



Contrôle génétique et moléculaire du stolonnage : Balance entre reproduction sexuée et multiplication végétative chez le fraisier diploïde

Tracey Tenreira

► To cite this version:

Tracey Tenreira. Contrôle génétique et moléculaire du stolonnage : Balance entre reproduction sexuée et multiplication végétative chez le fraisier diploïde. Biologie de la reproduction. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0415 . tel-03631233

HAL Id: tel-03631233

<https://theses.hal.science/tel-03631233>

Submitted on 5 Apr 2022

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : Biologie végétale

Par Tracey **TENREIRA**

**Contrôle génétique et moléculaire du stolonnage –
Balance entre reproduction sexuée et multiplication végétative
chez le fraisier diploïde**

Directrice de thèse:
Mme Béatrice DENOYES, Ingénieur de recherche Hors Classe, INRA Bordeaux

Soutenue le : 18 décembre 2015

Devant le jury constitué de :

Mme Evelyne COSTES, Directeur de recherche, INRA Montpellier.....Rapporteur
M Jean-Michel DAVIERE, Maître de conférences, CNRS Strasbourg.....Examinateur
M Fabrice FOUCHER, Directeur de recherche, INRA Angers.....Rapporteur
M Michel HERNOULD, Professeur, Université de Bordeaux.....Président

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION 7

I. Balance entre les deux modes de reproduction..... 8

I.1 La reproduction sexuée : la floraison..... 8

I.1.1 Physiologie de la floraison..... 8

I.1.1.a Phase de juvénilité 9

I.1.1.b Phase adulte 10

I.1.2 Contrôle génétique et moléculaire de la floraison..... 10

I.1.2.a Arabidopsis thaliana: une plante modèle 10

I.1.2.b Gènes de l'identité du méristème floral..... 11

I.1.2.c Les intégrateurs floraux..... 12

I.1.3 FT et la notion de florigène 12

I.1.4 Les répresseurs floraux..... 13

I.1.5 Facteurs influençant la floraison..... 14

I.1.5.a Facteurs environnementaux 14

(1) La photopériode..... 14

(2) La température 15

I.1.5.b Facteurs endogènes..... 16

(1) La voie autonome et âge de la plante..... 16

- La voie autonome..... 16

(2) Les sucres 16

(3) Les gibbérellines..... 17

I.2 La reproduction asexuée: la multiplication végétative..... 18

I.2.1 Les méristèmes axillaires: éléments clefs de l'équilibre entre développement végétatif et floraison..... 18

Dominance apicale 18

Contrôle génétique..... 19

Régulation hormonale 20

I.2.2 Différents types de multiplication végétative 20

I.2.2.a Base de données CLO-PLA 20

I.2.2.b Multiplication par formation de bulbes..... 21

I.2.2.c Propagation par rhizomes 21

I.2.2.d La tubérisation 21

I.2.2.e Clonage par stolons..... 22

I.2.3 Un avantage évolutif et écologique..... 22

I.2.3.a Contexte évolutif..... 22

I.2.3.b Avantages et inconvénients adaptatifs..... 23

I.2.4 Allocation des ressources : priorité à la reproduction sexuée..... 24

I.3 Contrôle moléculaire de la balance entre reproduction sexuée et multiplication végétative..... 25

I.3.1 Un exemple d'équilibre : la pomme de terre..... 25

I.3.1.a Implication de FT dans la balance floraison / tubérisation 25

I.3.1.b Rôle des hormones dans la multiplication végétative 26

I.3.1.c Contrôle du stolonnage de la pomme de terre ? 27

I.3.2 FT : implication dans la multiplication végétative 27

II. Les gibbérellines..... 28

II.1 Métabolisme 28

II.2 Transduction du signal 29

II.2.1 Perception des GA par les GID 29

II.2.2 Les protéines DELLA, cibles des GA..... 29

II.2.3 Complexe GID-GA-DELLA dans la réponse au signal GA..... 30

II.2.4 Migration des GA à travers la plante..... 30

II.2.5 Inactivation des GA et formes conjuguées..... 31

II.3 Rôle des gibbérellines dans le développement 31

II.3.1 Implication des GA dans le développement végétatif..... 31

II.3.2 Rôle des GA dans la floraison 32

II.3.2.a Activation de la floraison chez les plantes annuelles 32

II.3.2.b Répression de la floraison chez les plantes pérennes..... 32

II.4 Régulation de la voie métabolique	33
II.4.1 Homéostasie des GA.....	33
II.4.1.a Boucle de rétrocontrôle.....	33
II.4.1.b Régulation par des facteurs de transcription	33
II.4.2 Interaction entre les GA et les autres hormones	34
III. Le Fraisier : un modèle d'équilibre entre reproduction sexuée et multiplication végétative.....	36
III.1 Histoire et contexte économique	36
III.1.1 Histoire et domestication.....	36
III.1.2 Origine du fraisier cultivé octoploïde : <i>Fragaria x ananassa</i>	36
III.1.3 Le marché de la fraise : contexte économique	37
III.2 Fraisier diploïde: modèle d'étude du fraisier octoploïde	37
III.2.1 Avantages et outils disponibles du fraisier diploïde	37
III.2.2 Transférabilité des informations génétiques du fraisier diploïde au fraisier cultivé octoploïde.....	38
III.3 Le fraisier, une plante herbacée pérenne.....	38
III.3.1 Description botanique.....	39
III.3.2 Cycle de développement.....	40
III.4 La floraison du fraisier	40
III.4.1 Les différents types de floraison.....	41
III.4.1.a Les génotypes non-remontants	41
III.4.1.b Les génotypes remontants.....	41
III.4.2 Le contrôle génétique et moléculaire de la remontée florale chez le fraisier diploïde	42
III.4.3 Facteurs influençant la floraison et la remontée du fraisier	43
III.4.3.a Photopériode et qualité de la lumière.....	43
III.4.3.b [Photopériode x Température]	44
III.4.3.c Besoins en froid	44
III.5 La multiplication végétative du fraisier	44
III.5.1 La formation de cœurs : un événement méconnu	44
III.5.2 Contrôle génétique du stolonnage.....	45
III.5.3 Facteurs influençant le stolonnage.....	45
III.5.4 Rôle des GA dans la production de stolons	45
IV. Enjeux, objectifs et stratégies de la thèse	47
IV.1 Enjeux et objectifs de la thèse.....	47
IV.2 Objectifs de la thèse	47
IV.3 Stratégies utilisées	48
CHAPITRE 2 : RESULTATS	49
- PARTIE 1 -	50
IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU GENE DE STOLONNAGE CHEZ LE FRAISIER DIPLOÏDE <i>FRAGARIA VESCA</i>	50
I. Une délétion dans le gène de biosynthèse des gibbérellines, <i>FvGA20ox4</i>, entraîne le phénotype de non-stolonnage.....	51
II. Résultats complémentaires	78
II.2 Le devenir des méristèmes axillaires est dépendant de leur localisation sur le plant.....	78
II.3 En conditions naturelles, la délétion au niveau du gène <i>FvGA20ox4</i> n'affecte pas la hauteur totale du plant.....	79
II.4 Essais préliminaires du dosage de GA endogènes dans plusieurs organes végétatifs.....	80
II.5 La surexpression du gène <i>FvGA20ox4</i> _délété provoque un phénotype nain chez <i>Arabidopsis thaliana</i> sauvage.....	81
II.6 Comparaison des modèles structuraux des protéines <i>FvGA20ox4</i> et <i>FvGA20ox4</i> _délétée	82
II.7 L'application de traitements (GA ₃ et ProCa) modifient le nombre de hampes et de stolons, chez les génotypes NRU et RU respectivement	83

II.7.1 La pulvérisation de GA ₃ provoque la diminution du nombre de stolons chez les individus stolonnants (RU)	83
II.7.2 Une modification de la teneur en GA entraîne une augmentation de la production de cœurs uniquement chez le génotype stolonnant (RU)	84
II.7.3 L'apport exogène de GA actives entraînent une diminution du nombre de hampes florales chez les génotypes non-stolonnants / remontants	84
III. Discussion	86
III.1 La perte de trois acides aminés entraîne une perte totale d'activité enzymatique	86
III.2 Le gène <i>FvGA20ox4</i> aurait-il un rôle spécifique au niveau des méristèmes de stolons ?	87
III.3 L'excès ou la limitation en GA actives entraîne l'arrêt du stolonnage chez le génotype stolonnant et la production de cœurs	88
III.4 Les GA actives causent la production de stolons et une diminution de la production de hampes florales chez le génotype non-stolonnant	89
- PARTIE 2 -	90
VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DE LA BALANCE ENTRE REPRODUCTION SEXUEE ET MULTIPLICATION VEGETATIVE	90
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE	116
IV Discussion générale	117
IV.1 <i>FvGA20ox4</i> : gène responsable du stolonnage chez le fraisier diploïde <i>Fragaria vesca</i>	117
IV.1.1 Réduction du locus <i>RUNNERING</i>	117
IV.1.2 La non-fonctionnalité du gène <i>FvGA20ox4</i> est responsable du phénotype de non-stolonnage	118
IV.1.3 <i>FvGA20ox4</i> : action spécifique au niveau des méristèmes axillaires de stolons ?	118
IV.1.3.a Contrôle du devenir des méristèmes axillaires	118
IV.1.3.b <i>FvGA20ox4</i> : action spécifique aux stolons ?	119
IV.1.4 Antagonisme entre production de cœurs et stolonnage	120
IV.2 Vers une meilleure compréhension de la balance physiologique entre les deux modes de reproduction	121
IV.2.1 Exemple de la balance physiologique observée	121
IV.2.2 Dominance de la remontée florale sur le stolonnage	121
IV.2.3 Potentiel rôle des gènes <i>FT</i> dans la quantité de hampes florales et de stolons?	122
Conclusion et perspectives	123
Références bibliographiques	124

Abréviations

% :	Pourcentage
°C :	Degrés Celsius
2ODD:	2-oxoglutarate-dépendante dioxygénases
3'UTR :	3' UnTranslated Region
5'UTR :	5' UnTranslated Region
ABA :	Acide Abscissique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANOVA :	analysis of variance, analyse de variance
AP1:	APETALA 1
ARF:	Auxine Response Factor
ARN :	Acide ribonucléique
ARNi :	ARN interférant
ARNm :	ARN messenger
AUX :	Auxines
Aux/IAA:	AUXin/Indole-3- Acetic Acid
BR:	Brassinostéroïdes
Br1:	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
CAL:	CAULIFLOWER
CF :	continuous flowering
CGO:	organe de croissance végétative
CIM :	composite interval mapping, cartographie par intervalle composite
CK :	Cytokinines
CLO-PLA:	CLOnal PLAnt
cM :	centiMorgan
CO :	CONSTANS
CPS:	ent-diphosphate synthase
DDF1:	DWARF AND DELAYED FLOWERING1
EMF:	EMBRYONIC FLOWER
ET :	Ethylène
F:	Fargesia
FD:	FLOWERING LOCUS D
FLC :	FLOWERING LOCUS C
FLM:	FLOWERING LOCUS M
FT:	FLOWERING LOCUS T
FUL:	FRUITFULL
GA :	Gibbérellines
GA2ox:	GA 2-oxidase
GA3ox:	GA 3-oxidase
GA20ox:	GA 20-oxidase
GAI:	Gibberilic acid -INSENSITIVE
GDR :	Genome Database for Rosaceae
GGDP:	GéranylGéranylDiPhosphate
GID:	GIBBERILIC ACID INSENSITIVE DWARF
h :	Heure
HXK1:	HEXOKINASE 1
K:	potassium
KAO:	ent-Kaurenoic oxydase
Kb :	Kilo base
KNOX:	KNOTTED1-like homeobox
KO:	ent-Kaurène oxydase
KS:	ent-Kaurène synthase

LAS:	LATERAL SUPPRESSOR
LFY:	LEAFY
LOD :	logarithm of the odds
LR :	linear regression, régression linéaire
Mb :	Méga base
miARN :	micro Acide RiboNucléique
N :	nitrate
NRU :	Non-runnering
Nt :	Nucléotide
OF :	Once flowering
ORF :	Open Reading Frame
P:	Phosphate
Pb :	Paire de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PEBP:	PhosphatidylEthanolamine Binding Protein
PF :	Perpetual Flowering
PIF:	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIN:	PIN-FORMED
PKL:	PICKLE
POTH1:	POTATO HOMEBOX 1
QTL :	Quantitative Trait Loci
RGA:	REPRESSOR OF ga1-3
RGS:	REPRESSION OF GROWTH
RNAi:	ARN interférent
RT-PCR :	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
RU :	Runnering
SAM :	Shoot Apical Meristem
SF:	Seasonal Flowering
SFL:	Seasonal Flowering Locus
SLY:	SLEEPY
SOC1:	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS
SPY:	SPINDLY
St:	<i>Solanum tuberosum</i>
STM:	SHOOT MERISTEMLESS
StSP6A:	<i>SELF-PRUNING</i> protein 6A
StSPD3:	<i>SELF-PRUNING</i> protein 3D
SVP:	SHORT VEGETATIVE PHASE
T6P:	tréhalose-6-phosphate
TAIR :	The Arabidopsis Information Ressources
TCP:	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, PCF
TFL1:	TERMINAL FLOWER LOCUS 1
TPS:	terpène synthase
TPS1:	TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE
Ub:	Ubiquitination
VIN3:	VERNALIZATION INTENSIVE 3
VRN :	VERNALIZATION
vs. :	<i>versus</i>

Chapitre 1 : Introduction

I. Balance entre les deux modes de reproduction

De nombreuses Angiospermes sont capables de combiner deux modes de reproduction, une reproduction sexuée et une multiplication végétative. Cette dernière permet la formation de clones, génétiquement identiques. La division des Angiospermes comporterait près de 80% de lignées capables de floraison et d'une forme de reproduction asexuée (Klimes *et al.*, 1997).

Ainsi, il est légitime de se demander comment fonctionne la balance entre la reproduction sexuée (par la floraison) et la multiplication végétative ? Cette question demande que l'on s'attache avant à mieux comprendre le fonctionnement de chacun de ces deux modes de reproduction. La suite de ce chapitre présente une vision globale mais non exhaustive des différents modes de reproduction, leurs réseaux géniques associés ainsi que l'implication des facteurs endogènes et environnementaux dans ces processus. Enfin, les connaissances relatives à certaines espèces capables de maintenir l'équilibre reproducteur sont discutées.

I.1 La reproduction sexuée : la floraison

La floraison se définit par la transition entre un état végétatif et un état reproducteur qui conduit à la formation d'organes reproducteurs à l'intérieur de la fleur puis à la formation du fruit contenant les graines. Chez les Angiospermes, l'occurrence de la floraison au cours du cycle de vie permet de regrouper les plantes en deux catégories, les plantes monocarpiques et les plantes polycarpiques.

Les plantes monocarpiques ne fleurissent qu'une seule fois au cours de leur cycle de vie qu'il soit annuel ou pluriannuel alors que les plantes polycarpiques qui incluent les plantes pérennes sont capables de fleurir plusieurs fois au cours de leur existence. Chez ces plantes, un système d'équilibre entre développement végétatif et floral est mis en place de façon à maintenir une réserve de méristèmes végétatifs qui permettront d'assurer les croissances végétatives successives et les floraisons multiples.

I.1.1 Physiologie de la floraison

Les végétaux comportent deux types de méristèmes primaires qui sont des structures composées de cellules souches totipotentes capables de générer tous les organes : un méristème apical et un méristème racinaire.

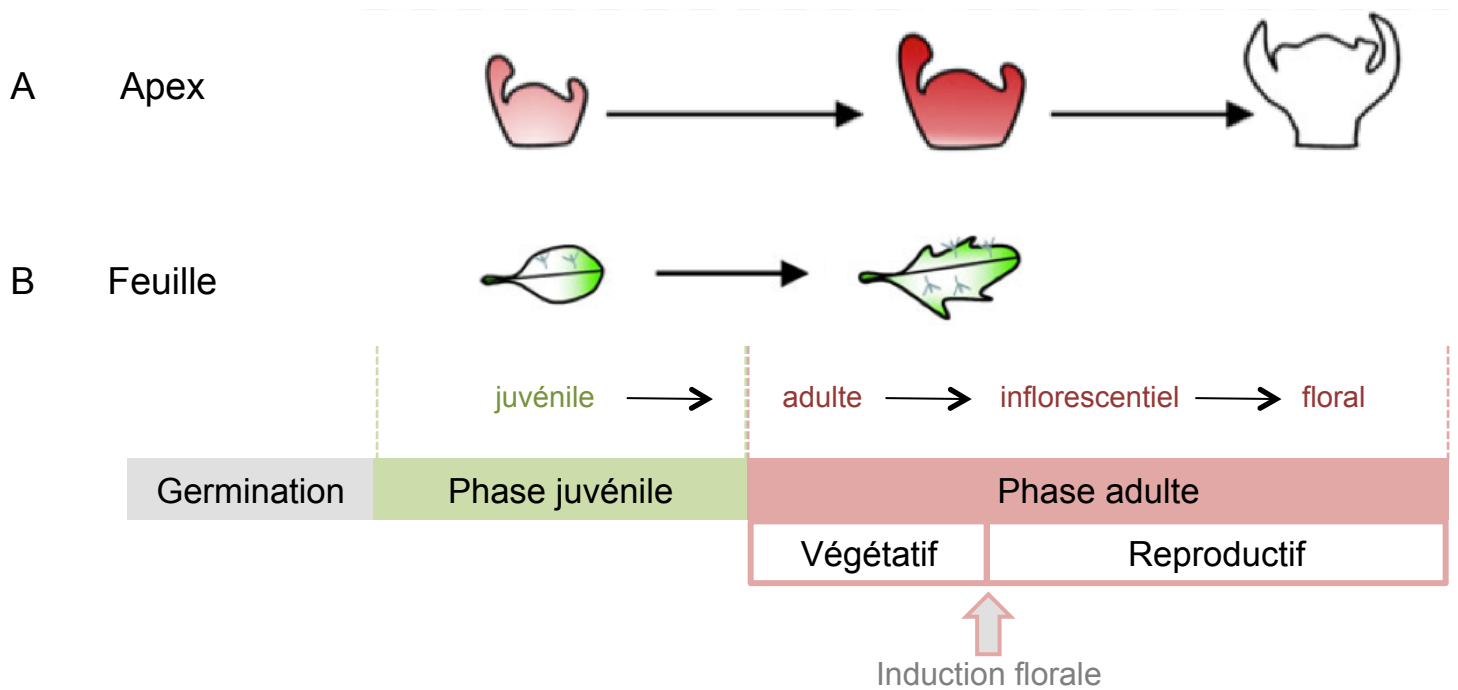


Figure 1 : Représentation schématique des différentes phases de développement chez *A. thaliana*, en lien avec les stades successifs entre l'état végétatif et l'état reproducteur, au niveau de l'apex (A) et des feuilles (B).

Après la germination, la plantule entre en phase juvénile marquée par une morphologie simple de la feuille et une distribution partielle des trichomes. Pendant la phase adulte, l'apex subit des modifications et les feuilles se complexifient (d'après Bergonzi et Albani, 2011).

Au moment de la floraison, le méristème apical passe d'un état indéterminé avec le développement d'organes végétatifs à un état déterminé caractérisé par la production d'organes floraux (Poethig, 2003 ; Putteril *et al.*, 2004 ; Albani et Coupland, 2010). La transition entre ces états fait intervenir deux phases : une phase de juvénilité, et une phase adulte.

I.1.1.a Phase de juvénilité

Cette étape intervient juste après la germination et permet l'accumulation de réserves indispensables au développement floral et à la production de graines. Cette phase de juvénilité débute lorsque le méristème apical commence à initier la tige, les feuilles et les méristèmes axillaires.

Durant cette phase qui peut durer de quelques mois à des dizaines d'années, la plante développe ses organes végétatifs. Pendant cette phase, la plante est capable de percevoir les signaux (Figure 1), qu'ils soient endogènes ou environnementaux mais ne peut y répondre (Poethig, 2003; Albani et Coupland, 2010; Bergonzi et Albani, 2011).

La phase de juvénilité est caractérisée par plusieurs marqueurs morphologiques notamment au niveau des feuilles (Figure 1). Chez la plante modèle annuelle *Arabidopsis thaliana*, la production de trichomes a lieu exclusivement à la surface adaxiale alors qu'elle devient adaxiale et abaxiale lorsque le plant entre en phase adulte (Telfer *et al.*, 1997 ; Matsoukas, 2014). A côté des marqueurs morphologiques, des marqueurs endogènes tels que certains microARN, les sucres ou encore l'amidon corréleront négativement avec la phase de juvénilité et augmentent progressivement en même temps que le passage à la phase adulte (Matsoukas *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2013 ; Matsoukas *et al.*, 2013).

D'un point de vue moléculaire, les gènes spécifiques de cette phase juvénile sont, pour la majorité, des répresseurs floraux. En effet, une surexpression de ces gènes entraîne une prolongation de la juvénilité et donc un retard de floraison. Comme tous les autres aspects du développement, la phase de juvénilité est sous un contrôle hormonal. Les gibbérélines (GA) par exemple activent la floraison chez *A. thaliana*. Ainsi, les mutants perte-de-fonctions des gènes de biosynthèse présentent un retard de floraison et donc une phase de juvénilité plus longue ou une phase adulte allongée (Telfer *et al.*, 1997 ; Matsoukas, 2014).

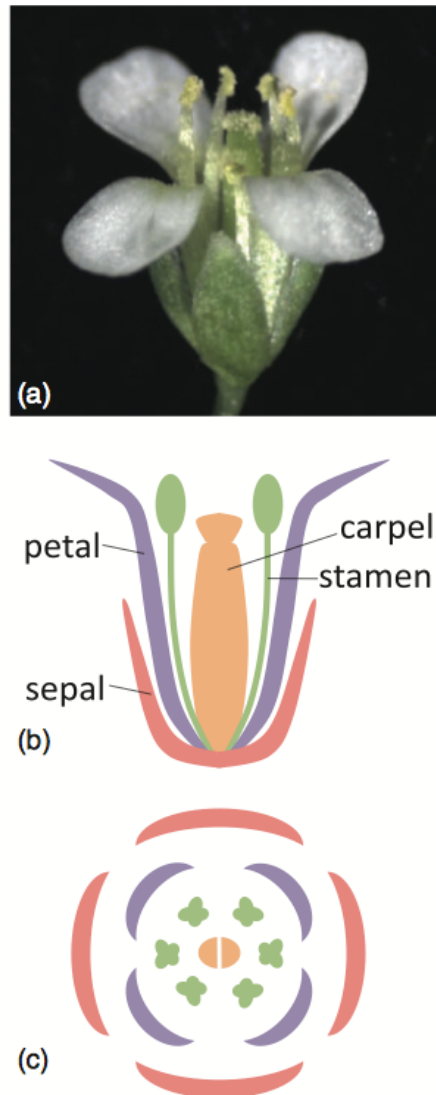


Figure 2 : Description d'une fleur d'*A. thaliana*.
 (A) Photographie d'une fleur mature.
 (B) Schéma d'une coupe longitudinale d'une fleur.
 (C) Schéma d'une coupe transversale d'une fleur.
 (Irish *et al.*, 2010)

I.1.1.b Phase adulte

Lors du passage de la phase juvénile à la phase adulte, la plante devient compétente, ce qui lui permet de répondre à des signaux inducteurs de la floraison générés par des stimuli externes ou internes (Albani et Coupland, 2010). Cette compétence peut être accompagnée de changements morphologiques liés à la transition florale qui est le passage de la phase végétative à la phase reproductive. Cette transition est composée de trois étapes. La première est l'induction florale lorsque le méristème apical perçoit les stimuli internes et externes, ce qui va entraîner la transition du méristème végétatif en méristème inflorescentiel (Figure 1). La deuxième étape est l'initiation florale, qui est caractérisée par une réorganisation du méristème impliquant des changements morphologiques (Figure 1) ainsi que l'activation des gènes d'identité du méristème floral. La dernière étape est la différenciation florale au cours de laquelle les organes floraux, sépales, pétales, étamines et carpelles se développent jusqu'à la formation complète de la fleur apte à la fécondation (Figure 2).

I.1.2 Contrôle génétique et moléculaire de la floraison

I.1.2.a Arabidopsis thaliana: une plante modèle

La floraison est un mécanisme complexe qui nécessite une synchronisation entre l'intégration de signaux endogènes au niveau de la plante, les facteurs environnementaux, et l'activation de réseaux géniques complexes qui vont induire la mise en place des organes reproducteurs. La grande complexité de ces mécanismes a facilité le développement d'un modèle de plante facile à utiliser et disposant de nombreuses ressources génétiques, *Arabidopsis thaliana*. En effet, cette plante est une angiosperme annuelle monocarpique appartenant à la famille des Brassicacées, présentant de nombreux avantages tels qu'un génome diploïde de petite taille (125 Mb) entièrement séquencé (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), un temps de génération court de 3 mois, la disponibilité de nombreux mutants, ainsi que des outils génétiques et moléculaires (TAIR : The Arabidopsis Information Resources, www.arabidopsis.org).

Les études menées sur cette plante modèle ont permis d'élucider une partie du réseau génique ainsi que les voies endogènes et exogènes impliquées dans son mécanisme de floraison (Boss *et al.*, 2004; Putterill *et al.*, 2004; Blazquez *et al.*, 2006 ; Galvao et Schmid, 2014 ; Capovilla *et al.*, 2015).

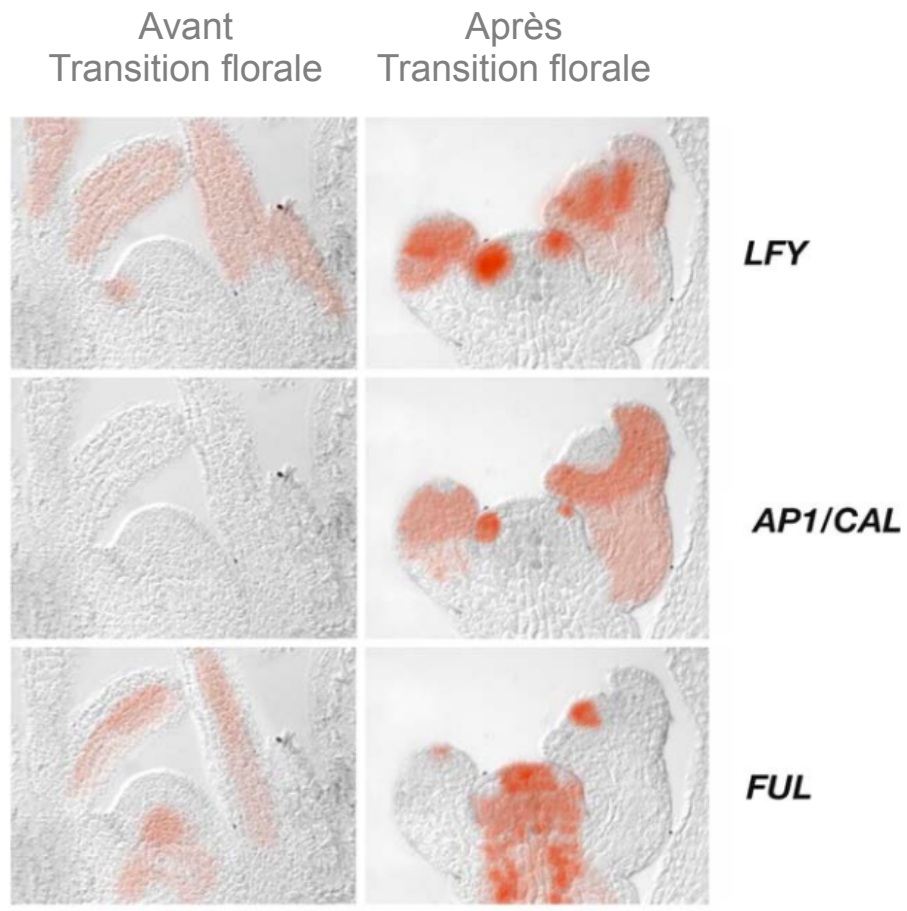


Figure 3 : Domain d'expression de *LFY*, *AP1/CAL* et *FUL* (coloration rouge) dans le méristème apical avant et après la transition florale chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Blázquez *et al.*, 2006).

Chez cette espèce, on distingue six voies de régulations majeures impliquées dans le processus de floraison :

- 1) la photopériode régulée par la longueur du jour et la qualité de la lumière, liée au rythme circadien ;
- 2) la vernalisation, c'est-à-dire l'exposition prolongée au froid ;
- 3) la température ambiante ;
- 4) la voie autonome, faisant intervenir des signaux intrinsèques de la plante, indépendamment des voies de la photopériode ou des gibbérellines ;
- 5) la voie des répresseurs floraux ;
- 6) la voie des gibbérellines (GA).

Le paragraphe suivant décrit le réseau des principaux gènes contrôlant la floraison chez *A. thaliana*, en focalisant ma synthèse bibliographique sur l'initiation et l'induction florale.

1.1.2.b Gènes de l'identité du méristème floral

Les gènes de l'identité du méristème floral vont permettre la transition du méristème végétatif vers la production d'un méristème inflorescentiel (Figure 3). Ces gènes codent principalement des facteurs de transcription de la famille des protéines à MADS-box dont *APETALA 1* (*API*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), et *FRUITFULL* (*FUL*). Mais d'autres acteurs comme *LEAFY* (*LFY*) de la famille FLORICAULA/LEAFY interviennent également dans le réseau de régulation. Chez *A. thaliana*, le triple mutant, *apl cal ful*, présente une prolifération de méristèmes qui restent à l'état végétatif sans pouvoir devenir inflorescentiels (Mandel *et al.*, 1992; Ferrandiz *et al.*, 2000). Les protéines API, CAL et FUL ont des fonctions redondantes et permettent la formation du méristème inflorescentiel puis du méristème floral. *LFY* est un facteur de transcription indispensable au développement de la fleur. Sa surexpression entraîne la transformation des méristèmes apicaux et axillaires en fleurs terminales (Weigel et Nilsson, 1995 ; Blazquez *et al.*, 1997). A l'inverse, les mutants perte-de-fonction *lfy* comportent des feuilles à la place des fleurs (Weigel *et al.*, 1992).

Le gène *LFY*, en plus de participer au développement du méristème floral, est aussi considéré comme un intégrateur floral qui active les gènes de l'identité du méristème floral (Wagner *et al.*, 1999).

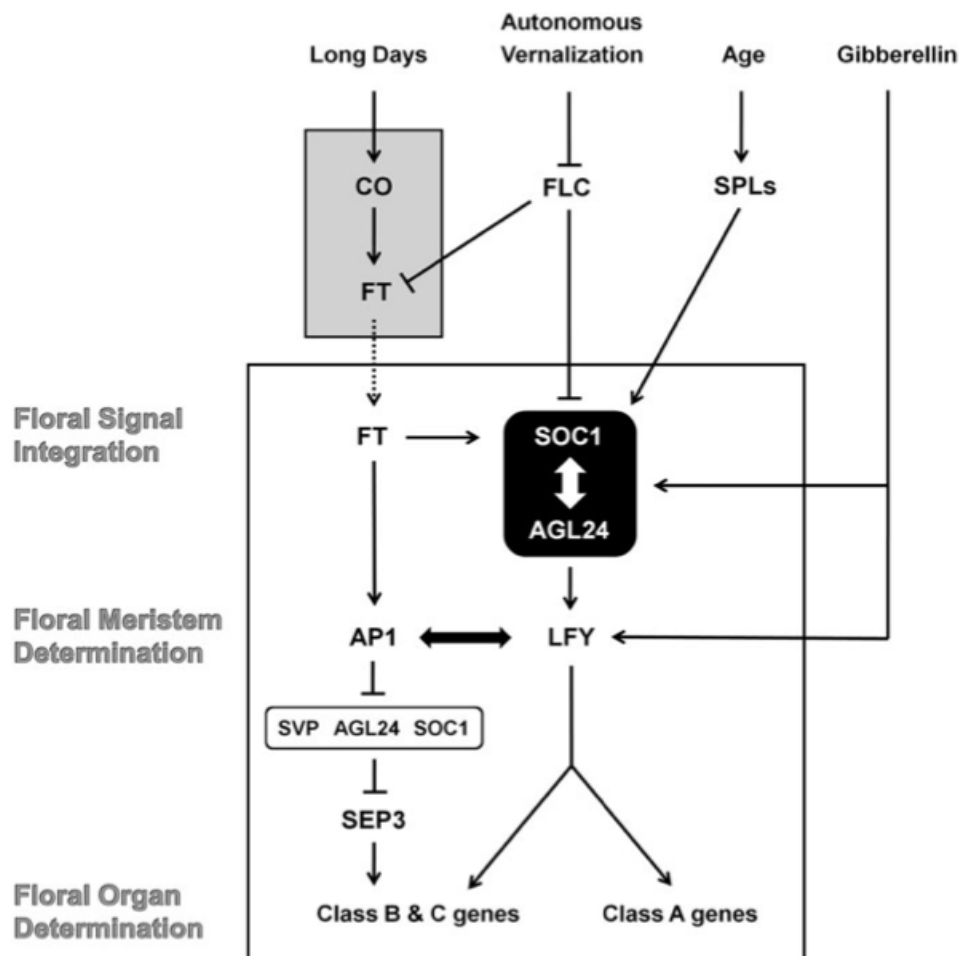


Figure 4 : Schéma d'action des intégrateurs floraux *FT* et *SOC1* interagissant avec les nombreux signaux de floraison et liés avec le développement de la fleur.
Lee and Lee, 2010.

I.1.2.c Les intégrateurs floraux

Les intégrateurs floraux sont primordiaux dans la cascade de régulation génique de la floraison puisqu'ils intègrent les signaux endogènes et environnementaux, permettant la floraison. Ils permettent ainsi l'activation des gènes responsables de l'identité du méristème floral, ce qui va conduire à l'initiation florale dans les conditions favorables pour le développement de la fleur. Trois intégrateurs floraux principaux ont été décrits, *LFY* précédemment décrit, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* et *FLOWERING LOCUS T (FT)*.

Le gène *SOC1* est un facteur de transcription de type MADS-box (Lee *et al.*, 2000). Son expression est régulée par la voie autonome, la vernalisation et de façon photopériodique (Yoon *et al.*, 2005, Moon *et al.*, 2005). Il va permettre l'activation du gène *LFY* mais aussi *API* et *FUL* et donc à terme, permettre le développement de la fleur (Figure 4).

La protéine FT appartient à la famille des protéines PEBP (PhosphatidylEthanolamine binding protein) (Kobayachi *et al.*, 1999). Chez *A. thaliana*, le mutant perte-de-fonction *ft* présente une floraison retardée (Koornneef *et al.*, 1991), alors que la surexpression de *FT* entraîne une précocité de la floraison (Kardailsky *et al.*, 1999). Le gène *FT* apparaît ainsi comme un activateur de la floraison. En tant qu'intégrateur floral, ce gène est capable de d'activer le programme génétique de la floraison en réponse aux signaux de floraison, notamment la photopériode (Figure 4).

I.1.3 FT et la notion de florigène

Le paradigme du florigène est né de l'observation d'un signal de floraison activé dans les feuilles par des stimuli spécifiques de l'espèce, transmissible par greffage et commun à toutes les plantes (Zeevaart, 1976; Notaguchi *et al.*, 2005). Le florigène circule ainsi de la feuille vers le méristème terminal où il induit la floraison. En 2007, (Corbesier *et al.*, 2007, Mathieu *et al.*, 2007), la protéine FT a été montrée comme faisant partie du florigène.

Chez *A. thaliana*, la transcription du gène *FT* a lieu exclusivement dans les cellules compagnes des vaisseaux des feuilles (Figure 5, Takada and Goto, 2003 ; Ahn *et al.*, 2004). De plus, sa transcription est induite en jours longs, par l'intermédiaire du gène *CONSTANS (CO)* au niveau des feuilles. Les protéines FT (Corbesier *et al.*, 2007) migrent jusqu'au méristème où FT interagit avec le facteur de transcription de type bZIP *FLOWERING LOCUS D (FD)*. Cette interaction va permettre d'activer la transcription des gènes *API*, *FUL* et *SOC1* (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Corbesier *et al.*, 2007), et donc la floraison (Figures 5 et 6).

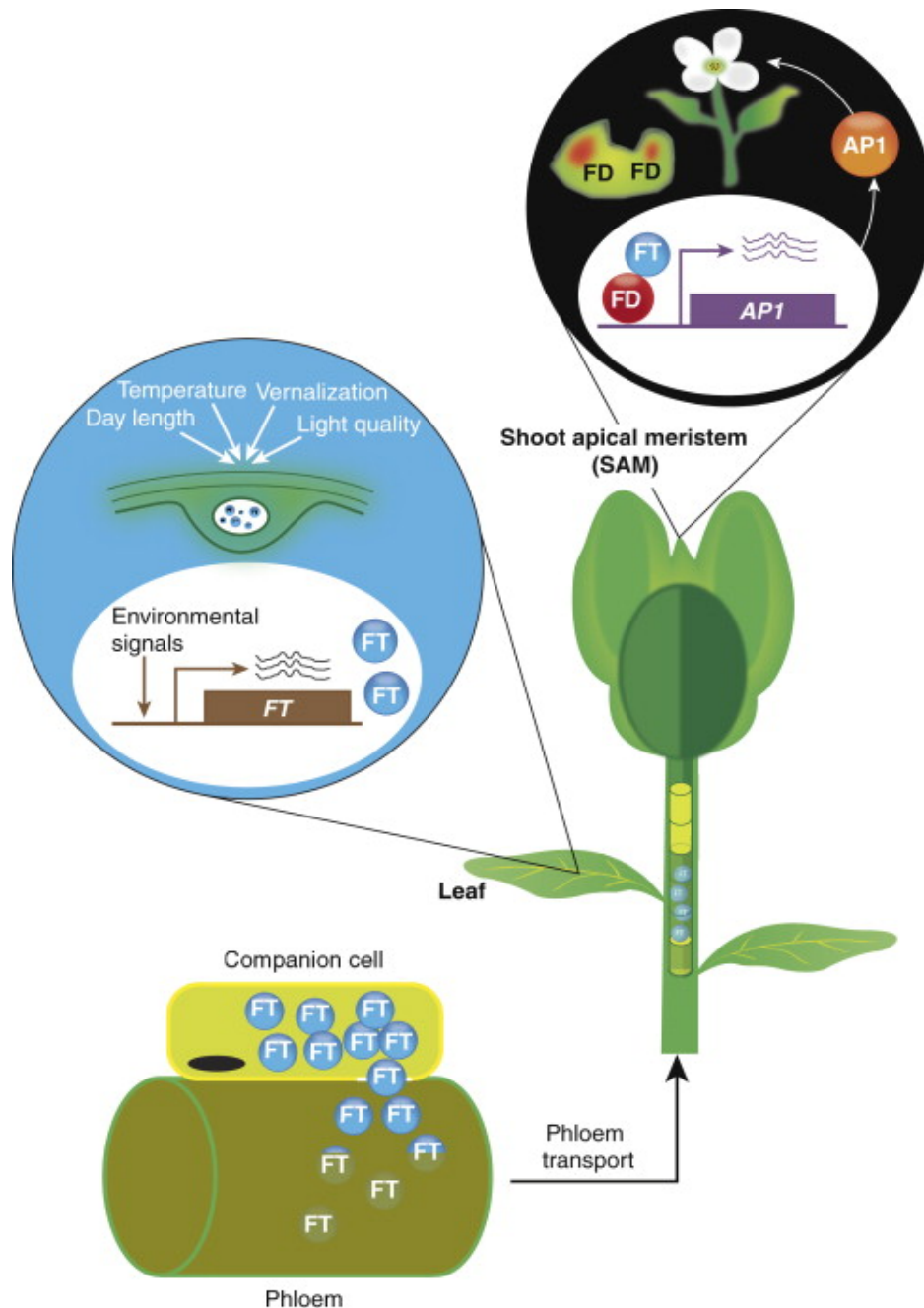


Figure 5 : Schéma descriptif de l'activation de la floraison via le florigène FT chez *A. thaliana*.

Au niveau de la feuille, la perception des facteurs environnementaux vont permettre la transcription du gène *FT*. Par la suite, les transcrits et les protéines FT vont migrer à travers le phloème pour atteindre le méristème apical. A ce niveau, la protéine FT va se lier au facteur de transcription FD et permettre la transcription du gène *AP1* par exemple.

Wigge, 2011.

Les protéines FT et TERMINAL FLOWER LOCUS 1 (TFL1) sont en compétition pour interagir avec le facteur de transcription FD (Figure 6, Ahn *et al.*, 2006 ; Hanano et Goto, 2011). Les protéines FT et TFL1 appartiennent toutes deux à la famille des protéines PEBP mais ont des fonctions antagonistes. Les fonctions antagonistes de ces deux protéines FT comme activateur et TFL1 comme répresseur seraient liées à la substitution d'un unique acide aminé : l'histidine en position 88 sur la protéine TFL1 est remplacée par une tyrosine en position 85 sur FT (Hanzawa *et al.*, 2005).

D'autres composantes, tels que les carbohydrates, les sucres ou encore les gibbérellines, pourraient avoir un rôle dans le complexe florigène puisque ces composants migrent à travers la plante et activent la floraison. Par exemple, en 2013, Yang *et al.* ont montré une corrélation négative entre la concentration en sucres et l'expression des miRNA156. De plus, l'expression du gène *HEXOKINASE 1* (*HXK1* qui catabolise le Glucose) est corrélée avec l'accumulation précoce en miRNA156 (acteur de la voie autonome). Ainsi, les sucres activeraient la floraison en réprimant la phase juvénile (Yang *et al.*, 2013 ; Matsoukas, 2014).

I.1.4 Les répresseurs floraux

Avant la floraison, la plante doit accumuler les ressources nécessaires afin d'atteindre un stade de développement végétatif suffisant en attendant les conditions favorables à sa reproduction sexuée (Komeda, 2004). Chez *A. thaliana*, les études menées sur des mutants perte-de-fonction, ont permis de mettre en évidence des acteurs ayant des fonctions de répresseurs floraux (Koornneef *et al.*, 1998), parmi lesquels *EMBRYONIC FLOWER 1* et *2* (*EMF1* et *EMF2*), *TFL1* déjà mentionné ci-dessus et *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*).

Les mutants perte-de-fonction *emf* présentent une floraison très précoce. Les protéines EMF1 et EMF2 bien qu'impliquées dans des mécanismes de régulation différents permettent de maintenir le développement végétatif au détriment du développement floral (Moon *et al.*, 2003).

Pour TFL1, les mutants perte-de-fonction *tfl1* présentent une floraison précoce avec une transition florale très courte. La surexpression du gène *TFL1* provoque une augmentation du développement végétatif, ainsi que des inflorescences ramifiées (Ratcliffe *et al.*, 1998). Ainsi, la protéine TFL1 intervient dans le maintien de la phase végétative en réprimant les gènes de l'identité du méristème inflorescentiel (Ratcliffe *et al.*, 1998; Blazquez *et al.*, 2006).

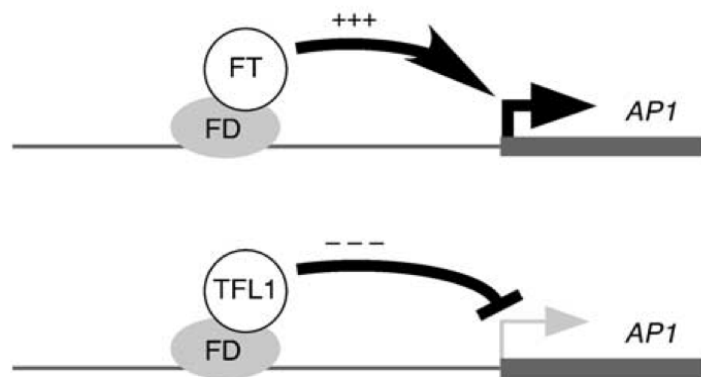


Figure 6: Modèle d'interaction entre le facteur de transcription FD et les protéines FT et TFL1. D'après Ahn *et al.*, 2006.

Le gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)* code un facteur de transcription de type MADS-box. Ce répresseur floral empêche la transcription du facteur *FD* et celle des intégrateurs floraux *SOC1* et *FT* en se fixant sur des régions régulatrices de ces gènes (Hepworth *et al.*, 2002 ; Searle *et al.*, 2006).

Ainsi, chez *A. thaliana*, le contrôle moléculaire de la floraison fait intervenir de nombreux gènes qui vont permettre une régulation fine de la reproduction sexuée de façon à ce que la plante soit compétente pour la floraison lorsque les conditions sont favorables. Comme dit précédemment, ce réseau génique complexe est régulé par des facteurs endogènes et environnementaux.

I.1.5 Facteurs influençant la floraison

Comme mentionné au paragraphe *I.1.2.a*, six voies de signalisation interconnectées interviennent dans la régulation de la floraison (Figure 7).

I.1.5.a Facteurs environnementaux

(1) La photopériode

Cette voie s'appuie sur l'étroit lien entre la réception de la lumière par les photorécepteurs et l'horloge circadienne de la plante (Searle et Coupland, 2004). Le régulateur central de cette voie est le gène *CONSTANS (CO)*. Ce gène est un facteur de transcription de type doigt à zinc (Putterill *et al.*, 1995) qui permet l'induction de la floraison quand son expression coïncide avec l'exposition à la lumière, appelé « modèle de coïncidence externe ». En effet, il a été démontré que la lumière est capable de stabiliser les protéines CO qui permettent d'induire l'expression des intégrateurs floraux *FT* et *SOC1* (Figure 7, Valverde *et al.*, 2004).

Chez *A. thaliana*, le mutant perte-de-fonction *co* n'est plus régulé de façon photopériodique et présente un retard de floraison (Rédei *et al.*, 1962). La protéine CO a pour fonction d'induire l'expression des intégrateurs floraux *FT* et *SOC1* (Figure 7).

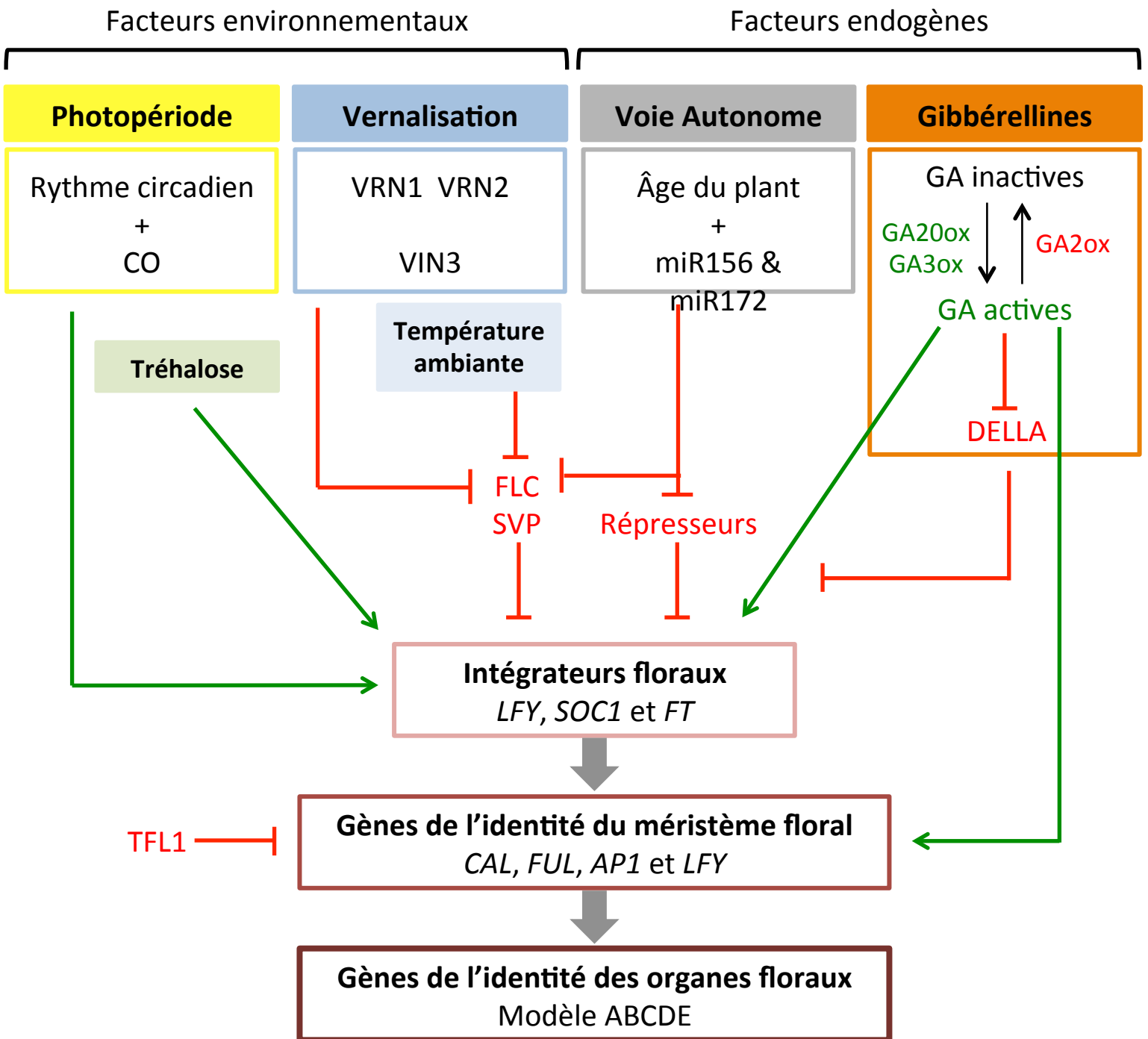


Figure 7: Modèle simplifié de l'interaction entre les quatre voies de signalisation de la floraison chez *Arabidopsis thaliana*. La voie de la photopériode ainsi que celle des gibbérellines permettent l'activation directe des intégrateurs floraux; alors que la vernalisation et la voie autonome vont permettre leur activation via l'inhibition de répresseurs floraux.

(2) La température

- La vernalisation

La vernalisation correspond à une exposition prolongée au froid qui conduit à l'acquisition de la compétence à fleurir (Henderson *et al.*, 2004). Dans cette voie, l'activation de la floraison est réalisée en réprimant le répresseur floral *FLC* (Figure 7).

L'expression de *FLC* est réprimée par plusieurs procédés :

- i) par les protéines VERNALIZATION (VRN) 1 et 2, ainsi que VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3). Ces trois protéines agissent en permettant l'apposition de marques épigénétiques répressives sur le gène *FLC*, réprimant ainsi son expression (Hepworth et Dean, 2015). Le répresseur floral devenant inactif, les intégrateurs floraux peuvent agir et la floraison avoir lieu (Figure 7).
- ii) par deux ARN non codants : *COOLAIR* et *COLD AIR* (Swiezewski *et al.*, 2009 ; Heo et Sung, 2011). L'augmentation de ces ARN non codants est corrélée à la diminution de l'expression du gène *FLC* pendant la vernalisation (Andrès et Coupland, 2012).
- iii) par la voie autonome qui sera détaillé par la suite (I.1.5.b (1)).

- La température ambiante

Le régulateur principal de la floraison en réponse à la température ambiante est la protéine SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP). La perte-de-fonction *svp* entraîne une floraison précoce. Il s'agit d'une protéine à MADS-box capable de réprimer la transcription du gène *FT* en se liant à son promoteur. C'est donc un répresseur floral central intervenant dans les trois voies de signalisation, température, autonome (Lee *et al.*, 2010, Marin-Gonzalez *et al.*, 2015) et gibbérellines (Li *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2012) (Figure 7).

Ce gène interagit aussi avec l'un des principaux répresseurs floraux, *FLC*, pour réprimer la transcription des intégrateurs floraux, *FT* et *SOC1* (Li *et al.*, 2008). Plus récemment, il a été démontré que les protéines SVP étaient capables d'interagir avec les protéines FLOWERING LOCUS M (FLM proches de FLC) pour réprimer la transcription des intégrateurs floraux en fonction de la température (Lee *et al.*, 2014).

I.1.5.b Facteurs endogènes

(1) La voie autonome et âge de la plante

- La voie autonome

La voie autonome de la floraison correspond à des signaux endogènes de la plante qui restent à ce jour non caractérisés et qui sont indépendants des facteurs environnementaux (Figure 7, Simpson, 2004). Chez *A. thaliana*, plusieurs acteurs appartenant à cette voie ont été identifiés et tous permettent la régulation négative du gène *FLC* (Simpson, 2004; Noh *et al.*, 2004). Ces régulateurs agissent selon deux modes d'action pour réprimer *FLC*, soit en interagissant avec les ARN messagers de *FLC*, soit en apposant des marques épigénétiques au niveau de son promoteur (Simpson, 2004; Boss *et al.*, 2004).

- Age de la plante : rôles des microARN

Le passage de la phase juvénile à la phase adulte fait également intervenir deux microARN (miR156 et miR172) qui sont exprimés de façon antagoniste au cours du développement de la plante. Le microARN miR156 permet le maintien de la phase juvénile en réprimant les facteurs de transcription nécessaires à l'activation des gènes de floraison. Le microARN mi172 quant à lui intervient lors de la phase adulte, en réprimant les répresseurs floraux (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

(2) Les sucres

Le tréhalose est formé de 2 molécules de glucose. Son dérivé, le tréhalose-6-phosphate (T6P) est synthétisé à partir du glucose-6-phosphate par la TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1). Chez *A. thaliana*, les mutants perte-de-fonction *tps1* présentent une floraison tardive, quelle que soit la photopériode (Walh *et al.*, 2013). Dans les feuilles, la régulation du T6P suit le rythme circadien et est nécessaire à l'activation du gène *FT* indépendamment de CO (Walh *et al.*, 2013). Au niveau des méristèmes, le T6P est régulé par la voie autonome via le microARN miR156 (Figure 7, Walh *et al.*, 2013). Ainsi, le statut carboné de la plante intervient dans l'activation de la floraison, en intégrant les autres voies de signalisation comme par exemple dans ce cas la voie autonome (Bolouri Moghaddam et Van den Ende *et al.*, 2013).

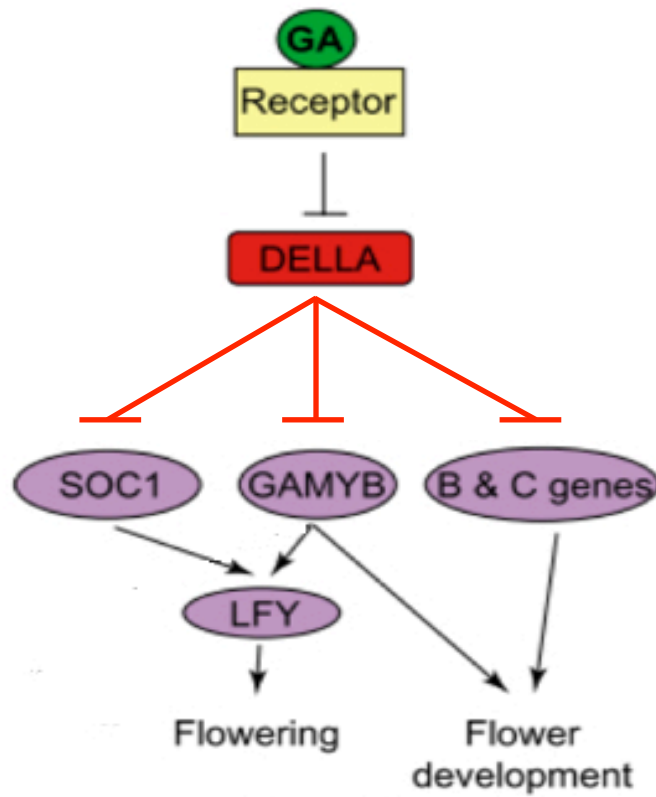


Figure 8: Modèle simplifié de la signalisation par les GA pour le floraison d'*A. thaliana*. En violet, sont représentés les facteurs de transcriptions impliqués dans la floraison. D'après Fleet and Sun, 2005.

(3) *Les gibbérellines*

Pour activer la floraison, les GA ont deux modes d'actions. Au niveau des feuilles et en jours longs, les GA activent la transcription du gène *CO* qui activera *FT* et donc la floraison (Hisamitsu et King, 2008). Au niveau du méristème apical, les GA activent la floraison en induisant la dégradation des protéines DELLA lesquelles répriment l'intégrateur floral *SOC1* (Figure 8, Eriksson *et al.*, 2006). De plus, les GA activerait le gène *LFY* via un facteur de transcription GA-dépendant de type MYB qui se fixe sur le promoteur du gène (Figure 8, Gocal *et al.*, 2001).

Compte-tenu du rôle majeur des gibbérellines sur la floraison, sur la reproduction végétative, ou voire sur la régulation de la balance entre ces deux modes de reproduction, j'ai choisi de leur consacrer un chapitre spécifique dans cette introduction.

Ce chapitre m'a permis de développer, de manière non exhaustive, la floraison en prenant comme exemple la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Son système de régulation est depuis longtemps le sujet d'étude de nombreux laboratoires, ce qui a permis d'identifier, au fil des ans, de nouvelles voies de signalisation. Les signaux de ces voies peuvent être communs à d'autres espèces ou au contraire avoir un effet opposé chez différentes espèces. De plus, outre la complexité génique évidente, l'interconnexion entre les différentes voies de signalisation est essentielle et complique les études.

I.2 La reproduction asexuée: la multiplication végétative

Parmi les organismes vivants présentant les deux modes de reproduction, sexuée et végétative (bactéries, champignons ou invertébrés), les plantes à fleurs ont la plus large gamme de stratégies combinant ces deux modes de reproduction (Barett, 2015). Deux principales stratégies de reproduction végétative chez les Angiospermes permettent la production de descendants génétiquement identiques au plant mère: (i) l'apomixie qui permet la formation de graines sans fécondation, et (ii) la multiplication végétative qui conduit à la formation d'un plant clone physiquement attaché au plant mère, et qui pourra devenir autonome après enracinement. Dans ce chapitre, je détaillerai exclusivement la multiplication végétative.

La multiplication végétative met en évidence l'importance des méristèmes axillaires qui vont permettre les multiples floraisons pour les espèces pérennes, et le développement d'organes végétatifs pour les espèces capables de multiplication végétative.

I.2.1 Les méristèmes axillaires: éléments clefs de l'équilibre entre développement végétatif et floraison

Les méristèmes axillaires sont initiés à l'aisselle des feuilles. Ils peuvent être maintenus dormants sous l'effet de la dominance apicale ou développer quelques entre-nœuds très courts pour former les bourgeons axillaires. Au cours de la vie de la plante, ces bourgeons vont poursuivre leur croissance et mettre en place de nouveaux axes feuillés, les rameaux. Ils peuvent également évoluer pour donner des axes inflorescentiels ou être impliqués dans la formation d'organes impliqués dans la multiplication végétative. Le devenir des méristèmes axillaires dépend de leur position sur le plant.

Dominance apicale

Le contrôle assuré par le méristème apical caulinaire via la dominance apicale joue un rôle prépondérant dans le devenir des méristèmes axillaires. La dominance apicale est admise depuis plus de 80 ans et est considérée comme définissant le phénomène selon lequel le méristème apical se développe en maintenant dormants les méristèmes axillaires.



Figure 9 : Comparaison entre deux plants d'*A. thaliana* sauvage (A) et mutant *las* (B). Chez le sauvage (A), on observe le développement d'inflorescences axillaires, alors que le mutant *las* présente moins de ramifications. Greb *et al.*, 2003.

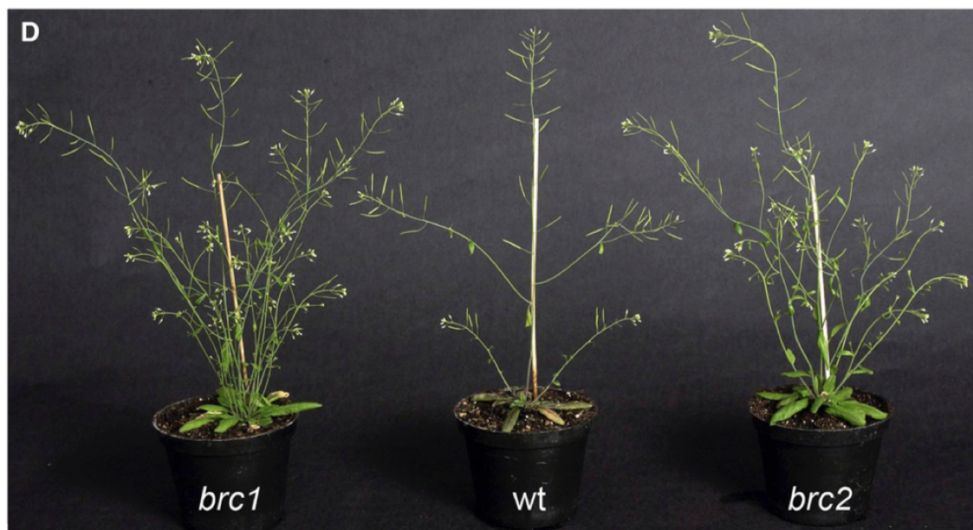


Figure 10 : Comparaison entre un plant sauvage d'*A. thaliana* et deux mutants *brc*. Les deux mutants présentent un grand nombre de ramifications par rapport au plant sauvage. Aguilar-Martinez *et al.*, 2007.

Des expérimentations de décapitation d'apex réalisées chez la fève, *Vicia faba*, ont permis de montrer que cette excision entraîne la levée de la dormance des méristèmes axillaires, et induit le développement de ramifications (Thimann et Skoog, 1933).

Les méristèmes axillaires sont typiquement situés sur la tige, à l'aisselle de la feuille, sur la face adaxiale. De façon anecdotique, on peut observer la formation de branches sur les racines, sur les feuilles ou sur des sites variables (ramifications adventives). Le devenir du bourgeon axillaire participe pour une part importante à la détermination de l'architecture de toute la plante. Le degré d'implication des méristèmes axillaires dépend de deux facteurs, l'initiation de méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles et la régulation de la reprise d'activité des bourgeons axillaires. Ces facteurs sont extrêmement régulés et participent, chez certaines espèces, à la mise en place de l'équilibre entre reproduction sexuée et multiplication végétative.

Contrôle génétique

L'étude de mutants présentant un défaut de ramifications a permis de mettre en évidence des éléments du contrôle génétique de l'initiation des méristèmes axillaires parmi lesquels des facteurs de transcriptions.

Un des gènes impliqués dans le contrôle du développement du méristème axillaire est le gène *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)*. Le mutant *las* perte-de-fonction est incapable de former des tiges latérales pendant le développement végétatif (Figure 9 ; Greb *et al.*, 2003). Ainsi, ce gène apparaît ainsi comme un régulateur positif de la ramification.

A l'inverse, le gène *BRANCHED1* appartenant à la famille des TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PCF) de la classe II a été décrit comme un régulateur négatif de la ramification. En effet, chez *A. thaliana*, le mutant perte-de-fonction présente des nombreuses ramifications via la présence ectopique de méristèmes axillaires (Figure 10 ; Aguilar-Martinez *et al.*, 2007). Récemment, il a été démontré que les protéines DELLA – cibles des GA- sont capables de bloquer l'action de ces régulateurs (TCP de classe I) en se liant à leur domaine de liaison à l'ADN (Davière *et al.*, 2014).

Traits	Description and categorization	Example 2 <i>Fragaria viridis</i>
Whole plant (genet) traits		
Tap root persistence	Primary root survives over entire plant life-span (yes/no)	No
Reproductive types	Prevailing mode of reproduction (vegetative/generative/vegetative and generative)	Vegetative and generative
Other storage organs	Existence of storage organ not utilized for clonal growth (yes/no)	No
Age at first flowering	Life period when plant may regenerate only vegetatively (years)	No data
Genet life span	Life span of plant arising from one zygote (years)	No data
Leaf distribution	Distribution of leaves along the flowering shoot (no-rosette/semirosette/rosette)	Semirosette
Bud bank traits*		
Bud bank distribution	Vertical distribution of buds (five layers > 10/10 to 0/0/0 to -10/< -10 cm in relation to soil surface)	
Seasonality of bud bank	Mode of perennation of bud-bearing organs (perennial/seasonal/potential/perennial and potential/seasonal and potential)	0/ seasonal / seasonal / perennial / 0
Number of buds per shoot	Numbers of buds per shoot and layer in well-developed plants (0/1-10/> 10)	0/1-10/1-10/> 10/0
Clonal growth traits**		
Clonal growth organs (CGO)	Morphologically delimited types (17 types—see Fig. 1)	CGO 1: 9; CGO 2: 1
Role of CGO	CGO are necessary (If all adult plants in all populations develop CGOs), additive (If CGO is not needed for flowering and overwintering or is absent in some populations) or regenerative (If CGO develops after an injury)	CGO 1: necessary; CGO 2: additive
Cyclicity	Cyclicity corresponds to the life span of a shoot, starting from sprouting of a bud, followed by vegetative growth, flowering and fruiting, until shoot death. (1/2/> 2 years)	CGO 1: 2; CGO 2: > 2
Persistence	Persistence of connection, such as stolons or rhizomes, between parent and offspring ramets (1/2/> 2 years)	CGO 1: > 2; CGO 2: 1
No. of shoots/parent shoots	Rate of clonal multiplication (< 1/1/2-10/> 10 per year)	CGO 1: 1; CGO 2: 2-10
Lateral spread	Horizontal increment of clonal growth organ. Some water plants form turions or tubers that can be dispersed independent of the parent plant (< 0.01/0.01 — 0.25/> 0.25 m/year/dispersable)	CGO 1: < 0.01; CGO 2: > 0.25
Branching	Morphological type of stem branching (monopodial/sympodial/dichotomic)	CGO 1: sympodial; CGO 2: sympodial
Tillering in graminoids	Morphological type of branching in graminoids. (intravaginal/extravaginal/intra- and extravaginal)	Not relevant
Roots along CGO	Placement of roots on clonal growth organs of stem origin (along horizontal stem/on oldest part/on youngest part/on shoot base/not applicable)	CGO 1: along horizontal stem; CGO 2: on shoot base
Leaf distribution	Leaf distribution along flowering shoot (no rosette/semirosette/rosette)	CGO 1: rosette; CGO 2: rosette
Offspring comparison with parents	Relative size of clonal offspring (about the same/much smaller)	CGO 1: about the same; CGO 2: much smaller
Reproduction vs. clonality	When, in ontogeny, clonal type of clonal growth organs are formed (prereproductive/reproductive/postreproductive)	CGO 1: prereproductive; CGO 2: prereproductive
Generation overlap	Shoots from following generations present (Yes/No)	CGO 1: yes; CGO 2: yes

Figure 11 : Tableau descriptif des caractères pris en compte dans la base de données CLO-PLA et exemple des données collectées pour l'espèce *Fragaria viridis*.

* Banque de bourgeons inclus tous les bourgeons d'une plante disponibles pour la multiplication végétative.

** Les caractères morphologiques de la multiplication végétative sont évalués séparément pour un organe de croissance végétative (CGO), un plant peut comporter plusieurs CGOs. (Klimesova et De Bello, 2009)

Dans le contrôle de la dominance apicale, les phytohormones jouent un rôle primordial. L'auxine est connue pour son rôle dans le maintien de la dominance apicale au niveau du méristème apical, alors que les cytokinines favorisent la ramification des racines. Plus récemment, une nouvelle classe d'hormones, les strigolactones, a été caractérisée comme inhibiteur de la ramification (Umehara *et al.*, 2008).

De plus, en regroupant les résultats obtenus chez *A. thaliana* et chez le pois, le gène *BRC1* cité précédemment pourrait être un intégrateur clef de différentes voies, notamment hormonales, impliquées dans le contrôle du développement du méristème axillaire (Rameau *et al.*, 2015).

I.2.2 Différents types de multiplication végétative

De nombreuses études descriptives ont été menées sur la multiplication végétative. Elles ont permis de mettre en évidence une large gamme de types de multiplication. Néanmoins, la classification de ces espèces en fonction des différents types de multiplication s'avère compliqué de par le grand nombre d'espèces concernées, et la subjectivité des caractères morphologiques ; en effet, en fonction du niveau de description des formes de multiplication, certains auteurs en dénombrent près de 100 (Kästner et Karrer, 1995) là où d'autres en comptent 21 (Klimes *et al.*, 1997 ; Klimesova et De Bello, 2009).

I.2.2.a Base de données CLO-PLA

Afin de pallier à cette complexité de classification, Jitka Klimešová and Leoš Klimeš (1996) ont créé la base de données CLO-PLA, pour CLOnal PLAnt, afin de rassembler les données bibliographiques et les banques de bourgeons ('bud bank') (<http://clopla.butbn.cas.cz/>, Figure 11). Ce site permet une recherche ou une comparaison en fonction des genres ou des espèces (Klimesova et De Bello, 2009) et la classification est effectuée en fonction de 17 organes issus de croissance végétative (Figure 12). De manière plus générale, quatre grands groupes de multiplication végétative sont décrits en fonction des organes clonaux produits (Figure 12). Toutefois, nous ne disposons que de peu d'informations, et les données disponibles sont surtout descriptives pour une utilisation dans le domaine de l'écologie. Par la suite, seuls les types de multiplication végétative pouvant être retrouvés chez les espèces herbacées et pour lesquels des données bibliographiques sont disponibles ne seront cités.

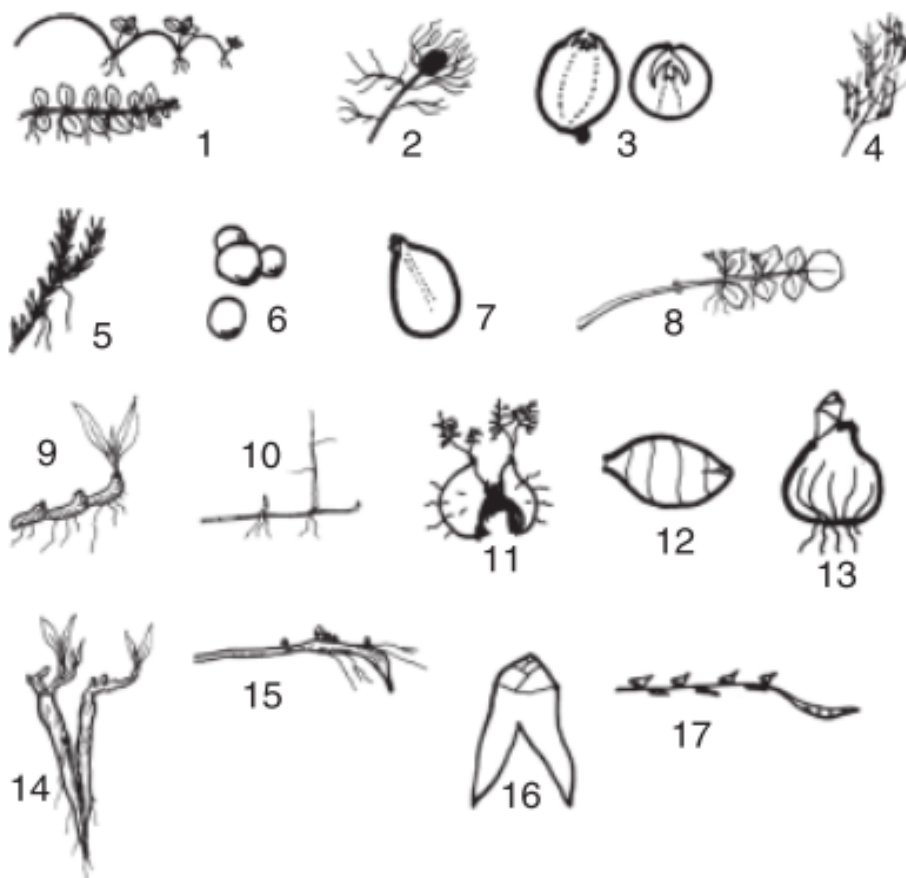


Figure 12 : Présentation des 17 caractères morphologiques des organes de croissance végétative utilisés dans la base de données CLO-PLA.

- (1) Enracinement horizontal ou stolons (cas du fraisier),
- (2) Turions ou bourgeon souterrain,
- (3) Bulbes ou tubercules,
- (4) Pseudoviviparité,
- (5) Fragmentation de tiges,
- (6) Bourgeonnement,
- (7) Tubérisation souterraine,
- (8) Bourgeonnement sur feuille,
- (9) Rhizomes aérien,
- (10) Rhizomes souterrain,
- (11) Séparation de tubercules,
- (12) Tubérisation,
- (13) Bourgeonnement,
- (14) Racines séparées,
- (15) Bourgeons adventifs sur racines,
- (16) Tubercule racinaire souterrain,
- (17) Tubercule aérien sur tige.

Klimesova et Klimes, 2008.

I.2.2.b Multiplication par formation de bulbes

Le bourgeonnement peut être souterrain ou aérien, et se définit comme une excroissance permettant la formation d'un organe de stockage et le détachement du plant mère (Figure 13). Ce mode de reproduction est répandu chez les monocotylédones, qu'elles soient ornementales comme la jacinthe, le narcisse, la tulipe, la jonquille, ou encore agronomiques par exemple chez la plupart des espèces d'*Allium* qui regroupe l'oignon, l'ail et les espèces apparentées. Le nombre de bulbes produit par cycle annuel est très variable en fonction des espèces.

Chez l'ail (*Allium vineale*) par exemple, afin de comprendre l'importance de la reproduction sexuée sur la multiplication végétative dans des populations naturelles, les auteurs ont croisé les données génétiques et les localisations géographiques. La diversité génétique est faible, ce qui suggère que chaque population s'est majoritairement construite par multiplication végétative (Ceplitis, 2001).

Chez le pâturin des alpes (*Poa alpina*), les plants issus de la floraison présentent une plus grande diversité génétique que ceux issus du bourgeonnement. De plus, la reproduction par bourgeons apparaît plus souvent à des altitudes élevées à l'inverse de la reproduction sexuée (Steiner *et al.*, 2012).

I.2.2.c Propagation par rhizomes

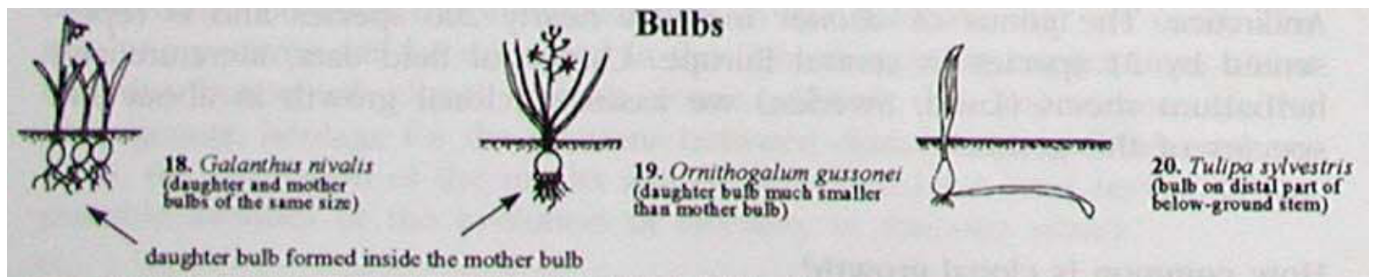
Les rhizomes sont des tiges aux entre-nœuds courts qui permettent la multiplication végétative (Figure 13). Les rhizomes, en plus de permettre la colonisation de l'espace, peuvent aussi servir de support à de nouveaux plants, à des tubercules ou à des bourgeons adventifs. Ce mode de reproduction est retrouvé chez de nombreuses espèces comme le bambou, l'iris, le chiendent, ou encore l'asperge et le gingembre.

Le bambou par exemple est connu pour sa rapide colonisation de territoire. En 2014, Umemura et Takenaka ont étudié le lien entre la composition en nutriments des feuilles et la formation de rhizomes. L'élongation des rhizomes serait positivement corrélée à des taux élevés de bore et de zinc.

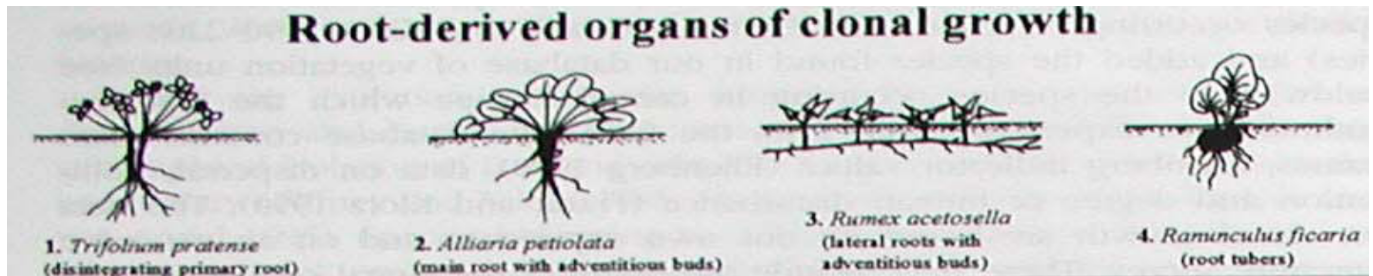
I.2.2.d La tubérisation

Le tubercule est un organe de réserve qui se développe à partir des rhizomes ou des stolons. Il peut également se former à partir des racines ou de la tige (Figure 13). De par son importance agronomique, l'espèce tubérisante la mieux décrite est la pomme de terre.

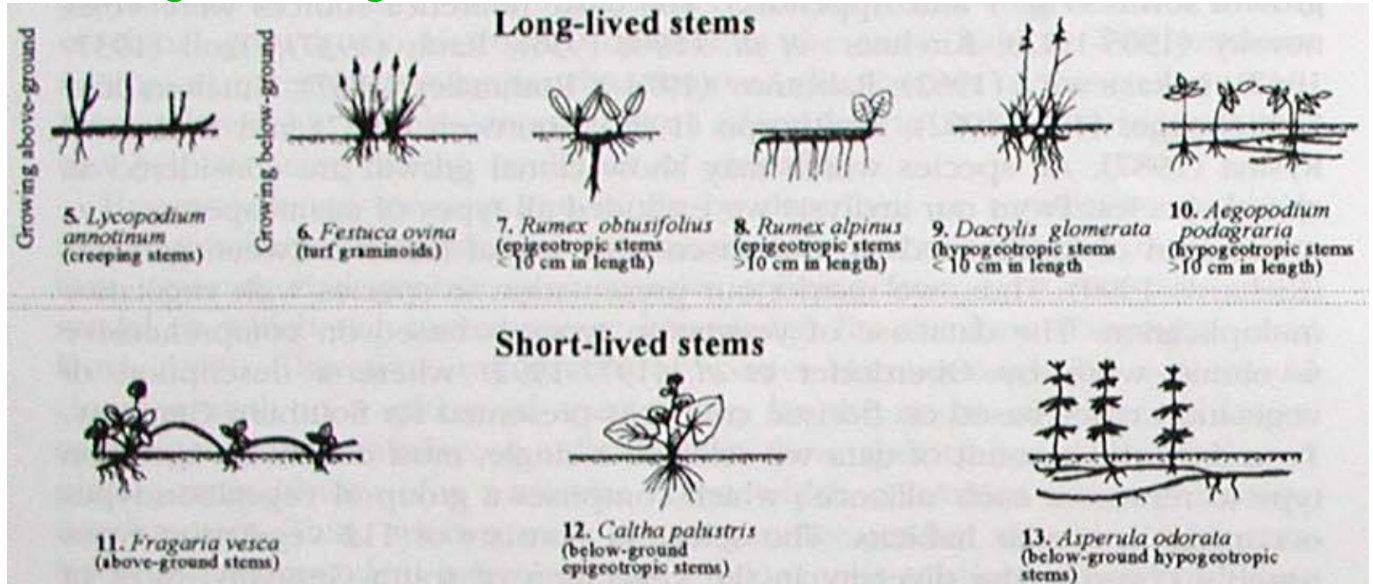
Par bourgeonnement



Par racines adventives



Par élongation de tiges



Par tubérisation

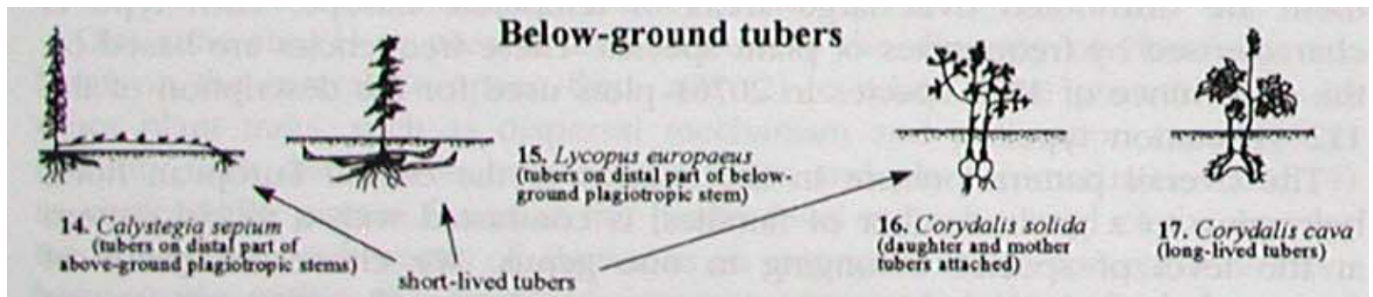


Figure 13 : Classification des différents types de multiplication végétative, en fonction des organes clonaux produits: par bourgeons, par racines adventives, par élongation de tiges (cas du fraisier n°11) ou par tubérisation. D'après Klimes *et al.*, 1997.

Cette espèce offre un bon modèle d'étude de la balance entre multiplication végétative et floraison, balance qui sera décrite dans le paragraphe I.3.1 (Abelenda *et al.*, 2014).

La tubérisation et la floraison de la pomme de terre sont finement régulées par la photopériode et la température. Ainsi, la formation de tubercules chez la pomme de terre est inhibée par des températures élevées, et est favorisée par une photopériode de jours courts (inférieur ou égal à 12 heures de jour). D'autres facteurs ont également un impact sur la tubérisation, comme la concentration en azote, les sucres, la qualité de la lumière ou encore le contrôle hormonal (Jackson, 1999).

I.2.2.e Clonage par stolons

Les stolons sont des tiges rampantes, présentant des entre-nœuds allongés et à croissance indéterminée (Figure 13). Ils ne présentent pas de racines adventives sur les entre-nœuds allongés mais ils développent des racines à partir du bourgeon porté à l'extrémité de l'entre-nœud. Comme dans le cas de la pomme de terre, ils peuvent porter des tubercules. Les stolons sont le plus souvent aériens mais ils peuvent aussi être également souterrains. Ce type de multiplication végétative est présent chez de nombreuses espèces.

Les stolons sont donc connectés au plant mère pour l'allocation des ressources et ce, jusqu'à ce que le plant issu du stolon s'enracine et devienne indépendant. Chez *Potentilla anserina*, Stuefer and Huber (1999) ont étudié la fragmentation du stolon afin de voir si le plant obtenu survit mieux s'il est rattaché ou non au plant d'origine. Les résultats ont montré que le stolon était primordial pour la survie des plants filles et que ces tiges rampantes pouvaient aussi remplir une fonction de stockage de nutriments (Stuefer and Huber, 1999).

I.2.3 Un avantage évolutif et écologique

La multiplication végétative est largement répandue chez les angiospermes puisqu'elle est présente chez près de 80% des lignées (Klimes *et al.*, 1997).

I.2.3.a Contexte évolutif

Contrairement aux microorganismes chez lesquels la reproduction clonale a une origine plus ancienne que la reproduction sexuée (Andrews, 1998), chez les Angiospermes, l'apparition de la reproduction végétative serait intervenue au cours de l'évolution, après la reproduction sexuée (Klimes *et al.*, 1997, Takhtajan, 1980).

D'un point de vue écologique, l'étude du succès reproducteur (fitness) des espèces capables des deux modes de reproductions paraît compliquée puisque ce paramètre est étroitement lié à l'environnement naturel de l'espèce alors qu'il est souvent étudié en milieu artificiel (Fischer and Van Kleunen, 2001).

La comparaison entre les espèces capables ou non de multiplication végétative a aussi été étudiée d'un point de vue de la variabilité génétique. Il est accepté que la variabilité génétique neutre serait équivalente entre les espèces ayant une stratégie de reproduction végétative et celles qui ne l'ont pas. Néanmoins, certains paramètres comme celui de la localisation par zone géographique n'ont pas été clairement pris en compte. Sa prise en compte rendrait très complexe l'étude de la variabilité génétique entre deux types d'espèces (Fischer et Van Kleunen, 2001).

Pour comprendre le lien entre la multiplication végétative et l'environnement, l'interaction 'Génotype x Environnement' a été étudié chez l'espèce *Ranunculus reptans* capable de produire des stolons. Cette espèce (hygrophile) est capable de se développer dans des habitats plus ou moins submergés. En imposant une compétition avec une autre espèce (terrestre) stolonnante *Agrotis stolonifera*, cette étude a permis de mettre en évidence que : les plants issus de l'habitat submergé se développent mieux sans compétition avec l'autre espèce stolonnante, alors que les plants issus des zones terrestres ont une meilleure croissance avec compétition. Ainsi, ces résultats ont permis de mettre en évidence l'importance de l'interaction 'Génotype x Environnement' (Fischer and Van Kleunen, 2001, Prati et Schmid, 2000).

1.2.3.b Avantages et inconvénients adaptatifs

Les plantes capables de se reproduire de façon végétative auraient un avantage face aux espèces capables d'utiliser uniquement la reproduction sexuée. En effet, la multiplication végétative présente des avantages (Klimes *et al.*, 1997, Vallejo-Marin *et al.*, 2010, Barrett, 2015) en permettant notamment (i) une colonisation rapide de nouveaux territoires, sans qu'il y ait nécessité d'une phase de dormance, (ii) une optimisation de l'acquisition des ressources (lumière, eau, nutriments), (iii) la pérennité de l'espèce en conditions peu propice à la floraison et (iv) la fixation de caractères agronomiques.

Néanmoins, la reproduction par multiplication végétative comporte aussi des inconvénients, dont trois majeurs (Klimes *et al.*, 1997, McKey *et al.*, 2010, Barrett, 2015):

(i) le fait que la multiplication végétative soit rapide peut entraîner une diminution des ressources allouées pour la floraison, (ii) le manque de diversité génétique est problématique en cas de propagation de maladies, et (iii) dans le cas d'espèces qui présentent une reproduction sexuée limitée ou absente, l'accumulation de mutations somatiques peut entraîner une diminution de la fertilité, voire la perte de la capacité à fleurir.

I.2.4 Allocation des ressources : priorité à la reproduction sexuée

Comme vu précédemment, les espèces capables des deux modes de reproductions comportent des avantages par rapport à celles qui se reproduisent uniquement par reproduction sexuée.

Néanmoins, au sein de ces espèces, la répartition des ressources ne semble pas égale pour les deux modes. En effet, bien qu'il y ait peu d'études concernant l'allocation des ressources entre la mise en place de la floraison et la formation des organes par multiplication végétative, un lien étroit semble exister entre le mode de reproduction et l'allocation des ressources en nutriments.

Ce lien a notamment été étudié chez l'espèce *Sagittaria pygmaea* qui fleurit et qui produit des tubercules à partir de stolons. Des tests ont été réalisés avec un arrosage avec différentes concentrations de fertilisant composé de nitrate (N), phosphate (P) et potassium (K). Les résultats ont montré qu'en cas de ressources limitantes, les stratégies adoptées semblent être d'une part, d'augmenter le développement des organes capables de réaliser la photosynthèse, et d'autre part, de privilégier la reproduction sexuée au détriment de la multiplication végétative (Liu *et al.*, 2009).

En conclusion, la multiplication végétative est un caractère développemental peu étudié au regard de son importance agronomique. Néanmoins, de nombreuses études principalement physiologiques ont été menées pour décrire les différents types de reproduction asexuée mais peu d'études ont porté sur le contrôle génétique ou la régulation de ce processus.

Toutefois, la pomme de terre reste l'espèce modèle la plus étudiée pour ses mécanismes de multiplication végétative bien qu'il s'agisse d'un modèle complexe puisqu'il comporte trois programmes de régulation dédiés respectivement à la floraison, la tubérisation et le stolonnage. Ces programmes sont interconnectés afin de maintenir un équilibre entre les différents modes de reproduction.

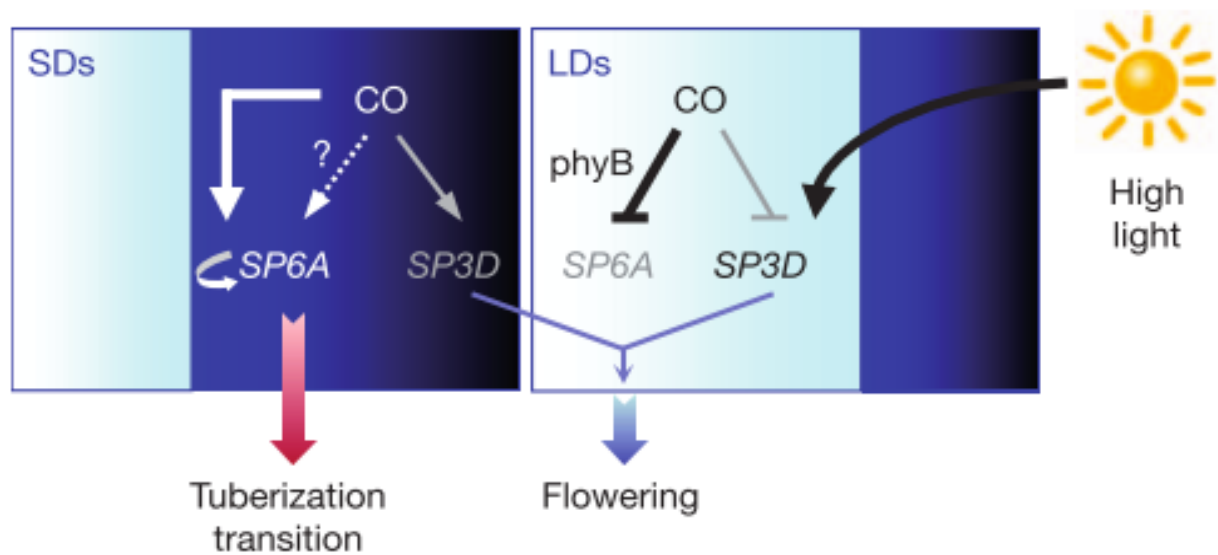


Figure 14 : Modèle du contrôle photopériodique de CO sur les deux homologues *FT* de la pomme de terre: *StSP3D* le florigène supposé et *StSP6A* l'activateur de tubérisation. Navarro *et al.*, 2011.

I.3 Contrôle moléculaire de la balance entre reproduction sexuée et multiplication végétative

Un grand nombre d'Angiospermes combine un mode de reproduction sexuée et un mode de multiplication végétative. Cette situation comme indiquée précédemment suggère l'existence d'un mécanisme de régulation de l'équilibre et la synchronisation entre ces deux modes de reproduction.

I.3.1 Un exemple d'équilibre : la pomme de terre

Les études menées sur le modèle pomme de terre ont permis d'identifier des acteurs clés dans le contrôle de la tubérisation, mais aussi dans le contrôle de la balance entre les modes de reproduction.

La reproduction végétative chez la pomme de terre nécessite comme la floraison plusieurs voies de signalisation. Ainsi, en conditions non-inductibles pour la floraison (jours courts), le stolon chez la pomme de terre grandit comme une tige horizontale et s'il est exposé à la lumière, il pourra émerger du sol pour former un nouveau plant. En conditions inductibles pour la floraison (jours longs), l'élongation du stolon cesse et un tubercule se forme à son extrémité (Xu *et al.*, 1998).

I.3.1.a Implication de FT dans la balance floraison / tubérisation

Chez la pomme de terre, quatre séquences homologues avec le florigène *FT* ont été identifiées. Parmi celles-ci, *StSP3D* a un rôle d'activateur de la floraison. Le gène est transcrit au niveau des feuilles et tout comme chez *A. thaliana*, la protéine migre jusqu'au méristème pour activer la floraison (Navarro *et al.*, 2011). La surexpression de *StSP3D* entraîne une floraison précoce alors que son extinction provoque une floraison tardive. Son expression pourrait être induite en jours longs via la protéine CO.

Une deuxième protéine, *StSP6A* est présente au niveau des feuilles et des stolons et sa présence est corrélée à la production de tubercules. La surexpression de *StSP6A* conduit à une floraison précoce alors que les plants perte-de-fonction pour *StSP6A* ne présentent aucune altération de la floraison mais la tubérisation est inhibée (Navarro *et al.*, 2011). La protéine *StSP6A* est donc un activateur de la tubérisation.

Sa présence en position subapicale du stolon lui permet d'inverser le programme développemental en modifiant les plans de division cellulaire et l'accumulation d'amidon (Abelanda *et al.*, 2014).

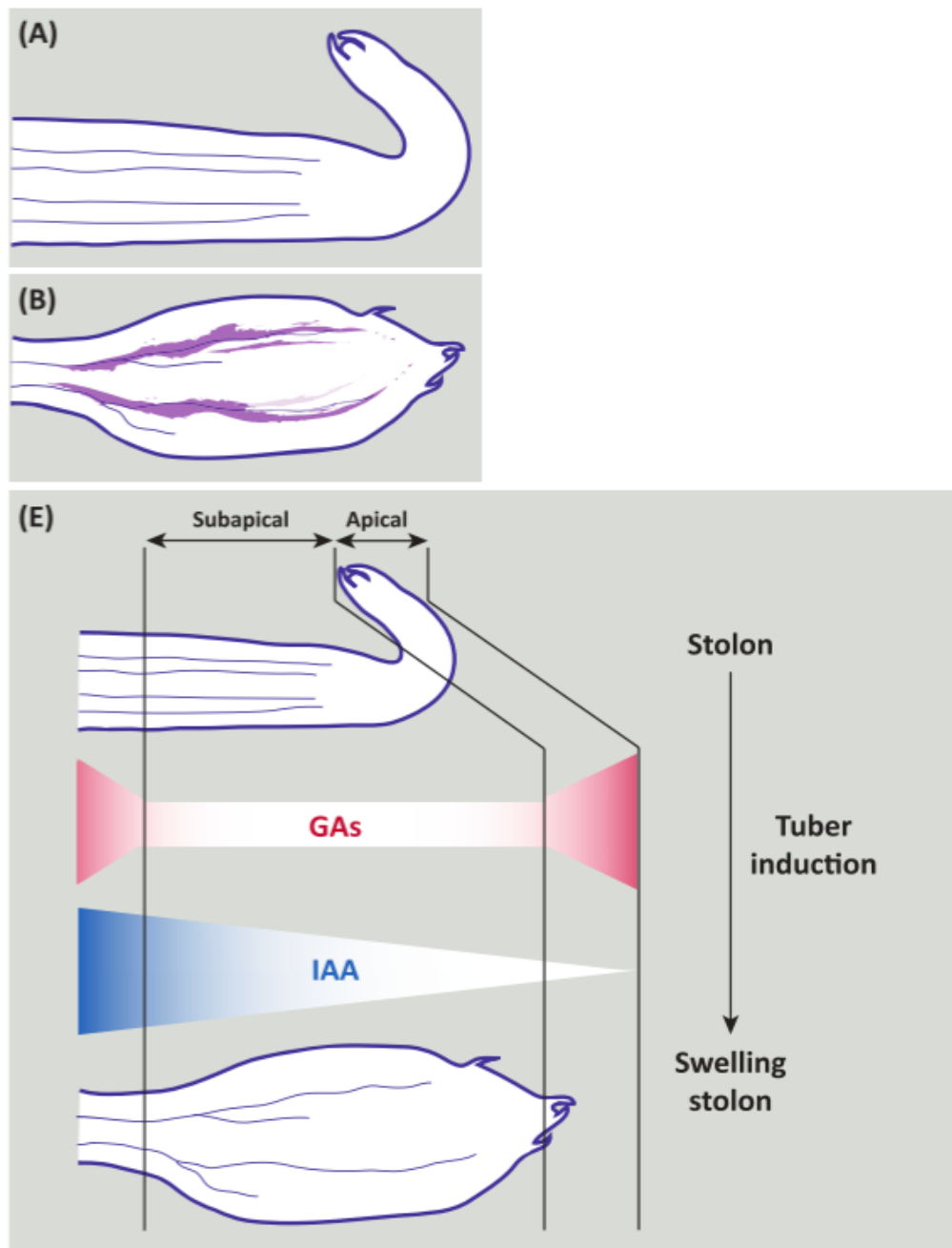


Figure 15 : Taux de GA et d'auxine (IAA) pendant l'induction de la tubérisation.

(A, B) Localisation tissulaire de l'expression de *StGA2ox1* dans une coupe longitudinale d'un stolon en transition vers la tubérisation.

(A) Aucune expression de *StGA2ox1* n'est détecté dans le stolon non-induit (jours longs).

(B) Expression au niveau des tissus vasculaires du tubercule en formation (en violet).

(E) Résumé de l'équilibre entre GA et Auxine pendant l'induction du tubercule.

Abelenda *et al.*, 2014.

Gonzalez-Schain *et al.* (2011) ont mis en évidence le rôle de la protéine *StCO*, homologue de la protéine CO d'*A. thaliana*, comme répresseur de la tubérisation. La surexpression de *StCO* retarde la tubérisation alors que son extinction favorise la multiplication végétative et ce, de manière dépendante de la photopériode (Figure 14). Ainsi, *StCO* régulerait les deux homologues de *StFT* uniquement en jours courts et serait donc tout comme chez *A. thaliana*, régulée de façon photopériodique (Gonzalez-Schain *et al.*, 2011).

Le gène *StTFL1* quant à lui est exprimé au niveau des racines et des stolons émergents et sa transcription diminue progressivement pendant la tubérisation. Sa surexpression entraîne une tubérisation normale en jours longs alors qu'elle a naturellement lieu en jours courts. Ainsi, *StTFL1* serait impliqué dans la régulation de la production de tubercules (Guo *et al.*, 2010).

1.3.1.b Rôle des hormones dans la multiplication végétative

Les deux principales hormones impliquées dans la tubérisation sont les auxines et les gibbérellines (GA).

L'application exogène d'auxines entraîne une augmentation de la tubérisation (Kumar et Wareing, 1974). De plus, une étude plus récente a permis de mettre en évidence le lien entre l'expression des gènes homologues aux gènes *PIN* codant des transporteurs d'auxines et le développement du tubercule. En effet, plusieurs *StPIN* sont exprimés au niveau du renflement du stolon qui se différencie en tubercule (Figure 15, Roumeliotis *et al.*, 2013, Abelenda *et al.*, 2014).

Kumar et Wareing (1974) ont aussi étudié l'implication des gibbérellines dans la tubérisation. L'apport de GA actives entraîne l'inhibition de la production de tubercule et la différenciation de méristèmes axillaires en stolons. De plus, l'expression du gène *StGA2ox1*, enzyme entraînant l'inactivation des GA actives, est augmentée pendant les premiers stades de développement du tubercule, au niveau du renflement du stolon en position subapicale (Kloosterman *et al.*, 2007). Ainsi, ce gène pourrait être impliqué dans l'initiation précoce du tubercule. Le gène *StGA3ox2*, gène de biosynthèse des GA a aussi été étudié. Son extinction par RNAi entraîne des plants plus petits et aux entre-nœuds plus courts, comme les plants surexprimant *StGA2ox1* (Kloosterman *et al.*, 2007, Roumeliotis *et al.*, 2013). Les transformants perte-de-fonction *StGA3ox2* présentent une augmentation du nombre de tubercules produits et une activation de la transcription des gènes *StGA2ox* (Roumeliotis *et al.*, 2013).

De plus, deux gènes à homéodomaines, *POTATO HOMEODOMAIN1* (*POTH1*) et *StBEL5*, homologue du gène *BEL5* d'*A. thaliana* sont comme impliqués dans la tubérisation (Hannapel *et al.*, 2013, Suarez-Lopez *et al.*, 2013).

I.3.1.c Contrôle du stolonnage de la pomme de terre ?

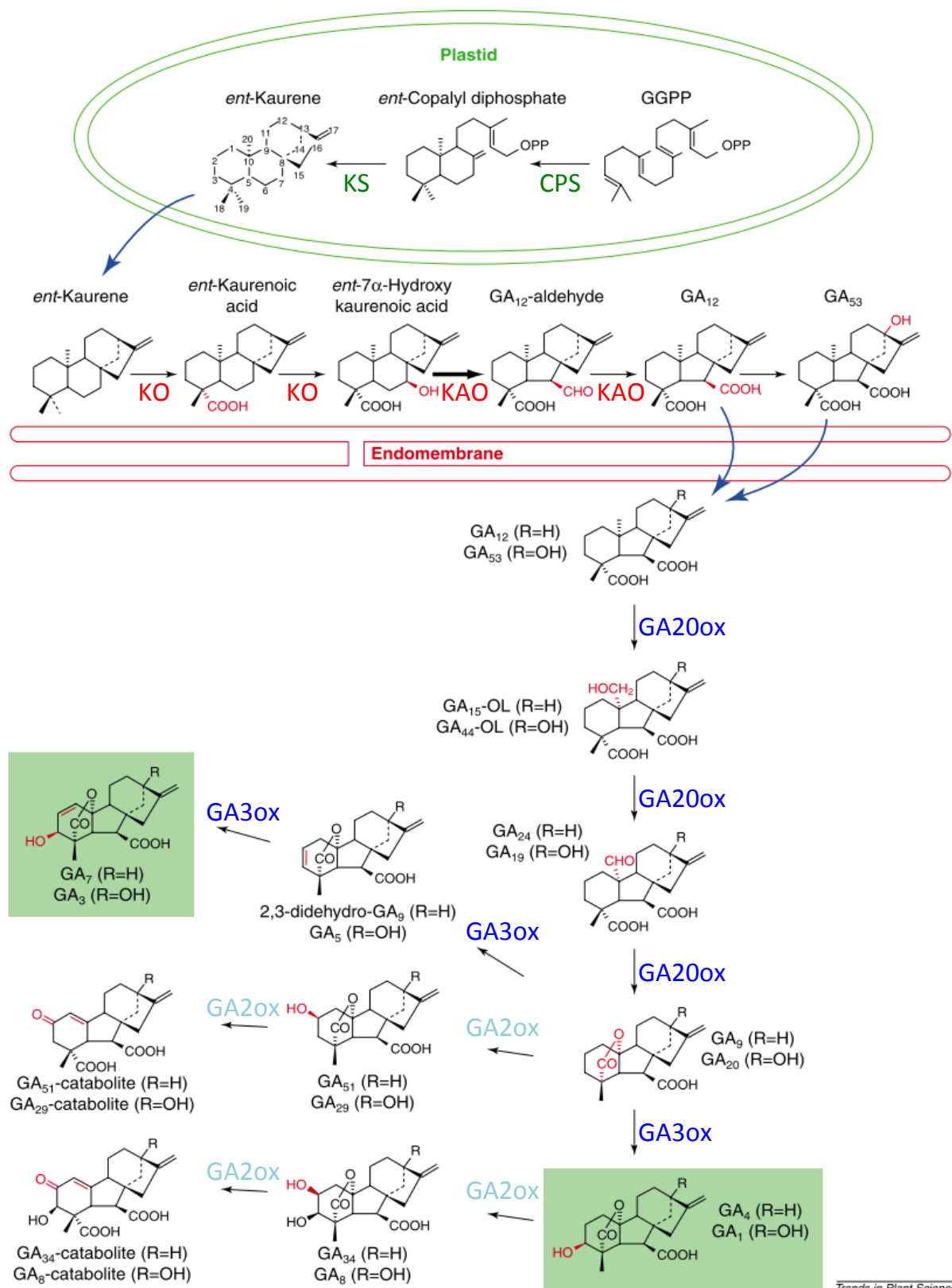
Peu d'études ont porté sur le contrôle du stolonnage chez la pomme de terre. Les GA actives diminuent au niveau des stolons au moment de l'initiation de la tubérisation (Kloosterman *et al.*, 2007, Roumeliotis *et al.*, 2013). Ce résultat va dans le même sens que celui de l'arrêt de la tubérisation après un traitement avec des GA actives exogènes (Kumar et Wareing, 1974). La présence des GA actives dans les tissus du stolons est corrélée à une expression des gènes de la voie de biosynthèse des GA (Kloosterman *et al.*, 2007, Roumeliotis *et al.*, 2013).

L'implication des GA dans le processus de stolonnage chez la pomme de terre constitue une porte d'entrée pour aborder les programmes de régulation de ce processus chez d'autres espèces.

I.3.2 FT : implication dans la multiplication végétative

Le gène *FT* est un intégrateur floral, et est considéré comme le florigène de nombreuses espèces. Néanmoins, au cours de l'évolution, des événements de duplication puis de néo-fonctionnalisation ont permis l'acquisition de gènes paralogues au gène *FT* mais qui n'ont pas forcément la fonction d'activateurs de la floraison.

Outre le cas de la pomme de terre chez qui une des protéines homologues à la protéine *FT* est un activateur de la tubérisation, l'oignon (*Allium cepa*) présente aussi des protéines *FT* ayant un rôle dans la multiplication végétative. L'oignon est une plante bisannuelle qui produit des bulbes par multiplication végétative. Cette espèce présente six homologues au gène *FT*. Il a été démontré que la vernalisation était suffisante pour déclencher l'induction florale chez l'oignon laquelle est corrélée à une augmentation de l'expression du gène *AcFT2* ce qui n'est pas le cas des autres gènes *AcFT*. Ainsi, *AcFT2* paraît être un bon candidat pour porter la fonction de florigène chez l'oignon. Mais de manière intéressante, la surexpression du gène *AcFT1* provoque un phénotype sévère correspondant notamment à la formation ectopique de bulbes (Lee *et al.*, 2013). Ainsi, la protéine *AcFT1*, homologues à *FT* favoriserait la multiplication végétative chez l'oignon.



Trends in Plant Science

Figure 16: Voie métabolique simplifiée des GA.

Le groupe fonctionnel de chaque molécule est en rouge, le radical de chaque molécule est indiqué entre parenthèses. Les GA actifs *GA*₁, *GA*₃, *GA*₄ et *GA*₇ sont encadrés en vert. Les enzymes TPS sont indiquées en vert (**KS** et **CPS**), celles appartenant au groupe des cytochromes sont écrits en rouge (**KO** et **KAO**) et enfin les oxydases 2ODD sont en bleu (**GA20ox**, **GA3ox** et **GA2ox**).

D'après Hedden and Phillips, 2000.

Même si peu d'études ont permis l'identification d'acteurs clefs de la régulation de la multiplication végétative, les études menées chez l'oignon et chez la pomme de terre ont montré que des voies de signalisation intervenant dans la régulation de la floraison chez *A. thaliana* peuvent également être impliquées dans la régulation de la multiplication végétative.

De plus, il semblerait que certaines voies soient déviées en faveur de la multiplication végétative. En effet, le signal porté par les GA peut, chez certaines espèces, avoir un effet activateur de la floraison et inhibiteur de la multiplication végétative ou à l'inverse chez d'autres espèces avoir un effet répresseur de la floraison et activateur de la multiplication végétative.

II. Les gibbérellines

Les acides gibbérelliques ou gibbérellines (GA) sont des phytohormones. Ces molécules ont été découvertes par Eiichi Kurosawa en 1926, grâce à l'isolement d'un champignon pathogène du riz *Gibberella fujikuroi* (aujourd'hui *Fusarium fujikuroi*). De manière générale, ces phytohormones sont impliquées dans le contrôle de la floraison, le développement de la graine et l'élongation cellulaire. Chez *A. thaliana* comme pour d'autres espèces annuelles, les gibbérellines sont des activateurs de la floraison. Il existe plus de 130 molécules dans la famille des gibbérellines dont quatre molécules sont considérées comme des gibbérellines actives c'est-à-dire exerçant une fonction biologique. Il s'agit de GA₁, GA₃, GA₄ et GA₇. Les autres molécules sont des précurseurs des formes actives ou des formes inactives.

II.1 Métabolisme

Les GA sont des molécules diterpéniques tétracycliques synthétisées à partir d'un précurseur diterpénoïde, le géranylgéranyldiphosphate (GGDP).

Le GGDP est présent au niveau des plastes. Il est converti en *ent*-Kaurene via deux réactions successives faisant intervenir des terpènes synthases (TPS) et des cytochromes P450. Les TPS sont constituées de l'*ent*-diphosphate synthase (CPS, initialement nommée GA1) et l'*ent*-Kaurène synthase (KS, initialement nommée GA2). Puis au niveau du réticulum endoplasmique, l'*ent*-Kaurène est converti en GA₁₂ par deux enzymes, l'*ent*-Kaurène oxydase (KO) et l'acide *ent*-Kaurenoic oxydase (KAO), qui vont catalysées trois réactions d'oxydation chacune (Figure 16).

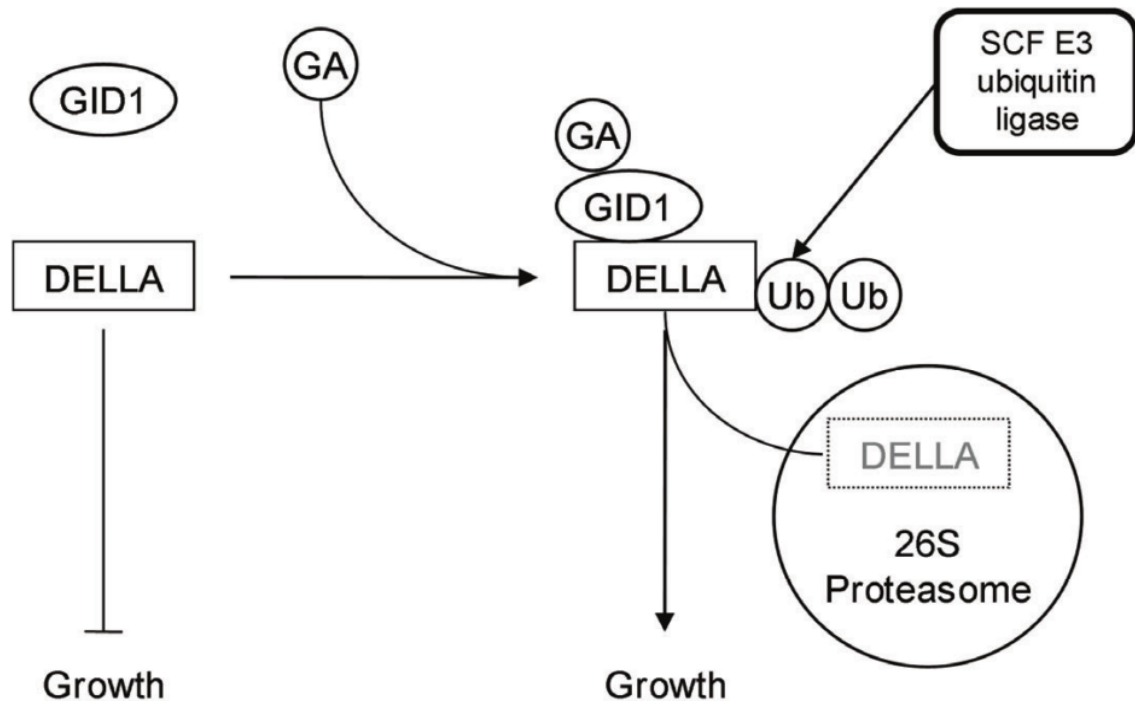


Figure 17: Schéma simplifié de la voie de signalisation des GA.

Sans GA, les protéines DELLA sont des répresseurs de la floraison.

Quand les GA sont synthétisées, elles sont perçues par les récepteurs solubles GID1, et ce complexe va se fixer sur la protéine DELLA. Le trimère ainsi formé va permettre l'ubiquitination (Ub) des DELLA et sa dégradation par le protéasome 26S.

Thèse T. Hytönen, 2009.

Dans le cytoplasme, le précurseur GA₁₂ va par la suite être converti en GA actives grâce à une dernière classe d'enzymes, les 2-oxoglutarate-dépendante dioxygénases (2ODD). Ce groupe est majoritairement constitué de trois enzymes, les GA 20-oxydases et les GA 3-oxydases qui permettent la conversion du GA₁₂ en GA actives et les GA 2-oxydases qui inactivent les GA actives (Figure 16, Hedden, 1999; Hedden and Phillips, 2000; Yamaguchi, 2008). Le contrôle de l'expression de ces gènes constituant le groupe 2ODD permet de finement réguler la voie métabolique des GA (Hedden and Thomas, 2012).

Les gènes codant les enzymes du groupe des 2ODD appartiennent à des familles multigéniques. Ainsi, chez *A. thaliana*, il existe cinq gènes *GA20ox*, quatre gènes *GA3ox* et sept gènes *GA2ox* (Yamaguchi, 2008).

II.2 Transduction du signal

II.2.1 Perception des GA par les GID

Les GA actives sont perçues par des récepteurs appelés GID pour GA INSENSITIVE DWARF, initialement isolés chez le riz (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Chez *A. thaliana*, il existe trois protéines GID1, GID1a, GID1b et GID1c dont les fonctions sont redondantes puisque les simples mutants perte-de-fonction ne présentent pas de phénotype particulier. Néanmoins, le triple mutant est nain et l'application de GA exogènes ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage (Griffiths *et al.*, 2006). Les récepteurs GID sont solubles et localisés dans le noyau. Ils se lient aux GA actives et le complexe est capable d'interagir physiquement avec les protéines DELLA (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005, Nakajima *et al.*, 2006, Figure 17).

II.2.2 Les protéines DELLA, cibles des GA

Les GA contrôlent le développement de la plante en réprimant les protéines DELLA qui sont des répresseurs des gènes de réponse à la signalisation par les GA (Gubler *et al.*, 2002). *A. thaliana* possède cinq gènes codant des protéines DELLA, *REPRESSOR OF ga1-3 (RGA)*, *GA-INSENSITIVE (GAI)*, *RGA-LIKE1 (RGL1)*, 2 (*RGL2*) et 3 (*RGL3*).

Les protéines DELLA ont la particularité de posséder trois domaines distincts, les domaines DELLA et VHYNP en position N-terminale et le domaine GRAS à l'extrémité C-terminale. Le domaine GRAS est conservé dans de multiples protéines régulatrices (Pysh *et al.*, 1999) et est responsable de la liaison avec les protéines à F-box (Dill *et al.*, 2004 ; Griffiths *et al.*, 2006). Le domaine DELLA quant à lui est nécessaire à la perception du signal porté par les GA à travers sa liaison avec le complexe GA-GID1 (Griffiths *et al.*, 2006).

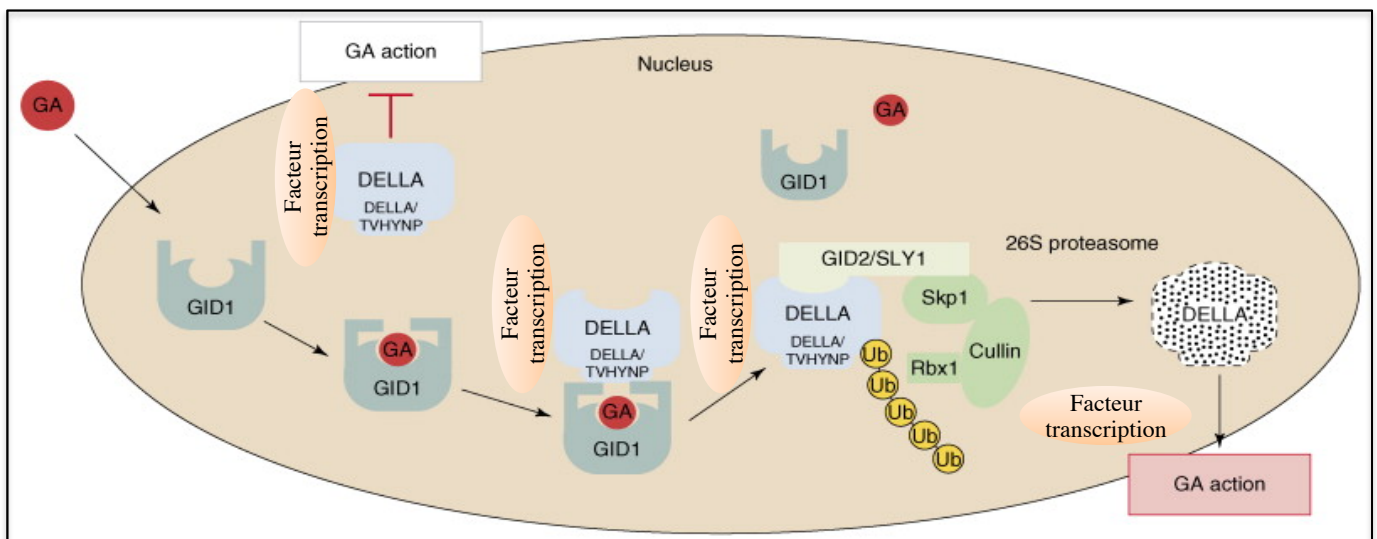


Figure 18 : Modèle de l'action des GA via la dégradation des protéines DELLA. En l'absence de GA, l'action de GA est réprimée par la séquestration de facteurs de transcription par les DELLA. En la présence de GA, les GA se lient au récepteur GID1, le complexe va se lier aux DELLA et permettre son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation permet la libération du facteur de transcription qui va permettre l'expression des gènes de réponse. D'après Hirano et al. 2008

Chez *A. thaliana*, les cinq protéines DELLA ont des fonctions distinctes et complémentaires en fonction de leur domaine d'expression. Ainsi, RGA et GAI contrôlent le développement végétatif et l'initiation florale. RGL2 intervient au niveau de la germination des graines et RGA, RGL1 et 2 interviennent dans le développement de la fleur et du fruit (Zentella *et al.*, 2007). Le mode d'action des protéines DELLA n'est pas encore totalement établi. En effet, différentes hypothèses ont été proposées, parmi lesquelles 1) les protéines DELLA séquestrent des facteurs de transcription tels que ceux de la famille des PIFs (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR*) et ainsi répriment la transcription de certains gènes (Figure 18, De Lucas *et al.*, 2008, Achard et Genschik, 2009) ; 2) les protéines DELLA agiraient en régulant directement l'expression des gènes de biosynthèse des gibbérellines. Ces hypothèses ne sont pas exclusives.

II.2.3 Complexe GID-GA-DELLA dans la réponse au signal GA

La liaison du complexe GID-GA avec les protéines DELLA fait intervenir la protéine SLY (SLEEPY). Cette dernière est une protéine à F-box qui interagit avec les protéines DELLA et qui intervient dans leur dégradation par le protéasome 26S (McGinnis *et al.*, 2003, Ariizumi *et al.*, 2008). L'inactivation des protéines DELLA peut également être obtenue en absence de la protéine SLY (Achard and Genschik, 2009). À côté des protéines qui participent à la dégradation des DELLA, une autre protéine SPY pour SPINDLY intervient comme activateur des DELLA (Olszewski *et al.*, 2002, Swain *et al.*, 2002, Silverstone *et al.*, 2007, Hauvermale *et al.*, 2014).

II.2.4 Migration des GA à travers la plante

Chez le maïs et chez le pois, des expériences de greffages de génotypes sauvages sur des mutants nains ont permis de restaurer la taille normale chez ces mutants et ont ainsi montré que les GA peuvent circuler dans la plante (Katsumi *et al.*, 1983 ; Proebsting *et al.*, 1992). Plus récemment chez *A. thaliana*, le mouvement longue distance des GA a été montré par l'application exogène de GA actives sur une seule feuille provoquant une floraison précoce (Eriksson *et al.*, 2006), et par des essais de greffage entre génotypes sauvage et mutants perte-de-fonction *della* (Ragni *et al.*, 2011) qui entraîne comme précédemment la restauration du phénotype sauvage. En 2015, une étude menée sur *A. thaliana*, en associant des expérimentations de greffages, de localisation de protéines DELLA marquées et le dosage de GA endogènes, a permis de prouver le mouvement longue distance des précurseurs GA₁₂ des GA actives (Regnault *et al.*, 2015).

II.2.5 Inactivation des GA et formes conjuguées

A côté de l'inactivation des GA par les gènes *GA2ox* décrit précédemment, d'autres mécanismes peuvent désactiver les GA tels que l'époxydation ou les méthylations. De plus, les GA actives peuvent aussi être conjuguées à d'autres molécules, notamment le glucose. Ces formes seraient potentiellement impliquées dans le stockage de GA et/ou dans leur transport. Néanmoins, la réversion de ces inactivations ainsi que leur possible rôle physiologique restent mal définis (Hedden et Thomas, 2012).

II.3 Rôle des gibbérellines dans le développement

Les GA sont intervennent sur de nombreux processus au cours du développement de la plante. Dans ce chapitre, je développerai exclusivement les processus qui concernent l'action des GA sur l'élongation des organes et la régulation des processus de reproduction.

II.3.1 Implication des GA dans le développement végétatif

La perte-de-fonction des gènes de biosynthèse des GA (*GA20ox* et *GA3ox*) ainsi que la surexpression des gènes d'inactivation (*GA2ox*) entraîne un phénotype nain par rapport au phénotype sauvage; ce résultat est en lien avec le rôle des GA dans l'induction de l'élongation cellulaire.

Chez *A. thaliana*, le facteur de transcription *PIF4* est impliqué dans la régulation des gènes de la photomorphogénèse. Le mutant perte-de-fonction *pif4* présente des hypocotyles plus courts alors que les plantes gain-de-fonction *PIF4* présentent une augmentation de leurs tailles. L'apport d'inhibiteur des GA entraîne une diminution de la taille de l'hypocotyle. A l'inverse, un traitement par les GA actives entraîne une augmentation de la taille. Ces diminutions ou augmentations de taille en fonction des traitements sont observables que ce soit avec le mutant perte-de-fonction ou avec les plantes gain-de-fonction (De Lucas *et al.*, 2008). De plus, l'interaction entre le facteur de transcription *PIF4* et les protéines DELLA (*RGA* et *RGL2*) a été montrée (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2010).

Un autre facteur de transcription de type AP2 et appartenant à la sous-famille Dehydration Responsive Element Binding Proteins (DREB), *DWARF AND DELAYED FLOWERING 1* (*DDF1*), a également été identifié chez *A. thaliana*. Sa surexpression cause une diminution des concentrations des GA endogènes et un phénotype nain (Magome *et al.*, 2004). Il serait impliqué dans l'élongation cellulaire au niveau des tiges.

Au niveau racinaire, le simple mutant *gal-3* d'*A. thaliana* (mutation au niveau de l'enzyme CPS qui intervient dans les premières étapes de la voie de biosynthèse des GA) présente des racines plus courtes que celles des plantes sauvages. Néanmoins, ce phénotype est restauré lorsqu'il y a perte-de-fonction des gènes *RGA* et *GAI* codant les protéines DELLA correspondantes (Fu et Harberd, 2003). Ces résultats suggèrent que ces deux protéines DELLA seraient impliquées dans l'inhibition de l'allongement racinaire qui est au contraire stimulé par les GA actives.

II.3.2 Rôle des GA dans la floraison

II.3.2.a Activation de la floraison chez les plantes annuelles

L'implication des GA dans l'induction de la floraison chez *A. thaliana* a été largement documentée.

Au chapitre *I.1.5.b (3)*, l'effet activateur des GA sur la floraison via la transcription du gène *CO* ou l'activation du gène *LFY* a été résumé chez *A. thaliana*. Enfin, le mutant *gal-3* présente un fort retard de floraison et comme nous l'avons vu précédemment, un phénotype nain. L'apport de GA actives permet d'obtenir une floraison normale entraînant l'expression de gènes liés à la floraison (Hisamatsu et King, 2008).

II.3.2.b Répression de la floraison chez les plantes pérennes

Les plantes pérennes sont par définition des plantes dont la période de végétation s'étend sur plusieurs années. Elles sont caractérisées par une alternance entre développement végétatif au cours duquel pourra se mettre en place un processus de multiplication végétative et floraison. Le contrôle de l'équilibre entre floraison et développement végétatif fait intervenir plusieurs acteurs parmi lesquels les GA semblent tenir un rôle majeur.

Chez *Lolium perenne*, par exemple, un lien étroit a été mis en évidence entre la vernalisation, les jours longs ainsi que les gibbérellines pour activer la floraison (Colleen *et al.*, 2005).

Chez le citronnier (Lord et Eckard, 1987), le litchi (Chen, 1990) ou encore le macadamia (Nagao *et al.*, 1999), des traitements exogènes par les GA et/ou des évaluations des concentrations de GA endogènes au moment de l'induction florale ont permis de montrer que les GA inhibent la floraison (Wilkie *et al.*, 2008). Il en va de même pour les espèces appartenant à la famille des Rosacées, comme le cerisier (Lenahan et Whiting, 2006), le prunier (Gonzalez-Rossia *et al.*, 2006), le néflier (Reig *et al.*, 2011), l'abricotier (Southwick *et*

al., 1997), le pommier (Bertelsen *et al.*, 2002) ou encore le nectarinier (Garcia-Pallas and Blanco, 2001).

De plus, chez d'autres espèces comme l'avocatier (Salazar-Garcia et Lovatt, 1998) ou le manguier (Wilkie *et al.*, 2008), il a été démontré que les GA, en plus d'inhiber la floraison, favorisent également le développement végétatif en augmentant le nombre de tiges végétatives chez l'avocatier par exemple.

Ce comportement est retrouvé chez d'autres espèces de Rosacées comme le rosier (Roberts *et al.*, 1999, Randoux *et al.* 2013) et le fraisier (Hytönen *et al.*, 2009).

II.4 Régulation de la voie métabolique

La voie métabolique des gibbérellines est régulée de façon à maintenir une concentration de GA optimale afin de contrôler la croissance et le développement de la plante.

II.4.1 Homéostasie des GA

II.4.1.a Boucle de rétrocontrôle

L'équilibre homéostatique en GA est conservé grâce à la régulation par une boucle de rétrocontrôle assurée par les GA elles-mêmes. Cet équilibre est également contrôlé par les protéines DELLA qui vont réguler l'expression des gènes de la voie de biosynthèse (Rieu *et al.*, 2008, Hedden et Thomas, 2012). En effet, des traitements exogènes de GA sur des mutants perte-de-fonction d'*A. thaliana* ont permis de mettre en évidence un contrôle de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse, *GA20ox* et *GA3ox*. Ainsi, chez le mutant *gal-3*, l'apport exogène de GA₃ actives entraîne la réduction de la transcription de ces gènes (Phillips *et al.*, 1995 ; Cowling *et al.*, 1998). Il en va de même pour la régulation des gènes d'inactivation *GA2ox* (Thomas *et al.*, 1999) pour lesquels l'application de GA actives chez le mutant *gal-2* entraîne la nette augmentation des transcrits du gène *GA2ox*.

L'expression des gènes *GID*, les récepteurs de GA actives, est aussi soumise à un rétrocontrôle. En effet, tout comme pour les gènes de biosynthèse, l'application de GA actives chez le mutant *gal-3* provoque la diminution de la transcription des gènes *GID* (Griffiths *et al.*, 2006).

II.4.1.b Régulation par des facteurs de transcription

Des facteurs de transcription à homéodomains sont des régulateurs négatifs de la voie des GA. Il s'agit notamment de facteurs de transcription de la famille des *KNOX* (*KNOTTED1-like homeobox*) parmi lesquels le gène *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* permet la répression des gènes de biosynthèse des GA (Hay *et al.*, 2002).

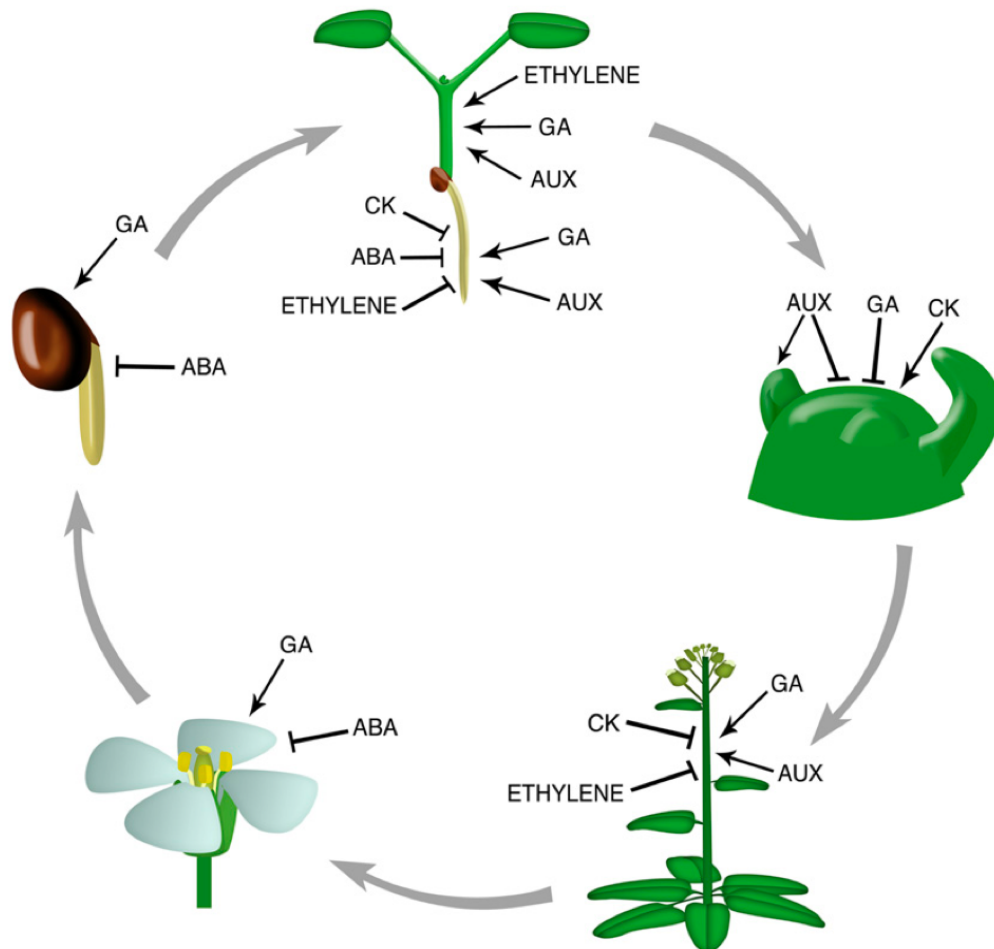


Figure 19: Modèle simplifié de l'interaction entre les GA et les autres principales hormones au cours du cycle de vie d'*A. thaliana*. CK = cytokinines, AUX = auxine, ABA = acide abscissique. Weiss and Ori, 2007.

Chez *Nicotiana tabacum*, le tabac, un autre facteur de transcription de la famille des protéines bZIP, REPRESSION OF GROWTH (RSG) régule la quantité de GA endogènes. Une forme de dominant négatif du gène *RSG* a permis de mettre en évidence la répression transcriptionnelle de l'*ent*-kaurene oxidase (KO) qui intervient dans les étapes précoces de biosynthèse des GA. En présence d'inhibiteur de GA, l'expression du gène *NtGA3ox* est augmentée alors que celle de *NtGA20ox1* n'est pas modifiée. Ainsi, la protéine RSG est impliquée dans le rétrocontrôle transcriptionnel de *NtGA20ox1* mais pas dans celui de *NtGA3ox* (Fukazawa *et al.*, 2010). Dans le cas présent, aucun lien avec les protéines DELLA n'a pu être établi.

Le gène *PICKLE* (*PKL*) serait aussi impliqué dans la régulation des GA. Chez *A. thaliana*, la protéine PKL intervient dans le remodelage de la chromatine et contribue donc à la régulation transcriptionnelle de certains gènes. Le mutant *pkl* présente une accumulation de GA actives. Chez ce mutant, l'expression des gènes de biosynthèse *AtGA3ox1* et *AtGA20ox1* est réduite (Henderson *et al.*, 2004). Ainsi, PKL interviendrait dans le contrôle de ces gènes. Cependant, le mécanisme permettant d'expliquer la diminution de l'expression de *AtGA3ox1* et de *AtGA20ox1* reste inconnu.

II.4.2 Interaction entre les GA et les autres hormones

Le développement de la plante nécessite une coordination de l'action des phytohormones notamment des auxines, des brassinostéroïdes, des cytokinines, de l'acide abscissique et de l'éthylène. L'interconnexion des voies de signalisation hormonale est un sujet d'étude dont la complexité est révélée par le nombre d'acteurs moléculaires mis en jeu et dont certains restent toujours non identifiés. Un descriptif non exhaustif des implications de chacun dans les processus développementaux, et ce, dans un grand réseau de régulation reste un challenge (Figure 19, Weiss et Ori, 2007 ; Davière et Achard, 2015).

Les auxines agissent en concomitance avec les GA en favorisant la floraison. Ainsi, en présence d'auxines, des répresseurs appelés Aux/IAA (AUXin/Indole-3-Acetic Acid) sont dégradés libérant ainsi les facteurs de transcription ARF pour Auxine Response Factor qu'ils séquestraient (Frigerio *et al.*, 2006). Ces facteurs de transcription ARF vont alors activer la transcription des gènes de biosynthèse des GA et inhiber celle des *GA2ox* (Figure 20, Weiss and Ori, 2007) chez *A. thaliana*.

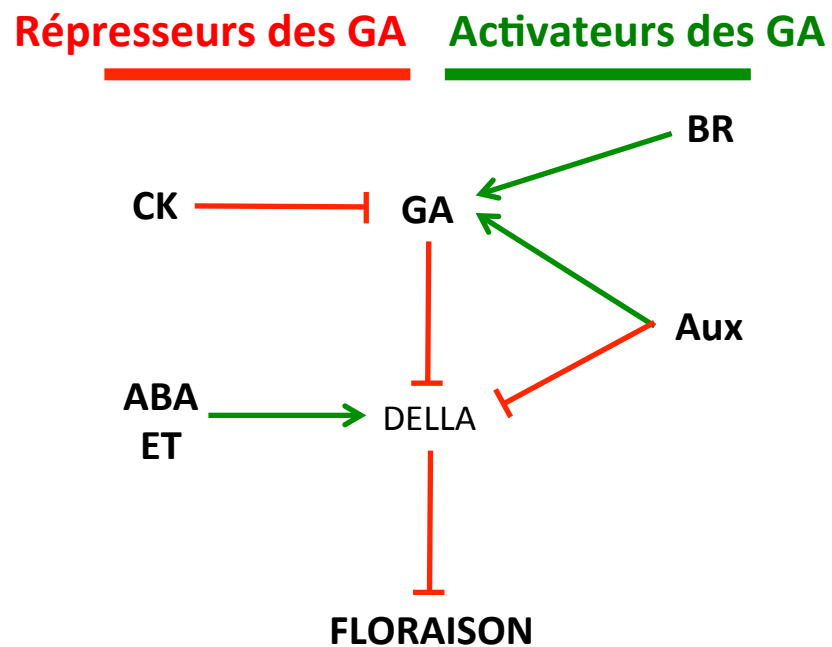


Figure 20: Schéma simplifié du réseau hormonal agissant sur la voie des GA. Résumé de la régulation des GA par les autres hormones: CK= cytokinines, Brassinostéroïdes, ABA = acide abscissique, ET = éthylène, Aux = auxines.

Une récente étude menée par Unterholzner *et al.* (2015) a permis de mettre en évidence que chez les mutants perte-de-fonction *br1* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1*) affectés sur la voie des brassinostéroïdes, la production de GA actives est fortement réduite ainsi que la transcription des gènes *GA20ox* et *GA3ox*. De plus, chez ces mutants, l'expression du gène *AtGA20ox1* placée sous le contrôle du promoteur natif de *BRI* permet la restauration du phénotype sauvage chez les mutants qui présentent un phénotype nains (Unterholzner *et al.*, 2015 ; Figure 20) Ainsi, les brassinostéroïdes agiraient comme des activateurs de la voie de biosynthèse des GA.

Les cytokinines quant à elles ont un rôle antagoniste aux GA. En effet, des apports exogènes de CK sur *A. thaliana* ont permis de mettre en évidence la répression transcriptionnelle des gènes *GA20ox* et l'augmentation des transcrits des gènes *DELLA* (Brenner *et al.*, 2005). De ce fait, les cytokinines agiraient comme des répresseurs de la voie des GA (Figure 20).

L'acide abscissique et l'éthylène sont des phytohormones impliquées dans le développement de la plante, spécialement lorsque les conditions environnementales sont défavorables. L'éthylène entraîne un retard de floraison chez *A. thaliana* et cette répression est supprimée par l'application exogène de GA actives (Achard *et al.*, 2007, De Grauwe *et al.*, 2007, Weiss and Ori, 2007). L'éthylène aurait un mode d'action étroitement lié aux répresseurs de GA, les protéines DELLA (Figure 20, Achard *et al.*, 2007).

Le mode d'action de l'acide abscissique est similaire, en réprimant des processus développementaux de façon DELLA-dépendante (Figure 20, Achard *et al.*, 2006, Weiss and Ori, 2007).

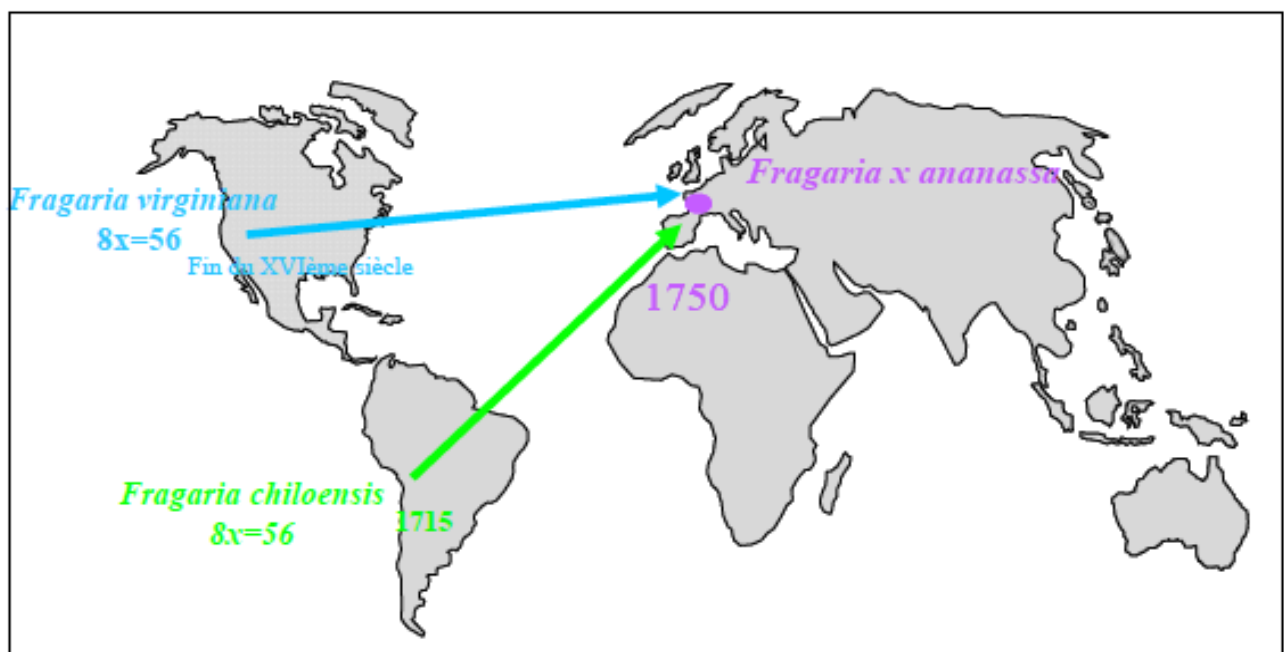


Figure 21: Origine du fraisier cultivé octoploïde *F. x ananassa*.

III. Le Fraisier : un modèle d'équilibre entre reproduction sexuée et multiplication végétative

III.1 Histoire et contexte économique

III.1.1 Histoire et domestication

Durant la période romaine, les fraisiers étaient utilisés pour leurs propriétés médicinales. Jusqu'au Moyen-Age, seul le fraisier des bois *Fragaria vesca* L. ($2n=2x=14$) était récolté. Les premiers récits de culture de fraisiers en Europe datent de 1368 grâce au roi Charles V qui demanda la plantation de 1 200 plants dans les jardins royaux du Louvre à Paris. Par la suite, les premières descriptions botaniques eurent lieu en 1484 via l'étude de trois espèces européennes : *F. vesca*, *F. viridis* et *F. moschata*. A partir du XVI^{ième} siècle, la culture du fraisier hexaploïde *F. moschata* ($2n=6x=42$) supplanta la fraise des bois en Europe grâce à ses plus gros fruits.

Ce n'est qu'au XVII^{ième} siècle qu'arrivèrent en Europe les premiers fraisiers octoploïdes ($2n=8x=56$) via l'espèce américaine *F. virginiana* Mill. provenant de Virginie. Cette espèce de fraisier produisit des fruits plus gros et fut plus vigoureuse que les espèces diploïdes (*F. vesca*) ou hexaploïde (*F. moschata*) jusqu'ici connues en Europe. En 1716, une deuxième espèce américaine octoploïde ($2n=8x=56$), *F. chiloensis*, provenant du Chili fut introduite en Europe. Les plants importés étant mâle stérile, cette espèce fut propagée par stolons et cultivée dans de nombreux jardins botaniques européens (Darrow, 1966).

III.1.2 Origine du fraisier cultivé octoploïde : *Fragaria x ananassa*

Un siècle plus tard, la présence simultanée entre les deux espèces américaines : *F. virginiana* et *F. chiloensis* entraîna la création d'une nouvelle espèce hybride interspécifique octoploïde ($2n=8x=56$) appelée *F. x ananassa* (Figure 21). Cette espèce serait issue de la pollinisation de l'espèce chilienne (mâle stérile) par *F. virginiana*, et cumulait les qualités des deux espèces parents, l'arôme et la taille des fruits de *F. chiloensis* et la couleur et la capacité à produire des stolons de *F. virginiana*. A partir des années 1800, les sélectionneurs ne cessèrent pas d'améliorer ce fraisier pour donner les centaines de variétés existantes aujourd'hui.

III.1.3 Le marché de la fraise : contexte économique

Au niveau mondial, près de 136 kilos de fraises sont produits par seconde, dans le monde, soit 7,739 millions de tonnes en 2013. L'Europe produit plus d'un quart de ce total et la France se situe au sixième rang européen dans la production de fraises, avec plus de 56 000 tonnes en 2013 (FAOStat, <http://faostat3.fao.org>). Cette culture, par sa valeur ajoutée, représente un atout important pour le maintien d'un tissu rural. Ainsi, le marché de la fraise représente environ 30.000 emplois directs et indirects pour les filières plants (~100 millions de plants produits en France) que fruits. Son chiffre d'affaire la classe en 3^{ème} position des espèces fruitières après la pomme et la poire et devant la pêche et nectarine.

III.2 Fraisier diploïde: modèle d'étude du fraisier octoploïde

Le génome du fraisier cultivé *F. x ananassa* est octoploïde ($2n=8x=56$) et compte parmi les plus complexes des espèces cultivées. Le fraisier des bois, *F. vesca*, quant à lui est diploïde ($2n=2x=14$) et présente des caractéristiques qui en font un modèle très intéressant pour le genre *Fragaria*, mais aussi pour toute la famille des Rosacées à laquelle il appartient (Slovin *et al.*, 2009).

III.2.1 Avantages et outils disponibles du fraisier diploïde

Le fraisier des bois, *F. vesca*, est diploïde et comporte un petit génome de 240 Mb séquencé en 2011 (Shualey *et al.*, 2011), un temps de génération de graines à graines relativement court (4 mois pour certains génotypes) et est génétiquement transformable (Oosumi *et al.*, 2006).

Chez le fraisier et plus largement chez les Rosacées, les données génomiques sont disponibles sur le Genome Database for Rosaceae (GDR, <http://www.rosaceae.org>). Ces données regroupent par exemple les génomes séquencés : le fraisier des bois (*F. vesca*), le pommier (*Malus domestica* ; Velasco *et al.*, 2010), le pêcher (*Prunus persica* ; The International Peach Genome Initiative, 2013), ou des données de Whole Genome Sequencing (WGS) de différents génotypes de fraisier et d'autres espèces.

Ce site réalise des mises à jour régulières. Ainsi, récemment, une nouvelle version du génome du fraisier diploïde numérotée v2.0a a été mise à disposition après révision de l'assemblage (Tennessen *et al.*, 2014).

F. vesca
($2n=2x=14$)



F. x ananassa
($2n=8x=56$)

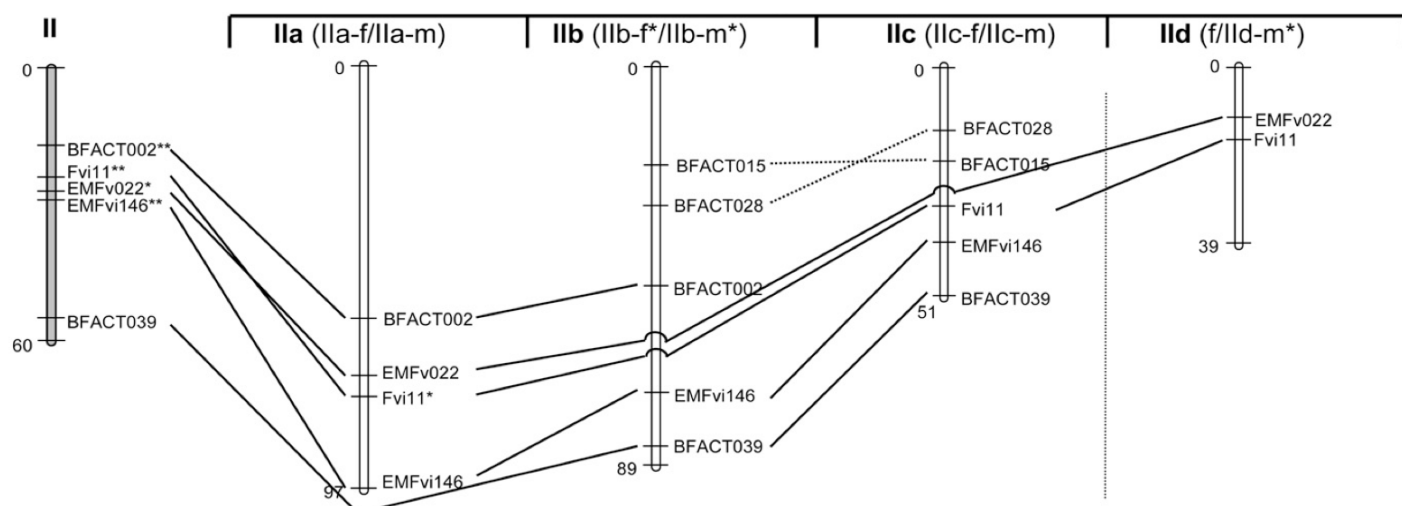


Figure 22: Exemple de cartographie comparée du groupe de liaison 2, entre la carte de liaison génétique du fraisier diploïde et celle du fraisier octoploïde.

D'après Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008).

En 2013, une nouvelle base de données a été mise à disposition, appelée SGR pour Strawberry Genomic Resources (<http://bioinformatics.towson.edu/strawberry/Default.aspx>). Ce site comporte entre autre des résultats de RNA sequencing effectués sur divers organes, principalement floraux et chez le fraisier diploïde (Darwish *et al.*, 2013).

III.2.2 Transférabilité des informations génétiques du fraisier diploïde au fraisier cultivé octoploïde

Une étude de cartographie comparée (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008) a permis de mettre en évidence que la macrosynténie et la macrocolinéarité entre les génomes des fraisiers diploïdes et octoploïdes sont relativement bien conservées (Figure 22). De plus, une étude de phylogénie (Rousseau Gueutin *et al.* 2009) a mis en évidence que le fraisier diploïde *F. vesca* était à l'origine de deux des quatre sous-génomes du fraisier octoploïde, les deux autres appartenant à l'espèce japonaise *F. iinumae*. Plus récemment, un nouveau regard a été apporté sur les origines et la dynamique des quatre sous-génomes du fraisier octoploïde grâce à la réalisation d'une carte de liaison haute densité par « capture ciblées ». Le génome de *F. vesca* représenterait un seul des quatre sous-génomes et les trois autres appartiendrait à *F. iinumae* ou un ancêtre de *F. iinumae*. Ces trois génomes de *F. iinumae* présenteraient de nombreuses introgressions de *F. vesca*.

Ainsi, les informations génétiques peuvent être transférées du fraisier diploïde génétiquement simple vers le fraisier octoploïde plus complexe ce qui fait du fraisier diploïde une référence pour l'étude des Rosacées. Cependant, il est important de prendre en compte les réarrangements possibles qui ont eu lieu chez le fraisier polyploïde et qui sont clairement visibles en macrosynténie lors de l'étude de BAC homéologues (Perrotte, comm. pers.).

III.3 Le fraisier, une plante herbacée pérenne

Le fraisier appartient à la famille des Rosacées qui compte plus de 100 genres et 3 000 espèces (Shualev *et al.*, 2008). Cette famille représente la troisième famille la plus importante économiquement, en regroupant des arbres fruitiers (pommier, pêcher...), des espèces herbacées (fraisier, framboisier) ainsi que des plantes ornementales (rosier, potentille) (Dirlewanger *et al.*, 2002).

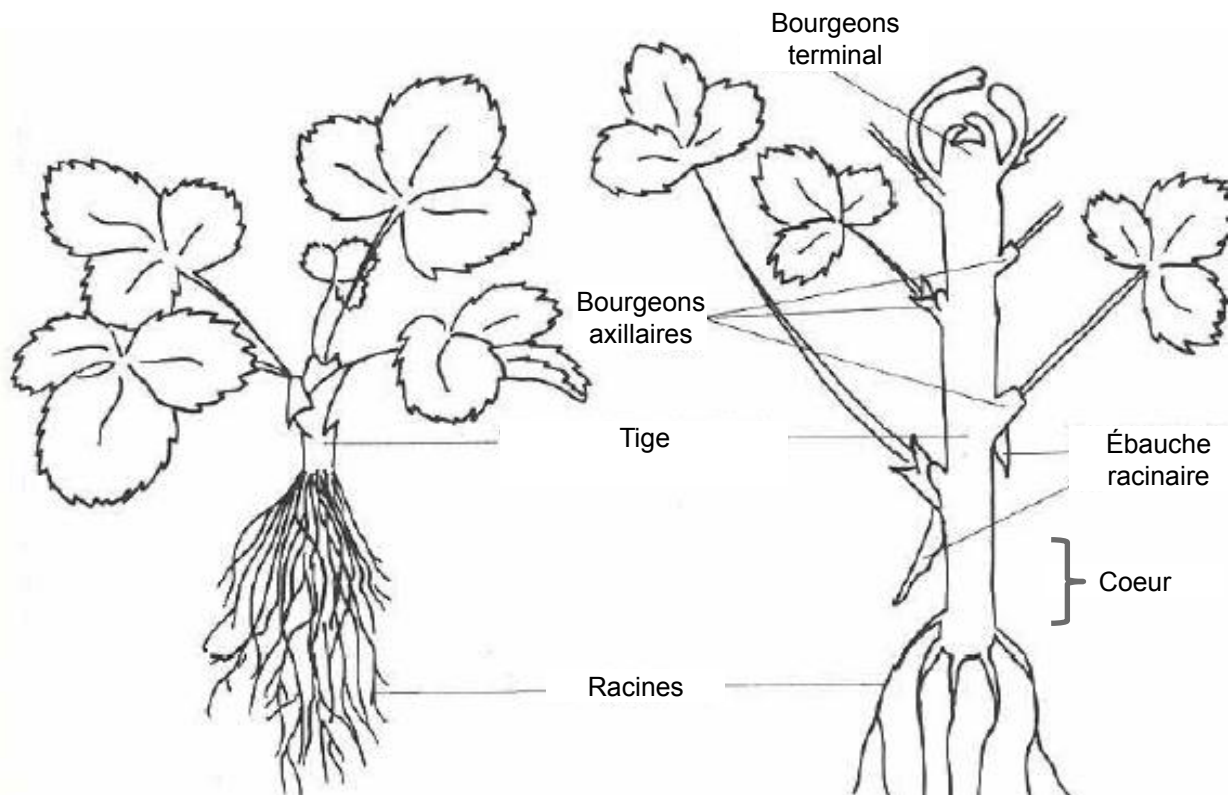


Figure 23: Dessin d'un jeune plant de fraisier. Les entres nœuds ont été exagérément allongés pour faire apparaître la structure du plant. D'après Risser et Navatel, 1997.

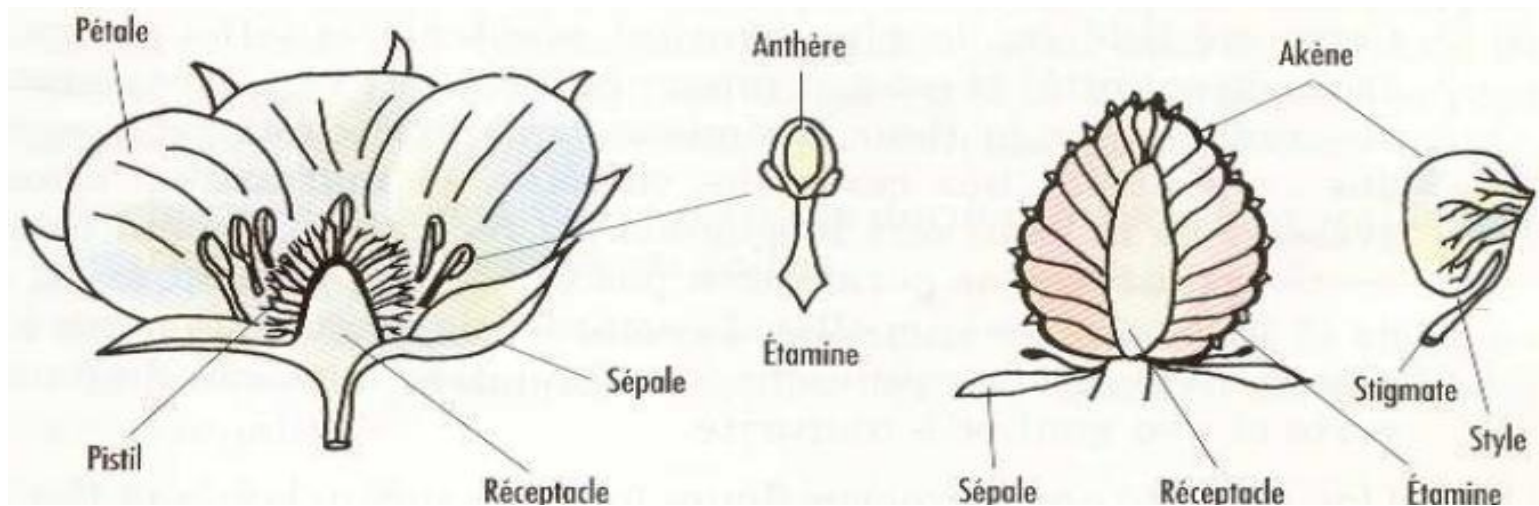


Figure 24: Coupes longitudinales d'une fleur de fraisier et d'une fraise. Les proportions entre les organes ne sont pas respectées. D'après Risser et Navatel, 1997.

Le fraisier appartient à la sous-famille des Rosoïdées et au genre *Fragaria*. Ce genre regroupe 23 espèces au niveau de ploïdie allant du diploïde au décaploïde. La répartition géographique du fraisier est large et variée à travers le monde, les espèces diploïdes poussaient à l'état naturel dans les sous-bois européens et sont retrouvés sous un climat tempéré des Etats-Unis ainsi qu'en Eurasie (Staudt, 1989).

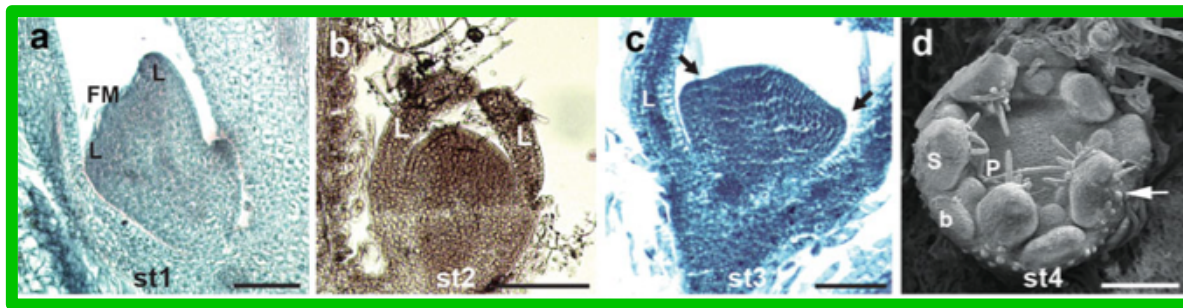
III.3.1 Description botanique

Le fraisier est une dicotylédone, herbacée et pérenne. Il est composé d'une tige ramassée, aux entre-nœuds courts, avec des feuilles trifoliées alternes imbriquées en rosette (Figure 23, Guttridge 1955, Risser and Navatel, 1997). La tige avec le bourgeon terminal forme une structure appelée cœur (Costes *et al.*, 2014).

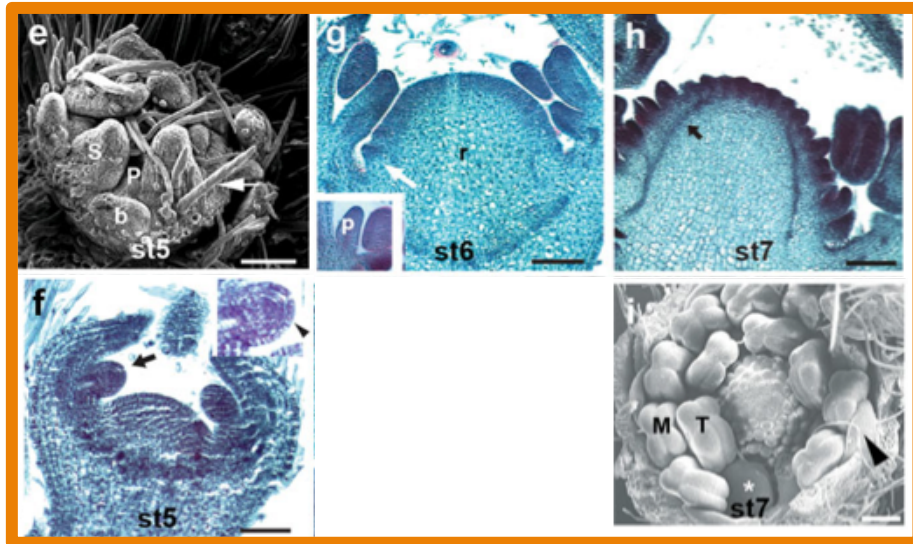
Le fraisier a une croissance déterminée, quand la dormance apicale est levée, l'inflorescence se forme au niveau du méristème terminal. L'inflorescence du fraisier est une cyme bipare et le nombre de fleurs produites est variable. La fleur quant à elle, comporte : cinq sépales, cinq pétales, 20 étamines répartis en deux ou trois cercles et enfin un très grand nombre de carpelles insérés sur un réceptacle charnu (Figure 24). Chaque pistil comporte un carpelle contenant un ovaire.

Les stades de développement de la fleur du fraisier diploïde ont été décrits par Hollender *et al.*, (2012) et peuvent être divisés en trois étapes : quatre stades précoces, suivis de trois stades correspondant à l'initiation florale et au développement des organes reproducteurs, et enfin, quatre stades présentant la différenciation des organes floraux (Figure 25). Le fraisier a un développement sympodial, c'est-à-dire qu'après la floraison, la croissance végétative reprend à partir de méristème axillaire placé directement sous la hampe florale. De nouveaux axes peuvent également repartir des méristèmes axillaires, ce qui conduit à une croissance partiellement monopodiale. Ces nouveaux axes sont appelés des cœurs.

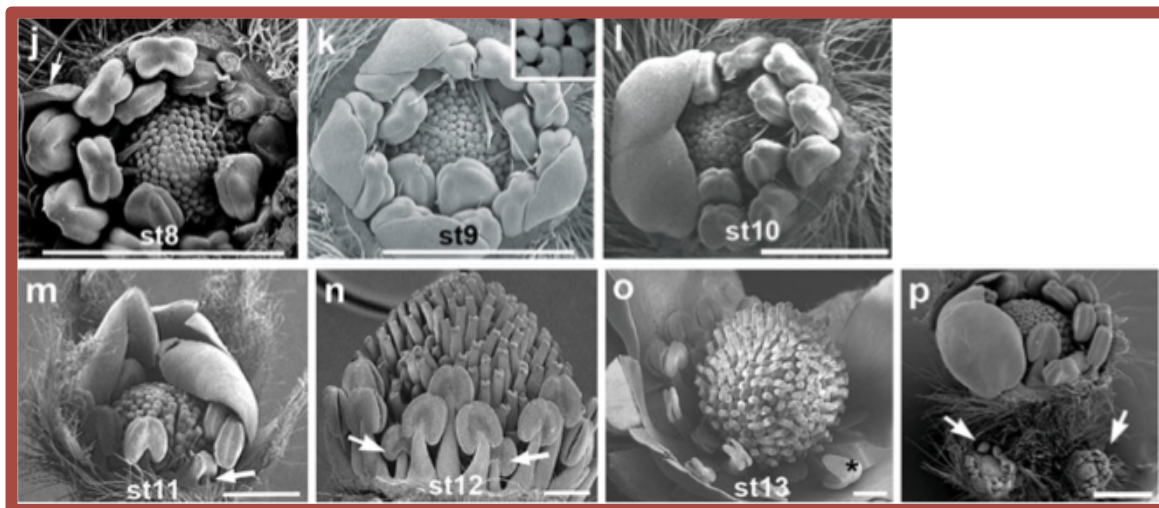
La fraise est un faux fruit et le véritable fruit est un akène, c'est-à-dire un fruit sec contenant la graine. L'organe charnu correspond au réceptacle mûr sur lequel les akènes se développent (Figure 24).



Stades
précoces



Initiation de la
floraison
&
Développement des
organes reproducteurs



Différenciation
des organes
floraux

Figure 25: Stades de développement du méristème floral puis d'une fleur de *Fragaria vesca*, coupes histologiques (a-c, f-h) et images de microscopie électronique (i-p).

FM= méristème floral, L= ébauche foliaire, S= sépale, P = pétale, b = bractée, r = réceptacle, p = ébauche de pétale, M = ébauche de carpelle, T = ébauche d'étamine.

Barre a-g = 100µm, h-p = 1mm. D'après Hollender *et al.*, 2012.

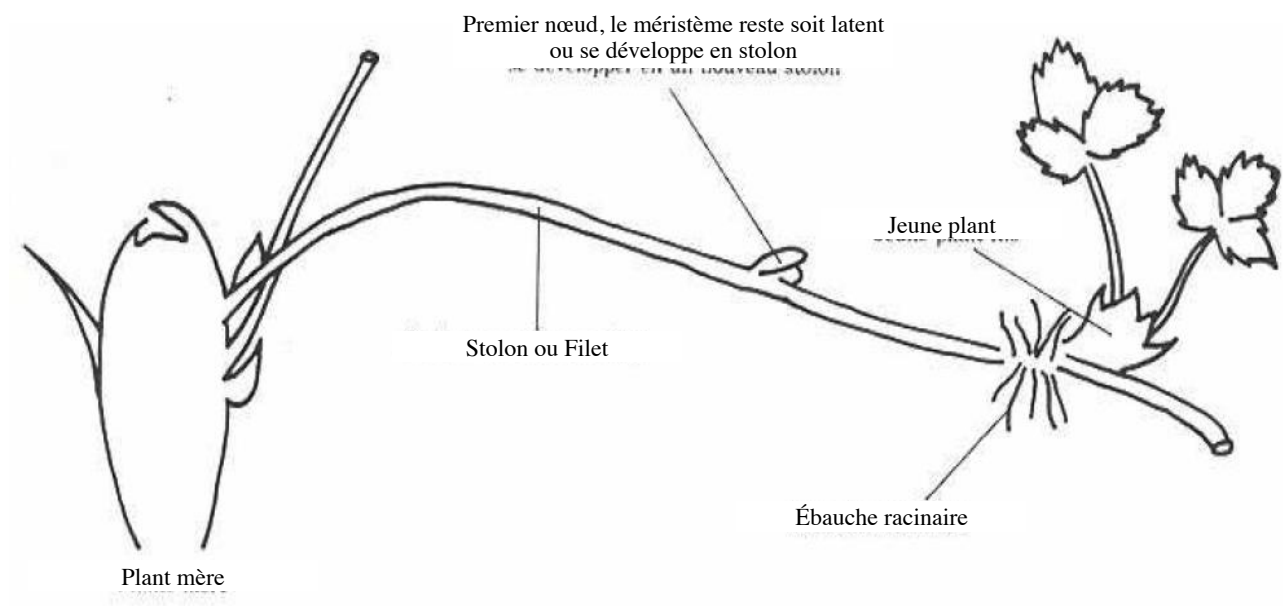


Figure 26 : Représentation d'un bourgeon axillaire se développant en stolon pour former un nouveau plant. D'après Risser et Navatel, 1997

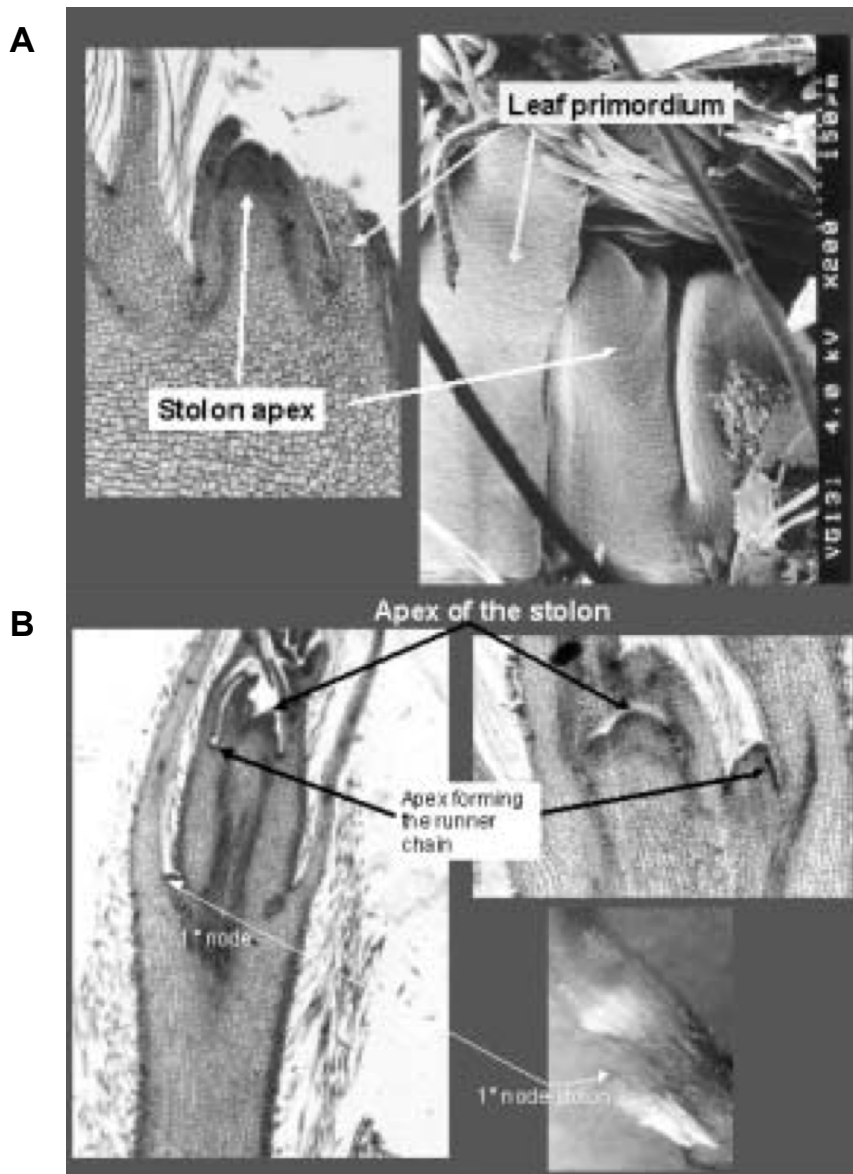


Figure 27 : A) Coupe histologique et image de microscopie électronique, au stade de deux ébauches foliaires, moment où la différenciation en stolon du méristème axillaire devient visible. B) Coupes histologiques et photo représentant le départ du filet à partir du méristème de stolon. D'après Savini *et al.*, 2005.

A l'aisselle de chaque feuille, sont situés les méristèmes axillaires végétatifs. Ces derniers peuvent avoir plusieurs devenir : rester dormant, devenir des axes inflorescentiels, donner de nouveaux cœurs ou se différencier en stolon, en fonction de leur position sur la tige (Guttridge, 1956, Costes *et al.*, 2014). Ces deux dernières structures sont génétiquement identiques au plant mère.

Les stolons sont des ramifications qui, à la différence des cœurs, comportent des entrenœuds allongés et se développent à l'horizontal.. Le premier nœud reste dormant et à partir du deuxième nœud, un plant génétiquement identique au plant mère va être produit en position terminale. Après enracinement, ce nouveau clone aura une vie autonome au plant mère et un plan de développement identique. Cette aspect d'autonomisation des plants clones s'apparente à la notion de réitérations, notamment connu chez les arbres fruitiers. Par la suite, le développement de nouveaux nœuds s'effectuera à partir d'un méristème axillaire du plant fille produit permettant ainsi la production de nouveaux plants filles à chaque nouveau nœud (Figures 26 et 27, Savini *et al.*, 2005).

III.3.2 Cycle de développement

Le fraisier est une plante vivace et pérenne, de ce fait, elle est capable d'adapter son développement aux conditions climatiques et de perdurer plusieurs années en réalisant plusieurs floraisons.

Le cycle annuel de développement d'un fraisier de saison ou non remontant peut être résumé en quatre étapes majeures (Figure 28) :

- (1) une phase d'initiation florale qui a lieu en automne ;
- (2) une phase de dormance pendant l'hiver durant laquelle le plant ralentit sa croissance ; cette phase est initiée par la diminution de la photopériode et de la température ;
- (3) une phase d'émergence d'inflorescences corrélée à une production de fruits pendant l'été ;
- (4) une phase de multiplication végétative via la production de stolons.

III.4 La floraison du fraisier

Les fraisiers sont présents sur tout l'hémisphère nord, ce qui suggère une grande adaptabilité pour faire face à des conditions climatiques contrastées (Darrow, 1966). Le fraisier, diploïde comme octoploïde, présente deux types de floraison en fonction de leur génotype, que l'on distingue comme 'non remontant' (once flowering, OF) ou 'remontant' (perpetual flowering, PF) (Brown and Wareing, 1965, Albani *et al.*, 2004 ; Gaston *et al.*, 2013).

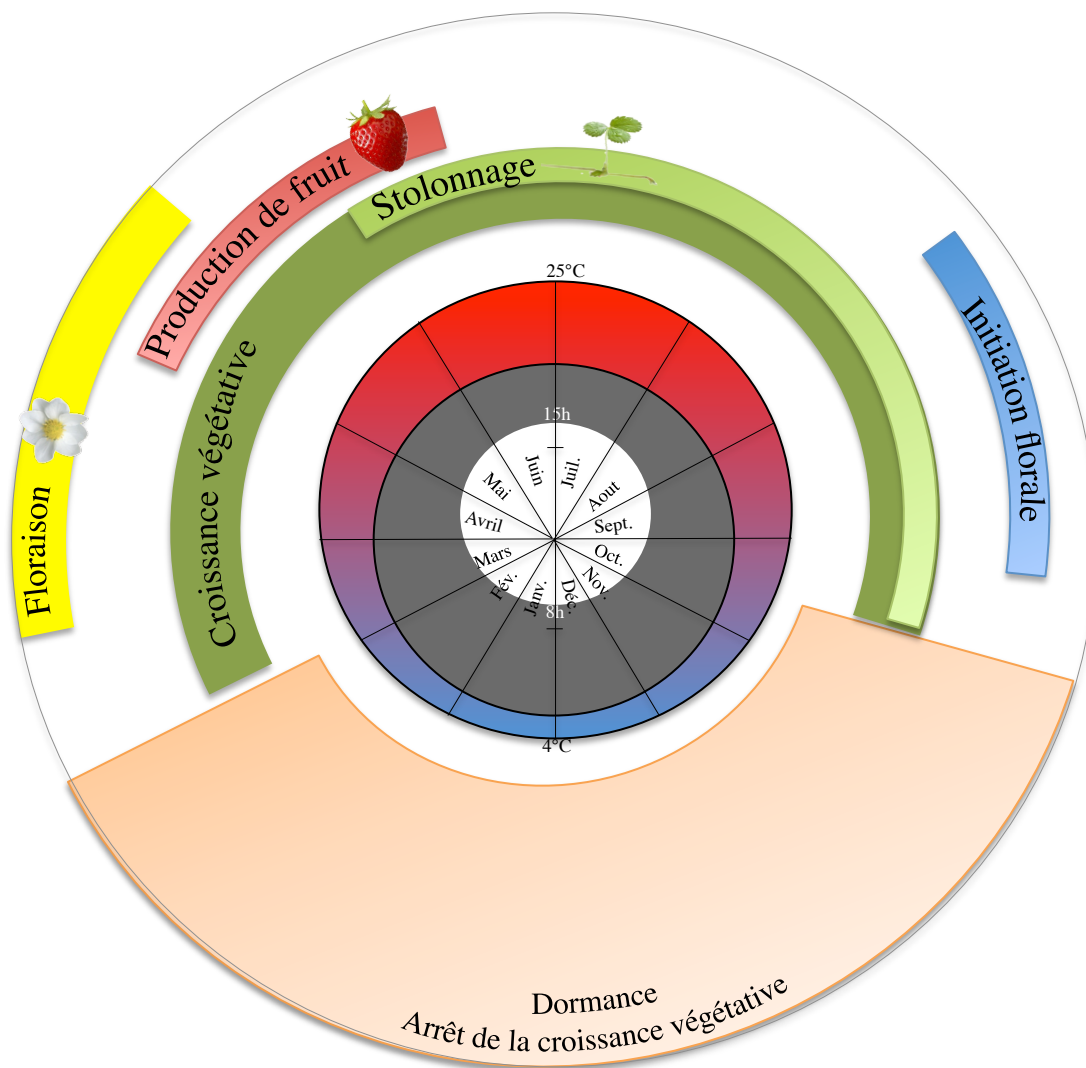


Figure 28: Cycle de développement des fraisiers non-remontant dans l'hémisphère nord.

Le cycle de développement est présenté sur une année calendaire.

Dans les cercles centraux sont représentées la photopériode avec la durée de nuit (en gris) et la température moyenne pendant les mois de l'année (dégradé de bleu, température froide et rouge, température chaude).

Thèse J. Perrotte 2013

III.4.1 Les différents types de floraison

La remontée florale se définit comme la capacité d'une plante à fleurir tout au long de l'année. Ce caractère constitue un caractère d'intérêt agronomique important pour les espèces cultivées, et se retrouve chez d'autres espèces telles que le rosier. De part son importance agronomique et économique, la remontée florale a été le sujet de plusieurs études physiologiques et génétiques menées sur le fraisier cultivé (Heide *et al.*, 2013 ; Gaston *et al.*, 2013) et le fraisier des bois (Albani *et al.*, 2004, Iwata, Gaston *et al.*, 2012). Dans le cadre de ce travail, nous nous focaliserons sur les données obtenues pour le fraisier diploïde *F. vesca*.

III.4.1.a Les génotypes non-remontants

Le fraisier est classé comme plante de jours courts. Cependant la période d'induction florale est inconnue et pourrait se situer en jours raccourcissant lorsque les plants sont placés en conditions naturelles (Denoyes, comm. pers.). L'induction florale résulte d'une interaction entre la longueur du jour et la température. Des températures trop basses ($<8^{\circ}\text{C}$) ou trop haute ($>30^{\circ}\text{C}$) ne permettent pas l'induction florale quelque soit la photopériode (Guttridge, 1979). Avec des photopériodes autour de 12h de jour, les températures doivent être inférieures à 18-20°C pour qu'il y ait induction florale (Heide *et al.*, 2007).

L'initiation de la floraison des fraisiers non-remontants se déroule en jours courts soit en automne, ce qui permet l'émergence des inflorescences et donc la production de fruits le printemps de l'année suivante (Figures 28 et 29). Si les jours courts sont nécessaires pour induire la floraison, les jours longs favorisent la poursuite du développement floral (Sironval et El Tannir-Lomba, 1960 ; Stewart et Folta, 2010).

III.4.1.b Les génotypes remontants

Les génotypes remontants sont capables d'induire leur floraison tout au long de la période végétative et ainsi de fleurir et de produire des fruits en continu sur toute la période où le plant n'est pas en dormance (Figure 29). Jérôme Bock est le premier à décrire en 1532 la première espèce de fraisiers des bois remontants, *F. vesca semperflorens* découverte dans les Alpes. Duchesne en 1766 décrit cette espèce remontante comme un mutant du fraisier des bois commun non-remontant.

Ces fraisiers ont d'abord étaient considérés comme insensible à la photopériode, (Brown and Wareign, 1965, Battey *et al.*, 1998), mais tout comme les génotypes non-remontants, l'interaction [photopériode x température] semble primordiale à l'induction de la floraison (Sonsteby and Heide, 2008).

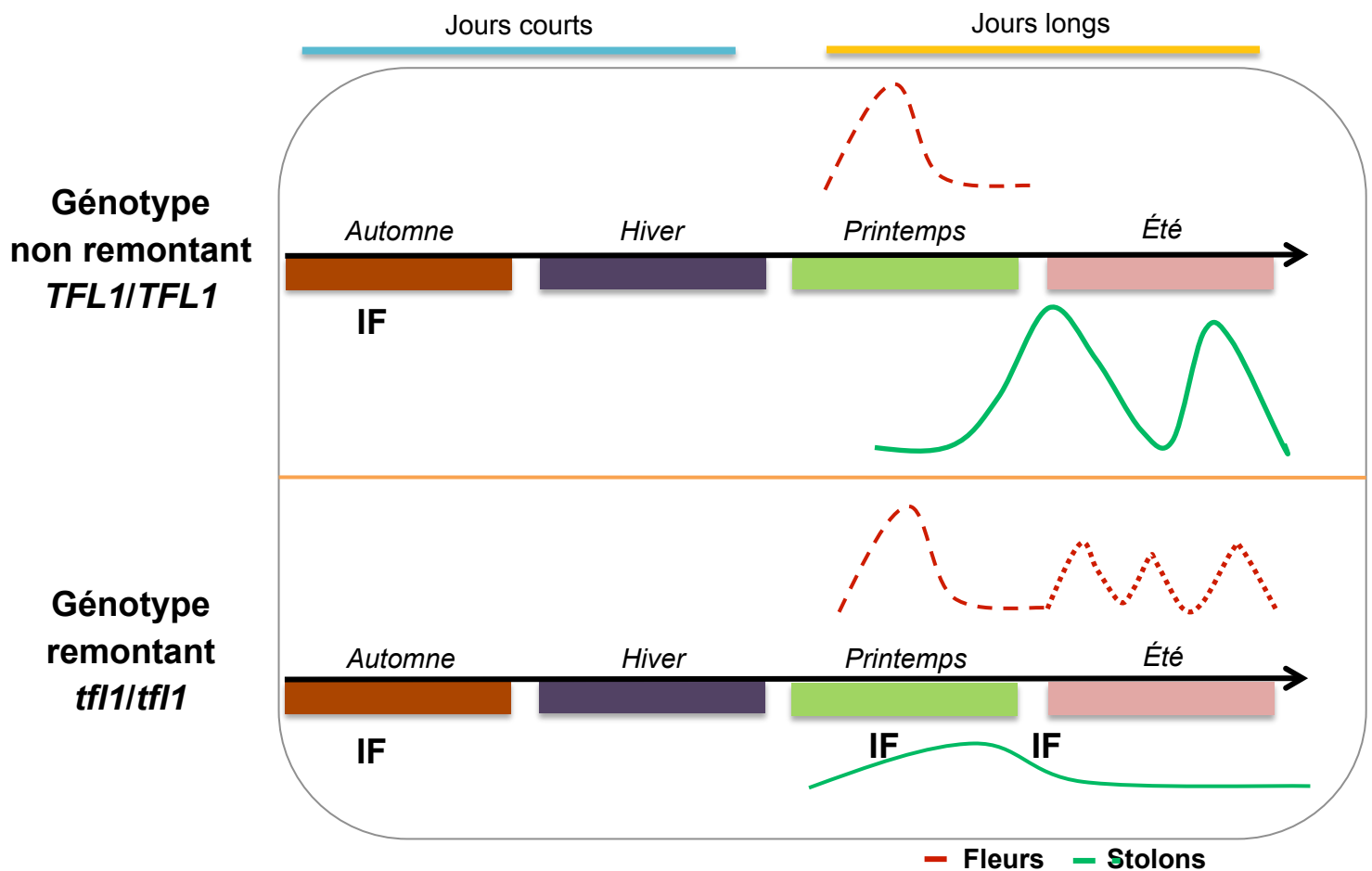


Figure 29: Cycle de développement annuel des fraisiers en fonction de leur génotypes. En automne a lieu l'initiation florale (IF) puis le plant entre en dormance et accumule son besoin en froid. Les plants non remontants présenteront leur floraison initiée l'année passé au printemps, puis entreront en développement végétatif via la production de stolons pendant l'été. Les génotypes remontants auront la même floraison au printemps mais vont continuer à fleurir pendant tout l'été et produiront peu ou pas de stolons en fonction des génotypes.

III.4.2 Le contrôle génétique et moléculaire de la remontée florale chez le fraisier diploïde

En 1965, Brown et Wareign l'étude de la descendance issue d'un croisement entre deux génotypes remontant et non-remontant a permis de mettre en évidence un locus majeur récessif nommé par la suite *SFL* pour *Seasonal Flowering Locus* (Albani *et al.*, 2004). Ainsi, les génotypes remontants sont homozygotes récessifs *sfl/sfl*. De plus, en 2004 Sargent *et al.*, a cartographié ce locus majeur sur le groupe de liaison VI de la carte de référence diploïde.

En 2012, le gène responsable de la remontée florale chez le fraisier diploïde a été identifié (Iwata, Gaston *et al.*, 2012). En effet, la remontée est due à l'homologue du gène *TFL1* (*FvTFL1* ou *FvKSN* pour *KUSHIN*), un des principaux répresseurs floraux chez *A. thaliana*. Chez les génotypes remontant, le répresseur floral est délété de deux bases dans sa séquence codante, ce qui entraînerait la production d'une protéine TFL1 tronquée et non fonctionnelle. L'absence de ce répresseur conduit à une floraison continue tout au long de la période végétative. Ainsi, les génotypes *tfl1/tfl1* ont un phénotype remontant (Iwata *et al.*, 2012, Koskela *et al.*, 2012).

Le gène *FvTFL1* est fortement exprimé dans le méristème, ainsi que dans les ébauches foliaires et les tissus vascularisés. Chez le fraisier diploïde, l'expression de *FvTFL1* est activée en jours longs et réprimée en jours courts au niveau des méristèmes alors qu'en jours courts l'expression de *FvAPI* et *FvFUL1* (gènes de l'identité du méristème floral) sont activées (Koskela *et al.*, 2012).

Le fraisier diploïde présente trois homologues du florigène *FT* : *FT1*, 2 et 3 (Iwata *et al.*, 2012). Dans la suite de ce paragraphe, nous conservons les noms initialement attribués par Iwata, Gaston *et al.* en 2012 : *FvFT1* et *FvFT3* correspondent à *FvFT2* et *FvFT1* respectivement dans la publication de Koskela *et al.* (2012). Dans l'étude de Koskela *et al.* (2012), *FvFT1* est exprimé dans le méristème floral et *FvFT3* dans les feuilles. L'expression de *FvFT2* n'est pas reportée. Ces auteurs suggèrent que, *FvFT3*, étant le seul exprimé dans les feuilles, représenterait le florigène bien qu'il ne soit exprimé qu'en jours longs aussi bien chez les plants remontants que non-remontants (Koskela *et al.*, 2012) et que l'exposition aux jours courts des plants non-remontants induit la réduction de l'expression de ce gène.

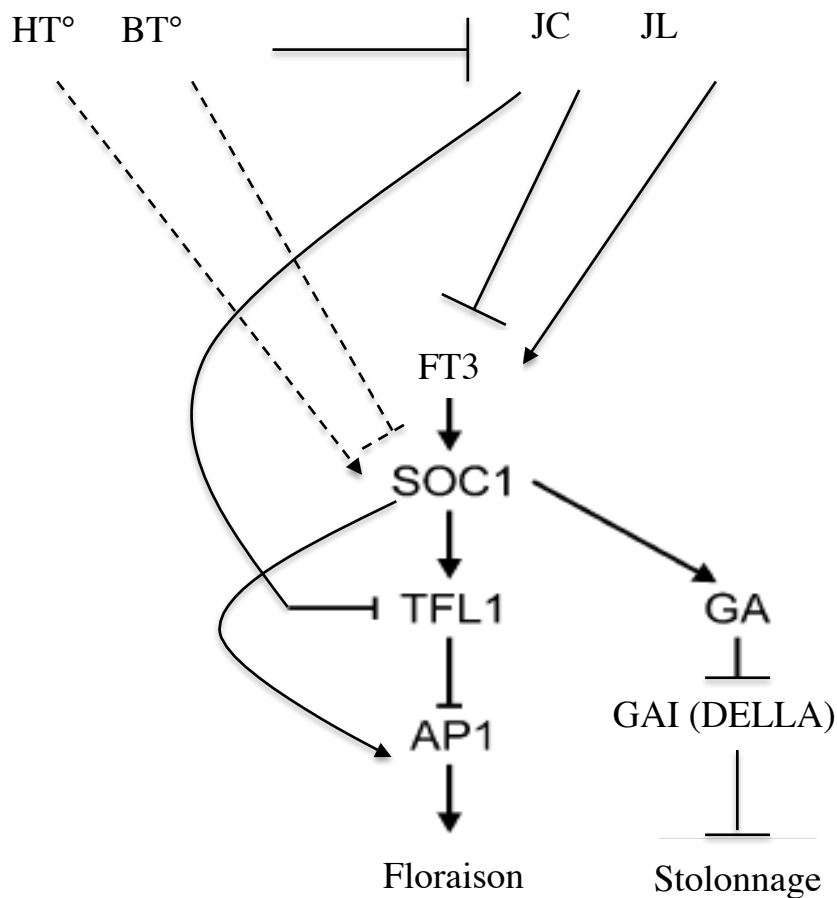


Figure 30 : Réseau de régulation de la floraison et du stolonnage par la photopériode et la température chez le fraisier diploïde non remontant.

Les traits plein montre les régulations directes et les traits en pointillé les régulations indirectes. Sont indiquées les températures hautes (HT°) et basse (BT°) ainsi que les jours longs (JL) et les jours courts (JC).

D'après Heide et al., 2013 et Mouhu et al., 2013

Les mêmes auteurs montrent que dans un fond génétique remontant, les transformants ARN interférant (RNAi) de *FvFT3* présentent un retard de floraison en jours longs et la répression des expressions de *FvAPI* et *FvFUL*. Ainsi, en jours longs, *FvFT3* activerait la floraison des plants remontants (Figure 30). Ils suggèrent alors que chez les individus non-remontants, la présence de *FvTFL1* fonctionnel annulerait l'effet de *FvFT3* en jours longs.

Des résultats récents (Gaston *et al.* en préparation) propose une hypothèse alternative : *FvFT1* dont l'expression est continue dans les feuilles (non détectée par Mouhu *et al.*, 2013) représenterait le florigène et *FvTFL1* exprimé en jours longs représenteraient l'anti-florigène. La floraison résulterait d'une balance entre ces deux expressions.

En 2013, Mouhu *et al.* mettent en évidence le rôle central du gène *FvSOC1* dans la floraison du fraisier. Les plants qui n'expriment plus *FvFT3* présentent une répression de l'expression de *FvSOC1*, ainsi *FvFT3* activerait *FvSOC1* (Figure 30).

Dans un fond génétique remontant, la surexpression ou le RNAi du gène *FvSOC1* modifie l'expression de *FvTFL1* ce qui prouve que *FvSOC1* active la transcription de *FvTFL1* en jours longs alors que son expression en jours courts est régulée par un mécanisme indépendant de *FvSOC1* (Figure 30).

III.4.3 Facteurs influençant la floraison et la remontée du fraisier

III.4.3.a Photopériode et qualité de la lumière

En 2013, un modèle génétique de la floraison chez le fraisier diploïde a pu être établi. Ainsi, le répresseur floral et gène de remontée florale *FvTFL1* est exprimé en jours longs, la remontée florale serait donc liée à sa non fonctionnalité. *FvTFL1* est activé en amont par l'intégrateur floral *SOC1*, lui-même activé par le *FvFT3* qui est régulé de façon photopériodique (Figure 30, Mouhu *et al.*, 2013).

Des études récentes ont permis de mieux comprendre l'influence de la photopériode, de la qualité de la lumière ainsi que de la température sur les gènes impliqués dans le modèle de la floraison. En effet, les lumières incandescentes, bleues et rouge-lointain favorisent l'expression de *FvFT3* alors que la lumière rouge l'inhibe (Figure 31). Ainsi, l'expression de *FvFT3* serait favorisée par les jours longs et la lumière de fin de journée (Rantanen *et al.*, 2014). De façon surprenante, le pic d'expression du gène *FvCO* ne coïncide pas avec l'expression de *FvFT3*, alors que chez *A. thaliana* comme chez d'autres espèces, la protéine CO active la transcription du gène *FT* (Putterill *et al.*, 2004). Ainsi, chez le fraisier diploïde, la régulation de *FvFT3* par *FvCO* n'est pas encore clairement établie (Rantanen *et al.*, 2014).

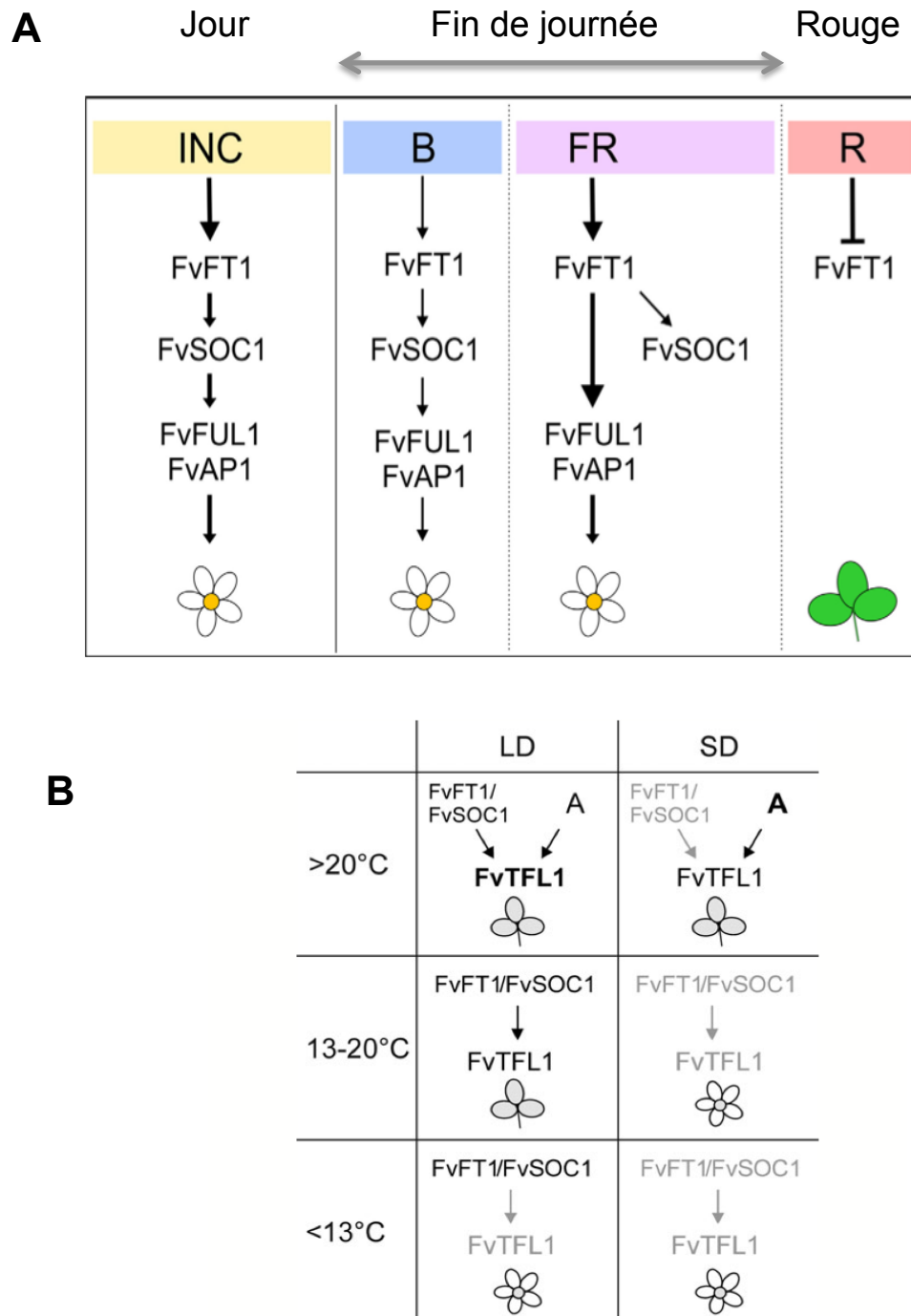


Figure 31 : Régulation environnementale du gène de remontée florale *FvTFL1*.

(A) Impact de la qualité de la lumière. Rantanen *et al.*, 2014

(B) Influence de la température. Rantanen *et al.*, 2015.

III.4.3.b [Photopériode x Température]

De plus, Rantanen *et al.* en 2015 ont réussi à faire le lien entre la photopériode et la température pour la régulation de l'expression de *FvTFL1*. Ainsi, sa transcription n'est possible qu'avec des températures dépassant les 13°C. De ce fait, la floraison serait régulée à deux niveaux : d'une part par la photopériode qui contrôle la transcription de *FvFT3* et celle de *FvSOC1* et d'autre part, par la température qui agit sur la transcription du gène *FvTFL1* (Figure 31, Rantanen *et al.*, 2015).

III.4.3.c Besoins en froid

Chez le fraisier de façon générale, la floraison est inhibée par les températures inférieures à 8-9°C et supérieures de 25°C ; entre 10 et 15°C la floraison est activée indépendamment de la photopériode ; enfin, entre 15 et 25°C la floraison est dépendante des conditions photopériodiques (Guttridge, 1985, Ito and Saito, 1962). De plus, le fraisier a un besoin variable en froid qui va induire une période de dormance. En effet, les besoins en froid sont très dépendants du génotype (Darnell and Hancock, 1996) et est défini comme le nombre d'heures cumulées entre 0 et 7°C.

III.5 La multiplication végétative du fraisier

Le fraisier peut se multiplier végétativement via la production de stolons, mais aussi par la formation de nouveaux axes appelés cœurs.

III.5.1 La formation de cœurs : un événement méconnu

La tige comportant le bourgeon terminal est appelée cœur primaire. Certains méristèmes axillaires présents à l'aisselle des feuilles adultes vont permettre la formation de nouveaux cœurs annexes, qui auront une structure identique au cœur mère. Cette structure particulière pourrait s'apparenter aux rameaux courts des Rosacées fruitières (Foster *et al.*, 2003). Néanmoins, nous disposons de très peu d'informations quant à leur formation. Toutefois, la formation de cœurs est étroitement liée au non-stolonnage et pourrait de ce fait être contrôlée par les mêmes gènes (Brown and Wareign, 1965). En 2001, Konsin *et al.*, ont montré que les fraisiers cultivés sont capables de produire des cœurs tant que la durée du jour n'excède pas les 15 h. En jours longs (à partir de 18h de jour), la production de cœurs est inhibée.

III.5.2 Contrôle génétique du stolonnage

Comme pour la remontée florale, Brown et Wareign en 1965 ont étudié une population diploïde de *F. vesca* en ségrégation pour le stolonnage. Ainsi, ils ont pu démontrer que le stolonnage était contrôlé par un locus majeur et dominant appelé *R* pour *RUNNERING*. Ce locus a été cartographié sur le groupe de liaison II mais le gène responsable de ce locus n'a pas encore été identifié (Sargent *et al.*, 2004).

Les caractères de remontée florale et de stolonnage ségrègent indépendamment et les locus majeurs ne sont pas cartographiés sur le même groupe de liaison, ainsi, les deux caractères ne sont pas génétiquement liés (Brown and Wareign, 1965).

III.5.3 Facteurs influençant le stolonnage

Le stolonnage, sensu-stricto, n'a pas beaucoup été étudié, comme en témoigne le faible nombre de publications sur le sujet. Néanmoins, en regroupant les informations obtenues sur le fraisier cultivé et sur le fraisier des bois, il semble que tout comme pour la floraison et la remontée florale, la photopériode et la température sont des facteurs environnementaux essentiels dans le contrôle de ce processus.

Ainsi, la production de stolons est favorisée par une longue photopériode supérieure à 14 heures de jours et à des températures élevées, supérieures à 17°C (Darrow, 1936, Guttridge, 1985, Hytönen, 2009). De plus, la température semble supplanter le rôle de la photopériode (Heide and Sonsteby, 2007):

- entre 9 et 10°C, la production de stolons est inhibée,
- à 15°C, la production des stolons est favorisée en JL uniquement,
- à une température de plus de 21°C, la production des stolons est induite indépendamment de la photopériode

III.5.4 Rôle des GA dans la production de stolons

Plusieurs études menées sur le fraisier cultivé ont permis de déterminer la prédominance de la voie 13-hydroxylation des GA dans la production des stolons (Taylor *et al.*, 1994, Taylor *et al.*, 2000). De plus, de nombreuses études d'apports exogènes de GA actives et d'inhibiteurs de GA ont été menées. En effet, l'application d'inhibiteurs de GA (PP333 = paclobutrazol et ProCa = prohexadione de calcium) a pour conséquence de réduire la taille des pétioles, de diminuer nettement la production de stolons et enfin d'augmenter le nombre de cœurs (Wiseman and Turnbull, 1999, Black *et al.*, 2004, Hytönen *et al.*, 2009).

L'effet de l'inhibiteur de GA peut être restauré via l'apport de GA actifs en jours longs (Hytönen *et al.*, 2009). Ainsi, les GA joueraient un rôle dans la régulation photopériodique de la différenciation des méristèmes axillaires en stolons ou cœurs.

Mouhu *et al.* en 2013 ont mis en évidence l'implication de l'intégrateur floral *FvSOC1* comme activateur du stolonnage chez le fraisier diploïde. En effet, lors de cette étude, des plants non remontants ont été génétiquement transformés : soit par ARN interférant (RNAi-*FvSOC1*), soit par surexpression (*FvSOC1*-OX). Ces plants ont subi un traitement photopériodique, soit 6 semaines de jours courts puis 2 semaines de jours longs. Ainsi, les plants RNAi-*FvSOC1* présentent une diminution de la production de stolons ainsi qu'une augmentation du nombre de cœurs. *A contrario*, les lignées *FvSOC1*-OX produisent plus de stolons et moins de cœurs que les plants témoins (Mouhu *et al.*, 2013). De ce fait, *FvSOC1* intervient dans la floraison du fraisier, comme discuté précédemment, mais aussi dans la régulation photopériodique de la différenciation des méristèmes axillaires en stolons et cœurs, chez le fraisier diploïde non remontant (Figure 30).

Cette étude a aussi permis de faire le lien entre *FvSOC1* et les gibbérellines. Sur les plants *FvSOC1*-OX, l'apport de ProCa (inhibiteur de GA) entraîne l'arrêt du stolonnage, alors que l'application de GA active sur les individus RNAi-*FvSOC1* provoque l'augmentation du stolonnage. Chez les plants RNAi-*FvSOC1* traités aux GA actifs, l'expression du gène *FvTFL1* n'est pas modifiée par rapport aux plants contrôles alors que le stolonnage est activé.

De plus, chez les plants surexprimant *FvSOC1*, l'expression des gènes de biosynthèse des GA (les *FvGA20ox* et *FvGA3ox*) est augmentée alors que celle des gènes d'inactivation des GA (les *FvGA2ox*) est diminuée ; les effets sont inversés chez les plants RNAi-*FvSOC1* (Mouhu *et al.*, 2013). De façon surprenante, l'expression de l'homologue du gène *GAI*, un des gènes DELLA, est augmentée pour les plants *FvSOC1*-OX et diminuée chez les lignées RNAi. Ce résultat suggère une régulation de la concentration en GA par les protéines DELLA (Hytönen *et al.*, 2009 ; Hedden et Thomas, 2012). L'expression des gènes *GID* n'est pas clairement modifiée dans les lignées transgéniques.

En conclusion, les gibbérellines ont un effet opposé sur la floraison du fraisier par rapport à leurs rôles chez *A. thaliana*. En effet, chez le fraisier, les GA activent la production de stolons, et inhibent la floraison. De plus, l'intégrateur floral *FvSOC1* semble être au cœur de la balance génétique entre les deux modes de reproduction puisqu'il intervient dans la régulation du stolonnage en lien avec les GA, et dans la floraison via le gène *FvTFL1* indépendamment des GA (Figure 30).

IV. Enjeux, objectifs et stratégies de la thèse

IV.1 Enjeux et objectifs de la thèse

Le fraisier cultivé présente un réel intérêt agronomique et la réussite d'une variété est conditionnée par son rendement, c'est à dire son potentiel de production de fleurs et donc de fruits, mais aussi par sa capacité à produire des stolons pour la production de plants en pépinière. Chez le fraisier cultivé ces deux caractères sont génétiquement liés de façon négative (Gaston *et al.*, 2013) et doivent donc être étudiés ensembles. Néanmoins, la complexité génétique du fraisier cultivé présente une réelle difficulté. Aussi le fraisier des bois est utilisé comme modèle d'étude. De plus, ce dernier pourrait servir à la compréhension d'autres espèces stolonnantes et plus largement aux espèces présentant un équilibre entre reproduction sexuée et asexuée.

Chez le fraisier diploïde et à l'inverse de l'espèce cultivé, les deux caractères, reproduction sexuée et végétative, ne sont pas génétiquement liés (Brown et Wareign, 1965 ; Sargent *et al.*, 2004). Chez le fraisier diploïde, le gène responsable de la remontée florale a été identifié (Iwata *et al.*, 2012) comme étant le répresseur floral *FvTFL1*. Les rôles d'un des trois gènes homologues de *FT* et du gène *SOC1* ont été démontrés comme impliqués dans la floraison du fraisier diploïde (Mouhu *et al.*, 2013). Néanmoins, peu de données génétiques ou moléculaires ont été publiées sur la production de stolons. En effet, à ce jour, nous savons que le gène majeur est dominant et cartographié sur le chromosome 2 (locus *R*), et que le stolonnage est activé par les GA.

IV.2 Objectifs de la thèse

Ainsi, ma thèse comporte deux objectifs majeurs :

- (i) Identifier et caractériser le gène majeur responsable du contrôle du stolonnage ; ce gène avait été cartographié sur le groupe de liaison 2 par Sargent *et al.* en 2004.
- (ii) Etudier d'un point de vue physiologique et génétique la balance entre la remontée florale et la production de stolons. Ces deux processus se superposent au cours du développement du plant et pourraient donc être interconnectés bien qu'ils ne soient pas contrôlés par un même gène. La question d'une interaction entre les déterminants génétiques impliqués dans les deux modes de reproduction se pose alors. Pour cette étude, il est tout d'abord important d'identifier l'ensemble des déterminants génétiques du contrôle du stolonnage (nombre de stolons produits) et de l'importance de la floraison (nombre des hampes émergées).

IV.3 Stratégies utilisées

L'identification du gène responsable du stolonnage a été menée par cartographie fine à partir des données publiées par Sargent *et al.* en 2004. Pour ce faire, une population de 1350 individus ségrégeant pour la remontée florale et le stolonnage a été génotypée et phénotypée pour identifier les individus recombinants dans le locus *R*. Cette zone a été enrichie en marqueurs moléculaires et une analyse combinant le séquençage haut débit (Next Generation Sequencing) et une stratégie de bulks a été conduite afin de réduire au maximum cette zone et permettre l'identification du gène de stolonnage. Le gène *R* a ensuite été caractérisé par des approches complémentaires.

La caractérisation physiologique et l'identification des déterminants génétiques de la balance entre reproduction sexuée et végétative ont été conduites grâce à une description fine d'individus et une approche de génétique quantitative. Une population en ségrégation pour la remontée florale et le stolonnage a été notée hebdomadairement pour l'émergence des hampes, des stolons et des cœurs pendant deux cycles annuels. Le regroupement des individus en fonction de leurs modes de reproduction sexuée (remontant et non-remontant) et végétatif (stolonnant et non-stolonnant) a permis d'émettre des hypothèses sur la relation entre les deux modes de reproduction.

Enfin, une analyse QTL a été conduite afin de connaître les zones génomiques impliquées dans la quantification du caractère stolonnage et de la remontée florale. À partir des QTL identifiés, une analyse des interactions épistatiques a été conduite en utilisant l'ANOVA notamment.

Chapitre 2 : Résultats

- Partie 1 -

**Identification et caractérisation du gène de
stolonnage chez le fraisier diploïde
*Fragaria vesca***

La production de stolons, ou stolonnage, est un des types de multiplication végétative présent chez plusieurs espèces, telles la potentille ou la violette, mais aussi chez des espèces d'intérêt agronomique : la pomme de terre et le fraisier.

A ce jour, aucun gène responsable du stolonnage n'a été identifié. Mon travail s'est focalisé sur le fraisier diploïde, *Fragaria vesca*, et la première étape a été d'identifier le gène responsable du stolonnage, nommé gène *R* pour *RUNNERING*, localisé sur le chromosome 2 (Sargent *et al.*, 2004) et identifié comme un gène majeur et dominant par Brown et Wareign en 1965.

I. Une délétion dans le gène de biosynthèse des gibbérellines, *FvGA20ox4*, entraîne le phénotype de non-stolonnage

Les résultats qui suivent, ont été écrits sous la forme d'un article intitulé «Mutation of the gibberellin biosynthesis gene *FvGA20ox4* causes deficiency in vegetative reproduction in wild diploid strawberry *Fragaria vesca*» et sont issus de mon travail portant sur l'identification et la caractérisation du gène de stolonnage chez le fraisier diploïde.

Cet article a été mené en collaboration avec plusieurs personnes :

- i) Cécile Brès a analysé les résultats de Next Generation Sequencing (NGS) et m'a permis de mettre en forme les données ;
- ii) Maria Pimenta Lange et Theo Lange ont effectué les analyses d'activités enzymatiques ;
- iii) Michel Hernould a effectué l'étude de dissection de plants de fraisiers diploïdes, ainsi que les expérimentations d'hybridation *in situ* ;
- iiii) Amparo Montfort nous a permis de travailler sur une lignée NIL (Near Isogenic Line) introgressée pour une partie du chromosome 2 d'un génotype stolonnant (contenant le gène *R*) dans un fond génétique non stolonnant.

En termes d'expérimentations, mon implication dans cet article concerne les expérimentations et les analyses génétiques, la comparaison des résultats de NGS, les observations phénotypiques, la transformation stable d'*A. thaliana*, les différents traitements sur fraisiers, la production de protéines ainsi que l'analyse de l'expression des différents gènes. Les résultats complémentaires à ce travail seront présentés à la suite de ce manuscrit.

Mutation of the gibberellin biosynthesis gene *FvGA20ox4* causes deficiency in vegetative reproduction in wild diploid strawberry *Fragaria vesca*

Summary

The genetic and molecular control of vegetative reproduction which offers the capacity to the plant to multiply quickly in a stable environment is poorly understood. One of the main vegetative reproduction processes is the propagation by stem such as stolons, from which ramets can be formed. Here, we study the runnering process corresponding to the ability to produce stolons in diploid strawberry. By developing a strategy combining linkage map, Bulk Segregant Analysis and next generation sequencing, we discovered a key gene, *R* gene, controlling the runnering. The *R* gene was identified as a component of the Gibberellic acid biosynthetic pathway, the gibberellin (GA) oxidase, *FvGA20ox4*. The GA oxidase activity was confirmed in enzymatic activity assays and *FvGA20ox4* gene expression is consistent with its regulatory function of axillary meristem activity and runnering. Woodland strawberry genotypes unable to produce stolon exhibit a loss-of-function mutation in *FvGA20ox4* coding sequence. Interestingly, the runnering strawberry plants produce axillary meristems that elongate giving rise stolons whereas the loss-of-function mutants produce axillary meristems that degenerate and necrotize. Altogether, our results reveal that *FvGA20ox4* is a key regulator of the runnering process in diploid strawberry.

INTRODUCTION

Vegetative reproduction, present in ~80 % of angiosperms, represents the main asexual process (Kilmes *et al.*, 1997). Advantages of vegetative reproduction include the ability to rapidly colonise open habitats, to occupy space by forming dense patches or to forage for resources that are heterogeneously distributed (Winkler and Stöcklin, 2002). Like sexual reproduction in natural habitats its role are determinants of plant species abundance as a major challenge for ecology (Herben *et al.*, 2014). Moreover, in domesticated plants, a large diversity of clonally propagated crops is observed, and vegetative multiplication has many advantages for crops like easy propagation or fixation of agronomic traits (McKey *et al.*, 2010).

Genetic and molecular controls of vegetative reproduction remain poorly known except for potato. This species presents flowering and produces tubers *via* stolons, which are stems with long internodes. In 2011, Navarro *et al.*, shows implication of *StSP6A*, a *FLOWERING LOCUS T* homologue, like a long-distance activator of tuberization (Abelenda *et al.*, 2014). Moreover, whereas auxins activate tuberization (Roumeliotis *et al.*, 2013), gibberellin could repress it. However, GA have an antagonistic role by repressing tuberization and activating runnering. Exogenous apply of actives GA allows a reduction of tubers production and overexpression of inactivation GA enzyme (*StGA2ox1*) allows a dwarf phenotype and a reduction of stolons growth (Kloosterman *et al.*, 2007).

Another crop species with production of new ramets though stolons is strawberry. Strawberry stands as an interesting model for identifying molecular control of vegetative reproduction through stolons (the so-called runnering process) since genetic variability exists for this trait. In the diploid woodland strawberry, *Fragaria vesca*, runnering is controlled by one gene localised on the linkage group II (LGII), *RUNNERING (R)* locus, where the R allele conferring the runnering is dominant (Brown and Wareign, 1965). In the octoploid strawberry, a locus *FaPFRU* localized on the LGIVb has been identified with opposite effect between promoting emergence of stolons and promoting emergence of inflorescences in long days (Gaston *et al.*, 2013). Therefore, these two genes or locus are controlled by different genes and no hypotheses have been made on these identities.

In strawberries, the emergence of stolons, which occurs from basal axillary buds (Savini et al., 2006), is affected by environmental factors, in particular by photoperiod and temperature. Indeed, stolons formation occurs in long days (>14 hours) and especially when temperature exceed 17°C (Darrow, 1936; Guttridge, 1985; Hytönen, 2009; Heide and Sonsteby, 2007). In the diploid strawberry and in natural environment, this process occurs after flowering when days are long (Darrow, 1936). In the octoploid strawberry, this capacity to multiply through stolons is commonly used for producing commercial plants, which then are planted in field or in greenhouse. Another factors impacting runnering process is the treatment with gibberellins (GA). Exogenous application of actives GA causes runnering whereas, GA inhibitor treatment dramatically reduce numbers of stolons formed (Guttridge and Thompson, 1963; Wiseman and Turnbull, 1999; Black *et al.*, 2004; Hytönen *et al.*, 2009). More recently, plants who overexpressed the floral integrator *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*) show more stolons compare to the control, and expression of GA biosynthetic genes was induced (Mouhu *et al.*, 2013). A model was proposed whereby SOC1 activates GA pathway to runnering.

Gibberellins are important phytohormones involved in many developmental processes like seed germination, flower induction and development, and cell elongation (for reviews, Fleet and Sun, 2005; Pimenta Lange and Lange, 2006; Weiss and Ori, 2007). GA are derived from the diterpenoid precursor GGPP (geranyl diphosphate) and allow production of GA actives like GA₁ and GA₄ that are considerate like most important. The final stage of GA biosynthesis is controlled by three soluble 2-oxoglutarate-dependante dioxygenases (ODD). These three enzymes belong to Fe-containing enzymes class widespread in plants and other organisms: two biosynthetic enzymes (GA 20-oxidases and GA 3-oxidases), and a catalytic enzyme (GA 2-oxidases). Moreover, a recent study proves the long distance transport of the intermediate GA₁₂-aldehyde and may have roles in developmental processes (Regnault *et al.*, 2015). In *A. thaliana*, GA target DELLA-domain transcriptional repressors. GA allow DELLA degradation via proteasome. Interestingly, GA induce flowering in annuals plants (Blazquez *et al.*, 1998, King *et al.*, 2001) whereas they act as flowering repressor in many perennials plants, or as activator of vegetative development (Wilkie *et al.*, 2008) or of vegetative multiplication like in potato runnering (Kumar and Wareing, 1974, Roumeliotis *et al.*, 2013).

In this study, we identify for the first time the mutation responsible for the non-runnering phenotype in woodland strawberry, using combined approaches fine genetic mapping, Bulk Segregant Analysis (BSA, Michelmore *et al.*, 1991) and Next-Generation Sequencing (NGS). The mutation targets the FvGA20ox4 leading to the production of a non-functional protein. Interestingly, we observe that the non-runnering plants produce axillary buds that do not develop and necrotize. However, a treatment with active GA₃ can restore the capability of those plants to produce stolons.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growing conditions

Strawberry

A range of genotypes of the diploid strawberry was used according to the objective (Supp. Data Table 5):

- (i) For mapping the *R* locus and identify the two border markers of this locus, we obtained a F₂ population, named Ilaria_F₂, that segregated for runnering and for other traits such as seasonal flowering; This F₂ population of 154 individuals was issued from the self-pollination of Ilaria F₁ obtained from the cross between two contrasted lines, ‘Sicile’ a runnering (RU) and seasonal flowering (SF) genotype and ‘Alpine’ a non-runnering (NRU) and perpetual flowering genotype (PF). Then for fine mapping, we obtained other 1350 individuals issued from the self-pollination of Ilaria F₁;
- (ii) For physiological characterization and cytological analyses, a range of genotypes was available: in addition to ‘Sicile’ and ‘Alpine’ the parents of the segregating population, we used ‘Rodluvan’, which was like ‘Sicile’ RU and SF, ‘Reine des Vallées’ which was like ‘Alpine’ NRU and PF and a Near Isogenic Line (NIL) Fb2:39-63 (Urrutia *et al.*, 2015), a RU and PF genotype. This last line represented Reine des Vallées with an introgression of *F. bucharica* in homozygosity (SF and RU) in the LGII between cM 39 to 63, conferring the runnering capacity to this line (RU and PF). Fine genotyping of line by SNPs shows the size of introgression of 3,7 Mb, and located between position 18.950.307 and 22.663.853 of *F. vesca* genome v1.1 (Urrutia et al 2015).
- (iii) For genetic diversity, leaves for DNA extraction from a range of genotypes RU and NRU were obtained from the National Clonal Germplasm Repository (USDA, Corvallis, Oregon) (Supp. Data Table 5).

Arabidopsis thaliana

The ecotype Columbia-0 (Col-0) was used as the wild type. The Nottingham Arabidopsis Stock Centre obtained seeds of *ga20ox1* simple mutant (SALK_016701C) and *ga20ox1-3/ga20ox3-1* double mutant was described in Plackett *et al.* in 2012 and given by the Rothamsted Research (UK).

Growing conditions

Seeds of strawberry were sown in a mix of $\frac{2}{3}$ loam and $\frac{1}{3}$ grit at 16h/8h day/night at 22°C/18°C. Plants were transplanted to 1 L pots containing the same mix and were maintained in a glasshouse under natural conditions.

For *A. thaliana*, seeds grew under 16h/8h day/night at 22°C/18°C with 70%/62% of humidity in climatic chamber.

Phenotypic observations

For mapping the *R* locus, we phenotyped the 154 individuals of Ilaria_F₂ for their emergence of stolons. Newly emerged stolons were counted and cut weekly for two years during the annual cycle (from January to October) of the plant. These two years were separated by dormancy. For fine mapping, only the 26 recombinants were phenotyped for their number of stolons.

To evaluate the impact of GA₃ or ProCa, we weekly counted the number of stolons from treatments to 11 weeks after and measured the length of the petiole of the youngest fully expanded leaves since third weeks after begin of experimentation.

Genetic resources were phenotyped by the National Clonal Germplasm Repository (USDA, Corvallis, Oregon) for the presence or absence of stolons.

DNA extraction and genotyping for mapping the R locus

The 154 individuals of the Ilaria_F₂ population and the further 1350 individuals were extracted for DNA using the DNeasy™ Plant Mini kit or DNeasy™ 96 Plant kit (Qiagen Inc., Germany) by following the manufacturer instructions. For Next Generation Sequencing (NGS), the chosen recombinants (see here after) were extracted for DNA using a classical Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson, 1980) to obtain a high quality, which was estimated by Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagents (Invitrogen – Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

The 154 individuals of the Ilaria_F2 population as the further obtained 1350 individuals were genotyped using microsatellites (Simple Sequence Repeat, SSR) using Li-Cor® and/or Single Nucleotide Polymorphism (SNP) using KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) method. The SSR were obtained from Genome Database Rosaceae (GDR, <https://www.rosaceae.org>, Sargent *et al.*, 2004, Sargent *et al.*, 2006, Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008) (Supp. Data Table 1). Acrylamide gels were realized with Gel Matrix 6,5% revealed on Li-Cor® 4 300 DNA Analyzer as described in Till *et al.*, 2003. For SNP, KASP genotyping procedures were realized (LGC Genomics, Queens Road, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, UK <http://www.lgcgroup.com/our-science/genomics-solutions/genotyping/>) on LightCycler® 480 II (Roche), and described in Smith and Maughan 2014. Primers were done using batchprimer3 software (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer>).

PCR was performed in a final volume of 12 µL containing: 1X PCR buffer, 0,2 mM of dNTP, 0,2 mM of each primer and 0,05 units/µL of VWR Taq polymerase (VWR Chemicals, USA), and 4 ng/µL of DNA was added in 1 µL. Amplifications were obtained on C1000™ Thermal Cycler Bio-Rad and program following manufacturer's instructions.

Whole Genome Sequencing

To identify all polymorphisms present in the *R* locus restricted after fine mapping, nine homozygous non-running individuals recombining in this region were chosen and grouped into two bulks. Bulk1 grouped seven individuals that recombined in the left part of locus and Bulk2, two individuals that recombined in the right part of the locus. Each bulk contained 300ng of DNA. Libraries and sequencing were performed by transcriptomic platform GeT-PlaGe of INRA Toulouse (France). Raw fastq files were mapped to the strawberry reference genome sequence *fragaria vesca* V2.0.a1 (ftp://ftp.bioinfo.wsu.edu/species/Fragaria_vesca/Fvesca-genome.v2.0.a1/assembly/) using BWA version 0.7.12 (Li and Durbin 2009; <http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Variant calling (SNPs and indels) was performed using SAMtools version 1.2 (Li *et al.*, 2009; <http://htslib.org/>). Variant analysis was performed on VCF files of bulk1 and bulk2 using a home-made python script to obtain common (C) and non common (NC) SNPs and indels between the two bulks. This step includes the allelic frequency computation, variant type determination and exclusion of false positives. The *compare_WT_mutant_samtools_vcf_v5.py* script computes the allelic frequency and compares the .vcf files of the bulks to produce two output files for variants between the both bulks. Only one variant type at a time would be considered at this step (SNPs or INDELs).

Protein function annotation with Blast2GO

Protein sequences were obtained on GDR website, with hybrid v1.0 annotations. Annotation was performed with Blast2GO® software with parameters by default, following the handbook instructions (Conesa *et al.*, 2005).

GA₃ and ProCa treatments

Treatments were performed on two *F. vesca* genotype contrasted for their running behavior: ‘Rodlivan’ RU, and ‘Alpine’ NRU. Plants at three months old were sprayed with Prohexadione-Calcium (Pro-Ca) at 100 mg/L (13 plants) and GA₃ at 50 mg/L (16 plants), as previously described (Mouhu *et al.*, 2013). Plants were grown in natural conditions in greenhouse under long days (June). Four applications in two weeks (week 0 and 1) were performed. During observations, stolons were systematically cut after their counting.

Statistical analysis

When data are appropriated, Mann-Whitney test was performed, with 0.05, 0.01 and 0.001 as degrees of confidentiality.

Dissections and microscopic observation

Dissections and observations were performed on three plants of four *F. vesca* genotypes, among which two are RU accessions (NIL-2.39.63 and Sicile), and two are NRU accessions (Reine des Vallées and Alpine). Experiments were performed on 5-months old plants cultivated in natural conditions. Dissections were done on living material using a stereomicroscope equipped with a 10 Megapixel moticam color camera.

In situ hybridization

In situ hybridization of digoxigenin-UTP labelled RNA probe to mRNA was performed as described (Bisbis *et al.*, 2006). To synthesize the riboprobes, specific cDNA fragments were amplified using the following combination of forward FwFvGA20ox42 and reverse RevFvGA20ox42 oligonucleotides for GA20ox4 (accession no.). The cDNA fragments were then amplified by nested PCR using the following combinations of forward and reverse oligonucleotides, FwFvGA20ox42 and RevFvGA20ox4T72, and FwFvGA20ox4T72 and RevFvGA20ox42, to produce the matrix for GA20ox4 antisense and sense riboprobe synthesis, respectively. Antisense and sense control RNA probes were obtained by transcription using T7 RNA polymerase. Hybridization and signal detection were done according to Bisbis *et al.* (2006). To be as quantitative as possible, all samples originating from the different lines were processed in the same way, at the same time and prepared on the same slide for in situ hybridizations.

Phylogenic analysis

Sequences of the five GA oxydases present in *A. thaliana* and in *F. vesca*, GA20ox, GA2ox and GA3ox, were isolated using sequences obtained via *Arabidopsis* genome (The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org>) and *Fragaria* genome sequencing (Shulaev *et al.*, 2011) (Supp. Data Table 6). Amino acid sequences of these sequences were aligned with predicted GA oxydases proteins using ClustalW software (Thompson *et al.*, 1997). A phylogenetic tree was produced from 1000 bootstrap replicates by applying the neighbour joining (NJ) method with Jukes-Cantor like genetic distance model.

Plasmid constructions and heterologous transformation in A. thaliana

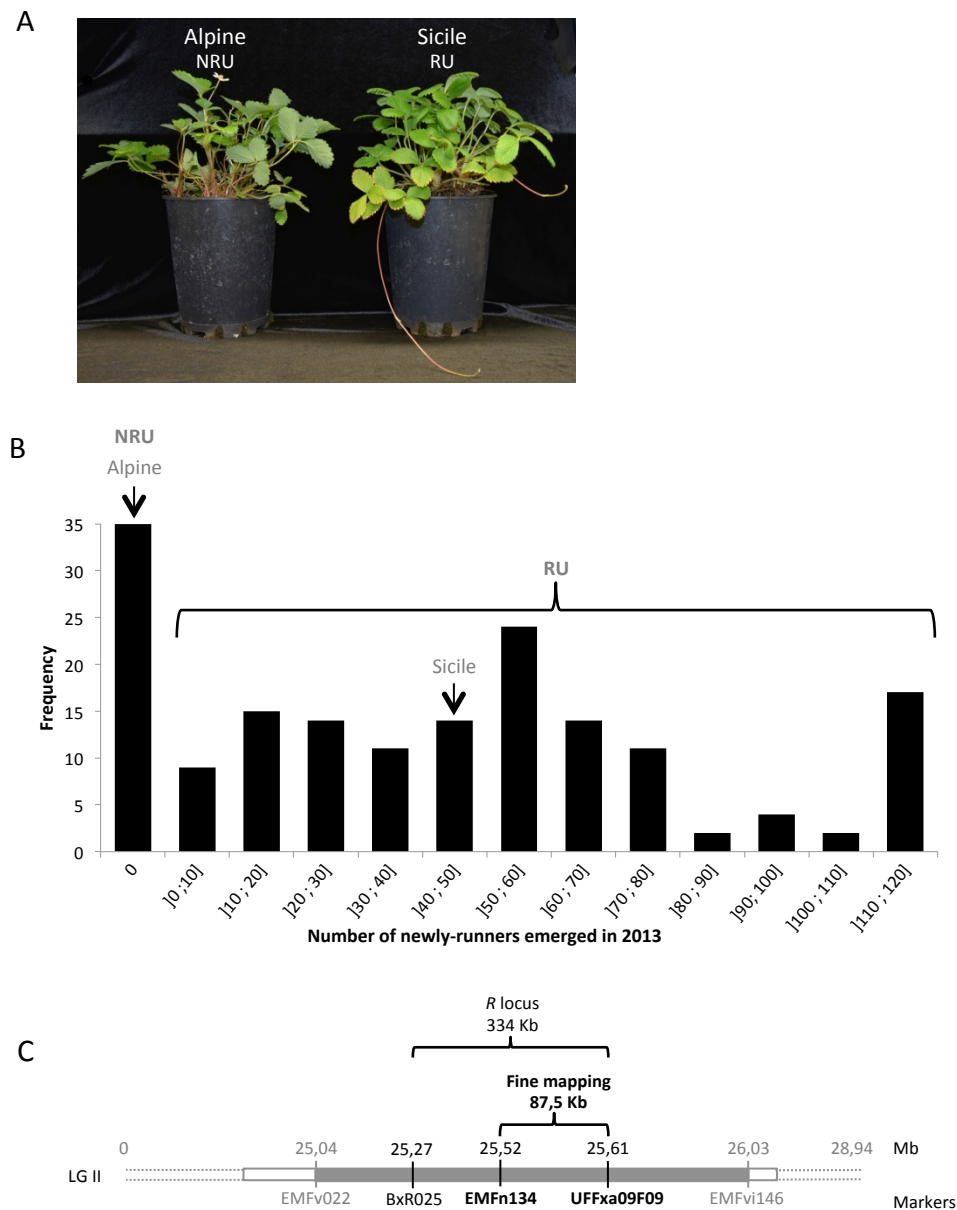
The GA20ox4-wild sequence, were amplified from genomic DNA of Sicile (RU) using the PrimeSTAR Max high fidelity DNA polymerase in a final volume of 25µL, with 15 sec of elongation and following manufacturer's instructions (ClonTech, TaKaRa Bio Company). PCR products were purified with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and cloned using an LR reaction (Gateway®) into pK7WG2D plasmid carrying Kanamycin resistance gene (NPTII). The resulting vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101) by electroporation. Five plants of each genotype were transformed by the floral dip method (Clough and Bent, 1998). For plant height, 6 plants were phenotyped for controls and 10 for transgenics lines.

Protein production and enzymatic activity

cDNA of GA20ox4-wild and GA20ox4-mutated were synthesized by Integrated DNA Technologies. PCR were performed with TaKaRa PrimeSTAR Max as described previously. PCR products were purified with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and cloned into Champion™ pET300/NT-DEST gateway vector carrying Ampicillin resistance gene and a 6xHis tag on N-term, using an LR reaction (Gateway®). pET300-GA20ox4-wild and pET300-GA20ox4-deleted were transformed into *E. coli* Rosetta 2 (DE3) cells (Novagen, Darmstadt, Germany). Protein production was induced by 1mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) during 1h at 37°C in Lysogeny Brothmedium. Recombinant protein production, enzyme assays, and enzyme product purification and analysis were essentially as described previously (Pimenta Lange *et al.*, 2013).

RNA isolation and genes expression analyses

For RNA isolation, the different organs of plants at four months old were collected at 2PM at the end of April, on the two contrasted lines, NIL Fb.2.39.63 and RdV. Samples were dissected and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated with Spectrum™ Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions, with volume of Lysis buffer doubled. cDNA synthesis was carried out with 1µg of total RNA with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) following manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed using 3µL of resultant cDNA product (1/10 dilution), and 10mM of each primer in a final volume of 20µL with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Experiment was performed on CFX96 Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler Bio-Rad) with the following PCR conditions: after denaturation of 7 min at 95°C, 40 cycles were realized of 15 s at 95°C, and 25 s at 62°C; followed by a melt curve ranging from 65 to 95°C with increments of 0.5°C. *FvACTIN* was used as reference gene, and analyses were performed with 3 biological replicates and three technical replicates for each biological replicate. Primers were previously described in Mouhu *et al.*, 2013.



RESULTS

The *R* locus conferring runnering process covered a chromosomal region of 334 Kb localised on the LGII

For identifying flanking markers for the *R* locus conferring runnering process, we developed a F₂ population derived from a cross between two contrasted genotypes (Figure 1A): ‘Alpine’ which is perpetual flowering (PF) and non-runnering (NRU), and ‘Sicile’ which is runnering (RU) and seasonal flowering (SF). After selfing Ilaria_F₁, the hybrid between these two parents, the Ilaria_F₂ population constituted of 154 F₂ individuals, was obtained and segregated for both runnering and perpetual flowering. Hereafter, we will focus on the runnering trait. Because the distribution of the number of stolons produced per year by Ilaria_F₂ was bimodal (Figure 1B), we grouped plants into two classes based on their stolon number for studying the segregation of this trait. Plants were ranged as non-runnering, class [NRU], when they produced 0 - 3 stolons the first year of observations and as runnering, class [RU], when they produced more than 3 stolons (Supp. Data Figure 1). The segregation observed fitted the 3:1 expected ratio ($P = 0.05$, chi-square test), with 115 individuals (75%) ranged as [RU] and 39 individuals (25%) as [NRU]. This segregation ratio was consistent with the hypothesis that the runnering *R* locus (Brown and Wareign, 1965) was controlled by a single dominant locus, which is heterozygous (*R/r*) in the hybrid Ilaria_F₁, homozygous runnering in the parent ‘Sicile’ (*R/R*) and non-runnering in the parent ‘Alpine’ (*r/r*).

To identify flanking markers of the *R* locus, we developed a linkage map restricted to the LGII, on which the *R* locus has been previously located (Sargent *et al.*, 2004; Figure 1C). For this purpose, six microsatellites (or SSR for Single Sequence Repeat) (Supp. Data Table 1) already developed (Sargent *et al.*, 2004, Sargent *et al.*, 2006, Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008) were mapped on the 154 individuals. Considering the *R* locus was a single locus segregating 3:1, we mapped this locus between the two markers BxR025 and UFFxa09F09 (Figure 1C, Supp. Data Table 1). The physical distance between these two markers represented 334 Kb, and included 64 genes.

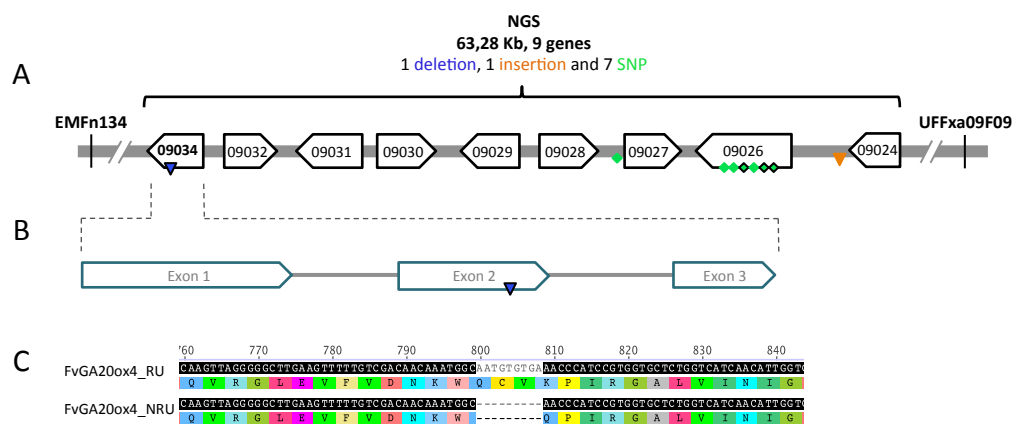


Figure 2. Strategy based on NGS and bulks to identify the GA 20-oxidase as the most relevant candidate gene controlling *R* locus.

- (A) *R* locus reduced to 63,28 Kb by NGS analyses. This region included nine genes. A total of 9 SNP/INDEL was identified: insertion, triangle orange; deletion, triangle blue; SNP, diamond. When forms are surrounded in black, modifications are in coding regions.
- (B) Localisation of the 9 bp deletion in the gene 09034, which is a predicted like Gibberellin 20-oxidase. This deletion occurred in the Exon 2 and did not modify the ORF.
- (C) The deletion led to a shorter protein with three amino acids less in the non-running individuals.

***R* locus can be reduced to 9 genes with fine mapping**

To reduce the size of the *R* locus, we developed a strategy of fine mapping. After enlarging the F₂ population with 1350 new individuals, we genotyped them with the flanking markers identified above, BxR025 and UFFxa09F09. Out of the 1350 F₂ individuals, 26 recombined between these two markers. Half (13) of them were runnering, and homozygous or heterozygous with the dominant allele while half (13) is non-runnering and homozygous with the recessive allele. Based on the 13 homozygous non-runnering individuals, we were able to reduce the *R* locus to 87.5 Kb, which included 17 genes between EMFn134 and UFFxa09F09 (Figure 1C).

Based on NGS associated to bulks, the most relevant candidate gene was a GA 20-oxidase

To analyse all the polymorphisms present in the locus, we developed a strategy that associated both bulks of individuals (BSA) and Next-Generation Sequencing (NGS). Nine F₂ individuals were chosen because they recombined across EMFn134 and UFFxa09F09 and they were homozygous non-runnering (*r/r*). Seven and two of these recombinants were respectively pooled into the Bulk1 and Bulk2 according to their allelic configuration on the two flanked markers, heterozygous or homozygous.

NGS was performed on these two bulks (*r/r*) and on ‘Sicile’ (*R/R*) (Supp. Data Table 2). These bulks were genetically similar between them and differed from the parent Sicile for the gene controlling runnering and other polymorphisms in linkage disequilibrium with this gene. A homemade python pipeline using BWA 0.7.12 (Li and Durbin, 2009), SAMtools 1.2 allowed to identify Common (C) and Non-Common (NC) SNPs and INDELS between Bulk1 and Bulk2. A total of 23 SNP/INDEL covering a distance of 63.28 Kb and overlapping nine genes representing the two haplotypes of the *R* and *r* allele (Figure 2A; Supp. Data Table 3).

To decrease the number of SNP/INDEL in linkage disequilibrium with the *R* locus, we analysed sequencing data available for two *F. vesca* genotypes (DataBase of Genome Database Rosaceae, <https://www.rosaceae.org/>) known for their runnering behaviour, Pawtuckaway (RU) and Baron Solemacher (NRU). For this purpose, we checked the status of the 23 SNP/INDEL found previously. This approach hypothesised a single origin for the mutation on the gene controlling runnering in the woodland strawberry available in collections.

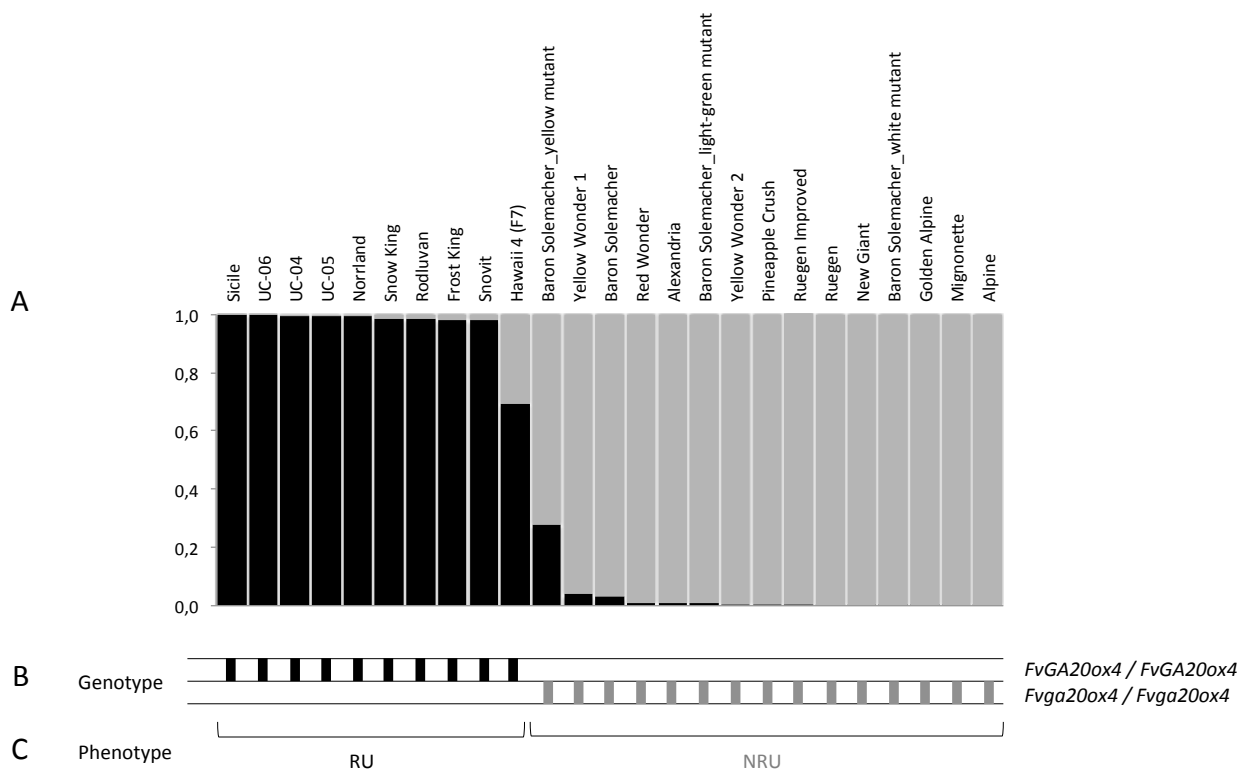


Figure 3. Genetic structure of 25 woodland strawberry genotypes.

- (A) Genetic structure of woodland strawberry genotypes was estimated based on 37 SNP and one deletion. The structure is represented by vertical lines, in which the ancestry proportions of each genotype are indicated by the length of the black and grey segments.
- (B) Genotypes are distributed in $K = 2$ ancestry groups (black and grey). *FvGA20ox4* is homozygous complete gene and *Fvga20ox4* is the homozygous deleted version, genotyping of each genotype is indicated by vertical bars.
- (C) Runnering RU and Non-runnering NRU phenotyping are indicated for each genotype.

This assumption is acceptable because as for perpetual flowering (Iwata *et al.*, 2012), the absence of stolons has been used in many local selections in *F. vesca*. By comparing the 23 SNP/INDEL between the three genotypes, the two bulks and ‘Sicile’, we conserve only two INDEL and seven SNP (Figure 2A; Supp. Data Table 4). Out of these seven polymorphisms, four (3 SNP and 1 INDEL) were located in coding regions of two genes, gene 09026 and gene 09034 (Figure 2A).

Next, we asked whether the SNP impacted on the proteins. The gene 09026 is predicted to encode an amidotransferase. Out of the three SNP, only one was not synonymous and modified a Lysine in a Glutamic acid in position 2 980 (Supp. Data Table 4). The gene 09034 is predicted to encode a GA 20-oxidase (GA20ox). These enzymes are involved in the final part of the pathway of GA biosynthesis. The INDEL is a deletion of 9 nucleotides in exon 2 leading to the elimination of three amino acids Cysteine, Valine and Lysine in positions 268, 269 and 270, respectively (Figures 2B, 2C). Because of the role of gibberellins in production of stolons when exogenous GA₃ is sprayed on (Guttridge and Thompson, 1963), the GA 20-oxidase gene was the most relevant candidate for controlling runnering process. This gene was previously published as *FvGA20ox4* (Mouhu *et al.*, 2013) but any characterized function was reported so far.

Deletion when homozygous is strictly linked to NRU phenotype in the segregating Ilaria_F₂ population and in diversity resources

The genetic status of the deletion, heterozygous or homozygous, and its link with the phenotype, RU or NRU respectively, was analysed in the segregating Ilaria_F₂ population using primers developed around the deletion (Supp. Data Table 1). All NRU individuals were homozygous for the deletion while the RU individuals were heterozygous or did not show the deletion. No statistical difference was observed among RU plants between homozygous and heterozygous individuals (*FvGA20ox4_deleted/wild* and *FvGA20ox4_wild/wild*) (Supp. Data Figure 1), which suggested complete dominance of the wild allele on the mutant allele.

In order to confirm the role of the 9 bp deletion of *FvGA20ox4* in runnering, we conducted a diversity analysis between the 9 bp deletion and runnering phenotypes using 25 accessions of *F. vesca* originated from different areas (Supp. Data Table 5). Using 37 neutral microsatellites distributed on all the seven linkage groups, we investigated the population structure in these 25 accessions using a model-based clustering method implemented in Structure (Pritchard *et al.*, 2000) software.

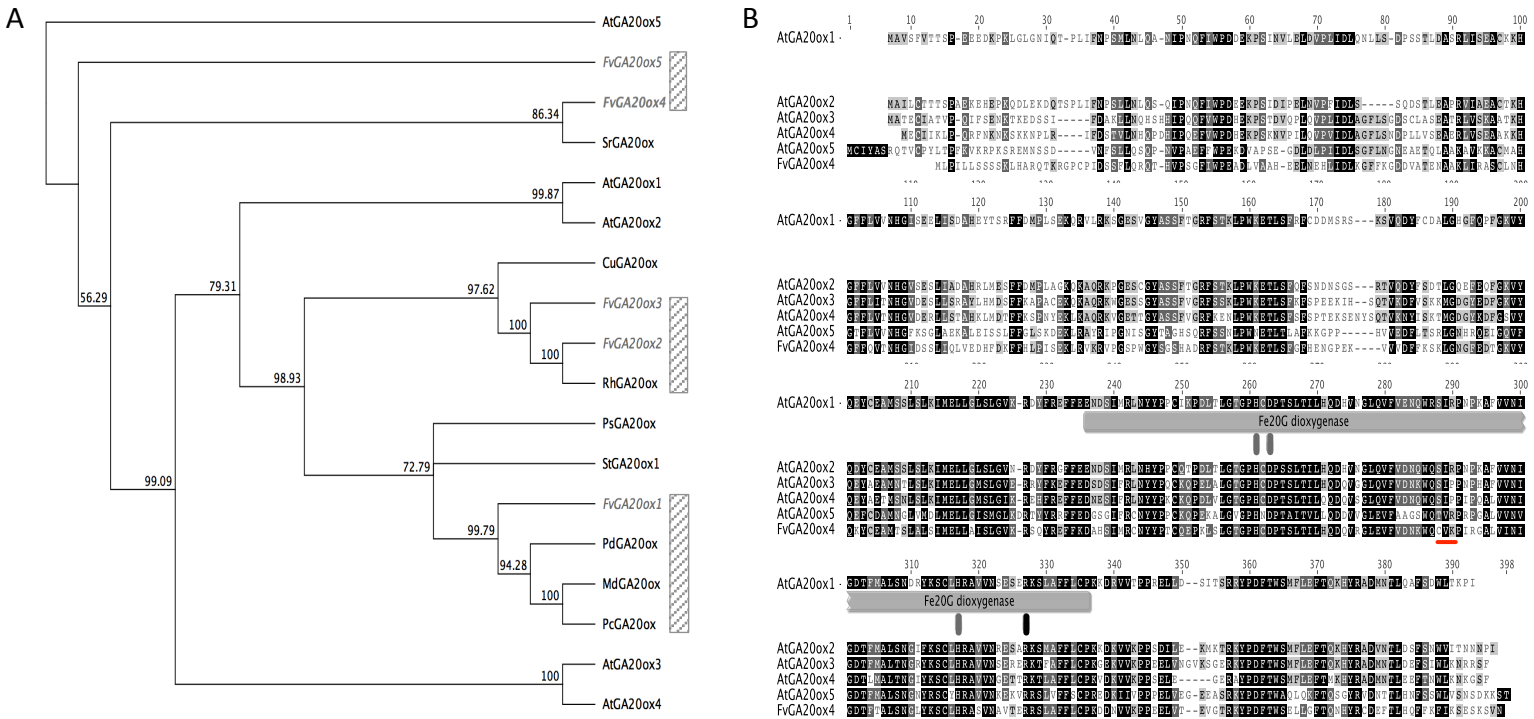


Figure 4. Gibberellin (GA) 20-oxidase (GA20ox) homology of FvGA20ox4. (A) Unrooted phylogenetic tree of the five FvGA20ox with protein sequences of *Arabidopsis thaliana* (At), potato (*Solanum tuberosum*, St), and other sequences of *Rosaceae* species. Hatched bars represent the order of *Rosales*. (B) Protein sequence alignment of the five AtGA20ox and FvGA20ox4. Grey box represents the catalytic domain described in *AtGA20ox1* and the three amino acids (H247, D249 and H303) involved in metal binding. Black bar represents the R313 active site. Red trait is the position of the three amino acids deleted in FvGA20ox4 in the non-running individuals.

Analyses of genetic structure resulted in two subpopulations according to the criterion of Evanno (Evanno *et al.*, 2005). Individuals were assigned to a particular subpopulation based on their highest ancestry percentage (Figure 3). The first group included 10 genotypes, which were all homozygous runnering (*FvGA20ox4_wild/wild*), and the second group 15 genotypes, which were all homozygous non-runnering (*FvGA20ox4_deleted/deleted*). Therefore, the runnering process structured these groups, which suggests a single origin of the mutation.

FvGA20ox4 gene expression is associated to axillary meristem

The five GA 20-oxidase genes present in the genome of *F. vesca* were studied for their expression in Reine des Vallées and NIL-2.39.63, non-runnering and runnering genotypes respectively. NIL-2.39.63 differs from Reine des Vallées by an introgression in the LGII. Patterns of expression were different according to these genes and the studied organs (Supp. Data Figure 2). The *FvGA20ox3* and *FvGA20ox4* transcripts were detected in all organs including leaf, crown and stolon in the runnering genotype and in leaf and crown in the non-runnering genotype. In contrast, expression of the *FvGA20ox2* gene was detected specifically in crown of both genotypes (Supp. Data Figure 2), while *FvGA20ox5* expression followed a similar pattern with, in addition, presence of transcripts in the stolon. *FvGA20ox1* was not detected in any studied organs. *In situ* hybridization experiments revealed that *GA20ox* mRNA distribution was detectable in the whole axillary meristem but was more abundant in leaf primordia and in the central zone (Supp. Data Figure 3). In the emerging leaf, the signal intensity was higher on the adaxial sides. A control hybridization using the sense probe showed no signal (Supp. Data Figure 3).

Phylogenetic relationship of *FvGA20ox4* with the GA oxidases and its putative function using heterologous transformation

To have better understanding of the phylogenetic relationship between *FvGA20ox4* and the other GA oxidases, we constructed a phylogenetic tree based on protein sequences. For this purpose, all predicted GA oxidases of the diploid woodland strawberry and of *A. thaliana* were studied. *FvGA20ox4* was clearly group with all other *GA20ox* (Supp. Data Figure 4). An other phylogenetic tree was performed with the five *FvGA20ox*, the five *GA20ox* of *Arabidopsis thaliana*, one of potato, which is a runnering species, and of other *Rosaceae* species (Figure 4).

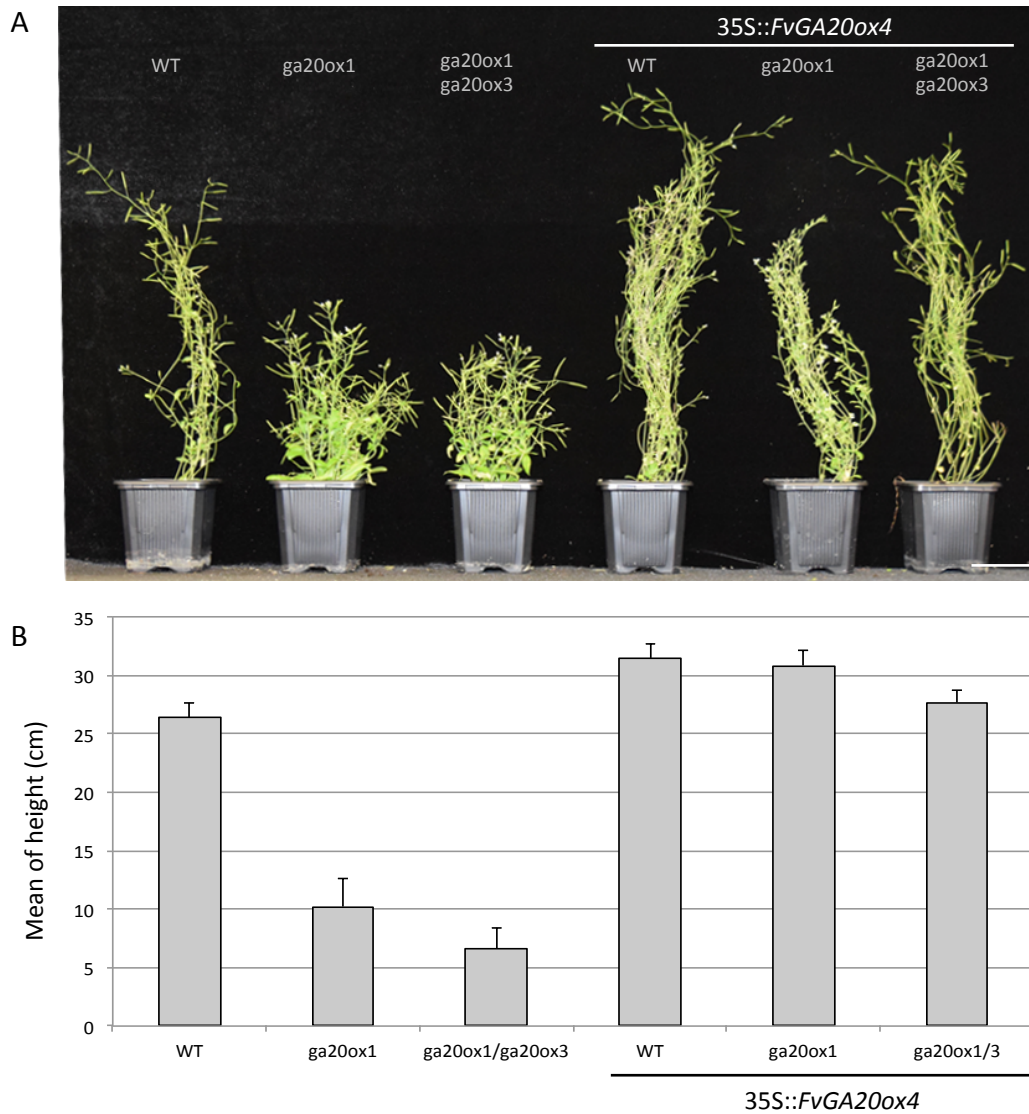


Figure 5. Overexpression of the wild *FvGA20ox4* allele in three genotypes of *Arabidopsis thaliana*: Col-0 (WT), single mutant *ga20ox1* and double mutant *ga20ox1/ga20ox3*. (A) Controls and transgenic plants with 35S::FvGA20ox4; (B) Height of the transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *FvGA20ox4*. Barr = 5 cm. Error bars indicate SE. $n = 6$ for controls and 10 for transformants plants.

The phylogenetic tree with only the GA20ox sequences showed that the FvGA20ox4 could be the ancestor in *F. vesca* compare to other FvGA20ox except *FvGA20ox5*, which is quite separated from the group (Figure 4A).

GA oxidases belong to the Fe2OG oxygenase family (Hedden and Phillips, 2000) and dioxygenase domain was studied especially the five *AtGA20ox*. Gap discovered in *FvGA20ox4* occurs on this domain, predicted on *AtGA20ox* (Figure 4B). The catalytic domain is described like strongly conserved on oxidases and conferred them function (Han and Zhu, 2011).

To demonstrate the function of wild *FvGA20ox4* in a heterologous system, its overexpression was performed in mutants and wild genotypes of *A. thaliana*. The high level of conservation of the protein sequences between species (Figure 4B) allowed this use of a heterologous system. The two *A. thaliana* mutants tested, the *ga20ox1* simple mutant and the *ga20ox1 ga20ox3* double mutant, showed dwarf phenotype compare to the wild type as expected (Plackett *et al.*, 2012) (Figure 5). When *FvGA20ox4* is overexpressed, mutants recover wild type phenotype with a height similar to the one of the wild type. Overexpression in the wild genotype, Col-0, induces plants with taller height than the control. Therefore, *FvGA20ox4* is able to restore WT phenotype on mutants and so, *R* gene has a putative GA 20-oxidase function.

The deleted version of FvGA20ox4 enzyme is not functional

To test functionality of both wild and mutated FvGA20ox4 proteins, enzymatic activity was tested in heterologous system. The two respective cDNAs were heterologously expressed in *E. coli*. Each FvGA20ox4 protein were incubated with ¹⁴C-labelled GA₁₂ substrate. Only the wild FvGA20ox4 enzyme converted this substrate efficiently to GA₉, which was identified by GC–MS (Figure 6A), whereas the mutated FvGA20ox4 enzyme was not able to convert the GA₁₂ substrate, which suggests that the latter protein is not functional (Figure 6B). These results confirmed that FvGA20ox4 is involved in the gibberellin pathway with a GA 20-oxidase function, and that the deletion of three amino acids leads to a non-functional protein.

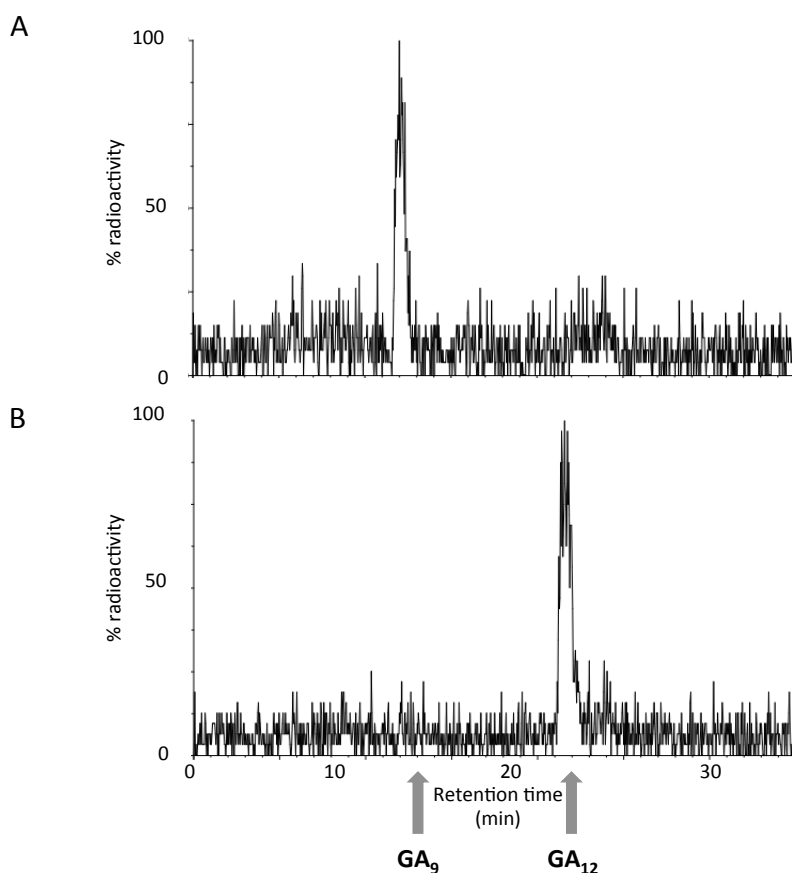


Figure 6. HPLC-radiochromatograms of products from incubations of recombinant FvGA20ox4 wild-type (A), and FvGA20ox4 mutant protein (B) with ^{14}C -labelled GA_{12} . Identities of substrate and product were confirmed as methyl esters trimethylsilyl ethers by GC-MS by comparison of their mass spectra with published spectra (Gaskin and MacMillan): $[1\text{-},7\text{-},12\text{-},18\text{-}^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$ mass/charge (% relative abundance), $\text{M}^+352(5)$, $344(3)$, $320(11)$, $312(6)$, $306(8)$, $298(4)$, $290(34)$, $284(20)$, $245(100)$, $239(52)$, $201(47)$, $195(22)$; $[1\text{-},7\text{-},12\text{-},18\text{-}^{14}\text{C}]\text{GA}_9$, $\text{M}^+338(6)$, $330(3)$, $306(75)$, $298(45)$, $276(100)$, $270(54)$, $251(60)$, $243(42)$, $233(66)$, $232(78)$, $227(38)$, $226(48)$, $189(48)$, $183(36)$.

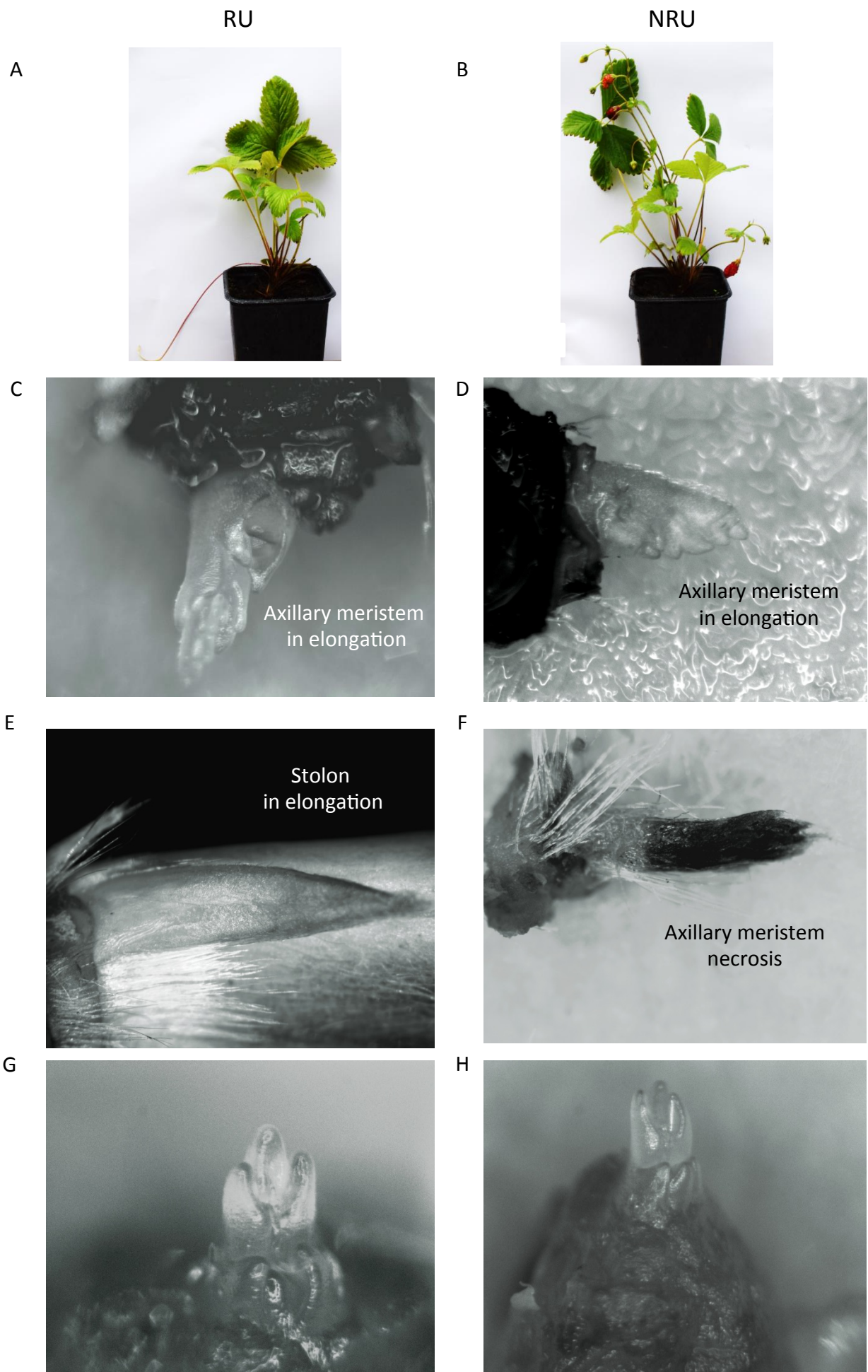


Figure 7 Dissections of running (RU) and non-running (NRU) genotypes primary crown. A,C,E and G show RU plants; whereas B, D,F and H represent NRU individuals. (C), (D), (E) and (F) are axillary meristems at different stages. (G) and (H) are shoot apical meristems.

FvGA20ox4 mutation in NRU causes axillary meristem degeneration

It was previously shown that stolons in strawberry are derived from axillary meristems initiated in the axils of leaves. The absence of stolons in loss-of-function FvGA20ox4 mutant plants should result from an arrest of axillary meristem production or development. To test this hypothesis, we dissected primary crown of runnering and non-runnering genotypes (Figures 7A and B) in order to determine if axillary meristems are produced in non-runnering plants and if their development is affected. The axillary meristems at the base of the primary crown of the runnering genotype elongated until becoming a stolon (Figures 7C and E). Conversely, in the non-runnering genotype, the axillary meristems at the base of the primary crown initiated elongation (Figure 7D) and then degenerated showing necrosis (Figure 7F). Development of shoot apical meristems appeared to be similar in runnering and non-runnering genotypes, respectively (Figures 7G and H) suggesting that the loss-of-function FvGA20ox4 does not affect shoot apical meristem activity. Interestingly, axillary meristems located at the top of primary crown of the non-runnering genotype elongated producing inflorescences as expected for this non-runnering genotype that exhibits a perpetual flowering phenotype. Altogether, these results suggest that FvGA20ox4 activity is required for normal development of stolon in strawberry initiated from axillary meristems but not for axillary meristems devoted to inflorescence development or shoot apical meristem.

Exogenous treatment of GA₃ restores runnering in non-runnering plants

Based on the hypothesis that the deleted FvGA20ox4 protein is non-functional, we test treatment of exogenous gibberellins using actives GA (GA₃) and a GA inhibitor of GA3ox activity, the Prohexadione-Calcium (ProCa). Treatments were applied on non-runnering and runnering genotypes in spring.

GA₃ treatment on non-runnering genotypes resulted in stolons emergence two weeks after the first treatment. During five weeks, an average of two stolons was produce by week, following by the restoration of non-runnering phenotype six weeks after the last treatment (Figure 8A). Moreover, GA₃ treatment causes petioles elongation during two weeks after treatment following by the restoration of the phenotype (Supp Data Figure 5A). ProCa treatment on runnering genotypes resulted in a drastic diminution of stolons until a stop total of the emergence of stolons the third week after the last treatment. Thereafter, stolon production was restored to runnering phenotype (Figure 8B). In addition, ProCa treatment caused a decrease of the height plant, which was restored after ten weeks (Supp Data Figure 5B).

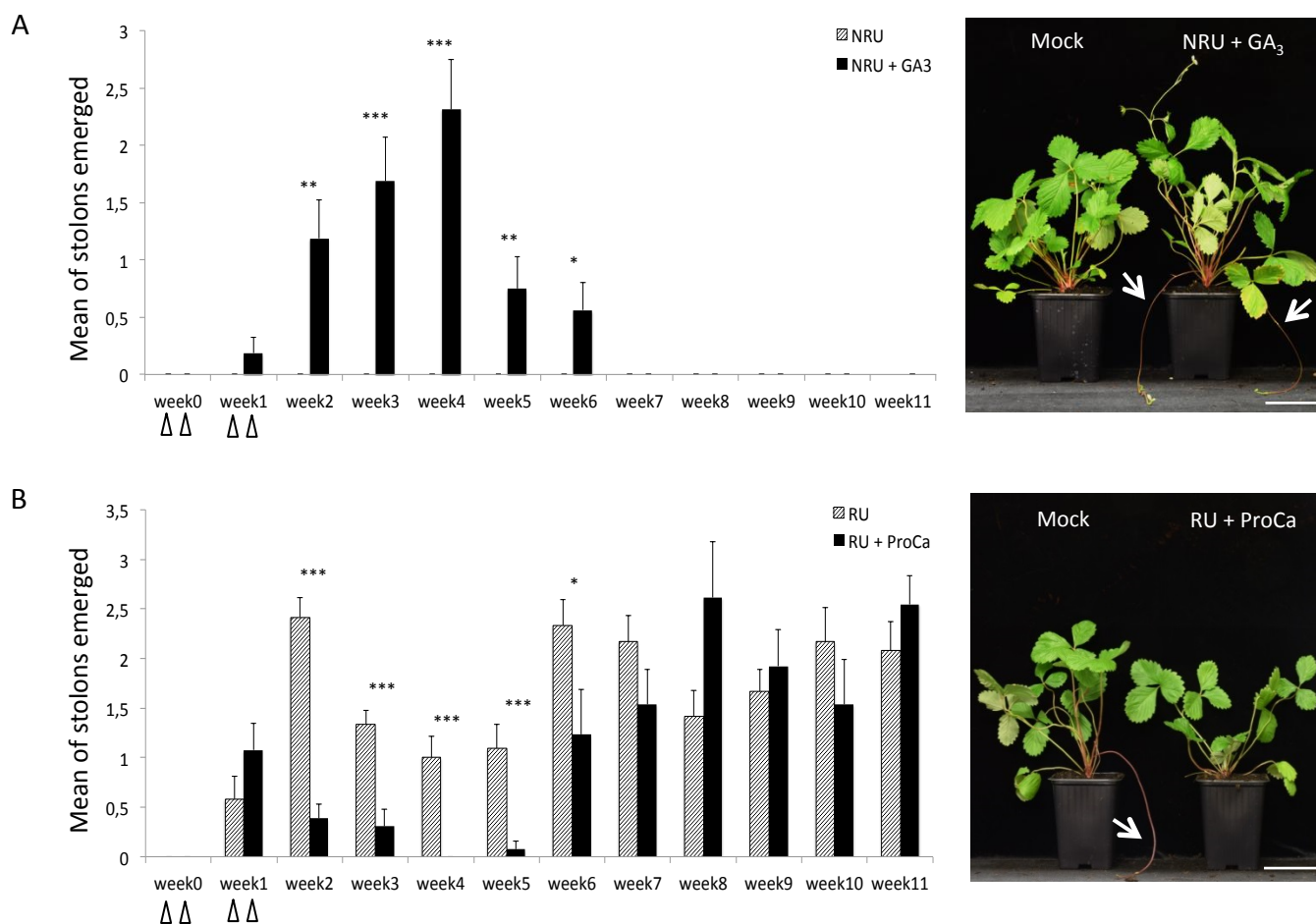


Figure 8. Production of stolons with exogenous apply of actives GA (GA₃) and GA's inhibitor (ProCa) on NRU and RU diploid strawberry respectively. Triangles represents treatment dates. Error bars indicate SE. *p*-value = 0,001 (***), 0,01 (**) or 0,05 (*). In photos, bar = 6,5 cm.

(A) GA₃ treatment on non-running (NRU) genotype. *n* = 16 plants

(B) ProCa treatment on running (RU) genotype. *n* = 13 plants

These results showed the importance of the GA biosynthesis in the runnering process in the diploid strawberry and the possibility to a non-runnering genotype to be runnering after GA treatment.

DISCUSSION

Naturally woodland strawberry, a perennial Rosaceae species, combines sexual reproduction by flowers and asexual reproduction by stolons, also called runnering process. The stolons necessary to propagate strawberry cultivars in nurseries (Simpson and Sharp, 1988) are considered as negative trait for fruit production in cultivated strawberry. Beside deep investigations devoted to identify factors that regulate the runnering process, the genetic control of stolon production in strawberry is still unknown. However, a major QTL, the *R* locus that controls runnering process in woodland strawberry have been localized on the LGII by Sargent *et al.* (2004). The identification of the corresponding *R* gene constitutes a main goal in the way to describe the genetic program that regulates runnering process in woodland strawberry. In this paper, we identify the *R* gene and we characterized its in linked to runnering phenotype.

Mutation in a Gibberellin biosynthesis gene causes the non-runnering phenotype

R locus was reduced at the maximum in our population because of linkage disequilibrium (Figures 1 and 2). Despite others potential candidate genes, deletion in gene09034 predicted as a GA 20-oxidase, *FvGA20ox4*, seems to be the stronger candidate. Mutation of *FvGA20ox4* is linked to all non-runnering individuals in our segregating population (Supp. Data Figure 1). Nevertheless, heterozygous plants for the mutation present the same mean production of stolons than the homozygous plant carrying a non-mutated *FvGA20ox4* gene.

In order to prove that the *FvGA20ox4* gene encodes an active GA 20-oxidase, complementation assays of *Atga20ox* mutants and enzymatic activity assays have been performed. Restoration of wild type phenotype in *Atga20ox* mutants (Figure 5) and production of GA by the wild *FvGA20ox4* (Figure 6) demonstrate that *FvGA20ox4* possesses a GA 20-oxidase activity. The lack of only three amino acids causes the dysfunction of *FvGA20ox4* as shown by the unsuccessful tentative to obtain GA 20-oxidase activity with the deleted *FvGA20ox4* protein.

Deletion concerns three amino acids at positions present in the catalytic iron-dependant domain as predicted from *AtGA20ox*. Moreover, in 2011, Han and Zhu published a comparative study of the GA oxidases from rice, *Arabidopsis* and soybean, and they described several motifs involved in oxidative function. Indeed, the deletion in *FvGA20ox4* gene allows the production of a dysfunctional protein by modifying its 3-D structure affecting either i) the link with the iron ion, or ii) the accessibility of the enzymatic active site for the substrate. Therefore, results suggest that in RU genotypes, endogenous concentrations of active GA should be higher than those present in NRU plants. Conversely, an opposite situation should be observed for the precursors of active GA.

Gibberellin is an important plant growth regulator, involved in many developmental processes. In perennial plants, active GA are known to act as flowering inhibitors and vegetative promoters (Wilkie *et al.*, 2008). Active GA promote runnering in strawberry. Nevertheless, many studies reported the effects of exogenous GA treatments, on citrus resulting in flowering inhibition, (Lord and Eckard, 1987) or promoting the vegetative development in avocado (Salazar-Garcia and Lovatt, 1998).

Mutation in *FvGA20ox4* affects stolons axillary meristems development

In order to determine how the *FvGA20ox4* loss-of-function results in impairing the stolon development, we performed a functional analysis of the *FvGA20ox4* gene in both wild-type (RU) and loss-of-function plant (NRU). *FvGA20ox4* expression was detected in all vegetative organs tested of both RU and NRU plants. However, *FvGA20ox4* gene shows a higher expression level in stolons (Supp. Data Figure 2). *In situ* transcript localizations show that *FvGA20ox4* gene is expressed in axillary meristems. The specific expression pattern suggests a role of active GA in the stolons development from axillary meristem. This assessment is confirmed by active GA treatments that results in stolons production in NRU plants. Conversely treatments with ProCa, an inhibitor of active GA synthesis, inhibit stolons production (Figure 8). In addition, exogenous active GA and ProCa affect plant height in opposite directions (Supp. Data Figure 5). Interestingly, the loss-of-function of *FvGA20ox4* does not affect plant height in NRU plant compared to those observed in RU plant the suggesting a specific action of the *FvGA20ox4* enzyme restricted to axillary meristem.

Dissections of the plant were done to characterize axillary meristems differentiation in both NRU and RU plants. Indeed, in strawberry, the outcomes of axillary meristems depend of their position along the main stem. So, axillary meristems in the basal parts of the main stem will become stems of second order or stolons whereas axillary meristems that are formed in the uppermost part of the main stem can become inflorescent meristems (Battey *et al.*, 1998; Savini *et al.*, 2008; Costes *et al.*, 2014). In NRU individuals, we observed that all axillary meristems located at the base of the main stem initiate, producing few leaf primordia before they stop their development and become necrotic (Figure 7). Conversely, in RU plants the axillary meristems develop in the same ways as those of the NRU plants but continue their elongation to develop a stolon or a stem of second order. Since we are unable to clearly differentiate the axillary meristems that will give rise stolons from those that will develop for producing stem of second order, we do not know if the axillary buds that necrotize are those producing stolons or stem of second order. However, since both RU and NRU plants produce stems of second order with suspect that the axillary meristems that necrotize are those devoted to stolon production.

Altogether, our data suggest that FvGA20ox4 possess a GA oxidase activity necessary to produce active GA in axillary meristems that will induce the development of stolons whereas the loss-of-function of the FvGA20ox4 gene in NRU plant does not allow the production of an active enzyme that cannot produce the active GA necessary for stolon development. However, the molecular mechanism by which the active GA regulates the development of stolons from axillary meristems remains to be characterized.

Supplemental Table 1. List of SSR markers primers for fine mapping

Markers	Position on LG2 (v2.0a1)	Forward	Reverse	References
BFACT002	19 761 608	ACTAGGAAGATGCGGTGTGG	GCAGGGCTTCAGAGAAATCA	Rousseau-Gueutin <i>et al.</i> , 2008
EMFv022	22 040 248	CCTCCGGCCAAGCACCGCCTTC C	ACGACCGCGACCCGTTTGATTTG	Sargent <i>et al.</i> , 2004
BxR025	25 275 901	TAACCGGAATCGGAGAGATG	ACAGCTTCATTTGCGCTTTT	-
EMFn134	25 522 662	TGATTCTTTGAAAGGCTTTGG	AAAACAACCCCTCTCATCC	Sargent <i>et al.</i> , 2006
UFFxa09F09	25 609 724	AGAACCATCATCGTCTCTCGTT	GCAATCTCTCCGGCTTAAACT	Sargent <i>et al.</i> , 2006
EMFvi146	26 029 778	ACGAAAAACAGCATACACATCG	TACCGCCCTTAAGTTTGAGTA	Sargent <i>et al.</i> , 2004

Supplemental Table 2. Illumina sequencing of F₂ bulked individuals displaying a NRU phenotype. Sequence of the reference genome is the strawberry whole genome shotgun chromosomes v2.0.a1 available on the Genome Database for Rosaceae website (ftp://ftp.bioinfo.wsu.edu/species/Fragaria_vesca/Fvesca-genome.v2.0.a1/assembly/).

	Bulk1	Bulk2	Pawtuckaway	Baron Solemacher
Scored phenotype	NRU	NRU	RU	NRU
Strawberry reference genome	Fragaria vesca V2.0.a1	Fragaria vesca V2.0.a1	Fragaria vesca V2.0.a1	Fragaria vesca V2.0.a1
Nb of F ₂ plants per bulk	7	2	-	-
Nb of paired reads	82,799,864	84,573,179	15,229,794	9,013,443
% mapped reads	82.00%	84.41%	78%	80%
Insert size	408 bp	388 bp	334 bp	304 bp
Sequence length	100 bp	100 bp	26-95 bp	26-95 bp
Coverage	40X	41X	6X	4X

Supplemental Table 3. Prediction of the R locus using GDR (Genome Database Rosaceae) annotation. A second annotation was realized using Blast2go© software.

Gene ID v1.0-hybrid	GDR's annotation	Second annotation with Blast2go®	E-value Blast2go®
gene09024	Oleosin Zn-I (probable)	Oleosin 16 kDa	7,30E-07
gene09025	Oleosin 16 kDa (probable)	NA	-
gene09026	Calcineurin-binding protein cabin-1 (CAIN) (probable)	Amidotransferase subunit chloroplastic mitochondrial	4,40E-43
gene09027	Histidine-rich glycoprotein, Precursor (probable)	Unknown	-
gene09028	RNA polymerase sigma factor rpoD (Sigma-A) (probable)	RNA polymerase sigma factor sig3	9,50E-123
gene09029	Putative lipase YOR059C (probable)	Epidermal Patterning factor-like protein 2	1,38E-12
gene09030	Far upstream element-binding protein 2 (FUSE-binding protein 2) (probable)	Flowering locus K homology domain	1,10E-15
gene09031	SEC23-interacting protein (probable)	Phospholipase sgr2	0
gene09032	Wall-associated receptor kinase 2, Precursor (probable)	Wall-associated receptor kinase 2	3,09E-59
gene09033	Protein NLRCS (CLR16.1) (probable)	NA	-
gene09034	Gibberellin 20 oxidase 2 (similar to)	Gibberellin 20 oxidase 3	1,20E-133

Supplemental Table 4. List of the 9 SNP/INDEL. The comparison between NGS results based on bulks analyses and NGS sequencing available in the Genome Database of Rosaceae (*F.vesca* Pawtuckaway and Baron Solemacher) allowed to eliminate 14 out of the 23 SNP/INDEL.

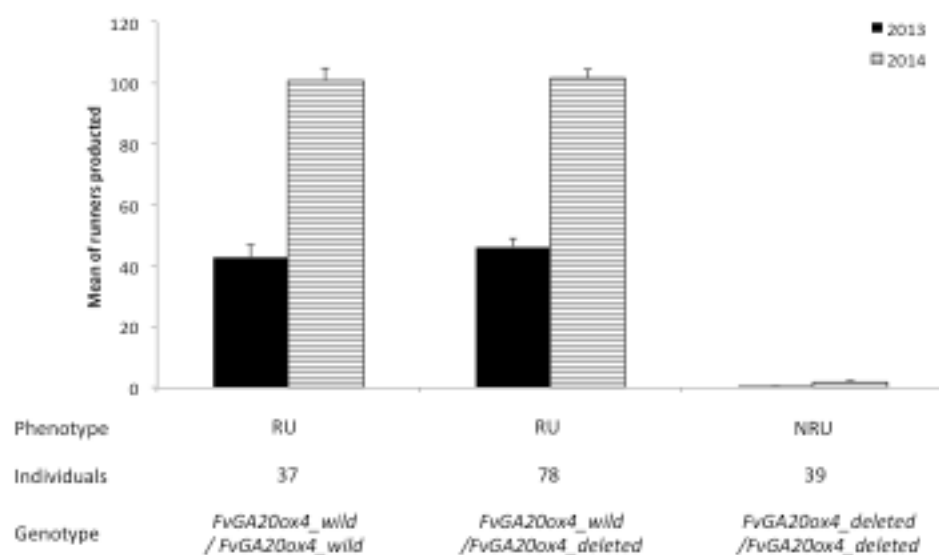
Position v2.0a1	SNP / INDEL	[RU]	[NRU]	[RU]	[NRU]	Gene position	Notes
		<i>F.vesca</i> Sicile	Bulk1/ Bulk2	<i>F.vesca</i> Pawtuckaway	<i>F.vesca</i> Baron Solemacher		
25,536,550	DEL	-	AAGTGTGTA	-	AAGTGTGTA	Exon2 gene09034	Δ268-270
25,576,106	SNP	G	A	G	?	Prom gene09027	
25,589,461	SNP	A	C	A	C	Intron gene09026	
25,591,942	SNP	G	T	G/T	T	Intron gene09026	
25,593,132	SNP	A	G	G/A	G	Exon7 gene09026	K 2980 E
25,593,932	SNP	A	T	T	T	Intron gene09026	
25,594,802	SNP	G	A	G	A	Exon5 gene09026	S 1611 S
25,595,663	SNP	C	T	T	T	Exon5 gene09026	L 750 L
25,599,833	IN	-	T	?	?	3'UTR gene09025/ 3'UTR gene09024	

Supplemental Table 5. List of the 25 *F. vesca* genotypes used for genetic structure analysis. Runnering habit and genotyping of the 9 bp deletion in *FvGA20ox4* is included

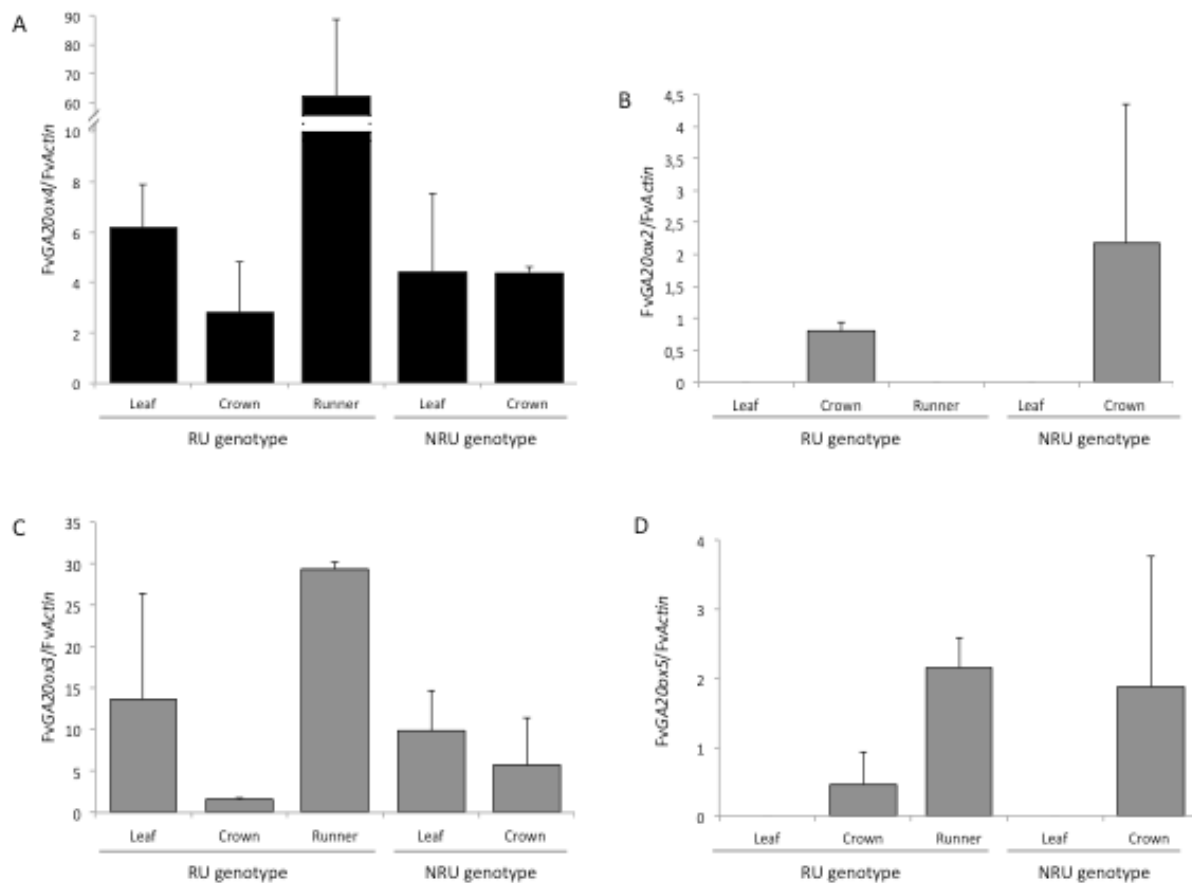
Taxon	Plant ID	Country of origin	Runnering habit	Deletion in gene <i>FvGA20ox4</i> ?
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Ruegen	Germany	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Pineapple Crush	United States	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	New Giant	United States	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Alexandria	United States	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Baron Solemacher	Germany	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>alba</i>	Yellow Wonder	United States	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> <i>semperflorens</i>	Alpine	-	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Baron Solemacher light-green mutant	United States (New Hampshire)	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Baron Solemacher yellow mutant	United States (New Hampshire)	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Baron Solemacher white mutant	United States (New Hampshire)	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Golden Alpine	United States (California)	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i>	Mignonette	United States (New Jersey)	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>alba</i>	Yellow Wonder	United States (Connecticut)	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> spp. <i>alpina</i>	Ali Baba	Europe	NRU	Yes
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	UC-04	United States (California)	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>californica</i>	UC-05	United States (California)	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>bracteata</i>	UC-06	United States (California)	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Frost King	United States	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	Snow King	United States (Michigan)	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Rodlvan	Sweden	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Snovit	Sweden	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>semperflorens</i>	Norrland	Sweden	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> ssp <i>vesca</i>	Sicile	-	RU	No
<i>Fragaria vesca</i> f. <i>alba</i>	Hawaii 4 (F7)	United States (Maryland)	RU	No

Supplemental Table 6: Gene identifier of Gibberellin (GA) oxidases.

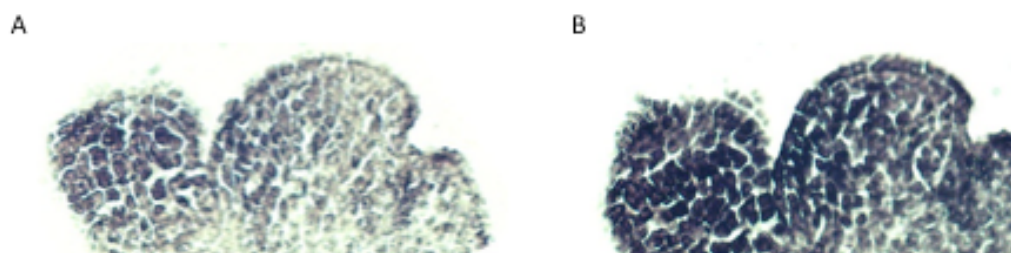
Name	Species	ID	Web site
AtGA20ox1	<i>A.thaliana</i>	AT4G25420.1	TAIR
AtGA20ox2	<i>A.thaliana</i>	AT5G51810.1	TAIR
AtGA20ox3	<i>A.thaliana</i>	AT5G07200.1	TAIR
AtGA20ox4	<i>A.thaliana</i>	AT1G60980.1	TAIR
AtGA20ox5	<i>A.thaliana</i>	AT1G44090.1	TAIR
AtGA2ox1	<i>A.thaliana</i>	AT1G78440.1	TAIR
AtGA2ox2	<i>A.thaliana</i>	AT1G30040.1	TAIR
AtGA2ox3	<i>A.thaliana</i>	AT2G34555.1	TAIR
AtGA2ox4	<i>A.thaliana</i>	AT1G47990.1	TAIR
AtGA2ox5	<i>A.thaliana</i>	AT3G17203.1	TAIR
AtGA2ox6	<i>A.thaliana</i>	AT1G02400.1	TAIR
AtGA2ox7	<i>A.thaliana</i>	AT1G50960.1	TAIR
AtGA2ox8	<i>A.thaliana</i>	AT4G21200.1	TAIR
AtGA3ox1	<i>A.thaliana</i>	AT1G15550.1	TAIR
AtGA3ox2	<i>A.thaliana</i>	AT1G80340.1	TAIR
AtGA3ox3	<i>A.thaliana</i>	AT4G21690.1	TAIR
AtGA3ox4	<i>A.thaliana</i>	AT1G80330.1	TAIR
FvGA20ox1	<i>F. vesca</i>	gene13360	GDR/SGR
FvGA20ox2	<i>F. vesca</i>	gene19438	GDR/SGR
FvGA20ox3	<i>F. vesca</i>	gene19437	GDR/SGR
FvGA20ox4	<i>F. vesca</i>	gene09034	GDR/SGR
FvGA20ox5	<i>F. vesca</i>	gene10825	GDR/SGR
FvGA2ox1	<i>F. vesca</i>	gene05020	GDR/SGR
FvGA2ox2	<i>F. vesca</i>	gene00852	GDR/SGR
FvGA2ox3	<i>F. vesca</i>	gene03182	GDR/SGR
FvGA2ox4	<i>F. vesca</i>	gene07935	GDR/SGR
FvGA2ox5	<i>F. vesca</i>	gene19549	GDR/SGR
FvGA3ox1	<i>F. vesca</i>	gene06004	GDR/SGR
FvGA3ox2	<i>F. vesca</i>	gene01056	GDR/SGR
FvGA3ox3	<i>F. vesca</i>	gene01058	GDR/SGR
FvGA3ox4	<i>F. vesca</i>	gene01059	GDR/SGR
FvGA3ox5	<i>F. vesca</i>	gene01060	GDR/SGR
FvGA3ox6	<i>F. vesca</i>	gene11192	GDR/SGR
RhGA20ox	<i>Rosa hybrid cultivar</i>	AIN45172	NCBI
MdGA20ox	<i>Malus domestica</i>	12231168	NCBI
PcGA20ox	<i>Pyrus communis</i>	333440997	NCBI
PdGA20ox	<i>Prunus dulcis</i>	390013402	NCBI
PsGA20ox	<i>Pisum sativum</i>	2108428	NCBI
SrGA20ox	<i>Sesbania rostrata</i>	68509984	NCBI
CuGA20ox	<i>Citrus unshiu</i>	823683720	NCBI
StGA20ox1	<i>S. tuberosum</i>	10800974	NCBI



Supp. Data Figure 1. Frequency distribution of stolons into two classes [RU] and [NRU] for respectively runner and non-runner individuals. Plants were ranged as [RU] or [NRU] when they produced more than 3 stolons or 0 - 3 stolons respectively. Genotyping of the *FvGA20ox4* gene is included: the wild allele was the one which conferred runner whereas the deleted mutant allele did not. Error bars indicate SE.

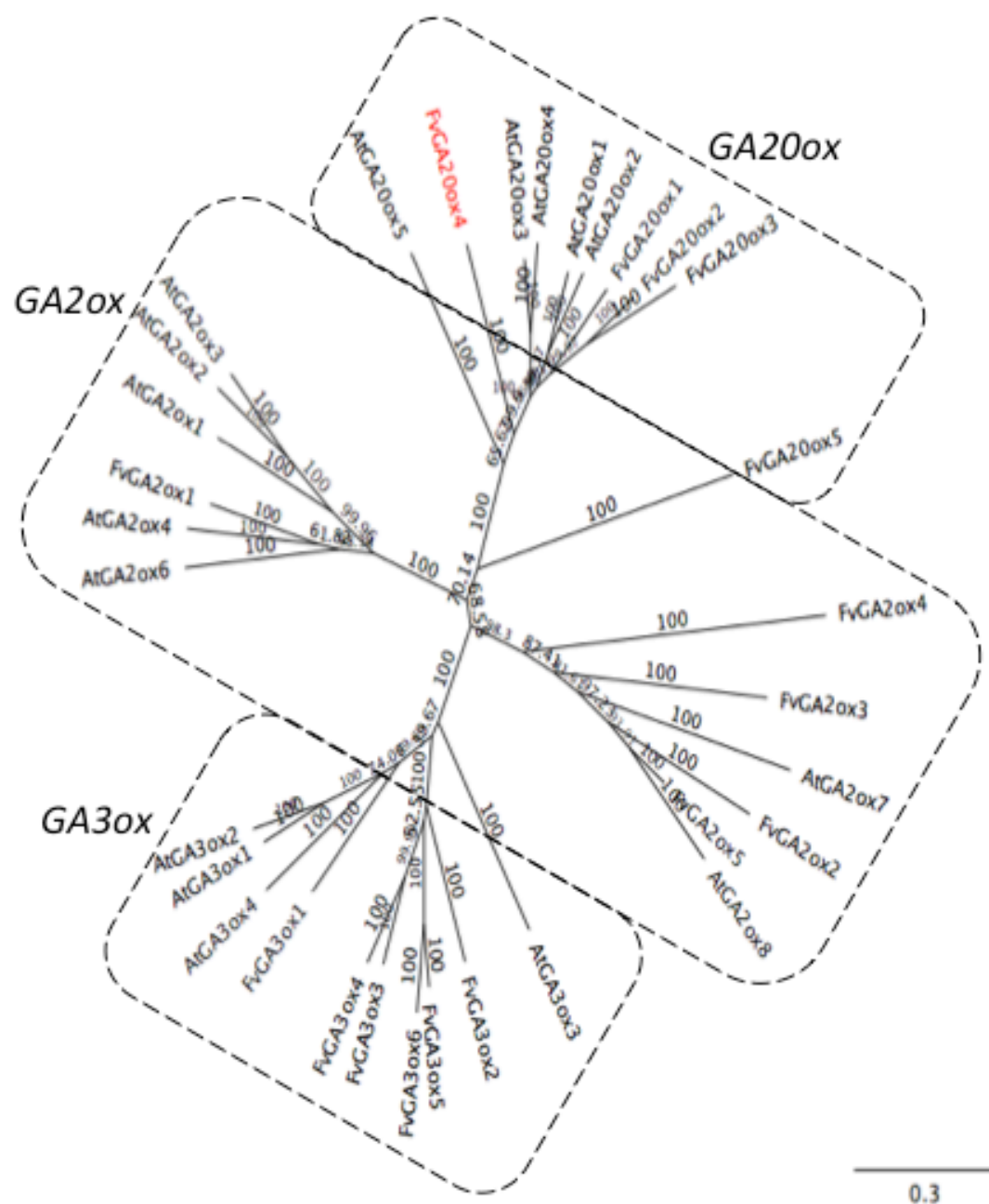


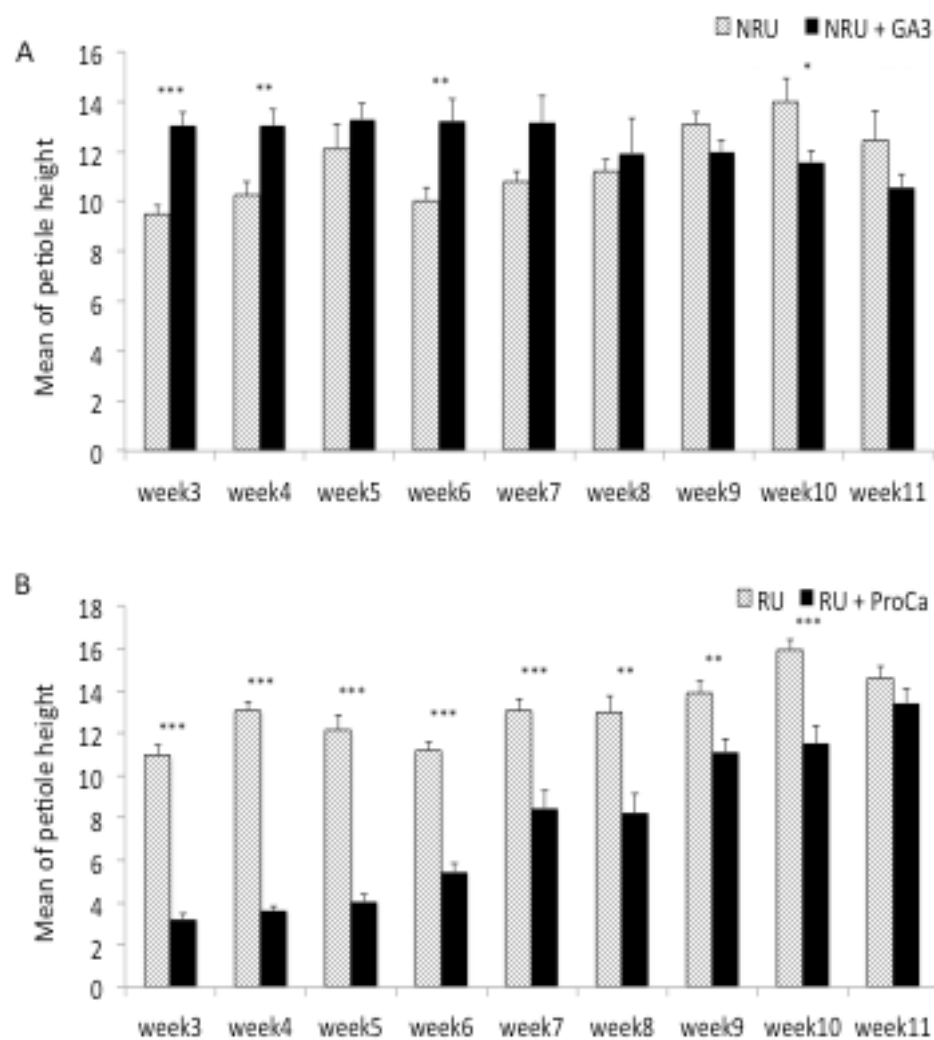
Supp Data Figure. 2. The five *FvGA20ox* expressions were studied in vegetative organs of RU and NRU genotypes. *FvGA20ox1* transcripts was not found. Error bars indicate SE. Expression of *FvGA20ox4* (A), *FvGA20ox2* (B), *FvGA20ox3* (C) and *FvGA20ox5* (D) expressions were reported.



Supp Data Figure 3: Analysis of *FvGA20ox4* expression by *in situ* hybridization in the axillary meristems of (A) Running (RU) and (B) Non-Running (NRU) genotypes.

Supp Data Figure 4: Unrooted phylogenetic tree of Gibberellin (GA) oxidases genes from *Fragaria vesca* (Fv) and *Arabidopsis thaliana* (At)





Supp. Data Figure 5: Comparison of height with GA apply (A) and ProCa treatment (B) on NRU and RU genotypes respectively. p -value = 0,001 (***), 0,01 (**) or 0,05 (*), Error bars indicate SE.

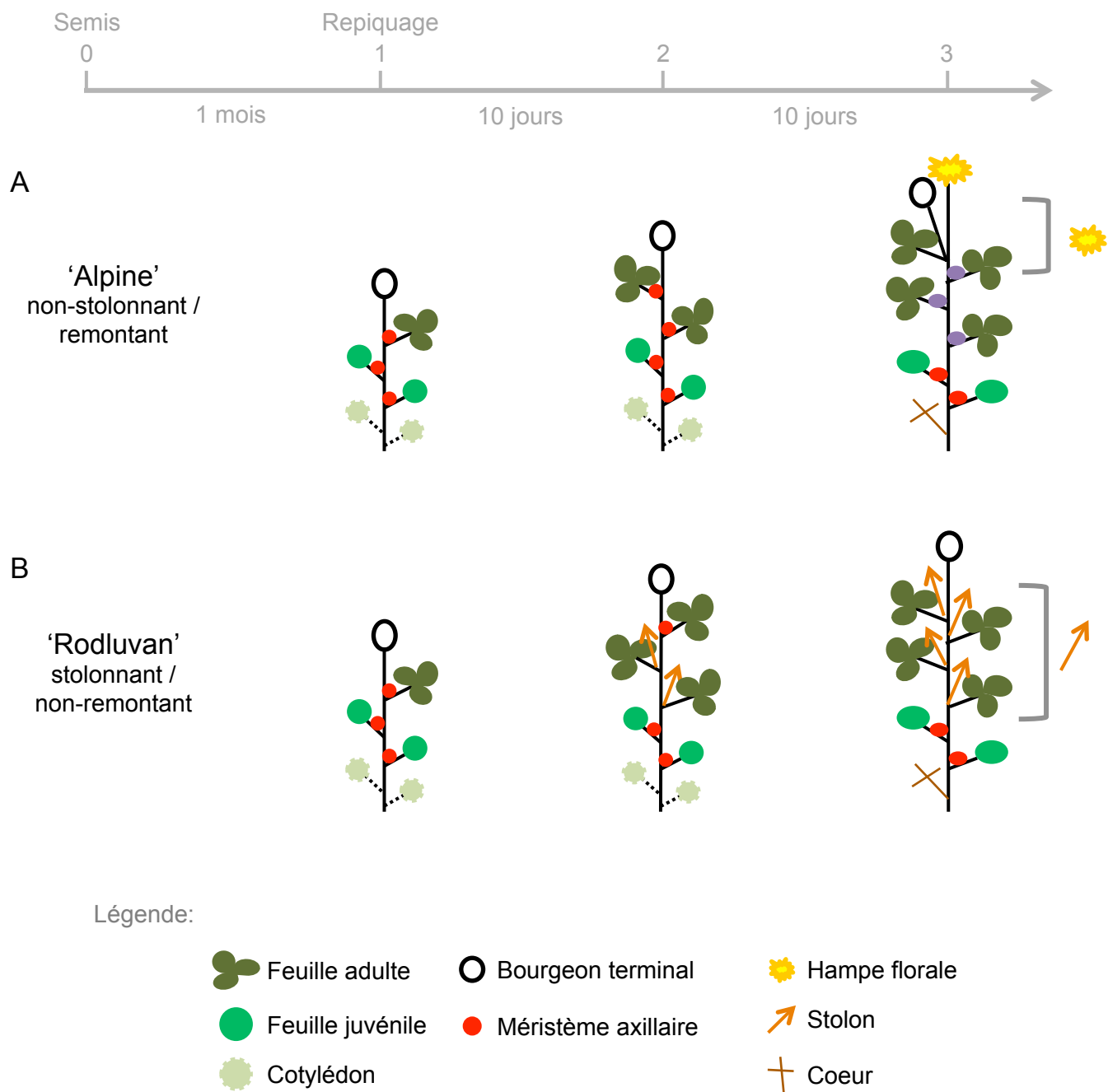


Figure 32: Schéma de l’architecture comparative entre un génotype non-stolonnant / remontant ‘Alpine’ (A) et un génotype stolonnant / non-remontant ‘Rodluvan’ (B). $n = 20$ plants par génotype aux temps 1 et 2, et $n = 10$ au temps 3.

II. Résultats complémentaires

II.2 Le devenir des méristèmes axillaires est dépendant de leur localisation sur le plant

Afin de mieux comprendre le développement des stolons à partir des méristèmes axillaires, des observations ont été effectuées, aux premiers stades de développement de la plantule : à partir de l'émergence de la première feuille adulte, jusqu'à l'apparition de la première hampe florale.

Cet essai a été réalisé sur les génotypes 'Alpine' (non stolonnant / remontant) et 'Rodluvan' (stolonnant / non-remontant) précédemment décrits. Les graines ont été semées en mars 2013 en conditions naturelles et les plantules ont été repiquées un mois après. Compte-tenu de la période d'essai qui s'est déroulée en jours longs, seul le génotype remontant (Alpine) était capable de fleurir. Les plants ont été disséqués sur trois dates, celle du repiquage, 10 et 20 jours après repiquage. Vingt plants par génotype pour les deux premières dates, puis 10 pour la dernière date ont été disséqués et notés.

A la date de repiquage, les deux génotypes présentent un développement identique avec le développement des méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles juvéniles et de la feuille adulte (Figure 32).

Dix jours après le repiquage, une nouvelle feuille adulte a émergé chez le génotype 'Alpine' contre deux nouvelles feuilles adultes chez le génotype 'Rodluvan'. Chez ce dernier, deux stolons ont émergé au niveau des méristèmes axillaires des deux premières feuilles adultes. Par la suite, le nombre de feuilles adultes redevient similaire entre les deux génotypes avec quatre feuilles pour chaque génotype.

Vingt jours après repiquage, l'émergence des stolons continuent chez le génotype stolonnant avec l'émergence d'un stolon à l'aisselle de chaque feuille adulte. A cette même date, la première hampe florale apparaît chez le génotype remontant, uniquement au niveau de la quatrième feuille.

En ce qui concerne la formation de cœurs, elle paraît similaire chez les deux génotypes qui présentent un nouvel axe à la base des plants un mois et demi après semis, lorsque les plants ont produit quatre feuilles adultes (Figure 32).

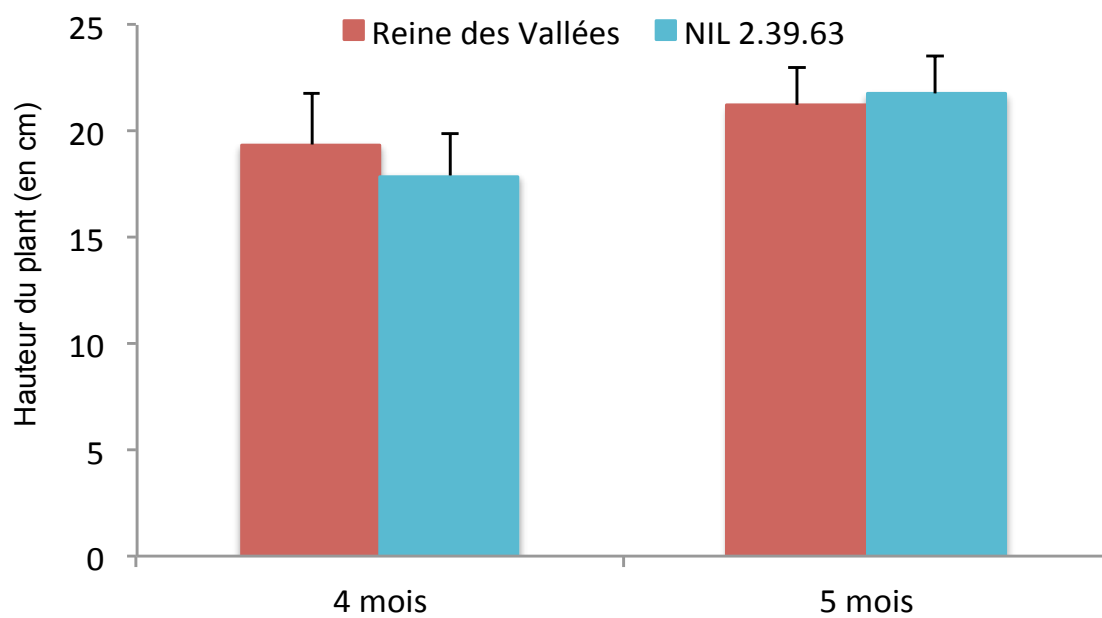


Figure 33: Estimation de la hauteur de plants adultes ‘Reine des Vallées’ (en rouge) et de la lignée ‘NIL 2.39.63’ (en bleu), âgés de 4 mois et 5 mois après semis. La comparaison entre les deux génotypes ne montre pas de différence significative.

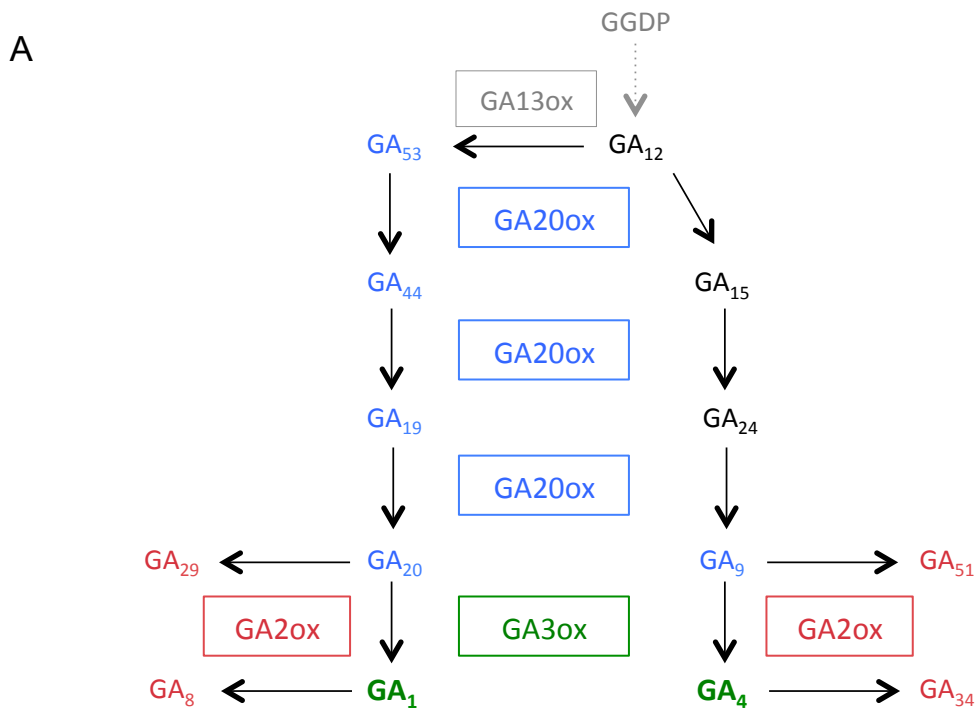
Ainsi, cette étude descriptive a pu confirmer le lien spatial entre la localisation des méristèmes et leur devenir en tant que stolons et hampes florales. Il serait intéressant de poursuivre cette étude chez un plus grand nombre de génotypes incluant des génotypes stolonnants / remontants.

II.3 En conditions naturelles, la délétion au niveau du gène *FvGA20ox4* n'affecte pas la hauteur totale du plant

Comme supposé dans l'article 1, le gène de stolonnage, *FvGA20ox4*, pourrait être impliqué dans l'élongation des méristèmes axillaires. De plus, l'application de GA actives entraîne un allongement des pétioles, alors que le traitement avec l'inhibiteur de GA provoque un arrêt de cette croissance (Article 1, Supp. Data Figure 5). Ainsi, nous avons voulu savoir si les génotypes stolonnants (*FvGA20ox4* allèle sauvage) et les génotypes non-stolonnants (*FvGA20ox4* allèle délété) présentaient ou non une différence de hauteur de plant.

Afin de travailler avec des génotypes présentant un même fond génétique mais différents pour leur capacité à former des stolons, nous avons réalisé notre étude sur 'Reine des Vallées' (non-stolonnant (homozygote *FvGA20ox4* délété) et remontant), et la lignée 'NIL 2.39.63' fourni par notre collaboratrice Amparo Monfort (IRTA, Barcelone) (stolonnant (homozygote *FvGA20ox4* allèle sauvage) et remontant). Cette lignée NIL est issue de back cross successifs avec Reine des Vallées après un premier croisement entre 'Reine des Vallées' et un génotype de *F. bucharica* qui stolonne. Ainsi, la lignée NIL présente le même un fond génétique que 'Reine des Vallée' excepté une introgression sur le chromosome 2. Cette introgression inclue le gène de stolonnage provenant du génotype de *F. bucharica*. La hauteur du plant adulte a été estimée en mesurant le pétiole de la plus jeune feuille adulte totalement développée, fin juin. A ces données, la description de la collection de NIL a permis également de disposer de la date de floraison et du pourcentage de germination des akènes issus de ces génotypes.

Les résultats montrent que les deux plants se développent de manière similaire excepté une floraison plus précoce en première année pour Reine des Vallées. Il n'y a pas de différence significative entre les hauteurs des plants adultes des deux génotypes (Figure 33), à 4 mois ou 5 mois après semis.



B

Voie de biosynthèse	Type de GA	GA	ng de GA / g de matière sèche				
			Feuille adulte		Cœur		Stolon
			Sicile	Alpine	Sicile	Alpine	Sicile
GA1	Précurseur	GA53	0,10	0,10	2,00	3,30	0,50
GA1	Intermédiaire	GA44	0,20	0,30	0,40	0,70	0,20
GA1	Intermédiaire	GA19	12,90	18,00	35,70	53,50	78,70
GA1	Intermédiaire	GA20	1,50	3,50	0,50	0,60	0,60
GA1	GA active	GA1	1,30	6,40	0,50	1,10	0,60
GA1	GA inactive	GA29	23,10	41,30	3,40	3,20	17,80
GA1	GA inactive	GA8	42,60	80,00	40,10	23,70	120,80
GA4	Intermédiaire	GA9	0,10	0,20	0,30	0,20	0,20
GA4	GA active	GA4	0,00	1,30	0,60	0,80	1,50
GA4	GA inactive	GA51	0,10	0,20	0,00	0,00	0,30
GA4	GA inactive	GA34	0,70	1,50	0,10	0,20	1,90

Figure 34: Essais préliminaires du dosage de GA endogènes au niveau de trois organes végétatifs: feuille adulte, cœur et stolon, chez les génotypes Sicile (stolonnant / non-remontant) et Alpine (non-stolonnant / remontant).

(A) Représentation simplifiée de la fin de la voie de biosynthèse des GA: les précurseurs et intermédiaires de GA sont en bleu, les GA actives (GA₁ et GA₄) sont en vert et enfin les GA inactives sont en rouge, avec en encadré les enzymes responsables catalysant les réactions.

(B) Dosage préliminaire de la quantité de GA (en ng / g de matière sèche) dans chaque organe de chaque génotype. Ces résultats correspondent à un échantillon biologique avec un réplicat technique.

Ces observations suggèrent donc que l'implication du gène *FvGA20ox4* dans l'élongation des stolons (Article 1, Figure 33), aurait une action spécifique et n'altérerait pas l'allongement des pétioles. Une observation plus précise des différents organes sera réalisée pour confirmer ces résultats.

II.4 Essais préliminaires du dosage de GA endogènes dans plusieurs organes végétatifs

De part l'importance des gibbérellines dans le processus de stolonnage, il devenait particulièrement crucial de doser ces molécules endogènes. Ainsi, des analyses de dosage des GA ont été initiées en collaboration avec Maria Pimenta Lange et Theo Lange, de l'Institut für Pflanzenbiologie der Technischen Universität Braunschweig (Allemagne).

A ce jour, seuls des tests préliminaires ont été effectués sur des échantillons de plants cultivés en serre en conditions naturelles de deux génotypes aux phénotypes contrastés : 'Sicile' stolonnant et non-remontant et 'Alpine' non-stolonnant et remontant précédemment décrits dans l'Article 1. Les organes de six plants de chaque génotype ont été prélevés en mai 2014, en début d'après-midi. Les plants étaient alors âgés de 4 mois après semis ; ainsi seuls les individus remontants (non-stolonnants) produisaient des hampes florales, et les plants stolonnants (non-remontants) produisaient des stolons. Les prélèvements ont été effectués dans l'azote liquide puis les tissus ont été broyés au mortier. Les poudres ont par la suite été lyophilisées et 2 grammes de chaque échantillon ont été envoyés à nos collaborateurs. Par la suite, les dosages ont été effectués comme décrit dans Lange *et al.* (2005) par HPLC couplé à la GC-MS.

Les principales GA ont pu être dosées (Figure 34) au niveau des trois organes végétatifs étudiés, les feuilles adultes, les cœurs et les stolons chez les deux génotypes 'Sicile' et 'Alpine'. A ce jour, le dosage de GA n'a pu être effectué que sur un échantillon biologique, avec un seul réplicat technique. De ce fait, une réelle comparaison entre génotypes n'est pas possible.

Toutefois, ces résultats peuvent apporter des premières pistes. La voie de biosynthèse du GA₁ semble privilégiée, comme cela a déjà été montré chez le fraisier (Taylor *et al.*, 1994). De plus, les trois molécules de GA les plus abondantes dans tous les échantillons sont : l'intermédiaire GA₁₉ et les deux catabolites GA₂₉ et GA₈ (Figure 34).

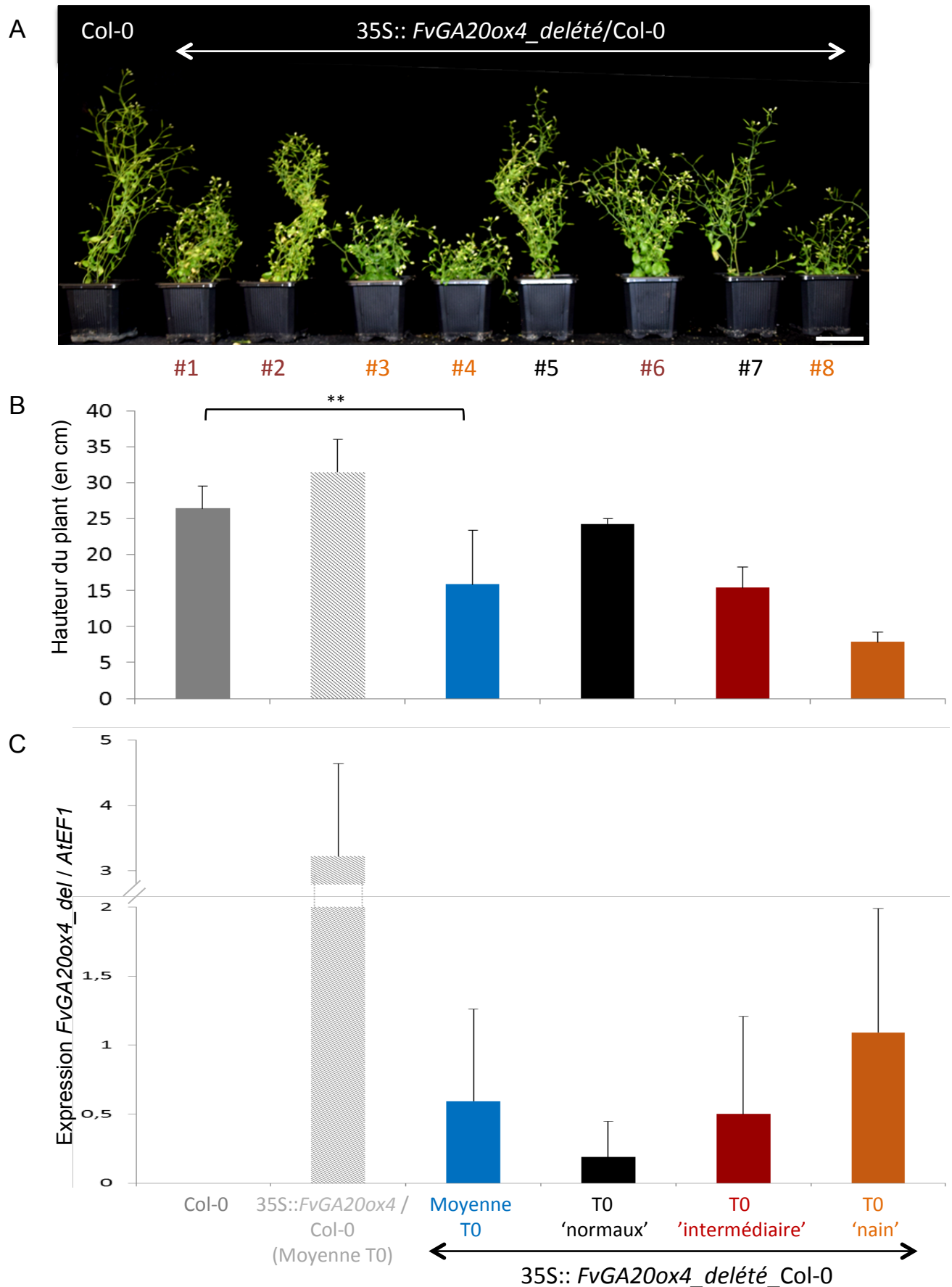


Figure 35: Surexpression du gène *FvGA20ox4* délété chez *A. thaliana* sauvage (Col-0). (A) Photo d'un plant sauvage et des 8 plants 'T0' Col-0 transformés: attribution de classes de phénotype en fonction de la hauteur du plant adulte, en noir les plants 'normaux', en rouge les plants 'intermédiaires' et en orange les plants 'nains'. Barre= 5 cm.

(B) Comparaison de la taille moyenne de chaque classes phénotypiques de transformants T0 avec les plants témoins (Col-0) ($n= 6$) et la moyenne des plants T0 transformés avec le gène *FvGA20ox4* entier ($n= 10$). Barre d'erreur = écart-type, ** P -value <0,01.

(C) Comparaison de l'expression du gène *FvGA20ox4* de chacun, normalisé via le gène *AtEF1*. Barre d'erreur = écart-type.

Si on s'intéresse plus particulièrement aux GA actives (GA₁ et GA₄) les quantités dosées paraissent faibles par rapport à celles des trois molécules majeures citées précédemment (Figure 34) et ce, dans tous les échantillons testés.

De plus, la caractérisation du gène de stolonage laissait sous-entendre l'importance des GA actives dans l'allongement du stolon. Néanmoins, le prélèvement de stolon ici testé contient très peu de molécules actives.

Aux vues des résultats obtenus quant à l'identification et à la caractérisation du gène de stolonage, on aurait pu s'attendre à une nette différence de la concentration en GA actives entre les deux génotypes. En effet, de part la non-fonctionnalité de la protéine de biosynthèse des GA, FvGA20ox4 chez les génotypes non-stolonants, une accumulation de GA actives chez Sicile, notamment au niveau des cœurs et des stolons, aurait été attendue. Ces résultats seront confirmés par l'analyse de nouveaux échantillons qui incluront les réplicats biologiques.

II.5 La surexpression du gène *FvGA20ox4*_délété provoque un phénotype nain chez *Arabidopsis thaliana* sauvage

La surexpression du gène délété a été réalisée chez l'espèce modèle *A. thaliana* sur le sauvage (Col-0), un simple mutant *ga20ox1* et un double mutant *ga20ox1/ga20ox3*. Ces constructions étaient similaires à celles présentées dans l'article.

Cinq plants par génotype ont été transformés et toutes les graines 'T0' ont été semées afin d'obtenir un nombre élevé de transformants. Malgré toutes ces précautions, seulement huit plants transformés ont été obtenus, et uniquement chez le génotype sauvage (Figure 35). L'expression du transgène a été analysée par qRT-PCR.

Ces plants transformés avec la version mutante du gène *FvGA20ox4* présentent une gamme de phénotype (Figure 35) pouvant être classés en trois catégories:

- i) des transformants appelés 'T0 normaux' avec une hauteur moyenne de 23 cm,
- ii) des transformants appelés 'T0 intermédiaires' présentant en moyenne 14 cm,
- iii) et des transformants appelés 'T0 nains' avec une hauteur moyenne de 6 cm.

En comparant ces différentes classes de taille de plants avec l'expression du transgène *FvGA20ox4*_délété, on observe une corrélation négative : moins le transgène est exprimé et plus la hauteur du plant est grande et se rapproche de celle des plants témoins ; à l'inverse, plus le gène est exprimé et plus le phénotype de nanisme est marqué (Figure 35).

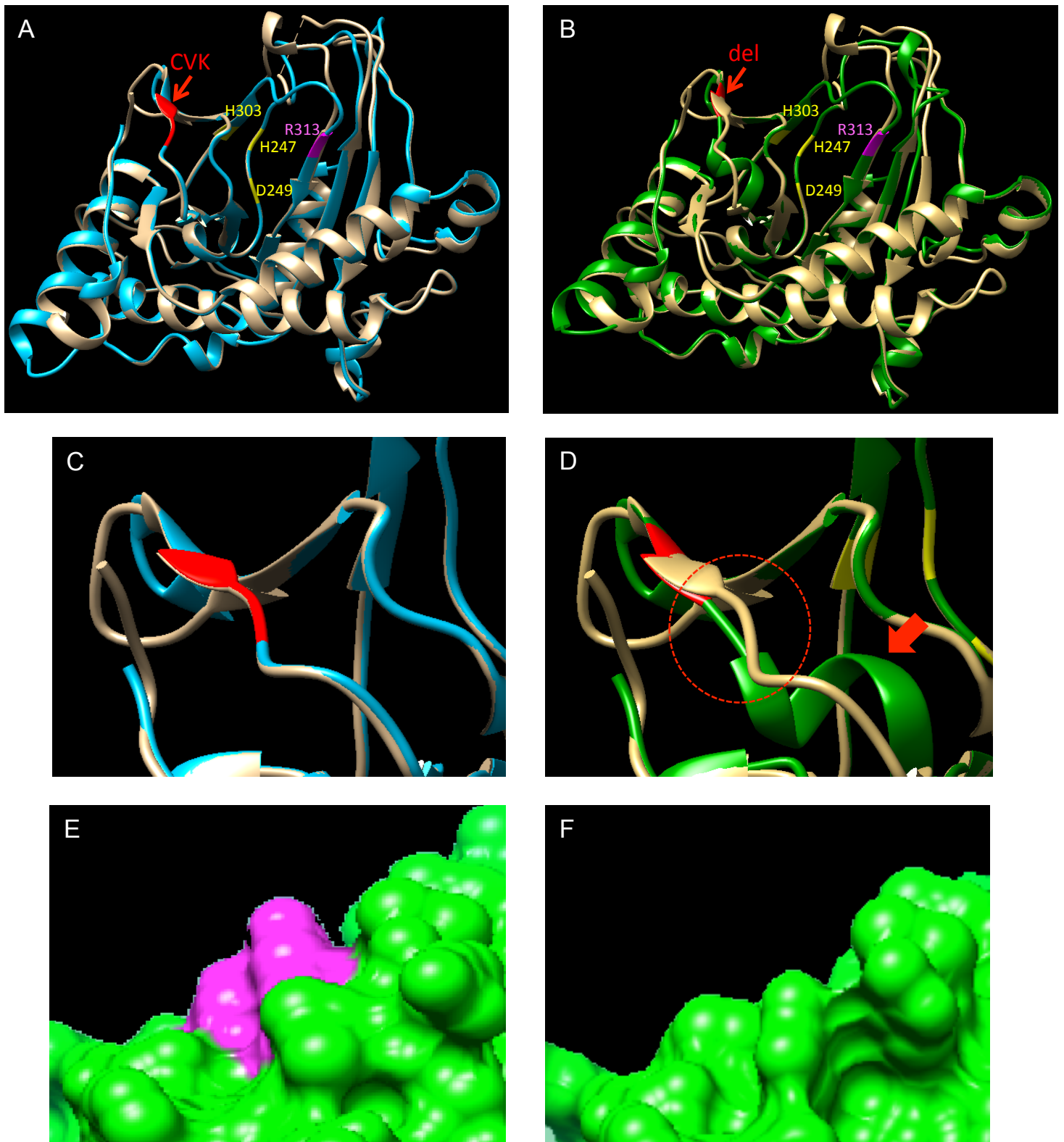


Figure 36: Modèles de la protéine FvGA20ox4, bleue (A, C, E et G) et FvGA20ox4_délétée, vert (B, D, F et H) établis à partir de la structure d'une oxygénase bactérienne, beige.

(A et B) Visualisation globale des deux protéines avec en rouge les 3 acides aminés délétés (C268-V269-K270) chez les génotypes non-stolonnants; en jaune, les 3 acides aminés impliqués dans la liaison au métaux (H247, D249 et H303) et en rose, l'Arginine correspondant au site actif (R313), prédits chez AtGA20ox1.

(C et D) Zoom sur la modification liée à la perte des 3 acides aminés.

(E et F) Modification de la surface liée à la délétion.

Entre les plants classés ‘nains’ et les plants classés ‘normaux’, la taille est multipliée par presque 4 alors que l’expression du transgène est divisée par 4,5.

Ces résultats préliminaires sont en faveur de l’hypothèse d’un processus de ‘dominant négatif’ via la surexpression du gène délété et donc de la surproduction d’une protéine non-fonctionnelle. Néanmoins, ces essais devront d’une part être confirmés en renouvelant l’expérimentation, et d’autre part en étudiant la génération T1 de façon à confirmer ces observations.

II.6 Comparaison des modèles structuraux des protéines FvGA20ox4 et FvGA20ox4_délétée

Précédemment, nous avons pu prouver que la délétion de trois acides aminés entraîne la perte totale d’activité enzymatique chez la protéine FvGA20ox4 délétée. Cette protéine est responsable du phénotype de non-stolonnage via la perte de la Cystéine (C) en position 268, la Valine (V) en position 269 et la Lysine (K) en position 270.

Afin de mieux comprendre en quoi cette délétion entraîne la perte totale d’activité enzymatique de la protéine FvGA20ox4_délétée, une analyse de prédiction de structure a été effectuée avec l’aide de Thierry Michon (Equipe Virologie de l’UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie).

Lors de cette analyse, la première étape a été de modéliser les deux séquences protéiques sur une structure protéique déjà cristallographiée. Les deux protéines FvGA20ox4 et FvGA20ox4 délétée ont été modélisées à l’aide du serveur Phyre2 (The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, Kelley *et al.*, 2015). Ces deux protéines possèdent 29% d’identité avec une ‘leucocyanidine oxygénase’ (identifiant Protein Data Bank : 3OOX) bactérienne. Les modèles couvrent 86% de la séquence avec une fiabilité de presque 100%. La qualité des modèles a été évaluée à l’aide du pack ProQ2 (Ray *et al.*, 2012) disponible sur le serveur Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). La superposition des modèles avec l’enzyme bactérienne traduit une qualité de modélisation satisfaisante.

Au niveau du site catalytique contenant les acides aminés prédits comme intervenant dans l’activité enzymatique chez *A. thaliana* (Figure 36), les modèles se superposent correctement avec l’enzyme de structure connue. On constate que le modèle de FvGA20ox4 et l’oxydase bactérienne se superposent parfaitement dans la région de la protéine non délétée (Figure 36). Dans la protéine FvGA20ox4 délétée (C268-V269-K270), la délétion entraîne une modification de structure secondaire.

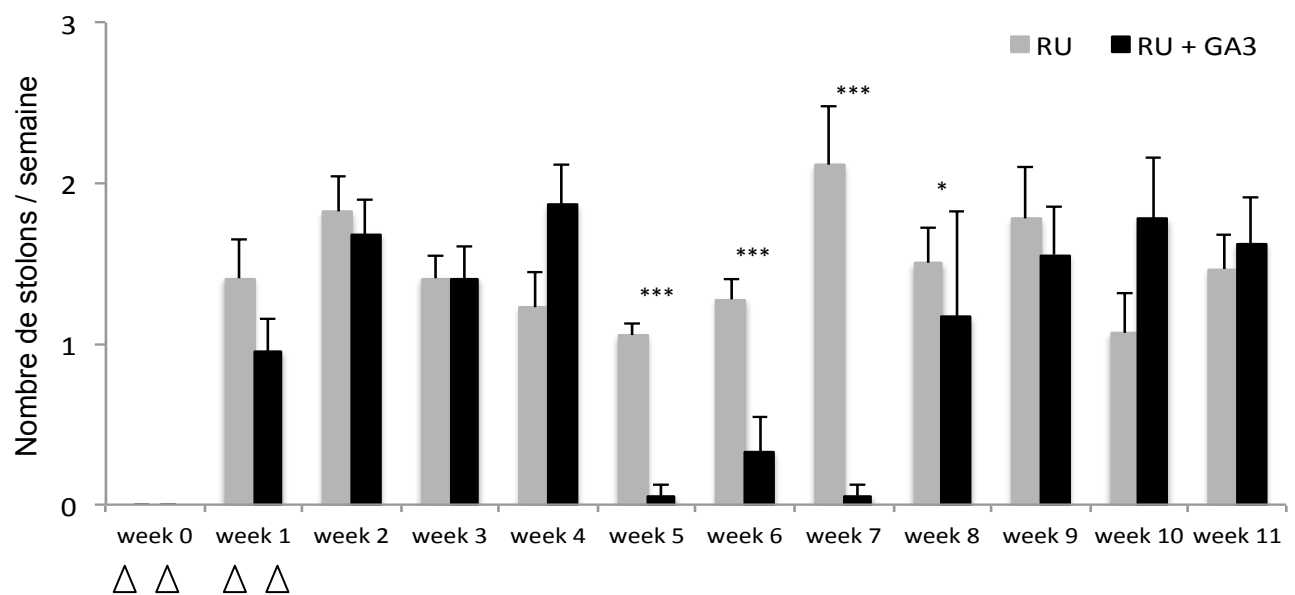


Figure 37: Effet de l'application de GA_3 sur le nombre de stolons produits par semaine chez le génotype stolonnant (RU), $n = 13$ individus par condition. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les triangles correspondent à l'application des traitements. * P -value $<0,05$, ** P -value $<0,01$ et *** P -value $<0,001$.

Le segment C268-L276 initialement en coude β , subit un remaniement structural. Le nouveau segment C268-V277 adopte une structure en hélice α (Figure 36). De plus, à la surface de la protéine, la délétion semble entraîner la disparition d'un renflement initialement présent (Figure 36).

La délétion de trois acides aminés entraîne donc une modification de la structure secondaire de la protéine, ainsi qu'une modification de sa surface. Cette analyse permet d'émettre plusieurs hypothèses pouvant expliquer la perte totale d'activité enzymatique qui seront discutées par la suite.

II.7 L'application de traitements (GA₃ et ProCa) modifient le nombre de hampes et de stolons, chez les géotypes NRU et RU respectivement

Afin d'étudier l'effet exogène des GA sur le stolonnage, nous avons rapporté dans l'article, l'étude de l'apport exogène de GA actives (GA₃) sur un géotype non-stolonnant et celle d'inhibiteur de GA (ProCa pour Prohexadione de Calcium qui est un inhibiteur de la GA3ox, Rademacher, 2000) sur un géotype stolonnant.

Ces tests avaient également été réalisés sur des individus stolonnant pour la pulvérisation de GA₃ et non-stolonnant pour celle du ProCa. Pour ces essais, nous avons coupés les hampes et les stolons au début de l'expérience.

II.7.1 La pulvérisation de GA₃ provoque la diminution du nombre de stolons chez les individus stolonnants (RU)

Comme vu précédemment, l'apport d'inhibiteur de GA (ProCa) entraîne la diminution drastique jusqu'à l'arrêt totale de la production de stolons chez le géotype stolonnant (RU) (Article 1, Figure 8). Quand on traite ce même géotype avec des GA actives, des résultats similaires sont observés mais de manière plus tardive. En effet, l'apport de GA₃ entraîne une nette diminution du nombre de stolons pendant les semaines 5 à 8 avec moins de 0,5 stolons produits par les plants traités contre 1 en moyenne chez les plants contrôles durant cette période (Figure 37).

Ainsi, de façon surprenante, l'application de GA actives provoque la production de stolons chez le géotype non-stolonnant alors qu'il entraîne l'arrêt du stolonnage chez les individus stolonnants.

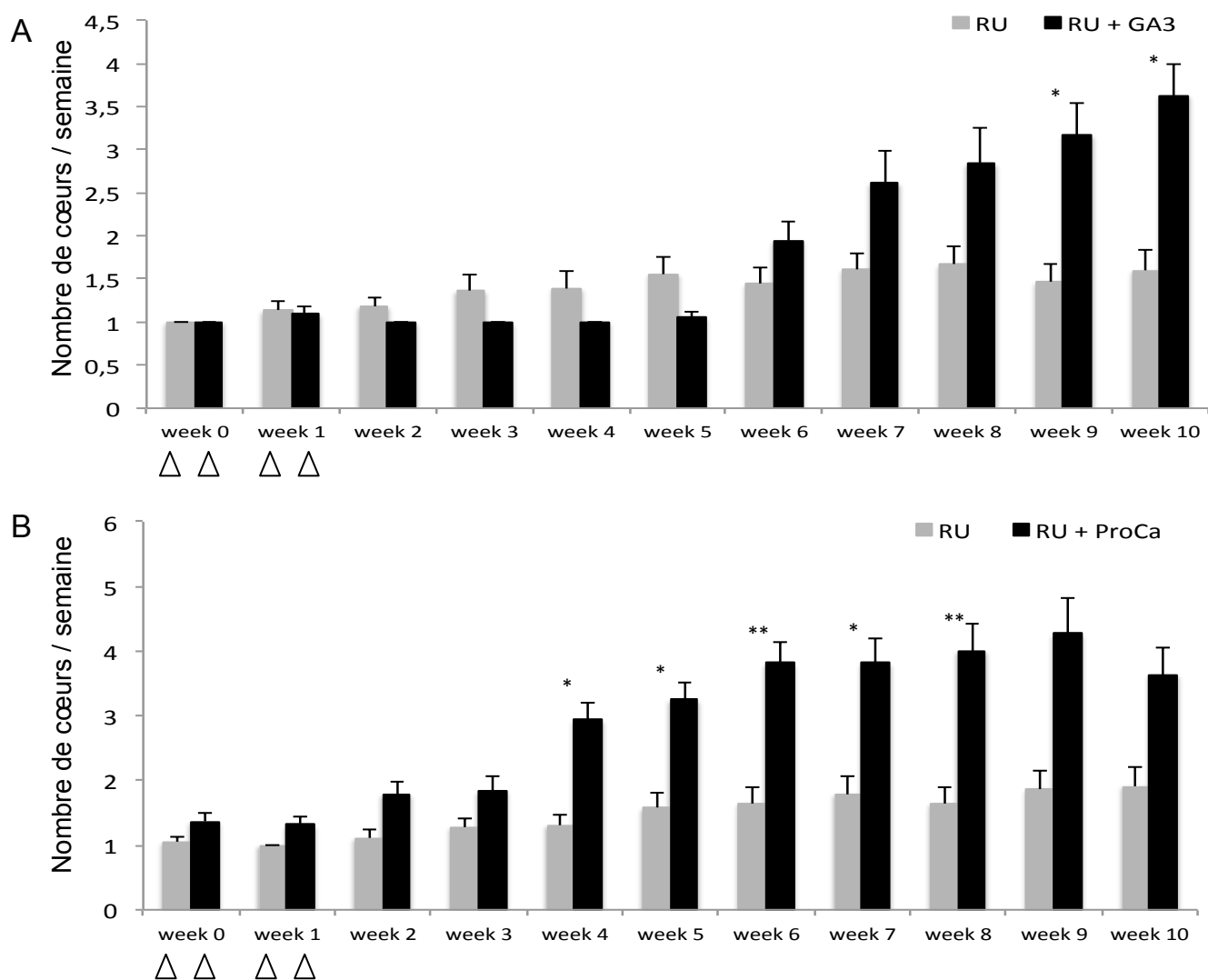


Figure 38: Effet des traitements GA_3 (A) et ProCa (B) sur le nombre de cœurs produits par semaine chez le génotype stolonnant (RU). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les triangles correspondent à l'application des traitements. * P -value $<0,05$, ** P -value $<0,01$ et *** P -value $<0,001$.

II.7.2 Une modification de la teneur en GA entraîne une augmentation de la production de cœurs uniquement chez le génotype stolonnant (RU)

Chez le génotype non stolonnant, les traitements n'ont pas modifié la production de cœurs.

Chez le génotype stolonnant (RU), l'apport exogène de GA actives entraîne une diminution du nombre de stolons accompagnée d'une augmentation du nombre de cœurs. En effet, le nombre de cœurs est significativement plus élevé chez les plants traités aux GA actives avec en moyenne trois cœurs produits par semaine, contre moins de 1,5 pour les plants contrôles (Figure 38).

De façon surprenante, des résultats similaires sont observés avec le traitement d'inhibiteur de GA (ProCa). Ce traitement, en plus de réduire drastiquement la production de stolons, active la formation de cœurs dès la quatrième semaine d'observation et l'effet perdure pendant cinq semaines. Ainsi, les plants traités produisent en moyenne deux fois plus de cœurs que les plants témoins (Figure 38).

Les traitements en GA actives et en inhibiteur de GA entraînent tout deux une augmentation du nombre de cœurs chez le génotype stolonnant.

II.7.3 L'apport exogène de GA actives entraînent une diminution du nombre de hampes florales chez les génotypes non-stolonnants / remontants

Cette expérimentation a été menée sur des plants en première année de développement, de ce fait, seuls les individus remontants (et dans ce cas non stolonnants, NRU) étaient capable de fleurir sans l'induction automnale de l'année précédente.

L'application de GA actives n'affecte pas significativement le nombre de hampes florales durant les 5 premières semaines de notations alors que ces plants traités produisent des stolons (Article 1, Figure 8), mais provoque une nette diminution à partir de la sixième semaine (Figure 39). Ainsi, durant les six dernières semaines d'observations, le nombre moyen de hampes florales produites par semaine avoisinent les 4 pour les plants contrôles, alors qu'il est réduit à environ 1,5 en moyenne pour les plants traités (Figure 39). Cette réduction du nombre de hampes persiste jusqu'à la fin des observations (semaine 11) où la floraison semble se rapprocher de celle des plants témoins.

L'apport exogène d'inhibiteur de GA quant à lui, n'affecte pas significativement le nombre de hampes de ces individus non-stolonnants par rapport aux remontants (Figure 39).

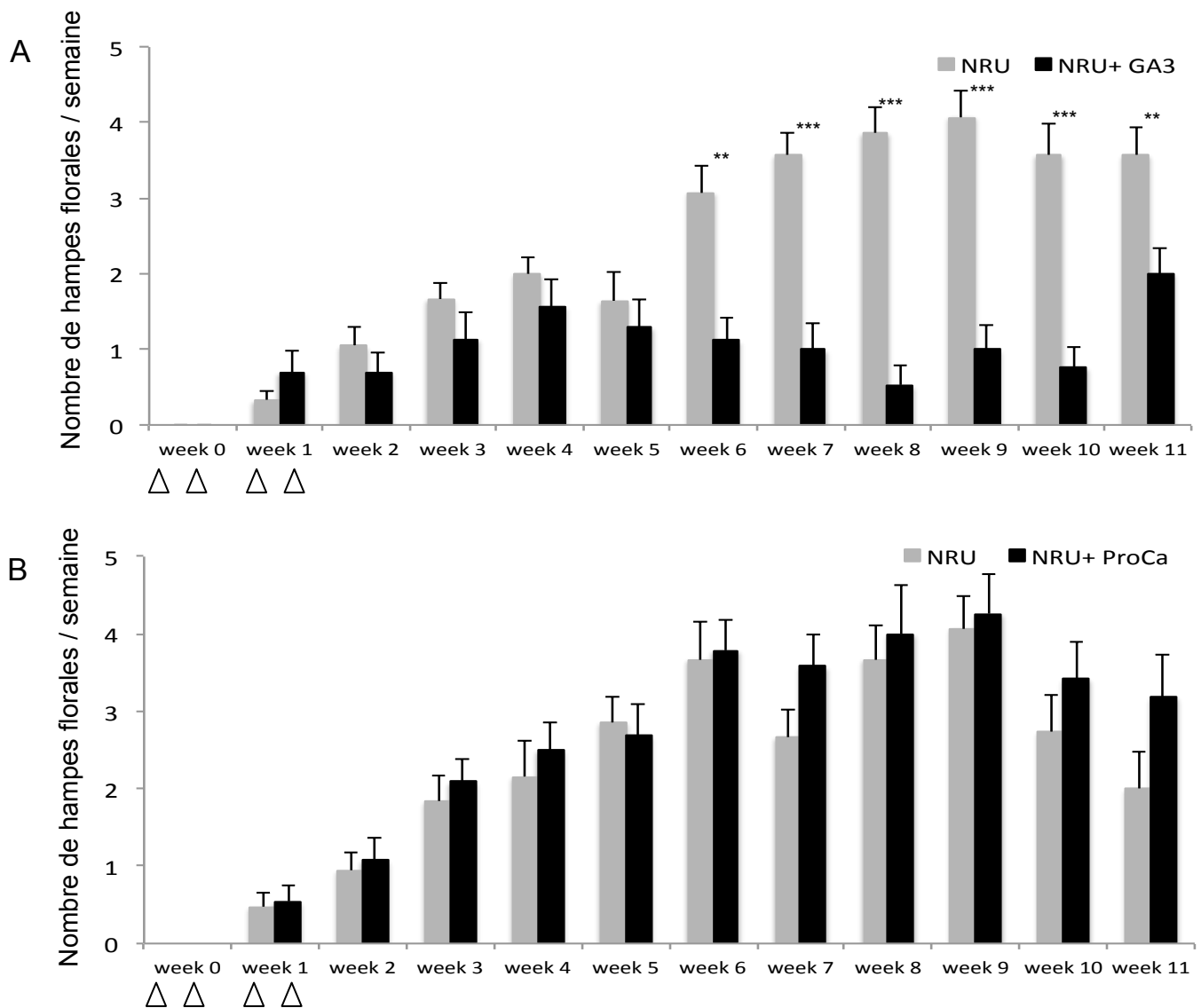


Figure 39: Effet des traitements GA₃ (A) et ProCa (B) sur le nombre de hampes florales produites par semaine chez le génotype non stolonnant (NRU) / remontant. $n = 16$ individus par condition. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les triangles correspondent à l'application des traitements. * P -value $< 0,05$, ** P -value $< 0,01$ et *** P -value $< 0,001$.

Ainsi, l'apport de GA actives chez le géotype non-stolonnant entraîne la production de stolons et une réduction significative du nombre de hampes émergentes. Le décalage observé entre la production de stolons et la diminution du nombre de hampes pourrait être dû au temps plus long nécessaire à la formation d'une hampe comparée à celle d'un stolon (Costes *et al.*, 2014).

III. Discussion

III.1 La perte de trois acides aminés entraîne une perte totale d'activité enzymatique

L'étude de la prédiction structurale de la protéine FvGA20ox4 a permis de mettre en évidence des modifications de la structure via la délétion de trois acides aminés ('CVK') chez les génotypes non-stolonnants (Figure 36). La modification de la structure secondaire et de la surface de cette enzyme ne semble pas modifier l'intégrité de la poche catalytique contenant les acides aminés impliqués dans la liaison aux métaux et le site actif. Néanmoins, cette délétion pourrait entraîner des modifications à plusieurs niveaux : i) le site de liaison du substrat ; ii) l'accessibilité de la poche catalytique ; iii) le site de liaison potentiel avec d'autres protéines.

Toutefois, le test d'activité enzymatique de la protéine FvGA20ox4 délétée a permis de mettre en évidence une perte totale d'activité GA 20-oxidase (Article1, Figure 6). Cette expérimentation a été menée dans un système hétérologue en intégrant uniquement le substrat radioactif. La protéine entière FvGA20ox4 a été capable de convertir tout le substrat en produit. De ce fait, il semblerait que l'enzyme fonctionnelle soit capable d'avoir une activité enzymatique en agissant seule, sans l'aide d'autres protéines.

Enfin, la surexpression du gène *FvGA20ox4* délété dans un génotype sauvage d'*Arabidopsis thaliana* entraîne un phénotype nain, corrélé à l'expression du transgène (Figure 35). Ce résultat suppose un processus de 'dominant négatif' dû à la surproduction d'une protéine non-fonctionnelle. Ces résultats devront être confirmés d'une part en réitérant l'expérimentation et d'autre part en étudiant la génération T1.

Si cette hypothèse s'avère exacte, le phénotype nain observé pourrait être la conséquence d'une compétition entre la protéine FvGA20ox4 non-fonctionnelle et les protéines AtGA20ox endogènes pour la liaison au substrat. Ainsi, la taille réduite des transformants serait due à une diminution de la concentration des GA actives. Cette hypothèse corrobore avec le phénotype nain observé chez les mutants perte-de-fonction des gènes de biosynthèse des GA chez *A. thaliana* (Plackett *et al.*, 2012) mais aussi plus récemment chez un mutant naturel 'Alpine' d'*A. thaliana* qui présente un phénotype nain due à la délétion d'un nucléotide au niveau du gène *AtGA20ox1* (Luo *et al.*, 2015).

En résumé, les résultats de ces différentes expérimentations montrent que l'enzyme fonctionnelle est capable d'avoir à elle seule une activité enzymatique, en l'absence d'autres protéines partenaires en système hétérologue et ils suggèrent que la protéine non-fonctionnelle serait capable de lier le substrat.

La délétion des trois acides aminés pourrait donc modifier l'accessibilité de la poche catalytique. Des analyses bio-informatiques plus précises devront être menées pour valider cette hypothèse, en étudiant l'environnement électrostatique de la protéine par exemple. De plus, il serait intéressant de doser l'activité enzymatique de la protéine FvGA20ox4 en délétant un à un les trois acides aminés : Cystéine 268, Valine 269 et Lysine 270. Cette expérimentation permettrait de savoir si l'un de ces acides aminés est essentiel ou s'il s'agit de la délétion des trois qui entraîne la perte de fonction.

III.2 Le gène *FvGA20ox4* aurait-il un rôle spécifique au niveau des méristèmes de stolons ?

Bien que le gène de stolonnage ait été identifié, son mécanisme d'action et les résultats suggèrent une action spécifique de ce gène.

Les essais de dissection présentés dans l'Article 1 (Figure 7) ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle ce gène serait impliqué dans l'élongation du stolon et non dans son initiation. En effet, chez les génotypes non-stolonnants, il semblerait que les méristèmes axillaires commencent leur élongation à l'instar des stolons visibles chez les génotypes stolonnants. Néanmoins, à un stade plus avancé, ces méristèmes axillaires stoppent leur élongation et nécrosent. Ainsi, le gène *FvGA20ox4* permettrait l'allongement de ces méristèmes en stolons, et sa non-fonctionnalité entraînerait leur nécrose et donc le phénotype non-stolonnant.

Ce rôle dans l'allongement n'a pas été observé sur la taille du plant mesurée à travers celle d'un pétiole. Une analyse plus fine de la taille des différents organes permettra de conclure quant au développement similaire supposé des deux génotypes.

De plus, l'expression du gène *FvGA20ox4* a aussi été étudiée afin de corroborer son rôle avec le stolonnage. L'expérimentation d'hybridation *in situ* a permis de mettre en évidence une accumulation de ses transcrits dans les méristèmes axillaires des deux génotypes. Ce résultat corrèle avec l'émergence des stolons à partir des méristèmes axillaires, observée aussi bien dans l'essai de dissection (Article 1, Figure 7) que dans l'étude de l'architecture des stades précoces de développement (Figure 32). Afin de prouver le rôle spécifique du gène *FvGA20ox4* au niveau de ces méristèmes, il serait intéressant de réitérer cette étude sur les méristèmes inflorescentiels où son expression devrait être absente ou restreinte.

De façon surprenante, l'expression de ce gène a été retrouvée dans tous les organes végétatifs testés par qRT-PCR (feuille adulte, cœur et stolon, Article 1, Supp. Data Figure 2). Néanmoins, des expérimentations de greffages ont permis de mettre en évidence le mouvement de GA actives et de précurseurs de GA à travers la plante chez *A. thaliana* comme chez d'autres espèces (Katsumi *et al.*, 1983 ; Ragni *et al.*, 2011 ; Regnault *et al.*, 2015).

Ces résultats semblent cohérents avec ceux obtenus via le dosage des GA endogènes. En effet, les essais préliminaires tendent vers une répartition similaire d'intermédiaires de GA et de GA inactives entre les deux génotypes et les deux organes testés (feuille adulte et cœur). Il faut souligner que l'étude de l'expression tout comme le dosage des GA endogènes ont été réalisés sur les cœurs qui regroupent de multiples tissus. Les molécules de GA retrouvées au niveau du stolon pourraient quant à elles être impliquées dans l'élongation du stolon via le gène *FvGA20ox4*.

III.3 L'excès ou la limitation en GA actives entraîne l'arrêt du stolonnage chez le génotype stolonnant et la production de cœurs

Afin de mieux comprendre le rôle des GA sur la production de stolons, des apports de Prohaxadione de Calcium (ProCa) et de GA actives ont été effectués sur un génotype stolonnant.

L'application de ProCa a, comme attendu, entraîné une diminution drastique de la production de stolons (Article 1, Figure 8) ainsi qu'une augmentation de la production de cœurs (Figure 38). Ces résultats corroborent avec ceux déjà publiés (Guttridge et Thompson, 1965 ; Hytönen *et al.*, 2009).

L'application de GA actives sur le génotype stolonnant entraîne là encore une diminution des stolons. Ce résultat pourrait être la conséquence d'une boucle de rétrocontrôle afin de réguler la concentration en GA, comme déjà décrit chez *A. thaliana* (Zentella *et al.*, 2007).

Cette hypothèse pourrait être confirmée en montrant une diminution des GA endogènes par dosage et/ou en étudiant l'expression des gènes de biosynthèse et de désactivation des GA.

III.4 Les GA actives causent la production de stolons et une diminution de la production de hampes florales chez le génotype non-stolonnant

Afin de palier la non-fonctionnalité du gène *FvGA20ox4* chez le génotype non-stolonnant, un apport exogène de GA actives a été effectué. Ce traitement entraîne la production de stolons et permet donc de restaurer un phénotype stolonnant via un excès de GA actives (Article 1, Figure 8). Ce résultat confirme la nécessité de GA pour le stolonnage.

Néanmoins, cet apport a aussi pour conséquence une diminution du nombre de hampes florales (Figure 39). Chez les plantes annuelles, les GA favorisent la floraison comme chez *Lolium tumulentum* (King *et al.*, 2001) ou encore la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Eriksson *et al.*, 2006). A l'inverse, chez les espèces pérennes, les GA inhiberaient la floraison comme par exemple chez l'avocatier (Salazar-Garcia et Lovatt, 1998), le néflier (Reig *et al.*, 2011), ou encore chez le rosier (Roberts *et al.*, 1999). Il en est de même chez le fraisier cultivé (Hytönen *et al.*, 2009). Ainsi, ces résultats corrélerent avec la littérature et pourraient tendre vers un modèle de balance entre la reproduction sexuée (via la floraison) et la multiplication végétative (par la production de stolons).

- Partie 2 -

**Vers une meilleure compréhension de la
balance entre reproduction sexuée
et multiplication végétative
chez le fraisier diploïde**

La majorité des plantes Angiospermes seraient capables de se reproduire via la reproduction sexuée et la multiplication végétative (Klimes *et al.*, 1997).

Les fraisiers diploïdes et octoploïdes sont capables de floraison et de stolonnage. Quand ces génotypes sont remontants, l'émergence de hampes florales et la production de stolons se produisent en parallèle, durant la période végétative. Chez le fraisier diploïde, la production de stolons serait amoindrie chez les génotypes remontants par rapport aux non-remontants (Battey *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent la mise en place d'une balance entre ces deux modes de reproductions, et le fraisier diploïde apparaît comme un bon modèle d'étude pour étudier ce processus.

Chez le fraisier diploïde, *Fragaria vesca*, les caractères de remontée florale et de stolonnage sont contrôlés par deux gènes différents. La remontée florale est un caractère récessif et le gène responsable a été identifié comme un homologue du répresseur floral *TFL1*, situé sur le chromosome 6. Ainsi, la floraison continue est due à l'absence de ce répresseur floral fonctionnel (Iwata *et al.*, 2012). Le stolonnage est un caractère dominant et le gène responsable a été identifié et caractérisé comme le gène *FvGA20ox4*, situé sur le chromosome 2 et impliqué dans la biosynthèse des gibbérellines (GA) (Tenreira *et al.*, en préparation).

Ainsi, la seconde partie de mon travail a été consacrée à une meilleure compréhension de la balance entre ces deux modes de reproductions. Pour ce faire, une étude physiologique et des analyses QTL ont été menées. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article intitulé « Genetic dissection underlying the relationship between sexual and vegetative reproduction » présenté ci-après.

Genetic dissection underlying the relationship between sexual and vegetative reproduction highlighted epistatic interaction between *TFL1* and *GA20ox*

INTRODUCTION

Most plant species can reproduce both sexually and vegetatively and the balance between these two modes of reproduction may vary widely between and within species (Zhang and Zhang, 2007). Regarding sexual reproduction, seeds can easily survive in unfavorable conditions owing to dormancy, and through long-distance dispersal can easily colonize new habitats (Zhang and Zhang, 2007). Clonal plants exhibit a lower mortality rate because of the supply of the mother plant but can only disperse in a much shorter distance. These two modes of reproduction were studied in natural conditions and their importance can vary among habitats (e.g. Turkington, 1985; Sutherland and Vickery, 1988; Stöcklin, 1992, 1999; Eckert and Barrett, 1993; Krahulec, 1994 (cited by Winkler and Stöcklin, 2002)). The relationships between these two modes are complex due to the trade-offs in partitioning resources between vegetative reproduction (clonal expansion) and sexual reproduction (Abrahamson, 1980; Bishop and Davy, 1985; Hartnett 1987; Holler and Abrahamson, 1977; Pitelka *et al.*, 1980 (cited by Hartnett, 1990)). Variation in the balance between vegetative and sexual reproduction is influenced by numerous effect such as size-population-dependent effects (Hartnett, 1990) or also by environment, (Abrahamson, 1975; Smith, 1973; Williams, 1975 (cited by Hartnett, 1990)). However, the genetic architecture of this balance as the genetic relationship between these two processes remain unknown.

Knowledge on the genetic control of sexual flowering is huge because of the plant model *Arabidopsis thaliana* for which numerous genes have been identified (review in Parcy, 2005). Indeed, major endogenous and environmental cues were known and many key genes involved were now characterized as *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) protein who being part of the florigenic signal (Corbesier *et al.*, 2007). Understanding the flowering pathway in *A. thaliana* allowed identifying genes with similar functions in other angiosperm species with a major difference concerning the floral repressor which is *FLC* in *A. thaliana* as in other *Brassicaceae* and *TFL1* for other plants (review in Blümel *et al.*, 2015).

Knowledge on genetic control of vegetative reproduction is scarce except for the model of potato or recently onion, which are able to propagate vegetatively with tubers and bulbs respectively. These two species present *FT* homologs, one of which is the florigen and others involved in vegetative reproduction (Navarro *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013). In addition, *StTFL1* also regulate tuberization of potato and its overexpression causes normal tubers formation under long days (non inductible condition for tuberization) (Guo *et al.*, 2010).

The woody strawberry stands as an interesting model as perennial plant for studying the genetic relationship between vegetative and sexual reproduction. This species displays contrasted genotypes for their variation of flowering length because of difference in the period of floral initiation. In once flowering (OF) genotypes, low temperature and short days in autumn trigger floral initiation (Verheul *et al.*, 2007) whereas perpetual flowering (PF) genotypes are day-neutral (Battey, 1998). Whatever OF or PF genotypes, after entering dormancy and receiving chilling requirement, the autumn-initiated inflorescences emerge in spring, followed by fruiting without new flowering in OF genotypes, whereas new inflorescences are initiated continuously during all the growing season from spring until late autumn in the PF genotypes (Costes *et al.*, 2014). Beside the sexual reproduction, vegetative reproduction occurs in long days through stolons. Stolons elongate and produce new ramets at nodes (the so-called runnering process) (Savini *et al.*, 2008). As for sexual reproduction, extreme variation exists for this process, and genotypes producing stolons or not can be found (Darrow, 1966).

Thanks to recent advances in strawberry genetics and the sequencing of the diploid genome (Shulaev *et al.*, 2011), genetic factors underlying variations in the variation of flowering length and the emergence of stolons begin to be deciphered. The PF trait is due to a mutation in a homologous to *TFL1* floral repressor (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012). The runnering trait, is controlled by a dominant gene, called *R* gene (Brown and Wareign, 1965) and this gene was identified as a Gibberellin oxidase gene, *GA20ox* (Tenreira *et al.* in process). These two genes are located on two different chromosomes, LG6 and LG2 respectively for *TFL1* and *GA20ox* genes.

In this study, the genetic architecture of the balance between two reproductive modes, sexual and vegetative, was deciphered based on QTL approach. Thanks to a segregating population for flowering duration and runnering, we studied the genetic control of numbers of inflorescences, stolons and crowns emerged along two annual cycles. These numbers represented the ability to switch into sexual or vegetative reproduction respectively. Results shown that, beside the known roles of *TFL1* and *GA20ox* genes in promoting perpetual flowering and runnering processes respectively, two loci on LG4 and LG3 were linked to the quantitative responses of these processes. In addition, *TFL1* and *GA20ox* genes showed epistatic interaction, and the process of flowering was maintained as priority over runnering, which decreased. These results provided new insight in the genetic control of the relationship between sexual and vegetative reproduction.

MATERIEL & METHODS

Plant material and growing conditions

The strawberry segregating population consists of an intercross family of 154 F₂ individuals derived from a cross between two contrasted genotypes: ‘Alpine’ a perpetual flowering (PF) and non-runnering (NRU), and ‘Sicile’ once flowering (OF) and runnering (RU) (Figure 1). This F₂ population showed a large variation of number of inflorescences and stolons emerged along the vegetative development (Table 1, Figure 2). All individuals were sown at the end of October 2012 at 16h/8h day/night at 22°C/18°C and were transferred in glasshouse, under natural conditions since February 2013. The first year, only PF plants were able to flowering without an autumn floral induction.

Phenotypic data

Inflorescences, stolons and crowns were weekly counted during two annual cycles (2013 and 2014), from January to October. These two years of scoring were separated by dormancy. To get easier counting, stolons were weekly cut after counting and inflorescences were tagged. Based on the hypothesis that inflorescences were the results of the activity of the shoot apical meristem (SAM) and axillary meristems when the SAM started to develop in inflorescences (Costes *et al.*, 2014) and that the stolons resulted from axillary meristems, we estimated the number of actives meristems by summing the number of inflorescences and stolons produced for each year.

DNA extraction and genotyping by Kompetitive Allelic Specific PCR (KASP®)

DNA of the 154 individuals of the Ilaria_F₂ population were extracted using DNeasy™ Plant Mini kit (Qiagen, Inc., Germany) by following the manufacturer recommendations. To develop a linkage map, we identified five Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) per linkage groups. These identifications were based on Next Generation Sequencing data available for the parent Sicile and two bulks of individuals (Tenreira *et al.* in process) and in Genome DataBase of Rosaceae (GDR, <https://www.rosaceae.org>). PCR and genotyping using KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) method were performed as previously described in (Smith and Maughan, 2014, Tenreira *et al.*, in progress).

Statistical analysis

An exploratory analysis was performed on data for describing the pattern of flowering and running of the segregating population. Relationship between traits was studied using the Spearman's rank correlations along with the pairwise p-values among the correlations. The *p*-values were corrected for multiple inferences using Holm's method. Statistical analyses were performed with R software version 2.13.1. (<http://www.r-project.org/>).

Genetic maps and QTL detection

Chi-squared tests of goodness-of-fit to an expected segregation ratio of 1:2:1 or 3:1 were carried out for all markers segregating in the F₂ population. Linkage analysis was performed on the total markers using Mapmaker 3.0 (Lander *et al.*, 1987) with the Kosambi function (Kosambi *et al.*, 1944). Possible genotyping errors were checked before map construction using the “error detection on” command. Then, the best order of markers in each linkage group was established using the “order” and “try” commands and was validated with the “ripple” command. Marker placement was determined using a minimum LOD score threshold of 5.0 and a recombination fraction threshold of 0.35. In few cases, the gene order was not the same than expected thanks to the diploid genome sequencing (Shulaeva *et al.*, 2011). Since rearrangements were identified on this version (Tennessen *et al.*, 2014), we left the order gave by MapMaker with *Fragaria vesca* v2.0a1 genome version.

QTL detection was performed by composite interval mapping (CIM) (Zeng, 1994) with QTL Cartographer software (Basten *et al.*, 2001), using SF₂ design for F₂ progenies data. For each trait, a permutation test was performed to estimate the appropriate significant threshold (LOD_{threshold}) using stringent experiment wise error $\alpha = 0.05$. A forward-backward stepwise regression was performed to select cofactors before performing QTL detection by CIM. Two markers with the highest F values were added as cofactors in the CIM step (model 6, using a moving window size of 10 cM). The likelihood value of the presence of a QTL was expressed as LOD score.

The most likely position of the QTL was estimated by the point where the maximum LOD score was found. As described by Lander and Bostein (1989), the interval support was defined as the distance equivalent to a LOD decrease of 1 unit on each side of the position of the maximum value. For one trait, QTLs detected in different years with interval support that overlapped were summarized as unique QTL.

The additivity (a) and dominance (d) effects were estimated, using QTL cartographer models ($a \neq 0, d \neq 0$, vs $a = 0, d = 0$). For each QTL, the percentage of phenotypic variation explained (R^2) were estimated.

For studying epistasis, we used multiple-way ANOVA between markers to gain an idea of the importance of epistasis (Verhoeven *et al.*, 2010). This analysis was based on the assumption that QTL are completely linked with markers (Zhang *et al.*, 2008). For this analysis, when alleles were dominant, e.g. A on B, we pooled homozygous AA and heterozygous AB in one category to be compared to BB. The model was the following:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} is the phenotypic value of the individual possessing alleles i, j and k at respectively markers α , β and γ , μ is the overall mean and ε represented the residue. This model contained the parameters representing the marginal effects of loci α , β and γ and their epistatic interaction. Then significant differences between samples were tested using the Kruskal-Wallis test and two-way interaction plots were performed.

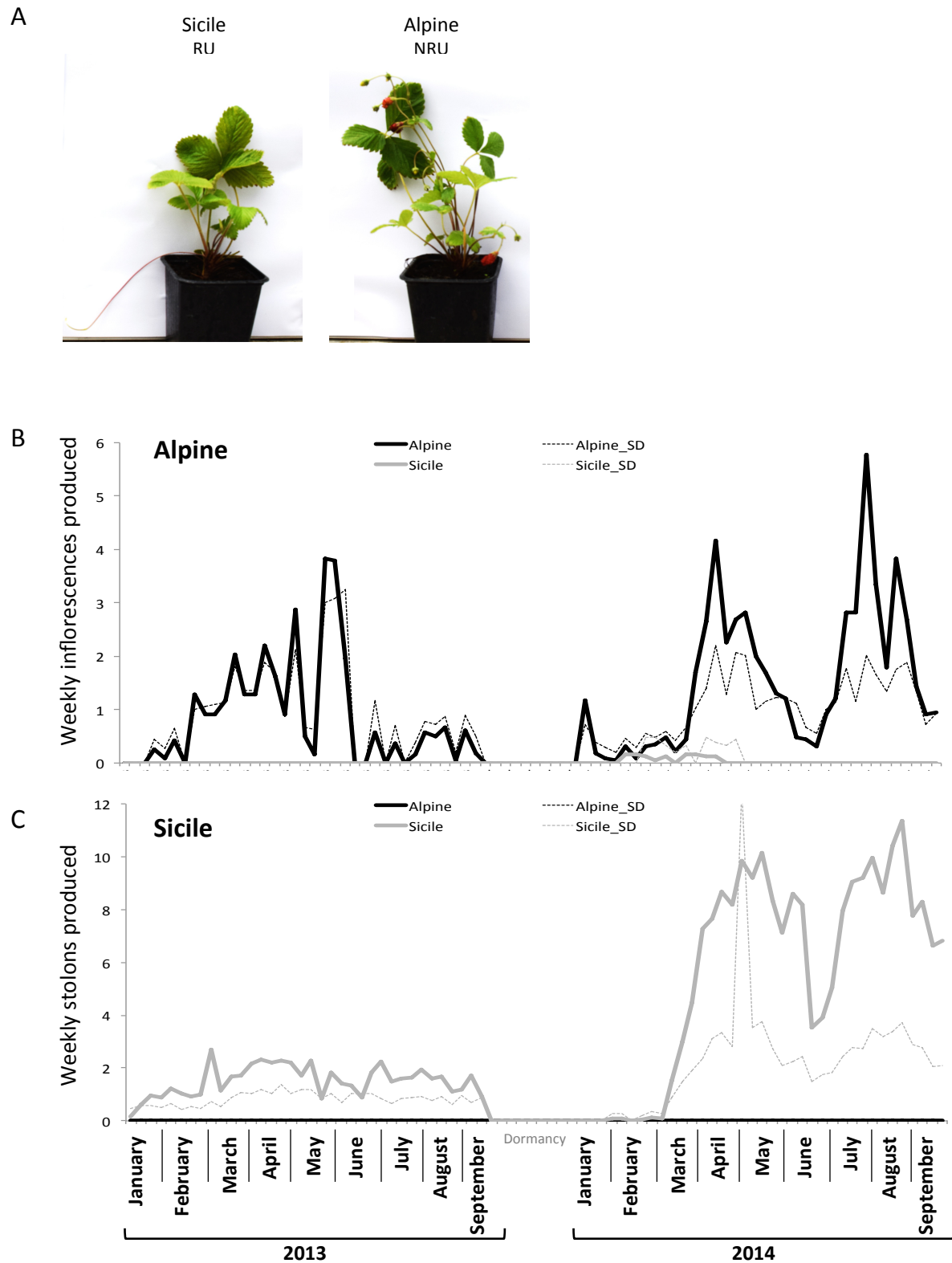


Figure 1. Parents of the segregating population, ‘Alpine’, a perpetual flowering (PF), non-running (NRU) genotype and ‘Sicile’, a once-flowering (OF), running (RU) genotype: Photos of the parents (A) ; Weekly evolution of newly emerged inflorescences (B) and stolons (C) in 2013 and 2014. SD = Standard Deviation. $n = 26$ and 24 for Sicile. and 24 and 23 for Alpine. respectively in 2013 and 2014.

RESULTS

Exploratory analyses of the population Ilaria_F2 segregating for perpetual flowering and runnering behaviours

For studying the relationship between sexual and vegetative reproduction, we created a F₂ population issued from a cross between two contrasted *F. vesca* genotypes (Figure 1A): ‘Alpine’ and ‘Sicile’. ‘Alpine’ parent is a perpetual flowering (PF) and non-runnering (NRU) genotype. During the two years of observations, this genotype never produced stolon but inflorescences (Figure 1, Table 1). As expected, plants of this genotype were able to initiate flower the first year with a mean of 31.21 and 58.48 inflorescences the first and the second year respectively. ‘Sicile’ parent is a once flowering (OF) and runnering (RU) genotype. Plants did not produce inflorescence the first year since OF genotypes need short days to induce flowering (de Camacaro *et al.*, 2002), while they produced a mean of 1.21 inflorescences the second year issued from the floral initiation occurred the first year (Figure 1, Table 1). As for the number of inflorescences in ‘Alpine’, a much larger number of stolons emerged the second year (226.46) compared to the first year (50.54).

The Ilaria_F₂ population showed a large variation of the numbers of inflorescences, stolons or crowns observed in the two vegetative seasons, 2013 and 2014 (Table 1, Figure 2). In average, the progeny doubled their reproductive organs between the two years, with averages of 9.64 and 18.57 inflorescences and 34.15 and 77.08 stolons in respectively 2013 and 2014 (Table 1). Frequency distributions of the F₂ population for the three studied traits showed bimodal distribution for inflorescences and stolons (Figures 2A, 2B), and normal distribution for crowns (Figure 2C).

Despite significant correlations between traits (Table 2), for which correlation between inflorescences and crowns numbers are positive but negative when analysed with stolons, *r* values were low except when comparisons were performed between the two years for inflorescences and stolons (Table 2).

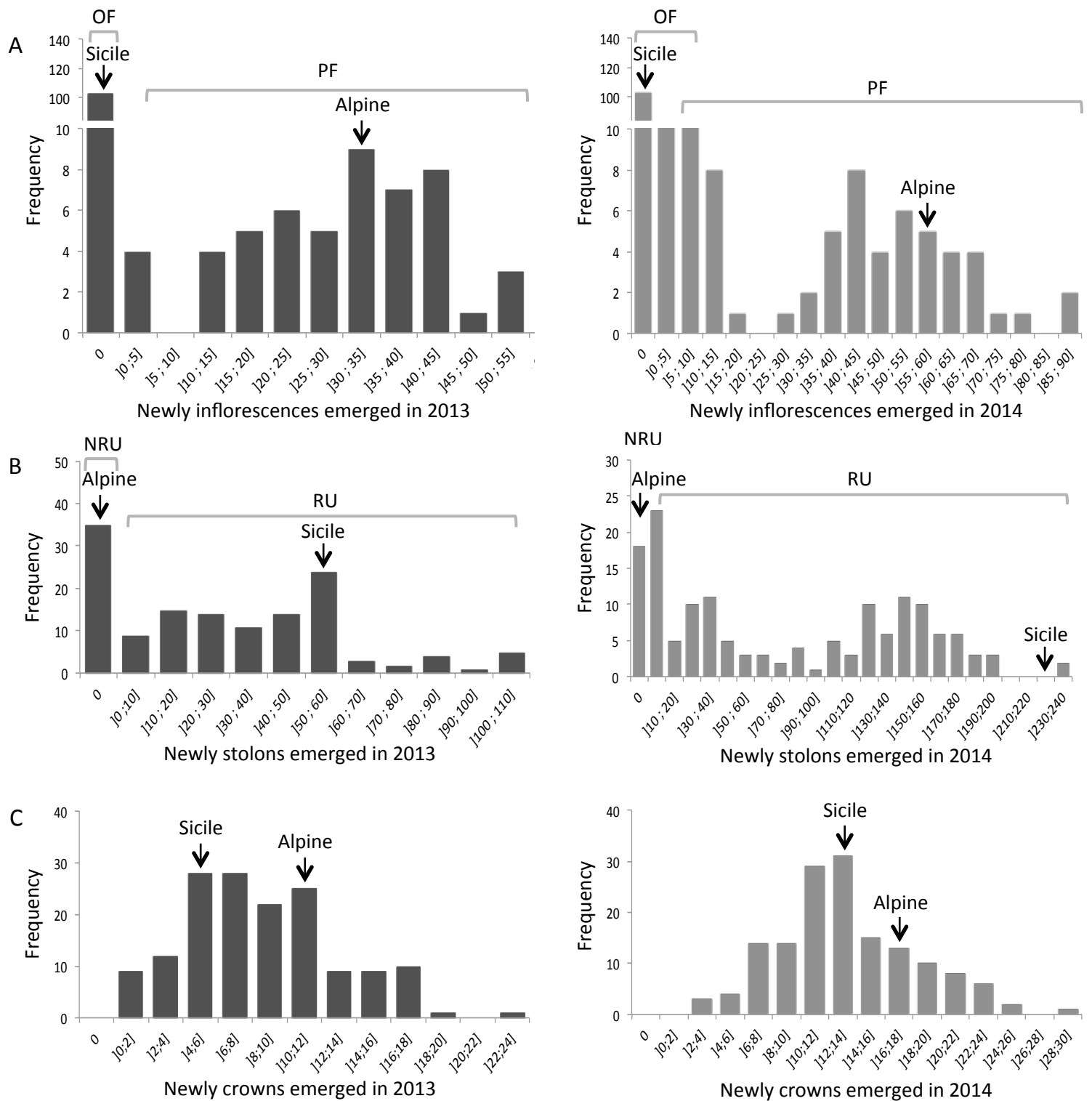


Figure 2. Distribution of the progeny frequency in the first and the second years of observations (2013 and 2014). Values of 2013 were indicated in black bar and values of 2014 in grey bar.

(A) Emerged inflorescences with differentiation of OF (Once Flowering) phenotype with 0 inflorescence in 2013 and 0 – 18 in 2014; and PF (Perpetual Flowering) phenotype with 10 – 54 in 2013 and 13 – 87 inflorescences in 2014.

(B) Newly stolons emerged with two distinct phenotypes: NRU (Non-Runnering) phenotype with 0 – 3 stolons produced in 2013 and 0 – 11 in 2014; and RU (Runnering) phenotype with 6 – 101 in 2013 and 14 – 223 inflorescences produced in 2014.

(C) Crowns emerged in 2013 and 2014..

Progeny presents four phenotypic combinations

The Ilaria_F₂ population showed segregations ratio of 3:1 for runnering (RU:NRU where RU= *GA20ox/GA20ox* and *GA20ox/ga20ox* genotypes and NRU= *ga20ox/ga20ox*) consistent with a monogenic inheritance and dominance of allele *GA20ox*. A similar 3:1 ratio was obtained for duration of flowering indicating once flowering (OF: *TFL1/TFL1* or *TFL1/tfl1*) and perpetual flowering (PF: *tfl1/tfl1*) F₂ individuals. As a consequence, each individual can be ranged into one of the following four groups: RU_OF (76 individuals), NRU_PF (9 individuals), NRU_OF (30 individuals), and RU_PF (39 individuals). Traits of these sub-populations were described in Supp. Data Table 1.

Patterns of flowering and runnering of these four groups are shown in Figure 3. The sub-populations were compared to the parents, Sicile (RU, OF) and Alpine (NRU, PF), for the total number of inflorescences, stolons and crowns for both years of observations (Figures 1 and 3 for flowering and runnering, Supp. Data Figures 1 and 2 for crowns). The patterns of runnering of the sub-population RU_OF and the one of flowering of the sub-population NRU_PF were respectively similar to the parents Sicile (RU, OF) and Alpine (NRU, PF) (Figure 3). This result suggested predominance of genetic effects of the dominant alleles conferring runnering (*GA20ox*) or once flowering behaviours (*TFL1*).

Patterns of the sub-population NRU_OF showed very low level of emergence of inflorescences and almost no stolon (less than one inflorescence or stolon in 2013 and 5.55 inflorescences and 1.55 stolons in 2014). These individuals did not show an increase of crown as the three other sub-populations (8.28 and 9.41 crowns in 2013 and 2014 respectively) (Figure 4).

Patterns of the sub-population RU_PF, which combined both runnering and perpetual flowering, were partly different than the ones of the parents (Supp. Data Figure 3). During the first year of observation of the sub-population RU_PF individuals showed similar patterns of runnering and flowering than the parents Sicile and Alpine respectively, but surprisingly runnering stopped earlier than for Sicile and this stop corresponded to a peak of emergence of inflorescences (Supp. Data Figure 3). During the second year of observation, the pattern of emergence of inflorescences was similar than the PF parent Alpine whereas individual produced much lower number of stolons than the RU parent Sicile. These results suggest an impact of the status of PF on the runnering process leading to a decrease of stolon emergence while emergence of inflorescences is not affected.

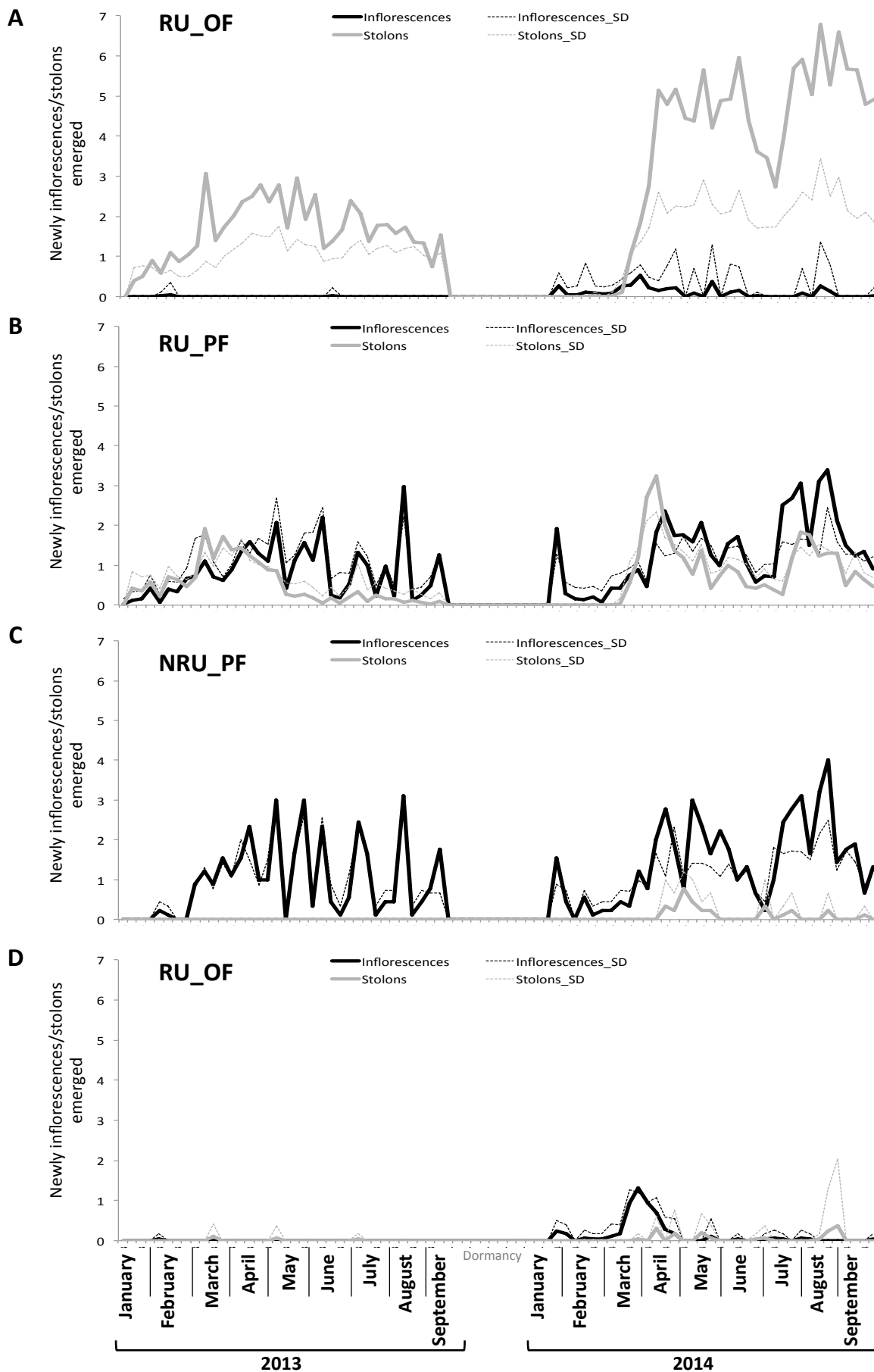


Figure 3. Emergence of inflorescences (black) and stolons (grey) of the different F_2 phenotypic combinations: (A) Once Flowering/Runnering [RU_OF] with 76 individuals, (B) Perpetual Flowering/Runnering [RU_PF] with 39 individuals, (C) Perpetual Flowering/ Non-runnering [NRU_PF] with 9 individuals and (D) Seasonal Flowering/Non-runnering [NRU_OF] with 30 individuals. Dotted lines represent Standard Deviation (SD).

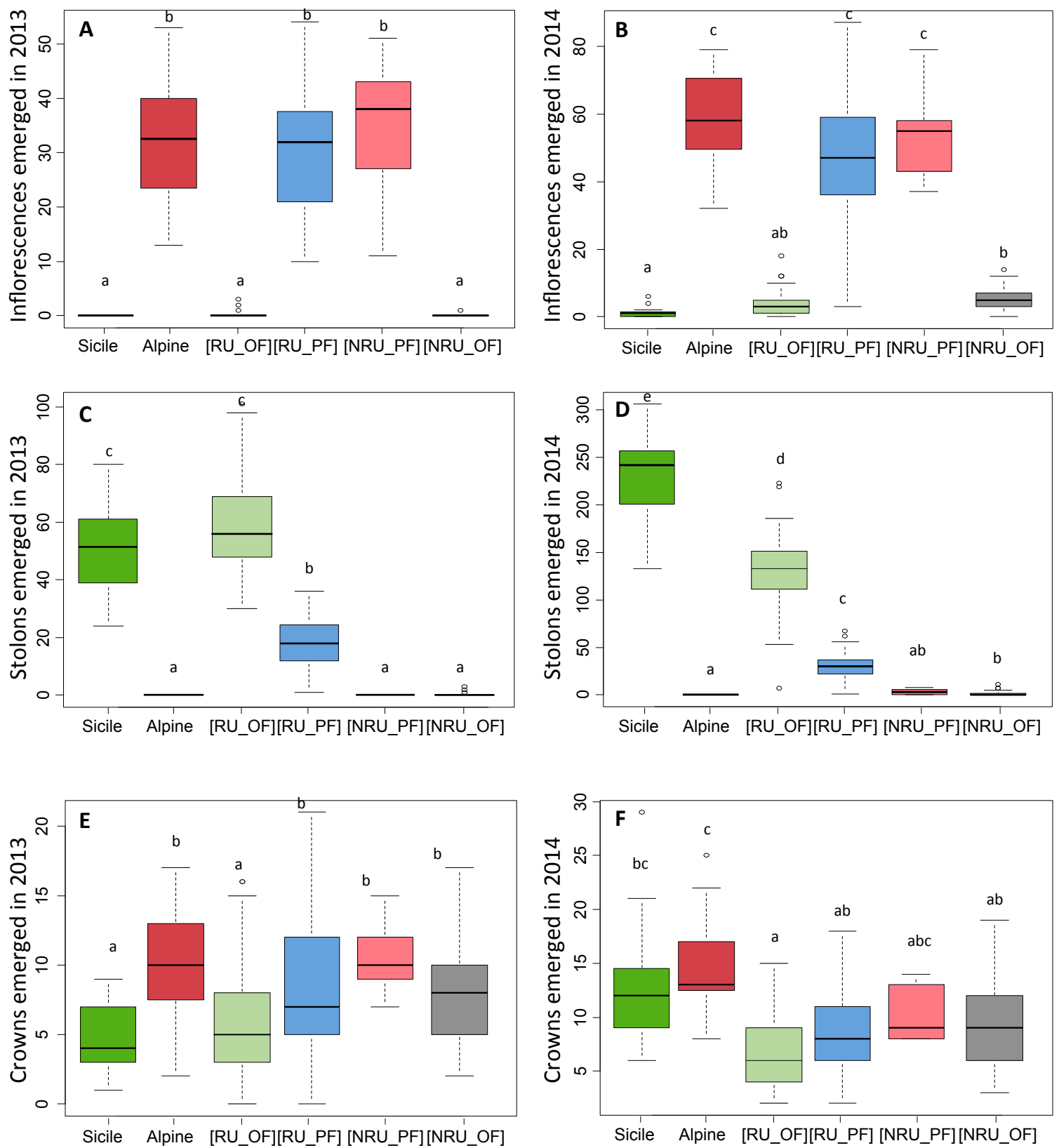


Figure 4. Inflorescences (A and B), stolons (C and D) and crowns (E and F) emerged in 2013 (A, C and E) and in 2014 (B, D and F). Boxplots were represented for both parents, ‘Sicile’ runner and once flowering (RU_OF) and ‘Alpine’ non-runner and perpetual flowering (NRU_PF), and in the four groups of the segregating population: RU_OF, RU_PF, NRU_PF and NRU_OF. Different letters indicate a significant difference between samples according to Kruskal-Wallis test ($P = 0.05$).

By considering both patterns of runnering or flowering, we observed coordination between them. Whatever the sub-populations, we observed an important decrease in both flowering and runnering at the end of June in 2013 and 2014 with a more drastic decrease in 2014. This coordination between the two processes on different plants suggested strong impacts of environment control of these processes.

Beside gene effects of *GA20ox* and *TFL1* promoting runnering and perpetual flowering, two new QTLs linked to quantitative responses of these processes were identified

Thirty nine out of the 42 markers were mapped on eight linkage groups with two groups for the LG4. Kompetitive Allelic Specific PCR (KASP®) markers gave easily interpretable results except for some markers which showed therefore more missing data. This linkage map was used for the detection of QTLs.

QTLs linked to the numbers of stolons, inflorescences and crowns, were identified using composite interval mapping (Table 3 and Supp. Data Table 2). When analyses were performed on the total segregating population, which included the four sub-populations, RU_PF, NRU_PF, RU_OF and NRU_OF, and on the two years of observations, a total of 12 significant QTL ($\alpha = 0.025$) were detected (Supp. Data Table 2). These 12 QTLs can be summarized in three unique QTL since their LOD support confidence interval (Table 3). These QTLs co-localized on the LG2 (*GA20ox*) for QTLs linked to stolon's and crown's numbers, LG4 (LG4K4 but we took the marker LG4K2 for further analyses since this last marker showed low number of missing data) for QTL linked to stolon's number and LG6 (*TFL1*) for QTLs linked to the three traits (Figure 5). In the segregating Ilaria_F₂ population, the effect of the two alleles of LG4K2 (LG4K2_Sic and LG4K2_Alp issued respectively from Sicile and Alpine) can be summarized as follow: individuals showing at least one copy of the allele of Alpine, LG4K2_Alp (LG4K2_Alp/LG4K2_Alp and LG4K2_Alp/LG4K2_Sic) produced 15.9 and 44.6 more stolons in 2013 and 2014 respectively than the individuals homozygous for the allele of Sicile, LG4K2_Sic.

On the LG2 and LG6, effects of QTL were negative for stolon's number and positive for inflorescence's and crown's number. These results confirmed the correlation values found between traits, where the number of inflorescences and crowns are positively correlated between them and negatively correlated with stolons.

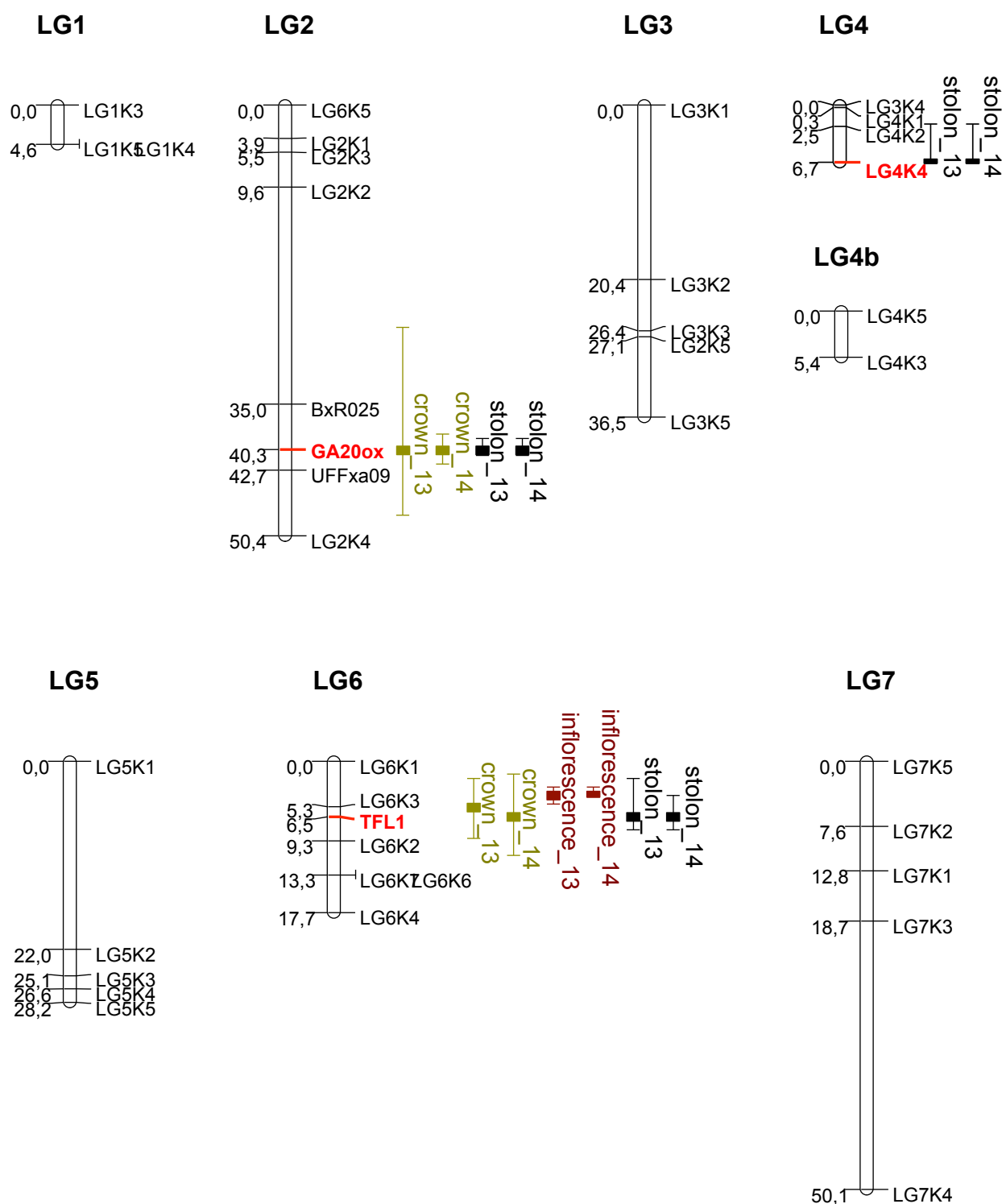


Figure 5. Quantitative Trait Loci (QTL) detected on the linkage map for developmental traits, numbers of inflorescences, stolons or crowns observed during two vegetative seasons, 2013 (_13) and 2014 (_14) on F₂ population

Significant QTL (superior to the QTL threshold at $\alpha = 0.025$) were identified. Support interval of QTL is determined by the maximum LOD score (boxes) minus 1 (LOD-1). Black for stolons, Red for inflorescences and Green for crowns. Markers in red showed a maximum of LOD for almost all QTLs that colocalized in the region.

When analyses were performed on sub-populations, the same QTLs were identified with one additional QTL on LG3 (Supp. Data Table 2; Supp. Data Figure 4). This last QTL was detected on inflorescences number only when QTL analyses were performed on PF sub-population. In this last sub-population, no QTL on LG6 was identified since no polymorphism was present on this LG (all individuals of PF are *tfl1/tfl1*). In this PF sub-population, individuals showing at least one copy of the allele of Sicile, LG3K1_Sic produced 2.9 more inflorescences compare to individuals homozygous for the allele of Alpine, LG3K1_Alp in 2014. Therefore, for inflorescences, beside the control on LG6 (*TFL1*) that control once flowering vs perpetual flowering, the QTL on LG3 modified quantitatively the number of inflorescences.

As expected, when analyses were performed on the sub-population RU, which included only runner individuals, only QTLs on LG4 and LG6 were identified and none on LG2, which was fixed (RU: *GA20ox/GA20ox* or *GA20ox/ga20ox*) (Supp. Data Table 2; Supp. Data Figure 4). This result suggested that LG2 promotes stolon production and LG4 and LG6 control the final number of stolons.

Epistatic interaction between *GA20ox* and *TFL1* led to less stolons than expected in an additive model

In order to study the relationship between all QTLs identified, on LG2, LG3, LG4 and LG6, we investigated the interaction between these QTL using ANOVAs. Numbers of stolons, inflorescences and crowns scored in 2013 and 2014 were analysed. To perform these analyses, we used the closest markers to the LOD score peak for each QTL as explanatory variables, i.e. *GA20ox*, *TFL1*, LG4K2 and LG3K1. Because of dominant alleles at these loci, we pooled heterozygous and homozygous with dominant alleles for these four loci.

Results of ANOVAs are shown in Table 4. The main genetic effects of number of stolons were caused by *GA20ox*, *TFL1* and their epistatic interaction. In addition, the genetic effect of LG4K2 also significant both years and an interaction between *GA20ox* and LG4K2 was detected only in 2014. These results confirm the role of *GA20ox*, *TFL1* and LG4K2 in the quantitative variation of stolons per year but also show that the two first genes have a strong epistatic interaction. This epistatic interaction showed that the genetic status of *TFL1* led to more or less stolons according to the status of *GA20ox* while it did not affect the number of inflorescences.

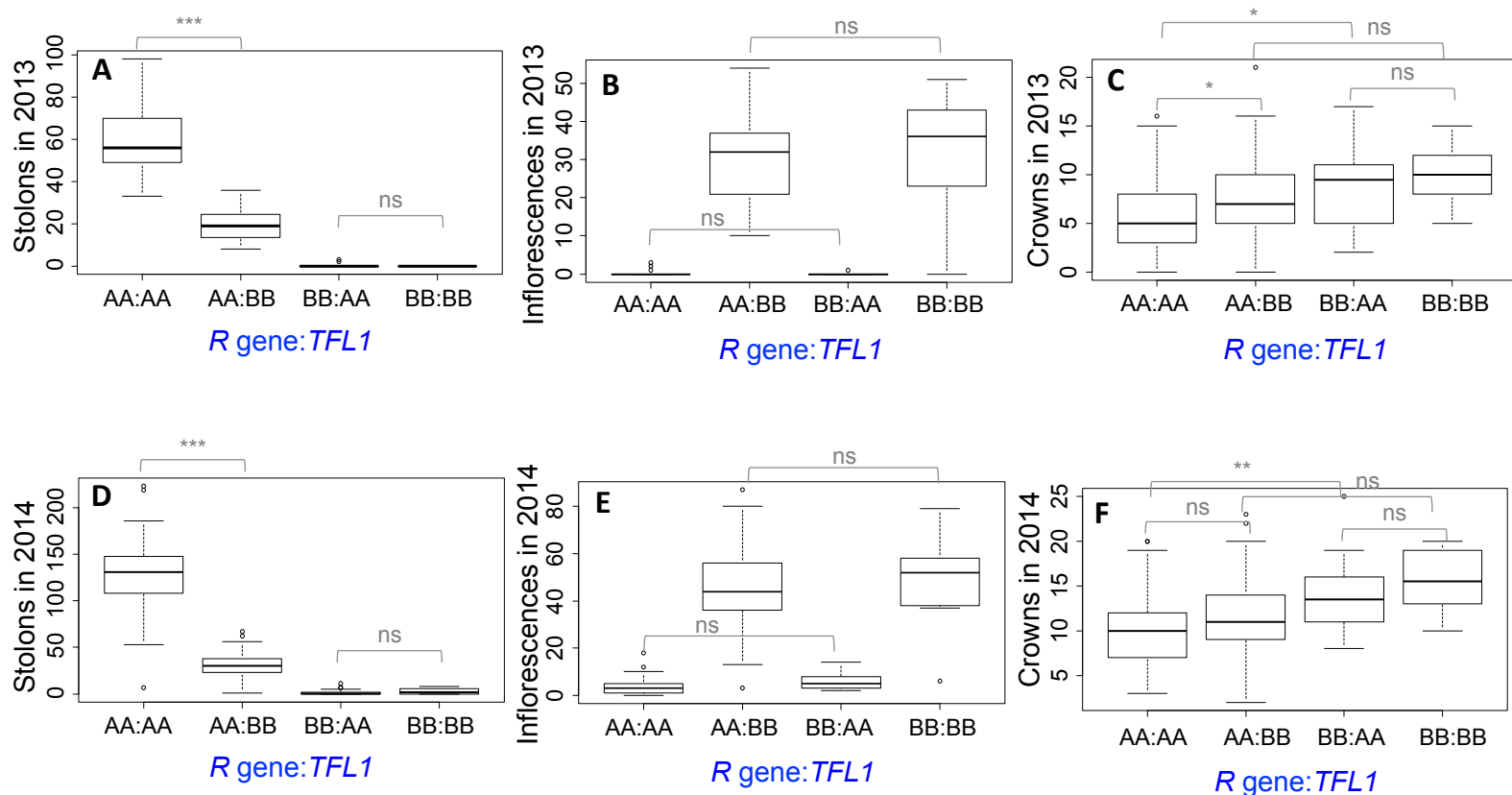


Figure 6. Effects of allelic status of *GA20ox* (*R* gene) and *TFL1* on stolons production (A and D), inflorescences emergence (B and E) and crowns formation (C and F) in 2013 (A, B and C) and in 2014 (D, E and F). Kruskal-Wallis test *** P -value <0.001 , ** P -value <0.01 , * P -value <0.05 and 'ns' = non significant.

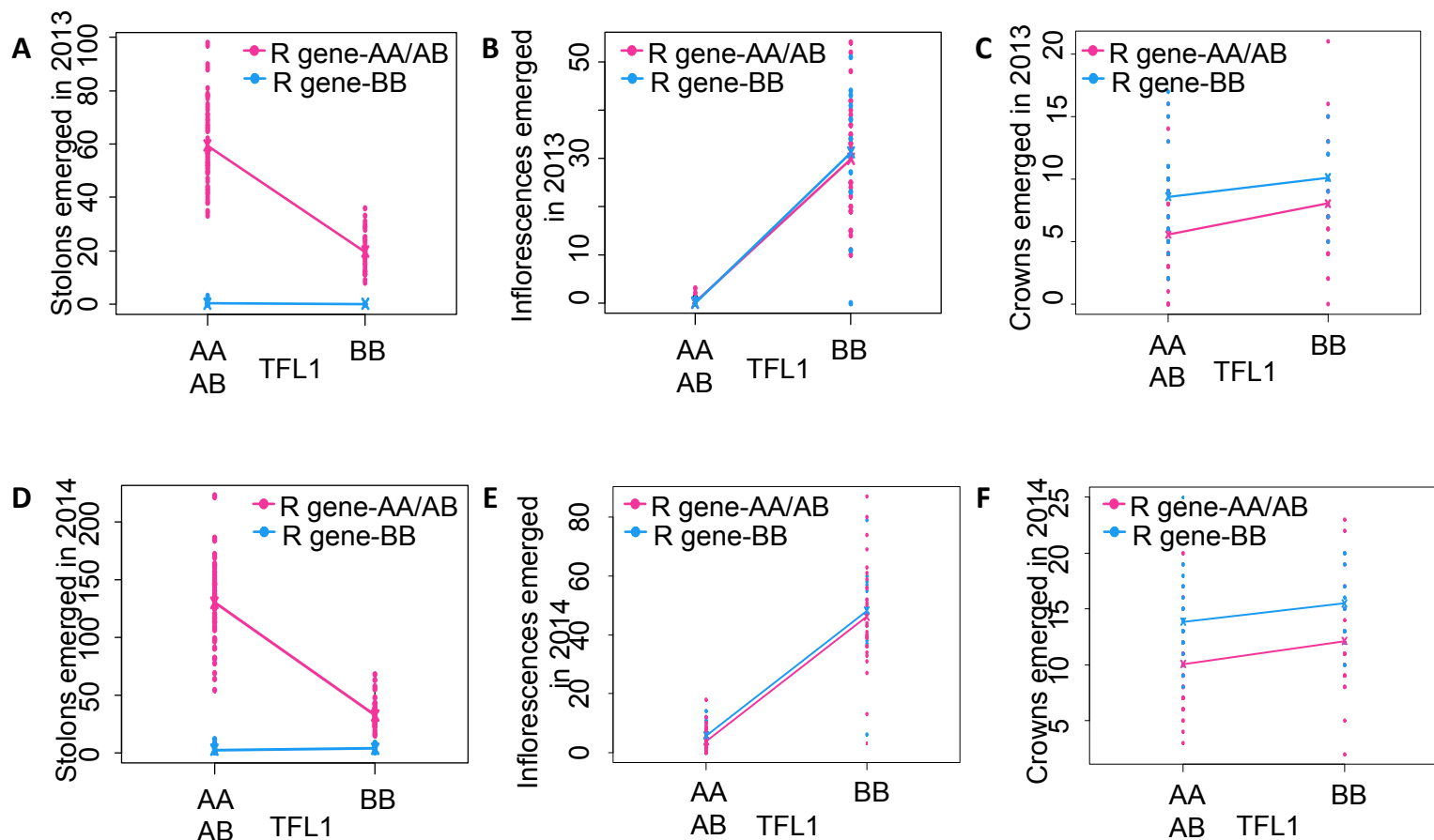


Figure 7. Effects of allelic status of *GA20ox* (*R* gene) against *TFL1* on each traits in 2013 (A, B and C) and in 2014 (D, E and F).

Dot plots of the trait as a function of markers genotypes, lines represent estimated trait averages.

Potential interaction between markers were visualized for each trait: stolons production (A and D), inflorescences emergence (B and E) and crowns formation (C and F).

This interaction could be due to the interaction between gibberellins and flowering pathways as previously described (Guttridge and Thompson, 1964) or to a trade-off between these two processes (Zhang and Zhang, 2007).

The main genetic effect of number of inflorescences was caused by *TFL1* as expected since this gene controls the perpetual flowering trait. In addition, ANOVAs identified a significant effect on the *LG3K1* in 2014, and a low interaction effect between *TFL1* and *LG3K1* or *LG4K2* in 2014. For crown, the main effect was due mainly to *GA20ox* and partially to *TFL1* and *LG3K1* and no epistatic interaction was identified.

Epistatic interactions between markers were also studied using the Kruskal-Wallis test (Figure 6 and Figure 7 represented the interaction between *GA20ox* and *TFL1* using box plots or distribution respectively). Results were similar to the ones obtained using ANOVAs and they confirm the interaction between *TFL1* and *GA20ox* in the final numbers of stolons respectively (data with *LG3K1* and *LG4K2* not shown).

DISCUSSION

In strawberry, floral transition occurs in the shoot apical meristem while formation of stolons, organs producing new ramets, takes place in basal axillary meristems. Even though these processes take place in separate parts of the plant, they could be interconnected. To answer to this question with a genetic point of view, we studied a population that segregated for flowering and runnering. Results showed the roles of *GA20ox* and *TFL1* as a switch on/off respectively for stolons and inflorescences productions. In addition, two other loci, *LG4K2* and *LG3K1*, controlled quantitatively flowering and runnering respectively. In addition, a strong epistatic interaction between *GA20ox* and *TFL1* was highlighted. This interaction modified the runnering process but not the perpetual flowering pattern.

Genetic controls underlying the loci localized on LG2 and LG6 can be attributed respectively to *GA20ox* and *TFL1*

The cross between the two contrasted parents Sicile and Alpine offered an interesting progeny who displayed large distributions of inflorescences and stolons emergences. Bimodal distributions with these two traits offer us to relocate loci responsible of them in our population. By QTL approach, we detected two strong QTLs linked to runnering and flowering localized on LG2 and LG6 respectively.

For stolon production, one locus was found on LG2, with a dominant and major effect as described in Sargent *et al.* (2004). This locus corresponded to *GA20ox* which was previously identified and characterized as the runner gene (Tenreira *et al.*, in progress). As previously shown and confirmed in this study, this gene acts as a switch on/off in runner process rather than stolons quantity.

For inflorescences, QTL analysis detects a major locus on LG6. This position corresponds to *TFL1* gene that was previously identified as the gene responsible of perpetual flowering (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012).

Crowns production seems to be affected by these two major genes, *GA20ox* and *TFL1*, and so, by perpetual flowering and runner traits with positive relationship with the first and negative with the second.

Beside *GA20ox* and *TFL1* that control vegetative and sexual processes, two other loci localized on LG3 and LG4 act quantitatively in flowering and runner

With the heterozygosity of *TFL1* and *GA20ox* in the F₁ individual, Ilaria, issued from the cross of the parent Sicile and Alpine, the F₂ population issued from selfing covered four phenotypic combinations according to the genetic status of these two genes. This segregating population appeared therefore as optimal to identify other genetic controls linked to runner and flowering beside the two major genes *TFL1* and *GA20ox*. Using Ilaria_F₂, we identified two QTL localized on the LG4 and LG3 involved in the quantitative response of runner and flowering.

Firstly, on total F₂ population, LG4K2 locus was found with a strong effect on stolons production the two years, whereas LG3K1 had a weak effect on crowns emergence in 2013 and on flowering in 2014.

Secondly when we focused on RU individuals (75% of the population) or PF individuals (30.5% of population), results were more precise. Indeed, the two new loci acted only the second year of observations, and were involved in quantity of stolons in RU individuals. Moreover, LG3K1 acted in inflorescences quantity in PF population with a weak effect.

Therefore, the effect of the marker LG4K2 was strong since much more stolons were produced when the allele from the parent Alpine was present (see description in Results). To study if this locus is the same than the one responsible of the QTL *FaPFRU* in the octoploid strawberry (Gaston *et al.*, 2013), it will be necessary to obtain a single linkage groups 4 by adding new markers into this group (Figure 5).

Significant epistatic interaction between *TFL1* and *GA20ox*

In quantitative genetics, epistasis refers to a non-additive interaction between genotypes at two or more loci (Mackay 2013). Recently, epistatic effects have been considered by many researchers as important for complex traits, including disease resistance (e.g. Vasquez *et al.*, 2015), assimilation of minerals (e.g. Ding *et al.*, 2014) or resources allocations (Chardon *et al.*, 2014). Here, we showed that the QTL in chromosome LG2 interacted epistatically with the QTL in chromosome LG6. *GA20o* locus on the LG2 promotes positively runnering and negatively crowns emergence, but this effect depends on the allelic composition in the locus on the LG6, i.e. *TFL1* (Figure 7). The consequence of this interaction is less stolons in PF individuals than in OF individuals. On the contrary, no change in the number of inflorescences was observed according to the allelic combination in the LG2 locus, i.e. *GA20ox* in PF individuals. This epistatic interaction suggested the ascendant of *TFL1* effect on the *GA20ox*. In natural woody strawberry population, when this relationship was studied with biomass, clonal reproduction was the dominant reproductive pathway whereas sexual reproduction was rather insignificant for population growth (Schulze *et al.*, 2012).

Hypotheses about the relationship between perpetual flowering and runnering

Beside to the epistatic interaction between *TFL1* and *GA20ox* (Table 4), antagonism between inflorescence and stolon productions was observed (Table 2).

The central question is whether (i) these two genes could directly or indirectly interact through connection into their pathways, which leads to modify the inflorescence-to-stolon ratio, or (ii) flowering and runnering could be in competition for the same resources allocation leading to a switch between these two modes of reproduction (Thompson and Eckert, 2004; Vallejo- Marin *et al.*, 2010).

In woodland strawberry, the role of GA in stolons production was already shown (Tenreira *et al.*, in progress). In addition, in this study, we showed that perpetual flowering prevailed on runner process. A link has been identified in rose where *RoTFL1* (an homolog of *AtTFL1*) was transcriptionally regulated by GA (Randoux *et al.*, 2012). Because rose and strawberry are closed species molecularly and physiologically: (i) *TFL1* controls perpetual flowering in both species and (ii) GA inhibit flowering also in both species, a similar hypothesis of transcriptional control of *FvTFL1* by GA could be suggested. However, RNAi and overexpression of *FvTFL1* did not affect stolons production (Koskela *et al.*, 2012). In addition in Mouhu *et al.* (2013), activation of *TFL1* seemed to be independent of GA but both were photoperiodically regulated by *FvSOC1*. The trade-offs between sexual and clonal reproduction hypothesis can be resource-based or be caused by a limited number of meristems that are available for either sexual or clonal reproduction (Vallejo-Marin *et al.* 2010). In the woody strawberry, Schulze *et al.* (2012) observed a marginally significant negative effect of fruit production on node production in 2009, suggesting the operation of trade-off.

Few data were published for a trade-off hypothesis because of the strong impact of environment. In specie able to reproduce by two modes of reproductions, flowering could be favoured in limiting resources (Liu *et al.*, 2009). Moreover, in cultivated strawberry, link between nutrients, auxin and stolons were established (Atkinson *et al.*, 2012).

CONCLUSION

These results provide hypothesis on the control of both perpetual flowering and runner process for which genes that promote these processes were identified plus genes acting quantitatively. *TFL1* and *GA20ox* promote respectively perpetual flowering and runner process and they showed clear epistatic interaction. Rather than a balance between the two processes, flowering and runner process, we can more suggest a dominance of flowering on runner process since flowering was not affected by the allelic composition of *GA20ox* but runner process was affected by the allelic composition of *TFL1*.

Table 1. Phenotypic values of the parental genotypes *Fragaria vesca* Sicile (RU) and *F. vesca* Alpine (NRU). The number of individuals analyzed, mean values, standard deviations (SD), and range of the traits are described. The significance level of the difference between parents means is indicated in the Sic vs Alp column: *** P<0.001 and *P<0.05.

	Traits	<i>Fragaria vesca</i> Sicile			<i>Fragaria vesca</i> Alpine			Sic VS Alp	Progeny Ilaria		
		Mean	SD	Range	Mean	SD	Range		Mean	SD	Range
2013	Inflorescences	0	0	-	31.21	10.49	13 - 53	***	9.64	15.62	0 - 54
	Runners	50.54	14.84	24 - 80	0	0	-	***	34.15	28.53	0 - 101
	Crowns	4.62	2.42	1 - 9	10.17	3.64	2 - 17	***	8.11	4.34	1 - 22
	Number of plants	26			24				154		
2014	Inflorescences	1.21	1.38	0 - 6	58.48	12.67	32 - 79	***	18.57	23.69	0 - 88
	Runners	226.46	48.38	133 - 306	0	0	-	***	77.08	67.94	0 - 237
	Crowns	12.58	5.40	6 - 29	14.65	4.16	8 - 25	*	9.14	4.33	1 - 23
	Number of plants	24			23				150		

Table 2. Phenotypic correlations between inflorescences (Inflo), stolons (Sto) and crowns (CR) measured in 2013 and 2014. Significant correlations are indicated: *** P <0.001. **P <0.01 and *P <0.05 and strong effects were shown in grey.

	Inflo_2013	Inflo_2014	Sto_2013	Sto_2014	CR_2013
Inflo_2013					
Inflo_2014	0.49***				
Sto_2013	-0.39***	-0.26*			
Sto_2014	-0.29**	-0.38**	0.58***		
CR_2013	0.28**	0.20*	-0.21*	-0.19*	
CR_2014	0.21*	0.25*	-0.22*	-0.28**	0.10

Table 3. Significant QTL detected by CIM for numbers of stolons, inflorescences and crowns with LOD>LOD threshold. Individual additive effects are indicated in brackets. Analyses were performed on the total segregating population.

Traits	Linkages Groups		
Total segregating population			
Stolon	LG2 (+) ^a	LG4 (-) ^a	LG6 (+) ^a
Inflorescences			LG6 (-) ^a
Crowns	LG2 (-) ^a		LG6 (-) ^a

^a, Mean effect on a trait: mean value of presence of one allele at a marker by comparison with the presence of the second allele. + and - indicates the direction of the additive effect.

Table 4. Analyses of variance of numbers of stolons, crowns or inflorescences on the Ilaria_F₂ population. Markers or epistatic interaction between markers were found significantly associated with the considered trait when the Pr value is significant (P<0.05).

Traits	Source of variation	Df	Mean_Sq	Pr(>F)		Df	Mean_Sq	Pr(>F)	
Number of stolons: effects GA20ox, TFL1, LG4K2, LG3K1, interaction									
		2013				2014			
	GA20ox	1	51424	<0.0001	***	1	207408	<0.0001	***
	TFL1	1	23520	<0.0001	***	1	115276	<0.0001	***
	LG4K2	1	1225	0.004	**	1	11940	<0.0001	***
	LG3K1	1	113	0.378	NS	1	691	0.221	NS
	GA20ox:TFL1	1	7180	<0.0001	***	1	39211	<0.0001	***
	GA20ox:LG4K2	1	227	0.212	NS	1	3654	0.006	**
	GA20ox:LG3K1	1	8	0.820	NS	1	1111	0.121	NS
	TFL1:LG4K2	1	73	0.479	NS	1	337	0.391	NS
	TFL1:LG3K1	1	189	0.255	NS	1	42	0.762	NS
	LG4K2:LG3K1	1	0	0.955	NS	1	32	0.791	NS
	Residuals	105	144			102	455		

Number of inflorescences: effects GA20ox, TFL1, LG4K2, LG3K1, interaction

	2013				2014			
GA20ox	1	86	0.200	NS	1	150	0.175	NS
TFL1	1	21309	<0.0001	***	1	45922	<0.0001	***
LG4K2	1	7	0.710	NS	1	58	0.396	NS
LG3K1	1	4	0.794	NS	1	354	0.038	*
GA20ox:TFL1	1	6	0.726	NS	1	172	0.147	NS
GA20ox:LG4K2	1	3	0.807	NS	1	99	0.269	NS
GA20ox:LG3K1	1	59	0.286	NS	1	52	0.422	NS
TFL1:LG4K2	1	18	0.551	NS	1	638	0.006	**
TFL1:LG3K1	1	4	0.776	NS	1	1001	0.001	***
LG4K2:LG3K1	1	2	0.864	NS	1	6	0.793	NS
Residuals	105	52			102	80		

Number of crowns: effects GA20ox, TFL1, LG4K2, LG3K1, interaction

	2013				2014			
GA20ox	1	112.85	0.009	**	1	248.22	0.001	***
TFL1	1	131.71	0.005	**	1	51.8	0.121	NS
LG4K2	1	34.75	0.142	NS	1	61.48	0.091	NS
LG3K1	1	72.92	0.034	*	1	53.73	0.114	NS
GA20ox:TFL1	1	20	0.264	NS	1	68.81	0.074	NS
GA20ox:LG4K2	1	1.95	0.726	NS	1	7.89	0.543	NS
GA20ox:LG3K1	1	24.94	0.213	NS	1	20.69	0.325	NS
TFL1:LG4K2	1	2.44	0.696	NS	1	60.82	0.093	NS
TFL1:LG3K1	1	1.01	0.801	NS	1	2.56	0.729	NS
LG4K2:LG3K1	1	24.81	0.214	NS	1	23.2	0.298	NS
Residuals	105	15.86			103	21.18		

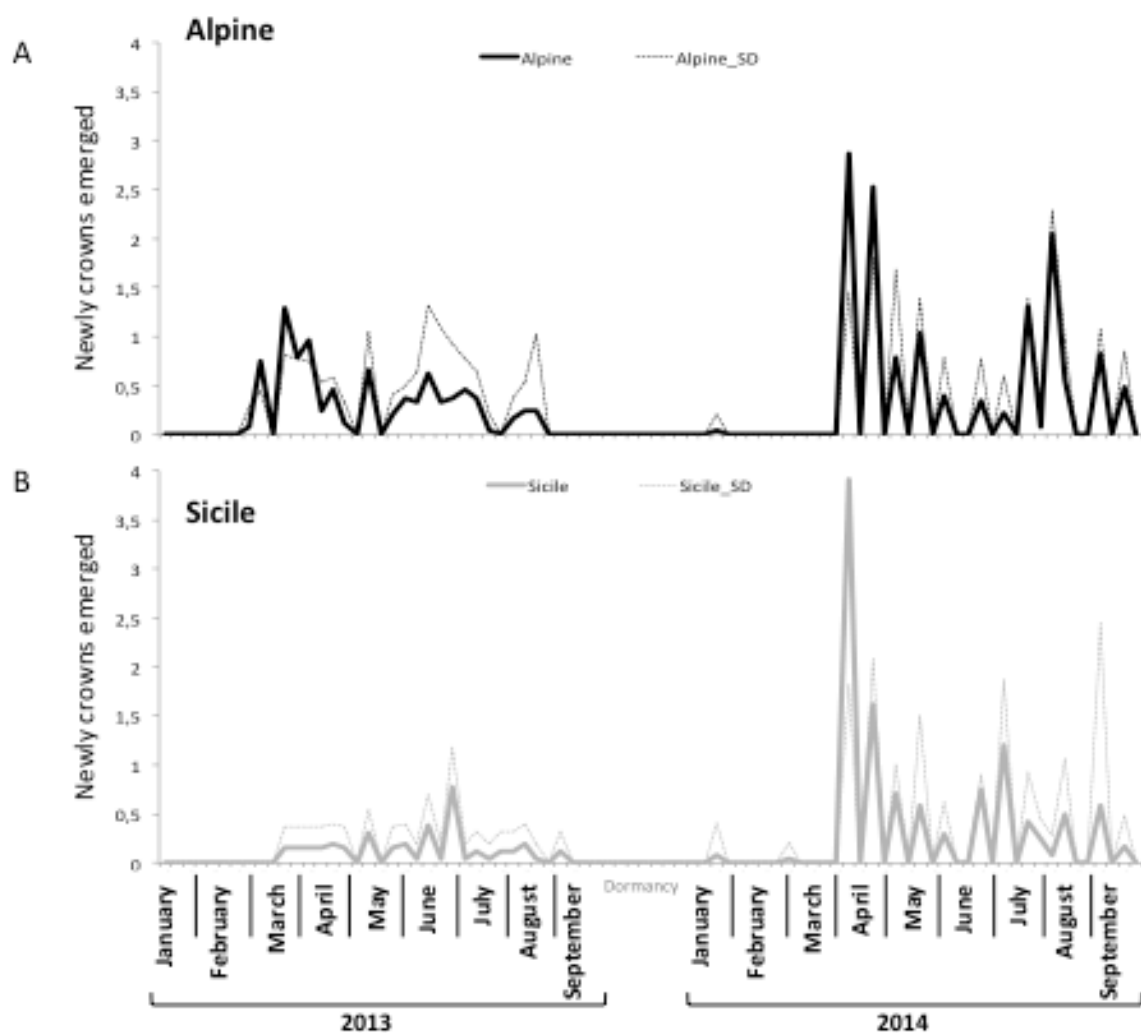
Df, Degree of freedom; Mean sq, Mean squares; Pr(>F), probability of the significance of the markers; ***, **, * and NS when significant at P<0.001, 0.01, 0.05 and non significant respectively

Supplemental Table 1. Phenotypic values of the four phenotypic combinations of progeny. The number of individuals analysed, mean values, standard deviations (SD), and range of the traits are described.

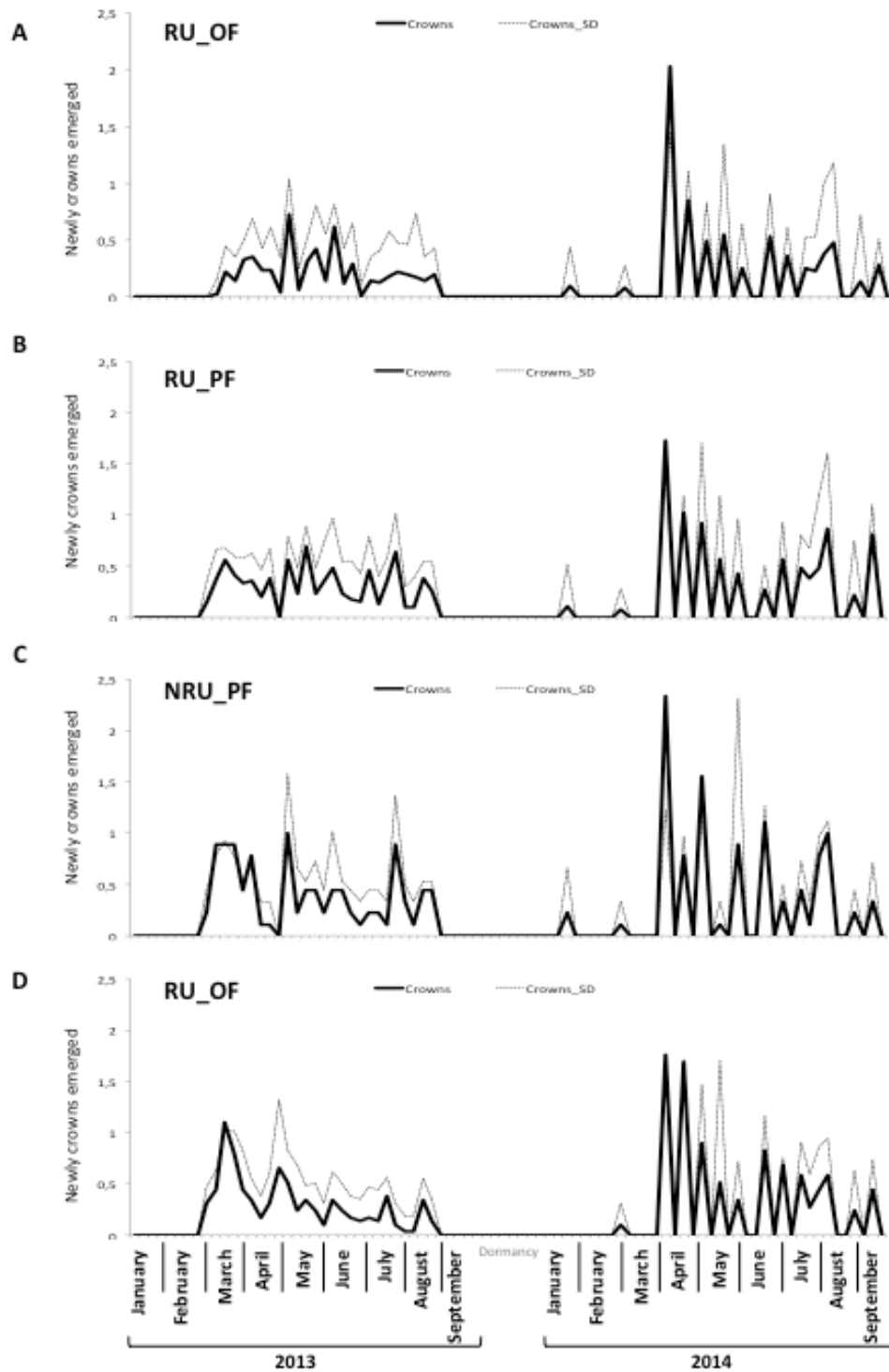
Traits		RU/SF			RU/PF			NRU/PF			NRU/SF		
		Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
2013	Inflorescences	0.08	0.42	0-3	30.05	11.23	10-54	34.67	12.40	11-44	0.034	0.19	0-1
	Runners	58.74	16.33	30-101	18.72	8.23	1-36	0	0	-	0.21	0.68	0-3
	Crowns	5.70	3.97	0-16	8.36	4.58	0-21	10.67	2.55	7-15	8.28	3.93	2-17
	Number of plants	76			39			9			30		
2014	Inflorescences	3.79	3.42	0-18	47.05	17.52	3-87	52.89	13.07	37-79	5.55	3.21	0-14
	Runners	129.67	36.17	7-223	30.41	14.83	1-67	3.22	3.19	0-8	1.55	2.68	0-11
	Crowns	6.99	3.28	2-15	8.95	4.05	2-18	10.33	2.60	8-14	9.41	3.78	3-19
	Number of plants	75			37			9			29		

Supp. Data Table 2. Significant QTL detected by CIM for numbers of stolons, inflorescences and crowns with LOD>LOD threshold. LOD score threshold was estimated by 1000 permutations using linear regression procedure. QTLs are described by: linkage group involved (LG), marker closest to the peak of LOD curve (marker), position (Pos) on the LG, LOD score, individual contribution to the resistance variation (R²) and individual additive effect.

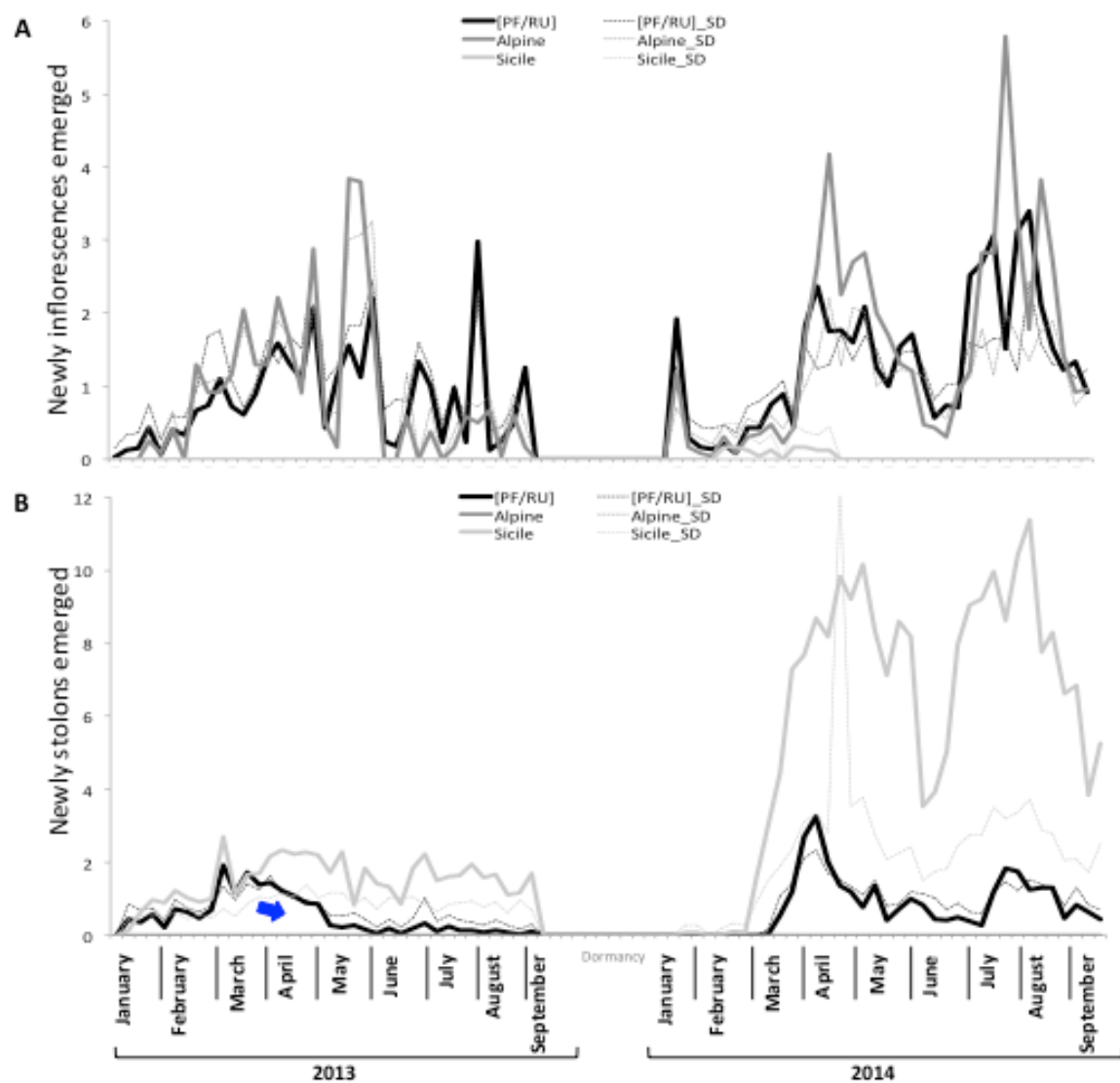
Trais	Years	LG	Markers	Pos (2013-2014)	LOD (2013-2014)	R ²	Effet
Stolon							
Total segregating population	2013-2014	LG2	GA20ox-UFFxa09	0.40 - 0.42	30.0 - 26.4	0.54 - 0.49	-
PF individuals	2013-2014	LG2	GA20ox-UFFxa09	0.40 - 0.42	8.0 - 2.7	0.53 - 0.23	-
Total segregating population	2013-2014	LG4	LG4K2	0.06	3.4 - 4.4	0.05 - 0.07	+
RU individuals	2013-2014	LG4	LG4K2	0.06	3.4 - 4.5	0.07 - 0.09	+
Total segregating population	2013-2014	LG6	TFL1	0.06	14.1 - 16.1	0.24 - 0.28	-
RU individuals	2013-2014	LG6	TFL1	0.06	24.0 - 26.4	0.62 - 0.72	-
Inflorescences							
Total segregating population	2013-2014	LG6	LG6K1-TFL1	0.04 - 0.06	56.4 - 58.2	0.84 - 0.86	+
RU individuals	2013-2014	LG6	LG6K1-TFL1	0.04 - 0.06	41.7 - 40.2	0.82 - 0.86	+
NRU individuals	2013-2014	LG6	LG6K2-LG6K7	0.11 - 0.13	18.5 - 19.4	0.92 - 0.91	+
PF individuals	2014	LG3	LG3K1	0.0	3.5	0.27	+
Crowns							
Total segregating population	2013-2014	LG2	GA20ox	0.04	3.0 - 5.5	0.08 - 0.15	+
Total segregating population	2013-2014	LG6	LG6K3-TFL1	0.05 - 0.06	3.7 - 2.4	0.09 - 0.06	+
RU individuals	2013-2014	LG6	LG6K3-TFL1	0.05 - 0.08	2.7 - 2.4	0.09 - 0.10	+



Supp. Data Figure 1. Weekly production of crowns in parents 'Alpine', a PF and NRU genotype (A); and 'Sicile', a OF and RU genotype (B) in 2013 and 2014. SD = Standard Deviation. $n = 26$ and 24 for Sicile, and 24 and 23 for Alpine, respectively in 2013 and 2014.

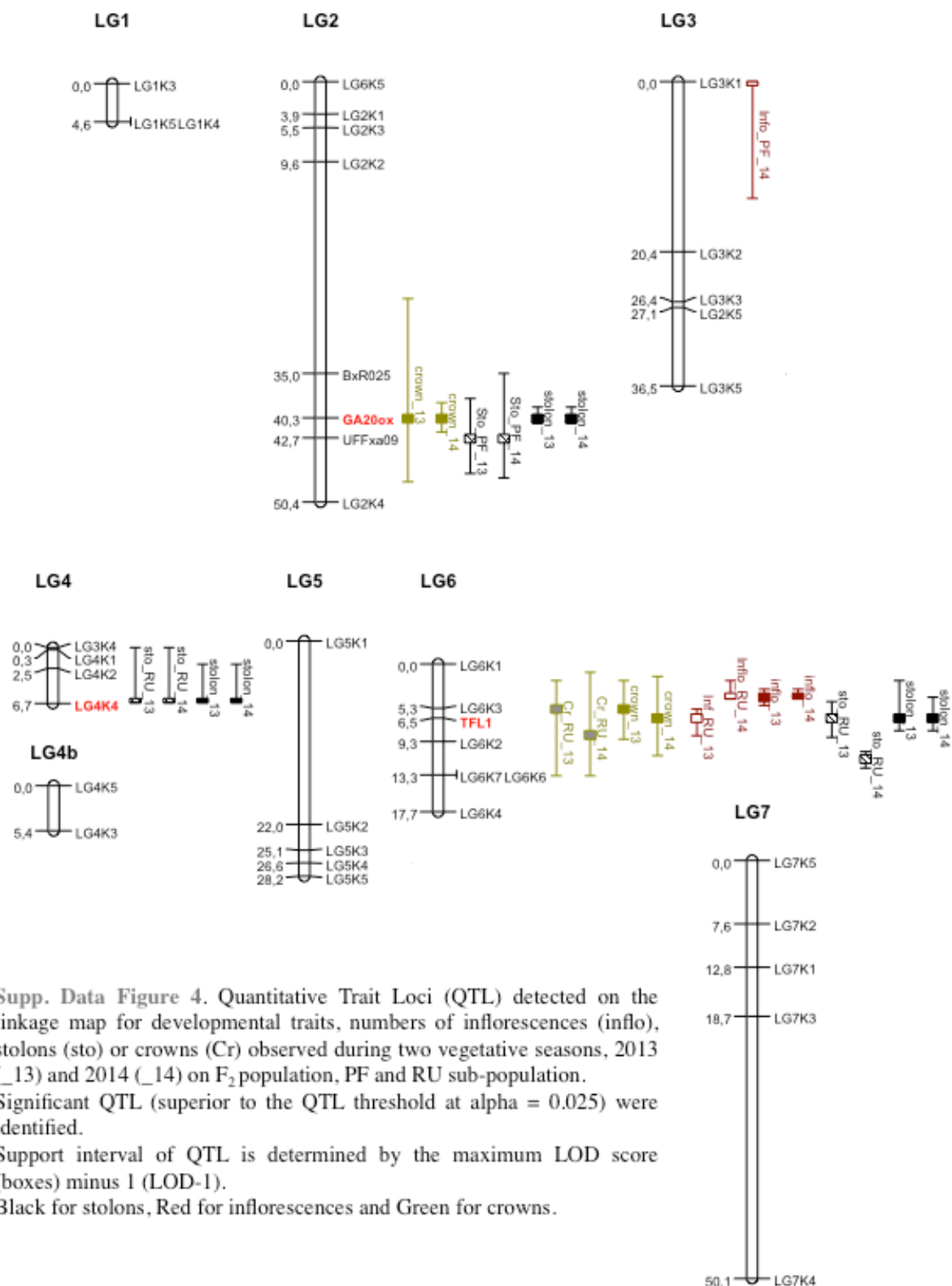


Supp. Data Figure 2. Emergence of newly crowns of the different F_2 phenotypic combinations: (A) Once Flowering/Runnering [RU_OF] with 76 individuals, (B) Perpetual Flowering/Runnering [RU_PF] with 39 individuals, (C) Perpetual Flowering/ Non-runnering [NRU_PF] with 9 individuals and (D) Seasonal Flowering/Non-runnering [NRU_OF] with 30 individuals. Dotted lines represent Standard Deviation (SD).



Supp. Data Figure 3. Weekly emergences of inflorescences (A) and stolons (B) in parents Alpine (dark grey) and Sicile (grey), and in progeny able to the two modes of reproduction [RU_PF] (black).

Blue arrow marks the date of stolons reduction, SD = Standard Deviation.



Chapitre 3 : Discussion générale

IV Discussion générale

En 2012, au commencement de ce travail, le gène responsable du stolonnage n'avait pas été identifié. Cette étude a permis d'identifier ce gène comme codant une protéine impliquée dans la voie de biosynthèse des gibbérellines (GA), *FvGA20ox4*, et sa caractérisation a été initiée (Article 1).

De plus, la balance physiologique entre la reproduction sexuée via la floraison et plus particulièrement la remontée florale, et le stolonnage avait été décrite chez le fraisier cultivé octoploïde où un locus majeur, *FaPFRU*, contrôle cette balance (Gaston *et al.*, 2014). Cette étude a permis de mettre en évidence une interaction entre deux gènes majeurs qui contrôlent les deux processus, la remontée florale et le stolonnage, *FvTFL1* et *FvGA20ox4*. Ces deux locus ne sont pas orthologues au locus *FaPFRU*.

IV.1 *FvGA20ox4* : gène responsable du stolonnage chez le fraisier diploïde *Fragaria vesca*

IV.1.1 Réduction du locus *RUNNERING*

Les approches génétiques de cartographie fine ainsi que de Next Generation Sequencing (NGS) ont permis de réduire le locus *R* à 9 gènes contenant 9 modifications génomiques de type SNP ou insertion/délétion liées au phénotype de non-stolonnage (Article 1, Figure 2). Parmi ces modifications, seules quatre interviennent dans des régions codantes. Bien que les modifications ayant lieu dans les régions non-codantes puissent aussi être intéressantes, les deux gènes qui les portent ne paraissent pas avoir un lien direct avec le stolonnage ou la multiplication végétative (Article 1, Supp. Data Table 3).

Si nous nous focalisons sur les modifications ayant lieu dans des régions codantes, deux gènes sont concernés : un prédit comme une amidotransférase putative et l'autre, le gène *FvGA20ox4*. Six SNP liés au non-stolonnage ont été localisés sur le gène amidotransférase prédit. L'hypothèse de l'alignement de séquences homologues qui présenteraient une forte similarité à la séquence de ce gène, présente sur le LG2 a été retenue car cette famille est multigénique. Notre étude s'est donc focalisée sur le gène *FvGA20ox4*, gène candidat le plus probant.

De plus, plusieurs de ces SNP testés sur les génotypes disponibles de la diversité génétique et sur des individus recombinants de la population Ilaria F₂ n'ont pas permis de diminuer le nombre de SNP en déséquilibre de liaison. Les SNP restant sont en cours d'analyses.

IV.1.2 La non-fonctionnalité du gène *FvGA20ox4* est responsable du phénotype de non-stolonnage

Le gène *FvGA20ox4* a été identifié comme le gène responsable du stolonnage. La délétion dans l'exon 2 de ce gène chez les génotypes non-stolonnant conduit à une protéine contenant trois acides aminés en moins (Article 1, Figure 2). Le lien entre cette délétion et le phénotype non-stolonnant a été confirmé chez les génotypes de diversité génétique, ce qui suggèrent une origine commune du stolonnage chez toutes les *Fragaria vesca*.

De plus, les analyses d'activité enzymatique ont permis de mettre en évidence que la délétion de trois acides aminés entraîne la perte totale d'activité enzymatique. Les apports exogènes de GA actives ont permis d'outre-passer cette non fonctionnalité et de permettre au génotype non-stolonnant la production de stolons. Ces résultats ont confirmé le rôle du gène *FvGA20ox4* comme responsable du stolonnage.

Par la suite, il serait intéressant de confirmer sa fonction via la transformation en système homologue. Néanmoins, la transformation stable du fraisier diploïde est complexe et chronophage. Les rendements obtenus jusqu'à lors sont très faibles. Toutefois, des tests sont en cours afin d'améliorer la technique de transformation. Une autre alternative serait d'utiliser la méthode VIGS (Virus-induced gene silencing) mais là encore, peu d'études ont été effectués sur le fraisier et les rendements de transformation restent faibles (Tian *et al.*, 2013), comme chez d'autres espèces comme la tomate (Quadrana *et al.*, 2011).

IV.1.3 *FvGA20ox4* : action spécifique au niveau des méristèmes axillaires de stolons ?

IV.1.3.a Contrôle du devenir des méristèmes axillaires

L'étude portant sur l'architecture des stades précoces de développement du fraisier diploïde a confirmé les résultats précédents (Guttridge, 1956, Costes *et al.*, 2014) en mettant en évidence l'importance de la localisation des méristèmes axillaires pour déterminer leur devenir (Figure 32).

De plus, l'analyse physiologique menée a permis d'observer des différences intéressantes concernant les méristèmes axillaires entre le génotype stolonnant et non-stolonnant (Article 1, Figure 8). En effet, au niveau des méristèmes axillaires situés à la base du plant, le génotype stolonnant ne présente que des méristèmes de stolons alors que le génotype non-stolonnant ne présente que des méristèmes en élongation qui par la suite nécrosent (Article 1, Figure 8). Ces résultats suggèrent que les plants non-stolonnants initient les stolons mais que l'élongation n'a pas lieu, ce qui pourrait être le rôle du gène *FvGA20ox4*.

Au niveau basal du plant, les méristèmes axillaires se développent soit en stolons soit en cœurs (Figure 32, Costes *et al.*, 2004). Toutefois, de façon générale, le génotype non-stolonnant 'Alpine' présente plus de cœurs que le génotype stolonnant 'Sicile' la première année de développement (Article 2, Figure 4). De plus, les méristèmes stolons sont caractérisés par leur allongement (Savini *et al.*, 2006) alors que les méristèmes axillaires qui deviennent des cœurs ne présentent pas d'élongation et se développeraient en rosette (Perrotte, comm. personnelle).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats tend vers une initiation des stolons chez les deux génotypes, stolonnant et non-stolonnant, et un arrêt de l'allongement chez les plants non-stolonnants qui portent le gène de stolonnage non fonctionnel.

Afin de confirmer cette hypothèse, des observations cytologiques pourront être réalisées chez les deux génotypes 'Reine des Vallées' et NIL 2.39.63 qui partagent le même fond génétique excepté la région chromosomique qui contient le gène *GA20ox4*. En effet, il serait intéressant d'étudier plus en détail les stades de développement des stolons de façon à préciser le moment de l'arrêt de l'allongement des méristèmes axillaires des génotypes non-stolonnant.

De plus, il serait intéressant d'observer les méristèmes axillaires des plants stolonnants qui ont subi des traitements d'apport de GA actives et d'inhibiteur de GA. Ces traitements ont tous deux conduit à un arrêt ou une diminution du stolonnage chez les plants stolonnants (Article 1, Figure 7 ; Figure 37). Il serait intéressant de vérifier si cet arrêt est dû à l'arrêt de l'élongation des méristèmes de stolons et si cet arrêt est accompagné d'une nécrose.

IV.1.3.b FvGA20ox4 : action spécifique aux stolons ?

Le rôle des GA dans l'élongation cellulaire est admis depuis longtemps et comme cité précédemment et nous supposons que tel est le cas au niveau des méristèmes de stolons.

Néanmoins, aucune différence de taille adulte n'a été observée entre les plants non-stolonnants ('Reine des Vallées') où la protéine FvGA20ox4 est non fonctionnelle, et les plants stolonnants (NIL 2.39.63) qui comportent la protéine de stolonnage fonctionnelle (Figure 33).

Ces résultats suggèrent une action spécifique de la protéine au niveau des méristèmes stolons. Toutefois, l'étude de l'expression du gène *FvGA20ox4* chez les deux génotypes a permis de mettre en évidence la présence de transcrits dans tous les organes végétatifs testés (feuille adulte, cœur et stolon) mais aussi au niveau des méristèmes axillaires par hybridation *in situ* (Article 1, Supp. Data Figure 3).

Ainsi, les GA auraient un rôle primordial dans l'allongement des stolons et il serait intéressant d'élucider les mécanismes moléculaires responsables. Nous pouvons supposer qu'un tel processus fait intervenir des gènes cibles des GA impliqués dans l'allongement, mais aussi, d'autres hormones, telles que les cytokinines, impliquées dans la ramification et le devenir des méristèmes axillaires (Davière et Achard, 2015 ; Rameau *et al.*, 2015).

IV.1.4 Antagonisme entre production de cœurs et stolonnage

Les traitements de plants stolonnants avec des GA actives ou un inhibiteur de GA ont montré en plus d'une réduction du stolonnage, une augmentation de la production de cœurs (Figure 38). Ces résultats suggèrent un lien étroit entre les cœurs et les stolons.

Cette observation est confirmée par les analyses QTL menées sur la population en ségrégation. En effet, les deux QTL majeurs, *FvGA20ox4* et *TFL1* agissent sur la production de cœurs, de façon antagoniste avec un effet négatif et positif respectivement.

Le rôle des GA comme activateurs de la floraison notamment chez *A. thaliana* a largement été démontré (Balzquez *et al.*, 1998 ; Eriksson *et al.*, 2006). Néanmoins, chez de nombreuses espèces pérennes, les GA inhibent la floraison comme chez la vigne (Boss et Thomas, 2002) ou le litchi (Chen, 1990) par exemple. Chez les Rosacées, il en est de même avec le cerisier (Lenahan et Whiting, 2006) ou le prunier (Gonzalez-Rossia *et al.*, 2006).

Nos résultats montrent que les GA ont un rôle majeur comme activateur de la multiplication végétative. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus chez la pomme de terre, une autre espèce stolonnante, chez qui les GA entraîneraient une diminution de la tubérisation (Kumar et Wareign, 1974 ; Roumeliotis *et al.*, 2013).

IV.2 Vers une meilleure compréhension de la balance physiologique entre les deux modes de reproduction

Les observations physiologiques des deux parents et des quatre combinaisons phénotypiques de la population en ségrégation montrent une dynamique de production de hampes florales et de stolons par vagues qui paraissent synchronisées (Article 2, Figure 3). Cette dynamique a déjà été observée chez le fraisier cultivé (Gaston *et al.*, 2013).

De plus, on observe dans la totalité de la population ainsi que chez les parents, une nette diminution les deux années, mi-fin juin, plus clairement visible au niveau de la production de stolons (Article 2, Figures 1 et 3). Ce résultat suggère une régulation environnementale forte et conservée entre les génotypes et les années.

IV.2.1 Exemple de la balance physiologique observée

En s'intéressant à la sous-population constituée d'individus capables des deux modes de reproduction (remontant_stolonnant, PF_RU), un exemple concret de la balance entre la remontée florale et le stolonnage est observé uniquement la première année (2013). Chez ces individus, la production de stolons démarre et suit une dynamique similaire à celui du parent non-remontant_stolonnant 'Sicile' dans les premiers mois de développement. Néanmoins, mi-avril, cette production diminue progressivement alors que la production de hampes florales s'accélère (Article 2, Figure 3B). Cette émergence de hampes suit alors une dynamique similaire à celle du parent remontant_non-stolonnant 'Alpine'. Ces observations suggèrent d'une part l'importance d'un contrôle environnemental, et d'autre part, une dominance de la production de hampes florales vis-à-vis de la production de stolons. Ces observations nécessiteraient d'être réitérées afin de savoir si elles sont reproductibles.

IV.2.2 Dominance de la remontée florale sur le stolonnage

Les analyses QTL réalisées sur l'ensemble de la population suggèrent que la production de hampes florales prédomine sur celle de stolons. En effet, le gène *GA20ox* a un effet positif sur le stolonnage sans affecter la production de hampes. A l'inverse, le gène *TFL1* contrôle la remontée florale mais affecte aussi la production de stolons (Article 2, Tableau 3). De plus, l'interaction entre ces deux loci n'est observée que pour la production de stolons et ce, les deux années (Article 2, Tableau 4).

Ces résultats tendent vers une dominance de la remontée florale sur le stolonnage qui peut être expliquée par plusieurs hypothèses :

- i) L'hypothèse la plus simple est que les gènes *TFL1* et *FvGA20ox4* interagiraient de façon directe ou indirecte. Néanmoins, l'extinction par RNAi ou la surexpression du gène *FvTFL1* n'entraîne pas de modification de la quantité de stolons produits, ni de cœurs, en jours courts comme en jours longs (Koskela *et al.*, 2012). Le gène *TFL1* étant contrôlé photopériodiquement (expression en jours longs), les résultats de RNAi et de surexpression suggèrent que *TFL1* n'est pas impliqué dans le contrôle photopériodique du développement végétatif. De plus, en cas de diminution de l'expression du gène *TFL1*, l'apport de GA actives ne semblent pas modifier sa transcription (Mouhu *et al.*, 2013).
- ii) Une autre hypothèse concernerait l'allocation des ressources, et une compétition pourrait être engagée entre ces deux modes, en faveur de la reproduction sexuée dans notre cas.

IV.2.3 Potentiel rôle des gènes *FT* dans la quantité de hampes florales et de stolons?

Les analyses QTL ont permis de mettre en évidence deux QTL potentiellement impliqués dans la quantité des stolons et des hampes florales, *LG4K2* et *LG3K1* respectivement (Article 2, Supp. Data Tableau 2). Le positionnement de ces QTLs sera amélioré avec l'ajout de nouveaux marqueurs qui pourront inclure des SNP sur différents gènes. Il sera particulièrement intéressant de cartographier les trois homologues du gène *FT* : *FT1*, *FT2*, et *FT3*. En effet, le gène *FT2* est localisé au niveau du LG3 entre les marqueurs *LG3K1* et *LG3K2*. Le rôle de ce gène comme florigène n'a pas été montré et son expression est retrouvée uniquement au niveau des bourgeons floraux et des fleurs (Gaston *et al.*, en préparation).

La carte de liaison du LG4 a posé plus de problème. En effet, de par un grand nombre de données manquantes et une mauvaise coordination entre la carte génétique et la carte physique, ce groupe de liaison nécessite là encore une augmentation du nombre de marqueurs pour préciser les analyses QTL. La densification des marqueurs sur ce groupe de liaison est d'autant plus importante que le locus *FaPFRU* responsable d'un effet positif sur la remontée florale et négatif sur la production de stolons est localisée sur ce groupe et dans cette région chez le fraisier octoploïde (Gaston *et al.*, 2013). De plus, ce groupe de liaison présente le gène *FT1* qui pourrait être une composante du florigène (Gaston *et al.*, en préparation).

Conclusion et perspectives

Ces travaux ont permis d'obtenir des informations quant au contrôle génétique et moléculaire du stolonnage, ainsi que d'acquérir des éléments permettant de mieux comprendre la balance entre les deux modes de reproductions du fraisier diploïde.

Par la suite, il serait intéressant d'approfondir ces travaux via la transformation du fraisier diploïde (VIGS, CRIPR Cas9) mais aussi en identifiant les gènes cibles des GA au niveau des méristèmes de stolons.

Les analyses QTL ont quant à elles, permis d'obtenir d'une part des informations novatrices quant à l'interaction entre les deux gènes majeurs, mais aussi d'identifier d'autres zones génomiques potentiellement responsable de la quantité de hampes florales et de stolons. Cette étude sera poursuivie en augmentant le nombre de marqueurs de façon à obtenir des données plus précises.

Références bibliographiques

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5737), 1052–1056.
- Abelenda, J. a., Navarro, C., & Prat, S. (2011). From the model to the crop: Genes controlling tuber formation in potato. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 287–292.
- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., Harberd, N. P. (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 6484–6489.
- Aguilar-Martinez, J. a., Poza-Carrion, C., & Cubas, P. (2007). Arabidopsis BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *The Plant Cell Online*, 19(2), 458–472.
- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., Weigel, D. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO Journal*, 25(3), 605–614.
- Albani, M. C., & Coupland, G. (2010). Comparative analysis of flowering in annual and perennial plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 91(C), 323–348.
- Albani, M. C., Battey, N. H., & Wilkinson, M. J. (2004). The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 109(3), 571–579.
- Andrews, J. H. (1998). Bacteria as modular organisms. *Annual Review of Microbiology*, 52, 105–26.
- Ariizumi, T., Murase, K., Sun, T.-P., & Steber, C. M. (2008). Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *The Plant Cell*, 20(9), 2447–2459.
- Barrett, S. C. H. (2015). Influences of clonality on plant sexual reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), 8859–8866.
- Battey, N. H., & Tooke, F. (2002). Molecular control and variation in the floral transition. *Current Opinion in Plant Biology*, 62–68.
- Battey, N.H., Lemièrre, P., Tehranifar, A., Cekic, C., Taylor, S., Shrives, K.J., Hadley, P., Greenland, A. J., Darby, J. and Wilkinson, M. J. (1998). Genetic and environmental control of flowering in strawberry. *Genetic and Environmental Manipulation of Horticultural Crops*. CAB International Publications, Wallingford, Oxon., UK. 111–131.
- Bergonzi, S., & Albani, M. C. (2011). Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *Journal of Experimental Botany*, 62 (13), 4415–4422.
- Bertelsen MG, Tustin DS, Waagepetersen RP. (2002). Effects of GA3 and GA4+7 on early bud development of apple. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77, 83–90.
- Bishop G.F., Davy A.J. (1985). Density and the commitment of apical meristems to clonal growth and reproduction in *Hieracium pilosella* L. *Oecologia* 66: 417–422.

- Black, B. L.** (2004). Prohexadione-calcium decreases fall runners and advances branch crowns of “Chandler” strawberry in a cold-climate annual production system. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(4), 479–485.
- Blázquez, M. a, Soowal, L. N., Lee, I., & Weigel, D.** (1997). LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development*, 124(19), 3835–3844.
- Blümel, M., Dally, N., & Jung, C.** (2015). Flowering time regulation in crops—what did we learn from Arabidopsis? *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 121–129.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & den Ende, W. Van.** (2013). Sugars, the clock and transition to flowering. *Frontiers in Plant Science*, 4: 22.
- Boss, P. K., Bastow, R. M., Mylne, J. S., & Dean, C.** (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell*, 16, 18–31.
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmölling, T.** (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant Journal*, 44(2), 314–333.
- Brown, T., & Wareing, P. F.** (1965). the Genetical Control of the Everbearing Habit and Three Other Characters. *Geology*, 14.
- Cabrera, A., Kozik, A., Howad, W., Arus, P., Iezzoni, A. F., & van der Knaap, E.** (2009). Development and bin mapping of a Rosaceae Conserved Ortholog Set (COS) of markers. *BMC Genomics*, 10, 562.
- Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martinez, J. L., & Prat, S.** (2000). Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant Journal*, 22, 247–256.
- Carrera, E., Jackson, S. D., & Prat, S.** (1999). Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiology*, 119, 765–774.
- Celton, J.-M., Christoffels, A., Sargent, D. J., Xu, X., & Rees, D. J. G.** (2010). Genome-wide SNP identification by high-throughput sequencing and selective mapping allows sequence assembly positioning using a framework genetic linkage map. *BMC Biology*, 8(1), 155.
- Ceptilis A.** (2001) The importance of sexual and asexual reproduction in the recent evolution of Allium vineale. *Evolution*, 55(8):1581-1591.
- Chardon, F., & Jasinski, S.** (2014). QTL meta-analysis in Arabidopsis reveals an interaction between leaf senescence and resource allocation to seeds. *Journal of experimental botany*, 65(14), 1–14.
- Chen, W.** (1990). Endogenous Growth Substances in Xylem and Shoot Tip Diffusate of Lychee in Relation to Flowering, *HORTSCIENCE* 25(3):314-315.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., ... Coupland, G.** (2005). Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis. *Science*, 316:9–11.
- Costes, E., Crespel, L., Denoyes, Bă©., Morel, P., Demene, M.-N., Lauri, P.-E., & Wenden, Bă.** (2014). Bud structure, position and fate generate various branching patterns along shoots of closely related Rosaceae species: a review. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–11.
- Cowling, R. J., & Harberd, N. P.** (1999). Gibberellins control Arabidopsis hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *Journal of Experimental Botany*, 50(337), 1351–1357.

- Darnell, R., Hancock, J.F.** (1996) Balancing vegetative and reproductive growth in strawberry. *Proceedings of the IV North American Strawberry Conference*, February 15-17, 1995, Gainesville, University of Florida, Orlando, 144-150.
- Darrow, G.** (1966). Everbearing Strawberries. Farmers' Bulletin 901, 1–19.
- Darwish, O., Slovin, J. P., Kang, C., Hollender, C. A., Geretz, A., Houston, S., Liu, Z., Alkharouf, N. W.** (2013). SGR: an online genomic resource for the woodland strawberry. *BMC Plant Biology*, 13, 223.
- Davière, J.-M., & Achard, P.** (2016). A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals. *Molecular Plant*, 4;9 (1):10-20.
- Davière, J.-M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., & Achard, P.** (2014). Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height. *Current Biology*, 24(16), 1923–1928.
- De Camacaro MEP, Camacaro GJ, Hadley P, Battey NH, Carew JG.** (2002). Pattern of growth and development of the strawberry cultivars Elsanta, Bolero, and Everest. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 901–907
- De Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., ... Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451(7177), 480–484.
- Ding, G., Zhao, Z., Wang, L., Zhang, D., Shi, L., & Xu, F.** (2014). Identification and multiple comparisons of QTL and epistatic interaction conferring high yield under boron and phosphorus deprivation in Brassica napus. *Euphytica*, 198(3), 337–351.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P. and Laigret, F.** (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 127–138
- Eckert, C.G. & S.C.H. Barrett.** (1993). Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany* 80:1175-1182
- Eriksson, S.** (2006). GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and Arabidopsis Floral Initiation. *The Plant Cell*, 18, 2172–2181.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., & Yanofsky, M. F.** (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development*, 127(4), 725–734.
- Fischer, M., & Kleunen, M. Van.** (2001). On the evolution of clonal plant life histories. *Evolutionary Ecology*, 565–582.
- Fu, X., & Harberd, N. P.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421(6924), 740–743.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Marín, J. a., Prat, S., Blázquez, M. a., & Alabadí, D.** (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between della proteins in arabidopsis. *Molecular Biology and Evolution*, 27(6), 1247–1256.
- García-Pallas, I., Val, J., & Blanco, A.** (2001). The inhibition of flower bud differentiation in “Crimson Gold” nectarine with GA3 as an alternative to hand thinning. *Scientia Horticulturae*, 90, 265–278.

- Gaston, A., Perrotte, J., Lerceteau-Köhler, E., Rousseau-Gueutin, M., Petit, A., Hernould, M., Rothan, C. & Denoyes, B.** (2013). PFRU, a single dominant locus regulates the balance between sexual and asexual plant reproduction in cultivated strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1837–1848.
- Gocal, G. F. W., Sheldon, C. C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D. J., ... King, R. W.** (2015). GAMYB-like Genes, Flowering, and Gibberellin in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 127, 1682–1693.
- González-Rossia, D., Juan, M., Reig, C., & Agustí, M.** (2006). The inhibition of flowering by means of gibberellic acid application reduces the cost of hand thinning in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.). *Scientia Horticulturae*, 110(4), 319–323.
- González-Schain, N. D., Díaz-Mendoza, M., Zurczak, M., & Suárez-López, P.** (2012). Potato CONSTANS is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner. *Plant Journal*, 70(4), 678–690.
- Greb, T., Clarenz, O., & Scha, E.** (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development*, 17:1175–1187.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z., Powers, S. J., ... Thomas, S. G.** (2006). Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 18, 3399–3414.
- Gubler, F., Chandler, P. M., White, R. G., Llewellyn, D. J., & Jacobsen, J. V.** (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiology*, 129(1), 191–200.
- Guo, J. L., Yu, C. L., Fan, C. Y., Lu, Q. N., Yin, J. M., Zhang, Y. F., & Yang, Q.** (2010). Cloning and characterization of a potato TFL1 gene involved in tuberization regulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(1), 103–109.
- Guttridge, C.G.,** (1959) Evidence for a Flower Inhibitor and vegetative growth promoter in the Strawberry. *Annals of Botany*, N.S Vol.23, No.90,1959.
- Guttridge, C. G., & Thompson, P. A.** (1964). The effect of gibberellins on growth and flowering of *Fragaria* and *Duchesnea*. *Journal of Experimental Botany*, 15(3), 631–646.
- Guttridge, C.G.,** (1956). Photoperiodic promotion of vegetative growth in the cultivated strawberry plant, *Nature*, 178,50-51
- Guttridge, C. G.,** (1985). *Fragaria ananassa*. In: CRC Handbook of Flowering. (Halevy, A. H., Ed.). Volume III. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 16–33
- Guttridge, C.G.,** (1955). Observations on the shoot growth of the cultivated strawberry plant. *Journal of Horticultural Science*, 30,1–11.
- Hanano, S., & Goto, K.** (2011). Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *The Plant Cell*, 23(9), 3172–84.
- Hannapel, D. J.** (2013). A perspective on photoperiodic phloem-mobile signals that control development. *Frontiers in Plant Science*, 4, 295.
- Hanzawa, Y., Money, T., & Bradley, D.** (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), 7748–7753.

- Hartnett, D. C.** (1990). Size-dependent allocation to sexual and vegetative reproduction in four clonal composites. *Oecologia*, 84(2), 254–259.
- Hartnett D.C.**, (1987) Effects of fire on clonal growth and dynamics of *Pityopsis graminifolia* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 74:1737–1743
- Hauvermale, A. L., Ariizumi, T., & Steber, C. M.** (2014). The roles of the GA receptors GID1a, GID1b, and GID1c in sly1-independent GA signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 9(2), e28030.
- Hauvermale, A. L., Tuttle, K. M., Takebayashi, Y., Seo, M., & Steber, C. M.** (2015). Loss of *Arabidopsis thaliana* Seed Dormancy is Associated with Increased Accumulation of the GID1 GA Hormone Receptors. *Plant and Cell Physiology*, 0(0): 1–13.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., & Hake, S.** (2002). The Gibberellin Pathway Mediates KNOTTED1-Type Homeobox Function in Plants with Different Body Plans. *Current Biology*, 12(02), 1557–1565.
- Hedden, P.** (1999). Recent advances in gibberellin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 50(334), 553–563.
- Hedden, P., & Phillips, A.L.** (2000). Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 130–137.
- Hedden, P., & Phillips, A.L.** (2000b). Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5(12), 523–530.
- Hedden, P., & Thomas, S. G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, 444(1), 11–25.
- Heide, O. M. and Sønsteby, A.** (2007). Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Physiologia Plantarum*, 130, 280–289
- Heide, O. M., Stavang, J. a., & Sønsteby, A.** (2013). Physiology and genetics of flowering in cultivated and wild strawberries - A review. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(5020), 1–18.
- Henderson, I. R., Shindo, C., & Dean, C.** (2003). The need for winter in the switch to flowering. *Annual Review of Genetics*, 37, 371–392.
- Henderson, J. T., Li, H.-C., Rider, S. D., Mordhorst, A. P., Romero-Severson, J., Cheng, J.-C., Ogas, J.** (2004). PICKLE acts throughout the plant to repress expression of embryonic traits and may play a role in gibberellin-dependent responses. *Plant Physiology*, 134(3), 995–1005.
- Hepworth, J., & Dean, C.** (2015). Flowering Locus C's Lessons: Conserved Chromatin Switches Underpinning Developmental Timing and Adaptation. *Plant Physiology*, 168(August), 1237–1245.
- Hisamatsu, T., & King, R. W.** (2008). The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3821–3829.
- Hoffmann, T., Kalinowski, G., & Schwab, W.** (2006). RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: A rapid assay for gene function analysis. *Plant Journal*, 48(5), 818–826.
- Hollender, C. A., Geretz, A. C., Slovin, J. P., & Liu, Z.** (2012). Flower and early fruit development in a diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Planta*, 235:1123–1139.

- Holler, L.C., and Abrahamson, W.G.**, (1977) Seed and vegetative reproduction in relation to density in *fragaria virginiana* (Rosaceae). *American Journal of Ecology*, 65, 689-701
- Hytönen, T.** (2009). *Regulation of strawberry growth and development*. PhD Manuscript. Department of Applied Biology Horticulture Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences University of Helsinki Finland.
- Hytönen, T., Elomaa, P., Moritz, T., & Junttila, O.** (2009). Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *BMC Plant Biology*, 9, 18.
- Ito, H., Saito, T.**, (1962). Studies on the flower formation in the strawberry plant I. Effects of temperature on flower formation. *Tohoku J. Agric. Res.* 13, 191–203.
- Iwata, H., Gaston, A., Remay, A., Thouroude, T., Jeauffre, J., Kawamura, K., ... Foucher, F.** (2012). The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant Journal*, 69, 116–125.
- Jackson, S. D.** (1999). Multiple Signaling Pathways Control Tuber Induction in Potato. *Plant Physiology*, 119(1), 1–8.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., ... Weigel, D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, 286 (5446), 1962–1965.
- Kästner, A. & Karrer, G.** (1995) Übersicht der Wuchsformtypen als Grundlage für deren Erfassung in der ‘Flora von Österreich’. *Fl. Austr. Novit.* 3: 1–51.
- Katsumi, M., Foard, D. E., & Phinney, B. O.** (1983). Evidence for the translocation of gibberellin A3 and gibberellin-like substances in grafts between normal, dwarf1, and dwarf5 seedlings of *Zea Mays* L. *Plant Cell Physiology*, 24(3), 379–388.
- King, R. W., Moritz, T., Evans, L. T., Junttila, O., & Herlt, A J.** (2001). Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. *Plant Physiology*, 127, 624–632.
- Klimes L, Klimesova J, Hendriks R, van Groenendal JM.** (1997) Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. The ecology and evolution of clonal plants. Leiden: Backhuys; 1–29.
- Klimešová and Klimeš** (1996) Effects of rhizome age and nutrient availability on carbohydrate reserves in *Rumex alpinus* rhizomes. *Biologia* 51(4):457-461.
- Klimešová, J., & Bello, F.** (2009). CLO-PLA: The database of clonal and bud bank traits of Central European flora. *Journal of Vegetation Science*, 20(3), 511–516.
- Kloosterman, B., Navarro, C., Bijsterbosch, G., Lange, T., Prat, S., Visser, R. G. F., & Bachem, C. W. B.** (2007). StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *Plant Journal*, 52, 362–373.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286(5446), 1960–1962.
- Komeda, Y.** (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 521–535.

- Konsin, M., Voipio, I., and Palonen, P.** (2001). Influence of photoperiod and duration of short-day treatment on vegetative growth and flowering of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 76: 77–82.
- Koornneef, M., C. Alonso-Blanco, A.J.M. Peeters, & W. Soppe.** (1998). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:345–370.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., & van der Veen, J. H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics*, 229(1), 57–66.
- Kosambi, D. D.,** (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172–175.
- Koskela, E. a, Mouhu, K., Albani, M. C., Kurokura, T., Rantanen, M., Sargent, D. J., ... Hytönen, T.** (2012). Mutation in TERMINAL FLOWER1 reverses the photoperiodic requirement for flowering in the wild strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Physiology*, 159(3), 1043–54.
- Krahulec F.,** (1994) Clonal behaviour in closely related plants. *Folia geobotanica* 29(2):277-289
- Kumar S, Stecher G, Peterson D, Tamura K.** (2012). MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics* 28:2685–2686
- Kumar, D., & Wareing, P. F.** (1974). Studies on tuberization of *Solanum andigena*. *New Phytology*, 73, 833–840.
- Lander ES, Botstein D.** (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 1989; 121:185-199.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S., and Newburg, L.** (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1:174–181
- Lange T, Kappler J, Fischer A, Frisse A, Padeffke T, Schmidtke S, Pimenta Lange MJ** (2005) Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings. *Plant Physiology* 139: 213–223
- Lee, H.J., Sook Chung, K., Kim, S., & Ahn, J. H.** (2014). Post-translational regulation of short vegetative phase as a major mechanism for thermoregulation of flowering. *Plant Signaling & Behavior*, 9, e28193.
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M., Lee, I.** (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 14(18), 2366–2376.
- Lee, J., & Lee, I.** (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2247–2254.
- Lee, R., Baldwin, S., Kenel, F., McCallum, J., & Macknight, R.** (2013). FLOWERING LOCUS T genes control onion bulb formation and flowering. *Nature Communications*, 4, 2884.
- Lenahan, O., Whiting, M., & Elfving, D.** (2006). Gibberellic Acid Inhibits Floral Bud Induction and Improves Bing® Sweet Cherry Fruit Quality. *HortScience*, 41(3), 654–659.
- Li, C., Zhang, K., Zeng, X., Jackson, S., Zhou, Y., & Hong, Y.** (2009). A cis element within flowering locus T mRNA determines its mobility and facilitates trafficking of heterologous viral RNA. *Journal of Virology*, 83(8), 3540–3548.

- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C.A., Ito, T., Meyerowitz, E., & Yu, H.** (2008). A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 15(1), 110–120.
- Lord, E.M. and KJ. Eckard.** (1987). Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington navel orange). I. Floral and Inflorescence Ontogeny. *Botanical Gazette* 146:320-326
- Luo, Y., Dong, X., Yu, T., Shi, X., Li, Z., Yang, W., Widmer, A., & Karrenberg, S.** (2015). A Single Nucleotide Deletion in *Gibberellin20-oxidase1* Causes Alpine Dwarfism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 168(3), 930–937.
- Mackay T.F.C.** (2013). Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene-gene interactions. *Nat. Rev. Genet.*, 15(1):22-33.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., & Oda, K.** (2004). dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal*, 37(5), 720–729.
- Mandel, M.A, Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, M.F.** (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature*, vol 360.
- Marín-González, E., Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, a. E., Lee, J. H., Ahn, J. H., Suárez-López, P., & Pelaz, S.** (2015). SHORT VEGETATIVE PHASE up-regulates TEMPRANILLO2 floral repressor at low ambient temperatures. *Plant Physiology*, 169(34), 1214–1224.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., & Schmid, M.** (2007). Export of FT Protein from Phloem Companion Cells Is Sufficient for Floral Induction in Arabidopsis. *Current Biology*, 17(12), 1055–1060.
- Matsoukas, I. G.** (2014). Attainment of reproductive competence, phase transition, and quantification of juvenility in mutant genetic screens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 32.
- Matsoukas, I. G.** (2014). Interplay between sugar and hormone signaling pathways modulate floral signal transduction. *Frontiers in Genetics*, 5, 1–12.
- Matsoukas, I. G., Massiah, A. J., & Thomas, B.** (2012). Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant and Cell Physiology*, 44(0), 1827–1842
- Matsoukas, I. G., Massiah, A. J., & Thomas, B.** (2013). Starch metabolism and antiflorigenic signals modulate the juvenile-to-adult phase transition in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 36(10), 1802–1811.
- McKey, D., Elias, M., Pujol, M. E., & Duputié, A.** (2010). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist* 186(2), 318–332.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M., & Lee, I.** (2005). Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), 292–299.
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., Kim, S.G., & Lee, I.** (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant Journal*, 35(5), 613–623.
- Moon, Y., Chen, L., Pan, R. L., Chang, H., Zhu, T., Maffeo, D. M., & Sung, Z. R.** (2003). EMF genes maintain vegetative development by repressing the flower program in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(3), 681–693.

- Mouhu, K., Kurokura, T., Koskela, E. A., Albert, V. A., Elomaa, P., & Hytönen, T.** (2013). The *Fragaria vesca* homolog of suppressor of overexpression of constans1 represses flowering and promotes vegetative growth. *Plant Cell*, 25(9), 3296–310.
- Nagao, M. A., Ho-a, E. B., & Yoshimoto, J. M.** (1999). Uniconazole retards growth and increases flowering of young *Macadamia* trees. *HortScience*, 34(1), 104–105.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., ... Yamaguchi, I.** (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant Journal*, 46(5), 880–889.
- Navarro, C., Abelenda, J. a., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. a., Tamaki, S., Silva, J., ... Prat, S.** (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, 478(7367), 119–122.
- Noh, B., Lee, S., Kim, H., Yi, G., Shin, E., Lee, M., & Jung, K.** (2004). Divergent Roles of a Pair of Homologous Jumonji / Zinc-Finger – Class Transcription Factor Proteins in the Regulation of *Arabidopsis* Flowering Time. *The Plant Cell*, 16, 2601–2613.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., ... Araki, T.** (2008). Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), 1645–1658.
- Olszewski, N., Sun, T.-P., & Gubler, F.** (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*, 14, 61–80.
- Oosumi, T., Gruszewski, H. A., Blischak, L. A., Baxter, A. J., Wadl, P. A., Shuman, J. L., Veilleux, R.E., & Shulaev, V.** (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*, 223(6), 1219–1230.
- Parcy, F.** (2005). Flowering : a time for integration. *Int. Dev.Biol.*, 49:585–593.
- Phillips, a L., Ward, D. a, Uknes, S., Appleford, N. E., Lange, T., Huttly, a K., ... Hedden, P.** (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108, 1049–1057.
- Plackett, a. R. G., Powers, S. J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Hedden, P.** (2012). Analysis of the Developmental Roles of the *Arabidopsis* Gibberellin 20-Oxidases Demonstrates That GA20ox1, -2, and -3 Are the Dominant Paralogs. *The Plant Cell*, 24:941–960.
- Poethig, R. S.** (2003). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250(4983), 923–930.
- Prati, D., & Schmid, B.** (2000). Genetic differentiation of life-history traits within populations of the clonal plant *Ranunculus reptans*. *Oikos*, 90(3), 442–456.
- Proebsting, W. M., Hedden, P., Lewis, M. J., Croker, S. J., & Proebsting, L. N.** (1992). Gibberellin concentration and transport in genetic lines of pea : effects of grafting. *Plant Physiology*, 100(3), 1354–1360.
- Putterill, J., Laurie, R., & Macknight, R.** (2004). It ' s time to flower : the genetic control of flowering time, *BioEssays*, 26:363–373.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. & Coupland, G.** (1995). The CONSTANS gene of *arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6), 847-857.

- Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., & Benfey, P. N.** (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal*, 18(1), 111–119.
- Rademacher, W.** 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:501–531.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., & Hardtke, C. S.** (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates Arabidopsis Hypocotyl Xylem Expansion. *The Plant Cell*, 23(4), 1322–1336.
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., & Sakr, S.** (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science*, 5, 741.
- Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Juchaux M, Sakr S, Foucher F.** (2012). Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, RoKSN, a rose TFL1 homologue. *Journal of Experimental Botany* 63: 6543–6554.
- Rantanen, M., Kurokura, T., Jiang, P., Mouhu, K., & Hytönen, T.** (2015). Strawberry homologue of TERMINAL FLOWER1 integrates photoperiod and temperature signals to inhibit flowering. *Plant Journal*, 82(1), 163–173.
- Rantanen, M., Kurokura, T., Mouhu, K., Pinho, P., Tetri, E., Halonen, L., Palonen, P., Elomaa, P., & Hytönen, T.** (2014). Light quality regulates flowering in FvFT1/FvTFL1 dependent manner in the woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 271.
- Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S., & Bradley, D. J.** (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, 125(9), 1609–1615.
- Rédei, G.P.** (1962) Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics* 47:443-460.
- Regnault, T., Davière, J.-M., Wild, M., Sakvarelidze-Achard, L., Heintz, D., Carrera Bergua, E., Achard, P.** (2015). The gibberellin precursor GA12 acts as a long-distance growth signal in Arabidopsis. *Nature Plants*, 1(6).
- Reig, C., Farina, V., Volpe, G., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Barone, F., Calabrese, F., Agustí, M.** (2011). Gibberellic acid and flower bud development in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Scientia Horticulturae*, 129(1), 27–31.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S. J., Gong, F., ... Hedden, P.** (2008). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant Journal*, 53(3), 488–504.
- Rinne, P. L. H., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjärvi, J., & van der Schoot, C.** (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3-beta-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *The Plant Cell*, 23, 130–146.
- Risser, G. & Navatel, J.C.,** (1997). La fraise: plants et variétés *CTIFL*.
- Roberts, A. V., Blake, P. S., Lewis, R., Taylor, J. M., & Dunstan, D. I.** (1999). The Effect of Gibberellins on Flowering in Roses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18, 113–119.
- Roumeliotis, E., Kloosterman, B., Oortwijn, M., Lange, T., Visser, R. G. F., & Bachem, C. W. B.** (2013). Down regulation of StGA3ox genes in potato results in altered GA content and affect plant and tuber growth characteristics. *Journal of Plant Physiology*, 170(14), 1228–1234.

- Roumeliotis, E., Kloosterman, B., Oortwijn, M., Visser, R. G. F., & Bachem, C. W. B.** (2013). The PIN family of proteins in potato and their putative role in tuberization. *Frontiers in Plant Science*, 4, 524.
- Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A., Aïnouche, A., Aïnouche, M. L., Olbricht, K., Staudt, G., Richard, L., & Denoyes-Rothan, B.** (2009). Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria L.* (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(3), 515–530.
- Rousseau-Gueutin, M., Lerceteau-Köhler, E., Barrot, L., Simpson, D., ... Denoyes-Rothan, B.** (2008). Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics*, 179(4), 2045–2060.
- Salazar-Garcia, S. and Lovatt, C.J.** (1998). GA3 application alters flowering phenology of ‘Hass’ avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(5):791-797.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-sommer, Z., Yanofsky, M. F., & Coupland, G.** (2000). Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*, *Science*, 288:1613–1617.
- Sargent, D. J., Clarke, J., Simpson, D. W., Tobutt, K. R., Arús, P., Monfort, a., ... Battey, N. H.** (2006). An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1349–1359.
- Sargent, D. J., Davis, T. M., Tobutt, K. R., Wilkinson, M. J., Battey, N. H., & Simpson, D. W.** (2004). A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1385–1391.
- Sargent, D. J., Hadonou, a. M., & Simpson, D. W.** (2003). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. *Molecular Ecology Notes*, 3, 550–552.
- Savini, G., Giorgi, V., Scarano, E., & Neri, D.** (2008). Strawberry plant relationship through the stolon. *Physiologia Plantarum*, 134, 421–429.
- Savini, G., Neri, D., Zucconi, F., & Sugiyama, N.** (2006). Strawberry Growth and Flowering. *International Journal of Fruit Science*, 5, 29–50.
- Schulze, J., Rufener, R., Erhardt, A., & Stoll, P.** (2012). The relative importance of sexual and clonal reproduction for population growth in the perennial herb *Fragaria vesca*. *Population Ecology*, 54, 369–380.
- Searle, I., & Coupland, G.** (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod, *EMBO Journal*, 23:1217–1222.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., & Coupland, G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 20(7), 898–912.
- Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., ... Folta, K. M.** (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43, 109–116.
- Silverstone, A. L., Tseng, T.-S., Swain, S. M., Dill, A., Jeong, S. Y., Olszewski, N. E., & Sun, T.-P.** (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143(2), 987–1000.

- Simpson, D.W. and Sharp, D.S.** (1988). The inheritance of fruit yield and stolon production in everbearing strawberries. *Euphytica*, 38(1), p65-74.
- Simpson, G. G., & Dean, C.** (2002). Arabidopsis, the Rosetta Stone of Flowering Time?, *Science*, 296:285–289.
- Simpson, G. G.** (2004). The autonomous pathway : epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time.
- Simpson, G. G.** (2004). The autonomous pathway: Epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5):570-574
- Skøt, L., Sanderson, R., Thomas, A., Skøt, K., Thorogood, D., Latypova, G., ... Armstead, I.** (2011). Allelic variation in the perennial ryegrass FLOWERING LOCUS T gene is associated with changes in flowering time across a range of populations. *Plant Physiology*, 155, 1013–1022.
- Slovin, J. P., Schmitt, K., & Folta, K. M.** (2009). An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. semperflorens for genomic and molecular genetic studies in the Rosaceae. *Plant Methods*, 5(1), 15.
- Smith, S.M. & Maughan, P.J.** (2014). SNP genotyping using KASPar assays. *Methods Mol. Biol.* 1245, 243-256
- Sønsteby, a., & Heide, O. M.** (2008a). Flowering physiology of populations of *Fragaria virginiana*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(2350), 641–647.
- Sønsteby, A., & Heide, O. M.** (2008b). Temperature responses, flowering and fruit yield of the June-bearing strawberry cultivars Florence, Frida and Korona. *Scientia Horticulturae*, 119, 49–54.
- Soønsteby, a., & Heide, O. M.** (2007b). Long-day control of flowering in everbearing strawberries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2350), 875–884.
- Southwick, S.M., J.T. Yeager, and K.G. Weis.** (1997) Use of gibberellins on ‘Patterson’ apricot (*Prunus armeniaca*) to reduce hand-thinning and improve fruit size and firmness: Effects over three seasons. *J. Hort. Sci.* 72:645–652.
- Staudt, G.** (1989). The species *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Hort.* 265:23-33.
- Steiner, B. L., Armbruster, G. F. J., Scheepens, J. F., & Stöcklin, J.** (2012). Distribution of bulbil- and seed-producing plants of *Poa alpina* (Poaceae) and their growth and reproduction in common gardens suggest adaptation to different elevations. *American Journal of Botany*, 99(12), 2035–2044.
- Stewart, P., & Folta, K.** (2010). A Review of Photoperiodic Flowering Research in Strawberry (*Fragaria* spp.). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 1–13.
- Stuefer, J. F., & Huber, H.** (1999). The role of stolon internodes for ramet survival after clone fragmentation in *Potentilla anserina*. *Ecology Letters*, 2(3), 135–139.
- Suárez-López, P.** (2013). A critical appraisal of phloem-mobile signals involved in tuber induction. *Frontiers in Plant Science*, 4, 253.
- Swain, S. M., Tseng, T.-S., Thornton, T. M., Gopalraj, M., & Olszewski, N. E.** (2002). SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiology*, 129(2), 605–615.

- Takada, S., & Goto, K.** (2003). TERMINAL FLOWER2 , an Arabidopsis Homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, Counteracts the Activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the Vascular Tissues of Leaves to Regulate Flowering Time. *The Plant Cell*, 15, 2856–2865.
- Takhtajan, A.L.** (1980) Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review*, 46:225–359
- Taylor, D. R., Blake, P. S., & Browning, G.** (1994). Identification of gibberellins in leaf tissues of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) grown under different photoperiods. *Plant Growth Regulations*, 15:235–240.
- Taylor, D. R., Blake, P. S., Crisp, C. M., Malling, E., Malling, W., & Me, K.** (2000). Identification of gibberellins in leaf tissues of day-neutral strawberry (*F x ananassa*) cultivars. *Plant Growth Regulations*, 30: 5–7.
- Teichmann, T., & Muhr, M.** (2015). Shaping plant architecture. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–18.
- Telfer, a, Bollman, K. M., & Poethig, R. S.** (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124(3), 645–654.
- Tennessen, J. a., Govindarajulu, R., Ashman, T.-L., & Liston, A.** (2014). Evolutionary Origins and Dynamics of Octoploid Strawberry Subgenomes Revealed by Dense Targeted Capture Linkage Maps. *Genome Biology and Evolution*, 6(12), 3295–3313.
- 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*, 19: 714–716
- Thomas, S.G, Phillips, A.L. and Hedden, P.** (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:4698–4703.
- Thompson, F. L., & Eckert, C. G.** (2004). Trade-offs between sexual and clonal reproduction in an aquatic plant: Experimental manipulations vs. phenotypic correlations. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 581–592.
- Turkington, R.** (1985) Variation and differentiation in poulaption of *Trifolium repens* in permanent pastures. *Studies on plant demography*, 69-82.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., ... Matsuoka, M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693–698.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., ... Yamaguchi, S.** (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195–200.
- Umemura, M., & Takenaka, C.** (2014). Retranslocation and localization of nutrient elements in various organs of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Science of the Total Environment*, 493, 845–853.
- Unterholzner, S. J., Rozhon, W., Papacek, M., Ciomas, J., Lange, T., Kugler, K. G., ... Poppenberger, B.** (2015). Brassinosteroids Are Master Regulators of Gibberellin Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell Preview*, 1–13.
- Vallejo-Marín, M., Dorken, M. E., & Barrett, S. C. H.** (2010). The Ecological and Evolutionary Consequences of Clonality for Plant Mating. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 193–213.

- Vazquez, M. D., Zemetra, R., Peterson, C. J., Chen, X. M., Heesacker, A., & Mundt, C. C.** (2015). Multi-location wheat stripe rust QTL analysis: genetic background and epistatic interactions. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 1307–1318.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., ... Viola, R.** (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10), 833–839.
- Verheul, M. J., Sønsteby, A., & Grimstad, S. O.** (2006). Interactions of photoperiod, temperature, duration of short-day treatment and plant age on flowering of *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Korona.. *Scientia Horticulturae*, 107, 164–170.
- Verhoeven, K. J. F., Casella, G., & McIntyre, L. M.** (2010). Epistasis: obstacle or advantage for mapping complex traits? *PLoS One*, 5(8), e12264.
- Wagner, D., Sablowski, R. W. M., & Meyerowitz, E. M.** (1999). Transcriptional Activation of APETALA1 by LEAFY, 285, 582–585.
- Wagner, D., Sablowski, R. W., & Meyerowitz, E. M.** (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, 285(5427), 582–584.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., ... Schmid, M.** (2013). Regulation of flowering by Threhalose-6-Phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339, 704–708.
- Wang, J., Czech, B., & Weigel, D.** (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138(4), 738–749.
- Weigel, D. & Nilsson, O.**, (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, 377(6549), 495-500.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., & Meyerowitz, E. M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 69(5), 843–859.
- Weiss, D., & Ori, N.** (2007). Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiology*, 144(3), 1240–1246.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309(5737), 1056–9.
- Wilkie, J. D., Sedgley, M., & Olesen, T.** (2008). Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3215–3228.
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M. N., Maier, A., & Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 1209–1220.
- Winkler, E. and Stöcklin J.** (2002). Sexual and Vegetative Reproduction of *Hieracium pilosella* L. under Competition and Disturbance: a Grid-based Simulation Model. *Annals of Botany*, 89(5), 525–536.
- Wiseman, N.J. & Turnbull, C.G.N.**, (1999). Endogenous gibberellin content does not correlate with photoperiod-induced growth changes in strawberry petioles. *Functional Plant Biology*, 26(4), p.359-366.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J., Weigel, D., & Poethig, R. S.** (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750–759.

- Xu, X., Vreugdenhil, D., & Lammeren, a. a. M. V.** (1998). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany*, 49(320), 573–582.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu Rev. Plant. Biol.*, 59:225-251.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., & Poethig, R. S.** (2013). Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *eLife*, 2, 1–15.
- Yoo, S. K., Chung, K. S., Kim, J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., ... Ahn, J. H.** (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(2), 770–778.
- Yu, S., Cao, L., Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Lian, H., Sun, Y., ... Wang, J.-W.** (2013). Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, 2, 1–17.
- Zeevaart, J.A.D** (1976). Physiology of flower formation. *Ann. Rev. of Plant Physiology*, 27:321-348.
- Zentella, R., Zhang, Z.-L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., ... Sun, T.-P.** (2007). Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19, 3037–3057.
- Zhang, L., Li, H., Li, Z., & Wang, J.** (2008). Interactions between markers can be caused by the dominance effect of quantitative trait loci. *Genetics*, 180(2), 1177–1190.
- Zhang, Y., & Zhang, D.** (2007). Asexual and sexual reproductive strategies in clonal plants. *Frontiers of Biology in China*, 2(3), 256–262.

Etude de la balance entre la floraison et le stolonnage chez le fraisier diploïde

Le fraisier diploïde (*Fragaria vesca*, $2n=2x=14$) comporte deux modes de reproduction : la reproduction sexuée via la floraison et la multiplication végétative via la production de stolons. Cette espèce présente également deux types de floraison, non-remontants ou remontants, selon la période d'initiation florale du génotype. Chez le fraisier diploïde, le gène responsable de la remontée florale a été identifié comme étant l'homologue du répresseur floral *TFL1* et celui du stolonnage reste inconnu. L'objectif de cette thèse est d'identifier le gène responsable du stolonnage et de mieux comprendre la balance entre les deux modes de reproduction, sexuée et asexuée, chez le fraisier diploïde.

Un approche de cartographie fine associée à du NGS a permis d'identifier le gène responsable du stolonnage, *FvGA20ox4*. Ce gène intervient dans la voie de biosynthèse des gibbérellines. Les génotypes non-stolonnants présentent une délétion de neuf bases qui ne modifie pas le cadre de lecture du gène. L'observation cytologique des méristèmes axillaires montre que les génotypes mutés présentent un allongement des axillaires comme les génotypes sauvages mais que ces bourgeons nécrosent par la suite. Une étude de l'activité enzymatique de la protéine délétée de trois acides aminés a montré qu'elle était inactive et ne permettrait pas de transformer les précurseurs de GA (GA_{12}) en GA intermédiaires, qui seront convertis en GA actives via d'autres enzymes. Chez les génotypes mutés, un apport de GA_3 permet de restaurer l'émergence de stolons.

L'étude de la balance entre les deux modes de reproduction a été étudiée au sein d'une population en ségrégation pour le stolonnage et la remontée florale. Une approche QTL a permis de confirmer le rôle des gènes *TFL1* et *GA20ox4* dans le devenir des méristèmes en floral ou stolon respectivement et d'identifier deux loci présents sur le LG3 et LG4 impliqués dans la variation quantitative de la floraison ou du stolonnage respectivement. Pour le stolonnage, une interaction forte entre *TFL1* et *GA20ox4* a été mise en évidence par ANOVA. De plus, le suivi hebdomadaire de cette population pendant deux ans a montré que le processus de remontée florale prédominait celui de stolonnage.

En conclusion, les données obtenues permettent une meilleure compréhension du stolonnage et de la balance entre les deux modes de reproduction chez le fraisier diploïde.

Balance between sexual and vegetative reproduction in the diploid woody strawberry

The diploid woodland strawberry ($2n=2x=14$) is a good model for genetic and genomic studies since it presents a small genome completely sequenced and its generation period is short. This species displays two modes of reproduction, sexual with flowering and vegetative through runnering, which is the capacity to form stolon. In addition, this species displays contrasted genotypes for their variation of flowering length because of difference in the period of floral initiation. This trait is under the control of *TFL1*. However, the genetic and molecular control of vegetative reproduction is poorly understood as the one of the balance between the two modes of reproduction. The objective of this work was to characterize the gene responsible of runnering and to decipher genetically and physiologically the balance between the two modes of reproduction.

By developing a strategy combining linkage map, bulks and NGS, we found that runnering is controlled by the gibberellin (GA) oxidase, *FvGA20ox4*. The loss of runnering function is caused by a deletion of nine nucleotides, which does not change the open reading frame of the RNA and leads to a protein shortened by three amino acids. The GA oxidase activity was confirmed in enzymatic activity assays with recombinant protein. In addition, the loss-of-function can be restored by exogenous GA_3 application.

The genetic architecture of the balance between two reproductive modes, sexual and vegetative, was deciphered based on QTL approach. Results showed that, beside the known roles of *TFL1* and *GA20ox4* genes in promoting perpetual flowering and runnering processes respectively, two loci localized on LG4 and LG3 were linked to the quantitative responses of these processes. In addition, *TFL1* and *GA20ox4* genes showed epistatic interaction, and the process of flowering was maintained as priority over runnering, which decreased.

These results provided new insight in the genetic control of the relationship between sexual and vegetative reproduction.

Key words: stolons, runnering, gibberellins pathway, epistatic interaction, Fragaria
