Ross et al., 2011).

Cellular examination of mutants affected in GA biosynthesis or GA signaling indicates that GA controls both cell division and cell elongation (Richards et al., 2001). Either IAA or GA treatment strongly promoted stem elongation in dwarf *le-1* mutant seedlings. However, there were striking differences between the pattern of IAA and GA-induced elongation kinetics (Ross et al., 2011). BR, another plant hormone which derives from sterol, promotes plant stem elongation and like GA this hormone promotes cell division and cell elongation (Clouse, 2011). BR mutants in pea are dwarf and semi-dwarf with pleiotropic phenotype on stem width (Nomura et al., 2003; Jager et al., 2005).

Among the numerous *dwarf* (*d*) mutants isolated in rice, some also display a high tillering phenotype and were shown to be strigolactones (SL) deficient (*d10*, *d17*) or not responding to SL (*d3*, *d14*) (Ishikawa et al., 2005; Zou et al., 2006). SL are a group of small molecules that constitutes the most recent-discovered class of plant hormones for their role in the control of shoot branching. (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). These carotenoid-

derived compounds were already known for their roles in symbiotic and parasitic interactions in the rhizosphere (Akiyama and Hayashi, 2006). Several functions to SLs other than the control of branching have been recently identified by a thorough examination of SL-deficient and SL-response mutants in particular in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Agusti et al., 2011; Kapulnik et al., 2011).

Interestingly, it has been shown that while SL repress the activity of axillary meristems located at the axils of most leaves and maintain them in a dormant state (Gomez-Roldan et al., 2008), they stimulate cambium activity. Cambium and interfascicular cambium represent different types of secondary meristems involved in secondary growth of trees but also herbaceous species. The SL-deficient *max1* mutants from *Arabidopsis* and *rms1* from pea display reduced extension of cambium and interfascicular cambium. Moreover exogenous application of the synthetic SL GR24 induced secondary growth in the SL-deficient *max1* mutant but not in the *max2* response mutant from *Arabidopsis* indicating that the SL-stimulation of cambial activity uses the same SL-signaling pathway as for the SL-control of branching. The same effect was observed not only in *Arabidopsis* and pea but also in eucalyptus (Agusti et al., 2011).

Root development is also affected by SL. SL regulate negatively lateral root formation and positively root hair elongation (Koltai, 2011). Consequently despite these SL mutants were first described as relatively non-pleiotropic, it seems that as for other plant hormones, SLs are involved in many aspects of plant development. Studies to investigate how SL interact with others hormones to regulate such processes are emerging using genetic and physiological approaches and highlight the complexity of cross-talks as it appears for other hormones. For the control of branching, two types of interaction have been identified between SL and auxin (Brewer et al., 2009). Auxin stimulates SL-biosynthesis genes at the transcriptional level but it is still needed to really quantify SL levels to confirm that auxin controls SL levels or that a lack of auxin following decapitation decrease SL levels (Foo et al., 2005). It has been shown that SLs also regulate negatively auxin transport, PIN, by an unknown molecular mechanism which impedes auxin export from axillary buds thereby their outgrowth (Bennett et al., 2006). It is very likely that both processes occur and similar interactions between GA and auxin have been shown where IAA stimulates GA biosynthesis and reciprocally GA activate PAT (Ross et al., 2011).

As mentioned previously for rice, another major trait observed in SL-deficient and SL-response mutants is their short stature. It is not clear if this relative dwarfism is due to their increase branching which may reduce the amount of resource for main stem growth. The objectives of this paper were to investigate the origin of the dwarfism of SL-deficient and response mutants in pea, to confirm the role of SL on stem elongation and to test a possible interaction with GA. Two types of possible interaction were evaluated: the effect of SLs on GA₁ levels and their possible influence on GA signaling in particular on DELLA proteins. Globally our results suggest that SL and GA act independently to stimulate stem growth in pea.

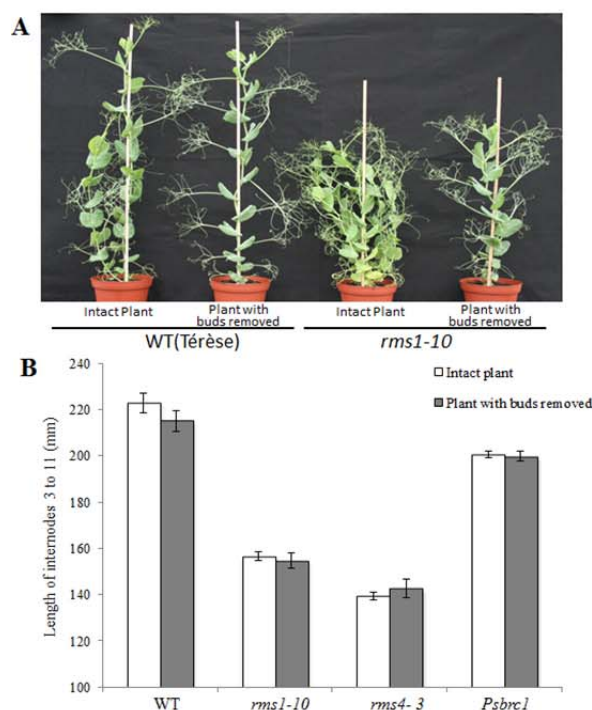


Figure 1. The *rms* mutant plants show reduced height that is not due to their strong shoot branching. (A) Phenotype of wild-type (cultivar Térèse) and *rms1* plants, intact or with axillary buds removed. (B) Quantification of plant height of intact plants and plants with buds/branches removed of WT, *rms1*, *rms4* and *Psbrc1* mutants. The internode length between node 3 and node 11 were measured when the plants were 30-d-old. Data are means $\pm$ standard error ($n = 7-8$).

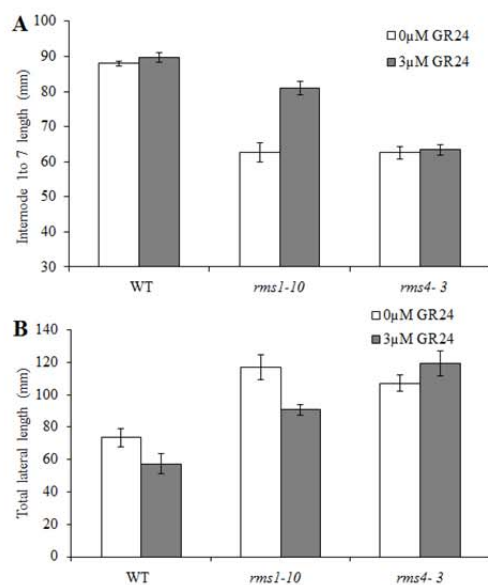


Figure 3. SL supplied via hydroponics increases internode length to SL deficient *rms1* plants but not to the SL-response *rms4* mutant. 6-d-old WT, *rms1-10* and *rms4-3* plants (cultivar Térèse) were supplied with 0 or 3 μ M GR24 via hydroponics for 16 days, after which the internode length between node 1 and node 7 (A) and the sum of all lateral buds and branches at nodes 1 to 5 (B) were measured. Data are means $\pm$ standard error ($n = 7-8$).

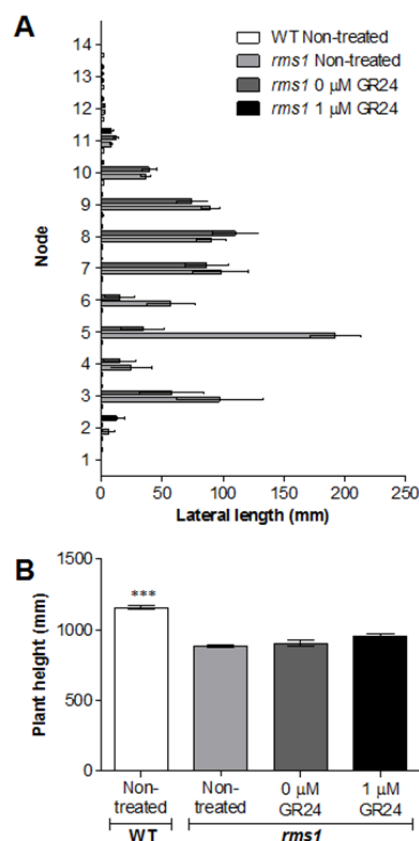


Figure 2. The outgrowth of all buds on a SL deficient *rms1* plant can be inhibited by direct application of SL (A), but inhibiting bud growth does not restore reduced *rms1* plant height (B). Axillary buds of WT or *rms1-1* plants (cultivar Parvus) were either left untreated (non-treated) or were treated with 0 or 1 μ M GR24 when the leaf was first open, and re-treated the following day. Bud lengths and plant height were measured when the plants were 35 d old. Data are means $\pm$ standard error ($n = 14-16$). Asterisks denote significant differences from *rms1* treated or not (***) $P < 0.001$, one-way ANOVA).

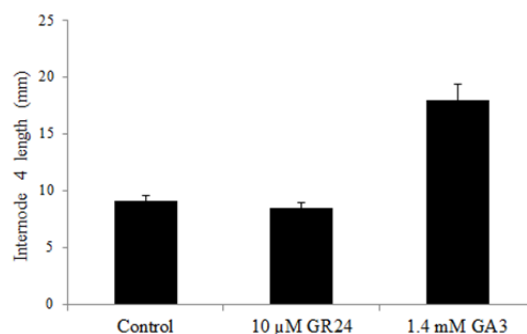


Figure 4. SL treatment to the shoot tip does not affect the growth of the main stem. The main shoot apex of 7-d-old *rms1-11* plants (cultivar Térèse) with 3 expanded leaves were treated with 0 or 10 μ M GR24 or 1.4 mM GA₃. The length of internode 4 was measured 7 d after treatment. Data are means $\pm$ SE ($n = 7-8$).

Results

The *rms* mutant plants show reduced plant height that is not due to their strong shoot branching

As previously reported, the *rms1* and *rms4* mutants exhibit not only a high branching phenotype but also a relative dwarf phenotype (Beveridge et al., 1997). In our experiment, the height of the *rms1-10* SL deficient mutant was 70% of the height of the WT line T  r  se and the height of the SL response *rms4-3* mutant was 63 % of the height of (Fig. 1). In contrast the other SL response *psbrc1* mutant (Braun et al., 2012), showed a significant reduced height but is far less affected than *rms1* and *rms4* (90% of the WT) (Fig. 1B). This observation suggested that the PsBRC1 transcription factor is specifically involved in the control of branching and not in internode elongation, at the difference of the RMS1 and RMS4 proteins which play an important role in both phenotypes.

To investigate whether the reduced height of the SL-related mutants is due to their high branching and the possible impact of branch number on plant height in pea, we compared internode length of WT, *rms1*, *rms4* and *Psbrc1* 15 days-old plants from which we have manually removed all axillary buds along the stem to internode length of intact plants. For all genotypes, no significant difference was observed in internode length between plants with buds removed and control intact plants (Fig. 1). Nevertheless, removal of axillary buds induced a significant increase of leaf size and of stem diameter (Supplemental Fig. S1). In addition we inhibited the outgrowth of all axillary buds of the SL deficient *rms1* mutant plant by exogenous treatment of GR24 directly to axillary buds. This treatment did not lead to a significant increase in plant height (Fig. 2). Our results suggest that SLs may affect plant height independently to their function in bud outgrowth inhibition and that the reduced height of the *rms* mutants is not a consequence of their increased branching phenotype.

SL promote stem elongation when applied/fed to the plant by the roots

To confirm that SL promote stem elongation, we supplied GR24 (3 μ M) to the roots of WT, *rms1* and *rms4* plants via hydroponics. After 16 days of GR24 treatment, total lateral length was significantly reduced for WT and *rms1* but not for *rms4*. Similarly, the GR24 treatment caused a significant increase in internode length for the SL deficient *rms1* mutant but not for the *rms4* response mutant that remained very small (Fig. 3; Fig. S2). No significant increase of internode length was observed for the WT.

In contrast, we compared the response of *rms1* plants to treatment of the shoot tip with or without GR24 or GA₃. While GA₃ applied to the shoot tip caused significant increases in internode lengths and the growth of the main stem, GR24 had no significant effect (Fig. 4). Combined, these results suggest that SL promote stem elongation, independent to its function in bud outgrowth inhibition.

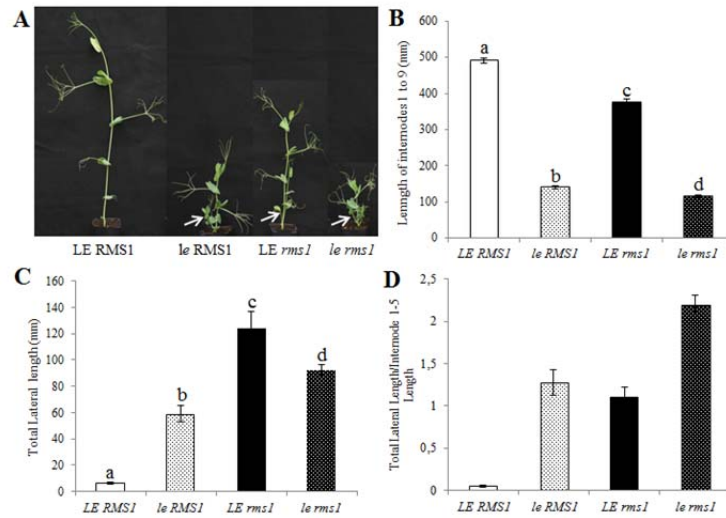


Figure 5. The effects of the *rms1* and *le* mutations on internode length and branching are additive. (A) 15-d-old plants of genotypes *LE RMS1*, *le RMS1*, *LE rms1* and *le rms1* plants. White arrows indicate basal branching. (B) Internode length. Data are means $\pm$ SE ($n = 18$). (C) Total lateral length. Data are means $\pm$ SE ($n = 18$). (D) Ratio of Total lateral length / total stem length. Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, $P < 0.01$).

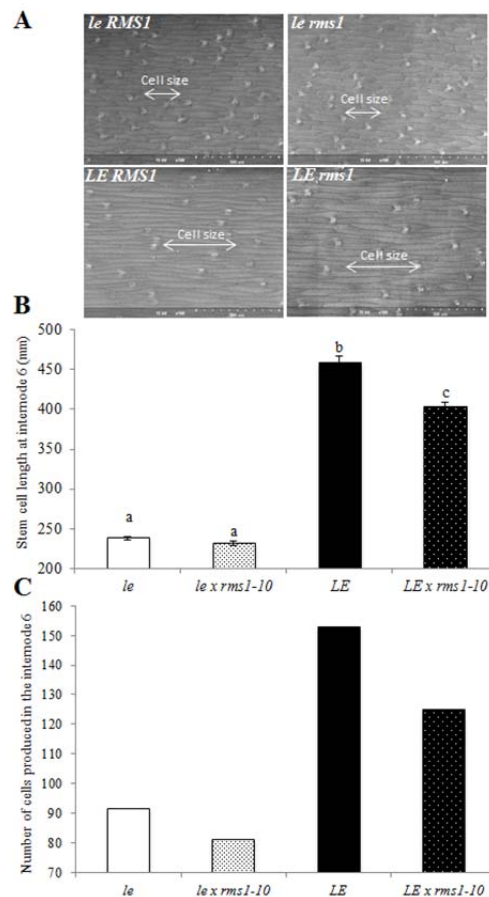


Figure 6. Quantification of epidermal cell size and cell number in pea (cultivar T  r  se) internode 6 by electronic microscopy in *le* line T  r  se, *le rms1-10* double mutant, *rms1-10* mutant and Wild Type (LE). (A) Pictures of epidermal cells by electronic microscopy. (B) Cell size of internode 6. Data are means $\pm$ SE ($n = 4$ plants and approximately 100 cells per plant). (C) Number of cells produced in the internode 5-6 estimated by the ratio of internode length to the mean cell length. Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, $P < 0.05$).

The effects of mutations affecting SL (*rms1*) and GA levels (*le*) are additive on branching and height of the plant

We have previously shown that the *rms1* mutation reduced plant height in different genetic backgrounds (Fig. 1B ; (Beveridge et al., 1997)). In particular the reduction is observed in the *rms1* line obtained from the WT line T  r  se which contains the *le-1* mutation affecting GA₁ levels. This result indicates that the *rms1* mutation affects plant height also in a GA deficient background.

To compare the effect of SL and of GA on internode length and to investigate if the level of GA can impact on the effect of SL on internode length, we used a series of 4 lines deficient in GA1 (*le*) or not (*LE*) and deficient in SLs (*rms1*) or not (*RMS1*) in the same genetic background T  r  se (Fig. 5A) (See Material and Methods). Branching and internode length were measured on 15-days old plants.

A deficiency in GA1 levels caused by the *le-1* allele gave rise to a decrease of 71% in internode length in a non-branching *RMS1* context and of 69% in a SL-deficient context (Fig. 5B). The *rms1* mutation led to a significant reduction in internode length but of only 23% in a *LE* context and of 17% in a GA1-deficient *le-1* context (Fig. 5B). Consequently SL effect on internode length is far less important than GA effect but SL significantly stimulate stem growth whatever the level of GA. Double *le-1 rms1* mutant is shorter than single *le-1* and *rms1* mutants suggesting that SL and GA control internode length independently (Fig. 5A-B).

The observation of branching (Fig. 5A, C, D) showed that both mutations induced branching but while a SL-deficiency stimulate branching at most nodes, a GA-deficiency induced branching at basal nodes only (Supplemental Fig. S4). Indeed it is commonly observed that in pea, dwarf lines have long basal branching at nodes 1 and 2. Total lateral length was higher for *rms1* lines whatever the GA-context while it was higher for *le-1* in a *RMS1* background but not in a SL-deficient *rms1* context. Because branching is quantified by branch length and consequently is strongly dependent of internode length, we quantified branching of the 4 lines by the ratio Total lateral length to Internode length. Using this ratio, the double *le-1 rms1* mutant was more branched than single *le-1* and *rms1* mutants suggesting that SL and GA control branching independently (Fig. 5D). Similarly, if we consider that a bud starts to grow when its size is over 1.5 mm, and if we estimate branching by the number of bud outgrowth, *LE RMS1* plants had only 1 bud outgrowth (at node 2), *le-1 RMS1* had 3 bud outgrowth at nodes 1 and 2 (with 2 bud outgrowths at node 2), *LE rms1* had 3 at nodes 1 to 3 and *le-1 rms1* had 6 bud outgrowths.

SL enhances more cell number rather than cell length to stimulate stem growth.

To investigate whether SL increase cell number and/or cell length to control the height of the plant, and to compare SL effect with GA, we performed a quantification of epidermal cell size and number on the same 4 lines at a given elongated internode (internode 6-7) of 25 day-old plants by electronic microscopy (Fig. 6A).

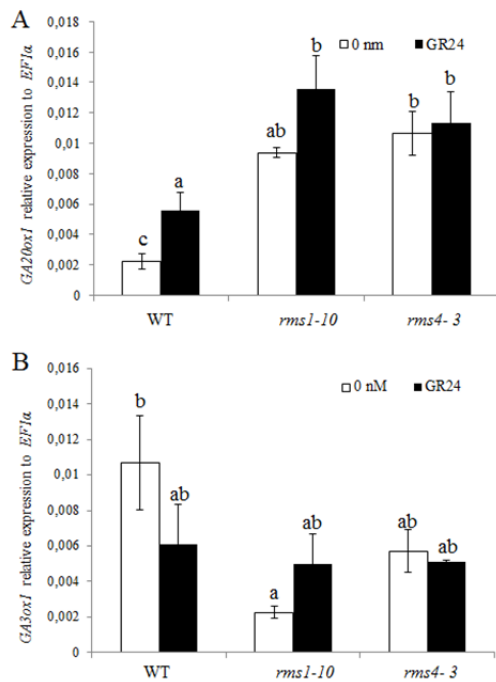


Figure 7. Relative transcript levels of GA biosynthesis genes *GA20ox1* and *GA3ox1* (LE) in pea expanding stem tissue. *GA20ox1* (A) and *GA3ox1* (B) transcript levels relative to *EF1a* measured in the expanding internode (between node 6 and 7) of 12-d-old WT, *rms1-10* and *rms4-3* plants (cultivar Tèreze). 6-d-old plants were supplied with 0 or 3 μM GR24 via hydroponics. Data are means ± SE (*n* = 3 pools of 6 plants). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, *P* < 0.05).

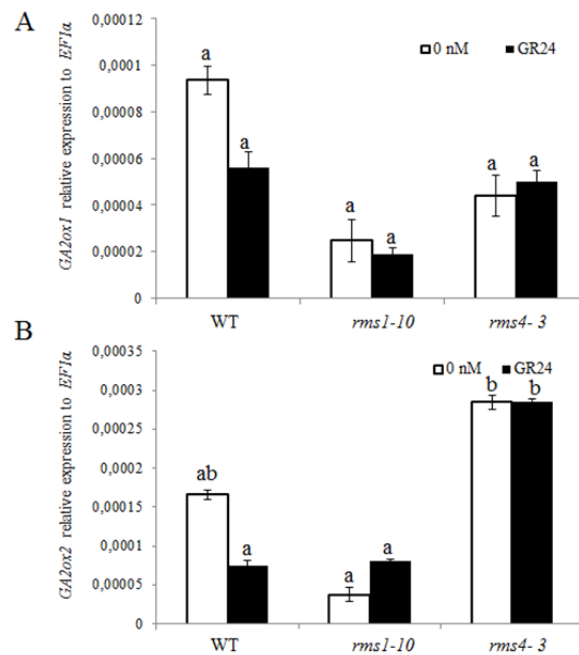


Figure 8. Relative transcript levels of GA biosynthesis genes *GA2ox1* (SLN) and *GA2ox2* in pea expanding stem tissue. *GA2ox1* (A) and *GA2ox2* (B) transcript levels relative to *EF1a* measured in the expanding internode (between node 6 and 7) of 12 days old WT, *rms1-10* and *rms4-3* plants (cultivar Tèreze). 6-d-old plants were supplied with 0 or 3 μM GR24 via hydroponics. Data are means ± SE (*n* = 3 pools of 6 plants). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, *P* < 0.05).

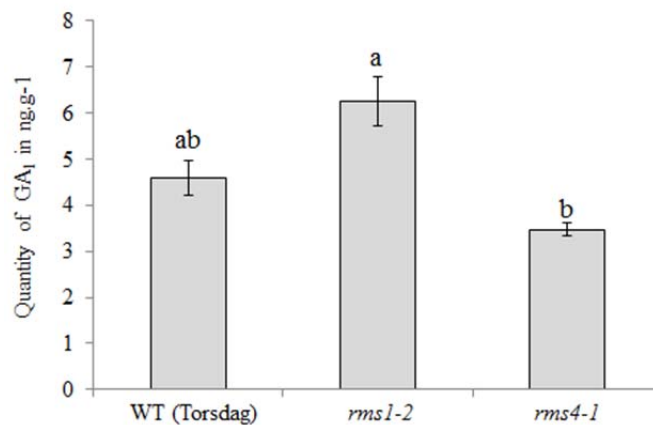


Figure 9. GA₁ levels in expanding stem tissue of wild-type, *rms1-2* and *rms4-1* 15-d-old plants. Data are means ± standard error (*n* = 3). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, *P* < 0.05).

Accordingly to what is known for GA, the number and cell length strongly decreased in *le-1* plants in comparison to *LE* plants (Fig. 6B, C). In contrast, cell length was significantly reduced in *rms1* plants but only in a *LE* background but not in a GA-deficient background. Cell number appeared to be reduced in *rms1* plants in both *LE* and *le-1* backgrounds; *rms1* mutation led to 11% decrease in cell number in *le-1* context and 24% in *LE* context (Fig. 6B C).

These results suggested that SL are mostly implicated in cell division rather than in cell elongation to increase the height of the plant. When considering the width of epidermal cells, the *rms1* mutation caused a strong increase in both *LE* and *le-1* context whereas the effect of GA was relatively low.

SL application has generally no significant effect on transcript levels of genes involved in GA metabolism and GA1 levels is slightly affected in the *rms* mutants.

To investigate whether SL are involved in the regulation of key GA biosynthesis genes, *PsGA20ox1* and *PsGA3ox1* (*LE*), and GA deactivation genes *PsGA2ox1* (*SLN*), and *PsGA2ox2* in pea expanding stem tissue, real-time PCR were performed on WT (Térèse), *rms1* and *rms4* mutants supplied by SL or not via hydroponics. *PsGA₃ox* proteins catalyze the conversion of inactive GA20 to the active form GA1, and the *PsGA₂ox* proteins convert GA1 to the inactive product GA8. *PsGA₂ox₁* but not *PsGA₂ox₂* also has the capacity to convert GA20 to another inactive product GA29 (Lester et al., 1999).

For the 4 genes, significant effect of the addition of GR24 (1 μ M) was observed on transcript levels only for *PsGA20ox1* in WT (Fig. 7A). In the *rms1* and *rms4* mutants, there was a 5-fold up-regulation of *PsGA20ox1* (Fig. 7A) in comparison to the WT and *PsGA3ox1* was down-regulated 5 fold and 2 fold (but not significant) in the *rms1* and *rms4* mutants, respectively (Fig. 7B). No significant changes for *PsGA2ox1* were observed whereas *PsGA2ox2* expression was in accordance with GA1 levels (see below): significant difference between the 2 mutants (higher in *rms4*) but no significant difference between WT and mutants.

To investigate in more details a possible interaction between SL and GA in the control of internode length and to determinate if the reduction of internode length in the *rms* mutant plants can be explained by difference in GA levels, the main bioactive GA in pea, GA1, was quantified. The quantification was done in the shoot apical portion (apical bud and expanding internode) from the tall line Torsdag (*LE*) and the corresponding mutant lines *rms1* and *rms4* (see Material and Method).

The *rms1* mutant contained 30% more GA1 than WT but the difference was at the limit of significance ($P=0.055$) whereas *rms4* had significantly less GA1 than *rms1* and no significant difference with the WT (Fig. 9). Consequently the dwarf phenotype of both *rms* mutants cannot be explained by low levels of GA1 in expanding tissue. It suggests that the action of SL on stem elongation is independent of GA biosynthesis.

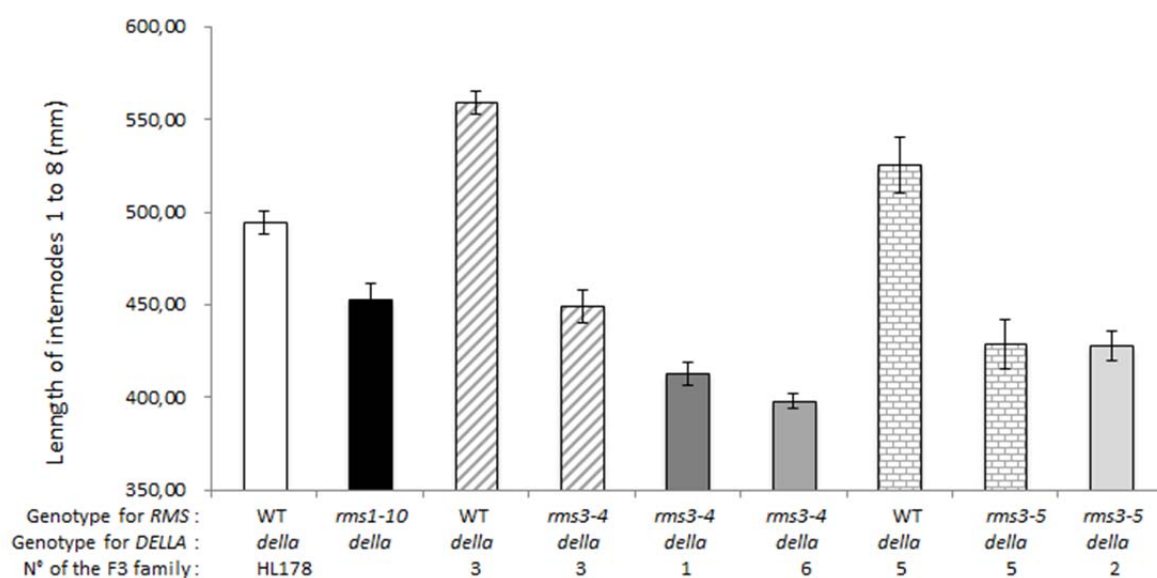


Figure 10. Comparison of internode length between different *della* F3 families fixed for *rms1-10*, *rms3-4* or *rms 3-5* and non-*rms* (WT). Data are means $\pm$ SE ($n = 8$).

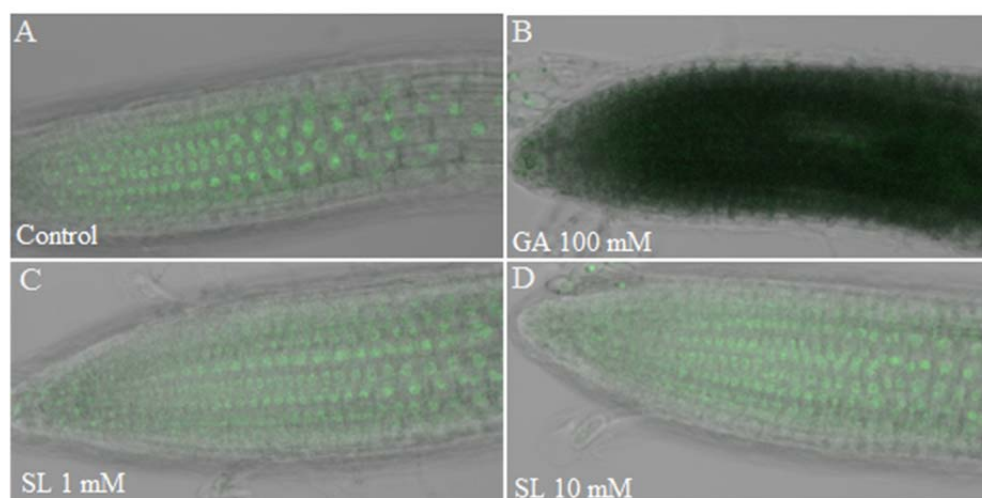


Figure 11. Effect of GA₃ and GR24 treatments on the GFP-RGA protein.

Roots of transgenic plants (*rga/gal-3* background) expressing the *RGAp::GFP-RGA* fusion were observed by using confocal laser microscopy. Shown are three-dimensional projections of the fluorescent images of root tips either treated 4h with control solution (top left) or with 100 mM GA₃ (top right), or with 1mM GR24 (bottom left) or 10 mM GR24 (bottom right)

All together these results indicate that the slight decreased GA1 content of *rms4* mutant mainly resulted from an increase of *PsGA2ox2* expression and GA catabolism and a possible reduction of *PsGA3ox1* expression. The increase in *GA20ox1* expression in both mutants is more consistent with those expected as part of a complex feedback regulation.

SL regulate internode length also in a *della* background

DELLA proteins are major actors in the GA signaling pathway known to be repressors of growth and degraded by GA. In pea, only two DELLA proteins have been identified, LA and CRY (Weston et al., 2008). To investigate if the reduction of internode length due to a SL deficiency need functional DELLA proteins, we compared internode length of *rms1* SL deficient lines with comparable non-SL deficient lines in a background with no functional DELLA proteins (*la cry-s*). The double mutant line *la cry-s* (line HL178) shows a slender phenotype with very long internodes, particularly the basal internodes (Weston et al., 2008). If SL and DELLA proteins act in the same pathway for the control of internode length, the dwarf phenotype caused by the *rms* mutations should not be observed in a genetic background where DELLA proteins are non-functional. The HL178 was crossed with the *rms1* line and 3 *rms3* lines and several slender F2 individuals (*la cry-s*) were selected phenotypically. Different F3 families were followed that were either fixed for *RMS* or *rms* or that were segregating for *RMS*. The branching phenotype of *rms* plants was generally easy to identify but plants were genotyped for *RMS* in the segregating families. Because we don't have the *rms* mutant and the double *la cry-s* mutant in the same genetic background, comparisons of internode length were done between *rms* F3 individuals and non-branching F3 individuals (*rms RMS* and *RMS RMS*) within the same segregating family. Other fixed *rms* and *RMS* F3 families were also analyzed for comparison.

A strong and significant effect of the *rms1*, and the 2 *rms3* alleles mutations was observed on internode length as all branching *rms* families had shorter internodes than the non-branching *RMS* families (including the parent line HL178). These results indicate that DELLA proteins are not needed for SL to regulate height of the plant (Fig. 10).

DELLA proteins are not degraded by SL in tip root of Arabidopsis

The Arabidopsis transgenic line carrying the RGA promoter::GFP-RGA fusion (Silverstone et al., 2001) was used to follow the levels and the localization of the GFP-RGA fusion protein after GR24 treatment in tip root of Arabidopsis seedlings. Root tips of transgenic plants expressing *pRGA::GFP-RGA* were treated with water and GA₃ as negative and positive controls, respectively, and with GR24 at 1 µM and 10 µM. Observations were done 4 h after treatment using confocal microscopy (Fig. 11). GFP signal in the nuclei decreased slightly with water but was maintained in the nuclei while the GA₃ treatment induced a strong decrease of GFP fluorescence in the nuclei. The GR24 treatment did not induce the degradation of GFP::RGA signal in nuclei.

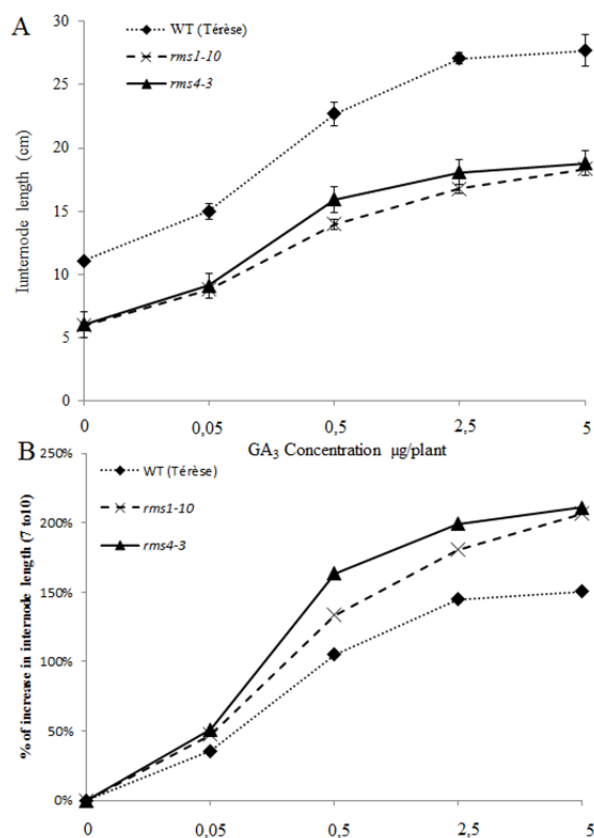


Figure 12. *rms* mutants are not insensitive to GA₃. (A) Length of internodes 7 to 10 of WT, *rms1*, and *rms4* plants after treatment with various concentrations of GA₃ as indicated. GA₃ was applied when the plants were 14-d-old. Measurements were made 13 d after treatment. Data are means $\pm$ SE (n = 7-8). (B) % of increase in internode length (nodes 7 to 10) by GA treatment.

Dose-response of GA₁ application on WT, *rms1* and *rms4*

GA is known to stimulate internode elongation. To understand if all *rms* mutants respond in the same way to GA treatment, we realized a dose response application of GA₃ on stipule of 10 –d-old plants on *rms1* and *rms4* including WT. The application of GA₃ to the *rms1* and *rms4* mutants promoted internode elongation, but the resulting internodes were still shorter than those of GA₃ treated WT plants (Fig. 12A). The effect of GA₁ on the growth rate of internodes was estimated by the ratio between length of untreated internode and treated internode (Fig. 12 B). The ratio was more important in the *rms* mutants than in the wild type plant. These results showed that the *rms* mutants did not behave as GA insensitive mutants.

DISCUSSION

SL deficient and response mutants in various species are shorter in stature than WT (e.g. (Beveridge et al., 1996; Napoli, 1996; Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Zou et al., 2006). Previously it was shown in rice that this reduced plant height was in part a consequence of the increased branching, as manual removal of tillers in the rice *htd1/d17* SL deficient mutant led to an increase in overall plant height (Zou et al., 2006). However, the overall plant height was not completely restored to that of comparative WT plants and this could have been due to diversion of energy from the main stem to the tillers prior to their removal. More recently, (Umehara et al., 2008) demonstrated that the decreased plant height of *d10* SL deficient mutant rice plants was restored to that of WT when grown with GR24 in the hydroponic media indicating a possible role for SL in the main stem growth. Here we show that depleted SL levels are more directly responsible for the reduced height of the pea *rms1* SL deficient mutant as inhibiting the outgrowth of the buds along the *rms1* mutant stem by applying the synthetic SL, GR24, specifically to the axillary buds led to only a minimal and insignificant increase in plant height (Fig. 1). By contrast, supplying GR24 to the root via hydroponics for only 5 days led to a significant increase in *rms1* main stem elongation (Fig. 3 ; Fig. S2) suggesting a more direct role for SL in controlling plant height. We therefore suggest that SLs, in addition to regulating shoot branching (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008) and various aspects of root development (Ruyter-Spira et al., 2010; Kapulnik et al., 2011) also contribute to the regulation of elongation of the main shoot. This SL function however is unlikely performed at the shoot tip, as treating GR24 to the shoot tip of WT plants had no effect on main stem elongation (Fig. 2). It seems that SL has a major effect on cell division to control internode length with a small effect on cell length. Consequently SL mediate opposite processes according tissue types: repressing cell division in axillary bud outgrowth; stimulating cell division in stem to stimulate stem elongation and to activate secondary growth (Agusti et al., 2011; Agusti and Greb, 2012). Agusti and Greb 2012 proposed that SL coordinate different components of shoot architecture in response to environmental inputs to have either a plant with one main stem or a short plant with thin numerous stems. Because the TCP transcription factor PsBRC1 involved in branching inhibition downstream of SL does not seem to be involved in stem elongation (Braun et al., 2012), further investigation should identify the transcription factor involved in SL signaling in the stem.

The GA application and quantification experiments reported here provide no evidence that the dwarf phenotype of the *rms* mutants is due to a decrease in the levels of the active endogenous GA. The observation that *rms* affects plant height without reducing the GA content of the plant, the additive phenotype of *le rms1* double mutants support the view that in pea the processes of stem elongation are not mediated by changes in GA biosynthesis. Furthermore, we demonstrated that SL-deficiency or a non-response to SL can affect stem growth in a *della* background and that SL application has no effect on DELLA localization and degradation. Consequently it appears that SL do not interact with GA to stimulate stem elongation.

Q-PCR analyses showed that the expression of GA biosynthetic gene (*GA3ox1*) is down-regulated while the GA catabolic gene (*GA2ox2*) is up-regulated in *rms4* expanding tissue compared to wild type, like in the seeds of *max2* (Shen et al., 2012). The slight difference of GA₁ levels between *rms1* and *rms4* needs further investigation. One possibility could be the higher auxin level found in *rms1* (Beveridge et al., 1997) as auxin is known to increase GA levels in pea stem (O'Neill et al., 2010).

In pea, it has been shown that while GA and auxin stimulate internode elongation, ethylene and ABA inhibit stem elongation (Ross et al., 2011). Further studies will decipher in what extent SL affect internode length in interaction with these other groups of hormone or whether they act independently.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The WT cultivars Tèrese and Torsdag were used with the derived mutants. The *rms1-10* (M3T-884), *rms3-4* (T2-30), *rms3-5* (M2T-32), *rms4-3* (M3T-946), alleles mutants were obtained in cv Tèrese (Rameau et al., 1997). The *rms1-2* (*rms1-2T*), *rms4-1* (K164) mutant lines were obtained in Torsdag cultivar. The *Psbrcl* mutation obtained in the Caméor background (Braun et al., 2012) was backcrossed into the Tèrese cultivar and BC4 was used in the present study.

The 4 lines with the *LE/le* and *RMS1/rms1* alleles in Tèrese background were obtained as following. The *LE* allele from Torsdag was backcrossed in the dwarf pea line Tèrese (*le*, *RMS1*) and the BC8 was used as the tall line (*LE*, *RMS1*). The *rms1-10* allele from M3T-884 was then crossed with the line (*LE*, *RMS1*) to get the line (*LE*, *rms1*).

The pea *della* deficient HL178 line *la cry-s* double mutant (Weston et al., 2008) was crossed with M3T-884, T2-30 and M2T-32 and all *della* F2 plants were selected. The F3 generation were used for phenotyping analysis. In *della* F3 families segregating for *RMS/rms*, plants were genotyped for *RMS* when necessary.

Detection of the GFP-RGA Fusion Protein and Confocal Laser Microscopy

Arabidopsis plants containing GFP-RGA fusion genes were grown as described in (Silverstone et al., 2001) and detection of GFP-RGA protein after GA and SL applications was performed as in (Silverstone et al., 2001). Detection of GFP fluorescence was performed with a Zeiss LSM 710 confocal microscope. The excitation wavelength was 488 and 561 nm, and emission was collected at 565 to 720 nm for root tip imaging. For the experiments, root tips from 6-day-old transgenic plants expressing *35S::GFP-RGA* were mounted on standard microscope slides in the presence of water, with 100 mM GA₃, with 1mM GR24 or 10 mM GR24.

Growing Conditions, and Phenotype Measurement

Pisum sativum (pea) plants were grown in a glasshouse as described in (Braun et al., 2012). For harvesting axillary buds at node 4 or epicotyls, plants were sown individually in 4-dL pots. For longer culture, one or two plants were cultivated per 2-L pot. Nodes were numbered acropetally from the first scale leaf as node 1. The stage indicated corresponds to the number of nodes with fully expanded leaves. Bud and branch lengths were measured with digital calipers. To study the effect of removing axillary buds, the *rms1-10*, *rms4-3*, *psbrc1* mutants and T  r  se wild type plant, were analyzed and their axillary buds were removed every days.

Hormonal Treatment

The synthetic SL GR24 (kindly provided by F.D. Boyer, Institut de Chimie des Substances Naturelles) was applied on buds as 10   L of a solution containing 50% ethanol, 1% polyethylene glycol 1450 (Sigma), 0.1% dimethyl sulfoxide (Sigma), and 0.1% acetone containing or not (mock treatment) 500 nM GR24.

For hydroponics treatments, acetone or GR24 (dissolved in acetone) was added to the hydroponic culture solution to give a final concentration of 0 or 3   M of SL and 0.01 % acetone. The hydroponic culture solution was continuously aerated by an aquarium pump and was replaced weekly. 2 days after the beginning of the treatment, expanding stem tissue (internode 5 to 6) were harvested for gene expression analyses.

For GA treatment, 2   L of solution containing gibberellin A1 (GA1; Sigma) at the concentrations specified dissolved in ethanol 95% was applied to each of the two stipules at the node 5 of 12-d-old plants in an ethanol.

Gene expression analyses

Tissue was harvested, total RNA isolated and quantified, cDNA synthesized and real-time PCR gene expression analyses were performed as described in Braun et al. (2012). Primer sequences were as follows: for GA synthesis genes and GA deactivation genes, PsGA20ox1, 5'-CATTCCATTAGGCCAAATTTCAAT-3' and 5'-CTGCCCTATGTAAACAACCTTGTATCT-3'; PsGA3ox1, 5'-TTCGAGAACTCTGGCCTCAAG-3' and 5'-ATGTTCTGCTAACTTTTTCATGGTT-3'; PsGA2ox1, 5'-CACAACCAATCAAGAACACAATTTTC-3' and 5'-CCCTTCTGCATCAAATCAAG-3'; PsGA2ox2, 5'-CCCTCCTGACCCCACTGAAT-3' and 5'-CTCACAACCAATCTTCCATTG-3'; for

gene marker of cell division : PsCycA3, 5'-CGACCAAGACAACCTCCACGC-3' and 5'-CGTTGGTTATGTCACCGAGAG-3'; PsCycD1 5'-CAAATCCCTGGAAGTCCAAGT-3' and 5'-CAGGCTCTGAGGTTGAATACGAG-3'; Transcript levels for the different genes were expressed relative to the expression of the EF1 α gene (Johnson et al., 2006).

Segregation Studies

The CAPS marker for genotyping *RMS1* was based on amplification of the PCR fragment using primers RMS1-118F (5'-TTGGTTGGACTTCACTTTGAGG-3') and RMS1-984R (5'-CACAACAATCAGCAATGACAGC-3') and digestion with the *Cfr13I* enzyme (Fermentas).

Hormone Quantification and Application

GA₁ were extracted and quantified as described by Weller et al.2009

Scanning Electronic Microscopy

Freshly sampled tissues were cooled to -33°C by a peltier cooling stage (Deben) and observed with a Hirox SH-1500 benchtop scanning electronic microscope.

REFERENCES

- Agusti J, Greb T** (2012) Going with the wind - Adaptive dynamics of plant secondary meristems. *Mech Dev*
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, Greb T** (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Akiyama K, Hayashi H** (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot (Lond)* **97**: 925-931
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C, Leyser O** (2006) The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**: 553-563
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC** (1996) Branching in Pea (Action of Genes *Rms3* and *Rms4*). *Plant Physiol* **110**: 859-865
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C** (1997) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft transmissible signal(s). *Plant Physiol.* **115**: 1251-1258
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadi I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, Luo D, Bendahmane A, Turnbull C, Rameau C** (2012) The Pea TCP Transcription Factor PsBRC1 Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching. *Plant Physiol* **158**: 225-238
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA** (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 482-493
- Chapman EJ, Greenham K, Castillejo C, Sartor R, Bialy A, Sun TP, Estelle M** (2012) Hypocotyl Transcriptome Reveals Auxin Regulation of Growth-Promoting Genes through GA-Dependent and -Independent Pathways. *PLoS One* **7**: e36210
- Clouse SD** (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* **23**: 1219-1230
- Durbak A, Yao H, McSteen P** (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 92-96

- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge CA** (2005) The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**: 464-474
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, Ejendal KF, Smith AP, Baroux C, Grossniklaus U, Muller A, Hrycyna CA, Dudler R, Murphy AS, Martinoia E** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* **44**: 179-194
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-194
- Hedden P** (2003) The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* **19**: 5-9
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyojuka J** (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol* **46**: 79-86
- Jager CE, Symons GM, Ross JJ, Smith JJ, Reid JB** (2005) The brassinosteroid growth response in pea is not mediated by changes in gibberellin content. *Planta* **221**: 141-148
- Johnson X, Bricch T, Dun EA, Goussot M, Haurogne K, Beveridge CA, Rameau C** (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014-1026
- Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Sejalon-Delmas N, Combier JP, Becard G, Belausov E, Beeckman T, Dor E, Hershenhorn J, Koltai H** (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta* **233**: 209-216
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**: 22-31
- Knoller AS, Blakeslee JJ, Richards EL, Peer WA, Murphy AS** (2010) Brachytic2/ZmABCB1 functions in IAA export from intercalary meristems. *J Exp Bot* **61**: 3689-3696
- Koltai H** (2011) Strigolactones are regulators of root development. *New Phytol* **190**: 545-549
- Lester DR, Ross JJ, Davies PJ, Reid JB** (1997) Mendel's stem length gene (Le) encodes a gibberellin 3 beta-hydroxylase. *Plant Cell* **9**: 1435-1443
- Lester DR, Ross JJ, Smith JJ, Elliott RC, Reid JB** (1999) Gibberellin 2-oxidation and the SLN gene of *Pisum sativum*. *Plant J* **19**: 65-73
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P** (1997) Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the Le alleles and function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8907-8911
- Multani DS, Briggs SP, Chamberlin MA, Blakeslee JJ, Murphy AS, Johal GS** (2003) Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants. *Science* **302**: 81-84
- Napoli C** (1996) Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* **111**: 27-37
- Nomura T, Bishop GJ, Kaneta T, Reid JB, Chory J, Yokota T** (2003) The LKA gene is a BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 homolog of pea. *Plant J* **36**: 291-300
- O'Neill DP, Davidson SE, Clarke VC, Yamauchi Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Reid JB, Ross JJ** (2010) Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta* **232**: 1141-1149
- Richards DE, King KE, Ait-Ali T, Harberd NP** (2001) HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 67-88
- Ross JJ, Weston DE, Davidson SE, Reid JB** (2011) Plant hormone interactions: how complex are they? *Physiol Plant* **141**: 299-309
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, Verstappen F, Bouwmeester H** (2010) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: Another below-ground role for strigolactones? *Plant Physiol*
- Salamini F** (2003) Plant Biology. Hormones and the green revolution. *Science* **302**: 71-72

- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M** (2002) Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**: 701-702
- Shen H, Zhu L, Bu QY, Huq E** (2012) MAX2 Affects Multiple Hormones to Promote Photomorphogenesis. *Mol Plant* **5**: 224-236
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP** (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555-1566
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM** (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* **129**: 1131-1141
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S** (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200
- Vanstraelen M, Benkova E** (2012) Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*
- Weston DE, Elliott RC, Lester DR, Rameau C, Reid JB, Murfet IC, Ross JJ** (2008) The Pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiol* **147**: 199-205
- Wilkinson S, Kudoyarova GR, Veselov DS, Arkhipova TN, Davies WJ** (2012) Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *J Exp Bot* **63**: 3499-3509
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP** (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037-3057
- Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L** (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J* **48**: 687-698

SUPPLEMENTAL DATA

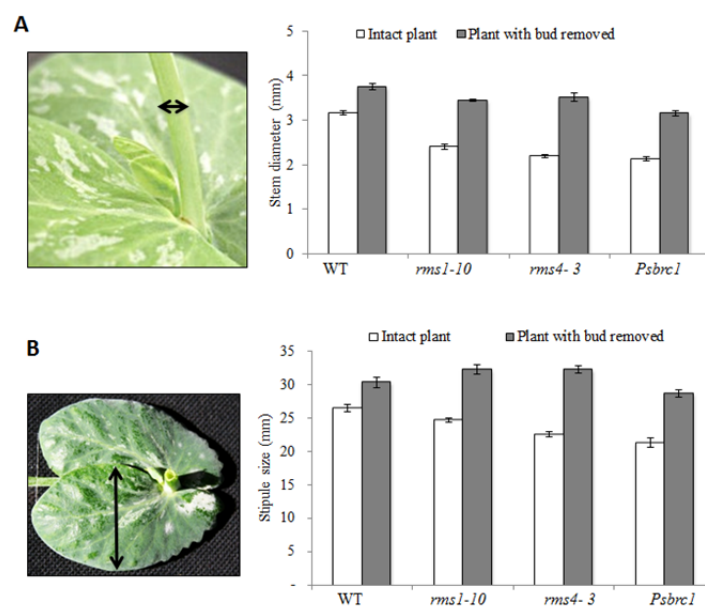


Figure S1. Quantification of stipule size and stem diameter on intact plants and plants with buds/branches removed. (A) Stem diameter at the base of the node 3 was measured when the plants were 30-d-old. Data are means $\pm$ standard error ($n = 7-8$). (B) Stipule width at node 3 was measured when the plants were 30-d-old. Data are means $\pm$ standard error ($n = 7-8$).

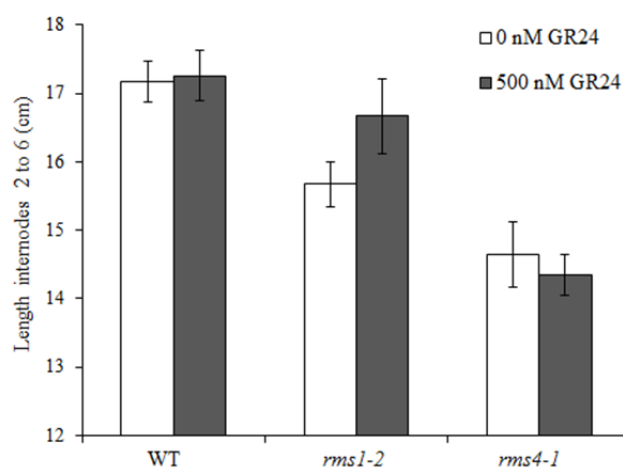


Figure S2. SL supplied via hydroponics to SL deficient *rms1-2* in Torsdag background. 6-d-old WT, *rms1-2* and *rms4-2* plants (cultivar Torsdag) were supplied with 0 or 3 μ M GR24 via hydroponics for 16 days, after which the internode length between node 1 and node 6 was measured. Data are means $\pm$ standard error ($n = 10-12$).

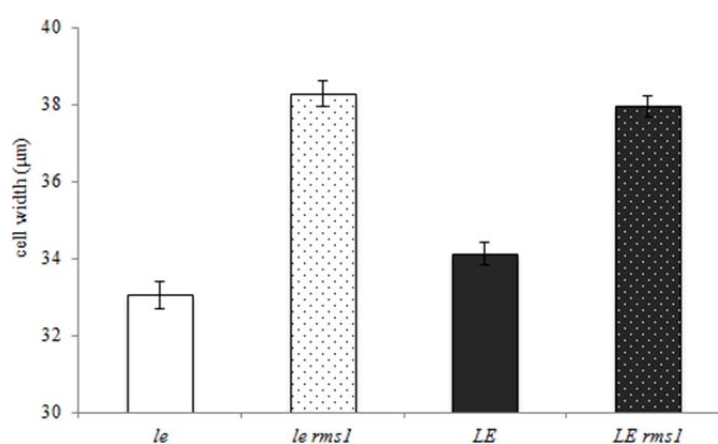


Figure S3. Cell width of epidermal cells of internode 6. Data are means $\pm$ SE ($n = 18$).

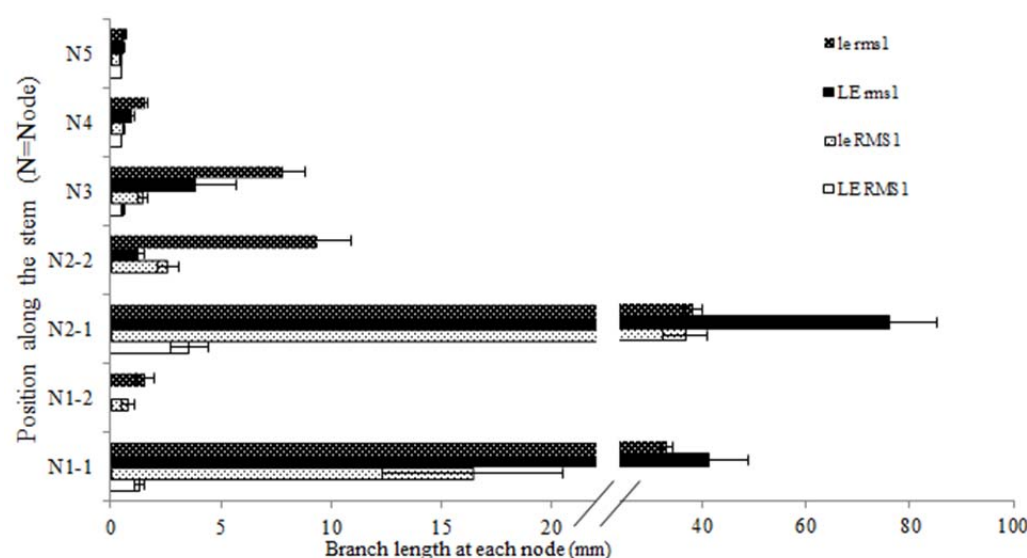


Figure S4. Branch length at each node of lines of the 4 genotypes *LE RMS1*, *le RMS1*, *LE rms1* and *le rms1*. N1-2 means second bud at node 1. Data are means $\pm$ SE ($n = 18$).

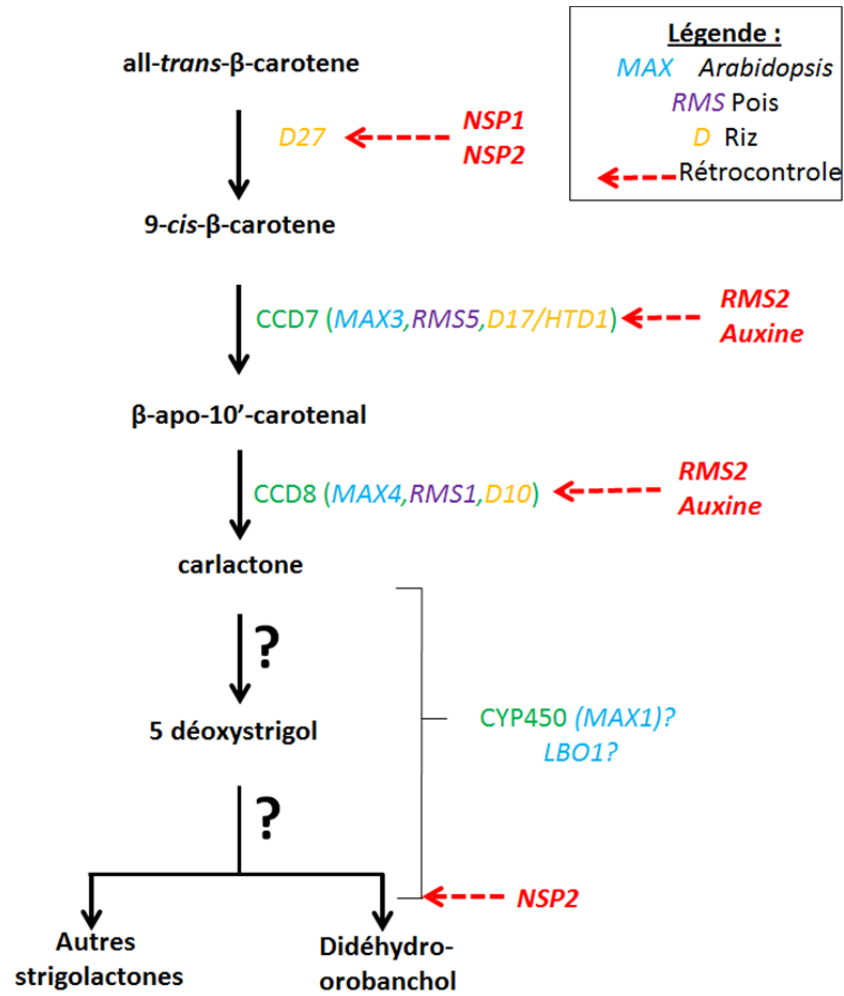


Figure IV. 1. Schéma de la biosynthèse des strigolactones et de sa régulation

Chapitre IV : Identification des homologues des gènes de biosynthèse des strigolactones chez le pois.

Avant-propos

Les résultats présentés dans ce chapitre sont un peu en marge de l'objectif principal de la thèse, car il s'agit d'une identification des gènes de biosynthèse de strigolactone chez le pois. Ils ouvrent néanmoins de nombreuses perspectives pour les projets futurs du laboratoire. L'acquisition de nouvelles données sur le génome du pois ainsi que la mise en place de collaborations avec d'autres équipes travaillant sur le modèle pois ont rendu ce travail rapide et fructueux. Jusqu'en 2010, nous utilisions une approche par primers dégénérés, afin d'identifier les gènes mais cette technique était longue et ne permettait pas d'identifier les homologues proches. A partir de 2011, l'équipe de Dijon de Judith Burstin, grâce au projet ANR GENOPEA, a obtenu « un set Unigene » de pois de 45000 gènes qui d'après leurs estimations, représenterait la majeure partie des gènes exprimés chez le pois (J. Burstin, communication personnelle). Ces données nous permettent d'obtenir très rapidement les séquences de pois des homologues des gènes de biosynthèse identifiés chez d'autres plantes. Notre collaboration avec la plateforme de TILLING d'Evry d'Abdel Bendahmane nous permet de plus d'obtenir facilement des mutants de pois pour nos gènes d'intérêt (Dalmais et al., 2008)

I. Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale (Paragraphe IV-B), les travaux d'Alder et al., 2012 ont permis d'élucider une des premières étapes de la biosynthèse des strigolactones à partir des caroténoïdes et notamment la fonction de D27, une isomérase qui produit un dérivé de caroténoïde, substrat spécifique de CCD7. Avant la caractérisation de la protéine *in vitro* la place de cette enzyme dans la biosynthèse était incertaine, c'est pourquoi nous avons envisagé une caractérisation de ce gène chez le pois. L'objectif était d'obtenir des mutants de pois pour ce gène par TILLING afin de réaliser des expériences de greffes et des quantifications de strigolactones. Nous avons obtenu le gène de pois et réalisé la caractérisation de son expression chez le pois, résultats qui concordent avec ceux récemment publiés chez *Arabidopsis* par (Waters et al., 2012)(voir ci-dessous).

Les premières étapes de la biosynthèse des strigolactones sont maintenant bien connues avec pour élément majeur la découverte d'un intermédiaire de biosynthèse, la carlactone, produit par l'enzyme CCD8 (Figure IV. 1). Mais les étapes qui conduisent à la formation d'une strigolactone tétra-cyclique à partir de la carlactone sont totalement inconnues. Il semble donc logique de penser que d'autres enzymes, déjà identifiées ou non, interviennent dans cette transformation. Très peu d'informations sont connues sur le devenir de la carlactone dans la plante. En effet, il serait intéressant de savoir si cette molécule est bien le signal mobile produit dans les plastes des cellules de la partie basse de la plante comme suggéré par des expériences de greffe (Turnbull et al., 2002)(Figure IV. 1). Parmi ces enzymes intervenant dans cette conversion on a pu identifier chez *Arabidopsis* la protéine MAX1 dont les mutants présentent un phénotype hyperramifié et qui répondent à l'application de GR24 (Booker et al., 2005; Crawford et al., 2010). On sait que cette enzyme catalyse une réaction enzymatique située en aval des enzymes CCD7 et CCD8 mais on ne connaît ni le substrat ni le produit de cette enzyme. Cette protéine n'a été caractérisée que chez *Arabidopsis*, et ce modèle ne permet pas de réaliser des quantifications hormonales facilement ni même de réaliser un nombre de greffe important. Pour cela nous avons envisagé d'obtenir le mutant de pois pour le gène *MAX1* afin de réaliser ces expériences de physiologie et de déterminer le rôle de cette enzyme.

Se basant sur l'idée que MAX1 ne pouvait pas être le seul intermédiaire enzymatique entre le produit de l'enzyme CCD8 et la strigolactone, l'équipe australienne de Christine Beveridge, a réalisé une expérience de microarray sur *Arabidopsis* pour identifier les gènes différentiellement exprimés dans la base de la hampe florale entre les plantes sauvages, les mutants *max*, et des plantes sauvages décapitées. En effet l'expression des gènes de biosynthèse de strigolactones est finement régulée par la décapitation (vraisemblablement par l'auxine) et l'application de SL (Beveridge and Kozuka, 2010). Par exemple chez le pois, l'expression des gènes de biosynthèse *RMS1* et *RMS5*, qui sont co-régulés, est fortement augmentée chez les mutants *rms4* et diminue suite à la décapitation (Brewer et al., 2009). L'idée du projet australien était de trouver d'autres gènes de biosynthèse co-régulés et qui répondent aux mêmes caractéristiques afin d'identifier de nouvelles enzymes. C'est ainsi que l'équipe australienne a mis en évidence le gène *LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE1 (LBO1)* (At3g21420) qui code une oxydo-réductase. L'obtention d'un mutant d'insertion T-DNA *lbo1* a permis de valider que

Nom de la famille	<i>Psmax1-A10 2622</i>	<i>Psmax1-A10 1190</i>	<i>Psmax1-A10 2824</i>	<i>Psmax1-A10 4601</i>	<i>Psmax1-A10 3006</i>
Amorces utilisés	MAX1A10_2622_CAPSF et MAX1A10_2622_CAPSR	MAX1A10_1190_CAPSF et MAX1A10_1190_CAPSR	MAX1A10_2824_CAPSF et MAX1A10_2824_CAPSR	MAX1A10_4601_CAPSF et MAX1A10_4601_CAPSR	MAX1A10_3006_CAPSF et MAX1A10_3006_CAPSR
Enzymes (nom fermentas/non usuel)	<i>A1w261/BsmAI</i>	<i>AjuI</i>	<i>SchI/MlyI</i> <i>PleI</i> (NEB)	<i>MbolI</i>	<i>HpyF3I/DdeI</i>
Tampon fermentas	TANGO	RED	TANGO	BLEU	TANGO
Durée de digestion	1H	1H	1H	1H	1H
Température	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Motif de restriction	5'...GTCTC(N) ₁ ^...3' 3'...CAGAG(N) ₅ ↑^...5'	5'...^ ₇ (N)GAA(N) ₇ TTGG(N) ₁₁ ^3' 3'...^ ₁₂ (N)CT(N) ₇ AACC(N) ₆ ^5'	5'...GAGATC(N) ₅ ^...3' 3'...CTCAG(N) ₅ ^...5'	5'...GAAGA(N) ₈ ^...3' 3'...CTTCT(N) ₇ ^...5'	5'...C^TNAG...3' 3'...GANT^C...5'
Tailles des fragments attendus	WT= 186pb + 57 pb m= 243pb H= 186pb + 57 pb + 243pb	WT= 320pb + 219 pb m= 539pb H= 320pb + 219 pb + 539 pb	WT= 212 pb + 131pb m= 343 pb H= 212pb + 131pb + 343pb	WT= 272 pb + 71pb m= 343 pb H= 272pb + 71pb + 343pb	WT= 112 pb + 66pb m= 178 pb H= 112pb + 66pb + 178pb

Nom de la famille	<i>Psmax1-A10 6547</i>		<i>Psmax1-A10 2503</i>
Amorces utilisés	MAX1A10_6547_dCAPSF et MAX1A10_6547_dCAPSR		MAX1A10_2503_dCAPSF et MAX1A10_2503_dCAPSR
Enzymes (nom fermentas/non usuel)	<i>Eam1104I/Ksp632I/EarI</i>	<i>MbolI</i>	<i>NheI</i>
Tampon fermentas	TANGO	BLEU	TANGO
Durée de digestion	1H	1H	1H
Température	37°C	37°C	37°C
Motif de restriction	5'...CTCTTC(N) ₁ ^...3' 3'...GAGAAG(N) ₄ ^...5'	5'...GAAGA(N) ₈ ^...3' 3'...CTTCT(N) ₇ ^...5'	5'...G^CTAGC...3' 3'...CGATC^G...5'
Tailles des fragments attendus	WT= 152 pb + 27pb m= 175 pb H= 152pb + 27pb + 175pb	WT= 80 pb + 72pb + 27pb m= 107 pb + 72pb H= 107pb + 80pb + 72pb + 27pb	WT= 136 pb + 26pb m= 162 pb H= 136pb + 26pb + 162pb

Tableau IV. 1. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING
PsMAX1-A10

ce gène était impliqué dans le contrôle de la ramification puisque celui-ci présente un phénotype hyperbranché. Toutefois l'équipe se heurte à la difficulté de démontrer que ce mutant est déficient en strigolactones par rapport au type sauvage. l'équipe nous a donc chargés d'obtenir le mutant de pois de ce gène afin de réaliser des quantifications hormonales ainsi que des greffes.

II. Matériel et méthodes

Obtention des gènes *PsD27*, *PsMAX1-A10*, *PsMAX1A12* et *PsLBO1*, et analyse phylogénétique

Les amorces dégénérées, ayant permis d'obtenir une partie de *PsD27*, PsD27_346U et PsD27_912L ont été définies à partir d'un alignement des séquences protéiques des homologues de *D27* chez *Arabidopsis*, *Medicago* et *Glycine max*. Les primers spécifiques utilisés pour le séquençage du gène *PsD27* sont : PsD27_p1F_5 et PsD27_p1R_578 ; PsD27_p1F_514 et PsD27_p1F_600 ; PsD27_p1R_725 et PsD27_p2F_36 ; PsD27_p2R_213 et PsD27_p2R_700 ; PsD27_p1F_725 et PsD27_p2R_36.

Le séquençage du gène *PsMAX1-A12* a été réalisé grâce aux couples d'amorces suivantes : PsMAX1-A12_3F et PsMAX1-A12_1009R; PsMAX1-A12_931F et PsMAX1-A12_2009R ; PsMAX1-A12_1963F et PsMAX1-A12_2713R. Pour *PsMAX1-A10* les amorces utilisés sont : PsMAX1-A10_F8 et PsMAX1-A10_R596; PsMAX1-A10_j2F596 et PsMAX1-A10_j2R1004 ; PsMAX1-A10_F1004 et PsMAX1-A10_R1846 ; PsMAX1-A10_j4F1846 et PsMAX1-A10_j4R3004 ; PsMAX1-A10_F3004 et PsMAX1-A10_R3400

L'obtention de *PsLBO1* a été réalisée avec les amorces dégénérées PsLBO_U515 et PsLBO_L777 et des amorces spécifiques PsLBO_U1024_3', PsLBO_U968_3', PsLBO_L520_5', PsLBO_L537_5' et PsLBO_L580_5', PsLBO_U525, PsLBO_L923 , PsLBO_F2006 et PsLBO_R2609.

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées grâce au logiciel MEGA4 (Tamura et al., 2007)

Nom de la famille	<i>Psm</i> ax1-A12 799	<i>Psm</i> ax1-A12 1032	<i>Psm</i> ax1-A12 1644	<i>Psm</i> ax1-A12 1995	<i>Psm</i> ax1-A12 2286
Amorces utilisés	MAX1A12_799_CAPS_F et MAX1A12_799_CAPS_R	MAX1A12_1032_CAPS_F et MAX1A12_1032_CAPS_R	MAX1A12_1644_dCAPF et MAX1A12_1644_dCAPR	MAX1A12_1995_dCAPF et MAX1A12_1995_dCAPR	MAX1A12_2286_CAPS_F et MAX1A12_2286_CAPS_R
Enzymes (nom fermentas/non usuel)	<i>TaaI/HpyCH4III</i>	<i>AjuI</i>	<i>BseNI/Bsrl</i>	<i>HpaII</i>	<i>PsuI/BstYI</i>
Tampon fermentas	TANGO	RED	BLEU	TANGO	BLEU
Durée de digestion	1H	1H	1H	1H	1H
Température	65°C	37°C	65°C	37°C	37°C
Motif de restriction	5'...ACN [^] GT...3' 3'...TG [^] NCA...5'	5'... [^] ₇ (N)GAA(N) ₇ TTGG(N) ₁₁ [^] ...3' 3'... [^] ₁₂ (N)CT(N) ₇ AACC(N) ₆ [^] ...5'	5'...ACTGGN [^] ...3' 3'...TGAC [^] CN...5'	5'...C [^] CGG...3' 3'...GGC [^] C...5'	5'...R [^] GATCY...3' 3'...YCTAG [^] R...5'
Tailles des fragments attendus	WT= 200pb + 150 pb m= 350pb H= 150pb + 200pb+350pb	WT= 150pb + 100 pb m= 250pb H= 150pb + 100 pb + 250pb	WT= 156 pb m= 177pb H= 156pb + 177 pb	WT= 153 pb m= 180pb H= 153pb + 180 pb	WT= 140 pb + 100pb m= 240pb H= 140pb + 100pb + 240pb

Tableau IV. 2. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING *PsMAX1-A12*

nom de la famille	<i>Psl</i> bo 3182	<i>Psl</i> bo 2100	<i>Psl</i> bo 2698	<i>Psl</i> bo 2083	<i>Psl</i> bo 4334
Amorces utilisés	LBO3182_dCAPS_F et LBO3182_dCAPS_R	LBO2100/2698_CAPS_F et LBO2100_CAPS_R	LBO2100/2698_CAPS_F et LBO2698_CAPS_R	LBO2083_CAPS_F et LBO2083_CAPS_R	LBO4334_CAPS_F et LBO4334_CAPS_R
Enzymes (nom fermentas/non usuel)	<i>XbaI</i>	<i>BseGI/BtsCI</i>	<i>BsuRI/HaeIII</i>	<i>TruI</i>	<i>MnII</i>
Tampon fermentas	TANGO	TANGO	RED	RED	GREEN
Durée de digestion	1H	1H	1H	1H	1H
Température	37°C	55°C	37°C	65°C	37°C
Motif de restriction	5'...T [^] CTAGA...3' 3'...AGATC [^] T...5'	5'...GGATGNN [^] ...3' 3'...CCTAC [^] NN...5'	5'...GG [^] CC...3' 3'...CC [^] GG...5'	5'...T [^] TAA...3' 3'...AAT [^] T...5'	5'...CCTC(N) ₇ [^] ...3' 3'...GGAG(N) ₆ [^] ...5'
Tailles des fragments attendus	WT= 155 pb m= 130pb H= 155pb + 130pb	WT= 171pb + 316 pb m= 486pb H= 171pb + 316 pb + 486pb	WT= 85pb + 254 pb m= 339pb H= 85pb + 254 pb + 339pb	WT= 230 pb m= 160pb + 70 pb H= 160pb + 70 pb + 230 pb	WT= 94 pb m= 124pb H= 94pb + 124pb

Tableau IV. 3. Marqueurs CAPS et dCAPS de génotypage des mutants de TILLING *PsLBO1*

Analyse de l'expression des gènes :

Le prélèvement des tissus, l'extraction d'ARN et la quantification ainsi que la synthèse des ADNc et l'analyse de l'expression des gènes par Q-PCR ont été réalisés comme décrit dans la matériel et méthode du chapitre III avec les couples d'amorces suivants ; pour *PsD27* : PsD27_F3 et PsD27_R3, pour *PsLBO1* : PsLBO F1 et PsLBO R1, pour *PsMAX1-A12* : PsMAX1-A12_F3 et PsMAX1-A12_R3, pour *PsMAX1-A10* : PsMAX1-A10_F3 et PsMAX1-A10_R3. Les tissus utilisés pour la localisation de l'expression sont décrits dans le chapitre III. Les épicotyles utilisés pour l'étude du rétrocontrôle du gène *PsD27* sont issus de plantes de pois âgées de 15 jours, cultivées en hydroponique selon les conditions décrites dans le chapitre III et traités avec 1 µM de GR24 ou non. 3 pools de 6 épicotyles ont été faits.

Conditions de culture :

Les plantes issues du TILLING ont été cultivées dans les conditions décrites dans (Braun et al., 2012).

Génotypage :

L'extraction d'ADN pour le génotypage a été réalisée selon le protocole décrit dans (Braun et al., 2012). Les différents marqueurs de génotypage utilisés sont détaillés dans les Tableau IV. 1. , IV. 2. et IV. 3.

TILLING :

Le TILLING a été réalisé comme décrit dans (Braun et al., 2012) avec les couples d'amorces Max1_N1F et Max1_N1R ; Max1_N2F700 et Max1-N2R800 pour le TILLING de *PsMAX1-A12* et les couples MaxA10_N1F2 et MaxA10_N1R3 ; MaxA10_N2Ft1 et MaxA10_N2Rt1 pour le TILLING *PsMAX1-A10*. Pour le TILLING de *PsLBO1* les amorces utilisées sont : PsLBO_TILN1_F et PsLBO_TILR1_R1/PsLBO_TILN1_R2 ; PsLBO_TILN2_F et PsLBO_TILN2_R.

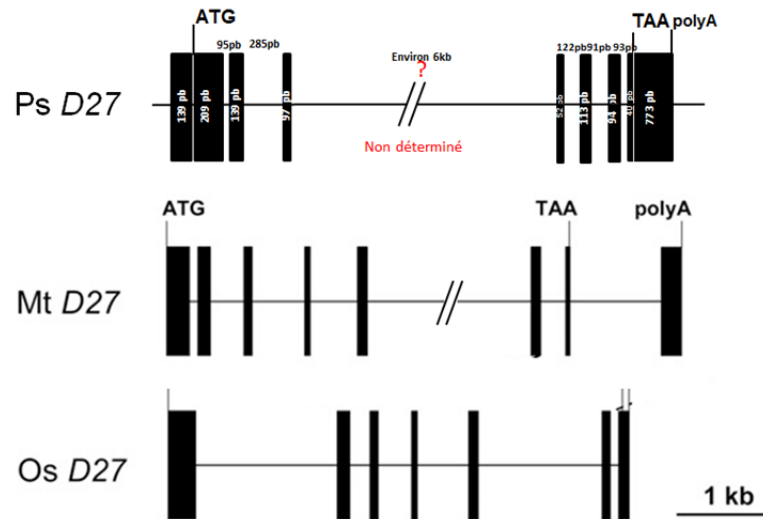


Figure IV. 2. Diagramme du gène *PsD27*

Les rectangles noirs représentent les exons et les traits les introns, les chiffres indiquent la taille des introns et des exons

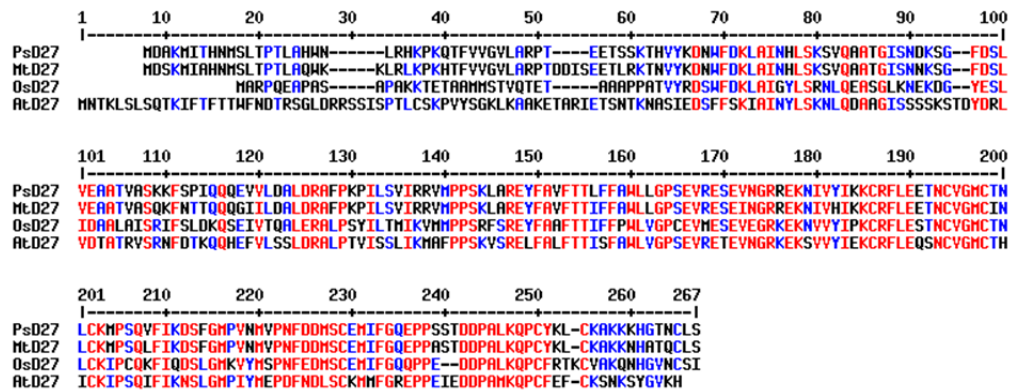


Figure IV. 3. Alignement des séquences protéiques des protéines D27 chez *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* et *Arabidopsis thaliana*.

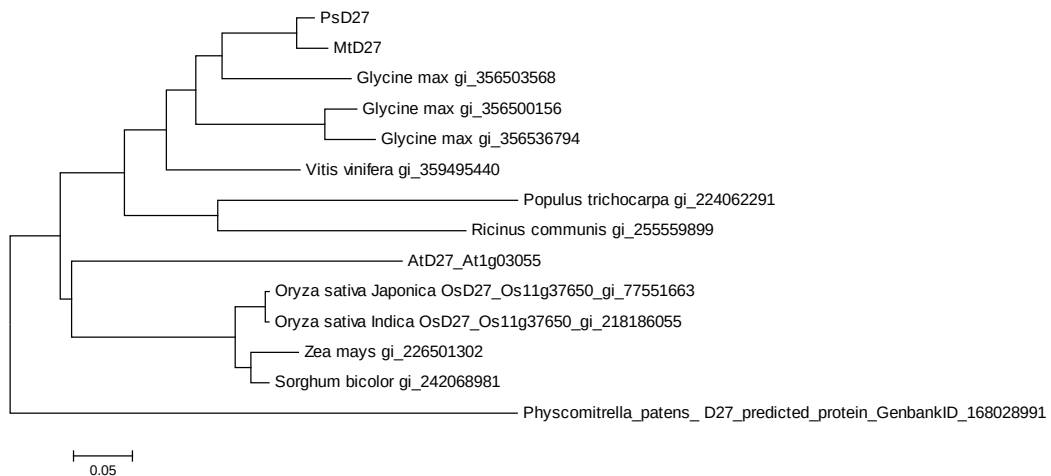


Figure IV. 4. Arbre phylogénétique des protéines D27

Arbre construit à partir des homologues de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, riz (*Oryza sativa*), maïs (*Zea Mays*), sorgho (*Sorghum bicolor*) et ricin (*Ricinus comunis*) par la méthode Neighbour joining

III. D27 une isomérase dont l'expression est finement régulée.

Le gène *D27* a été identifié pour la première fois chez le riz et code pour une protéine dont la séquence prédit un adressage aux plastides comme CCD7 et CCD8, ce qui suggérait une étape de conversion proche (Lin et al., 2009). Cette protéine est indispensable à la synthèse des strigolactones et a pour particularité de lier un atome de fer comme cofacteur (Lin et al., 2009; Alder et al., 2012).

A. Résultats

1. Obtention de la séquence *PsD27*

Afin d'obtenir la séquence d'un homologue putatif de *D27* chez le pois, nous avons dessiné des primers dégénérés à partir d'un alignement des séquences protéiques de *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* et *Arabidopsis thaliana* déduites du blast NCBI d'*OsD27* (Figure IV. 3). A partir de l'ADN génomique de pois, nous avons amplifié un fragment de 600 pb. Le reste de la séquence du gène a été obtenu par recherche d'homologie de ce fragment dans la base de données de séquences EST de pois effectuée par le laboratoire de Judith Burstin de Dijon. Nous avons ainsi obtenu la séquence complète de l'ARNm du gène *PsD27*, qui s'alignait parfaitement avec la séquence obtenue grâce aux primers dégénérés. La séquence codante de l'ARNm comprend 744 nucléotides et la prédiction de la traduction donne une protéine de 247 acides aminés.

A partir de la séquence codante du gène *PsD27*, nous avons défini des amorces spécifiques afin de déterminer la localisation précise des introns de ce gène. Ainsi le gène possède 5 introns séquencés et un 6^{ème} putatif (Figure IV. 2) (Séquence annexe 1). En effet, aucune amplification n'a été observée sur l'ADN génomique avec les primers, *PsD27_p1F* et *PsD27_p2R*, encadrant l'intron prédit numéro 3 alors qu'une amplification est observée avec l'ADNc, ce qui suggère la présence d'un intron de très grande taille dans cette zone à l'image de l'intron N°5 de *D27* chez *Medicago* qui présente une taille de plus de 6 kpb. Ainsi la taille des introns du gène ne semble pas être conservée entre le pois, *Medicago* et le riz mais le nombre et la taille des exons, le sont.

2. Phylogénie de *D27*

Une étude phylogénétique des homologues de *PsD27* obtenus à partir d'un blast de la séquence protéique nous a permis de confirmer que nous avons obtenu le bon homologue du gène *D27*. En effet le gène *PsD27* est très proche de son homologue chez

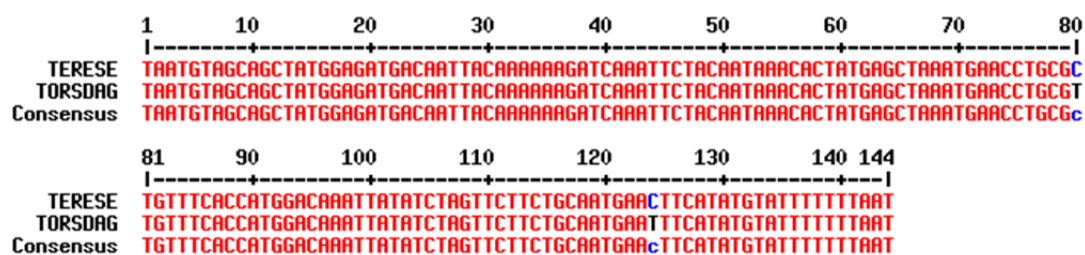


Figure IV. 5. Polymorphisme de la région 3'UTR entre le cultivar Térèse et le cultivar Torsdag.

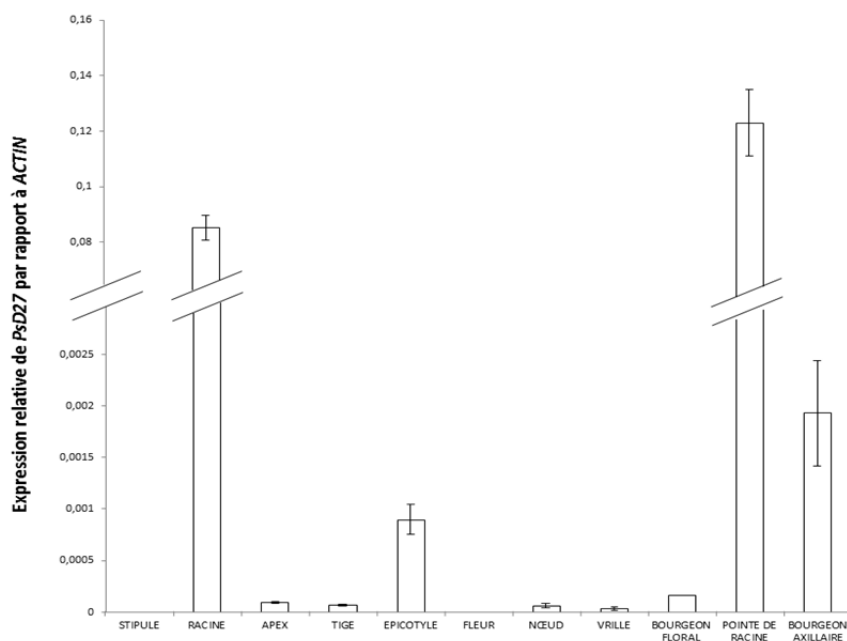


Figure IV. 6. Quantification de l'accumulation des transcrits de *PsD27* dans différents organes de plantes de pois par Q-PCR

Plantule (cv. Térèse) âgées de 30 jours. Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *ACTIN*.
Moyenne des résultats de deux pools de plantes (Barre d'erreur = Erreur standard, n=2)

Medicago qui est la légumineuse séquencée phylogénétiquement la plus proche du pois ; à proximité on retrouve plusieurs séquences de soja et enfin on observe un clade regroupant tous les homologues *D27* des Monocotylédones. A noter la position surprenante d'*AtD27* qui n'apparaît pas dans le clade des Dicotylédones (Figure IV. 4).

Cartographie de *PsD27*

Afin de réaliser la cartographie du gène *PsD27* nous avons cherché un marqueur polymorphe entre la séquence du gène chez le cultivar Tèrese et le cultivar Torsdag. Nous avons identifié deux SNP dans la région 3'UTR du gène : C77'T et C121'T 5 (Les nombres indiquent la position du nucléotide en prenant comme référence 1' pour le nucléotide situé après le codon stop) (Figure IV. 5). A partir de ce polymorphisme nous avons défini un marqueur CAPS où le produit d'amplification de 756 pb obtenu à partir des primers *PsD27_p2F_36* et *PsD27_p2R_700* est clivé en 2 fragments de 491 et 266 pb chez le génotype Tèrese par l'enzyme *Hin6I* (*HhaI*) au niveau du 1^{er} polymorphisme et non chez le génotype Torsdag. Un individu hétérozygote présentera un profil de digestion comportant donc 3 fragments (756, 491 et 266 pb). La cartographie du gène *PsD27* sur la RIL1 Tèrese x Torsdag est en cours.

3. Etude de l'expression de *PsD27*

Tout comme pour les gènes *CCD7/RMS5* et *CCD8/RMS1*, l'expression du gène codant pour la protéine D27 est soumis à une régulation très fine chez le riz et *Arabidopsis* (Liu et al., 2011; Waters et al., 2012). Afin d'analyser ces régulations chez le pois, nous avons réalisé diverses quantifications de l'accumulation des transcrits par Q-PCR.

- Localisation de l'expression de *PsD27*

Les transcrits du gène *PsD27* sont très majoritairement retrouvés dans les parties racinaires de la plante. Les transcrits sont 50 fois plus abondants dans les racines que dans le bourgeon axillaire, l'organe de la partie aérienne où il est le plus présent (Figure IV. 6). Ce profil d'expression est assez similaire à celui de *RMS1* et *RMS5* puisque les transcrits de ces gènes sont présents en quantité importante dans les racines et dans les épicotyles (Foo et al., 2005; Johnson et al., 2006). Par contre, la présence presque exclusive de *PsD27* dans les racines comme montré chez *Medicago* (Liu et al., 2011) concorde très bien avec la fonction de la protéine, c'est-à-dire réaliser les premières étapes de la synthèse des strigolactones qui seront ensuite exsudées dans la rhizosphère. Ce profil d'expression qui semble être caractéristique des légumineuses diffère grandement de celui du riz où le gène est

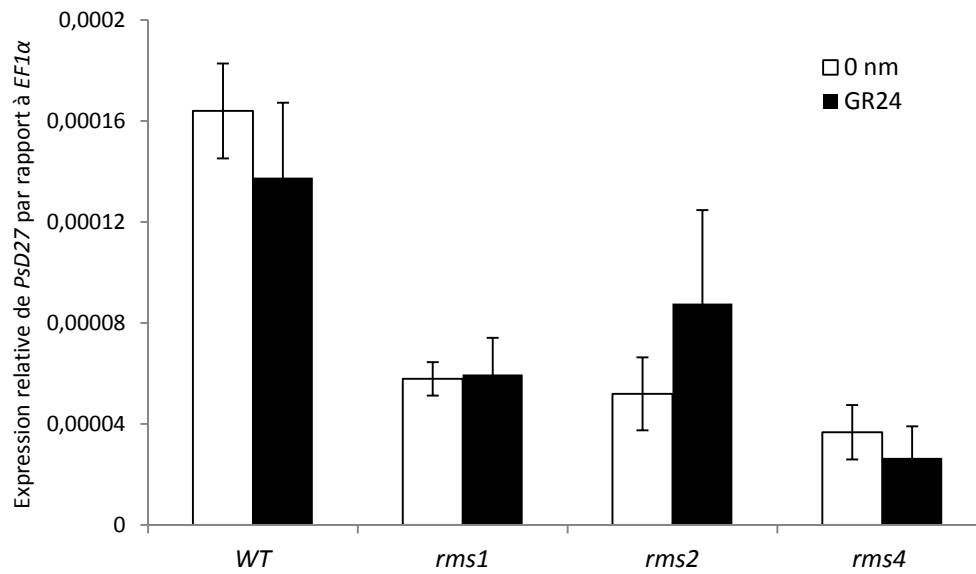


Figure IV. 7. Quantification de l'accumulation des transcrits de *PsD27* dans les épicotyles des mutants *rms*

Plantes âgées de 15 jours, 24h après traitement avec et sans GR24 à 1 μ M en hydroponique. Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *EF1 α* . Moyenne des résultats de trois pools de plantes (Barre d'erreur= Erreur standard, n=3)

fortement exprimé dans les parties aériennes et notamment le bourgeon, les épis et la base de la tige (Lin et al., 2009), mais aussi de celui d'*Arabidopsis* où les transcrits du gène s'accumulent peu dans les racines (Waters et al., 2012)

- Régulation de l'expression de *PsD27* dans les mutants *rms* et après application de GR24

Que ce soit chez le pois, *Arabidopsis* ou le riz, l'expression des gènes de biosynthèse *CCD7* et *CCD8* est soumise à un rétrocontrôle, et chez les mutants *ccd7* et *ccd8*, l'expression des gènes de biosynthèse est très fortement augmentée. C'est également le cas de *AtD27* chez *Arabidopsis* (Waters et al., 2012). Nous avons voulu vérifier si le rétrocontrôle exercé sur l'expression du gène *D27* était également présent chez le pois. Ne disposant pas de tissus racinaires des différents mutants *rms* nous avons sélectionné le tissu caulinaire dans lequel *PsD27* était relativement bien exprimé. Lorsque l'on quantifie l'accumulation des transcrits du gène *PsD27* dans l'épicotyle de pois des mutants *rms* en comparaison avec le WT, on remarque que le niveau des transcrits du gène n'est pas augmenté chez les mutants *rms*, il est même légèrement diminué (Figure IV. 7). Ces résultats suggèrent donc l'absence de rétrocontrôle pour le gène *D27* chez le pois, ce qui le distinguerait de *RMS1* et *RMS5*. Ces résultats sont confortés par le fait que l'application de GR24 ne modifie pas l'expression du gène (Figure). Il serait intéressant de faire les mêmes quantifications dans les tissus racinaires.

B. Discussion

L'identification du gène *PsD27* semble montrer que tout comme chez *Medicago truncatula*, un seul homologue de ce gène est présent chez le pois. L'expression de *D27* chez le riz est localisée principalement dans les bourgeons axillaires, la base de la plante, les chaumes et les épis (Lin et al., 2009), et chez *Arabidopsis* essentiellement dans l'appareil végétatif (Waters et al., 2012). Cependant chez le pois, *D27* est principalement exprimé dans les parties racinaires comme chez *Medicago* (Liu et al., 2011). Ce profil particulier est peut être dû à une spécificité des légumineuses et notamment à la mise en place des nodosités. L'expression de *D27* est peut-être plus forte dans les racines de ces plantes du fait de l'implication des strigolactones dans le développement des nodosités (Foo and Davies, 2011). De plus l'étude réalisée par Liu et al., 2011 montre que chez *Medicago truncatula*, l'expression de *MtD27* est sous le contrôle des facteurs de transcription de type GRAS, NODULATION SIGNALING PATHWAY1 (NSP1) et NSP2, impliqués dans la formation des nodules chez les Fabacées. Chez *Medicago*, le mutant *nsp1* montre une absence de

production de SL et le mutant *nsp2* une déficience en di-dehydro-orobanchol corrélée à une diminution de l'expression du gène *MtD27* (Figure). Alors que l'expression des gènes *MtCCD7* et *MtCCD8* n'est pas affectée dans ces mutants, l'expression du gène *MtMAX1* est diminuée chez les simples et double mutant *nsp1 nsp2* (Liu et al., 2011). Ainsi les premières étapes de la biosynthèse des SL seraient soumises à des contrôles différents. La régulation directe par les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 n'est pas claire. Les mutants *nsp1* et *nsp2* de *Medicago*, ainsi que le double mutant *nsp1 nsp2*, ne montrent pas de phénotype hyperbranché (ceci est peut-être dû au fait que cette plante ne montre pas une forte dominance apicale). Le mutant de pois *sym7* (*SYM7* est l'homologue du gène *MtNSP2*) (Kalo et al., 2005) ne présente pas non plus de phénotype hyperramifié (nos données, non montré). La poursuite des investigations nécessite donc l'obtention du mutant *Psns1*, afin de réaliser des observations phénotypiques mais aussi d'obtenir le double mutant *Psns1 sym7*. Des quantifications de strigolactones et l'analyse des transcrits des gènes de biosynthèse permettrait de mieux comprendre les relations entre par exemple nutrition azotée et l'architecture de la plante. Dans le cadre de ces études l'obtention du mutant *PsD27* par TILLING semble indispensable. De plus, il serait intéressant d'étudier la nodulation de ces différents mutants, couplé à des applications de strigolactones afin de comprendre l'implication directe ou indirecte des strigolactones dans l'établissement des nodosités.

On remarque également que le gène *AtD27* est soumis à un rétrocontrôle mais 2 fois moins fort que celui observé pour les gènes *CCD7/MAX3* et *CCD8/MAX4 REF*. L'étude de l'expression du gène *PsD27* chez le pois paraît indiquer que le rétrocontrôle de *D27* n'existe pas chez cette espèce et que la régulation passerait par une autre voie, qui impliquerait notamment les facteurs de transcription de type GRAS, NSP1 et NSP2 (Liu et al., 2011).

Chez *Arabidopsis*, le gène *AtD27* présente deux variants d'épissage, une forme longue identique au pois ou *Medicago* et une forme courte où les 3 premiers exons ne sont pas traduits. Ce phénomène d'épissage alternatif est observé pour d'autres gènes en lien avec la voie des strigolactones, comme *MAX1* ou *RMS3like* (voir paragraphe II de ce chapitre et le chapitre III). Il serait intéressant de voir si on retrouve ces caractéristiques chez le pois et de poursuivre les investigations afin de comprendre la signification biologique et le rôle de ces 2 formes de transcrits.

IV. *MAX1*, une duplication du gène chez le pois qui complexifie la détermination du rôle de la protéine dans la biosynthèse des strigolactones.

max1 est l'un des premiers mutants hyperramifiés identifié chez *Arabidopsis thaliana* (Stirnberg et al., 2002). Les auteurs avaient montré que le gène codait pour une protéine qui participait à la synthèse d'un signal inhibiteur de la ramification, maintenant identifié comme les strigolactones. Des expériences de greffe ont permis de montrer que l'enzyme MAX1 agissait en aval de CCD7 et CCD8 (Turnbull et al., 2002) et l'absence de signal d'adressage au chloroplaste dans la séquence protéique laisse à penser que cette enzyme produit un signal mobile précurseur des strigolactones qui migre dans la plante (Booker et al., 2005). Par la suite, le clonage du gène a permis d'identifier qu'il s'agissait d'une mutation qui affecte un cytochrome P450 et porte le nom de CYP450A711 (Booker et al., 2005). Ces protéines sont très souvent impliquées dans les voies de biosynthèse des hormones animales et végétales mais la nature des réactions qu'elles réalisent est diverse donc difficile à prévoir (Bak et al., 2011).

L'application de GR24 a montré que le phénotype hyperbranché de ce mutant pouvait être aboli, ce qui prouve que MAX1 est indispensable à la synthèse de strigolactones (Crawford et al., 2010). De plus, l'induction de la germination des graines de plantes parasites est significativement réduite en réponse aux exsudats racinaires du mutant *max1* par rapport au type sauvage, et la quantité de strigolactones est réduite dans ce mutant (Kohlen et al., 2010). Il a également été montré que MAX1 était un régulateur positif de la biosynthèse des flavonoïdes, en régulant l'expression de 11 gènes de biosynthèse de ces métabolites (Lazar et al. 2006).

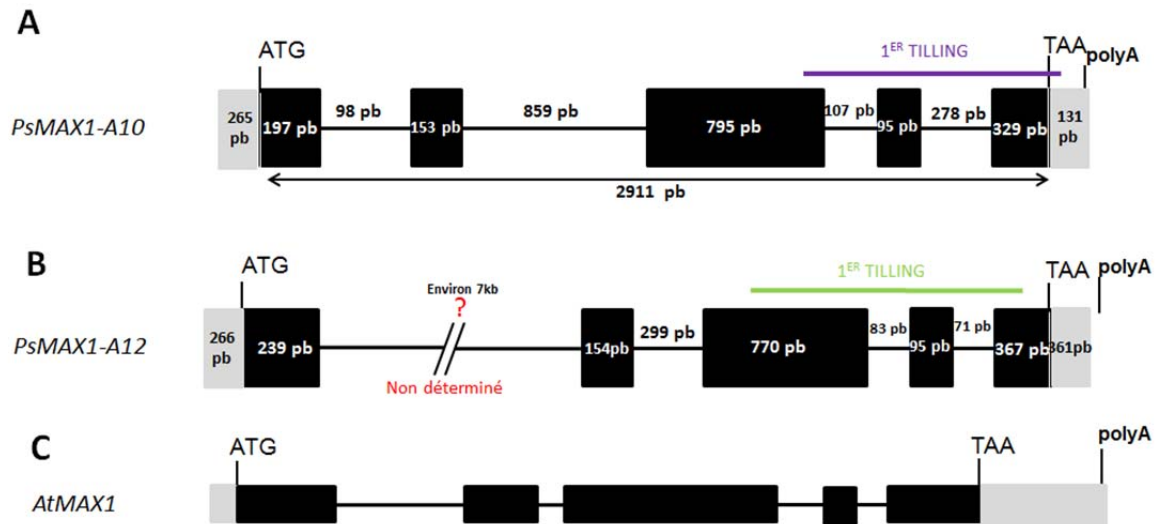


Figure IV. 8. Diagramme des gènes *MAX1*.

Les rectangles noirs représentent les exons et les traits les introns, les chiffres indiquent la taille des introns et des exons, les rectangles gris représentent les régions UTR. La position du TILLING est indiquée sur les gènes *PsMAX1-A10* et *PsMAX1-A12*.

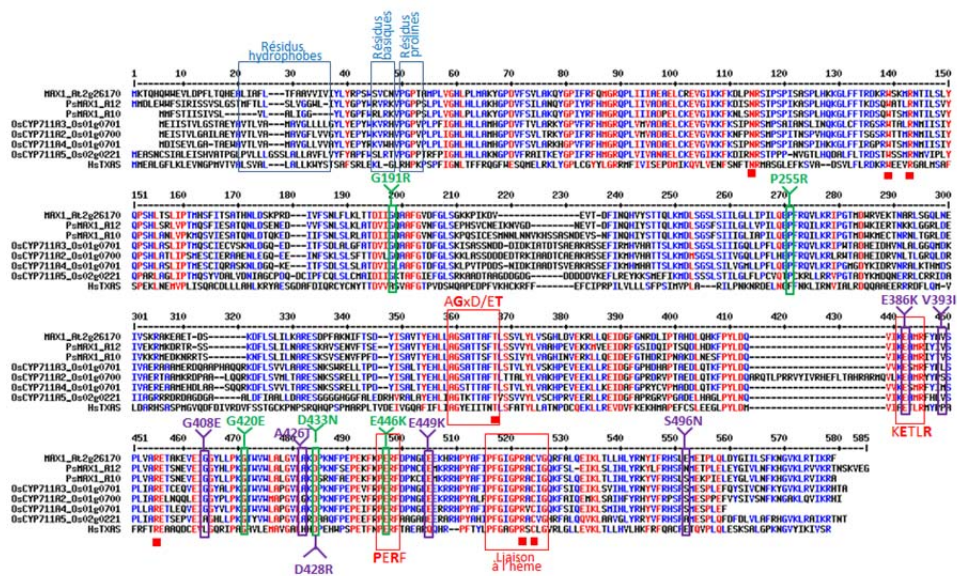
A. Résultats

1. Obtention de la séquence des gènes *PsMAX1-A10* et *PsMAX1-A12*

La recherche de l'homologue de *MAX1* chez le pois s'est déroulée en 2 temps. Tout d'abord une approche par amorces dégénérées et marche chromosomique a permis à l'équipe australienne de Christine Beveridge d'obtenir la séquence complète d'un homologue appelé *PsMAX1-A12* (Séquence annexe 4). Puis un TILLING sur ce gène a été réalisé mais nous n'avons observé aucun phénotype hyperbranché. Les travaux ont donc été abandonnés. Par la suite une étude bibliographique nous a montré que chez *Medicago truncatula*, il existe 2 homologues des gènes *AtMAX1* : *MtCYP711A10* et *MtCYP711A12* (Li et al., 2007). Ce résultat nous a suggéré que deux copies du gène existaient également chez le pois, ce qui pouvait expliquer l'absence de phénotype des mutants de *PsMAX1-A12*. Nous avons décidé de reprendre les travaux sur ce gène.

L'analyse de la base de séquence EST de pois de l'INRA de Dijon a permis de mettre en évidence l'existence de 2 homologues proches de la séquence *AtMAX1* : l'une d'elle correspondait à la séquence déjà obtenue par nos collègues australiens et proche de la séquence *MtCYP711A12*, et nous avons donc appelé le gène *PsMAX1-A12* et l'autre correspondait à un autre homologue proche de *MtCYP711A10*, et nous avons appelé le gène *PsMAX1-A10* (Séquence annexe 3).

Les 2 gènes *PsMAX1* possèdent 4 introns comme le gène *MAX1* d'*Arabidopsis thaliana* et la taille des exons est sensiblement conservée entre les 2 gènes de pois et entre les 2 espèces (Figure IV. 8). Par contre la taille des introns ne l'est pas, notamment pour le gène *PsMAX-A12*, on suspecte que l'intron numéro 2 soit de taille très importante. En effet l'amplification avec des amorces définies sur les exons 1 et 2 donne un produit de PCR sur de l'ADNc mais ne donne aucune amplification à partir de l'ADN génomique, même avec un temps d'élongation de plus de 3 min (permettant une amplification de 3 kb). De plus l'homologue *MtCYP711A12* présente un intron de 7 kb, ce qui renforce cette idée. Il reste donc à obtenir la séquence nucléotidique de cet intron (Figure IV. 8).

Figure IV. 9. Alignement des protéines MAX1 de pois, de riz et d'*Arabidopsis*.

Les positions des mutations identifiées par TILLING sont indiquées en vert pour la protéine PsMAX1-A12 et en violet pour la protéine PsMAX1-A10 avec le changement d'acide aminé qu'elles provoquent. Les carrés rouges indiquent les acides aminés indispensables à l'activité Thromboxane A₂ synthase et conservés chez les protéines MAX1. Les encadrés bleus et rouges correspondent aux zones conservées chez les cytochromes P450.

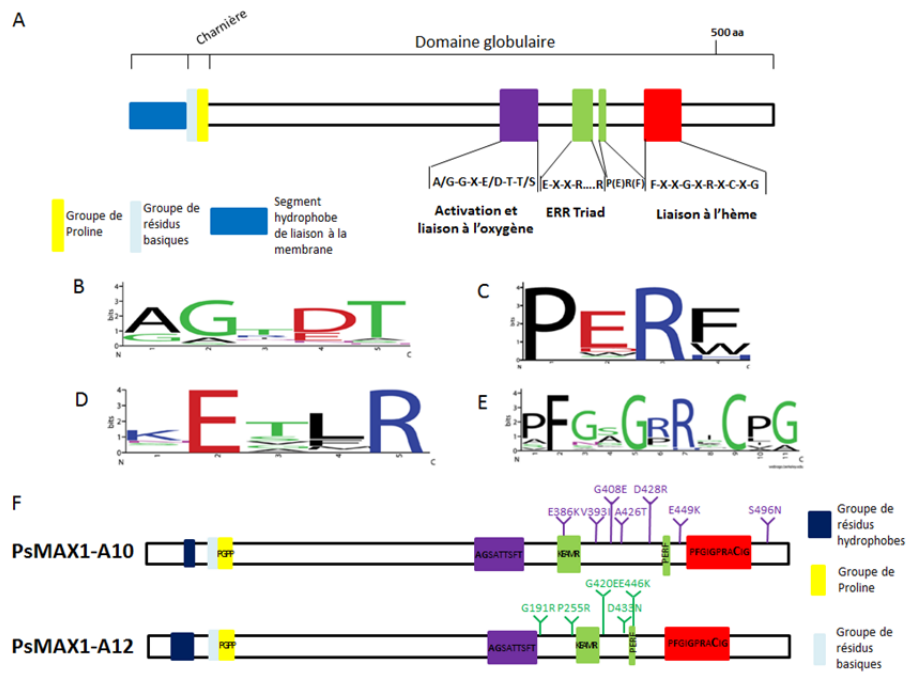


Figure IV. 10. Structures et séquences conservées chez les protéines CYP450.

A. Cartographie des motifs spécifiques des protéines P450 : l'arginine et la glutamine de l'hélice K de la séquence consensus « KETLR » ; l'arginine de la séquence consensus « PERF » de la triade E-R-R, le domaine de liaison à l'hème, le segment transmembranaire hydrophobe et la région charnière composé d'un groupe de résidus proline et d'un groupe de résidus basiques.

B-E. Séquence protéique consensus des différents domaines conservés chez les CYP450. La taille des lettres est proportionnelle au degré de conservation des acides aminés. **(B)** Domaine d'activation et de liaison à l'oxygène (hélice I) **(C)** Domaine PERF/W. **(D)** Domaine KETRL (Hélice K). **(E)** Domaine de liaison à l'hème : les résidus F, G et C sont conservés dans tous les CYP450 de plantes. Le résidu C est universellement conservé dans tous les CYP450 à travers tous les règnes.

F. Cartographie des motifs spécifiques sur les protéines PsMAX1-A10 et PsMAX1-A12. (Adapté de Bak et al., 2011)

La traduction *in silico* de la séquence codante des gènes *PsMAX1A10* et *PsMAX1A12* prédit respectivement des protéines de 523 et 534 acides aminés (Figure 9 et 10)(Séquence annexe 5) . Comme *AtMAX1*, *PsMAX1-A10* et *PsMAX1-A12* appartiennent au clade CYP711A des cytochromes, classés parmi les cytochromes de type Non-A et constituent les seuls membres de cette famille. On retrouve dans la séquence protéique de pois de très fortes similarités avec la Thromboxane A2 synthase, un cytochrome P450 de mammifère qui est impliqué dans le métabolisme des prostaglandines (Booker et al., 2005) Wang & Kulmacz, 2002). 7 des 8 acides aminés impliqués dans la liaison au substrat ou à l'hème, et essentiels à l'activité thromboxane synthase sont conservés dans les 2 protéines de pois (Figure IV. 9). On retrouve également, chez les 2 protéines, l'hélice I (AGxD/ET) impliquée dans la liaison à l'oxygène, la triade E-R-R constituée des acides aminés glutamates et arginine de la séquence consensus de l'hélice K (KETLR), la séquence consensus "PERF" constituée d'une arginine présente chez tous les cytochromes, la séquence entourant la cystéine responsable de la liaison à l'hème et la charnière riche en proline (Figure IV. 10). Dans la partie N-terminale de ces protéines on retrouve une région hydrophobe qui pourrait correspondre à un domaine transmembranaire (Bak et al., 2011).

Les cytochromes réalisant une grande diversité de réactions enzymatiques, il est très difficile de prédire la réaction réalisée par une protéine P450 par la simple analyse de la séquence protéique. Il est donc nécessaire d'entreprendre une approche « mutant », liée à des analyses chimiques et/ou une approche biochimique afin de déterminer la fonction de cette enzyme.

2. Phylogénie de MAX1

Afin de valider que les homologues de *MAX1* obtenus chez le pois appartiennent bien au clade CYP711A, nous avons réalisé une étude phylogénétique (Figure IV. 11). Nous pouvons voir que *PsMAX1-A10* et *PsMAX1-A12* sont bien les homologues respectifs des gènes *MtCYP711A10* et *MtCYP711A12*, qui sont eux-mêmes les homologues du gène *MAX1* d'*Arabidopsis*. Chez le soja, légumineuse polyploïde, 4 homologues sont présents. On remarque donc une duplication de ce gène chez les légumineuses alors que le gène semble être présent en une seule copie chez les autres Dicotylédones (pétunia, ricin, vigne, peuplier etc....).

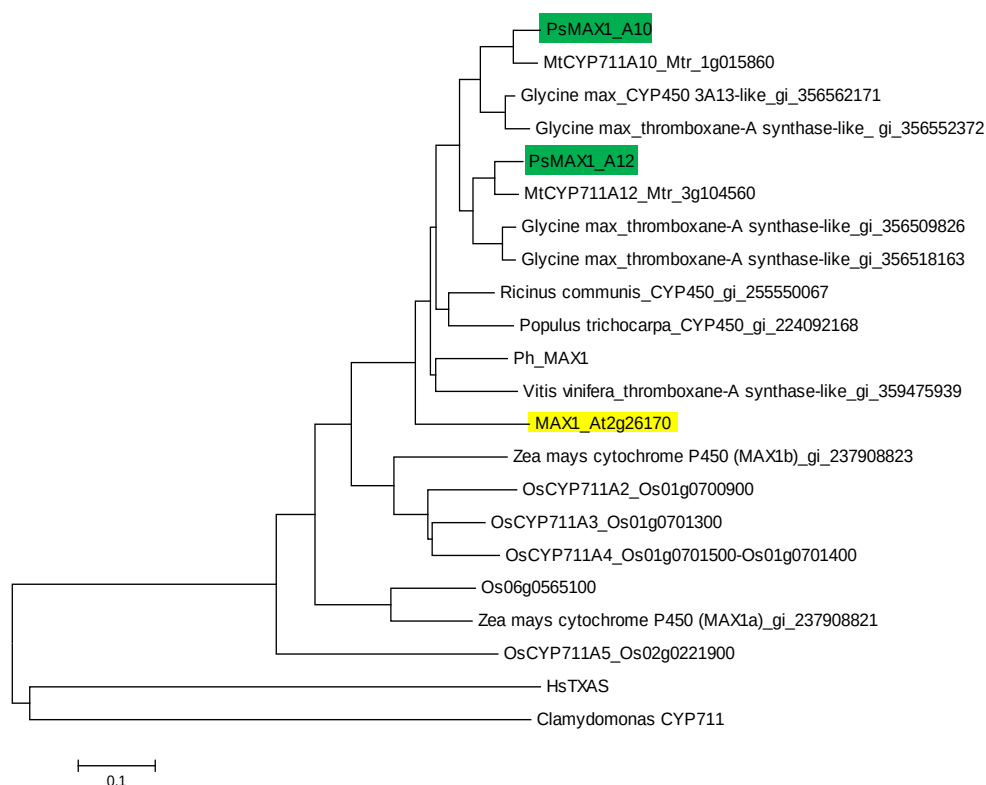


Figure IV. 11. Arbre phylogénétique des protéines MAX1

Arbre construit à partir des homologues de *Medicago truncatula*, Soja, *Arabidopsis thaliana*, Riz, Maïs, Vigne, Pétunia, Peuplier et Ricin obtenu par la méthode Neighbour joining

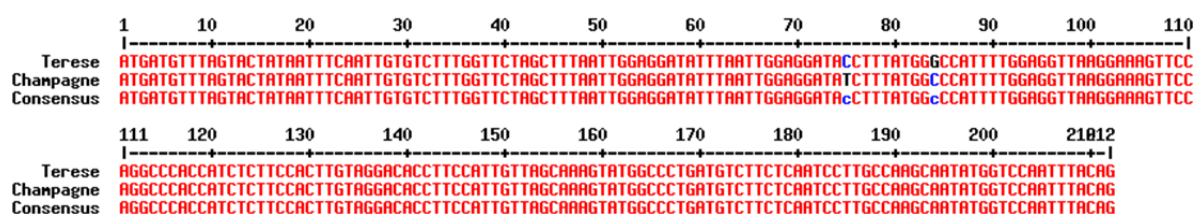


Figure IV. 12. Séquence nucléotidique de l'EXON 1 du gène *PsMAX1-A10* montrant 2 nucléotides polymorphes entre le cultivar Tèrese et le cultivar Champagne.

Par contre chez les Monocotylédones plusieurs événements de duplications sont intervenus ce qui explique la présence de 5 homologues de *MAX1* chez le riz ou encore chez *Brachypodium* comme l'a révélé l'étude de leur génome (Nelson and Werck-Reichhart, 2011).

A noter que ce gène est présent également chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, suggérant une existence du gène dans l'ensemble du règne des plantes (Nelson et al., 2004). Cependant, il est très surprenant de ne trouver aucun homologue de ce gène chez la mousse *Physcomitrella patens* dont on sait qu'elle produit des strigolactones (Proust et al., 2011), alors que ce gène semble indispensable à la biosynthèse de ces molécules. On peut donc se demander quelles enzymes interviennent dans la biosynthèse des strigolactones chez la mousse, ou si *MAX1* intervient vraiment dans la formation des strigolactones. Une autre hypothèse serait que *MAX1* intervient dans la synthèse de strigolactones particulières à partir de précurseurs tel que le 5-deoxystrigol ou de didehydroorobanchol à partir d'orobanchol (Liu et al., 2011).

3. Cartographie des gènes *PsMAX1*

Afin de réaliser la cartographie des 2 gènes *PsMAX1*, nous avons réalisé le séquençage de la totalité des 2 locus dans les cultivars Térésè, Champagne et Torsdag avec l'ensemble des amorces citées en annexe. Pour le gène *PsMAX1-A12* aucun polymorphisme n'a été trouvé et la cartographie n'a pu donc être réalisée mais la séquence du premier intron de ce gène n'est pas connue dans sa totalité, et il est donc possible qu'il y ait du polymorphisme dans cette zone dont on estime la taille à 7 kb.

Par contre pour le gène *PsMAX1-A10* nous avons observé 2 SNP entre les cultivars Térésè et Champagne au niveau de l'exon 1 du gène, et notamment le polymorphisme C75T qui nous a servi à définir un marqueur CAPS (Figure IV. 12). Pour cela nous avons utilisé les amorces *MAX1_A10_F8* et *MAX1_A10_R596* qui amplifient un fragment de 642 pb clivé chez Champagne en 2 fragments de 356 et 286 pb par l'enzyme *EcoRV* (*Eco32I* Fermentas) au niveau du site de restriction GAT^AATC absent chez le cultivar Térésè et qui n'est donc pas clivé chez ce génotype. La cartographie du gène *PsMAX1-A10* a été réalisée sur la population de cartographie RIL2 (Térésè X Champagne) par l'équipe d'Isabelle Lejeune à l'INRA de Mons. Le gène *PsMAX1-A10* se situe en haut du groupe de Liaison II entre les marqueurs AA473 (21,2 cM) et TNI01P10 (18,8 cM) (Annexe 9).

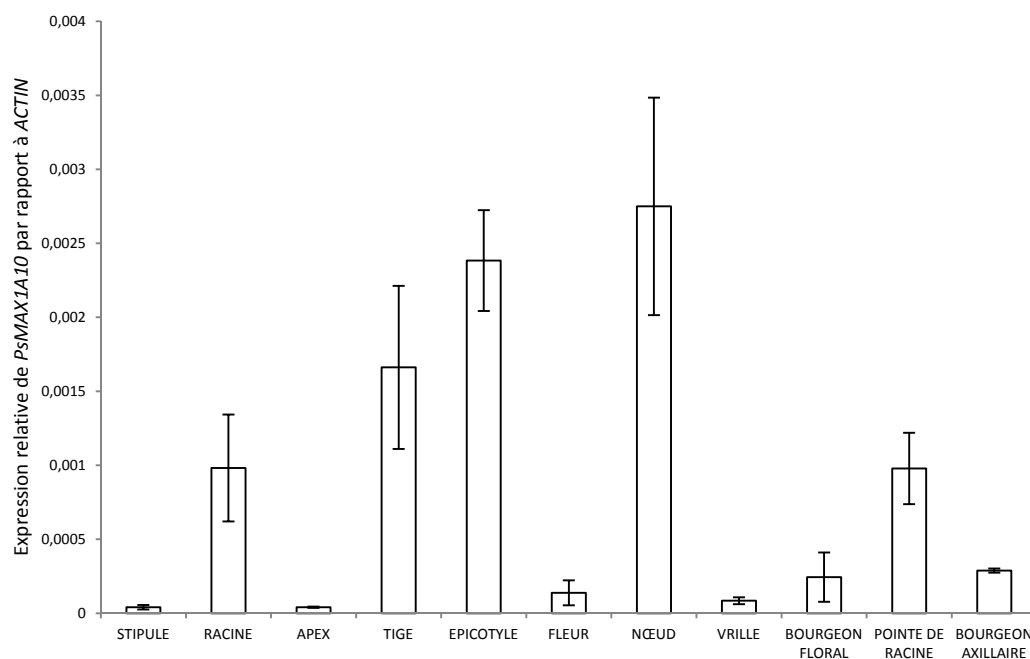


Figure IV. 13. Quantification de l'accumulation des transcrits de *PsMAX1-A10* dans différents organes de plante de pois par Q-PCR.

Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *ACTIN*. Moyenne des résultats de deux pools de plantes (Barre d'erreur=Erreur standard, n=2).

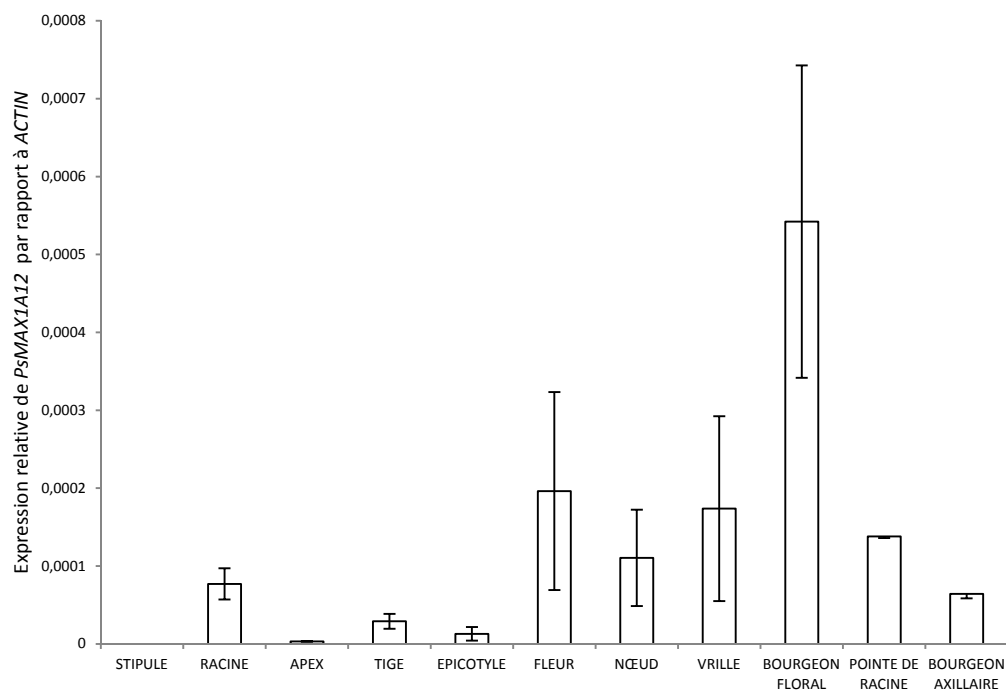


Figure IV. 14. Quantification de l'accumulation des transcrits de *PsMAX1-A12* dans différents organes de plante de pois par QPCR.

Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *ACTIN*. Moyenne des résultats de deux pools de plantes (Barre d'erreur=Erreur standard, n=2).

Le gène *PsMAX1-A10* ne co-localise pas avec un mutant de ramification non encore cloné (*rms2* ou *rms6*). Le gène *PsMAX1-A12* n'a pu être cartographié, donc on ne sait pas s'il se situe sur le même groupe de liaison que le gène *PsMAX1-A10*, ce qui compliquerait l'obtention d'un double mutant pour ces deux gènes. Mais étant donné que la synténie entre *Medicago* et le pois est bien conservée et que les deux homologues de *Medicago* ne se situent pas sur le même groupe de liaison, on peut penser qu'il en est de même chez le pois.

4. Etude de l'expression

L'étude de la localisation de l'expression du gène *MAX1* d'*Arabidopsis* à l'aide d'une construction avec le gène rapporteur GUS, a permis de montrer que l'expression de ce gène était associée aux tissus vasculaires de l'ensemble de la plante (Booker et al., 2005). Ce gène de biosynthèse de strigolactone présente un profil d'expression totalement différent de celui des gènes *MAX3* et *MAX4*, qui montrent une distribution plutôt racinaire (Sorefan et al., 2003). Cette distribution n'est pas surprenante étant donné que l'enzyme MAX1 agirait en aval de MAX3 et MAX4, et d'après les spéculations, cliverait un substrat mobile produit dans les racines par les enzymes D27, MAX3 et MAX4. Ce substrat se déplacerait uniquement de façon acropète (Turnbull et al., 2002) et serait véhiculé par le xylème. Il n'est donc pas étonnant de retrouver le gène qui code cette protéine essentiellement exprimé dans ces tissus. Afin de savoir si pour les homologues de pois, on retrouve les mêmes caractéristiques, nous avons réalisé une localisation de l'expression de ces 2 gènes dans différents tissus de la plante. Les résultats montrent que les transcrits de *PsMAX1-A10* sont surtout accumulés dans l'épicotyle et dans la tige, ce qui conforte l'idée d'une action de MAX1 sur un substrat mobile, probablement véhiculé dans la tige (Figure IV. 13). Pour le gène *PsMAX1-A12*, le profil d'expression est plus surprenant étant donné que le gène est le plus fortement exprimé dans les tissus reproducteurs : fleur et bouton floral. Les transcrits restent détectables dans les tissus racinaires mais le gène reste 10 fois moins exprimé que son homologue pour le même tissu (Figure IV. 14). Très souvent une duplication de gènes provoque une différence dans les profils d'expression de gènes, l'un des gènes montrant une expression très inférieure à l'autre ou des localisations d'expression différentes ce qui peut conduire à une subfonctionalisation des gènes (Charon et al., 2012). De plus la mutation dans l'un des gènes peut être compensée par une augmentation de l'expression de l'autre à titre de compensation.

Numéro de référence dans la base de données de TILLING de la famille de plante	Position de la mutation sur la séquence nucléique ¹	Position de la mutation sur la séquence protéique	Type de mutation	Observation
1644	G631A	G191R	Missense	
2834*	G632A	G191E	Missense	
1958	C671T	P204L	Missense	
2053*	C738T	H226H	Silent	
799	C823T	P255S	Missense	
2101*	G853A	G265R	Missense	
1414	C960T	F300F	Silent	
1043	G1120A	E354K	Missense	
1029	G1128A	E356E	Silent	
1800	G1138A	E356E	Silent	
1139	C1195T	H379Y	Missense	Plus de graine
1032*	G1319A	G420E	Missense	
1139	G1326A	W422*	STOP	Plus de graine
2286	G1353A	D433N	Missense	
1995*	G1396A	E446K	Missense	
3118*	C1409T	P450L	Missense	
947	C1479T	C473C	Silent	

Tableau IV 4. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène *PsMAX1-A12*

* Individu homozygote

¹ La position de la mutation sur la séquence nucléique est donnée par rapport au premier nucléotide de l'exon 2 étant donné que la taille de l'intron 1 n'est pas connue

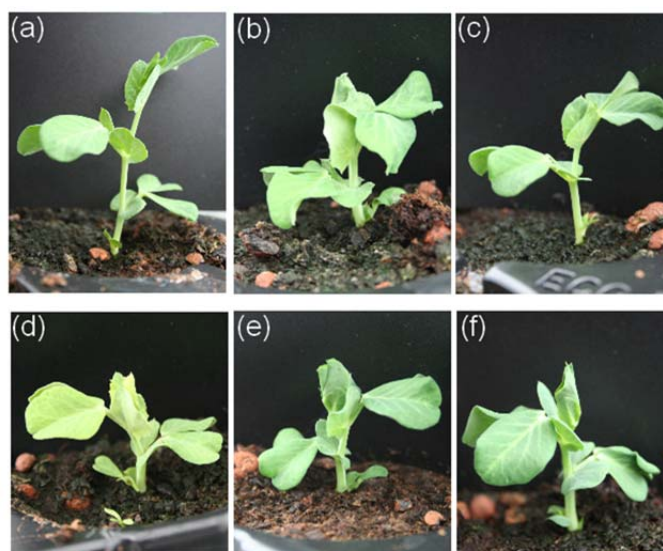


Figure IV. 15. Mutants de TILLING *Psmax1-A12*

(a): Caméor WT (b) : *Psmax1-A12* 1032 (c) : *Psmax1-A12* 799
(d) : *Psmax1-A12* 1644 (e) : *Psmax1-A12* 1995 (f) : *Psmax1-A12* 2286

5. Obtention de mutants par TILLING et caractérisation des mutants

Un TILLING avait été réalisé sur le gène *PsMAX1-A12* par le laboratoire avant mon arrivée mais aucun phénotype hyperbranché n'avait été observé. Etant donné que nous avons découvert que les strigolactones régulaient également la taille des entrenœuds (voir chapitre III), nous avons repris les plantes mutantes identifiées par TILLING afin de se focaliser sur ce phénotype. Parmi les familles identifiées à notre disposition, c'est-à-dire les familles 1644, 799, 1032, 2286 et 1995 caractérisées par différents changements d'acide aminé (Tableau IV 4), la famille 1995 semble particulièrement intéressante puisque le changement d'acide aminé se situe dans le domaine "PERF". Les autres mutations n'affectent pas des domaines conservés de la protéine mais provoquent un changement dans la nature des acides aminés et notamment de leur charge (G en E ou R, D en N) (Figure IV. 9 et IV. 10). Nous avons défini des marqueurs CAPS et dCAPS afin de valider la présence des mutations. Les plantes mutantes confirmées par génotypage ne présentaient pas de phénotype hyperbranché mais montraient une légère diminution de leur taille (Figure IV. 15). Après un rétrocroisement des plantes, le phénotype a disparu. Les mutants de TILLING *Psmax1-A12* ne sont donc pas affectés dans l'architecture de la plante.

Disposant de la séquence du second homologue de MAX1, nous avons entrepris le TILLING du gène *PsMAX1-A10* dans les 800 derniers nucléotides de la séquence afin de déterminer si les mutants ont un phénotype et envisager le croisement avec les mutants de TILLING de *PsMAX1-A12* pour obtenir les doubles mutants. Ce TILLING a permis d'identifier 7 familles de plantes présentant des mutations qui affectent la séquence de la protéine (Tableau IV. 5). La famille 6547 semble très intéressante car elle présente un changement d'acide aminé dans le domaine "KETLR" et notamment le glutamate qui est un acide aminé très conservé de ce motif. Des marqueurs de génotypage ont été définis pour permettre le suivi de plantes et des analyses du phénotype sont en cours. Les plantes seront rétrocroisées par le type sauvage Caméor et croisées avec les mutants de TILLING *Psmax1-A12* afin d'obtenir les doubles mutants qui devraient avoir un phénotype ramifié et dont on analysera la composition hormonale.

Numéro de référence dans la base de données de TILLING de la famille de plante	Position de la mutation sur la séquence nucléique	Position de la mutation sur la séquence protéique	Type de mutation
6547*	G2217A	E386K	Missense
1641	G2219A	E386E	Silent
2622	G2238A	V393I	Missense
1190	G2284A	G408E	Missense
2503	G2615A	A426T	Missense
2824	G2621A	D428N	Missense
4110	C2623T	D428D	Silent
4601	G2684A	E449K	Missense
3006*	G3091A	S496N	Missense

Tableau IV. 5. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène *PsMAX1-A10*

* Individu homozygote

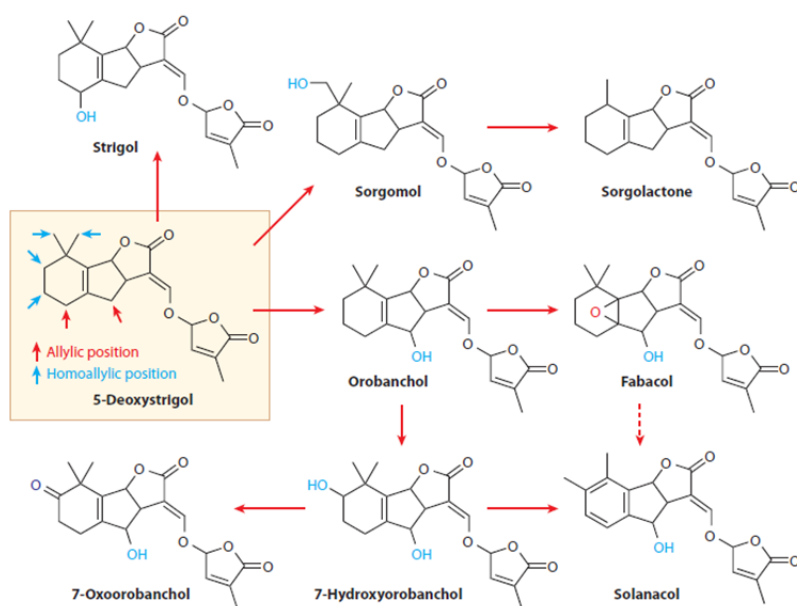


Figure IV. 16 . Le 5-déoxystrigol serait le précurseur de toutes les strigolactones naturelles (Xie and Yoneyama, 2010).

B. Discussion

L'enzyme MAX1 agissant en aval de CCD8, la carlactone mise en évidence par (Alder et al., 2012) est le meilleur candidat pour être le substrat des protéines MAX1. Les auteurs suggèrent que cette protéine à elle seule pourrait produire le 5-déoxystrigol à partir de la carlactone. Il serait donc intéressant de quantifier ces composés, carlactone et 5-déoxystrigol, mais aussi les autres strigolactones, dans les mutants *max1*. Il serait également intéressant de savoir si la carlactone est mobile dans la plante, puisque bon nombre d'expériences suggèrent que MAX1 cliverait un composé mobile au niveau des tissus vasculaires. Pour cela l'obtention d'une molécule de carlactone radiomarkée semble intéressante. Ainsi la molécule pourrait être incorporée à la plante et suivie dans les différents tissus. On peut même envisager de suivre les différences de modifications occasionnées dans les contextes mutants et sauvages, à la manière des expériences que nous avons réalisées avec les strigolactones marquées décrites dans le chapitre III.

D'autres hypothèses sont proposées pour l'action des CYP450 MAX1, la diversité d'hydroxylation, d'oxydation des cétones et d'époxidation dans la structure de base des strigolactones indique les cibles d'actions potentielles des Cytochromes P450 (Yoneyama et al., 2009). Le rôle des strigolactones dans la ramification des hyphes de champignons endomycorhiziens à arbuscules suggère que le 5 deoxystrigol pourrait être le précurseur de toutes les strigolactones naturelles en raison de l'absence de groupements hydroxyle ou autres sur les cycles A et B (Xie and Yoneyama, 2010). La protéine MAX1 pourrait donc être l'enzyme responsable de l'une de ces réactions plus communes chez les CYP450, à partir du précurseur probable de toutes les strigolactones, le 5 déoxystrigol (Figure IV. 16).

L'une des pistes envisagées pour déterminer les réactions réalisées par MAX1 est l'obtention du double mutant de pois *Psm_{max1}-A10 Psm_{max1}-A12* qui devrait nous permettre de réaliser des quantifications hormonales afin de déterminer si toutes les strigolactones identifiées à ce jour chez le pois sont présentes. L'obtention de ce double mutant nous permettra également de réaliser des expériences de greffe avec d'autres mutants de ramification. L'obtention de mutants de TILLING nous offre aussi l'avantage de réaliser une étude fonctionnelle des différents domaines de la protéine. Une autre piste envisageable serait de produire la protéine MAX1 dans le système hétérologue *E. Coli* afin de déterminer la réaction que cette enzyme réalise. L'un des substrats à tester en priorité serait la carlactone en cours de synthèse par FD Boyer. Si la synthèse de l'isomère Z de la carlactone a

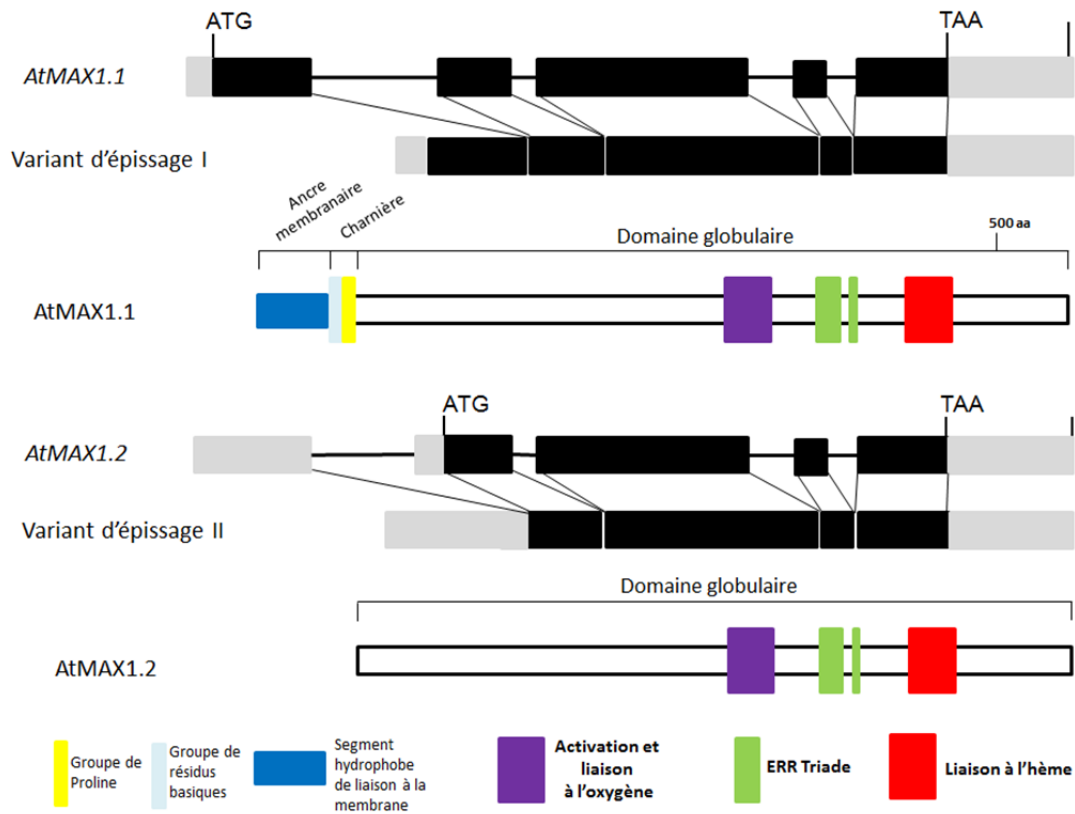


Figure IV. 17. Diagramme montrant l'épissage alternatif du gène *AtMAX1* et les 2 protéines produites.

été réalisée par le groupe de François-Didier Boyer, la forme naturelle (isomère E) est plus compliquée à obtenir (communication personnelle).

L'histoire évolutive des protéines MAX1 est également complexe puisqu'on peut remarquer qu'il existe 2 homologues chez les légumineuses, un seul chez les autres Dicotylédones dont le génome a été séquencé (Drummond et al., 2011), au moins 5 chez les Monocotylédones comme le riz et aucune chez la mousse *Physcomitrella patens*. On peut se demander quel est l'impact de la duplication du gène chez les légumineuses et d'une telle diversification chez le riz. Une autre question est comment expliquer l'absence de cette protéine chez la mousse. Il pourrait être intéressant de réaliser des tests de complémentation interspécifique notamment en exprimant chacun des deux homologues de MAX1 de pois chez le mutant *max1* d'*Arabidopsis* ou encore d'exprimer le gène d'*Arabidopsis* chez la mousse.

Pour de nombreuses séquences codantes de locus de cytochromes P450 d'*Arabidopsis*, on observe la production de plus d'un type de transcrits et donc plus d'une protéine (Nelson et al., 2004). C'est le cas pour le locus d'*Arabidopsis* codant pour la protéine CYP711A1, MAX1, qui produit une version complète (522 acides aminés) de la protéine et une version tronquée de la partie N-Terminale (439 acides aminés). La production de 2 protéines est due à une variation dans le site d'épissage du premier intron du gène MAX1 (Booker et al., 2005). La différence majeure entre les 2 protéines AtMAX1.1 et AtMAX1.2 réside dans la présence ou non d'une région hydrophobe dans la partie N-terminale, qui d'après la structure canonique des cytochromes P450 permettrait un ancrage à la membrane plasmique ou au réticulum. Ainsi le gène *AtMAX1* pourrait produire une protéine ancrée à la membrane et une protéine cytosolique (Figure IV. 17). Chez le pois, les homologues présentent tous deux des domaines transmembranaires dans leur partie N terminale. Il est donc envisageable que l'un des 2 gènes ou même les deux, produisent une forme longue et une forme courte d'une protéine CYP711A. Il serait intéressant de caractériser l'épissage des gènes MAX1 de pois et d'étudier la localisation tissulaire et cellulaire des transcrits.

L'identification des homologues de pois du gène MAX1 va permettre de réaliser des investigations sur les modalités de la régulation de l'expression de ces deux gènes et notamment lors d'une carence en phosphate (Umehara et al., 2010) et si la régulation de l'expression de ces gènes (très probablement de biosynthèse) est soumise à un rétrocontrôle

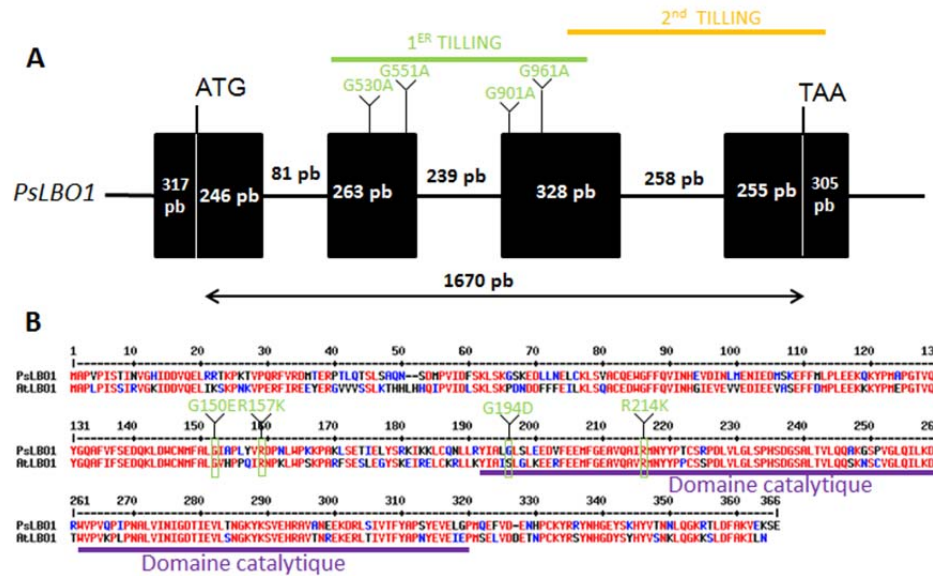


Figure IV. 18. Diagramme du gène *PsLBO1* et alignement des séquences protéiques de pois et d'*Arabidopsis*.

La position des mutations identifiées par TILLING sont indiquées sur le gène *PsLBO1* et sur la protéine PsLBO1.

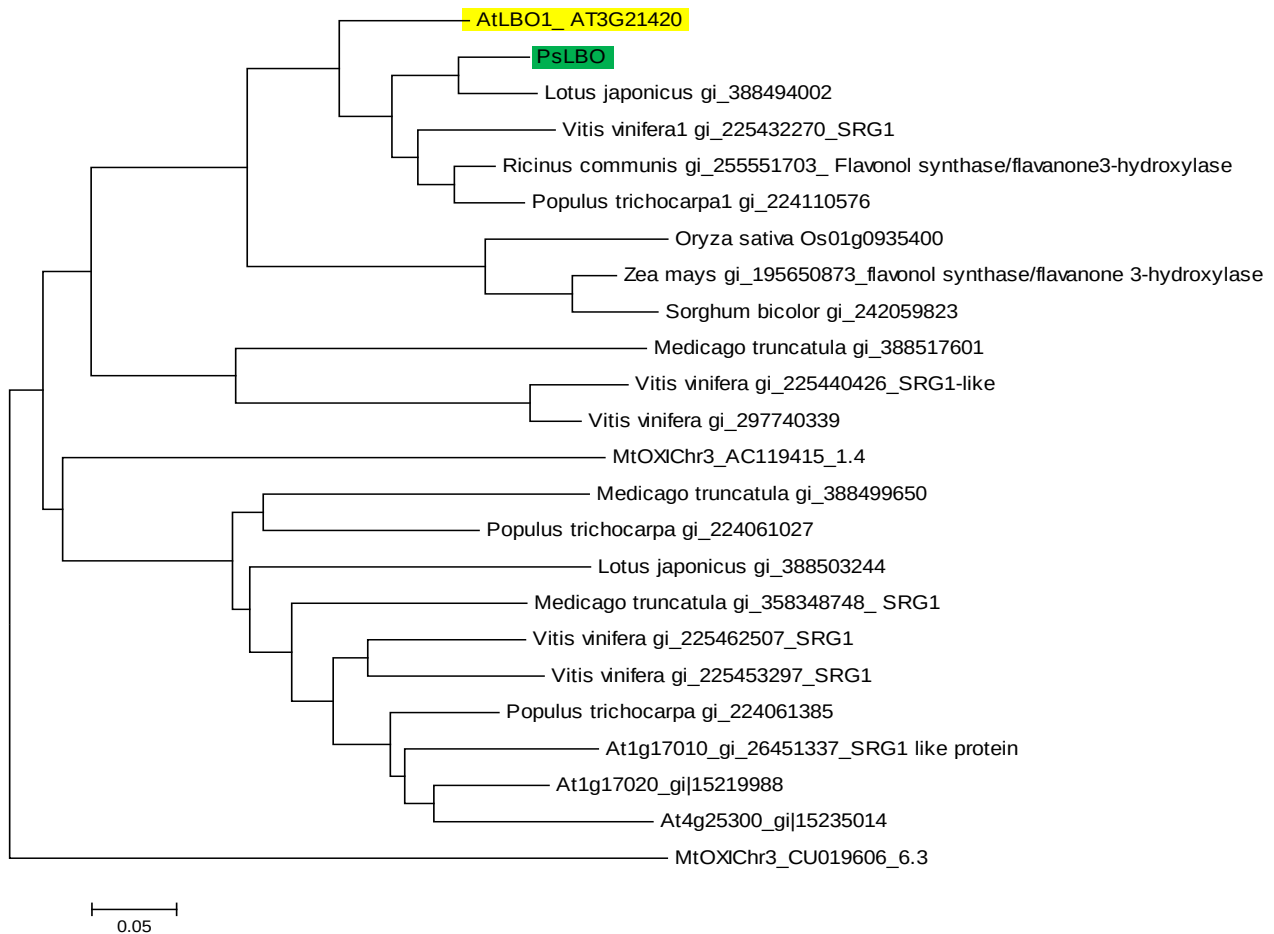


Figure IV. 19. Arbre phylogénétique des protéines LBO1 par la méthode Neighbour joining

faisant intervenir la protéine RMS2 ou non. De plus il semble que chez *Medicago truncatula*, *MAX1* soit comme *D27* aussi régulé par les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 (Liu et al., 2011).

V. *LBO1*, un bon candidat pour la réalisation des dernières étapes de la biosynthèse des strigolactones.

La caractérisation du mutant d'insertion d'ADN-T dans le gène *LBO1* (At3g21420) par l'équipe australienne a permis de montrer que le mutant était hyperramifié et que le phénotype sauvage pouvait être restauré par l'application de GR24. Mais le phénotype de ce mutant est beaucoup moins marqué que celui des autres mutants *max* et l'effet de l'application des strigolactones sur les mutants *Arabidopsis* est difficile à observer, et encore plus à quantifier. Des expériences de greffes entre *lbo1* et les mutants *max* ont permis de montrer que *LBO1* était une enzyme impliquée en aval des enzymes CCD7/8 et *MAX1*.

A. Résultats

1. Obtention de la séquence de pois du gène *LBO1*

Comme pour le gène *PsD27*, des primers dégénérés ont été définis à partir d'un alignement protéique de plusieurs homologues du gène *AtLBO1* pour obtenir la séquence de l'homologue de pois. Ainsi les primers ont été testés sur de l'ADN génomique de pois du cultivar Tèrese et un fragment de 713 pb a été obtenu à partir des amorces *PsLBO777L* et *PsLBOU515*.

Afin d'obtenir les extrémités 3' de cette séquence, il a été réalisé une 3'RACE PCR (Rapid amplification of cDNA-ends). Cette technique est basée sur la reverse transcription et permet d'amplifier un ADNc modifié à partir d'amorce spécifique du gène étudié et d'une amorce modifiée reconnaissant la queue polyA de l'ARNm. Une première PCR a été réalisée avec l'amorces *PsLBO_U968_3'* et l'adaptateur UAP, suivit d'une PCR emboîtée avec l'amorce *PsLBO_U1024_3'* et l'adaptateur AUAP, ce qui nous a permis d'obtenir un fragment de 650 pb. La partie 5' d'un gène a été obtenue par PCR walking, technique qui consiste en une digestion enzymatique de l'ADNg par 3 enzymes différentes (*DraI*, *EcoRV* et *SmaI*) suivi d'une ligation des produits de digestion avec un adaptateur qui sera reconnu par les amorces adaptatrices lors des PCR emboîtés successives réalisées avec des amorces spécifiques du gène. Les 3 amorces spécifiques suivantes *PsLBO_L520_5'*; *PsLBO_L537_5'*; *PsLBO_L580_5'* et l'ADN génomique de Tèrese digéré par l'enzyme de restriction *DraI* (Fermentas) ont été utilisés.

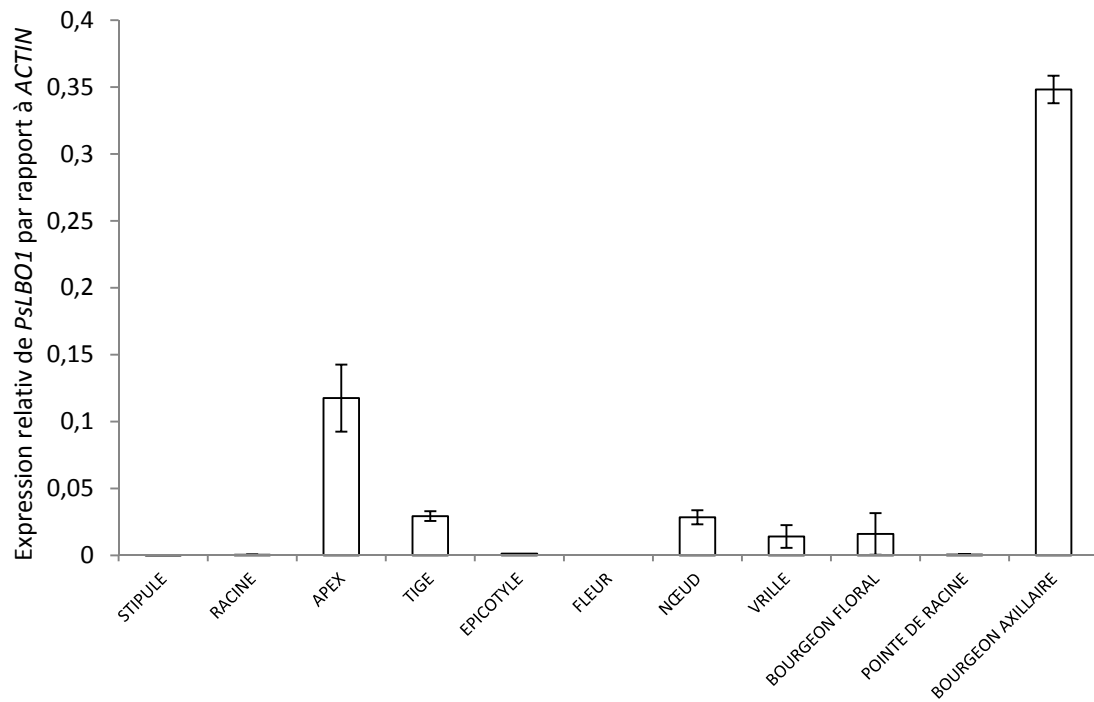


Figure IV. 20. Quantification de l'accumulation des transcrits de *PsLBO1* dans différents organes de pois par QPCR.

Les quantifications sont normalisées par rapport au gène *EF1α*. Moyenne des résultats de deux pools de plantes (Barre d'erreur = Erreur standard n=2).

La présence de 3 introns (Figure IV. 18A) a pu être mise en évidence par comparaison des séquences obtenues par PCR sur de l'ADN génomique et de l'ADNc grâce aux couples d'amorces spécifiques suivants *PsLBO_U525* et *PsLBO_L923* ; *PsLBOI_F2006* et *PsLBO_R2609* (Séquence annexe 2). On remarque que la structure introns/exons est conservée entre le pois et *Arabidopsis*. La traduction *in silico* de la séquence de l'ADNc prédit une protéine de 363 acides aminés avec un domaine catalytique en C-terminal, caractéristique de la famille des oxydoréductases (Figure IV. 18B).

Afin de confirmer que la séquence de pois obtenue correspond bien à l'homologue d'*Arabidopsis LBO1* (At1g23420) nous avons réalisé une étude phylogénétique à partir des séquences protéiques issues du blast de la séquence *PsLBO1*. On remarque que les séquences *PsLBO1* et *AtLBO1* se trouvent dans un clade assez proche et qu'aucune autre séquence *Arabidopsis* n'est présente dans ce cluster, ce qui laisse penser que nous avons obtenu le bon homologue de *LBO1*. Aucune séquence de *Medicago truncatula* n'a été identifiée dans ce cluster. De même les homologues de Monocotylédones obtenus (maïs, riz et sorgho) se trouvent assez éloignés du groupe qui contient *PsLBO1* et *AtLBO1* (Figure IV. 19).

Nous avons également réalisé la cartographie du gène afin de vérifier qu'il ne co-localisait pas avec une mutation de pois déjà caractérisée et non encore clonée (*rms2*, *rms6*). Pour cela nous avons identifié un SNP entre les cultivars Tèrese et Champagne et défini un marqueur CAPS. Ainsi les amorces *LBO_carto_F* et *LBO_carto_R* amplifient un fragment de 400 pb clivé chez Tèrese en 2 fragments de 200 pb par l'enzyme *RsaI* (Fermentas) au niveau du site de restriction GT^AAC absent chez le cultivar Tèrese et qui n'est donc pas clivé. La cartographie a été réalisée par l'équipe d'Isabelle Lejeune à l'INRA de Mons qui possède une population de cartographie Tèrese X Champagne (« RIL2 ») (Lejeune-Henaut et al., 2008). Les résultats montrent que ce gène est situé à la base du groupe de liaison VI, entre les marqueurs TE002E04 (144cM) et TI001G01 (147,8cM) (*LBO1* → 144,6 cM). Aucune mutation *rms* n'est située dans cette zone (Annexe 9).

2. Etude de l'expression de *PsLBO1*

Afin de tester l'hypothèse d'une fonction dans la biosynthèse des SLs de cette enzyme qui provoque, lorsqu'elle est mutée, un phénotype hyperbranché chez les plantes d'*Arabidopsis*, on a réalisé différentes quantifications de l'accumulation des transcrits de

Numéro de référence dans la base de données de TILLING de la famille de plante	Position de la mutation sur la séquence nucléique	Position de la mutation sur la séquence protéique
2083	G551A	R157K
2100	G961A	R214K
2698	G901A	G194D
3182	G530A	G150E
4334	G307A	D103N

Tableau IV 6. Résultats des mutations obtenues par TILLING du gène *PsLBO1*

(Exemple : R157K signifie que l'arginine 157 (157ème acide aminé à partir de la méthionine de départ) a été muté en lysine.



Pslbo1_3182 Pslbo1_2100 Pslbo1_2698 Caméor (WT)

Figure IV. 21. Trois mutants alléliques *Ps/bo1* obtenus par TILLING

PsLBO1. Lorsqu'on réalise la quantification des transcrits de *PsLBO1* par Q-PCR (Figure IV. 20), on remarque que l'accumulation est la plus forte dans les bourgeons axillaires. Ce gène est aussi exprimé dans tous les autres organes mais avec une faible accumulation dans les racines et l'épicotyle, à la différence des gènes *RMS1* et *RMS5* que l'on retrouve majoritairement exprimés dans ces tissus. LBO1 ne semble pas agir dans les mêmes organes que les enzymes situées plus en amont dans la voie de biosynthèse d'après les expériences de greffe (C. Beveridge, données non publiées). De plus, sa forte expression dans les bourgeons c'est à dire là où l'hormone agit pour réprimer la ramification renforce l'hypothèse de l'équipe de C. Beveridge que cette enzyme participe aux dernières étapes de biosynthèse.

3. Obtention de mutants par TILLING et leur caractérisation

Afin d'obtenir des mutants de pois pour ce gène et de valider que chez le pois les mutants présentent aussi un phénotype hyperbranché, nous avons réalisé un TILLING dans les 2^{ème} et 3^{ème} exons sur un fragment de 700 pb. Le TILLING de *PsLBO1* nous a permis d'identifier 10 familles contenant des mutations. Sur ces 10 mutations détectées 4 sont situées dans un intron, 5 changent un acide aminé (Tableau IV. 6) et une est silencieuse. Deux mutations sont situées dans le domaine catalytique (*Pslbo*-2100 et *Pslbo*-2698) mais aucune ne donne lieu à un codon stop (Figure IV 18B). Les familles présentant des mutations ont été commandées à l'INRA de Dijon et semées afin de réaliser un phénotypage.

Afin de vérifier si la mutation identifiée par TILLING est bien portée par les familles de plantes sélectionnées, nous avons défini pour chacun des mutants, des marqueurs CAPS ou dCAPS (Tableau IV. 3). Ces marqueurs ont permis de valider que toutes les familles présentaient bien la mutation identifiée par TILLING. Nous avons donc réalisé un phénotypage rapide de ces cinq familles de plantes et pu observer qu'aucune d'entre elles ne présentait un phénotype hyperbranché, ni même une légère augmentation de la ramification des entre-nœuds de la base. Une légère réduction de la taille des plantes a été observée pour les familles *Pslbo*-2100, *Pslbo* 2698 et *Pslbo* 3182. Etant donné que les strigolactones agissent sur l'élongation des entrenœuds nous avons réalisé un rétrocroisement de ces 3 familles avec la plante sauvage Caméor afin de tester si ces mutations affectent ou non la taille des plantes. Les résultats de ces rétrocroisements ont montré qu'il n'y avait pas co-ségrégation du phénotype nain avec les mutations (Figure IV. 21). Ces mutants TILLING ne présentent pas de phénotype au niveau de l'architecture de la

plantule de pois mais aucune des mutations obtenues par TILLING n'a donné lieu à un codon STOP ou à des mutations qui pourraient avoir des conséquences fonctionnelles importantes, c'est-à-dire dans le domaine catalytique de la protéine. Il est donc possible que les mutations obtenues n'affectent pas la fonction de la protéine PsLBO1 (hypothèse qui semble la plus probable). Un deuxième TILLING est en cours dans le 4^{ème} exon du gène qui code pour une grande partie le domaine catalytique de la protéine.

B. Discussion

La mise en évidence du gène *AtLBO1*, grâce à une approche par microarray, offre la possibilité d'élucider d'autres étapes de biosynthèse des strigolactones. Mais l'exploitation du mutant d'*Arabidopsis* dans le but de réaliser des expériences de physiologie est limitée, d'où la nécessité d'utiliser le pois et d'obtenir des mutants pour ce gène. Le TILLING a permis de déterminer des plantes portant des mutations ponctuelles dans le gène *PsLBO1*, mais aucun de ces mutants ne présente de phénotype d'hyper-ramification comme le mutant *Arabidopsis* de ce gène.

Tout comme MAX1, LBO1 semble participer aux dernières étapes de biosynthèse des strigolactones. D'après les expériences de greffe réalisées à Brisbane, son rôle semble être plus en aval de MAX1, et l'expression spécifique dans le bourgeon nous laisse penser que cette enzyme agirait dans les toutes dernières étapes de synthèse des strigolactones. Comme supposé dans le chapitre II, avec le suivi des strigolactones radiomarquées, les strigolactones seraient modifiées, probablement de façon enzymatique, et LBO1 semble être un très bon candidat pour être l'enzyme activatrice. Un autre candidat a été mis en évidence très récemment, il s'agit d'une Glutamine amido-transférase, GAT1_2.1, dont le mutant chez *Arabidopsis* présente un phénotype hyperramifié et une insensibilité au GR24. Cette enzyme réaliserait une réaction d'amidation qui activerait la strigolactone (Zhu and Kranz, 2012).

L'obtention d'un mutant de TILLING *Psibo1* de pois permettra probablement de répondre à ces questions, grâce à la mise en place d'expériences de greffe entre les différents mutants de biosynthèse comme *rms1* ou *Psmax1* et avec les mutants de perception *rms3*. Ce mutant nous permettra également de réaliser diverses expériences d'application de strigolactones et d'intermédiaires comme la carlactone, et de quantifications hormonales.

VI. Discussion sur la biosynthèse des strigolactones.

La biosynthèse des strigolactones est encore loin d'être totalement élucidée. Notre étude offre de nouvelles potentialités dans l'identification des acteurs et des intermédiaires réactionnels produits. En ce qui concerne la recherche de nouveaux acteurs, il serait intéressant de réaliser une étude transcriptomique comparative entre des plantes traitées au GR24 ou non dans les tiges de pois mais aussi dans le bourgeon afin d'identifier de nouveaux gènes de biosynthèse. Cette étude transcriptomique pourrait également nous permettre d'identifier de nouveaux facteurs de transcription qui réguleraient l'expression des gènes de biosynthèse.

La priorité reste d'obtenir des mutants de pois pour ces gènes, de caractériser leur phénotype afin de confirmer leur rôle dans la voie des SLs chez le pois, et ensuite de déterminer la réaction que ces enzymes catalysent, notamment en utilisant un substrat radiomarké, comme une carlactone tritiée. Toutes ces études du métabolisme des strigolactones sont facilement envisageables grâce à la collaboration étroite que nous entretenons avec l'équipe de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de François-Didier Boyer, qui est un atout majeur dans le cadre de ces études notamment si la synthèse de la forme naturelle de la carlactone aboutit.

Le modèle pois s'avère donc être un outil essentiel dans la compréhension de la voie de biosynthèse de cette hormone étant donné que l'identification et la quantification des strigolactones est relativement facile par rapport à *Arabidopsis*. Les tests d'activités sont faciles à mettre en place sur les différents mutants (Boyer et al., 2012) et la réalisation des greffes permet de déterminer l'ordre d'action des enzymes dans la biosynthèse des strigolactones.

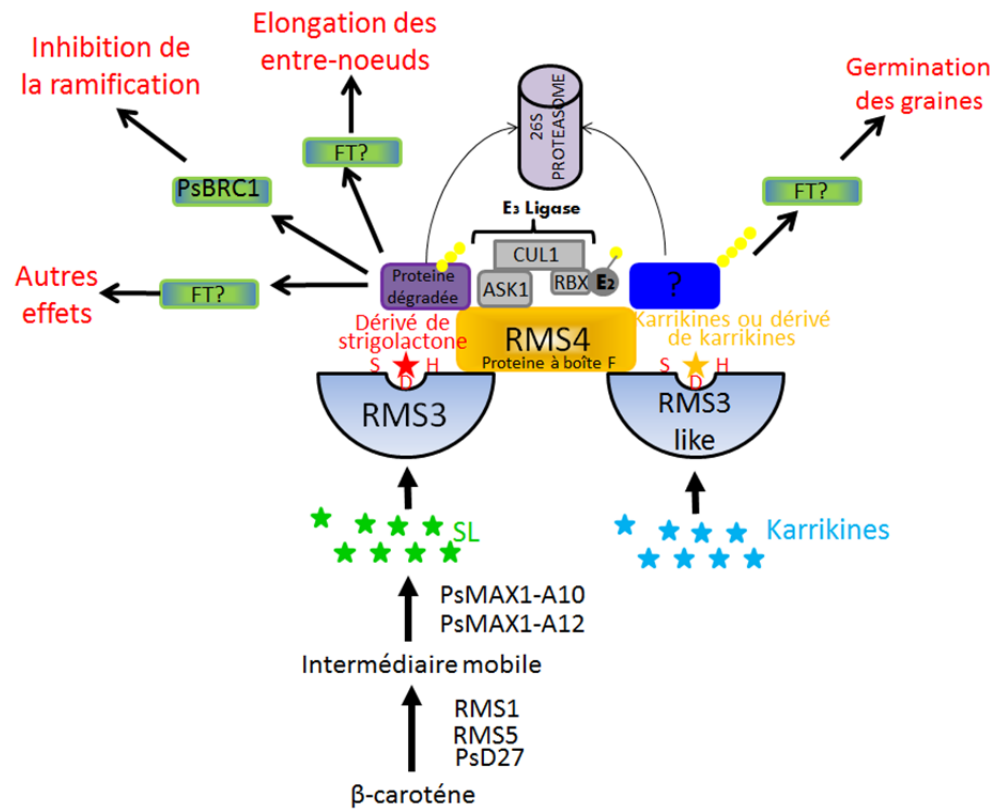


Figure V. 1. Modèle de la voie de signalisation des strigolactones
FT : Facteur de Transcription SL : Strigolactone

Conclusion et perspectives

I. Vers une compréhension de la perception des strigolactones

A cours de ma thèse nous avons montré que *PsBRC1* était un facteur de transcription essentiel au contrôle de la levée de dormance des bourgeons axillaires et que ce gène intégrait à la fois le signal strigolactone et le signal cytokinines, ces deux hormones régulant l'accumulation des transcrits de ce gène (Braun et al., 2012; Dun et al., 2012). Nous avons ensuite montré que le niveau de transcrits du gène *PsBRC1* dans le bourgeon détermine le devenir de celui-ci, rester dormant ou former une branche, mais aussi que la sensibilité à l'inhibition de la levée de dormance du bourgeon par un traitement aux strigolactones était dépendante du niveau de transcrit de ce gène (Dun et al., Submitted). *PsBRC1* est donc un gène de réponse aux strigolactones, mais il ne semble pas être le seul facteur de transcription cible qui contrôle l'ensemble des gènes de réponses aux strigolactones. Ce facteur de transcription ne serait pas l'équivalent des protéines ARF de la voie auxine, ou des protéines PIF de la voie de signalisation des gibbérellines. Les niveaux de transcrits des gènes codant pour les protéines ARF et PIF augmentent dès 30 min. après l'application de l'hormone (Badescu and Napier, 2006), or il semble que pour *PsBRC1* les premières variations du niveau de transcrits soient observées seulement après 2H (nos données, non publiées). L'action de *PsBRC1* dans la perception des strigolactones semble être restreinte au contrôle de la dormance des bourgeons axillaires, or les strigolactones sont impliquées dans d'autres processus développementaux, comme la croissance de la tige ou l'architecture racinaire. Il est donc fort probable que d'autres facteurs de transcriptions spécifiques de ces organes aient leur expression modifiée par les strigolactones (Figure V. 1).

La suite du travail s'est intéressée à la caractérisation du mutant de perception *rms3* mais nous n'avons malheureusement pas pu montrer que la protéine RMS3 liait les strigolactones ou avait une activité enzymatique. Or l'homologue de RMS3 chez le pétunia (*DAD2*) semble montrer *in vitro* une activité d'hydrolyse des strigolactones, mais aussi une activité de liaison à l'hormone (au GR24), ce qui permettrait une interaction avec la protéine à boîte F PhMAX2. L'interaction avec la protéine à boîte F aurait pour conséquence la cascade de signalisation des strigolactones (Hamiaux et al., 2012). Or nous avons montré que

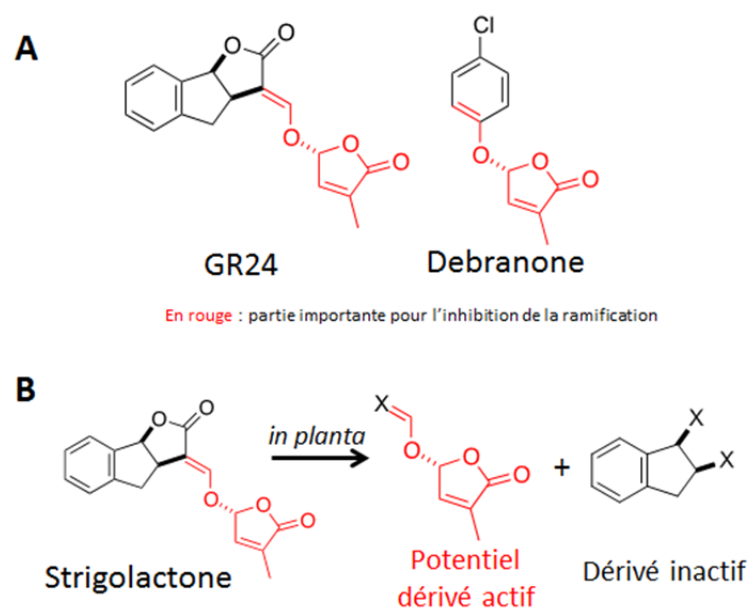


Figure V. 2. Dédution de la structure d'un potentiel dérivé actif de strigolactones

A. Comparaison des structures communes entre le GR24 et la débranone.

B. Réaction de clivage des strigolactones observée dans la plante.

les strigolactones étaient probablement modifiées en un autre composé, étant donné que le suivi de la molécule radiomarquée dans la plante a montré que le GR24 est clivé en un autre composé au niveau des racines, puis migrait dans les parties aériennes de la plante. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'on ne retrouve pas le GR24 tritié dans la sève du xylème et que des strigolactones aux structures différentes, comme la débranone, présentent la même activité que le GR24. Le composé actif liant la protéine RMS3 pourrait donc être un dérivé de strigolactone produit par la plante dont la partie commune serait le cycle D de l'hormone (Boyer et al., 2012) (Figure V. 2). Néanmoins, les résultats obtenus avec les protéines de pétunia n'ont pas été validés *in vivo* et il est possible que le mécanisme de perception ne soit pas identique dans la plante. Même s'il est très vraisemblable que la protéine RMS3 soit le récepteur des strigolactones, le mécanisme d'hydrolyse/liaison reste à être validé *in planta*. De ce fait, nous envisageons de reconduire nos expériences de suivi des strigolactones radiomarquées dans la plante mais aussi la production de la protéine RMS3 dans la bactérie *E. coli* afin de valider chez le pois les résultats obtenus chez le pétunia.

La découverte de l'implication des protéines MAX2 mais aussi de l'homologue de D14, D14 like, dans la perception des karrikinés (Scaffidi et al., 2012; Waters et al., 2012; Waters et al., 2012)) nous a amenés également à repenser les mécanismes de perception des strigolactones. C'est pour cela que nous avons envisagé une étude sur les homologues de RMS3, RMS3LIKE1 et RMS3LIKE2, afin de mieux comprendre le mécanisme de perception des strigolactones. Nous envisageons également de produire ces protéines afin de vérifier l'hypothèse émise par Waters et al. 2012 selon laquelle ces protéines seraient capables de lier les karrikinés mais aussi les strigolactones. Les voies strigolactones et karrikinés impliqueraient toute deux la protéine MAX2 et la spécificité de liaison se ferait grâce aux protéines D14 et D14 like. Le fait que les mutants *rms3/d14* présentent les mêmes phénotypes que le mutant *rms4* suggère que la spécificité des actions des strigolactones serait due à des recrutements de différents facteurs de transcriptions spécifiques de certains tissus et de certaines fonctions (Figure V. 1).

Notre équipe étudie également les aspects évolutifs de la voie de signalisation des strigolactones grâce à la plante modèle *Physcomitrella patens*. L'obtention du mutant de mousse *Pprms4* suggère que la voie de signalisation serait différente chez les Bryophytes car

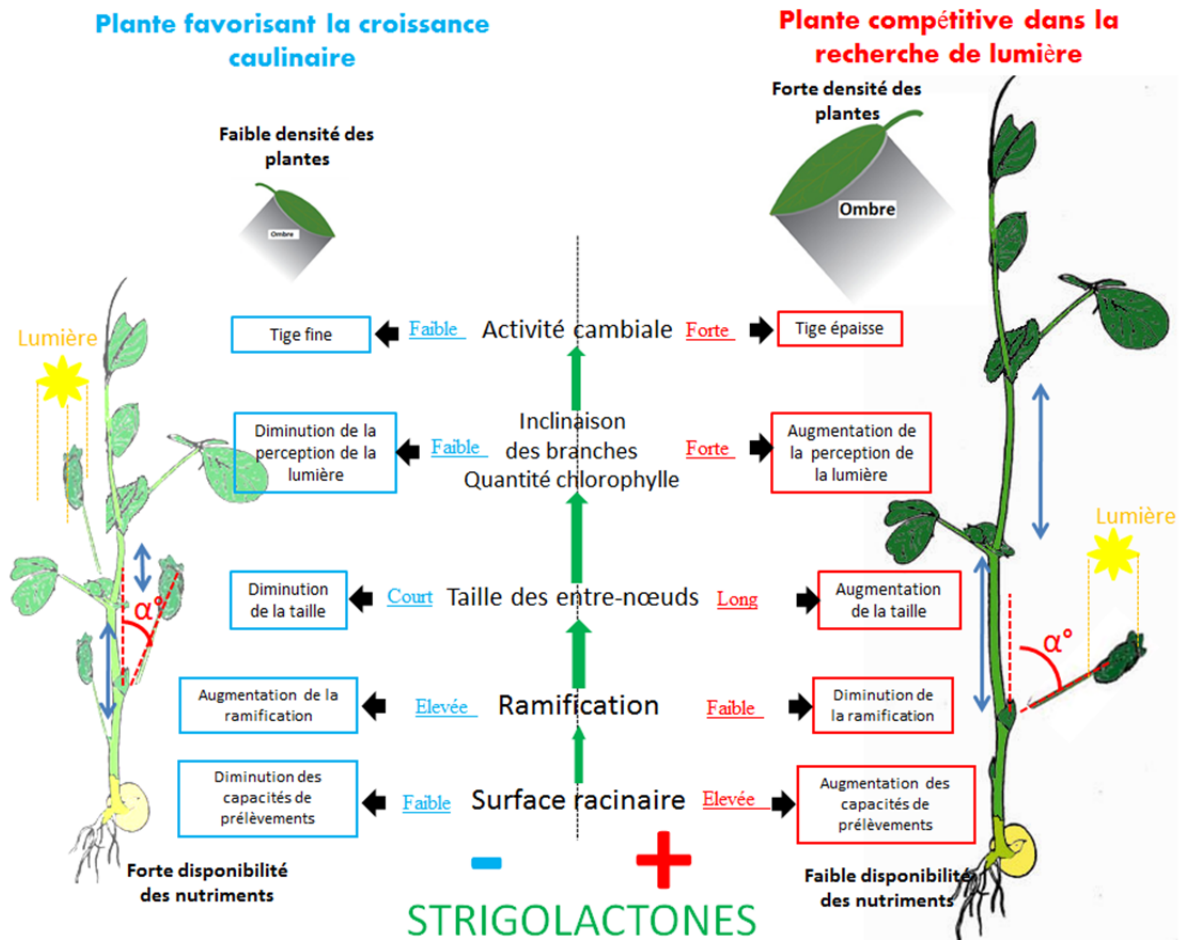


Figure V. 3. Modèle de l'harmonisation de la croissance des plantes par les strigolactones en fonction des paramètres environnementaux

le phénotype de ce mutant est totalement différent de celui du mutant *ppccd8* déficient en strigolactone. De plus, le gène de mousse *PpRMS4*, ne complémente pas le phénotype hyperramifié du mutant *max2* (Sandrine Bonhomme, communication personnelle). Les membres du laboratoire se demandent donc si PpRMS4 est bien impliquée dans la perception des strigolactones et poursuivent leurs investigations afin de répondre à cette question. Il serait intéressant de réaliser le même travail sur l'homologue de D14like chez la mousse. Mais comme on l'a vu, la phylogénie de cette protéine est complexe et il existe beaucoup d'homologues de ces gènes. Une approche de RNAi, facilement envisageable chez la mousse (Bezanilla et al., 2003) pourrait être envisagée pour étudier la fonction des homologues de *D14like* chez la mousse.

II. Vers une compréhension de la dynamique de la croissance des plantes

Les strigolactones semblent réguler une multitude de processus développementaux, autant lors de la mise en place de l'appareil racinaire que lors de la mise en place de l'architecture caulinaire mais il semblerait que tous ces paramètres soient régulés de façon à optimiser la croissance des plantes.

L'application de strigolactones provoque une diminution de la ramification (Gomez-Roldan et al., 2008), une augmentation de la croissance des entre-nœuds (Chapitre III) mais aussi une augmentation de la quantité de chlorophylle (Mayzlish-Gati et al., 2010). Tous ces caractères confèrent à la plante une plus grande capacité à capter l'énergie lumineuse et une meilleure compétitivité lorsque la couverture végétale du milieu est dense. A l'inverse des plantes déficientes en strigolactones, présentent une réduction de la taille des entre-nœuds (Chapitre III), de la quantité de chlorophylle (Mayzlish-Gati et al., 2010), et une augmentation de la ramification (Gomez-Roldan et al., 2008). Les plantes grandissant dans un milieu peu dense en plantes, présentent ce phénotype, n'étant pas en compétition pour la lumière, elles produisent une biomasse plus importante, moins de chlorophylle et n'optimisent pas leur croissance dans le but d'augmenter la perception de lumière (Figure V. 3). Toutes ces caractéristiques sont à l'opposé de plantes vivant en milieu dense et qui présentent le syndrome d'évitement de l'ombre (Shade Avoidance Syndrome = SAS) (Keuskamp et al., 2010). Il est donc possible que les strigolactones participent à l'établissement du phénotype caractéristique des plantes se développant à l'ombre, c'est-à-dire ayant un ratio Red/Far red

élevé. De plus, les mutants *max2* d'*Arabidopsis* présentent une élongation des hypocotyles (Shen et al., 2012), caractéristique de ce syndrome. De plus, le niveau de transcrits du gène *TB1/BRC1* est modulé par la densité des plantes (Aguilar-Martinez et al., 2007). Mais est-ce que la réponse à la densité (ratios FR/R élevés) régule directement les niveaux de transcrits TB1 ou est-ce qu'il existe une régulation plus en amont dans la voie de biosynthèse et/ou de signalisation des SLs ?

Les strigolactones stimulent la croissance secondaire des plantes en induisant l'activité cambiale (Agusti et al., 2011). Le cambium est une assise génératrice des tiges qui permet la mise en place des tissus secondaires, phloème secondaire et xylème secondaire (le bois). Ces tissus sont spécialisés dans le transport de l'eau, des assimilats, des molécules - signal mais aussi des nutriments. La stimulation du xylème secondaire renforce la résistance de la tige face aux contraintes mécaniques. La stimulation du cambium par les strigolactones permet donc la formation d'une tige épaisse, résistante et transportant plus de nutriments. Toutes ces caractéristiques confèreraient à l'appareil caulinaire un avantage face aux fluctuations de l'environnement.

La disponibilité en nutriments affecte la biosynthèse des strigolactones (Yoneyama et al., 2012) notamment la disponibilité en phosphate. En effet, chez *Arabidopsis*, une privation en phosphate induit très fortement la production de strigolactones qui s'accompagne d'une modification de l'architecture racinaire (Ruyter-Spira et al., 2010) permettant une optimisation des prélèvements des nutriments. Les strigolactones assureraient ainsi une harmonie entre la croissance racinaire et la croissance caulinaire, ce qui permettrait de diminuer la ramification lorsque les concentrations en nutriments sont faibles (Figure V. 3).

Les strigolactones permettraient donc d'adapter la croissance des plantes afin qu'elles soient plus compétitives dans la capture des nutriments et de la lumière. Les strigolactones agiraient comme une molécule permettant l'harmonisation de l'architecture en intégrant l'ensemble des informations reçues par la plante (Agusti and Greb, 2012). Cette hormone semble être le modulateur central de la croissance des plantes et serait à l'origine de la diversité des formes de végétaux en régulant de multiples paramètres.

III. Vers le développement de nouvelles applications

La découverte d'une substance naturelle modulant la croissance des plantes offre la possibilité de développer des applications à intérêt agronomique fort et ceci facilement.

Parmi les gènes impliqués dans la biosynthèse ou la perception des hormones découverts, certains peuvent s'avérer d'intérêt agronomique et on peut envisager de réaliser de la sélection vis à vis de ces gènes. C'est ainsi que le laboratoire a envisagé d'introduire la mutation affectant le gène *PsBRC1* dans les variétés cultivées de pois protéagineux. Une mutation dans le gène *PsBRC1* augmente la ramification basale des plantes sans diminuer la taille de celle-ci, à la différence des mutants *rms*. De plus, chez ce mutant la taille des graines ainsi que le rendement ne sont pas affectés, au moins en conditions de serre (données personnelles). Le rendement chez le pois étant corrélé au nombre de tiges au nœud 2, il est possible qu'une mutation dans *PsBRC1* augmente le rendement des cultures de pois mais aussi augmente le couvert végétal ce qui permettrait de diminuer la capacité des adventices à se développer en début de culture au champ.

Certaines espèces de plantes à intérêt agronomique produisent naturellement un nombre de branches très important : c'est le cas de la plupart des variétés de tomate qui produisent de nombreuses ramifications, ce qui a tendance à réduire la taille des fruits. Pour cela un travail manuel de suppression des bourgeons est réalisé.

Avec la découverte des strigolactones, l'espoir de diminuer la ramification des plantes par simple traitement chimique est apparu. On envisage d'ajouter dans la solution nutritive des tomates des strigolactones afin de diminuer la ramification. Cependant les premiers résultats ne sont pas concluants. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de perception des strigolactones pour développer ces applications. De même, des tests d'activité des strigolactones sont réalisés chez le fraisier (communication personnelle) afin d'inhiber la formation des « gourmands » (= stolons des fraisiers qui courent à la surface du sol, qui s'enracinent et forment un nouveau clone) qui réduisent fortement la production de fraises et qui eux aussi sont ôtés manuellement. De nouveaux analogues beaucoup plus actifs que le GR24 pour inhiber la ramification sont développés par FD Boyer. De plus ces analogues sont aussi testés pour leur activité sur la germination des graines de plantes parasites.

La conservation de la pomme de terre est également une cible de l'action des strigolactones. En effet la dormance des bourgeons axillaires des tubercules de pomme de terre est soumise à un mécanisme de dominance apicale comme les bourgeons axillaires de

l'appareil végétatif (Teper-Bamnolker et al., 2012). Il semblerait que ce mécanisme fasse intervenir l'auxine et les strigolactones (Roumeliotis et al., 2012). L'intérêt des strigolactones dans l'inhibition de la germination des pommes de terre est donc très fort surtout lorsque l'on sait que les traitements actuels sont coûteux, et qu'il n'existe pas de traitement efficace à partir du moment où les tubercules sont mis en rayon.

Comme on l'a vu en introduction le rôle des strigolactones n'est pas limité à leur action sur le contrôle de l'architecture des plantes mais aussi sur la germination des graines de plantes parasites qui causent des dommages importants notamment dans les pays africains. La découverte des gènes de biosynthèse permet de déterminer la cible de potentiels inhibiteurs de la biosynthèse des strigolactones. En effet la détermination de la nature de l'enzyme impliqué facilite le choix du type d'inhibiteur à tester. Ainsi la découverte de l'inhibiteur de biosynthèse de strigolactones TSI13, a été réalisé avec un crible d'inhibiteurs de Cytochrome P450, car l'une des enzymes impliqué dans cette synthèse MAX1 appartient à cette famille de protéine (Ito et al., 2011).

Ainsi diminuer la production de strigolactones ou sélectionner des plantes produisant peu de strigolactones sont des pistes à explorer dans la lutte contre les plantes parasites comme le *Striga* ou l'*Orobanche*. Cependant, réduire la production de strigolactones dans rhizosphère aurait pour conséquence de modifier la production de strigolactones par la plante et affecterait donc son architecture. D'où l'intérêt de trouver les spécificités des strigolactones qui agissent dans la rhizosphère par rapport à celles qui agissent sur l'appareil végétatif (Travail que réalise François-Didier Boyer). On peut espérer identifier une molécule qui possède toutes les caractéristiques hormonales, et qui ait perdu ses capacités à stimuler la germination des graines des plantes parasites. Ces molécules existent peut-être naturellement, c'est pour cela que nous cherchons à identifier les métabolites du GR24, grâce aux différents marquages radioactifs. L'élucidation du mécanisme de perception pourrait aussi permettre de développer des molécules inhibitrices de la perception des strigolactones, voir même des molécules spécifiques de la germination afin de développer les stratégies suicides qui visent à faire germer les graines de plantes parasites sans la présence des plantes hôtes, ce qui conduirait à leur mort.

Toutes ces découvertes permettent donc d'envisager la mise en place d'applications (sélection classique, traitement hormonal, utilisation d'inhibiteur etc..) qui ne nécessitent pas l'utilisation d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) dans un contexte social où

l'utilisation de cet outil biotechnologique fait débat et soulève beaucoup d'inquiétudes auprès du grand public.

Une étude a révélé que les strigolactones pourraient inhiber spécifiquement la division cellulaire des cellules cancéreuses (Pollock et al., 2012) d'où l'intérêt de tester les nouvelles molécules que nous découvrirons afin d'explorer ces potentielles pistes pharmaceutiques.

IV. Perspectives

En terme de perspectives à court terme, le laboratoire va se focaliser sur la recherche de gènes de réponses aux strigolactones afin de trouver de nouveaux acteurs de la voie de signalisation des strigolactones, comme les protéines cibles potentiellement marquées par la protéine a boîte F RMS4 et dégradées par la voie du protéasome, ou d'autres facteurs de transcription impliqués dans les autres processus développementaux tels que l'élongation des entre-nœuds ou la photomorphogénèse. Pour cela, une puce microarray de pois a été développée. Les taux de transcrits de différents organes : bourgeons, tiges ou nœuds vont être comparés avec ou sans traitement au GR24.

Le travail va également se poursuivre sur la caractérisation des protéines RMS3, RMS3LIKE1 et RMS3LIKE2 afin de comprendre la perception des strigolactones. Cette étude reposera essentiellement sur une approche biochimique visant à produire les différentes protéines. Cette caractérisation nécessitera aussi de déterminer la structure des produits de modification des strigolactones afin de vérifier la nature précise du signal inhibiteur de la ramification. La caractérisation des homologues des gènes de biosynthèse de strigolactones va également se poursuivre notamment par l'étude des mutants de TILLING obtenu chez les pois. Ce travail devrait s'effectuer dans le cadre de collaborations avec d'autres équipes, celle de Christine Beveridge mais probablement celle de Koichi Yoneyama afin de réaliser des quantifications fines des strigolactones.

D'autres pistes s'ouvrent également avec le clonage très récent du gène *RMS2*, dont on vient de montrer qu'il codait une des protéines récepteur à l'auxine, AFB5 (Auxin Signaling F-box Protein 5). Cette découverte permettra probablement d'élucider la nature du rétrocontrôle de la biosynthèse des strigolactone exercé par la protéine RMS2 et peut-être de conclure qu'il n'existe qu'un seul rétrocontrôle et qu'il est de nature auxinique.

Références

- Aguilar-Martinez JA, Poza-Carrion C, Cubas P** (2007) Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* **19**: 458-472
- Agusti J, Greb T** (2012) Going with the wind - Adaptive dynamics of plant secondary meristems. *Mech Dev*
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, Greb T** (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Aki T, Shigyo M, Nakano R, Yoneyama T, Yanagisawa S** (2008) Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-Like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol* **49**: 767-790
- Akiyama K, Hayashi H** (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot (Lond)* **97**: 925-931
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H** (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H** (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol*
- Alder A, Holdermann I, Beyer P, Al-Babili S** (2008) Carotenoid oxygenases involved in plant branching catalyse a highly specific conserved apocarotenoid cleavage reaction. *Biochem J* **416**: 289-296
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S** (2012) The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **335**: 1348-1351
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J** (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* **51**: 1019-1029
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyojuka J** (2009) d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol* **50**: 1416-1424
- Auger B, Pouvreau JB, Pouponneau K, Yoneyama K, Montiel G, Le Bizec B, Delavault P, Delourme R, Simier P** (2012) Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Mol Plant Microbe Interact*
- Auldrige ME, Block A, Vogel JT, Dabney-Smith C, Mila I, Bouzayen M, Magallanes-Lundback M, DellaPenna D, McCarty DR, Klee HJ** (2006) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J* **45**: 982-993
- Badescu GO, Napier RM** (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci* **11**: 217-223
- Bainbridge K, Sorefan K, Ward S, Leyser O** (2005) Hormonally controlled expression of the Arabidopsis MAX4 shoot branching regulatory gene. *Plant J* **44**: 569-580
- Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Hofer R, Paquette S, Werck-Reichhart D** (2011) Cytochromes p450. *Arabidopsis Book* **9**: e0144
- Barthelemy D, Caraglio Y** (2007) Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. *Ann Bot* **99**: 375-407
- Bennett T, Leyser O** (2006) Something on the side: axillary meristems and plant development. *Plant Mol Biol* **60**: 843-854
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C, Leyser O** (2006) The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**: 553-563

- Besserer A, Becard G, Jauneau A, Roux C, Sejalón-Delmas N** (2008) GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol* **148**: 402-413
- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Becard G, Sejalón-Delmas N** (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* **4**: e226
- Beveridge C** (2000) Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Reg* **32**: 193-203
- Beveridge CA** (2006) Axillary bud outgrowth: sending a message. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 35-40
- Beveridge CA, Dun EA, Rameau C** (2009) Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol* **151**: 985-990
- Beveridge CA, Kyojuka J** (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 34-39
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C** (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* **11**: 339-345
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC** (1996) Branching in Pea (Action of Genes *Rms3* and *Rms4*). *Plant Physiol* **110**: 859-865
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C** (1997) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft transmissible signal(s). *Plant Physiol*. **115**: 1251-1258
- Beveridge CA, Symons GM, Turnbull CG** (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol* **123**: 689-698
- Bezanilla M, Pan A, Quatrano RS** (2003) RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* **133**: 470-474
- Booker J, Auldrige M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O** (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* **14**: 1232-1238
- Booker J, Chatfield S, Leyser O** (2003) Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *Plant Cell* **15**: 495-507
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O** (2005) MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* **8**: 443-449
- Bordat A, Savoie V, Nicolas M, Salse J, Chauveau A, Bourgeois M, Potier J, Houtin H, Rond C, Murat F, Marget P, Aubert G, Burstin J** (2011) Translational Genomics in Legumes Allowed Placing In Silico 5460 Unigenes on the Pea Functional Map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. G3 (Bethesda) **1**: 93-103
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH** (2003) Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 358-364
- Boyer FD, de Saint Germain A, Pillot JP, Pouvreau JB, Chen VX, Ramos S, Stevenin A, Simier P, Delavault P, Beau JM, Rameau C** (2012) Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching. *Plant Physiol* **159**: 1524-1544
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadi I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, Luo D, Bendahmane A, Turnbull C, Rameau C** (2012) The Pea TCP Transcription Factor PsBRC1 Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching. *Plant Physiol* **158**: 225-238
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA** (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**: 482-493

- Brody MS, Vijay K, Price CW** (2001) Catalytic function of an alpha/beta hydrolase is required for energy stress activation of the sigma(B) transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 6422-6428
- Cannon SB, May GD, Jackson SA** (2009) Three sequenced legume genomes and many crop species: rich opportunities for translational genomics. *Plant Physiol* **151**: 970-977
- Chapman EJ, Estelle M** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* **43**: 265-285
- Chapman EJ, Greenham K, Castillejo C, Sartor R, Bialy A, Sun TP, Estelle M** (2012) Hypocotyl Transcriptome Reveals Auxin Regulation of Growth-Promoting Genes through GA-Dependent and -Independent Pathways. *PLoS One* **7**: e36210
- Charon C, Bruggeman Q, Thareau V, Henry Y** (2012) Gene duplication within the Green Lineage: the case of TEL genes. *J Exp Bot* **63**: 5061-5077
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 1790-1799
- Chern CG, Fan MJ, Yu SM, Hour AL, Lu PC, Lin YC, Wei FJ, Huang SC, Chen S, Lai MH, Tseng CS, Yen HM, Jwo WS, Wu CC, Yang TL, Li LS, Kuo YC, Li SM, Li CP, Wey CK, Trisiriroj A, Lee HF, Hsing YI** (2007) A rice phenomics study--phenotype scoring and seed propagation of a T-DNA insertion-induced rice mutant population. *Plant Mol Biol* **65**: 427-438
- Cho HT, Kende H** (1997) Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell* **9**: 1661-1671
- Cline M** (1991) Apical dominance. *Bot Rev* **57**: 318-358
- Clouse SD** (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* **23**: 1219-1230
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH** (1966) Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**: 1189-1190
- Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R** (2006) Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 497-520
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Muller D, Domagalska MA, Leyser O** (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**: 2905-2913
- Dalmaïs M, Schmidt J, Le Signor C, Moussy F, Burstin J, Savoie V, Aubert G, Brunaud V, de Oliveira Y, Guichard C, Thompson R, Bendahmane A** (2008) UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol* **9**: R43
- Delaux PM, Xie X, Timme RE, Puech-Pages V, Dunand C, Lecompte E, Delwiche CF, Yoneyama K, Becard G, Sejalón-Delmas N** (2012) Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol* **195**: 857-871
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M** (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109-119
- Doebley J, Stec A, Hubbard L** (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485-488
- Domagalska MA, Leyser O** (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 211-221
- Drummond RS, Sheehan H, Simons JL, Martinez-Sanchez NM, Turner RM, Putterill J, Snowden KC** (2011) The Expression of *Petunia* Strigolactone Pathway Genes is Altered as Part of the Endogenous Developmental Program. *Front Plant Sci* **2**: 115
- Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA** (2009) Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends Plant Sci* **14**: 364-372
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA** (2012) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol* **158**: 487-498
- Durbak A, Yao H, McSteen P** (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 92-96

- Fabian T, Lorbiecke R, Umeda M, Sauter M** (2000) The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* **211**: 376-383
- Faucher N, Ambroise Y, Cintrat JC, Doris E, Pillon F, Rousseau B** (2002) Highly chemoselective hydrogenolysis of iodoarenes. *J Org Chem* **67**: 932-934
- Ferguson BJ, Beveridge CA** (2009) Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiol* **149**: 1929-1944
- Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Trengove RD** (2004) A compound from smoke that promotes seed germination. *Science* **305**: 977
- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge CA** (2005) The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**: 464-474
- Foo E, Davies NW** (2011) Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta* **234**: 1073-1081
- Foo E, Morris SE, Parmenter K, Young N, Wang H, Jones A, Rameau C, Turnbull CG, Beveridge CA** (2007) Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 1418-1428
- Foo E, Turnbull CG, Beveridge CA** (2001) Long-distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol* **126**: 203-209
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Klessig DF, Tong L** (2005) Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1773-1778
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Klessig DF, Tong L** (2005) Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 1773-1778
- Gao Z, Qian Q, Liu X, Yan M, Feng Q, Dong G, Liu J, Han B** (2009) Dwarf 88, a novel putative esterase gene affecting architecture of rice plant. *Plant Mol Biol* **71**: 265-276
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, Ejendal KF, Smith AP, Baroux C, Grossniklaus U, Muller A, Hrycyna CA, Dudler R, Murphy AS, Martinoia E** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* **44**: 179-194
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-194
- Grant J, Cooper P** (2006) Peas (*Pisum sativum* L.). *Methods Mol Biol* **343**: 337-345
- Grbic V, Bleecker AB** (2000) Axillary meristem development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **21**: 215-223
- Greb T, Clarenz O, Schafer E, Muller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K** (2003) Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev* **17**: 1175-1187
- Gualtieri G, Kulikova O, Limpens E, Kim DJ, Cook DR, Bisselin T, Geurts R** (2002) Microsynteny between pea and Medicago truncatula in the SYM2 region. *Plant Mol Biol* **50**: 225-235
- Hamiaux C, Drummond RS, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD, Snowden KC** (2012) DAD2 Is an alpha/beta Hydrolase likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone. *Curr Biol*
- Hartweck LM** (2008) Gibberellin signaling. *Planta* **229**: 1-13
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O** (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol*
- Hedden P** (2003) The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* **19**: 5-9
- Hubbard L, McSteen P, Doebley J, Hake S** (2002) Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* **162**: 1927-1935

- Humphrey AJ, Galster AM, Beale MH** (2006) Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat Prod Rep* **23**: 592-614
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyojima J** (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol* **46**: 79-86
- Ito S, Umehara M, Hanada A, Kitahata N, Hayase H, Yamaguchi S, Asami T** (2011) Effects of triazole derivatives on strigolactone levels and growth retardation in rice. *PLoS One* **6**: e21723
- Jager CE, Symons GM, Ross JJ, Smith JJ, Reid JB** (2005) The brassinosteroid growth response in pea is not mediated by changes in gibberellin content. *Planta* **221**: 141-148
- Johnson X, Bricelj T, Dun EA, Goussot M, Haurogne K, Beveridge CA, Rameau C** (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014-1026
- Kalo P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, Kiss GB, Downie JA, Oldroyd GE** (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**: 1786-1789
- Kaneko T, Tanaka N, Kumasaka T** (2005) Crystal structures of RsbQ, a stress-response regulator in *Bacillus subtilis*. *Protein Sci* **14**: 558-565
- Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Sejalón-Delmas N, Combier JP, Becard G, Belausov E, Beeckman T, Dor E, Hershenhorn J, Koltai H** (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* **233**: 209-216
- Kapulnik Y, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Kaplan Y, Wininger S, Hershenhorn J, Koltai H** (2011) Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **62**: 2915-2924
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**: 22-31
- Kebrom TH, Brutnell TP, Hays DB, Finlayson SA** (2010) Vegetative axillary bud dormancy induced by shade and defoliation signals in the grasses. *Plant Signal Behav* **5**
- Keller T, Abbott J, Moritz T, Doerner P** (2006) *Arabidopsis* *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1* controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development. *Plant Cell* **18**: 598-611
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-451
- Keuskamp DH, Sasidharan R, Pierik R** (2010) Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signal Behav* **5**: 655-662
- Kieffer M, Master V, Waites R, Davies B** (2011) TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*. *Plant J* **68**: 147-158
- Knoller AS, Blakeslee JJ, Richards EL, Peer WA, Murphy AS** (2010) *Brachytic2/ZmABCB1* functions in IAA export from intercalary meristems. *J Exp Bot* **61**: 3689-3696
- Kohlen W, Charnikhova T, Lammers M, Pollina T, Toth P, Haider I, Pozo MJ, de Maagd RA, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ, Lopez-Raez JA** (2012) The tomato *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* (*SICCD8*) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytol* **196**: 535-547
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester HJ, Ruyter-Spira C** (2010) Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in non-AM host *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*
- Koltai H** (2011) Strigolactones are regulators of root development. *New Phytol* **190**: 545-549
- Koltai H** (2011) Strigolactones are regulators of root development. *The New phytologist* **190**: 545-549
- Komorisono M, Ueguchi-Tanaka M, Aichi I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M, Sazuka T** (2005) Analysis of the rice mutant dwarf and gladius leaf 1. Aberrant katanin-mediated microtubule organization causes up-regulation of gibberellin biosynthetic genes independently of gibberellin signaling. *Plant Physiol* **138**: 1982-1993

- Kriechbaumer V, Wang P, Hawes C, Abell BM** (2012) Alternative splicing of the auxin biosynthesis gene YUCCA4 determines its subcellular compartmentation. *Plant J* **70**: 292-302
- Kumar D, Klessig DF** (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 16101-16106
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311-4322
- Ledger SE, Janssen BJ, Karunairetnam S, Wang T, Snowden KC** (2010) Modified CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 expression correlates with altered branching in kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *New Phytol* **188**: 803-813
- Lejeune-Henaut I, Hanocq E, Bethencourt L, Fontaine V, Delbreil B, Morin J, Petit A, Devaux R, Boilleau M, Stempniak JJ, Thomas M, Laine AL, Foucher F, Baranger A, Burstin J, Rameau C, Giauffret C** (2008) The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theor Appl Genet* **116**: 1105-1116
- Lester DR, Ross JJ, Davies PJ, Reid JB** (1997) Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 beta-hydroxylase. *Plant Cell* **9**: 1435-1443
- Lester DR, Ross JJ, Smith JJ, Elliott RC, Reid JB** (1999) Gibberellin 2-oxidation and the *SLN* gene of *Pisum sativum*. *Plant J* **19**: 65-73
- Leyser O** (2009) The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant Cell Environ* **32**: 694-703
- Li L, Cheng H, Gai J, Yu D** (2007) Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 genes in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **226**: 109-123
- Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuan M, Luo D, Han B, Li J** (2003) Control of tillering in rice. *Nature* **422**: 618-621
- Liang J, Zhao L, Challis R, Leyser O** (2010) Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *J Exp Bot* **61**: 3069-3078
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, Wang Y** (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* **21**: 1512-1525
- Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, Yang WC, Hooiveld GJ, Charnikhova T, Bouwmeester HJ, Bisseling T, Geurts R** (2011) Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* **23**: 3853-3865
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z** (2009) Identification and characterization of HTD2: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* **230**: 649-658
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z** (2009) Identification and characterization of HTD2: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta*
- Lopez-Raez JA, Charnikhova T, Gomez-Roldan V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Becard G, Mulder P, Bouwmeester H** (2008) Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol* **178**: 863-874
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P** (1997) Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8907-8911
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ** (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* **139**: 920-934
- Mayzlish-Gati E, LekKala SP, Resnick N, Wininger S, Bhattacharya C, Lemcoff JH, Kapulnik Y, Koltai H** (2010) Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato. *J Exp Bot* **61**: 3129-3136
- McSteen P** (2009) Hormonal regulation of branching in grasses. *Plant Physiol* **149**: 46-55
- McSteen P, Leyser O** (2005) Shoot branching. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 353-374

- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**: 128-138
- Morris SE, Cox MC, Ross JJ, Krisantini S, Beveridge CA** (2005) Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiol* **138**: 1665-1672
- Morris SE, Turnbull CG, Murfet IC, Beveridge CA** (2001) Mutational analysis of branching in pea. Evidence that Rms1 and Rms5 regulate the same novel signal. *Plant Physiol* **126**: 1205-1213
- Muller D, Schmitz G, Theres K** (2006) Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 586-597
- Multani DS, Briggs SP, Chamberlin MA, Blakeslee JJ, Murphy AS, Johal GS** (2003) Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants. *Science* **302**: 81-84
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I** (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* **46**: 880-889
- Napoli C** (1996) Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* **111**: 27-37
- Nelson D, Werck-Reichhart D** (2011) A P450-centric view of plant evolution. *Plant J* **66**: 194-211
- Nelson DC, Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM** (2012) Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 107-130
- Nelson DC, Scaffidi A, Dun EA, Waters MT, Flematti GR, Dixon KW, Beveridge CA, Ghisalberti EL, Smith SM** (2011) F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8897-8902
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S** (2004) Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol* **135**: 756-772
- Nomura T, Bishop GJ, Kaneta T, Reid JB, Chory J, Yokota T** (2003) The LKA gene is a BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 homolog of pea. *Plant J* **36**: 291-300
- O'Neill DP, Davidson SE, Clarke VC, Yamauchi Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Reid JB, Ross JJ** (2010) Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta* **232**: 1141-1149
- Ongaro V, Leyser O** (2008) Hormonal control of shoot branching. *J Exp Bot* **59**: 67-74
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113-116
- Parker C** (2009) Observations on the current status of Orobanche and Striga problems worldwide. *Pest management science* **65**: 453-459
- Parniske M** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**: 763-775
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205
- Pollock CB, Koltai H, Kapulnik Y, Prandi C, Yarden RI** (2012) Strigolactones: a novel class of phytohormones that inhibit the growth and survival of breast cancer cells and breast cancer stem-like enriched mammosphere cells. *Breast Cancer Res Treat* **134**: 1041-1055
- Proust H, Hoffmann B, Xie X, Yoneyama K, Schaefer DG, Nogue F, Rameau C** (2011) Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss Physcomitrella patens. *Development* **138**: 1531-1539
- Prusinkiewicz P, Crawford S, Smith RS, Ljung K, Bennett T, Ongaro V, Leyser O** (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Rasmussen A, Beveridge CA, Geelen D** (2012) Inhibition of strigolactones promotes adventitious root formation. *Plant Signal Behav* **7**

- Rasmussen A, Mason MG, De Cuyper C, Brewer PB, Herold S, Agusti J, Geelen D, Greb T, Goormachtig S, Beeckman T, Beveridge CA** (2012) Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea. *Plant Physiol* **158**: 1976-1987
- Richards DE, King KE, Ait-Ali T, Harberd NP** (2001) HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 67-88
- Ross JJ, Weston DE, Davidson SE, Reid JB** (2011) Plant hormone interactions: how complex are they? *Physiol Plant* **141**: 299-309
- Roumeliotis E, Kloosterman B, Oortwijn M, Kohlen W, Bouwmeester HJ, Visser RG, Bachem CW** (2012) The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. *J Exp Bot* **63**: 4539-4547
- Ruiz-Sola MA, Rodriguez-Concepcion M** (2012) Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* **10**: e0158
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, Verstappen F, Bouwmeester H** (2010) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: Another below-ground role for strigolactones? *Plant Physiol*
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M** (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* **134**: 1642-1653
- Salamini F** (2003) Plant Biology. Hormones and the green revolution. *Science* **302**: 71-72
- Sammelson RE, Casida JE** (2003) Synthesis of a tritium-labeled, fipronil-based, highly potent, photoaffinity probe for the GABA receptor. *J Org Chem* **68**: 8075-8079
- Santner A, Estelle M** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **459**: 1071-1078
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M** (2002) Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**: 701-702
- Scaffidi A, Waters MT, Bond CS, Dixon KW, Smith SM, Ghisalberti EL, Flematti GR** (2012) Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorg Med Chem Lett* **22**: 3743-3746
- Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K** (2002) The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1064-1069
- Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K** (1999) The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 290-295
- Schwartz SH, Qin X, Loewen MC** (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from Arabidopsis indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* **279**: 46940-46945
- Schwartz SH, Qin X, Loewen MC** (2004) The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from Arabidopsis Indicates That a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching. *J Biol Chem* **279**: 46940-46945
- Shen H, Luong P, Huq E** (2007) The F-box protein MAX2 functions as a positive regulator of photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **145**: 1471-1483
- Shen H, Zhu L, Bu QY, Huq E** (2012) MAX2 Affects Multiple Hormones to Promote Photomorphogenesis. *Mol Plant* **5**: 224-236
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H** (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol Biol* **69**: 429-435
- Sieburth LE, Lee DK** (2010) BYPASS1: how a tiny mutant tells a big story about root-to-shoot signaling. *J Integr Plant Biol* **52**: 77-85

- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP** (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555-1566
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ** (2005) The Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746-759
- Somers DE, Fujiwara S** (2009) Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends Plant Sci* **14**: 206-213
- Sorefan K, Booker J, Haurogne K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, Leyser O** (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* **17**: 1469-1474
- Staswick PE** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 66-71
- Stirnberg P, Furner IJ, Leyser HMO** (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* **50**: 80-94
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM** (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* **129**: 1131-1141
- Stirnberg P, Ward S, Leyser O** (2010) Auxin and strigolactones in shoot branching: intimately connected? *Biochem Soc Trans* **38**: 717-722
- Studer A, Zhao Q, Ross-Ibarra J, Doebley J** (2011) Identification of a functional transposon insertion in the maize domestication gene tb1. *Nat Genet* **43**: 1160-1163
- Sun TP** (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **6**: e0103
- Sun XD, Ni M** (2011) HYPOSENSITIVE TO LIGHT, an alpha/beta fold protein, acts downstream of ELONGATED HYPOCOTYL 5 to regulate seedling de-etiolation. *Mol Plant* **4**: 116-126
- Symons GM, Reid JB** (2004) Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiol* **135**: 2196-2206
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H** (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *J Biol Chem* **279**: 41866-41872
- 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
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H** (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**: 1028-1036
- Teper-Bamnolker P, Buskila Y, Lospesco Y, Ben-Dor S, Saad I, Holdengreber V, Belausov E, Zemach H, Ori N, Lers A, Eshel D** (2012) Release of apical dominance in potato tuber is accompanied by programmed cell death in the apical bud meristem. *Plant Physiol* **158**: 2053-2067
- Thimann KV, Skoog F** (1933) Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **19**: 714-716
- Thuring JW, Nefkens GH, Wegman MA, Klunder AJ, Zwanenburg B** (1996) Enzymatic Kinetic Resolution of 5-Hydroxy-4-oxa-endo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-en-3-ones: A Useful Approach to D-Ring Synthons for Strigol Analogues with Remarkable Stereoselectivity. *J Org Chem* **61**: 6931-6935
- Turnbull CG, Booker JP, Leyser HM** (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 255-262
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698
- Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M** (2010) The perception of gibberellins: clues from receptor structure. *Current opinion in plant biology* **13**: 503-508
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M** (2007) Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 183-198

- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N, Yamaguchi S** (2010) Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol* **51**: 1118-1126
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S** (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200
- Vanneste S, Friml J** (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005-1016
- Vanstraelen M, Benkova E** (2012) Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*
- Vierstra RD** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *10*: 385-397
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521-4531
- Vogel JT, Walter MH, Giavalisco P, Lytovchenko A, Kohlen W, Charnikhova T, Simkin AJ, Goulet C, Strack D, Bouwmeester HJ, Fernie AR, Klee HJ** (2010) SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *Plant J* **61**: 300-311
- Waldie T, Hayward A, Beveridge CA** (2010) Axillary bud outgrowth in herbaceous shoots: how do strigolactones fit into the picture? *Plant Mol Biol* **73**: 27-36
- Wang G, Romheld V, Li C, Bangerth F** (2006) Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of pea plants (*Pisum sativum* L.). *J Plant Physiol* **163**: 591-600
- Wang Y, Li J** (2008) Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 253-279
- Waters MT, Brewer PB, Bussell JD, Smith SM, Beveridge CA** (2012) The Arabidopsis ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in control of plant development by strigolactones. *Plant Physiol*
- Waters MT, Nelson DC, Scaffidi A, Flematti GR, Sun YK, Dixon KW, Smith SM** (2012) Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis. *Development* **139**: 1285-1295
- Waters MT, Scaffidi A, Flematti GR, Smith SM** (2012) Karrikins force a rethink of strigolactone mode of action. *Plant Signal Behav* **7**
- Waters MT, Smith SM, Nelson DC** (2011) Smoke signals and seed dormancy: where next for MAX2? *Plant Signal Behav* **6**: 1418-1422
- Weston DE, Elliott RC, Lester DR, Rameau C, Reid JB, Murfet IC, Ross JJ** (2008) The Pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiol* **147**: 199-205
- Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, dePamphilis CW** (2010) The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 227-235
- Wilkinson S, Kudoyarova GR, Veselov DS, Arkhipova TN, Davies WJ** (2012) Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *J Exp Bot* **63**: 3499-3509
- Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG** (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1779-1790
- Xie X, Yoneyama K** (2010) The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 93-117
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K** (2009) Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **70**: 211-215
- Xu G, Ma H, Nei M, Kong H** (2009) Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 835-840
- Yang XC, Hwa CM** (2008) Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. *Heredity* **101**: 396-404

- Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T** (2012) How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**: 1197-1207
- Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K** (2007) Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**: 125-132
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H** (2008) Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol* **179**: 484-494
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y** (2009) Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Manag Sci* **65**: 467-470
- Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H** (2007) Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**: 1031-1038
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP** (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037-3057
- Zhu H, Kranz RG** (2012) A nitrogen regulated glutamine amidotransferase (GAT1_2.1) represses shoot branching in Arabidopsis. *Plant Physiol*
- Zou J, Chen Z, Zhang S, Zhang W, Jiang G, Zhao X, Zhai W, Pan X, Zhu L** (2005) Characterizations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **222**: 604-612
- Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L** (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J* **48**: 687-698

Annexes

Annexe 1. Séquence de PsD27

>PsD27_ADNgenomique_cultivarTérèse

aagccaacaaaacacacctaataacagaatcttaaacatgcgctttgggcaaagatgcttttcatgtactatttgcgtca
ttaagcctctcttattatattatcctctctcccacgtgaaactcaatgacactcacaaATGGATGCAAAATGATCACACATAAC
ATGAGCCTAACACCAACTTTAGCTCATTGGAACCTAAGACATAAACCAAAACAACTTTGTCGTTGGAGTTCTTGCACGTCC
CACAGAAGAAACATCAAGCAAGACTCATGTATACAAAGATAACTGGTTTGATAAATTAGCCATAAACCATTTATCAAAGAGTG
TTCAAGCAGCAACAGGtaataattcatttagagtggagtttgggtttttcattggtgatgaactgtgataagttttgaatct
cgtgcaggAATCAGTAATGATAAGAGTGGTTTTGATAGCCTTGTTGAAGCAGCTACCGTGGCTTCAAAGAAATTTAGTCCTAT
TCAACAGCAAGAAGTTGTTTTAGATGCACTTGATAGAGCCTTTCCAAAGCCAATACCTTCGGTGgtgagttcttgggtttct
ctcatttttcatgtgtttttcaagtttcaaactattatcaattattactcatgaatcactgacaccagatacagcatcgaaa
tcctgctaaggtgataaatatttctgtgttggaccggtctatacaaaactttactctgacttttaattcgtgtctagttccac
accaatccgacattttcacacgtgattatcggtgtgtgtataaataatagttatatattgatattgtttgtggatggtta
attactatgtttacagATAAGGAGAGTGATGCCACCATCAAAATTAGCAAGGGAATATTTTGCTGTCTTCAACCACTTTGTTTT
TTGCTTGGTTACTCGTCCCTCCGAGGTGAxxxxxxGAGAATCAGAAGTCAATGGAAGAAGAGAAAAAACATTGTCTACATA
AAAAAgtgcaggtaaccttttagcttttcttcatataattttaaatttcttcaaaaaattgtccacaatatataactagtagtt
ttcacatgaataaatcttgtccttaaaattgttttaacaatacaGTGCAGATTCTTAGAAGAAACAAATTTGTGTTGGAATGTG
TACTAATCTCTGCAAAATGCCATCTCAAGTGTTCATAAAAGACTCCTTTGGCATGCCAGTCAACATGGTCCCAAgtattgttc
ctaacaacacactccaattagtttttgaaagatacattaaatacacattatcttcgttctgaaattgaagattattttgcagA
TTTTGATGATATGAGTTGTGAGATGATATTGGCCAGGAACCACCATCATCAACTGATGATCCTGCACTCAAGCAACCTTGCT
ATAAACTATGtaacaatatatacttattttgagaataatttcatattcatacatttattttgaaaataatgtaactaacataac
attttcacatgtaatgcaggCAAGGCAAAGAAAAAGCATGGAACAAATTTGTCTCAGCTAAgttagcagctatggagatgacaa
ttacaaaaaagatcaaattctacaataaacactatgagctaaatgaacctgcgctgtttcaccatggacaaattatatctagt
tcttctgcaatgaaCttcatatgtatttttttaataaagatcaatttagtccttggacaatgataaattcagactctgtctt
ggacaatgatactgcatgttgaagattacataacaaaaagaaatctatattttaggataaaattttctgtctcattttctattc
tcattttttcatcatcaacgaccgtttcatttcattccgttataaaagtgaagttattttagtagaaagcatatggggatatacaac
caatagttggatgaccttcatttgcaaaagtacattgcaacatgggaagttccttaggatagaaatgaagcatcaaaggtatgga
tatggcgctgtcttctgttctttggcggaatgatacaaattttacaaggcaaaaatgaaccaagacgctaaggaacacatctg
ataatgcaggaattgttaaggatgtaaggagataactactccggcctgatttataagcaaaaaagacaagttttacatttatta
agaaatatagtttaactacatttaagtttcttgaatttcatgtgagagagataacataattattagttataccctcaattaaattg
tattctactaacaataattaagtaattaatgcagtgatgcttttggataaaaggcattaaatgcacatctatttattgacattt
gct

Légende :

ATG : Codon START

TAA : Codon STOP

xxxxx : emplacement de l'intron putatif manquant

AGGCAAAGAAAAAGCA : séquence exonique

atatatacttatttt : séquence intronique

c nucléotide polymorphe entre Térèse et Torsdag

Annexe 2. Séquence de *PsLBO1*

> *PsLBO1*_ADNgenomique_cultivarTérèse

cgcccggggaggtaaataaaaaagattaaattttgttaagccagtttagacaataactcttgcaataacatgcaatttgcggag
 cgcggtttcgaatctacgcgcgtccacctattttatattttttagtggtgcctattattatgcacaattgtaattcatagattg
 catatgtaacattattcttttgaatattttactctaaacgtcacaagagcctaatttcagttccactataaatacaacctta
 gttgagaggggtgaggatatataacaatcggttcaaaggaaaaccttagttcaaaaccaacctgtttcc**ATG**GCTCCTGTACCA
 ATTTCCACCATCAACGTAGGACACATTGATGATGTACAAGAATAAGAAGAACAAACCAAGACAGTTCCTCAAAGATTGT
 AAGAGACATGACAGAAAGACCAACACTTCAAACATCTCTTTCAGCACAAAATAGTGACATGCCTGTCATGATTTCTCTAAGC
 TTAGTAAAGGGAGCAAAGAGGATTTGCTCAATGAACTTTGCAAGCTTTCGGTCGCTTGTCAGAGTGGGGATTTTTTCAGGTa
 aataagtgtcttattatgtataagttatttggaggacatacttgtaattgaaactaataatgttgagtgtgtgatt**aggtGAT**
TAATCATGAGGTTGACATCAATCTAATGGAGAACATAGAGGATATGAGTAAGGAGTTTTTCATGCTACCTTTGGAAGAGAAAC
AGAAGTACCCTATGGCACCAGGAACAGTCCAAGGATATGGGCAAGCTTTTGTCTTCAGAGGACCAGAAACTTGATTGGTGC
AACATGTTTGCTTTAGGAATTGCACCTCTCTATGTTAGGGACCCAAATCTTTGGCCAAAGAAACCAGCAAACTCAG*gtaata*
*tatat*ttttatacatagtcgtctttaaatttttgaagatcctcggaatttagccagattcaacctgacaaaagatacaaaaa
 tcttattttaactattttttaacaatgacaaagattttataagatcctatttaagtacagtttaactgtgacaaatttttagacc
 ctttacagtaaaatatatatattttttatttagtaaaatgatttttttctcttcattcatgcagTGAAACAATAGAATTG
 TACTCAAGAAAAATCAAGAACTTTGTCAAAATTTGCTGAGATACATAGCATTAGGCCTGAGTTTGAAGAAGATGTTTTGA
 GGAGATGTTTGGTGAAGCAGTACAAGCTATAAGGATGAATTACTATCCAACATGTTCAAGGCCTGACCTTGTTTTGGGCCTGA
 GTCTCATTCAGATGGAAGTGCTCTTACTGTGCTGCAGCAAGCAAAGGGAAGCCCGGTGGGCCTTCAAATACTTAAAGACAGC
 AGATGGGTCCCTGTTCAACCAATTCCAAATGCTCTTGTGTCATCAACATTGGTGACACAATAGAA**Agtaa**gactatttcacttttc
 aaagtctactgttttacacgaataacataaccgtgttaagtttttggaggttcacgttttcttttgtttaactgtgacaaatata
 ttttgagaatatatttagttccggtttaatcggtgatacattttaagtcagtgtagcctatctttcatgttttttctcaa
 agacgggcagagtaaatagttattatattgttcattttgttatggacttggttttaatttgcattttgcagGTTCTTACAAA
 TGGAAAATACAAGAGTGTGGAGCATAGGGCTGTGGCTAATGAGGAAAAAGATAGGCTTCAATTGTGACATTTTATGCTCCTA
 GTTATGAAGTAGAGCTTGGACCAATGCAAGAATTTGTGGATGAAAATCACCCATGCAAGTATAGGAGATACAATCATGGAGAG
 TATAGTAAACATTATGTGACAAATAACTTACAAGGAAAGAGGACTTTGGACTTTGCAAAAGTGGAAAAAAGTGAA**TAA**tacta
 caaactaggaagtcctggccagttctccaactagcctggatcacttattgaaaatatataaaatctaccatagaaagtatga
 aggaattcaagcatcttaattttttattttatttggttaaataaggtagaagaattagtttggcaattagaagagtgattgattgtt
 gattcataaaaaaagaagtgtgattgtggccacatacaaaagacaagagtcactattcttatatcaaatatgtattatgtata
 tgctagctttcaatggaaactaatgacatctaatatgtgattgtgtgcaaa

ATG : Codon START

TAA : Codon STOP

AGGCAAAGAAAAAGCA : séquence exonique

atatatacttattttt : séquence intronique

catattcatgcagTGAAACAATAGAATTG : zone 1^{er} TILLING (italique)

atgcattttgcagGTTCTTACAAATGGA : zone 2nd TILLING (souligné)

Annexe 3. Séquence de *PsMAX1-A10*

> *PsMAX1-A10*_ADNgenomique_cultivarTérèse

CATATGAGGTAATAGGTCATGTATGAGGTTAAACTTTAAATATATTAATCTAAATGATTAAGAAAAACCAATGCATTACTTCATGCTAGGG
AACCAATAATTCATCTATATCATCATTCATGCATAGAAAAAACACCATCTCAACTCCACTCCTAATTTAGCGATGTTATAATTAACATGGTC
CCTCAATCCATACCTTATATAAACACCACTCGTCATTCTTCTATTTCAAACCAAAAACTTGCTCATAACATATCA**ATG**ATGTTTAGTACTAT
AATTTCAATTGTGTCTTTGGTTCTAGCTTAAATGGAGGATACCTTTATGGGCCATTTTGGAGGTTAAGGAAAGTCCAGGCCACCACATCTCTT
CCACTTGTAGGACACCTTCCATTGTTAGCAAAGTATGGCCCTGATGTCTTCTCAATCCTTGCCAAGCAATATGGTCCAATTTACAGgtttctat
attctacttgcataaacataaaccttaagacataaacataattttcatgttgatgatattgtttttatgtttgttaaatggatgatgaagATTT
CATATGGGAAGACAACCTCTTATAATCATAGCAGATCCAGAGCTTTGTAAAGAGTTGGAATAAAAAAATTCAAAAACCTTCAATAGAGCA
TTCCCTCTCTATCTCTGCTTCTCTCTCACCAAAAAGGTTTATTTCTCACAAggtatgtatatattcaatttatgacttaaaagggttaataa
acaataatattctgttgaggatcatgatatttatgatctggtcgacctcaagtcgcacatcactgctgttatgagatattgttcatttgagt
tgagaatcctcgtaactatttctcttagaaaaacatctgttgcggtcatatatatgagatggtatatacactactcttgatattgtgactat
tttgatgaactcctgaaaaatttgatttatgaatcatgatagagcaatgatgggtgttttattcatatcatgcatacaaatgacaaaatgat
gttatagatgtttatctgaataatttttcaataccatgtaaaatatattgtctagataaggatataaataaatgtactttttgtacaactttt
ttacttcaaaagtcacattgtcattttcatgtggtttctaggtgggttagcctaaccactaagttcaatgctatcaacttttttagatcaca
acattattaaattaagatcctcaaaatcactcaaatccaagggtttacaaaacttttgcctttttctaactcactatgcttgatgtgcaaa
atttcaactcacaaatatttatcctccaaatttgaaataagaattgatttttgaggtcgctttcatttaagtagatgtttggtaccacaaataa
tttatcagaattattgtgagttagaagtagatttacaataatttctttaaagtagaagattcatgtgatttttaactatatctgtgatataa
ataaatattgaatttttatatatgttttttaaatgtacgtaaaattactgtgtatatattttttgtattTACTCGCAGTGGACTTCGATGAGAAA
TACTATATTATCTGTATACCAACCATCACACTTAGCCAACTTAGTGCCAAAAATGCAATCAGTTATAGAATCTGCCACACAAAATCTTGACACA
CAAAAAGAGACATAATCTTTCAAATCTTCCCTAAGACTAGCAACTGATATCATTTGGAGATGCGGCATTCGGAGTCAACTTTGGTCTCTCTA
AGCCTCAATCAATTTGTGAATCAATGAACAATCTTAACAATGTAAAACATTCAAGTGCTAGTAATGATGAAGTATCAAAATTCATCAATCAACA
TATTTACTCCACAACACAACCTCAAGATGGATTTATCCGGTTCATTTTCGATTATAATTTGGCCTAATTGCTCCTATTCTTCAAGAGCCATTTAGG
CAGATTTCTAAGAGAATACCGGGCAGTATGGATTGGAAATGGAATGTACTAATAGAAATTAACCGGTCGTCTTGACGAGATTGTTAAGAAGA
GAATGGAAGATAAAAAATCGAAGAACTTCGAAGAATTTCTGTGCTTATATTGAATGCAAGAGAATCAAAGAGTGTGTGCGGAGAATGTGTTCC
GTTGATTACATAAGCGCGGTCACTTACGAACATTTACTTGTGCTGATCAGCCACAACATCTTTTACTTTGTCTATATTGTTTATTGGTTGCT
GGTCACATAAATGTTGAGAGAAAATTGCTTCAAGAGATTGATGAGTTTGAACACATGATAGGATACCTAATGCTAAAGACCTTAATGAAAGTT
TTCTTATCTTGATCAGgaagggtgaaaaatgaagaaatttaagttttgttttgaaatttggtgaggttgcaaggactaattagcaaatatatg
tttttattttttgtctattaatgtaggtGATTAAAGAGGCAATGAGGATTTACACTGTCTCTCCATTGGTTGCAAGAGAAACATCAAAATGAA
GTAGAGATTGAGGTTACCTTCTCCAAAGGtgacatatcttagtccaatgattttttactagatttggattctctccgtttactaactatgc
atagccaatttttaattgtcttgatcaagatcaaatagttcatatttcgctagtgtcagtgcttttgaatcatatttatcaaaattgggtgcatg
cgcttaatgcgcataccttgaccataatacacatatgttttatgaaatatatgttttggtatatatttctgtagagtttttgtagcaatat
tctattactaatttatatatgagtaggGAACATGGGTATGGTTAGCACTTGGAGTTCTAGCAAAAAGCTCAAGAAACTTTGCAGAGCCAGAGAA
ATTCAAACAGAGAGGTTTGTATCCAAATGTGAAAGAAATGAAAGAGGATCCTTATGCATTATACCATTTGGAATTGGTCCAAGAGCATGT
ATTGGCCAGAAATTTTATTGCAAGAGATCAAGCTTACTTTGATTCAATTATATAGAAAAATATGTATTTCCGCATTCACTTAGCATGGAAAAAC
CTATAGAACTTGAATATGGTTTATGTTCTTAATTTCAAGCATGGTGTCAAGCTTAGAGTAATAAAAAAGAGCA**TAA**TAGTGGTTAAATGTGTAAAC
CAATTAGATTGTATTATTAAGCATTGGAAGAATTGTTATCTTTCAACATTAAAGGTAAAGTATATAATTAAGCACATGTAAATTAGTCAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

ATG : Codon START

TAA : Codon STOP

AGGCAAAGAAAAAGCA : séquence exonique

atatatacttattttt : séquence intronique

TGTGAAACATCTCGATGACGATA : UTR

catattcatgcagTGAAACAATAGAAATGG : zone 1^{er} TILLING (italique)

g et **G** mutation identifiée par TILLING

Annexe 4. Séquence PsMAX1-A12

> PsMAX1-A12_ADNgenomique_cultivarTérèse

GGCAAAGTGAAGTGTGATACTCCATTATTTTGTCTTCCCATGAATACTACCATATTATTGATTGATTATTACACATTAATA
ATTGGAATAAATTATGGAAGTGGATTGGATTGGGTACAAGGGTATCTAATTCTGATATATCATCATCACATAAGGACAAAATT
AATAAAAAAGTCCATTACATCCATTTCTCTATATAAGCTATAAGGAGTAGGGTGAACTAGAGTACCTACCTAGCCTTCAAT
AAGCAAAGTTTGTGTTT**ATG**ATGGATTGGAATGGTGGTTTCAATTGCAATTAGTAGTGTTCCTTTGGGTTCACAAATGTTT
ACACTATTGAGTTTAGTTGGAGGGTGGTTGATTTATCTGTATGGGCCATATTGGAGAGTCAGAAAGGTTCCAGGCCACCATC
TCTGCCGTTGGTAGGACATCTTCATTGCTTGCTAAACATGGTCCGGATGTTTTCTCAATACTTGCCAAACCAATATGGTCCAA
TCTACAGxxxgtttcatttttatcatatcgcaattataattattttattttatttttaataatattaatcagagaagggtataaaagatgagt
tgagaaattgtaataataataaaatttatattattataattcaattgtcttttttatataaaagggccagctgagcacaagctttatatg
ctttcagactatattttatataaaataaaatattttatgtctttgtccattttcttttcgtcaacgcccgttcgatttattataaagctga
tagctttcttttttgattgttttttttataataacattgttgatgatctaccaaggattttttttgtcttgactctcgcatatctaaaa
aatatatacgtcccatctataacattaaagatttgatgaatattttgttttttagttcttaataaaaaaaataattttatgattatcttataag
aaaatgagaatcttataaaagaaataagatatgtatttacagtgtaaaaataattttatatattgtaaaattaataactatcatatatttgatcaca
tcaactgaagtttttaagttaataataacatgatgatgtgatgaattgatagtgtaaaaattttttatacttttagtatataaagttta
actcttttaaaatgattccttccgttattttttaactgtcatttttaagtaaaaaaattattttcttttaattgttgctttcaaaattcaagta
aaattaattgttattttgtcaaaaaaatttataatttttataaaaaaaatttttaaaaaaaataaagatattacagataaaaaagaccaata
gtgaatttgcttagcaatattttaggaaaaaataatttttaaatataactaaataatcaaaaatattaatttttaataatatttttaaaactaatt
ttttttataataaggatcaaaaaacatattgttaacaacacctaattcttatttttaggtgagataggaattcttacttttaggcgagataggg
tgcatggattgttattttaagtattatatttttatccaattcattattttttaagattttttaataattttatcttataatttttattaaga
atgtatatagtttaagtcaatacacaacacccagtcacactctgttaaaaaaaatttttaagtaggttgatttggaatttggttggaatgtg
ttttaaatttaaaaaaccattataaaaaatttaatttttggtataaactcagactcaaaaactaaaaaaattcactaatccactaatcaaatattt
attattataatttttaattgtattttgatgaatattaacttagttgtttcaatttttagtctttaacattattattttaataaatcatgacgacttta
ttaattttgaatgtttcactatttagttattttgttggttaattgttaattttatggtatgcaattttaattttatttagtattttataataattt
tattaatttaattgatataattttatttttatgatgtcaaaagataataattttattttaataaaaaataaaatttttcaataatttttatgaa
aaatatgatgagttattttaattataaaaaaaatgtatttggtactcgactatccaattcaatccaacttaaaaaatgaattggttcaa
gctgattgattgatataacagagagtttattttaactcaccacaaactagaatattctatatagattgaattgaattgttttaaaacccaacaa
aatcggtcagcttcacccttagttttgttattttctttttccatttaaaactctttcttttagcacctctcttataatcaaaattttctaa
atcttctcttttaattgtttatttttaattttatctcatttaactcttatacatattttaataataacactctcatctcactacacataattttat
ttatgtgttaatttttaaaacttattaatattttattttatacaatattttttcttattatttcaataaaaaaaattctttaacatgtgtca
cataaaatacataaaattttcttccatttcaaccatttaattttaaatgtattgaatttaaatagctcaaaagttttatgtaacataattttctca
ctcaatcatcaattaccgttattgttagattgaagtttaattagtttagattgaacccatgagttgacaattgtatgcatgaatctatgatgaaaa
aaataagaataaaaaaaataaaacataagtaaaaaatttatatacacttagactaatcatgcattttaatttagggttagctaaactgtgtg
ccttggtgcacaagtttaaggttactactataaaaaaaattgtgtggaataaaaacaaaaatttaatttcaaaaaatcaaatgcacgcactccaaa
aaaatattttctataagtgatcattaactgtgtccttggtgacacatgttagcattagccttaaaattttttcttagcaaatgttagtatatt
tcttcacaccaaagggcacaaaaagaaaggagccatggaaagaactaaaaagcctagatcattattgtctattccaaatcatacaattttga
ataatttagagtggttgatcatcatcttaactcatcatattctgaactcatctgatgaatcatttaatttactgaaaaatacattattgtttcta
aaaaatgaaaaaaaatgaattgaattaaaagggtggttttagcctttaagttgctgcaatatcaataatgataccataaaaaagttcaacagtaa
aaataatcaaagaagaggagagtaaaataatgctttttcattacactttttatttatgaaattaaacttaatttaattttttcttctcttca
tggtcattaataatttttccattattttatttagtgcaxxxATTTCACATGGGAAGACAACCACTAATAATAGTAGCAGATGCAGAAC
TGTGTAAGAAGTAGGAATCAAAAAATTCAAAGACATTCAAAACAGAAGCACTCCTTCTCCCATTAAGCTTCTCCACTTCAC
CAAAAGGGTCTCTTCTTCACCAAGtaacctttcatattccataatgttttctgttttgttctgtcatgttacagaataaaat
cgacaatcgacaagcacatagaatcacatgaatgaggtttcatagatatgattttttacattttttctcagtggtgactagcca
ctaagtttgaatattactttacctttttctgttagtggaagaaactgagtcagaatcatatatgtctctataaggtagta
ctacattattttgtcggcagatgtttacaatgttttttctaacagtttcatgccactttgattttcatctgcaggGATTTCACAA
TGGGCTACATTGAGAAACACGATTTTAT**CGGTATATCAACCGTCACATCTATCA**AGATTAGTGCCAACAATGCAATCATTCA
AGAATCTGCCACTCAAAATCTTGACTCAGAGAATGAAGATGTTGTCTTTTCTAATTGTGCGTTAAACTCGCGACCGACGTGA
TT**GG**ACAAGCAGCGTTCCGGTGTCAACTTTGGTCTCTCTGAGC**CT**CATTCTGTTTGCAACGAAATCAAGAATGTTGGTGATAAT
GAAGTAACGGATTTTATCAATCAACA**C**ATATACTCGACAACCTCAACTTAAGATGGATTGTGCGGGTTCGTTCTCAATCATACT
TGGTTTACTTGTCCGATTCTTCAAGAA**C**CGTTTAGACAGATTTTGAAGCGAATACCG**GG**CACTATGGACTGGAAAATCGAGC
GTACTAACAAAAAAGTAGGCGGACGTCTTGATGAGATTGTGGAAAAGAGAATGAAAGATAGAAC**CG**GTAGTTTGAAGGATTT**C**
TTGTGCGTTATACTAAATGCTAGAGAATCAAAAGCTGTTTTCGGAGAATGTGTTACATCTGAATATATCAGTGCTGTTACTTA
TGAACACTTGCTCGCTGGCTCTGCAACCATTCTTTACGTTGTCTTCTGTAGTCTATTTGGTTGCTGCGCATCCAG**A**AGTCG
AGAAAAAATGGTTGAAGAGATTGATAGGTTTGGTTCAATAGACCAGATACCGACTTCTCAAGATCTT**C**ATGACAAGTTCCCT
TATCTTGATCAGGT**ag**ttacgttgaatgaacatccttaaaactctctagagtgtatcgaaattaaactcttataatgttctatt
tatttaattgcaggtGATCAAAAGAGGCAATGAGGATTACATCGTATCGCCATTAGTTGCAAGAGAAACATCGAATGAAGTTGA
AATCGGAGGTTACCATCTTCCAAAGGtaaaacatgtttctttttgcatgatcatcaatgcttcaaatcggttgctgatgtagt
tttgtgcaacagg**G**AACTTGGGTTTGGTTAGCACTTGGTGTCTAGCGAAAG**G**ATCCGAAAAACTTTTCAGAGCCAGAAAAAGT
TTAAACCA**G**AAAGGTTTGAT**C**CTAACTGTGAAGAGATGAAGAGAAGGCACCCCTTATGCTTTCATACCATTCGGAATCGGTCCT
CGGGCTT**G**CATCGGTCAAGAAATTTCCCTTCAAGAGATTAAGCTTTCGCTCATTCAATTATACAGAAAAATCTTGTTTCGGCA

TTCACCGAACATGGAAACCCCTTTAGAACTTGAATATGGCATAGTCCTTAACCTCAAGCATGGTGTCAAGCTTAGAGTCGTAA
AAAGAACAAATTCGAAGGTCGAGGGA**TGA**GATATAAACTAATATTAGAAATAAGTATTATGAGATAATGTAATGAATAATCAT
GTCATATACCAAATAATGTAAGTTTATGAAAGGATACTGGTTTGTTAGCTTTTAAATAGTCAAAAATAAGATGAAAAATATTG
TTGACAAAGTGTGATTTTCCATAAATTGACGACGATTCATACAGAAAACCTCCGGACCGAGTATTAATCAAAACTCACAAA
TGAACAATTATACAAATGGAGGACAAGAACATAAGCTAGATCTGGTTCTTCTTGAAGCTAGCTAGTTAACTAACTCGGACTAA
AATACAACAGACAACAAGATGTCGAACTTCTTGAAAAACGAATAAATAAAGTGATCTT

ATG : Codon START

TAA : Codon STOP

Xxxxx : emplacement de l'intron putatif manquant

AGGCAAAGAAAAAGCA : séquence exonique

atatataacttattttt : séquence intronique

TGTGAAACATCTCGATGACGATA : UTR

catattcatgcagTGAACAATAGAATTG : zone 1^{er} TILLING (italique)

G mutation identifiée par TILLING

Annexe 5. Séquences Protéiques PsMAX1-A10 et PsMAX1-A12

>PsMAX1_A12

MMDLEWWFSIRISSVSLGSTMFTLLSLVGGWLIYLYGPIYWRVKVPGPPSLPLVGHLLHLLAKHGPDVFSILANQYGPYRFHMGRQPLIIVADA
ELCKEVGIKKFKDISNRSTPSPIKASPLHQKGLFFTKDSQWATLRNTILSVYQPSHLRLVPTMQSFIESATQNLDSENEVDVFSNLSLKLATD
VIQAAFGVNFGLSEPHSVCNEIKNVGDNEVTDFINQHIYSTTQLKMDLSGSFSIILGLLVPILQEFQRQILKRIPETMDWKIERTNKKLGRL
DEIVEKRMKDRTSSKDFLSLILNARESKAVSENVFTSEYISAVTYEHLLAGSATTSTLSSVVYLVAHPVEKKMVEEIDRFGSIDQIPTSQ
DLDKFPYLDQVIKEAMRIYIVSPLVARETSNEVEIGGYHLPKETVWLALGVLAKDPKNFSEPEKFKPERFDNCEEMKRRHPYAFIPFGIGP
RACIGQKFSLQEIKLSLIHLRYKYLFRHSPNMETPLELEYGIVLNFKHGVKLRVVKRTNSKVEG

>PsMAX1_A10

MMFSTIISIVSLVLALIGGYLYGPFWRRLRKVPGPPSLPLVGHLPLLAKYGPDVFSILAKYGPYRFHMGRQPLIIADPELCKEVGIKKFKNL
SNRSIPSPISASPLHQKGLFFTRDSQWTSMRNTILSVYQPSHLANLVPKMQSVIESATQNLDQKEDIIFSNLRLATDIIGDAAFGVNFGLS
KPQSICESMNNLNNVKHSSASNDEVSNFINQHIYSTTQLKMDLSGSFSIIIGLIAPILQEPFRQILKRIPGTMWKMECTNRNLTGRLDEIVKK
RMEDKNRRTSKNFLSLILNARESKSVSENVFPFDYISAVTYEHLLAGSATTSTLSSIVYLVAGHINVERKLLQEIDFEGTHDRIPNAKDLNES
FPYLDQVIKEAMRIYIVSPLVARETSNEVEIGGYLLPKGTWVWLALGVLAKDSRNFAEPEKFKPERFDPKCEEMKRRHPYAFIPFGIGPRACIG
QKFSLQEIKLTLIHLRYKYVFRHSLSEKPIELEYGLVLFKHGVKLRVVKRA

G mutation identifiée par TILLING

Annexe 6. Séquence *RMS3LIKE1*

>*RMS3LIKE1*_ADNgenomique_cultivarTérèse

TTTTTTTAACCATAAAATTTATAACAATAGAGAATCTCTTTTATTTAACCAATGAACTGCATTATATATATCAAGTTAAGCGT
TATCTAAACAGAAATATCTCTAAGGTGTGGCTCAACTTGTTCCTCGTGGCCTCATCCTCGTAAGTCCAAATACTACGACGTGA
CTTTTCACAACCTCACACAGTCGGTGAATGATCACTTTAATTATTAAGCAAACAAGAAAGTCACAACAACCTCACACCAAAGAG
AAAAAAGAAGAAACTGTGACAGAAAATGGGATAGTGAAGAAGCACACAACGTGAAAGTTTATAGGAACAGGAAATAGGTTTC
ATTGTTCTAGCTCATGGTTTTTGGTACGGATCAATCCGTATGGAACACTTTGTACCACATCTCGTCGATGGCTTTTCGTGTGT
TCTTTATGATAACATGGGTGCTGGTACTACAAACCCCGAGTACTTTGACTCCGAGCGTCATTCAAGCTTAGAAGGTTATGCTT
ATGATTTACTGTCAATTCTAGAAGAGCTTCAAGTCGAGTCTTGATATTTGTCGGTCACTCGGTTTCAGCAATGATCGGTGCT
ATAGCTTCTATTTCTCGACCTGATCTCTTTCTTAAACTCATCATGGTTTCTGGCTCACCAGGATACTTGAACGATGTGAATTA
CTTTGAGGATTGAGCAAGAAATGATCTGAATCAGTTATTTCACTGCTATGTCAGAAAATTACAAAGCATGGTGTTAC465GGGT
TTGCTCCTTTGGCGGTAAGGGGAGACATGGATTCTGTGGCGGTACAGGAGTTTAGTCGAACCTTTATTTAATATGAGGCCGGAC
ATAGCTTTG561ATAGTGTCGAGGACGATTTTTCAGAGTGATATGAGACAGATTTTGAACTTGTACTGTTCTTGTCTATAT
TATACAGGCGGAGAAGGATATGGCGGTTCCGGTGATGGTTTCGAGATTTTACATCAACAATTGGGTGGTCAAGTCGATTGTGG
AGGTTATTGGGACGGATGGTCAATTTGCCGCAGTTAAGCTCGCCGGATGTTGTTATTCCGGTGTTGCTTAAACATATTCAACTT
AATATTGAGCCAATAAGGtaaatacttggtacattagttattaaaaatttataggtaaaatgccacatgttggaatgacaact
gaaatcaaatgtcattttcaacaactatatattgtggggttatataaattttattttccaactaagtagggaagtgtgtggac
ctaacttttaattgtggttagagaaaaaagttatcacagtacttggataaattcaatttagcaagactatactattaaatttgg
ttatgttcattgacttacctatttttctaacaatggcagCTGTCAGAGAACTATCACACTTTCCAAAACCAAGAGGCTTCTT
CAACAAACACAACAAATGCAGATGTTTCTCGTTGATGAAACTTGAGGCAGATTTGTAAATTTGAAATCCCATTTATAGGCCCAT
TGGTGTAGCTAGTAAGGCACAAGATGAAGGAAGTGGCATTAAAGAAGATGTAACCTCATGAACAATGTTATGGTGGTGTATCTTT
CGTGTGAATCATATTTGAAGATGTAACCTCATGAACAAGTCAAATATGACATTATTCGTCAATGTTAATTATTATGGTTTCGGA
TTTGATAAAAAAAAAAAAA

ATG : Codon START

TAA : Codon STOP 2ND variant d'épissage

taa : Codon STOP 1er variant d'épissage

AGGCAAAGAAAAAGCA : séquence exonique

atatatacttattttt : séquence intronique

TGTGAAACATCTCGATGACGATA : UTR

catattcatgcagTGAAACAATAGAATTG : zone TILLING (italique souligné)

G mutation identifiée par TILLING

GACGTG : C/G-box OU C/A-box motif = site de liaison de la protéine HY5

Annexe 7. Séquence de *RMS3LIKE2*

>*RMS3LIKE2*_ADNgenomique_cultivar_Caméor

```

ATTTATTATTACCACCTAACAAGAATTTCTCAGCTGCATTATATATATAATAGACCTCAAATGAATGTTCTTTTATAGATGA
CTATATTCATCCATCATTTTTTTGTAGCGTCTCCATTTCCATTACATTTTACTGTTGGTGAACCTTAGTAAGGTTTATCCTAGT
TTAAAAAAACTACCTTAAAGTAGTATATGTTTGATGTTTATCCCTGTTGCCGTCATTAAGAGTTTTCTTAGATCCAAAATAT
GACGACATAGTCTAAAACTTTAGAACCTCAAAAGTCACAATCACAAACAACGTAAACACCCCTCCCAATTCCATTAACAAAAAC
AAAACAAAAGAGAATCAATCAGCCTACAGTTATCAACAACCCAACACCAAAAAATATGGGAATAGTGAAGAAGCACACAAC
GTGAAAGTTTTTAGGAACAGGTTTACGTTTCATAGTTCTAGCTCACGGATTTGGCACAGATCAATCTGTATGGAAACACCTCGT
ACCTCATCTCCTAGAAGAATTCCGTGTCATACTTTATGACAACATGGGAGCTGGTACAACCTAATCCAGATTATTTTCGATTTCG
AACGTTACTCAACGTTAGAAGGCTATGCTTATGATTTACTCGCAATATTACAAGAAGCTTAGAGTTGATTCTTGTATCTTTGTT
GGTCATTCGGTTTTCTGCTATGATTGGAAGTGTGTCATCGATTTCTCGTCCTGATTTGTTTGCCAAAATCATCATGATATCTGC
TTCTCCAAGGTATxxxxxxxTTGAACGACAGTAATTACTTTGGAGGATTTGAACAAGAAGATTTAGATCAATTATTCATGCT
ATGGCATCAAATTACAAAGCATGGTGTTCAGGCTTTGCTCCAATGGCGATTGGAGGGGACATGGAGTCAGTGGCAGTTCAAGA
ATTCAGTCGAACTTTGTTCACATGAGACCAGACATAGCCCTAAGCGTGTACAAACAATTTTCAAAAGTGACATGAGACAAA
TATTATGTCTCGTCAGTGTCCCATGTCACATTATACAAAGTATGAAGGACTTGGCTGTTCCCGTCGTAGTGGCGGAGTATCTC
CACCAACACGTCGGCACCGAGTCAATCGTGGAGGTGATGTCGACGGAGGGTCATTTACCGCAGTTAAGCTCGCCGGATGTTGT
TATTCGGTGATACTAAAACACATTCGTTATGATATTGTAGCTTGAATGTTAATGTGTGGTTGGTGTGTGTTTGTGGTGCATGA
TTGTATTGTTTAGGTTCTGAAAAAGAAATAAAATATTGAAAGAGCCAAAGAGAGTTGCTTTTTGTTTTGTGCTTTTTCGTAG
ATGAACAAGAAAAATGGGGTTGGCAACACATGGTTCATATCAATTATGCATTGTTGTTTATTAGTCATTTTAAATATAGTTT
AGTTTTGGTAGGTGGTGTATGCCATTCGATAGGTATTGGCATCAATTGTTATTATCTTTGTATGAATAATGTGGAGATGGAGGC
TGTGAATAATAAATAAATAGTTTGTGCTTGTATCATATATTTACCAAGTTTTTTTTATTCCAAA

```

ATG : Codon START

TAA : Codon STOP 2ND variant d'épissage

AGGCAAAGAAAAAGCA : séquence exonique

atatataacttattttt : séquence intronique

TGTGAAACATCTCGATGACGATA : UTR

Xxxxxx : emplacement de l'intron putatif manquant

Annexe 8. Séquences Protéiques RMS3LIKE1 et RMS3LIKE2

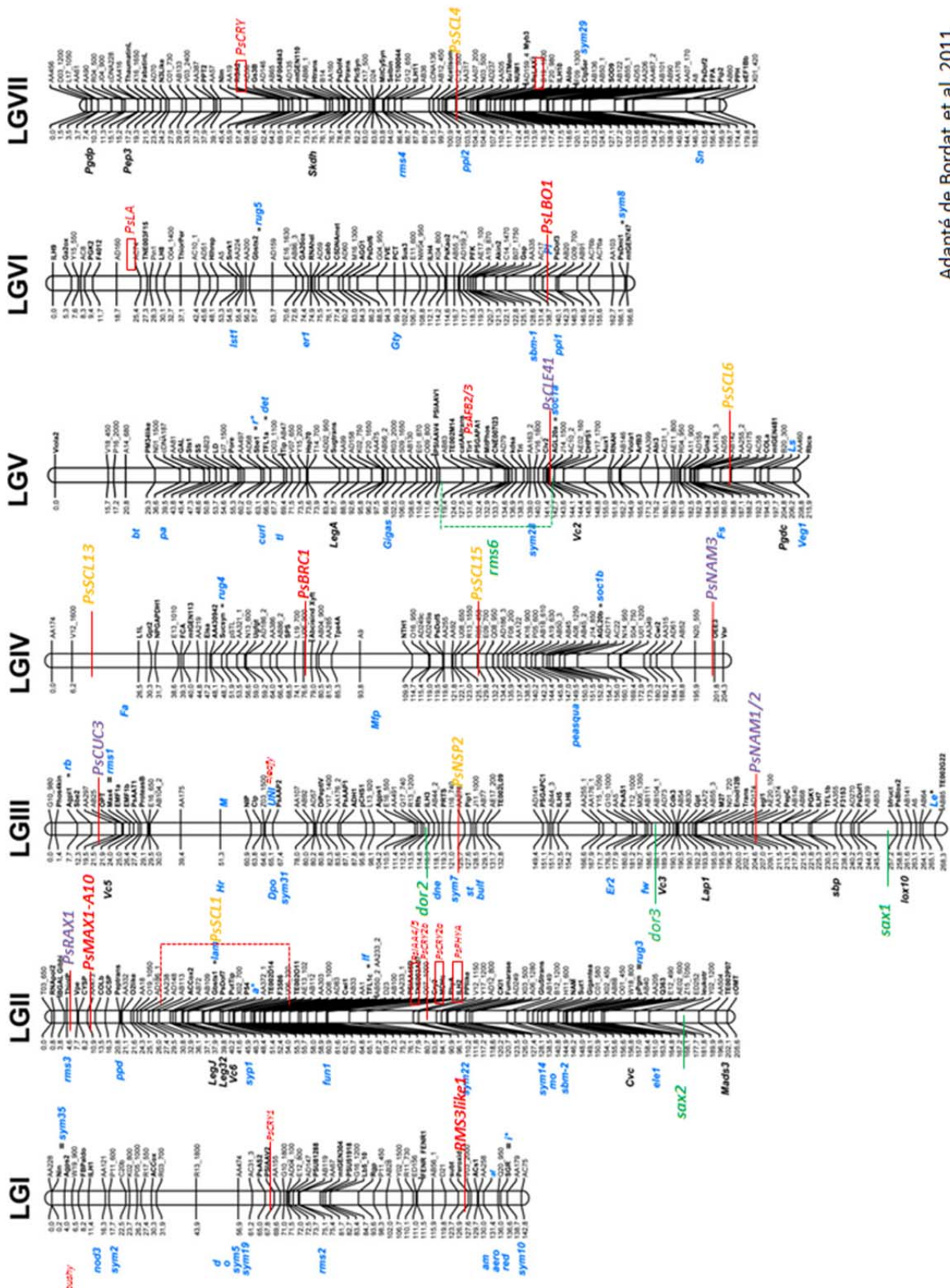
>RMS3Like-1_Proteine

MGIVEEAHNVKVLGTGNRFIVLAHGFGTDQSVWKHFVPHLVDGFRVVLVDNMGAGTTNPEYFDSEHHS
SLEGYAYDLLSILEELQVES^CIFVGHSVSAMIGAIASISRPD^LFLKLIMVSGSP^RYLN^DVNYF^GGFEQ
EDLNQLFTAMSENYKAWCYGFAPLAV^GGDMDSVAVQEF^SRTL^FNMRPDIALIVSRTIFQSDMRQILKL
VTVPCHIIQAEKDMAVPVMVSEY^LHQQLGGQSIVEVIGTDGHL^PQLSSPDV^VIPVLLKHIQLNIEPIS
CQRNYHTFQ^NQEASSTNTTNADVSSLMKLEADL

>RMS3Like-2_Proteine

MGIVEEAHNVKVLGTGSRFIVLAHGFGTDQSVWKHLVPHLL^EEF^RVILYDNMGAGTTNPDYFDFERY^S
TLEGYAYDLLAILQELRVDSCIFVGHSVSAMIGTVASISRPD^LFAKIIMISASPRYL^NDSNYFGGFEQ
EDLDQLFNAMASNYKAWCSGFAPMAIGDMESVAVQEF^SRTL^FNMRPDIALSVLQTIFKSDMRQILCL
VSV^PCHIIQSMKDLAVPVVVAEY^LHQHVGTESIVEVMSTEGHL^PQLSSPDV^VIPVILKHIRYDIVA

Annexe 9. Carte génétique du pois



Adapté de Bordat et al. 2011

Annexe 10. Listes des amorces utilisées

Nom des amorces	Séquences
<u>Obtention de <i>RMS3like1</i> et <i>RMS3like2</i> :</u>	
D14like1_141U (amorce dégénérée)	5' TCTATATGATAACATGGGNGCNGG 3'
D14like1_640L (amorce dégénérée)	5'-TGTATAATATGGCATGGNACNGTNAC-3'
D14_like_1F3'N1	5' GGAGAAGGATATGGCGGT 3'
D14_like1_F3'N2	5' TCGGAGTATTTACATCAACAATTG 3'
D14_like1_F3'N3	5' GTCAGTCGATTGTGGAGGTTA 3'
D14_like1_R5'1	5' GCTCTTCTAGAATTGACAGTAAATCA 3';
D14_like1_R5'2	5' GATGCTCGGAGTCAAAGTACTC 3'
D14_like1_R5'3	5' TAGTACCCGCCCCAATAT 3'
96_UAP	5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'
94_AUAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'.
RMS3_L1_F-100	5' AACTCACACAGTCGGTGAAT 3'
RMS3_L1_R1233	5' ATGCCACTTCCTTCATCTTG 3'
RMS3_L1_F-100	5' AACTCACACAGTCGGTGAAT 3'
RMS3_L1_R898	5' ACCCCACAATATATAGTTGTTG 3'
RMS3_L2_F-50	5' AAAAAGCAACTCTCTTTGGC 3'.
RMS3_L2_R937	5' GAGAATCAATCAGCCTACAGT 3'
<u>Obtention de <i>PsD27</i> :</u>	
PsD27_346U (amorce dégénérée)	5'-GATAGCCTTGTTGARGCNGC-3'
PsD27_912L (amorce dégénérée)	5'-GGACCGAGTAACCANGCRAARAA-3'
PsD27_p1F_5	5'-AGCCAACAAAACAAAACACCT-3'
PsD27_p1R_578	5'- GACCGAGTAACCAAGCAAAA-3'
PsD27_p1F_514	5'-ATCAAAATTAGCAAGGGAATAT-3'
PsD27_p1F_600	5'-CAGAAGTCAATGGAAGAAGAGA-3'
PsD27_p1R_725	5'-TTATGAACACTTGAGATGGC-3'
PsD27_p2F_36	5'- CAGGAACCACCATCATCAAC-3'
PsD27_p2R_213	5'- GTTGATGATGGTGGTTCCTG-3'
PsD27_p2R_700	5'- GCCGGAGTAGTATCTCCTTA-3'
PsD27_p1F_725	5'- GCCATCTCAAGTGTTCAATA-3'
PsD27_p2R_36	5'- CGCAGGTTTCATTTAGCTCAT-3'
<u>Obtention <i>PsMAX1-A12</i> :</u>	
PsMAX1-A12_3F	5'-GATGGATTTGGAATGGTGGT-3'
PsMAX1-A12_1009R	5'-TAATGGGAGAAGGAGTGCTT-3'
PsMAX1-A12_931F	5'-GCAGATGCAGAACTGTGTAAAG-3'
PsMAX1-A12_2009R	5'-CGCAGCAACCAATAGACTA-3'
PsMAX1-A12_1963F	5'-ATCCCTCGACCTTCGAATTT-3'
PsMAX1-A12_2713R	5'-CAACCACTTCCTTTACGTTGTC -3'

<u>Obtention <i>PsMAX1-A10</i> :</u>	
PsMAX1-A10_F8	5'-GGTAATAGGTCATGTATGAGGT-3'
PsMAX1-A10_R596	5'-GGTGAAGAGGAGAAGCAGAG-3'
PsMAX1-A10_j2F596	5'-CTCTGCTTCTCCTCTTCACC-3'
PsMAX1-A10_j2R1004	5'-TCTCATCGAAGTCCACTGCG-3'
PsMAX1-A10_F1004	5'-CGCAGTGGACTTCGATGAGA-3'
PsMAX1-A10_R1846	5'-TTGCAACCAATGGAGAGACA-3'
PsMAX1-A10_j4F1846	5'-TGTCTCTCCATTGGTTGCAA-3'
PsMAX1-A10_j4R3004	5'-CCAAGTGCTAACCATACCCA-3'
PsMAX1-A10_F3004	5'-ATGGGTATGGTTAGCACTTG-3'
PsMAX1-A10_R3400	5'-AAGATAACAATTCTTCCAATGCTT
PsMAX1-A10_F 600	5'-CAACCTCTTATAATCATAGC-3'
PsMAX1-A10_R1000	5'-AACAACCCATCATTGCTCTATC-3'

<u>Obtention de <i>PsLBO1</i> :</u>	
PsLBO_U515 (amorce dégénérée)	5'-CCGAAGATCAGAARCTNGAYTGGTG-3'
PsLBO_L777 (amorce dégénérée)	5'-ACTTGAACATGGNGGRTARTTTCAT-3'
PsLBO_U1024_3'	5'-AGTTCCGGTTTAATCGTGATAC-3'
PsLBO_U968_3'	5'-GGAGGTTACGTTTTCTTTGT-3'
PsLBO_L520_5'	5'-GTCAACCTCATGATTAATCACC-3'
PsLBO_L537_5'	5'-ACTCATATCCTCTATGTTCTCC-3'
PsLBO_L580_5'	5'-TGTTTCTCTTCCAAAGGTAGCA-3'
PsLBO_U525	5'-AGGTGATTAATCATGAGGTTGAC-3'
PsLBO_L923	5'-GTCTTTAAGTATTTGAAGGCC-3'
PsLBO_F2006	5'-TTAAAGACAGCAGATGGGTC-3'
PsLBO_R2609	5'-AGTTTCCATTGAAAGCTAGCAT-3'

<u>TILLING <i>PsMAX1-A12</i> :</u>	
Max1_N1F	5' CATCTGCAGGGATTCAATGGGCTAC 3'
Max1_N1R	5' GTTTATATCTCATCCCTCGACCTTCG3'
Max1_N2F700	5'CGGTATATCAACCGTCACATCTATC3'
Max1-N2R800	5'ACGACTCTAAGCTTGACACCATG3'

<u>TILLING <i>PsMAX1-A10</i> :</u>	
MaxA10_N1F2	5' CCGTTCGATTACATAAGCGCGG 3'
MaxA10_N1R3	5' ATACTTTACCTTAATGTTG 3'
MaxA10_N2Ft1	5'CACGACGTTGTAAAACGACGGATACCTAATGCTAAAGACC 3'
MaxA10_N2Rt1	5'GGATAACAATTCACACAGGGGTTTACACATTTAACCAC 3'

<u>TILLING <i>PsLBO1</i> :</u>	
PsLBO_TILN1_F	5'-GGTTTTTTCAGGTAAATAAGT-3'
PsLBO_TILR1_R1	5'-CACTGTTTACACGAATAACATA-3'
PsLBO_TILN1_R2	5'-TGTTAAGTTTTTGGAGGTTCA-3'
PsLBO_TILN2_F	5'-TTTGAGGACATACTTG-3'
PsLBO_TILN2_R	5'-GGGTCCCTGTTCAACCA-3'

<u>TILLING RMS3LIKE1 :</u>	
D14_N1F	5'-GGAAACACTTTGTACCACATCTCG -3'
D14_N1R	5'-TCCTTCATCTTGTGCCTTACTAGC -3'
D14N2Ftag	5'- ACGACGTTGTAAAACGAC GATAACATGGGTGCTGG -3'
D14N2Rtag	5'- TAACAATTCACACAGG CAATGGGCCTATAATGGG -3'

<u>Amorces marqueurs CAPS et dCAPS pour <i>PsLBO1</i> :</u>	
LBO2083__CAPS_F	5' GTAAGGAGTTTTTCATGCTACC 3'
LBO2083__CAPS_R	5' ATATATTACCTGAGTTTTGCTGGT 3'
LBO2100/2698__CAPS_F	5' GCCACGATTCAACCATGACA 3'
LBO2100__CAPS_R	5' TGAATTGGTTGAACAGGGA 3'
LBO2698__CAPS_R	5' GAACATGTTGGATAGTAATTCATCC 3'
LBO3182_dCAPS_F	5' ACTTGATTGGTGCAACATGTTTGCTCTAG 3'
LBO3182_dCAPS_R	5' CGTGGCTAATTTGCCGAGGATCT 3'
LBO2083__CAPS_F	5' GTAAGGAGTTTTTCATGCTACC 3'
LBO2083__CAPS_R	5' ATATATTACCTGAGTTTTGCTGGT 3'
LBO4334__CAPS_F	5' GTTGAGTGTTGTGATTAGGTGAT 3'
LBO4334__CAPS_R	5' CCCATATCCTTGGACTGTTC 3'

<u>Amorces marqueurs CAPS et dCAPS pour <i>PsMAX1-A12</i> :</u>	
MAX1A12_799_CAPS_F	5'-GATTGGACAAGCAGCGTTC 3'
MAX1A12_799_CAPS_R	5'-ATAAGCGACAAGAAATCCTTCG-3'
MAX1A12_1032_CAPS_F	5'-GATCAAAGAGGCAATGAGGA-3'
MAX1A12_1032_CAPS_R	5'-TTCACAGTTAGGATCAAACCT-3'
MAX1A12_1644_dCAPF	5'-TGTCGCTTAAACTCGCGACCGACGTGACT-3'
MAX1A12_1644_dCAPR	5'-AGAACGAACCCGACAAATCC-3'
MAX1A12_1995_dCAPF	5'-ACTTTTCAGAGCCAGAAAAGTTTAAACCG-3'
MAX1A12_1995_dCAPR	5'-CTGTATAAATGAATGAGCGAAAGCT-3'
MAX1A12_2286_CAPSF	5' -TATGAAAGCATAAGGGTGCC-3'
MAX1A12_2286_CAPSR	5'-GTTGAAATCGGAGGTTACCA-3'

<u>Amorces marqueurs CAPS et dCAPS pour <i>PsMAX1-A10</i> :</u>	
MAX1A10_6547_dCAPSF	5'-TTTTTTGCTTATTAATGTAGGTGATTGAA-3'
MAX1A10_6547_dCAPSR	5'-AGTTAGTAAACGGAGAGAATCC-3'
MAX1A10_2622_CAPSF	5'-GATACCTAATGCTAAAGACCTTA-3'
MAX1A10_2622_CAPSR	5'-ACCTCCAATCTCTACTTCATT-3'
MAX1A10_1190_CAPSF	5'-GGATACCTAATGCTAAAGACCT-3'
MAX1A10_1190_CAPSR	5'-CCATGTTCCCTACTCATATATAA-3'
MAX1A10_2503_dCAPSF	5'-CATGGGTATGGTTAGCACTTGGAGTGCTA -3'
MAX1A10_2503_dCAPSR	5'-CCAATACATGCTCTTGGACCA-3'
MAX1A10_2824_CAPSF	5'-TTTCGCTAGTGTGAGTGTCT-3'
MAX1A10_2824_CAPSR	5'-CAATACATGCTCTTGGACCA-3'
MAX1A10_4601_CAPSF	5'-TTTCGCTAGTGTGAGTGTCT-3'

MAX1A10_4601_CAPSR	5'-CAATACATGCTCTTGGACCA-3'
MAX1A10_3006_CAPSF	5'-TTCATACCATTGGAATTGGTC-3'
MAX1A10_3006_CAPSR	5'-CTTGACACCATGCTTGAAATTA-3'

Amorces marqueurs CAPS et dCAPS pour *RMS3like1* :

RMS3-like-561__dCAPS_F	GGTGTTACGGGTTTGCTCCTTTGGCGCTA
RMS3-like-561__dCAPS_R	CCGTCCCAATAACCTCCACAA
RMS3-like-1482/3246__dCAPS_F	TAAACTCATCATGGTTTCTGGCTCACCTA
RMS3-like-1482/3246__dCAPS_R	CTCTGAAAAATCGTCCTCGACACT
RMS3-like-3801__dCAPS_F	AATTCTAGAAGAGCTTCAAGTTGAGTCGT
RMS3-like-3801__dCAPS_R	GCCAAAGGAGCAAACCCGTA
RMS3-like-3801__dCAPS_F2	AATTCTAGAAGAGCTTCAAGTTGAGTCTA
RMS3-like-3801__dCAPS_R2	CGCCACAGAATCCATGTCTC
RMS3-like-4261__dCAPS_F	TGGTTTCTGGCTCACCGAGATACTTGAC
RMS3-like-4261__dCAPS_R	ATCGTCCTCGACACTATCAAAGCT

PCR quantitative

PsD27_F3	5'-CTACCGTGGCTTCAAAGAAA-3'
PsD27_R3	5'-ATTTTGATGGTGGCATCACT-3'
PsLBO F1	5'-TCATGCTACCTTTGGAAGAGA-3'
PsLBO R1	5'-GAGGTGCAATTCCTAAAGCA-3'
PsMAX1-A12_F3	5'-AAAACTAGGCGGACGTCTT-3'
PsMAX1-A12_R3	5'-TCCGAAACAGCTTTTGATTC-3'
PsMAX1-A10_F3	5'-GGTCGTCTTGACGAGATTGT-3'
PsMAX1-A10_R3	5'-GTAAGTGACCGCGCTTATGT-3'
RMS3like1F1	5'-CTTTGATAGTGTGCGAGGACGA-3'
RMS3like1R1	5'-GACCACCCAATTGTTGATGT-3'
RMS3like2F1	5'-GCCCTAAGCGTGTTACAAAC-3'
RMS3like2R1	5'-ACTCGGTGCCGACGTGT-3'
R3L1.1_F1	5'-TTGAGCCAATAAGCTGTCAGAGAAC-3'
R3L1.1_R1	5'-CACTTCCTTCATCTTGTGCCTTA-3'
R3L1.2 F1	5'-CTAACAATGGCAGCTGTCAG-3'
R3L11.2_R1	5'-CTTCTTAATGCCACTTCCTTCA-3'

Cartographie

LBO_ carto_F	5' CTTGTCAAGAGTGGGGATTT 3'
LBO_ carto_R	5' TTTGCCGAGGATCTTCAAAAAT 3'
RMS3L1_65_F	5'-TAGCTCATGGTTTTGGTACG -3'
RMS3L1_1161_R	5'-TCTGCCTCAAGTTTCATCAACG -3'

« Vers une meilleure compréhension du mode d'action des strigolactones et de leur interaction avec les autres hormones du développement »

RÉSUMÉ

L'étude de la ramification chez le pois, à partir des mutants hyper-ramifiés *ramosus* (*rms*) a permis de mettre en évidence l'existence d'une nouvelle famille d'hormones végétales : les strigolactones, inhibant la ramification des plantes à graines. La découverte de cette hormone végétale ouvre de nouvelles pistes de recherche sur la biosynthèse et la perception de cette nouvelle hormone. Nous avons montré le rôle du gène *PsBRC1*, codant un facteur de transcription de type TCP et homologue du gène *TEOSINTE BRANCHED1* du maïs, dans la voie de signalisation des strigolactones. L'étude de ce gène nous a permis d'avoir une meilleure compréhension de l'interaction entre strigolactones et cytokinines dans le contrôle de la ramification, de la dynamique de la levée de dormance des bourgeons axillaires, et d'effectuer les premières études de relations structure-activité des strigolactones sur l'inhibition de la ramification chez le pois.

Nous avons étudié et caractérisé d'autres éléments dans la voie de signalisation. Chez le pois, deux mutants, autres que *Psbrc1*, ne répondent pas à l'application de strigolactones, *rms3* et *rms4*. Le gène *RMS4* code pour une protéine à boîte F. Nous nous sommes focalisés ici sur le mutant hyper-ramifié *rms3*. Nous avons montré que *RMS3* est l'homologue du gène *D14* du riz, codant pour une protéine de la superfamille des α - β /hydrolases. Ces protéines peuvent avoir une activité enzymatique et ainsi pourraient modifier les strigolactones en un composé actif. Le récepteur des gibbérellines GID1 appartient aussi à cette famille, *RMS3* est donc un bon candidat pour être le récepteur des strigolactones. Nous avons utilisé une strigolactone radiomarquée afin d'étudier le métabolisme de l'hormone. Nous avons découvert que la strigolactone synthétique, ^3H -GR24 est clivée en un composé inconnu au contact des racines, indépendamment de l'activité de la protéine *RMS3*. Ce composé de structure inconnue se retrouve aussi dans la sève du xylème alors que ^3H -GR24 y est absent.

Outre un phénotype hyperbranché les mutants *rms* présentent une diminution de la taille de leurs entre-nœuds, qui n'est pas due à l'augmentation de la ramification. Nous avons étudié l'origine du nanisme des mutants déficients en strigolactones et affectés dans la réponse à l'hormone. Des approches génétiques et moléculaires ont été utilisées pour tester une interaction possible entre les strigolactones et les gibbérellines. Nous avons montré que les strigolactones régulaient l'élongation des entre-nœuds indépendamment des gibbérellines.

Le pois est un excellent modèle en génétique et en physiologie. Avec le développement de nouvelles techniques à l'INRA (TILLING; UNIGENE : ensemble de plus de 40000 séquences exprimées de pois), nous avons pu identifier de nouveaux gènes de biosynthèse des strigolactones chez le pois et obtenir plusieurs nouveaux mutants de pois. Ces mutants seront essentiels pour les futures études du laboratoire et pourront permettre d'identifier de nouveaux intermédiaires dans la biosynthèse et le métabolisme des strigolactones.

Mots clés : strigolactone, signalisation, alpha beta hydrolase, TCP, gibbérellines, biosynthèse, pois

« Towards a better understanding of strigolactone mode of action of and their interaction with other plant hormones »

ABSTRACT

The study of shoot branching in pea, using the high branching *ramosus* (*rms*) mutants has highlighted the existence of a new family of plant hormones: the strigolactones, inhibiting shoot branching in seed plants. The discovery of this novel plant hormone opens novel research areas in the deciphering of strigolactone biosynthesis and strigolactone perception. We have shown the role of the pea TCP transcription factor, *PsBRC1*, the homolog of the maize *TEOSINTE BRANCHED* (*TB1*) in strigolactone signaling. The *PsBRC1* gene was shown to have a role in integrating strigolactone and cytokinin pathways, and allowed to have a better understanding of the dynamics of bud outgrowth, and to perform the first strigolactone Structure-Activity Relationship studies for branching inhibition in pea.

We investigated and characterized other elements in the signaling pathway, including the strigolactone receptor. In pea, two mutants, other than *Psbrc1*, do not respond to the application of strigolactones, *rms3* and *rms4*. The *RMS4* gene encodes an F-BOX protein and here we focused on the high branching *rms3* pea mutant. We have shown that *RMS3* is the homolog of the rice *D14* gene encoding a protein of the α - β /hydrolase superfamily. Consequently *RMS3* may have an enzymatic activity to modify strigolactone into an active compound. The gibberellin receptor GID1 also belongs to this family, therefore *RMS3* is also a good candidate for the strigolactone receptor. We used a radiolabeled synthetic strigolactone, ^3H -GR24, to investigate the metabolism of the hormone. We discovered that the synthetic strigolactone, ^3H -GR24 is cleaved in an unknown compound in the root media independently of *RMS3* activity, compound which is also found in the xylem sap in contrast to ^3H -GR24.

The *rms* mutants exhibit not only a high branching phenotype but also a reduced height which is not due to this high branching. We investigated the origin of the dwarfism of strigolactone-deficient and response mutants in pea. Genetic and molecular approaches have been used to test a possible interaction between strigolactones and gibberellins. We have shown that strigolactones regulate stem elongation independently of gibberellin.

Pea is a powerful model plant for genetics and physiology. With the development of new facilities at INRA (TILLING; UNIGENE set of more than 40000 expressed sequences), we were able to identify new biosynthesis genes in pea and to obtain several novel pea mutants. These mutants will be essential for future studies of the laboratory in particular to identify new intermediates in strigolactone biosynthesis and metabolism.

Keywords: strigolactone, signaling, alpha-beta hydrolase, TCP, gibberellins, biosynthesis, pea