



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Biosciences végétales*

---

Présentée et soutenue par *Pierre-Marc DELAUX*  
Le 22 septembre 2011

**Titre :** *Rôles des strigolactones et évolution des compétences mycorhiziennes dans la lignée verte*

---

### JURY

*Mme, Valérie Legué, Maître de conférences, Nancy*  
*M. Daniel Wipf, Professeur d'Université, Dijon*  
*M. Jérôme Chave, DR CNRS, Toulouse*  
*M. Jean-Pierre Vors, Responsable d'équipe de Recherche Bayer CropScience, Lyon*  
*Mme Nathalie Séjalon-Delmas, Maître de Conférences, Toulouse*  
*M. Guillaume Bécard, Professeur d'Université, Toulouse*

---

**Ecole doctorale :** *SEVAB*

**Unité de recherche :** *Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales*  
**Directeur(s) de Thèse :** *M. Guillaume Bécard et Mme Nathalie Séjalon-Delmas*  
**Rapporteurs :**



## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Nathalie qui m'a donné la petite étincelle qui un jour m'a entraîné dans le monde de la recherche.

Je remercie également chaleureusement Guillaume, Christophe, Soizic et Virginie pour leurs conseils et soutiens pendant mes années passées dans l'équipe. Je souhaite également remercier Jean-Phi pour son peps !

A tous les membres du LRSV, pour les discussions scientifiques, les bonjours anonymes dans le couloir ou les franches parties de rigolades.

A tous mes amis du « bureau 50 » Coline, Alex, Domi, Jérôme, Damien, Marion, Jojo, un grand merci pour votre bonne humeur et l'ambiance dans laquelle vous m'avez permis d'évoluer au quotidien.

A mes amis et ma grande famille, et tout particulièrement mes parents, pour votre affection et vos encouragements.

Enfin, à Coralie ma femme, Arthur et Maddie mes deux merveilleux enfants, pour votre amour.



Pour Coralie,  
Arthur  
et Maddie



## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>I. La lignée verte (Viridiplantae)</b> .....	<b>13</b>
1. Endosymbiose primaire .....	13
2. Les Chlorophytes .....	13
3. Les Charophytes .....	15
A. Les Charophytes basales .....	15
B. Les Coleochaetales et les Charales .....	17
4. Les Plantes terrestres .....	19
A. Les Bryophytes .....	21
B. Les plantes vasculaires (trachéophytes).....	23
<b>II. La symbiose endomycorhizienne à arbuscules</b> .....	<b>25</b>
1. Le partenaire végétal .....	27
2. Les champignons endomycorhiziens à arbuscules : les Glomérormycètes .....	29
3. La phase pré-symbiotique.....	31
A. Le Signal végétal : du « Branching Factor » aux strigolactones.....	33
a. Caractérisation du « Branching Factor ».....	33
b. Structure des strigolactones.....	35
c. Mode d'action des strigolactones.....	37
d. Synthèse des strigolactones.....	39
e. Les strigolactones : une nouvelle classe d'hormones végétales.....	39
B. Le Signal fongique : des facteurs Nod aux Myc-LCOs.....	43
a. Les facteurs Nod.....	43
b. La voie CSP (Common Symbiosis Pathway).....	43
c. Caractérisation des Myc-LCOs .....	45
4. La phase symbiotique .....	47
<b>III. Objectifs de la thèse</b> .....	<b>51</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>55</b>
<b>Chapitre 1 : Origine évolutive des strigolactones dans la lignée verte</b> .....	<b>57</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>57</b>
1. Le test de ramification des hyphes de <i>Gigaspora rosea</i> .....	59
2. Spectrométrie de masse à haute sensibilité.....	61
3. Phylogénie de la voie de biosynthèse .....	61
<b>II. Article : Evolutionary origin of strigolactones in the green lineage</b> .....	<b>63</b>
<b>III. Conclusion</b> .....	<b>113</b>
<b>Chapitre 2 : Effet des strigolactones sur le développement racinaire d'<i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>115</b>





<b>I. Introduction .....</b>	<b>115</b>
<b>II. Article : Strigolactones affect lateral root formation and root hair elongation in <i>Arabidopsis</i> .....</b>	<b>119</b>
<b>III. Conclusion .....</b>	<b>145</b>
<b><i>Chapitre 3 : Evolution des mécanismes de régulation de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules .....</i></b>	<b><i>149</i></b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>149</b>
<b>II. Step-by-step evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the green lineage</b>	<b>153</b>
<b>III. Conclusion .....</b>	<b>185</b>
<b><i>Discussion-perspectives .....</i></b>	<b><i>189</i></b>
<b>I. Un schéma évolutif différent pour chaque élément de la régulation de l'établissement de la symbiose .....</b>	<b>189</b>
1. Présentes dès les algues .....	189
2. Spécifiques des plantes terrestres .....	191
3. Apparues au cours de l'évolution des plantes terrestres .....	191
<b>II. Le cas particulier des strigolactones .....</b>	<b>193</b>
1. Quels organismes pour quelle approche ? .....	193
2. Déterminer le point de départ de l'évolution des strigolactones .....	197
3. Conservation des strigolactones le long de la lignée verte .....	199
<b>III. Les strigolactones : des molécules aux multiples facettes .....</b>	<b>201</b>
1. Des molécules contrôlant le développement des plantes.....	201
A. Evolution de la fonction hormonale des strigolactones .....	201
B. Mécanisme d'action des strigolactones .....	207
2. Les strigolactones : un acteur de l'établissement de la symbiose MA .....	209
A. . Phase pré-symbiotique .....	209
B. La phase symbiotique .....	213
<b><i>Conclusion .....</i></b>	<b><i>215</i></b>
<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b><i>221</i></b>



# Introduction



# Introduction

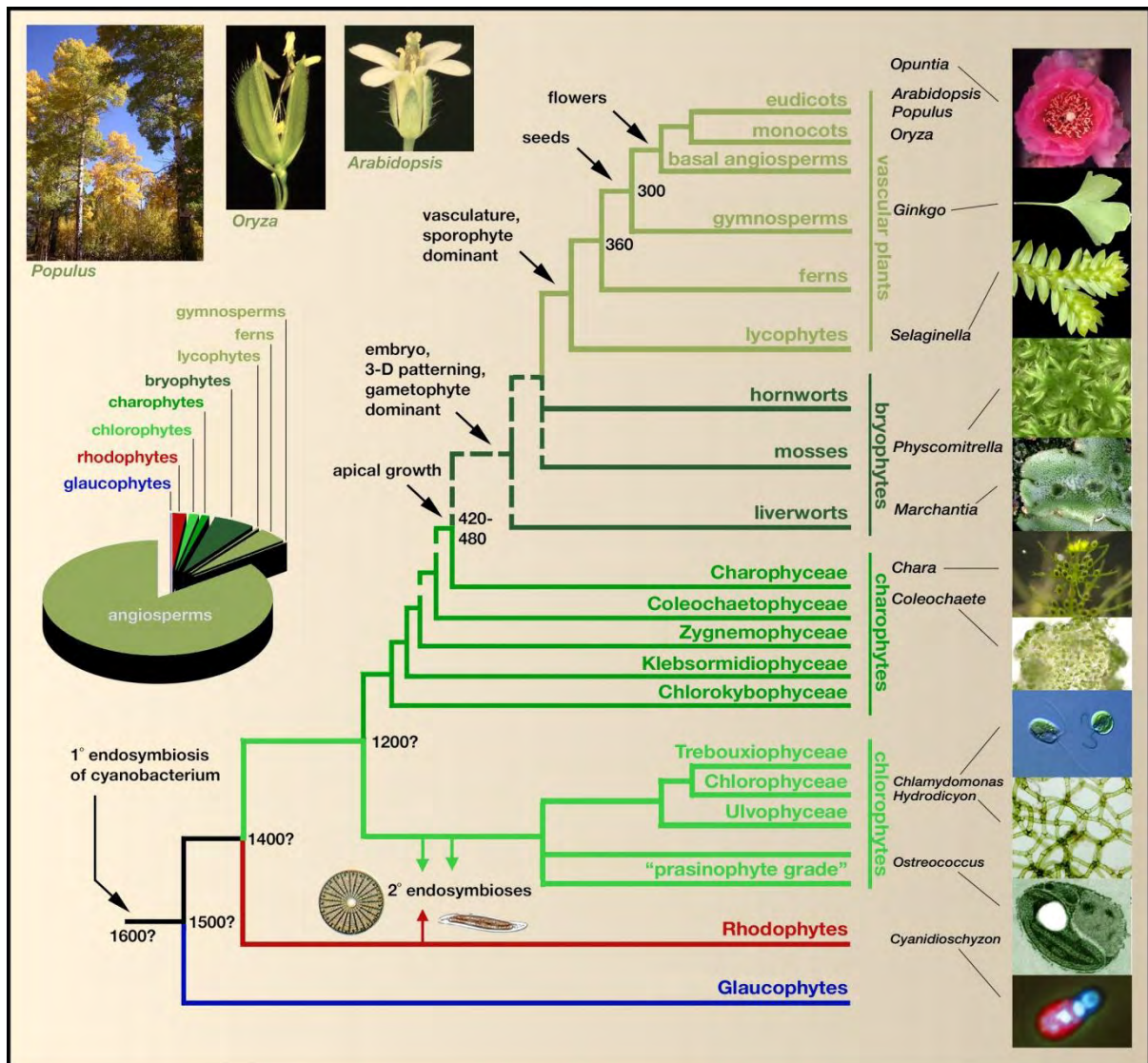
## I. La lignée verte (Viridiplantae)

### 1. Endosymbiose primaire

L'acquisition du chloroplaste par l'ancêtre commun des organismes de la lignée verte, un protiste unicellulaire, s'est vraisemblablement faite via l'internalisation d'une bactérie photosynthétique appartenant au groupe ancêtre des cyanobactéries. Cette internalisation dans la cellule hôte n'aurait pas entraîné la digestion de la cyanobactérie à des fins nutritives comme dans le cas d'une phagocytose, mais aurait conduit à son intégration et à la formation d'une endosymbiose primaire stable (pour review Reyes-Prieto et al., 2007). L'organelle résultant de cette endosymbiose primaire, capable de photosynthèse, a été maintenu tout au long de la lignée verte (Viridiplantae). Des analyses suggèrent que cette étape endosymbiotique de l'évolution des plantes se serait déroulée durant le Mésoproterozoïque, il y a 1,5 milliard d'années (Hedges et al., 2004; Yoon et al., 2004). Très rapidement (725-1200 MYA), la lignée verte a ensuite divergé en deux clades : les Chlorophytes et les Streptophytes (Fig 1; Hedges et al., 2004; Yoon et al., 2004).

### 2. Les Chlorophytes

Les Chlorophytes sont des algues vertes, majoritairement aquatiques bien que certaines comme *Pleurococcus* aient colonisé le milieu terrestre, réparties en quatre sous familles : les Prasinophyceae (e.g. *Ostreococcus*, *Micromonas*), les Trebouxiophyceae (e.g. *Chlorella*), les Ulvophyceae (e.g. *Ulva*) et les Chlorophyceae (e.g. *Chlamydomonas*, *Volvox*)



**Fig. 1. La lignée verte (Viridiplantae).** La lignée verte est composée de deux grands clades: les Chlorophytes et les Streptophytes. On retrouve des algues vertes dans les deux clades, les plantes terrestres étant toutes regroupées chez les Streptophytes. Adapté de Floyd et al. (2007).

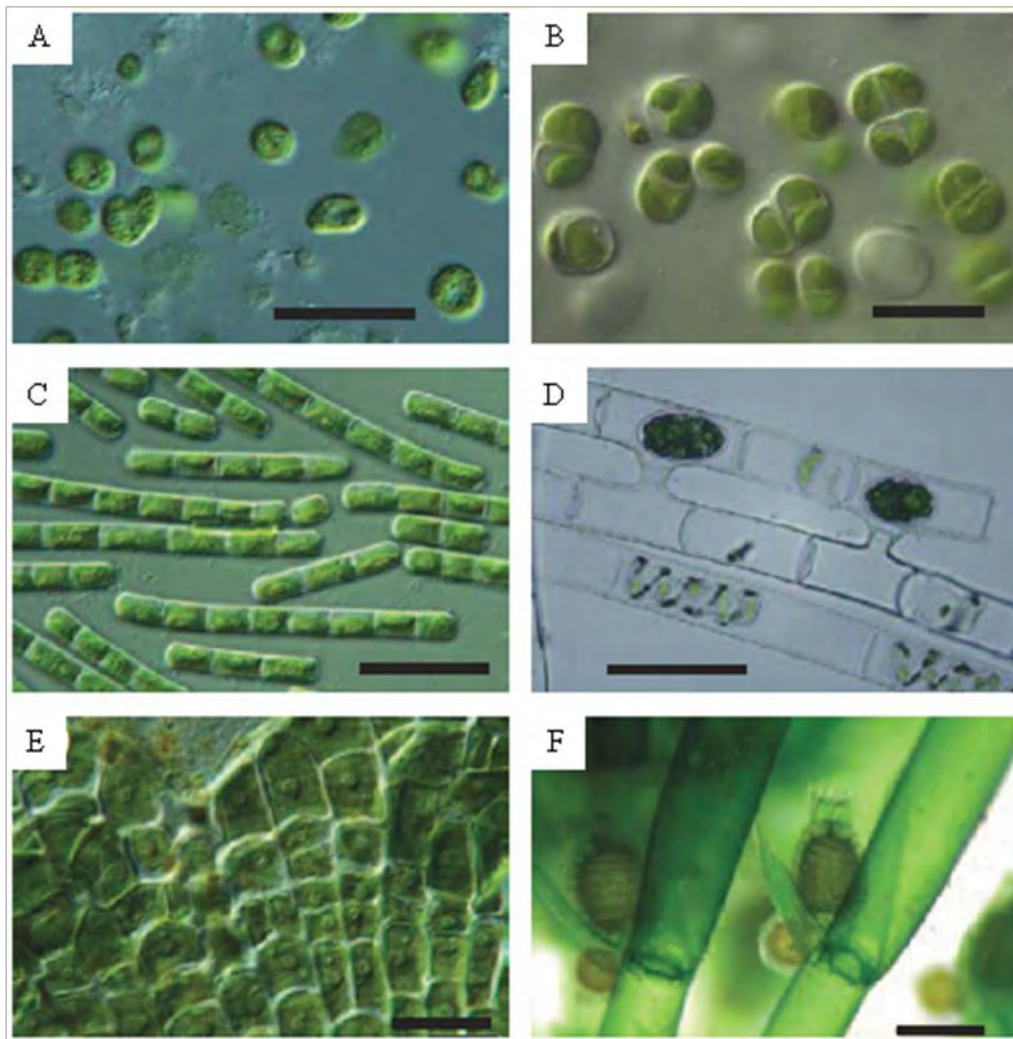
(Fig.1; Becker & Marin, 2009). Si la majorité de ces algues sont unicellulaires, des formes pluricellulaires sont retrouvées chez les Ulvophyceae et les Chlorophyceae. Chez les Chlorophyceae, le cas de *Volvox* est particulièrement intéressant. En effet, cette algue se développe en colonie composée de cellules somatiques biflagellées (plusieurs milliers) et de quelques cellules germinales ( $\pm 16$ ). Selon la théorie coloniale, cette algue a longtemps été considérée comme une forme intermédiaire de la pluricellularité. Le génome de *Volvox carteri*, récemment séquencé, ne présente pas plus de gènes que celui de l'algue Chlorophyceae unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* suggérant que l'émergence et le maintien de la multicellularité, dans ce clade au moins, est lié au recrutement de gènes préexistants et non à l'émergence de nouvelles voies de régulation (Prochnik et al., 2010). De plus, la pluricellularité n'est apparue que tardivement chez les Chlorophytes, suggérant une apparition indépendante de ce caractère chez les Chlorophytes et les Streptophytes.

Le clade des streptophytes regroupe à la fois les plantes terrestres et les algues vertes d'eau douce, les Charophytes. Les Charophytes englobent six ordres d'algues vertes : les Mésostigmales, les Chlorokybales, les Klerbsormidiales, les Zygnématales, les Coléochaetales et les Charales (Fig 2).

### 3. Les Charophytes

#### A. Les Charophytes basales

Les Mesostigmales comme les Chlorokybales sont des taxons monotypiques représentés respectivement par *Mesostigma viride* et *Chlorokybus atmophyticus*. Ces deux algues sont unicellulaires et flagellées et ressemblent fortement à certaines Chlorophytes. Ainsi, leur position phylogénétique est-elle restée longtemps incertaine. Les phylogénies moléculaires récentes les relient aujourd'hui sans ambiguïté aux Charophytes (Fig. 2A, B; Turmel et al., 2007; Finet et al., 2010).



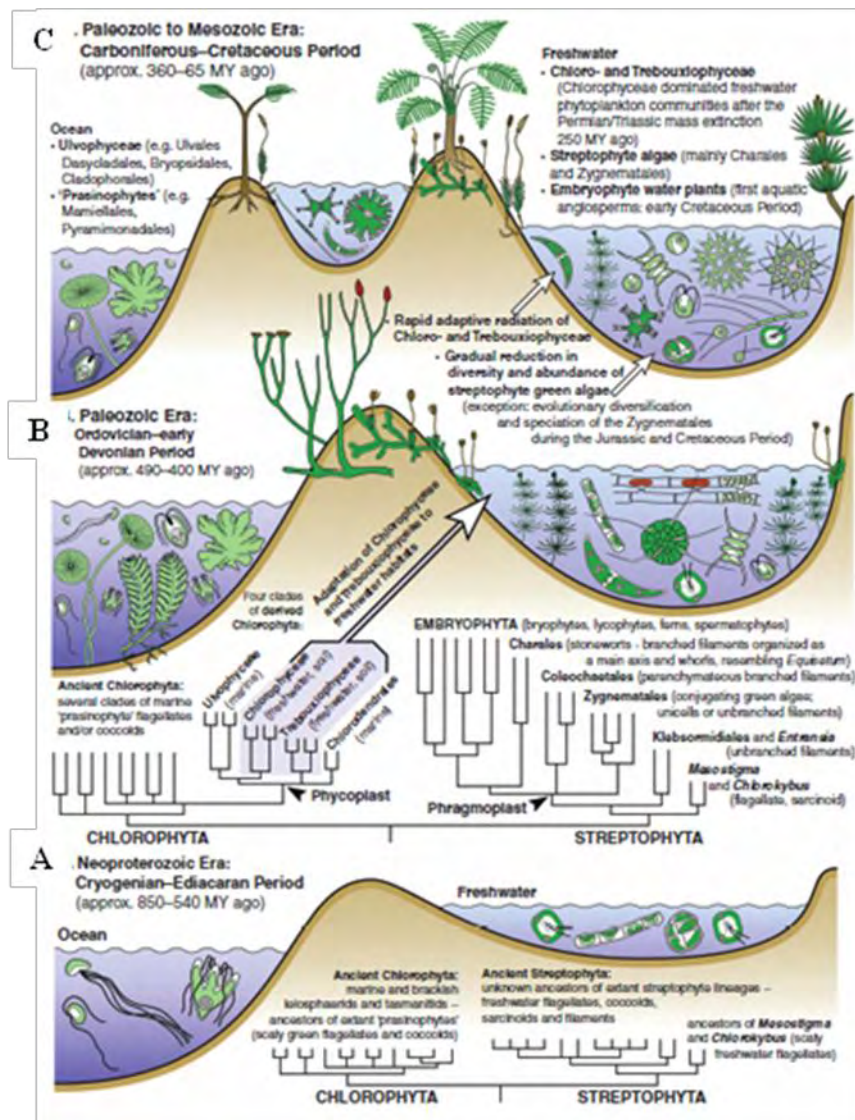
**Fig. 2. Les Charophytes.** A) *Mesostigma viridae* (Mesostigmales), B) *Chlorokybus atmophyticus* (Chlorokybales), C) *Klerbsormidium sp.* (Klerbsormidiales), D) *Spyrogira sp.* (Zygnematales), E) *Coleochaete pulvinata* (Coléochaetales), et F) *Chara braunii* (Charales). Les barres représentent 32  $\mu\text{m}$  pour les photos A), B), C) et E), 64  $\mu\text{m}$  pour la photo D) et 1 mm pour la photo F). Adapté de McCourt et al. (2004).



Les premières Charophytes pluricellulaires appartiennent au groupe des Klerbsormidiales. Ce groupe comprend une trentaine d'espèces réparties dans deux genres (*Kolellia* et *Klerbsormidium*). Les Klerbsormidiales sont formées de courts filaments (Fig. 2C). Les Zygnématales, avec ses 4000 espèces réparties dans 54 genres, représentent le plus gros groupe des Charophytes (McCourt et al., 2004). Leur structure peut être filamenteuse, contenant des chloroplastes organisés sous forme d'hélice comme chez *Spirogyra* (Fig. 2D), ou composées de deux cellules séparées par un isthme et entouré d'une paroi formant une structure très élaborée (*Desmidiiales*).

### ***B. Les Coleochaetales et les Charales***

Les Coleochaetales ne comportent que deux genres: *Coleochaetes* et *Chaetospheridium*. Ces algues se présentent sous forme de disques de cellules croissant radialement (Fig. 2E, Dupuy et al., 2010). Par ailleurs les *Coleochaetes* sont les seules algues dont le zygote est connu pour être protégé par une couche de sporopollenine, ce caractère étant partagé avec les spores de bryophytes (Delwiche et al., 1989). Enfin, les Charales présentent le développement le plus complexe. En effet, ces algues ont un port largement ramifié où les entre-nœuds sont composés d'une cellule filamenteuse géante plurinucléée de plusieurs centimètres de longueur (Fig. 2F). Des ramifications sont initiées au niveau de chaque nœud. A la base de ces filaments, des rhizoïdes, structurellement similaire à ceux des Hépatiques unicellulaire à croissance apicale (Braun, 1996), leur permettent de s'ancrer au substrat. Ces rhizoïdes apparus avec les Charales ont vraisemblablement joué un rôle prépondérant dans la conquête du milieu terrestre par l'ancêtre commun des Charophytes et des plantes terrestres (McCourt et al., 2004). Dans la suite de notre travail nous reviendront sur ces rhizoïdes en relation avec les strigolactones. La phylogénie des taxons basaux des Charophytes (*Mesostigma*,



**Fig. 3. Diversification de la lignée verte et colonisation du milieu terrestre.** La colonisation du milieu terrestre s'est effectuée en trois étapes majeures. (A) Evolution des algues vertes dans les eaux marines (Chlorophytes) et les eaux douces (Charophytes). (B) Colonisation du milieu terrestre par les Charophytes et (C) Large diversification aussi bien sur terre que dans les étendues marines et d'eau douce. Adapté de Becker & Marin (2009).

*Chlorokybus*, *Klerbsormidiales*), basée sur des séquences mitochondriales (Turmel et al., 2007) ou chloroplastiques (Lemieux et al., 2007) est relativement bien documentée (Karol et al., 2001; Finet et al., 2010). En revanche, la position des Coleochaetales et des Charales comme clade le plus étroitement lié aux plantes terrestres est plus discutée. Ainsi, la comparaison du génome mitochondrial de *Chara sp.* (Charales) avec ceux de cinq organismes, aussi bien charophytes que plantes terrestres, soutient l'hypothèse d'un ancêtre commun aux Charales et aux Hépatiques (Turmel et al., 2003). Cette hypothèse est également soutenue par une étude portant sur la comparaison de gènes nucléaires (SSU), mitochondriaux (*nad5*) et chloroplastiques (*atpB* et *rc1b1*), soit plus de 5000 nucléotides, de 34 Streptophytes et cinq Chlorophytes (Karol et al., 2001). Une autre hypothèse, plus récente, propose que les Coléochaetales représenteraient le taxon le plus proche des embryophytes. Elle s'appuie sur l'analyse du génome chloroplastique de *Chara sp.* (Turmel et al., 2006) et sur une récente étude phylogénétique portant sur l'étude de 77 gènes nucléaires chez 77 plantes (Finet et al., 2010). Savoir quel ordre des Charophytes est réellement le plus proche des plantes terrestres, est un point clés à élucider pour une résolution globale de la phylogénie de la lignée verte. Seul le séquençage total du génome d'organismes charnières appartenant aux Charales, Coléochaetales et Hépatiques permettra de clarifier ce nœud de la lignée verte.

#### **4. Les Plantes terrestres**

La colonisation du milieu terrestre par les plantes (Bryophytes et plantes vasculaires) représente une évolution majeure de la lignée verte, et de l'évolution du vivant en général. Pour permettre cette colonisation, les plantes ont dû s'adapter aux facteurs inhérents à la vie hors du milieu aquatique (déficience hydrique, pauvreté nutritionnel des sols, UV, présence de pathogènes, etc) en modifiant leur développement et leur organisation pour optimiser les interfaces avec le milieu, ces modifications s'étant probablement faites par étapes successives.



Becker et Marin (2009) proposent ainsi une hypothèse selon laquelle la colonisation du milieu terrestre s'est effectuée en plusieurs stades (Fig 3). Les algues vertes marines auraient dans un premier temps colonisé les eaux douces où elles auraient évolué pour donner les Charophytes (Becker & Marin, 2009). De cette façon, les Charophytes se seraient « pré-adaptées » au milieu terrestre. L'ancêtre commun des Charales ou des Coleochoetales et des plantes terrestres auraient ainsi dérivé de cette pré-adaptation (Becker & Marin, 2009). Curieusement, cette colonisation semble n'avoir eu lieu qu'une seule fois avec succès. En effet, les plantes terrestres constituent un groupe monophylétique. Et, si certains Chlorophytes ou Charophytes basales peuvent être retrouvées en milieu terrestre (McCourt et al., 2004; Jobson & Qiu, 2011), leur dissémination reste très limitée. Elle n'égale en rien la large distribution et la très remarquable adaptation au milieu terrestre des embryophytes. Une hypothèse voudrait que les tentatives ultérieures de conquête se soient heurtées à la compétition avec les plantes terrestres déjà présentes et adaptées aux contraintes de la vie terrestre (Becker & Marin, 2009).

### ***A. Les Bryophytes***

Le clade des Bryophytes comprend les Hépatiques, les mousses *sensu stricto* et les Anthocérotes. Les Hépatiques actuelles sont considérées comme les descendantes directes des premières plantes terrestres qui auraient divergées il y a 450 MA. En effet, des tétrades de spores fossilisées (Gray & Boucot, 1971) semblables à celles des Hépatiques actuelles ont été datées de l'Ordovicien moyen (approximativement -476 millions d'années), ce qui en fait les plus anciens fossiles de plante. De plus, des fragments de plantes fossilisées contenant des spores similaires ont été daté de la même période (Wellman et al., 2003). En 1998, Qiu et al. renforçait l'hypothèse à travers une étude phylogénétique à grande échelle portant sur l'analyse de trois introns mitochondriaux (*cox2.i3*, *cox2.i4* et *nad1.i4*) chez plusieurs centaines de plantes terrestres et d'algues (Qiu et al., 1998). Les Hépatiques sont divisées en



**Fig. 4. Les Bryophytes.** (A) Gamétophores de *Physcomitrella patens*, adapté de Menand et al. (2007). (B) Thalle de *Marchantia sp.* Dans les deux cas la flèche rouge indique les rhizoïdes, alors que la flèche noire indique la tige feuillée (*Physcomitrella*) ou la lame chlorophyllienne (*Marchantia*)

trois classes: Haplomitriopsida (*e.g. Haplomitrium, Treubia*), Jungermanniopsida et Marchantiopsida (*e.g. Blasia, Marchantia*). Les thalles des Hépatiques sont soit composés d'une lame chlorophyllienne et de rhizoïdes (Fig. 4A, Marchantiopsida et Jungermanniopsida anacrogynes), soit d'une tige feuillée (Haplomitriopsida et Jungermanniopsida acrogynes). La dissémination s'effectue via des spores, ou par multiplication végétative avec la formation de propagules appelées *gemmae*.

Après les Hépatiques, le deuxième clade ayant divergé comprend les mousses *sensu stricto*, représentées majoritairement par les Bryophytina, les Takakiophytina et les Sphagnophytina. Le développement de ces mousses passe par la germination d'une spore qui développe un protonema constitué de filaments composés de chloronema (cellules riches en chloroplastes) et de caulonema (pauvre en chloroplaste et paroi oblique). Sur ce protonema des bourgeons vont émerger et former le gamétophore. Le gamétophore est constitué d'une tige feuillée et de rhizoïdes (Fig. 4B). Par la suite, le sporophyte se développe sur le gamétophore et les spores fécondées sont disséminées.

Enfin, les Anthocérotes (Leiosporocerotopsida et Anthocerotopsida) représentent un troisième groupe ayant divergé encore plus tardivement. Leur gamétophyte est formé d'un thalle de un à deux centimètres de diamètre sous lequel se développe des rhizoïdes. Le sporophyte émerge ensuite et produit les spores.

Si *Marchantia polymorpha* (génomme en cours de séquençage, transformation possible par agrobactéries ou biolistique) et *Physcomitrella patens* (génomme publié en 2008, transformation par recombinaison homologue) sont respectivement utilisés comme organismes modèles pour représenter les Hépatiques et les mousses, aucun modèle d'étude n'a encore émergé chez les Anthocérotes (Langdale, 2008).

## ***B. Les plantes vasculaires (trachéophytes)***





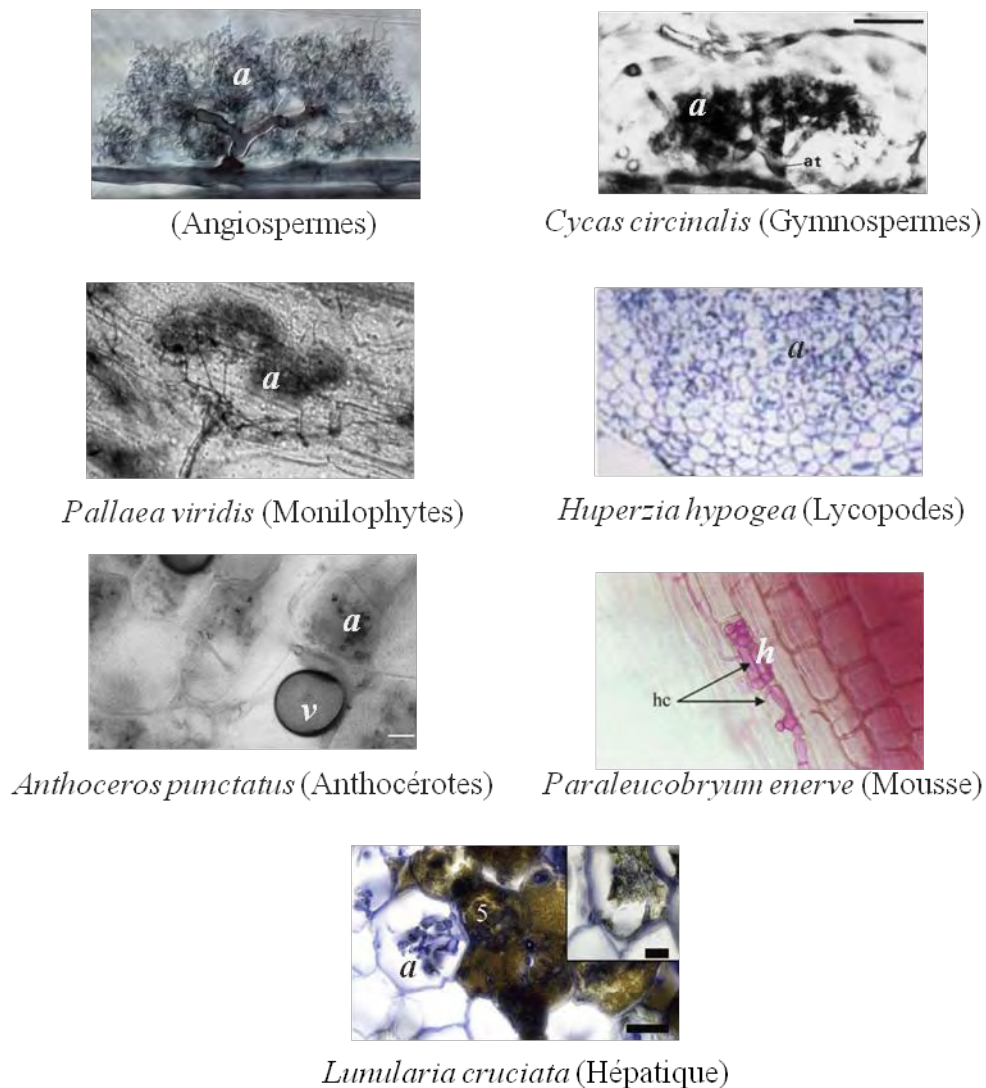
Après la conquête du milieu terrestre, de nouvelles structures ont émergé en réponse notamment à la compétition pour la source lumineuse. L'allongement des tiges (centimètres, puis mètres) a nécessité la mise en place d'un système de vascularisation permettant le transport sur de longues distances de l'eau et des nutriments puisés dans le sol.

Les plantes vasculaires, ou trachéophytes, comprennent quatre groupes: les Lycophytes, dont *Selaginella moellendorffii*, les Monilophytes comme *Pteridium* ou *Ceratopteris*, les Gymnospermes (*Cycads*, *Gingko* et *Conifères*) et les Angiospermes monocotylédones ou dicotylédones. Ces trois derniers groupes (Monilophytes, Gymnospermes et Angiospermes) formant les Euphylllophytes. Si la vascularisation (trachéïdes) n'est probablement apparue qu'une seule fois, chez l'ancêtre commun des Lycophytes et des Euphylllophytes, d'autres innovations développementales ont émergé indépendamment au cours de l'évolution. Ainsi, les Lycophytes et les Euphylllophytes auraient divergé avant l'apparition des racines (Raven & Edwards, 2001). De même, les feuilles seraient apparues de façon indépendante chez les Lycophytes et les Euphylllophytes (Langdale, 2008). Après l'apparition de la vascularisation et des racines, le développement de l'embryon au sein d'une graine (Gymnospermes et Angiospermes) et l'émergence de la fleur pour attirer les insectes pollinisateurs (Angiospermes) sont les autres innovations majeures ayant eu lieu au cours de l'évolution des plantes vasculaires.

Bien qu'ayant conquis le milieu terrestre avec succès, certaines plantes terrestres sont retournées en milieu aquatique comme *Ceratopteris richardii* (Monilophytes) et *Ceratophyllum desmosum* (Angiospermes).

## II. La symbiose endomycorhizienne à arbuscules

Pour de nombreux auteurs la capacité des premières plantes terrestres à entrer en symbiose avec certains microorganismes de la rhizosphère, et notamment avec les

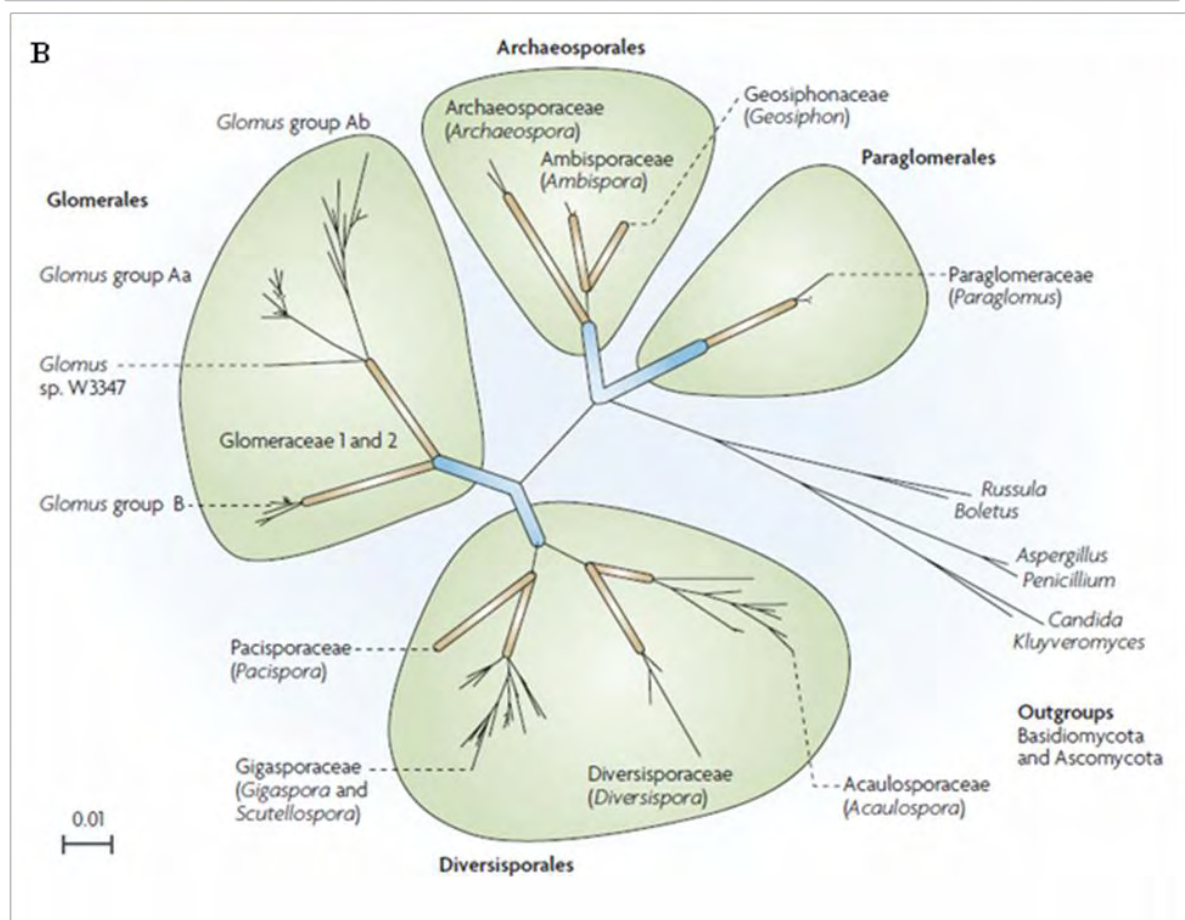
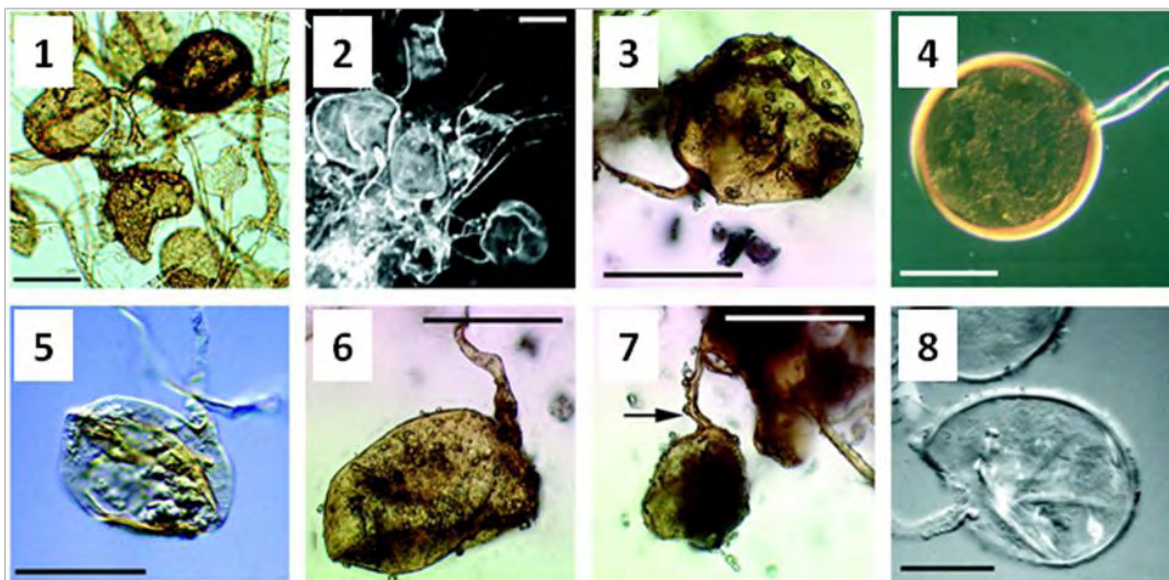


**Fig. 5. La symbiose endomycorrhizienne à arbuscules dans la lignée verte.** Seules les plantes terrestres sont concernées par cette symbiose. Photographies adaptées de Fonseca et al. (2006), Schüssler et al. (2001), Winther & Friedman (2008), Turnau et al. (2005), Muthukumar & Udaiyan (2002), Brundrett (2008), (Y. Zhang & Guo, 2007). *a* = arbuscule, *h* = hyphes, *v* = vésicule

champignons mycorhiziens à arbuscules (MA), a été prépondérante pour leur adaptation au monde terrestre. En effet, l'association avec les champignons MA favorise la nutrition et l'apport en eau à la plante, et permet également une meilleure résistance de cette dernière face aux agents pathogènes. Ces effets ont ainsi pu favoriser la croissance des premières plantes terrestres (Raven & Edwards, 2001; Bonfante & Genre, 2008; Humphreys et al., 2010). Une hypothèse récente voudrait que cette interaction ait été précédée par une interaction avec certains Zygomycètes, les Mucoromycotina (Bidartondo et al., 2011). En effet, les Hépatiques les plus basales forment une symbiose avec ces champignons Endogones (Bidartondo et al. 2011). Toutefois, l'extraordinaire distribution de la symbiose (MA) observée aujourd'hui dans tous les écosystèmes terrestres et l'accumulation de données fossiles (Remy et al., 1994; Redecker et al., 2000), plaident en faveur d'un rôle prépondérant joué par cette symbiose durant les premiers balbutiements de la colonisation du milieu terrestre par les plantes.

## 1. Le partenaire végétal

Un très grand nombre d'espèces (80 %) de plantes terrestres sont capables d'interagir avec les champignons MA, aussi bien chez les Bryophytes que chez les Lycopodes, les Monilophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes (Fig. 5; Wang & Qiu, 2006). L'absence de capacité mycorhizienne se retrouve chez certaines espèces de plantes et semble liée à une perte de fonction et à l'apparition d'un nouveau caractère. Par exemple, chez les Gymnospermes, sauf chez de rares exceptions, les Pinaceae ne sont pas endomycorhizables mais interagissent avec d'autres champignons symbiotiques, les champignons ectomycorhiziens (Wang & Qiu, 2006). Les Brassicaceae non mycotrophes, comme la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ont souvent des poils racinaires plus longs, et donc une capacité naturelle plus grande à absorber l'eau et les nutriments (Bucher, 2007). Il existe également quelques exceptions parmi des familles par ailleurs mycotrophes, comme les légumineuses du



**Fig. 6. Les Gloméromycètes.** (A) Spores fossilisées datées de l'Ordovicien (1-3, et 5-7, 460 millions d'années) et de spores actuelles (4 et 8). Les barres représentent 50  $\mu$ m. Adapté de Redecker et al. (2000). (B) Arbre phylogénique des Gloméromycètes. Issu de Schüsler et al. (2001).

genre *Lupinus* ou l'Hépatique *Marchantia polymorpha*. Mises à part ces exceptions, la symbiose MA reste un trait extrêmement répandue dans la lignée verte. Elle a très certainement joué un rôle crucial dans l'adaptation et l'évolution des plantes terrestres.

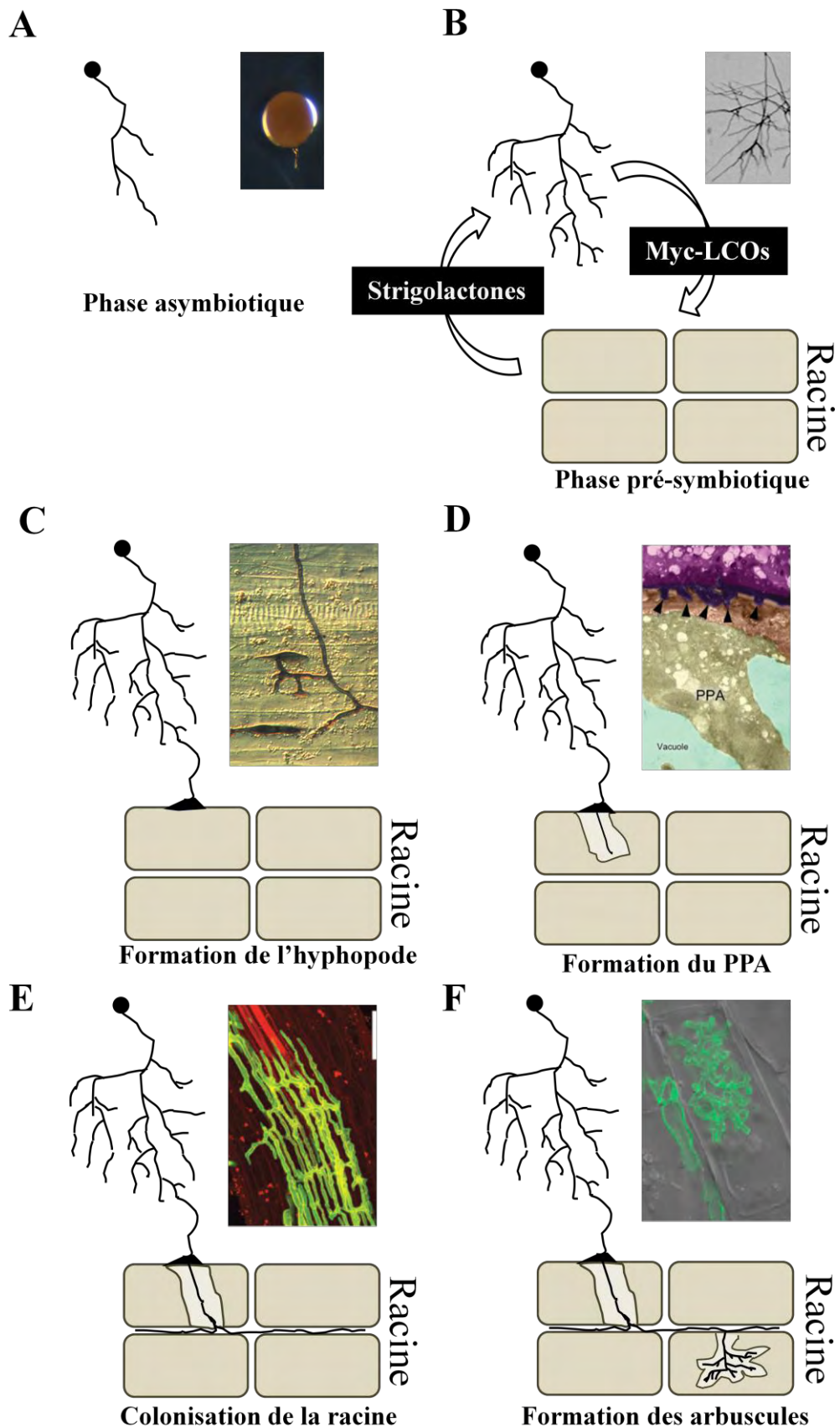
## **2. Les champignons endomycorhiziens à arbuscules : les Glomérormycètes**

La divergence entre les champignons primitifs, Chytridiomycètes, et les premiers champignons terrestres, Zygomycètes, est supposée avoir eu lieu il y a 1400 à 600 millions d'années (James et al., 2006). Les champignons MA, longtemps considérés comme des Zygomycètes, sont aujourd'hui regroupés dans une classe à part, les Glomérormycètes, et auraient divergé durant l'Ordovicien il y a 450 millions d'années (Schüssler et al., 2001). Cette nouvelle classification est basée sur des données de phylogénie moléculaire mais aussi sur des analyses de fossiles. En effet, des spores fossilisées datées de l'Ordovicien, et morphologiquement très proches des spores de Glomérormycètes actuels, ont été découvertes (Fig. 6A; Remy et al., 1994; Redecker et al., 2000). Selon la classification proposée par Schüssler et al (2001), les Glomérormycètes sont composés de quatre groupes phylogénétiquement distincts : les Glomérales (*Glomus* groupe A et B), les Paraglomérales (*Paraglomus*), les Archéosporales (*Archeospora*, *Ambispora* et *Geosiphon*) et les Diversisporales (*Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora* et *Diversispora*) (Fig. 6B). Les champignons MA présentent des spores de taille variable selon les espèces (40 à 450  $\mu\text{m}$ ) et développent un mycélium siphonné (coenocytique), présentant plus ou moins de ramifications. Leurs caractéristiques biologiques rendent leur étude particulièrement difficile. Ce sont des biotrophes obligatoires et leur structure génétique est complexe en tant qu'organismes coenocytiques, polynucléés et hétérocaryotiques (Sanders & Croll, 2010). Ces caractéristiques font que leur culture pure et leur transformation génétique sont encore



**Fig. 7. Les différentes étapes de l'établissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules.**

(A) Durant la phase asymbiotique la spore germe et développe quelques hyphes primaires. (B) La phase pré-symbiotique voit les deux partenaires échanger des signaux, strigolactones et lipochitooligosaccharides (Myc-LCOs). En croissance activée le champignon entre alors en contact avec la racine de la plante et forme un hyphopode (C), puis s'immisce dans l'appareil de pré-pénétration (PPA) développé par la plante (D). Enfin le champignon colonise la racine de façon intercellulaire (E) et forme des structures intracellulaires hyper ramifiées, les arbuscules (F). Photographies (B) adaptée de Buée et al. (2000), (D) adaptée de Bonfante et al. (2010), (E), adaptée de Pumplin et al. (2009), (F) adaptée de Zhang et al. (2010).



impossibles. Malgré cela et grâce à une méthode de culture *in vitro* des champignons MA sur racines transformées (Bécard & Piché, 1989), le cycle de développement de ces champignons commence à être caractérisé. La mise en place de la symbiose endomycorhizienne à partir d'un inoculum sous forme de spores se déroule en trois phases. La première est la phase asymbiotique durant laquelle la spore, même en absence d'une plante hôte, peut germer spontanément (si les conditions physicochimiques sont favorables) et produire un ou plusieurs tubes germinatifs et quelques ramifications (Fig. 7A). La croissance du champignon, très limitée, ne durera que quelques jours et n'aura alors consommé que très peu des réserves carbonées contenues dans la spore (Bécard et al., 1992; Bécard et al., 2004). Selon les espèces, le cytoplasme des hyphes germinatifs peut se rétracter dans la spore initiale ou peut servir à former de nouvelles spores (Bothe et al., 2002). Dans tous les cas le champignon maintient son potentiel de germination. Après la germination, mais cette fois en présence d'une racine hôte, les phases pré-symbiotique puis symbiotique se mettent en place. Elles conduiront au développement du champignon dans les racines de l'hôte et à la formation de structures intracellulaires hyper ramifiées nommées arbuscules. Ces arbuscules à l'interface symbiotique sont des sites privilégiés d'échanges de nutriments entre les partenaires.

### **3. La phase pré-symbiotique**

La phase pré-symbiotique commence lorsque le partenaire fongique a perçu la présence de son hôte et active alors son métabolisme et sa croissance. Elle se poursuit ensuite par la reconnaissance de la présence du champignon par la plante. C'est donc une phase où sont échangés, avant le contact physique entre les partenaires, des signaux d'origines végétale et fongique (Fig. 7B). Pendant cette phase les deux partenaires modifient leur métabolisme et leur expression génique. Cela peut conduire à la mise en place d'une réponse morphologique



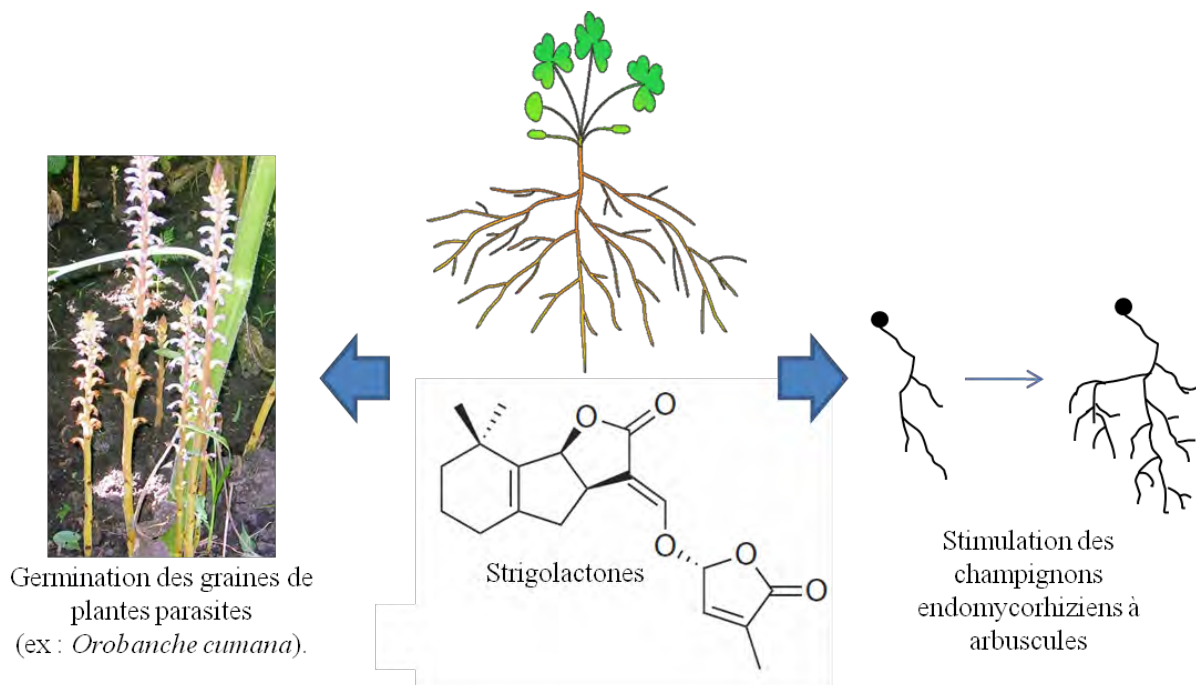


adaptée pour favoriser l'interaction, telle que la ramification des hyphes chez le champignon, et la formation des racines latérales chez la plante.

## ***A. Le Signal végétal : du « Branching Factor » aux strigolactones***

### ***a. Caractérisation du « Branching Factor »***

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'existence d'un ou plusieurs facteurs, présent dans les exsudats racinaires des plantes mycotrophes, stimulant le développement des champignons MA (Graham, 1982; Elias & Safir, 1987; Bécard & Piché, 1989; Tawaraya et al., 1995; Giovannetti et al., 1999). Les travaux de Giovannetti et al. (1996) ont montré, en séparant les deux partenaires par une membrane de cellophane, qu'un signal diffusible issu de la plante *Ocimum basilicum* était capable de stimuler de façon remarquable la formation de nouvelles ramifications du champignon ("branching"). Des résultats similaires ont été obtenues avec une fraction purifiée d'exsudats de racines de carottes «hairy roots», appelée « Branching Factor », provoquant chez le champignon une réponse morphologique comparable à celle mise en place en présence d'une racine hôte vivante (Buee et al., 2000; Nagahashi & Douds, 2000). En 2005, puis 2006, les travaux successifs d'Akiyama et al. (2005) et de Besserer et al. (2006) découvraient qu'une famille de molécules, les strigolactones, retrouvée à la fois chez les monocotylédones (*Sorghum bilocor*) et les dicotylédones (*Lotus japonicus*), était capable d'induire la ramification des hyphes germinatifs de *Gigaspora margarita* et de *Gigaspora gigantea* mais aussi la germination des spores de *Glomus intraradices* et de *Glomus mosseae*. Il a ensuite été montré avec des mutants de pois (*Pisum sativum*) déficients dans la synthèse des strigolactones, que ces molécules jouaient en effet un rôle important dans l'établissement de la symbiose MA (Gomez-Roldan et al., 2008). Les mutants déficients dans la synthèse des strigolactones présentent un taux de colonisation réduite comparée au sauvage et un ajout exogène de



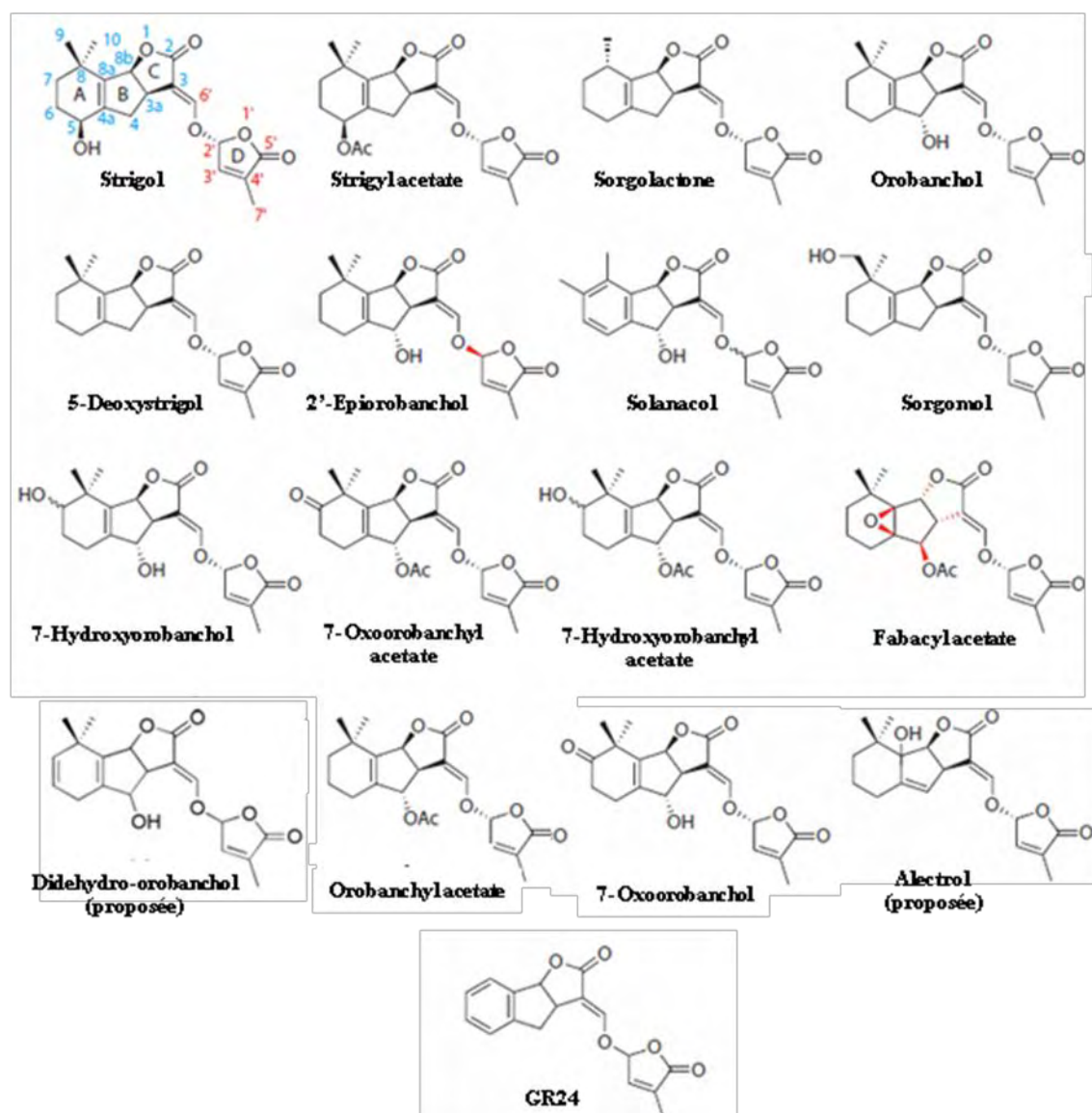
**Fig. 8 Rôles rhizosphériques des strigolactones.** Les strigolactones sont exsudées dans la rhizosphère où elles stimulent la germination des graines de plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* ainsi que la germination et la ramification des champignons endomycorhiziens à arbuscules.

strigolactones permet de restaurer un phénotype mycorhizien proche de celui des pois sauvages (Gomez-Roldan et al., 2008). On peut considérer aujourd'hui que les strigolactones font partie des molécules exsudées par les racines des plantes que les champignons MA utilisent pour reconnaître la présence d'une racine hôte.

### ***b. Structure des strigolactones***

Avant d'être identifiées comme « Branching Factor », les strigolactones étaient connues depuis une quarantaine d'années comme facteurs inducteurs de la germination des graines de plantes parasites (Fig. 8 ; Cook et al., 1966; Cook et al., 1972). Cook et al. (1966) avaient alors découvert le premier membre de la famille des strigolactones, le strigol (Fig. 9). Bien que difficiles à détecter et à caractériser une quinzaine d'autres strigolactones ont été identifiées depuis chez plusieurs espèces de plantes (Xie et al., 2010).

Les strigolactones présentent un squelette canonique composé de quatre cycles (A, B, C et D, Fig. 9). Les cycles C et D sont très conservés. Ce sont deux cycles lactones, reliés par une liaison vinyl ether. Les deux isomères de cette liaison coexistent et peuvent être produits par une même plante, suggérant l'absence de stéréospécificité de l'enzyme catalysant la liaison entre les deux cycles. Les différences structurales majeures entre chaque membre de la famille des strigolactones sont la nature, le nombre et la position des fonctions portées par les cycles A et B. En effet le cycle A peut porter une ou deux méthylations, le plus souvent sur le C8. Un de ces méthyles peut par ailleurs être hydroxylé (sorgomol, Fig. 9). Des fonctions alcools sont également retrouvées directement sur le cycle A, sur le carbone en position C7 (7-hydroxyorobanchol) ou C5 (strigol), et sur le cycle B en position C4 (orobanchol et solanacol). D'autres fonctions, acétate (fabacyl acétate, orobanchyl acétate), époxy (fabacyl acétate) ou cétone (7-oxoorobanchol et 7-oxoorobanchyl acétate), ainsi qu'un nombre variable d'insaturations sur le cycle A (didehydro-orobanchol) ont également été

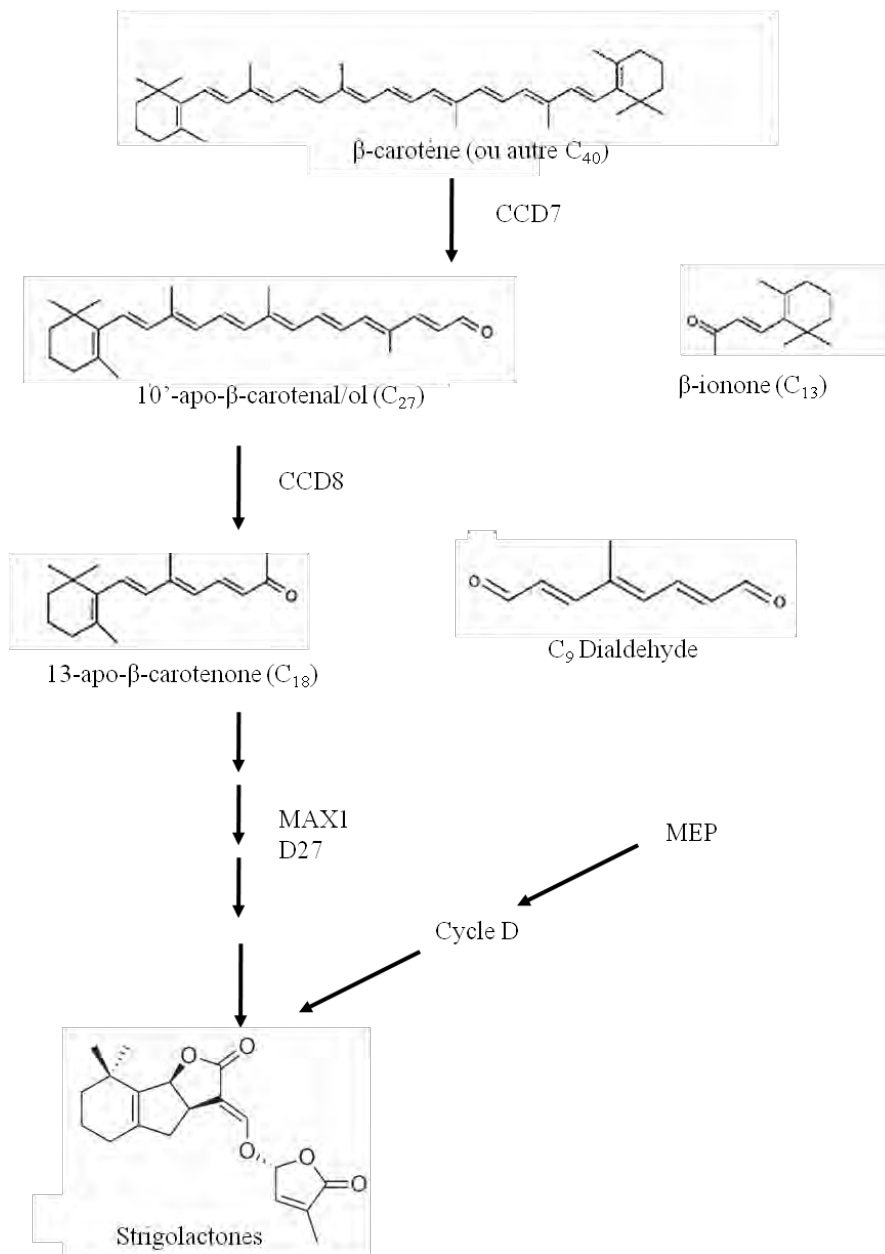


**Fig. 9. Structures des strigolactones.** Les strigolactones sont composées de 4 cycles (A, B, C et D). Les cycles A et B peuvent porter des groupements alcool, acétate, époxy, cétone, et un nombre variable d'insaturations. Le GR24 est un analogue de synthèse. Adapté de Xie et al. (2010).

trouvées, laissant supposer que plusieurs dizaines de nouvelles strigolactones, combinant ces fonctions, restent à découvrir (Yoneyama et al., 2009). Enfin, des strigolactones, qui n'ont pour l'instant jamais été retrouvées dans la nature, ont été obtenues par synthèse chimique (Johnson et al., 1981). L'une d'entre elle, le GR24, est uniquement composé des quatre cycles, le cycle A étant totalement insaturé (Fig. 9).

### *c. Mode d'action des strigolactones*

Les voies de perception des strigolactones et de signalisation chez le champignon ne sont pas connues, mais l'activité cellulaire des strigolactones a commencé à être décrite. En effet, avant même la caractérisation structurale du « Branching Factor », des travaux avaient montré que les exsudats de plantes induisaient la ramification des hyphes via une forte stimulation de la biogenèse mitochondriale (Tamasloukht et al., 2003). Ainsi, les hyphes de *Gigaspora rosea* traités avec des exsudats racinaires, présentent une densité plus importante de mitochondries (Tamasloukht et al., 2003). La forme de ces mitochondries est également modifiée, passant de globulaire à une forme en bâtonnet. Par la suite, des résultats similaires ont été observés en utilisant non plus des exsudats racinaires, mais une strigolactone de synthèse, le GR24 (Besserer et al., 2006). De plus, l'utilisation du GR24 a permis de décrire plus précisément la réponse cellulaire de *Gigaspora rosea* aux strigolactones. Ainsi, un ajout de GR24 ( $10^{-8}$  M) stimule, après seulement 5 minutes de traitement, la synthèse de NAD(P)H à l'apex des hyphes traités (Besserer et al., 2008). Cette augmentation de NAD(P)H est corrélée à une activation de la NADH deshydrogénase et à une augmentation de la concentration d'ATP, reflétant à nouveau une importante stimulation de l'activité mitochondriale. Ces réactions d'activation ne semblent pas (ou peu) dépendantes d'une régulation transcriptionnelle (Besserer et al., 2008). Enfin, le traitement au GR24 stimule ensuite le cycle et la prolifération cellulaire (ramification) du champignon (Besserer et al., 2008).



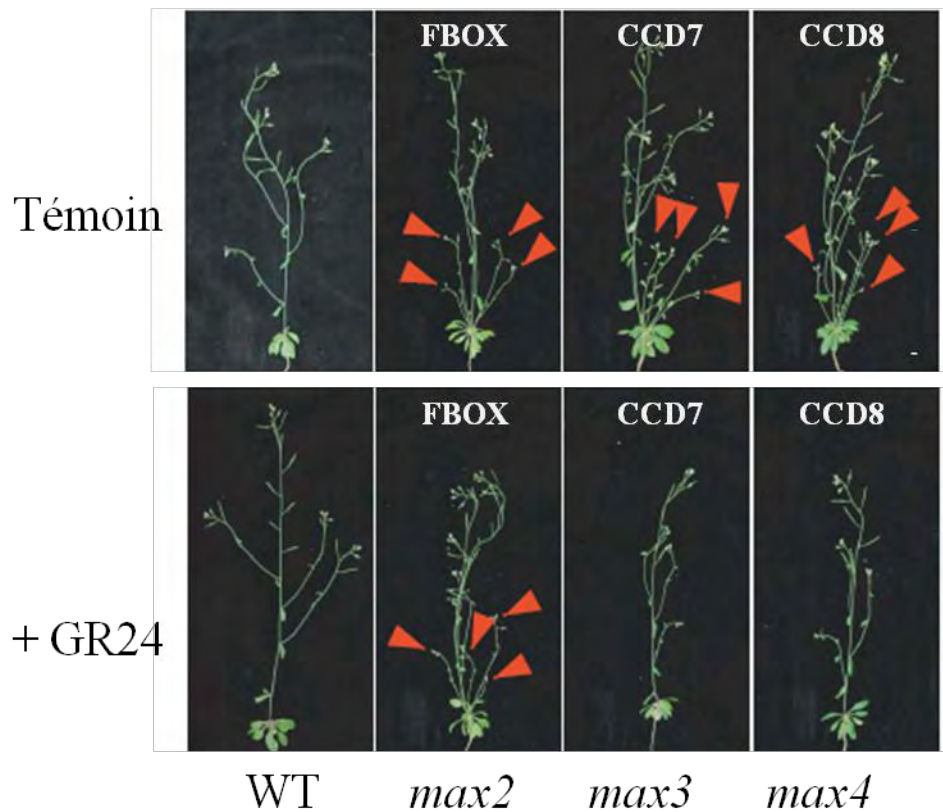
**Fig. 10. Voie de biosynthèse proposée des strigolactones.** Les enzymes Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD) 7 et 8 cliveraient séquentiellement un caroténoïde en  $C_{40}$  pour former la 13-apo- $\beta$ -carotenone, qui sera ensuite utilisé comme substrat par d'autres enzymes, dont MAX1. Schéma adapté de Schwartz et al (2004).

#### ***d. Synthèse des strigolactones***

Les premières étapes de la voie de biosynthèse des strigolactones ont été identifiées par des approches génétiques (Fig. 10). Cette voie fait tout d'abord intervenir les enzymes de clivage des caroténoïdes CCD7 et CCD8, pour Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7 et 8 (Schwartz et al., 2004a). Les mutants correspondant ont été caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* (*max3* et *max4*, Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004), chez le pois *Pisum sativum* (*rms1* et *rms5*, Morris et al., 2001; Sorefan et al., 2003), chez le riz (*d17* et *d10*, Arite et al., 2007), le pétunia (*dad3* et *dad1*, Snowden et al., 2005; Drummond et al., 2009), la tomate (*ccd7*, Vogel et al., 2010), le chrysanthème (*ccd8*, Liang et al., 2010) et le kiwi (*ccd8*, Ledger et al., 2010). CCD7 catalyserait le clivage du bêta-carotène ou d'un autre caroténoïde (C40) en un intermédiaire de synthèse le 10'-apo- $\beta$ -caroténal composé de 27 carbones (Fig. 10) et une molécule de  $\beta$ -ionone (Schwartz et al., 2004). Le 10'-apo- $\beta$ -caroténal serait ensuite pris en charge et clivé par CCD8 en un dialdéhyde à 9 carbones et en 13-apo- $\beta$ -caroténone (Schwartz et al. 2004). Le 13-apo- $\beta$ -caroténone servirait de substrat pour la suite de la biosynthèse, qui fait notamment intervenir une « iron-containing protein » et un cytochrome P450 (Booker et al., 2005; Lin et al., 2009). Les mutants correspondant à ces deux enzymes ont été caractérisés respectivement chez le riz (*d27*, Lin et al., 2009) et chez *Arabidopsis thaliana* (*max1*, Booker et al., 2005).

#### ***e. Les strigolactones : une nouvelle classe d'hormones végétales***

En plus de leur rôle dans la rhizosphère, il a récemment été montré que les strigolactones agissaient *in planta* comme hormones contrôlant la ramification des tiges (Fig. 11, Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Dans ces deux articles, les auteurs ont croisé des approches génétiques et biochimiques. L'étude biochimique de mutants de pois (*rms1* et



**Fig. 11. Fonction hormonale des strigolactones chez *Arabidopsis thaliana*.** Les mutants de synthèse (CCD7 et CCD8) et de perception (FBOX) des strigolactones ont des bourgeons axillaires plus développés (flèches rouges). En présence de GR24, une strigolactone de synthèse, cette hyper ramification diminue chez les mutants de synthèse pour retrouver le niveau du type sauvage (WT). Au contraire, le mutant de perception ne répond pas à l'apport exogène de GR24. Adapté de Umehara et al. (2008).

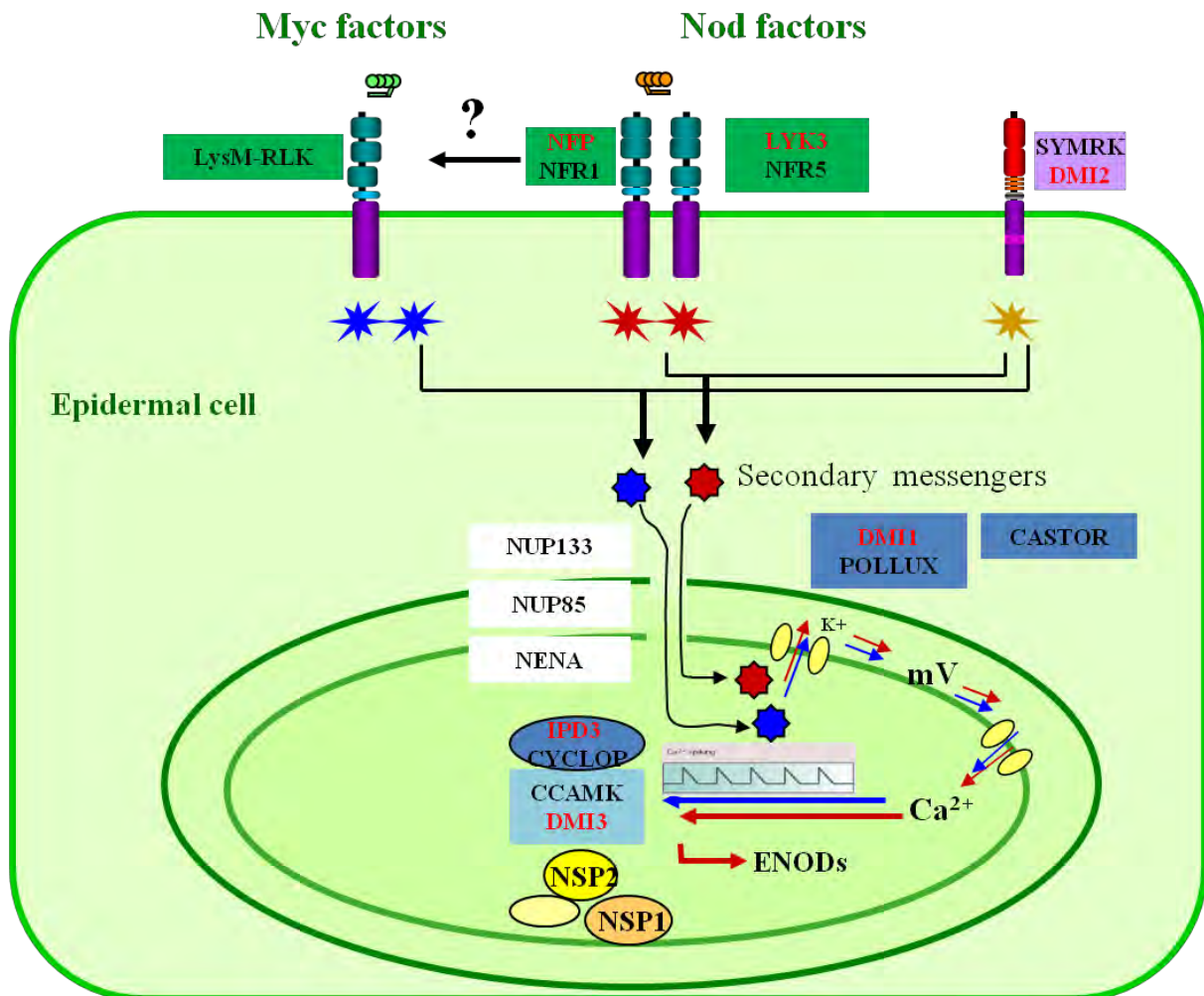


*rms5*) et de riz (*d7* et *d10*) présentant un phénotype hyper ramifié, a confirmé l'absence (détectable) de strigolactones dans ces plantes. Par ailleurs, des traitements par des apports exogènes de strigolactones synthétiques sur ces mutants hyper-ramifiés ont permis de restaurer un phénotype sauvage (Fig. 11). Au contraire, les mutant de perception du signal d'inhibition de la ramification produisent une quantité normale de strigolactones et leur phénotype hyper-ramifié persiste après ajout de strigolactones (Gomez-Roldan et al., 2008, Umehara et al., 2008). Ces mutant, *max2* chez *Arabidopsis thaliana*, *rms4* chez le pois et *d3* chez le riz, sont mutés sur un gène qui code pour une protéine à domaine FBOX (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006). Ce domaine est retrouvé chez certains récepteurs d'autres hormones végétales, comme TIR1, un récepteur d'auxine (Dharmasiri, et al., 2005), ou COI1 un récepteur de l'acide jasmonique (Sheard et al., 2010), laissant penser que les protéines MAX2/RMS4/D3 pourraient être des récepteurs de strigolactones.

Depuis ces travaux fondateurs, un nouveau mutant, *d14*, intervenant dans la voie de perception des strigolactones a été caractérisé chez le riz (Arite et al., 2009). Ce mutant est touché sur un gène codant pour une  $\alpha$ ,  $\beta$ -hydrolase (Arite et al., 2009).

Par ailleurs, de nouvelles fonctions hormonales des strigolactones ont également été découvertes. Ainsi, les strigolactones interviendraient au cours du processus de germination chez *Arabidopsis thaliana* (Tsuchiya et al., 2010) et joueraient un rôle dans la capture de la lumière chez la tomate (Mayzlish-Gati et al., 2010). Enfin, chez le riz, les strigolactones contrôleraient l'élongation du mésocotyle à l'obscurité, via une régulation de l'élongation cellulaire (Hu et al., 2010).

Ainsi, les strigolactones sont des molécules aux multiples facettes actives sur au moins trois systèmes biologiques différents : la germination des graines de plantes parasites *Striga* et



**Fig. 12. La voie symbiotique commune (CSP).** Les facteurs Myc sont perçus via la voie CSP qui comprend chez *Lotus japonicus* au moins un récepteur NFR et SYMRK. La transduction du signal est ensuite assurée par des messagers secondaires encore non caractérisés et par au moins trois nucléoporines (NENA, NUP133, NUP85) et deux transporteurs de potassium (CASTOR et POLLUX). Enfin le signal est décodé par une kinase calmodulin et calcium dépendante (CCAMK) et au moins un de ses interactants (CYCLOP). En rouge sont indiqués les orthologues des gènes de *Lotus japonicus* caractérisés chez *Medicago truncatula*.

*Orobanche*, le développement pré-symbiotique des champignons MA et le développement des angiospermes.

## ***B. Le Signal fongique : des facteurs Nod aux Myc-LCOs***

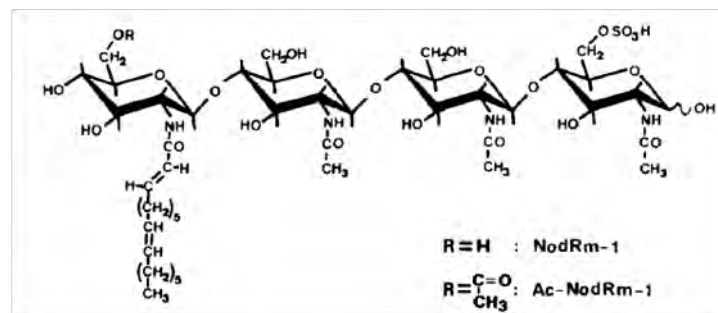
### ***a. Les facteurs Nod***

En réponse aux flavonoïdes produits par la plante dans la rhizosphère, les bactéries *Rhizobium* sécrètent des lipochitooligosaccharides appelés facteurs Nod. Ce dialogue moléculaire est la première étape lors de l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote entre ces bactéries et les plantes de la famille des Fabaceae (légumineuses). En effet, la perception des facteurs Nod par la plante hôte i) permettra aux étapes d'infection des racines par la bactérie (courbure des poils absorbants, cordon d'infection) de se dérouler correctement et 2) déclenchera la formation des nodules.

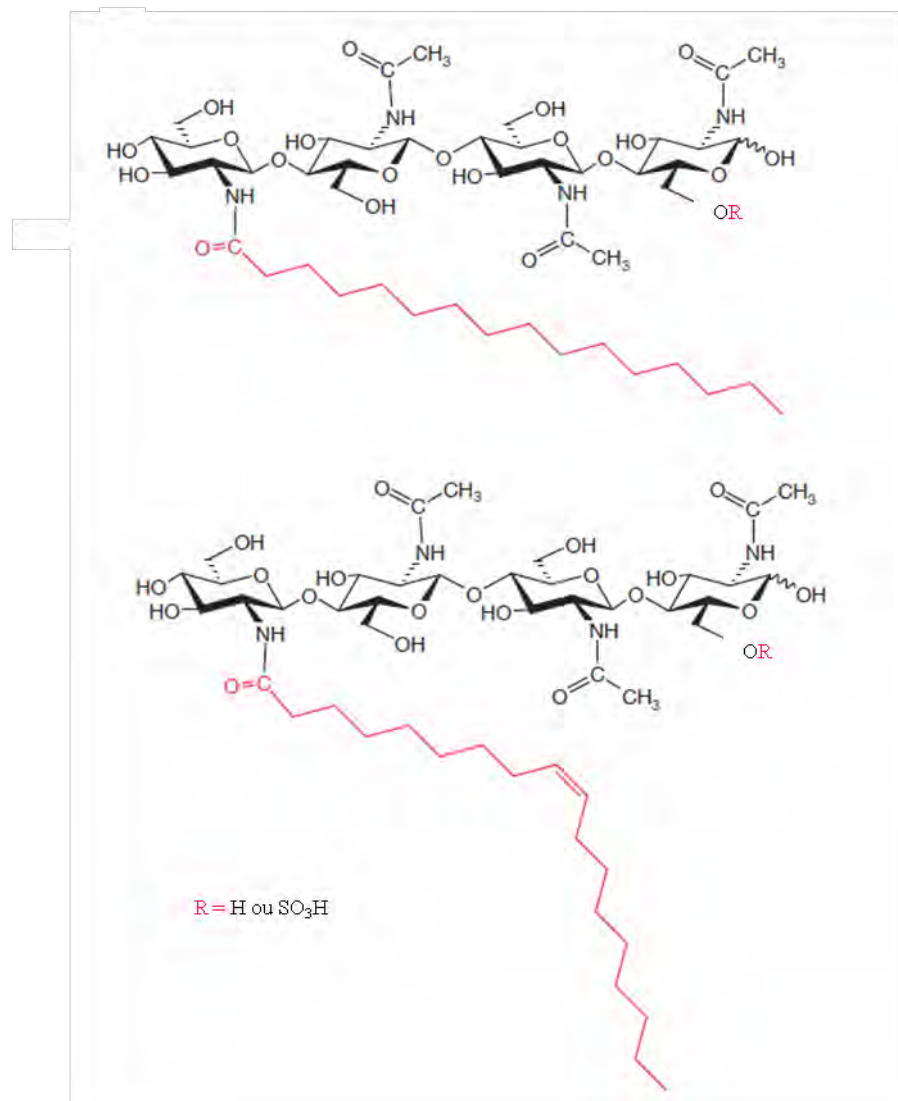
### ***b. La voie CSP (Common Symbiosis Pathway)***

La perception et l'intégration des signaux facteurs Nod se fait par l'intermédiaire d'une voie de signalisation de mieux en mieux caractérisée, la voie CSP (Common Symbiosis Pathway). Neufs gènes de cette voie de signalisation sont aujourd'hui connus (Fig. 12, Parniske, 2008). La caractérisation de cette voie est largement issue de travaux sur les légumineuses modèles *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula*. La perception des facteurs Nod fait tout d'abord appel à des récepteurs de type LysM-RLK, MtNFP/LjNFR5 et MtLYK3/LjNFR1 (Amor et al., 2003; Smit et al., 2007; Radutoiu et al., 2007). En aval de ces récepteurs plusieurs autres protéines de la voie de transduction ont été caractérisées : MtDMI2/LjSYMRK sont d'autres récepteurs à domaine kinase (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002), MtDMI1/LjCASTOR/LjPOLLUX sont des composantes d'un canal cationique (Ané et al., 2004; Imaizumi-Anraku et al., 2005), NUP85, NUP133 et NENA, sont trois

A



B



**Fig. 13. Structure des facteurs symbiotiques Nod et Myc.** (A) Facteurs Nod de *Sinorhizobium meliloti*. (B) Principaux Myc-LCOs de *Glomus intraradices*. Adapté de Roche et al. (1991) et Maillet et al. (2011).

nucléoporines pour le moment uniquement caractérisées chez *Lotus japonicus* (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010). Toutes ces protéines concourent à la production d'un signal calcique sous forme d'oscillations caractéristiques (Oldroyd & Downie, 2006). Viennent ensuite des protéines qui décodent et participent à la transduction de ce signal calcique : MtDMI3/LjCCamK, des kinases calmoduline et calcium dépendantes (Lévy et al., 2004; Tirichine, Imaizumi-Anraku, et al., 2006) et MtIPD3/LjCYCLOPS qui interagissent avec elles dans le noyau (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008). Enfin, deux facteurs de transcription de la famille des GRAS, NSP1 et NSP2 interviennent en aval de cette voie (Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005). La plupart des mutants correspondant à ces gènes présentent un phénotype mycorhizien fort, où sont inhibées à la fois la pénétration racinaire mais aussi les étapes ultérieures du développement intraracinaire, notamment la formation des arbuscules. Ce sont ces découvertes génétiques qui ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation Nod est une adaptation récente (60-70 millions d'années) de la voie de signalisation Myc, beaucoup plus ancienne. Cette hypothèse prédit donc l'existence des facteurs Myc. Le fait que les facteurs Nod possèdent un noyau structural sous forme d'oligomère de chitine (Fig. 13), un métabolite typiquement fongique, a alors fait proposer que les facteurs Myc seraient des facteurs Nod ancestraux et possèderaient aussi un noyau chitinique.

### *c. Caractérisation des Myc-LCOs*

Plusieurs auteurs ont montré expérimentalement l'existence d'un facteur sécrété par les champignons MA capable de modifier l'expression génique et le métabolisme du partenaire végétal (Weidmann et al., 2004; Oláh et al., 2005; Gutjahr et al., 2009; Kuhn et al., 2010). Olah et al. (2005) découvrent deux ans plus tard que les exsudats produits par plusieurs champignons MA stimulent, comme le font aussi les facteurs Nod, le développement des racines latérales de *Medicago truncatula*. Enfin, très récemment Maillet et al. (2011) mettent



en évidence dans les exsudats de *Gomus intraradices* la présence de lipochitooligosaccharides. Ces molécules sont composés de 4 à 5 résidus, sont sulfatées ou non sur le sucre réducteur et portent sur la fonction amine du résidu non réducteur un acide gras en C16 (acide palmitique) ou C18 (acide oleique) saturé ou non. Ces molécules sont structurellement très proches des facteurs Nod (Fig. 13). Maillet et al. (2011) ont montré qu'elles stimulaient la mycorhization de plusieurs espèces de plantes y compris des non légumineuses. Elles stimulent aussi le développement des racines latérales de *Medicago truncatula* via plusieurs gènes de la voie de signalisation CSP. Cette stimulation de la formation des racines latérales par ce facteur fongique, via la voie CSP, serait conservée chez les monocotylédones comme le riz ou le maïs (Mukherjee & Ané, 2011). Chez *Medicago truncatula* la formation de racines latérales en réponse au Myc-LCOs serait dépendante de la voie de l'éthylène, une hormone végétale connue par ailleurs pour réguler négativement la formation des racines latérales (Fukaki & Tasaka, 2009; Mukherjee & Ané, 2011).

Cette découverte de molécules fongiques lipochitooligosaccharidiques découlant d'un raisonnement et d'une démarche ciblés, ne permet pas de conclure sur le statut définitif de ces molécules comme facteurs Myc. D'autres signaux symbiotiques précoces produits par les champignons MA, encore à découvrir, pourraient aussi jouer un rôle dans l'établissement de la symbiose MA (Bonfante & Requena, 2011).

Pris ensemble, les signaux fongiques et végétaux échangés durant la phase pré-symbiotique permettent d'accroître le volume racinaire et fongique, augmentant ainsi les probabilités de contact, et donc d'interaction entre les deux partenaires.

#### **4. La phase symbiotique**

Après le contact avec le partenaire végétal et afin de pénétrer dans la racine, le champignon MA forme un hyphopode à la surface de celle-ci (Fig. 7C). La formation de cet





hyphopode peut être négativement contrôlée par la plante en présence de forte teneur en phosphate (Fig. 7C, Balzergue et al., 2011). Si au contraire les conditions sont favorables, la plante répond positivement en développant dans la cellule de l'épiderme racinaire située au contact de l'hyphopode un appareil de pré-pénétration (PPA). Ce PPA, correspond à une profonde réorganisation du cytosquelette et forme une sorte de tunnel cytoplasmique dans lequel les hyphes du champignon s'immiscent (Fig. 7D, Genre et al., 2005). Les gènes *DMI* de *Medicago truncatula* étant requis pour le développement de cette structure, la formation du PPA semble être dépendante de la voie CSP (Genre et al., 2005). La Vapyrin, une protéine présentant deux domaines d'interaction protéine-protéine, est nécessaire à cette pénétration par le champignon. En effet, les mutants de *Medicago truncatula vapyrin* ou de *Petunia pam1* présentent un nombre normal d'hyphopodes, mais une quantité importante de tentatives de pénétration avortées (Pumplin et al., 2010; Feddermann et al., 2010a). Le champignon colonise ensuite la racine via des hyphes intercellulaires (Fig. 7E). La symbiose devient effective avec le développement d'une structure fongique particulière, l'arbuscule, formée au sein des cellules du cortex racinaire (Fig. 7F). Si la formation de l'arbuscule est, comme indiqué précédemment, dépendante de la voie CSP et de la VAPYRIN, deux articles récents proposent l'implication de nouveaux éléments (Takeda et al., 2009; Q. Zhang et al., 2010). En effet la suppression par RNAi de l'expression des gènes de *Lotus japonicus sbtm1* ou *sbtm3* (Subtilase M1 et M3) induit une remarquable diminution de la colonisation et du nombre d'arbuscules (Takeda et al., 2009). De façon similaire, deux gènes de *Medicago truncatula*, *STR1* et *STR2*, codant pour deux demi transporteurs ABC capables d'interagir entre eux, sont cruciaux pour le développement normal des arbuscules, les mutants correspondant présentant des arbuscules avortés en proportion importante (Zhang et al., 2010). Les arbuscules formés sous l'impulsion de la plante (Genre et al., 2005), sont des structures fongiques hyper ramifiées séparées de la cellule hôte par une membrane péri-arbusculaire (Fig. 7F). De part sa



structure et son organisation, l'arbuscule est considéré comme le lieu privilégié des échanges de nutriments entre la plante et le champignon. Les échanges entre les deux partenaires se font via des transporteurs spécifiques. Coté champignon un transporteur d'hexose a été caractérisé chez *Geosiphon piriforme*, un champignon non mycorhizien mais appartenant au groupe des Gloméromycètes (Schüssler et al., 2006). Les transporteurs de sucres des champignons MA vrais n'ont pas encore été précisément caractérisés mais une étude récente du transcriptome de *Glomus intraradices* a mis en évidence plusieurs candidats potentiels (Tisserand et al, soumis). La plante, quant à elle, capte le phosphate puisé par le champignon via une famille de transporteurs spécifiques, dont les membres ont été caractérisés chez *Medicago truncatula* (MtPT4, (Javot et al., 2007), le riz (OsPT11, Paszkowski et al., 2002), la tomate (LePT4, Nagy et al., 2005), le peuplier (PtPT10, Loth-Pereda et al., 2011), ou la pomme de terre (StPT4, Nagy et al., 2005).

Plus qu'un rôle dans l'assimilation du phosphate transmis par le champignon, il a été montré chez *Medicago truncatula* que son transporteur de phosphate spécifique, MtPT4, permettait de contrôler le niveau de colonisation du champignon (Javot et al., 2007). En effet, les mutants de *Medicago truncatula pt4* présentent un nombre très élevé d'arbuscules dégénérés, et le champignon associé voit sa croissance fortement affectée (Javot et al., 2007).

### III. Objectifs de la thèse

Les mécanismes amenant à l'établissement d'une interaction fonctionnelle entre les champignons MA et les Angiospermes sont de mieux en mieux décrits. Cependant, peu d'études ont été menées sur la mise en place de ces mécanismes au cours de l'évolution des plantes terrestres. L'une d'entre-elles montre par exemple la complémentation du phénotype mycorhizien des mutants *dmi3* de *Medicago truncatula* par les orthologues de MtDMI3 d'Hépatiques et d'Anthocérotes, et donc montre la conservation de l'activité de cette protéine



dans la lignée verte (Wang et al., 2010). L'objectif de ma thèse est de proposer un schéma évolutif pour un des acteurs moléculaires clé intervenant lors de l'établissement de la symbiose MA, les strigolactones.

Plusieurs hypothèses de travail sont envisageables. Du fait de l'activité hormonale sur la ramification de la tige, les strigolactones ont pu apparaître avec les plantes vasculaires (Lycophytes). Une autre hypothèse voudrait que les strigolactones soient tout d'abord apparues pour leur rôle symbiotique (Bouwmeester et al., 2007). Enfin les strigolactones peuvent être, comme d'autres hormones végétales (De Smet et al. 2011), distribuées dans toute la lignée verte

Pour comprendre qui de l'effet hormonal ou du rôle symbiotique représentait la fonction primitive des strigolactones nous avons cherché dans le chapitre 1 à déterminer **quand** les strigolactones étaient apparues au cours de l'évolution. Bien sûr, les données fossiles ne pouvant être exploitées pour ce genre d'analyses, notre recherche s'est portée sur les organismes descendants des groupes d'intérêts (Bryophytes et Charophytes). Par la suite, nous avons cherché à savoir **quelle fonction** pouvait avoir les strigolactones chez ces organismes.

Dans le chapitre 2, nous avons voulu vérifier si une nouvelle fonction identifiée dans le chapitre 1 était conservée chez les Angiospermes, et plus particulièrement chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Enfin dans le chapitre 3, en exploitant les données obtenues au chapitre 1 sur l'évolution des strigolactones mais aussi les données disponibles dans la bibliographie sur des gènes liés à la symbiose MA, et à l'aide d'approches phylogénétiques, nous proposons **un schéma évolutif** des compétences mycorhiziennes dans la lignée verte.



## Résultats



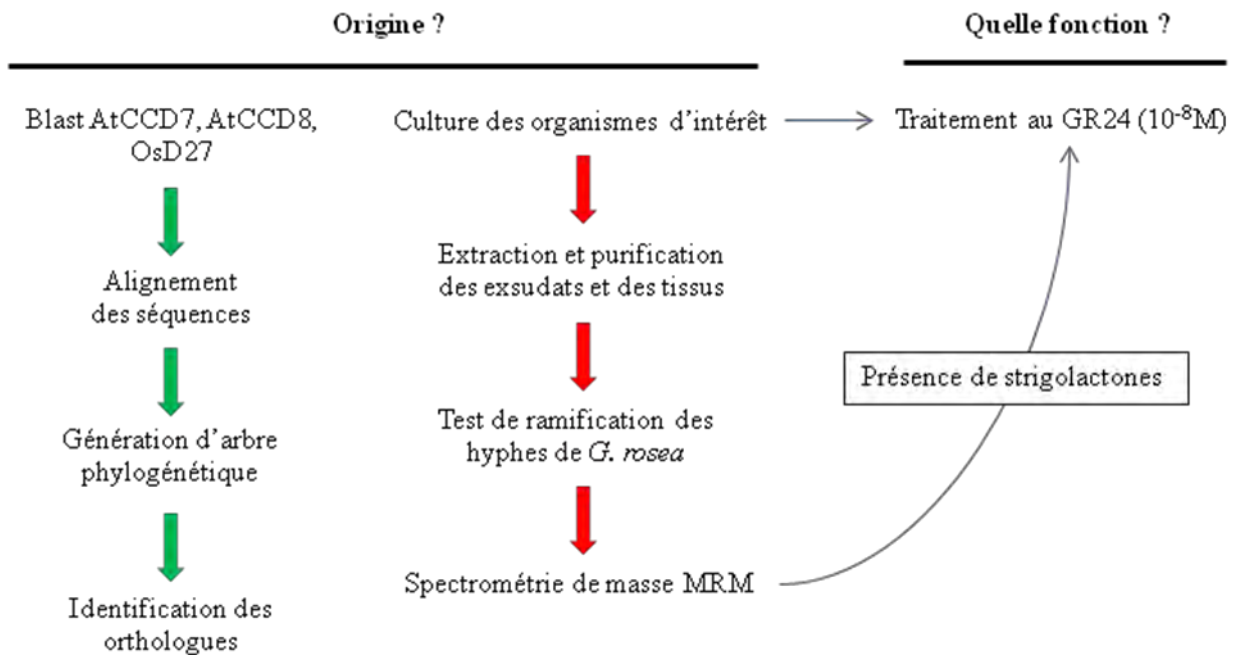


# Chapitre 1 : Origine évolutive des strigolactones dans la lignée verte

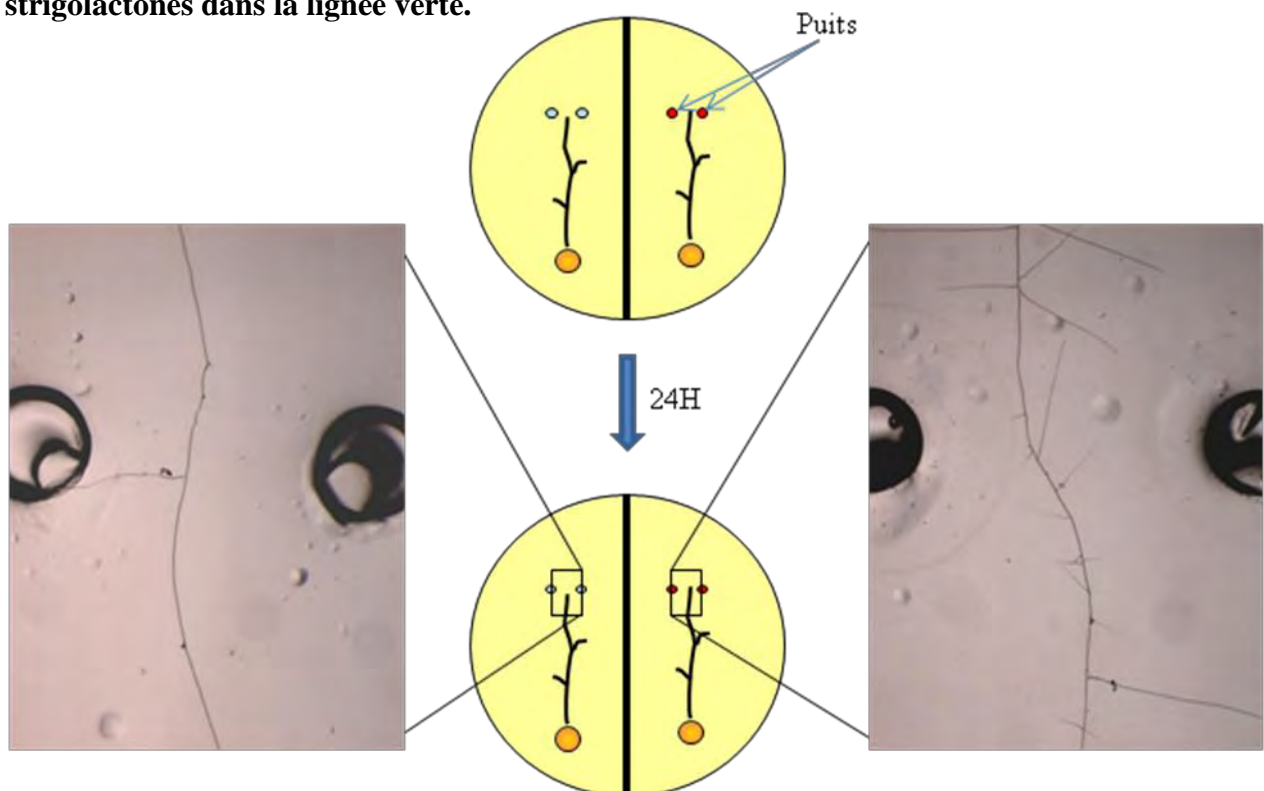
## I. Introduction

Dans ce chapitre nous nous posons les questions de savoir à quand remonte l'origine des strigolactones dans la lignée verte et quelles pouvaient être les premières fonctions de ces molécules.

Au vu de la fonction hormonale récemment décrite chez les Angiospermes (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008) des strigolactones pour contrôler la ramification des tiges, il était probable que cette hormone soit répandue chez tous les organismes possédant des bourgeons axillaires. Depuis quelques années on découvre en effet chez un nombre croissant d'espèces d'Angiospermes la présence de strigolactones déjà connues ou nouvelles (Xie et al., 2010). Néanmoins, on ne pouvait exclure que les strigolactones soient apparues bien plus tôt dans l'évolution de la lignée verte, pour une ou plusieurs fonction(s) restant à décrire. Etant donné le rôle des strigolactones dans la stimulation de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA), notre hypothèse était que ces molécules étaient apparues chez les premiers végétaux terrestres capables d'interagir avec les champignons MA, au début de la colonisation du milieu terrestre. Pour tester cette hypothèse il était nécessaire de vérifier la présence des strigolactones chez des mousses, des Hépatiques et des algues vertes (Charophytes et Chlorophytes). Mousses et Hépatiques sont considérées comme les descendants des premières lignées végétales terrestres, alors que les Charophytes sont décrites comme les ancêtres aquatiques à l'origine de l'évolution des premières plantes terrestres (Karol et al., 2001; Turmel et al., 2003; Turmel et al., 2006; Finet et al., 2010; Wodniok et al., 2011). Enfin dans la lignée verte, les Chlorophytes sont les algues qui ont divergé le plus tôt.



**Fig. 14** Stratégie mise en place pour déterminer l'origine et la fonction primitive des strigolactones dans la lignée verte.



**Fig. 15** Le test de ramification des hyphes de *Gigaspora rosea*. L'extrait à tester est introduit dans deux puits creusés dans la gélose à proximité de l'hyphe du champignon, 24H après le nombre de ramifications formées est compté.

Notre démarche expérimentale a donc été découpée en trois étapes : l'isolement et la culture in vitro de plusieurs organismes d'intérêt (Bryophytes, algues), la recherche de la présence des strigolactones chez ces organismes, et le traitement de ces organismes par une strigolactone exogène, le GR24, afin de découvrir de nouvelles activités biologiques potentielles des strigolactones (Fig. 14). La principale difficulté technique était la détection et la caractérisation des strigolactones chez ces organismes car ces molécules sont à l'état de trace dans les tissus végétaux, souvent en deçà des seuils de détection que peuvent avoir les analyses en spectrométrie de masse. Pour augmenter nos chances de déceler la présence des strigolactones dans nos extraits, nous avons donc utilisé deux approches.

### **1. Le test de ramification des hyphes de *Gigaspora rosea***

Deux tests biologiques sont aujourd'hui utilisés pour déceler la présence des strigolactones : l'induction de la germination des graines de plantes parasites (Cook et al., 1966) et la stimulation de la ramification des hyphes germinatifs de *Gigaspora rosea* (Buée et al., 2000; Akiyama et al., 2005; Fig. 15). Les deux tests présentent une limite de détection similaire (jusqu'à  $10^{-13}$  M avec un produit pur). Par contre, en terme de spécificité, d'autres composés comme le parthénolide, l'artéminisine, le dihydrosorgoleone, le deshydrocostuslactone, l'isothiocyanates, l'éthylène induisent la germination des graines de plantes parasites avec la même efficacité que les strigolactones ((Lynn et al., 1981; Fischer et al., 1990; Xie et al., 2010; Joel et al., 2011), et toutes les strigolactones ne sont pas capables d'induire la germination de toutes les espèces de plantes parasites. Au contraire, en ce qui concerne les champignons MA, seules les strigolactones sont à ce jour connues pour stimuler leur croissance avec une telle efficacité et surtout, le genre *Gigaspora* semble percevoir et répondre à toutes les strigolactones naturelles (Akiyama et al., 2010).



## 2. Spectrométrie de masse à haute sensibilité

Toutes les strigolactones présentent, après fragmentation en spectrométrie de masse, un ion de  $m/z$  97. Ce fragment correspond au cycle D qui est invariable. La masse de chaque strigolactone est connue, et celles de strigolactones potentielles peuvent être calculées. Ainsi sur un spectromètre de masse de type Q-TRAP ou triple quadripôle, il est possible de spécifier dans un premier temps la masse ( $m/z$ ) d'une strigolactone en particulier (ion parent), puis de sélectionner, et donc de détecter spécifiquement, les deux ions majoritaires (ions fils), correspondant au cycle D (97  $m/z$ ) et aux cycles ABC ( $m/z$  dépendant de chaque strigolactone), issu de la fragmentation de cette molécule,. Plusieurs analyses similaires, pour plusieurs strigolactones, peuvent être réalisées en parallèle dans une expérience de MRM (Multiple Reaction Monitoring, Sato et al., 2003; Yoneyama et al., 2008; Gomez-Roldan et al., 2008). La détection est possible dans des mélanges complexes jusqu'à des concentrations de l'ordre du nano molaire.

## 3. Phylogénie de la voie de biosynthèse

Afin de renforcer nos analyses, nous avons cherché en parallèle à savoir quand les gènes codant pour les protéines CCD7, CCD8 et D27 de la voie de biosynthèse des strigolactones étaient apparues au cours de l'évolution de la lignée verte. Pour cela nous avons utilisé les génomes de plantes terrestres et d'algues Chlorophytes actuellement disponibles. Par ailleurs, nous avons également criblé une banque d'ESTs nouvellement séquencée de huit algues représentant tous les groupes de Charophytes. Certains de ces ESTs étaient déposés sur Genbank (Timme & Charles F Delwiche, 2010), d'autres ont été fournis par le Pr. C.F. Delwiche (Université du Maryland, USA).



## **II. Article : Evolutionary origin of strigolactones in the green lineage**

(Soumis au journal « BMC Biology », en cours de révision)





**Evolutionary origin of strigolactones in the green lineage**

**Pierre-Marc Delaux<sup>1,2</sup>, Xiaonan Xie<sup>3</sup>, Ruth E. Timme<sup>4</sup>, Virginie Puech-Pages<sup>1,2</sup>,  
Christophe Dunand<sup>1,2</sup>, Emilie Lecompte<sup>5,6</sup>, Charles F. Delwiche<sup>4</sup>, Koichi Yoneyama<sup>3</sup>,  
Guillaume Bécard<sup>1,2\*</sup> and Nathalie Séjalon-Delmas<sup>1,2##</sup>**

<sup>1</sup> Université de Toulouse, UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales,  
BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR 5546, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup> Weed Science Center, Utsunomiya University, Utsunomiya 321-8505, Japan

<sup>4</sup> Cell Biology and Molecular Genetics, 2106 HJ Patterson Hall, University of Maryland –  
College Park, College Park, MD 20742, USA

<sup>5</sup> Université de Toulouse, UPS, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118  
route de Narbonne, F-31062, Toulouse, France

<sup>6</sup> CNRS, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062, Toulouse, France

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail:

[nathalie.sejalondelmas@ensat.fr](mailto:nathalie.sejalondelmas@ensat.fr) and [becard@lrsv.ups-tlse.fr](mailto:becard@lrsv.ups-tlse.fr)

# Present address: UMR5245 ECOLAB, ENSAT, Av de l'Agrobiopole, F-31326 Auzeville,  
Castanet-Tolosan, France



## Abstract

**Background.** Strigolactones are plant metabolites with three remarkable biological activities: germination stimulants of parasitic plants, presymbiotic stimulants of Glomeromycotan fungi and plant hormones. Here we address the question of the origin and the primitive function of these multifaceted molecules.

**Results.** For this purpose, we investigated the strigolactone content of several Bryophytes and green algae, using a sensitive biological assay and LC-MS/MS analyses. In parallel, phylogenetic analyses and sequence comparison of strigolactone related genes were performed using available genomic data and newly sequenced ESTs. Determination of a primitive function of strigolactones was also assessed by exogenous application of the synthetic analogue GR24. We show that liverworts, the most basal land plants, and Charales, one of the closest green algal relative to land plants, produce strigolactones whereas several other species of green algae do not. Strigolactone defective organisms are also defective in carotenoid cleavage dioxygenase 7 or 8 (*CCD*) genes or their CCD proteins lack important amino acids found in the CCD proteins of Angiosperms. Finally, we show that GR24 stimulates elongation of rhizoids of two Bryophytes.

**Conclusions.** We conclude that strigolactones appeared with advanced Charophytes algae. They may have been conserved in the basal land plants for their role in controlling rhizoid elongation, and then recruited for colonization by Glomeromycotan fungi.



## Background

Strigolactones (SLs) are a family of carotenoid-derived plant secondary metabolites produced by dicots and monocots (Xie et al., 2010). Eighteen members in this family have been identified so far but many more are expected to occur in the plant kingdom (Xie et al., 2010). SLs were first characterized as seed germination stimulants of the parasitic plants *Orobancha* and *Striga* (Cook et al., 1966, 1972). More recently they have been shown to be important plant signals for the establishment of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006; Gomez-Roldan et al., 2008), and finally they have been identified as a new class of plant hormones involved in the inhibition of shoot branching (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Recent studies also suggest that SLs control mesocotyl elongation (Hu et al., 2010), root development by inhibiting lateral root formation and stimulating root hair elongation (Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011) and finally the protonema expansion of the moss *Physcomitrella patens* (Proust, B. Hoffmann, et al., 2011).

Genetic studies have revealed that the initial steps of SL biosynthesis are likely to occur in plastids of root cells through the cleavage of beta-carotene or another (C40) carotenoid by two CCD (Carotenoid Cleavage Dioxygenase) enzymes, CCD7 and CCD8 (Matusova et al., 2005; Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Several orthologs of the genes encoding these two proteins were characterized: *MAX3* and *MAX4* in *Arabidopsis thaliana* (Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004), *RMS5* and *RMS1* in pea (Morris et al., 2001; Sorefan et al., 2003), *D17* and *D10* in rice (Arite et al., 2007), *DAD3* and *DAD1* in petunia (Snowden et al., 2005; Drummond et al., 2009), and recently *SICCD7* (Vogel et al., 2010; Koltai et al., 2010) and *PpRMS1* in *Physcomitrella patens* (Proust et al., 2011). Synthesis of SLs in *A. thaliana* also involves MAX1, a cytochrome P450



(Booker et al., 2005). In rice, an iron-containing protein, D27, has been characterized but its precise role in SL synthesis is unknown (Lin et al., 2009). Other proteins, downstream of the synthesis pathway, are expected to be involved in SL perception such as MAX2/RMS4/D3 in *A. thaliana*, pea and rice, respectively, and D14 in rice. MAX2/RMS4/D3 belong to the family of F-Box proteins (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006), whereas D14 is a protein of the  $\alpha/\beta$ -fold hydrolase superfamily (Arite et al., 2009).

To date, SLs have been identified in several angiosperms and in the moss *Physcomitrella* (Proust, B. Hoffmann, et al., 2011), but there is no report on their actual presence in other taxa of the green lineage (Viridiplantae). The Viridiplantae are split into two evolutionary lineages, the Chlorophytes (green algae *sensu stricto*) and the Streptophytes (Charophytes algae and Embryophytes). Molecular clock methods place this divergence between 725-1200 MYA (Floyd & Bowman, 2007). Chlorophytes comprise Prasinophyceae (*Ostreococcus*, *Micromonas*), Ulvophyceae (*Ulva*), Trebouxiophyceae (*Chlorella*) and Chlorophyceae like the unicellular model alga *Chlamydomonas reinhardtii* or the colonial one *Volvox carteri*.

Among the Streptophytes, Mesostigmatales and Chlorokybales represent the earliest diverging Charophytes (Lemieux et al., 2007). After these two unicellular orders, filamentous and unbranched algae are found in Klebsormidiales and Zygnematales. Finally, Charales and Coleochaetales are characterized by multicellular organization and form with Zygnematales the advanced Charophytes algae (Sørensen et al., 2011). Molecular phylogenetic analyses, biochemical characters (glycolate oxidase, superoxide dismutase, presence of sporopollenin) as well as ultrastructural features (phragmoplastic cell division) support the hypothesis that Charophytes have common ancestors with land plants (Karol et al., 2001; Lemieux et al., 2007; Finet et al., 2010, Wodniok et al., 2011). The emergence of land plants from a





freshwater aquatic ancestor is thought to have occurred during the mid-Ordovician and early Silurian (480-430 million years ago; Kenrick & Crane, 1997). Phylogenetic analysis demonstrated that liverworts are the direct descendants of these earliest land plants (Qiu et al., 1998). Based on the study of fossils from the Ordovician, it was proposed that AM symbiosis appeared concomitantly and could have been crucial for land colonization by plants (Redecker et al., 2000; Humphreys et al., 2010). This association between AM fungi of the genus *Glomus* and liverworts still persists today (Fonseca et al., 2006; Wang & Qiu, 2006; Russell & Bulman, 2005; Humphreys et al., 2010).

Were the first land plants already producing SLs with the primary function of promoting AM symbiosis (Bouwmeester et al., 2007) ? Or were SLs involved in some yet unknown hormonal regulation of ancestral developmental processes?

To address these questions, we first investigated the ability of Bryophytes, Charophytes and Chlorophytes to synthesize SLs by using a very sensitive bioassay (Buée et al., 2000) and mass spectrometry. We followed up these analyses by evaluating the occurrence of SL genes across the green lineage and then we experimentally examined whether exogenous SLs have some activity on basal land plants.

## **Materials and Methods**

### **Fungal material**

Spores of *Gigaspora rosea* (DAOM 194757) were produced in pot cultures on leeks and collected by wet sieving. They were washed in 0.05% Tween 20, soaked in 2% Chloramine T (Sigma) for 10 min, washed again three times in sterile water and stored in an antibiotic solution containing 100 mg l<sup>-1</sup> gentamycin and 200 mg l<sup>-1</sup> streptomycin. After 2 days at 4 °C, a second treatment with Chloramine T was carried out under the same conditions. Spores were then stored in the antibiotic solution at 4 °C before use.



### ***Gigaspora rosea* hyphal branching bioassay**

Hyphal branching bioassays were carried out according to Buée et al. (2000). Four spores of *Gi. rosea* were germinated and incubated under 2% CO<sub>2</sub> at 30 °C in the dark in vertical two-compartment Petri dishes (two spores per compartment), on M medium (Bécard & Fortin, 1988) supplemented with 10 µM quercetin (Sigma) and gelled with 0.6% Phytigel (Sigma). Seven days after inoculation, each spore produced a single germ tube growing upwards. Two small wells on each side of the hyphal tips were made in the gel with a Pasteur pipette tip and 5 µl of the solution to test: 10<sup>-7</sup>M GR24 in 10% acetonitrile (positive control), crude extracts or purified fractions (resuspended in 10% acetonitrile), or 10% acetonitrile (negative control) were injected into each well. After 24 h, hyphal branching was recorded quantitatively by counting newly formed hyphal tips. Five to 8 plates (20 to 32 spores) were used for each treatment. The mean number of hyphal branches for each of the fractions tested was compared to the acetonitrile control by the non-parametric Mann-Whitney test (p<0.05). Statistical analyses were performed with R Software. Each experiment was repeated three times.

### **Plant material and culture**

*Chlamydomonas reinhardtii* (CEA, Cadarache, France) was grown on Tris-minimal medium (Gorman & Levine, 1965). *Spirogyra* sp. and *Coleochaete scutata* were provided by the Sammlung von Algenkulturen Göttingen collection (SAG, [http://www.epsag.uni-goettingen.de/cgi-bin/epsag/website/cgi/show\\_page.cgi?kuerzel=about](http://www.epsag.uni-goettingen.de/cgi-bin/epsag/website/cgi/show_page.cgi?kuerzel=about)) and grown in 200 ml of modified BBM medium (three fold more NaNO<sub>3</sub>, 0.12 mg. l<sup>-1</sup> thiamin hydrochloride and 0.1 mg. l<sup>-1</sup> of cyanocobalamine, Bischoff and Bold, 1963) under low shaking (120 rpm, Gyrotary shaker, New Brunswick scientific). *Nitella hyalina* and *Nitella pseudoflabellata* were kindly provided by Pr. Ilse Foissner (Salzburg University, Austria) and grown in a 10 l tank containing 1/3 sterilized soil, 2/3 peat covered by 2-3 cm of clean sand and filled with



distilled water. Before exudation, apical cells were cut, washed and maintained in sterile water for one week. *Marchantia sp.* and *Lunularia cruciata* were collected in the Pyrenees Mountains (Ariège and Pyrénées Orientales, respectively, France). Gemmae were sterilized (Fonseca et al., 2006) and grown on KNOP medium (Reski & Abel, 1985). *Marchantia polymorpha* was kindly provided by Pr. Takayuki Kohchi (Kyoto University, Japan). The Gransden wild-type strain of *Physcomitrella patens* was grown on BCD medium (Grimsley et al., 1977). Light and temperature conditions were similar for all organisms (22°C, 16 h photoperiod, 18  $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### Collection of protein sequences

*Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Populus trichocarpa* (Pt), *Physcomitrella patens* (Pp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Volvox carteri* (Vc), *Chlorella variabilis*. NC64A (Nsp), *Ostreococcus tauri* (Ot), *Ostreococcus lucimarinus* (Ol) and *Micromonas pusilla* (Mp) sequences were collected from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). For *Selaginella moellendorffii* (Sm) the draft genome available on the JGI website (<http://genome.jgi-psf.org/>) was screened. Charophycean sequences of *Nitella hyalina*, *Coleochaete orbicularis*, *Chaetosphaeridium globosum*, *Spirogyra pratensis*, *Penium margaritaceum*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Klebsormidium flaccidum* and *Mesostigma viride* came from the EST collections of Timme et al. (2010) and from newly sequenced ESTs. Organisms and sequences used are summarized in Table 1.

Sequences of *Arabidopsis thaliana*, AtMAX3 (CCD7, NP\_182026.4), AtMAX4 (CCD8, NP\_195007.2) and AtMAX2 (F-BOX, ABQ85311.1), and of *Oryza sativa*, OsD14 (BAG92161.1), OsD14-like (NP\_001050445.1) and OsD27 (ACT91266.1), were used for blastp analyses. Sequences with an E-value  $< 10^{-10}$  were selected for phylogenetic analysis.



### Phylogenetic tree construction

Matching sequences from all the tested organisms were aligned (ClustalW or MAFFT, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/mafft/index.html>). Alignment was manually corrected using BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>). Maximum-Likelihood (ML) trees were consensus of 100 independently generated trees built with Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Outgroups were: AtNCEDs, AtCCD1 and AtCCD4 for CCD tree, and AtCCD1 for the CCD7 and CCD8 tree. AtTIR1 and AtCOI1 were used for FBOX tree, and *Bacillus subtilis* RsbQ for D14 tree, as proposed by Arite et al. (2009).

All newly generated sequences of CCD7, CCD8, D27, D14 or MAX2 orthologs were deposited in GenBank under the following accession numbers: CgCCD7 (JF810006), CaCCD8 (JF810007), CoCCD7 (JF810008), CaD14-likea (JF810009), CaD14-likeb (JF810010), KfD14-likea (JF810011), KfD14-likeb (JF810012), SpD14-like (JF810013), CaD27 (JF810014), CgD27a (JF810015), CgD27b (JF810016), KfD27a (JF810017), KfD27b (JF810018), NhD27 (JF810019), PmD27a (JF810020), PmD27b (JF810021), PmD27c (JF810022), SpD27 (JF810023), CaFBOX (JF810024).

### Preparation of extracts

The presence of SLs in basal land plants and algae was sought in exudates and tissues. Exudates were usually obtained by soaking each organism in distilled water for 24 h. Exudates of *Physcomitrella patens* and *Chlamydomonas reinhardtii* were also collected in growth media. Exudates in water or growth media were extracted with an equal volume of ethyl acetate. The ethyl acetate was washed with 0.2 M  $K_2HPO_4$ , dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and concentrated *in vacuo*. For tissue extractions, 10 to 80 g of fresh algae or liverwort were ground and extracted directly in acetone. Acetone extraction was repeated three times, the extracts pooled, dried *in vacuo* and dissolved in ethyl acetate. The ethyl





acetate extracts were then treated as described above. Each extract was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

The extracts of exudates were dissolved in 20% acetonitrile in water and loaded onto a SPE C18 cartridge (Varian Bond Elut, 500mg, 3 ml). The SPE C18 cartridges were eluted with 3 ml of 20% (F1), 30% (F2), 40% (F3), 50% (F4), 60% (F5) and 100% (F6) acetonitrile in water. Tissue extracts of algae or liverworts were dissolved in ethyl acetate : hexane (10 : 90) and loaded onto SPE Si cartridges (Thermo fisher, 1G, 6 cc). SPE Si cartridges were eluted in ten fractions with increasing concentrations (from 10 to 100%) of ethyl acetate in hexane. These fractions were dried under nitrogen, dissolved in acetonitrile and filtered through SPE C18 cartridge (Varian Bond Elut, 1G, 6 cc). Fractions of both exudates and tissue extracts were dried under nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### LC-MS/MS

For analyses performed on algae and *Marchantia sp.*, purified fractions or crude extracts of exudates were dissolved in 50% acetonitrile in water. SL detection was performed using a 4000 Q Trap mass spectrometer with a Turbo V ESI source in the positive mode, coupled to an Agilent 1100 series HPLC system as described in Gomez-Roldan et al. (2008), except for the following modifications. HPLC separation was performed using a C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 250 mm, ACCLAIM 120C18, Dionex). Solutions of formic acid: water [1:10<sup>3</sup> (v:v); A] and formic acid: acetonitrile [1:10<sup>3</sup> (v:v); B] were pumped at 0.2 ml min<sup>-1</sup>. The gradient was: 50% B for 5 min, 50–70% B in 5 min, 70% B for 10 min, 70–100% B in 10 min, and 100% B for 5 min. The column was equilibrated at 50% B for 5 min before the next run. For each sample, Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions for known SLs were systematically searched and retention times systematically compared to the corresponding synthetic standard, if available.

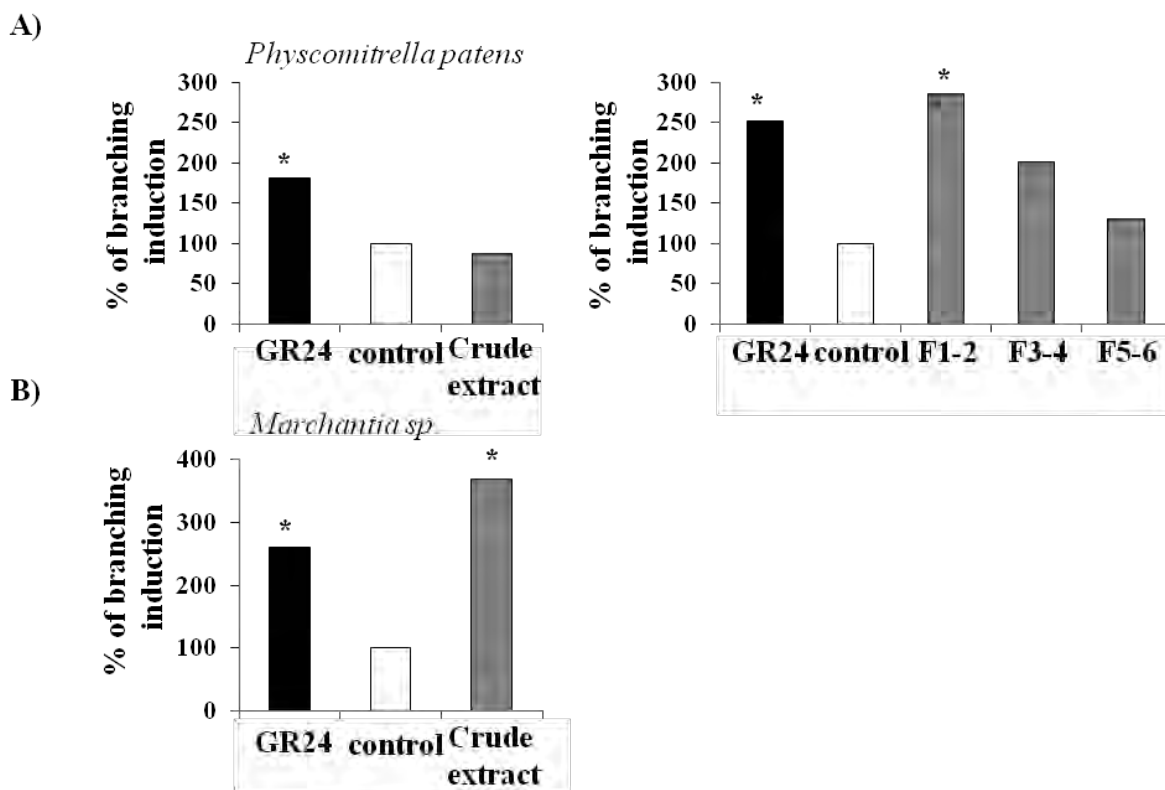


Analysis of *Marchantia polymorpha* purified extracts of tissue were performed with a Quattro LC tandem mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray source as described previously (Kaori Yoneyama et al., 2008). HPLC separation was conducted with a LaChromUltra UHPLC instrument (Hitachi, Tokyo, Japan) fitted with an ODS (C18) column (LaChromUltra C18, 2 x 50 mm, 2  $\mu$ m; Hitachi, Tokyo, Japan). The mobile phase was a water–methanol gradient. The gradient was: 30–45% methanol in 3 min, 45–50% methanol in 5 min, 50–70% methanol in 4 min, 70–100% methanol in 3 min, 100% methanol for 3 min, and 100–30% methanol in 1 min. The column was equilibrated at this solvent composition for 3 min before the next run. Total run time was 22 min. The flow rate was 0.2 ml min<sup>-1</sup> and the column temperature was set to 40°C.

### **GR24 effect on Bryophytes**

*Physcomitrella patens* gametophores from six week-old colonies were carefully isolated and grown in a 96-well plate. Each well was previously filled with 200  $\mu$ L of BCD medium (Grimsley et al., 1977) containing 0 or 10 nM of GR24 (Chiralix, Nijmegen, The Netherlands). After three weeks, the length of rhizoids of each gametophore was directly measured under a Leica RZ 75 stereomicroscope (n>30 gametophores).

For assays with *Marchantia sp.*, between 50 and 70 gemmae collected from the same thallus were used for each treatment. They were grown on KNOP medium (Reski & Abel, 1985) gelled with 6 g l<sup>-1</sup> Phytigel (Sigma) and containing 0 or 10 nM of GR24. After one week, an image of each thallus was acquired with a Leica RZ 75 stereomicroscope equipped with a Leica DFC320 camera. The length of the three longest rhizoids on each thallus was measured (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, United States). The mean of rhizoid length for each treatment was compared to the corresponding control using



**Fig. 16. Hyphal branching activity in Bryophyta.** (a) Crude extract of exudates of *Physcomitrella patens* has no effect on hyphal branching whereas purified fractions 1 and 2 stimulated the fungus (n=20). (b) Crude extract of exudates of the liverwort *Marchantia sp.* induces strong hyphal branching (n=20-30 spores). Stars indicate fractions with significant activity, according to Mann and Whitney test ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were performed on raw data before calculation of % of branching induction.

non-parametric Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ) with R software. Each experiment was repeated three times.

## Results

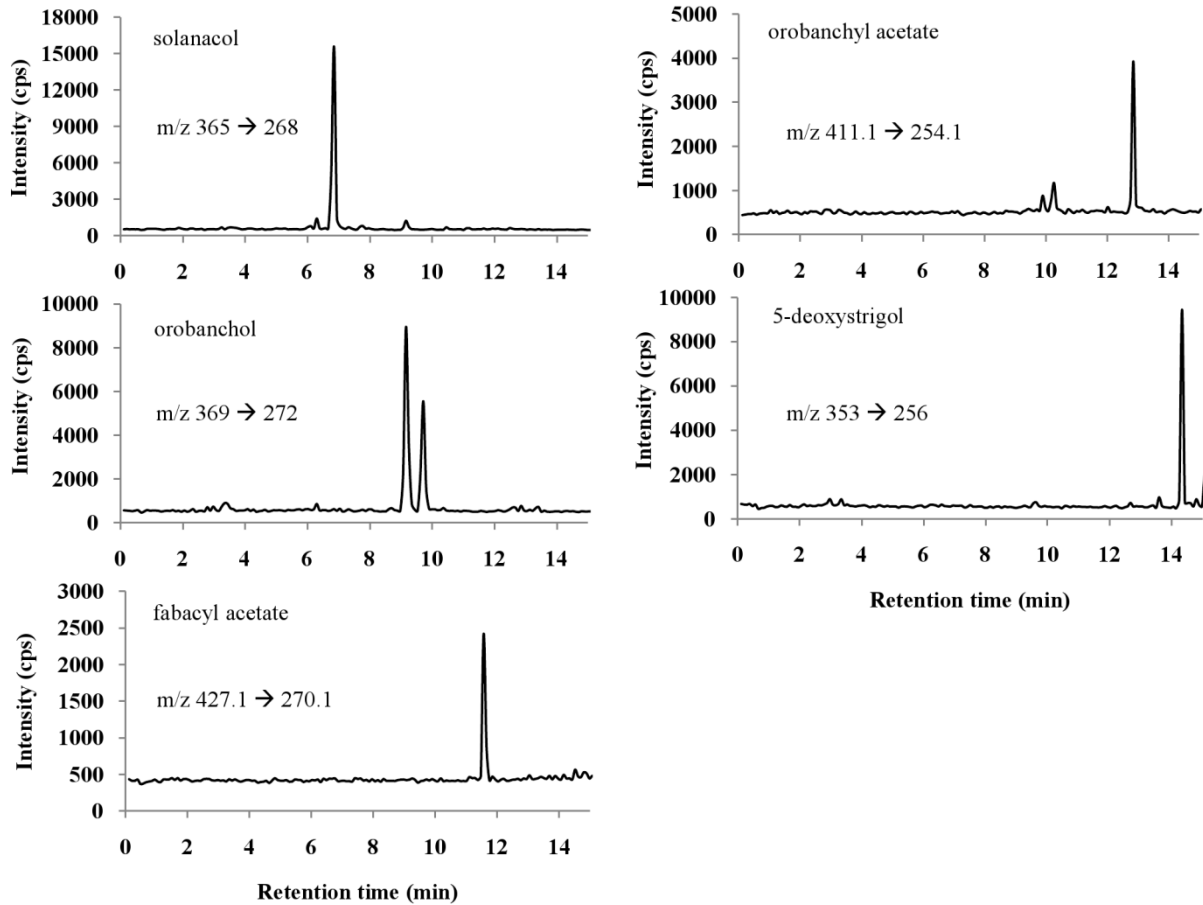
### Occurrence of strigolactones in the basal Viridiplantae lineages

#### *Strigolactones in basal land plants*

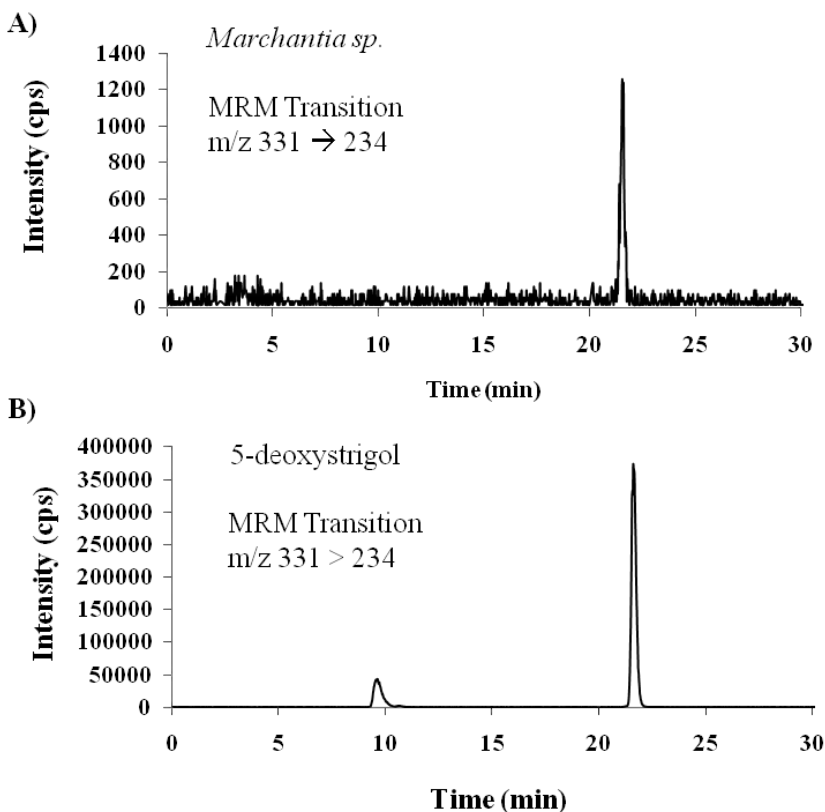
To answer the question of the occurrence of SLs in basal land plants, we sought the presence of SLs in exudates of two Bryophytes: the model moss *Physcomitrella patens* and the liverwort *Marchantia sp.* We used the hyphal branching bioassay on the AM fungus *Gigaspora rosea* (Buée et al., 2000). This method is extremely sensitive to the presence of SLs (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). In addition, we also carried out mass spectrometry (MS) analyses.

No activity was found in *P. patens* crude extract of exudates (Fig. 16A). After one C18 purification step, hyphal branching activity was found in the fractions F1-2, highlighting the importance of purification steps to avoid limitation of hyphal branching due to matrix effect or to the presence of inhibitory molecules. This is in agreement with MS analyses showing that *P. patens* produces 7-hydroxyorobanchyl acetate, 7-oxoorobanchyl acetate, orobanchyl acetate, fabacyl acetate, orobanchol and strigol (Proust, B. Hoffmann, et al., 2011).

Without any purification steps, crude extracts of exudates of *Marchantia sp.* stimulated hyphal branching (Fig. 16B). LC-MS/MS analyses were performed on crude extracts of exudates of two *Marchantia* isolates, confirming the presence of strigolactones. Specific multiple reaction monitoring (MRM) transitions and comparison of the retention times with those of synthetic strigolactone standards were used. The extract of *Marchantia sp.*



**Fig. 18.** LC-MS/MS analysis of strigolactones of *Marchantia polymorpha*. MRM (Multiple Reaction Monitoring) chromatogram of *Marchantia polymorpha* extract. Solanacol (m/z 365 → 268), orobanchol (m/z 369 → 272), fabacyl acetate (m/z 427.1 → 270.1), orobanchyl acetate (m/z 411.1 → 254.1) and 5-deoxystrigol (m/z 353 → 256) are detected.

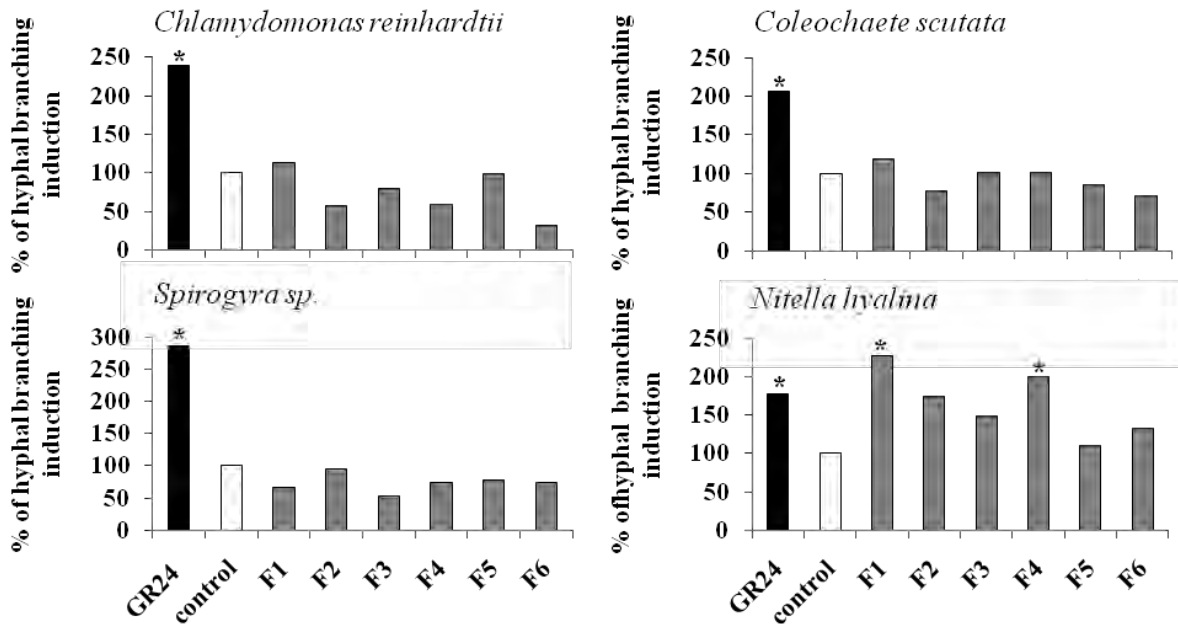


**Fig. 17.** LC-MS/MS analysis of strigolactones of *Marchantia sp.* Multiple reaction monitoring (m/z 331 → 234) chromatogram of (a) an active fraction of *Marchantia sp.* and (b) synthetic 5-deoxystrigol.

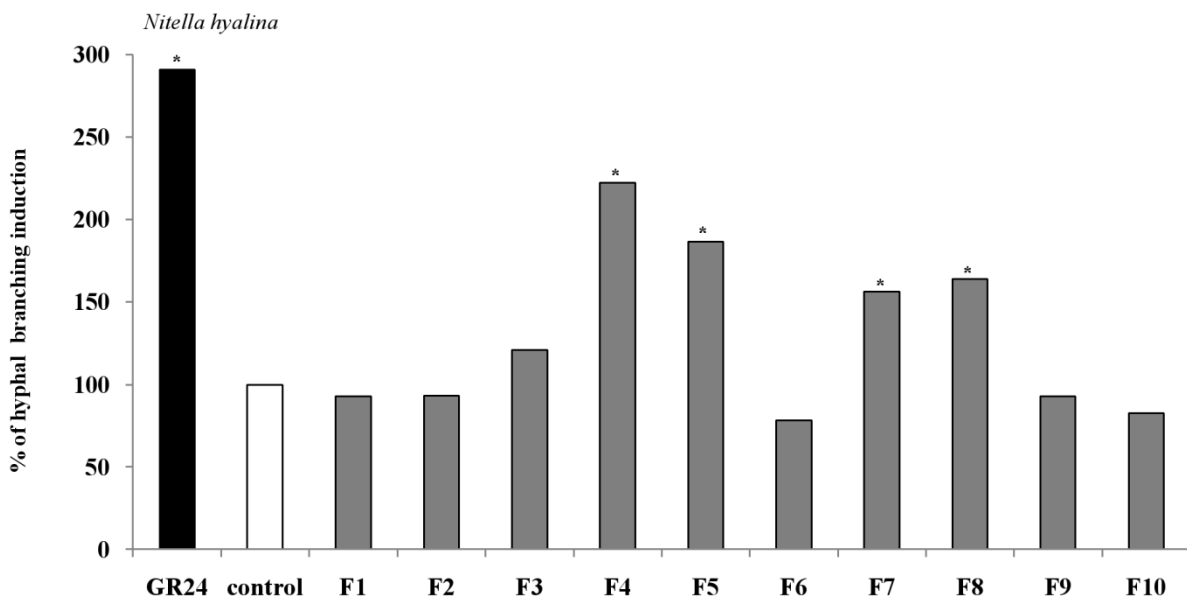
previously shown to be active (Fig. 16B) and the extract of *Marchantia polymorpha* contained 5- deoxystrigol (Fig. 17: m/z 331 → 234, Rt 21.4 min and Fig. 18: m/z 353 → 256, Rt 14.3 min). *Marchantia polymorpha* produced five additional strigolactones identified as solanacol (m/z 365 → 268, Rt 6.77 min), two isomers of orobanchol (m/z 369 → 272, Rt 9.17 min and Rt 9.72 min), fabacyl acetate (m/z 427 → 270, Rt 11.4 min) and orobanchyl acetate (m/z 411 → 254, Rt 12.9 min) (Fig. 18). The assignments for SLs produced by the two isolates were confirmed by co-chromatography with synthetic and/or natural standards (data not shown). In summary, these results show that strigolactones are not only produced by a large array of higher plant species (Koichi Yoneyama et al., 2009) but also by Bryophytes including liverworts, the earliest diverging lineage of land plants.

### ***Strigolactones in green algae***

To test whether SLs are produced in other Viridiplantae lineages, we examined the hyphal branching activity of exudates of several green algae: the model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a Chlorophyte, and four green algae in the Charophytes, *Spirogyra* sp. (Zygnematales), *Coleochaete scutata* (Coleochaetales) and two *Nitella* species (Charales). Neither crude extract nor purified fractions of *Chlamydomonas reinhardtii* exudates were able to induce hyphal branching (Fig. 19). Similarly, no activity was found in the exudates extracts (even purified) of *Spirogyra* sp. or *Coleochaete scutata* (Fig. 19). Tissue extracts of these three algae were not active either (data not shown). In addition, no known SLs were found by MRM analysis of all three extracts (data not shown). By contrast, several purified fractions of the two *Nitella* species, *N. hyalina* (Fig. 19) and *N. pseudoflabellata* (data not shown), significantly stimulated hyphal branching. To avoid inhibition or matrix effect, extracts of exudates were preferred to more complex tissue extract for the hyphal branching test. However, tissue extracts usually contain a larger amount of strigolactones and were used



**Fig. 19. Hyphal branching activity in green algae.** Purified fractions of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Spirogyra sp.* and *Coleochaete scutata* have no effect. Fractions 1 and 4 of *Nitella hyalina* are highly active (n=20-30 spores). Stars indicate fractions with significant activity, according to the Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were performed on raw data before calculation of % of branching induction.



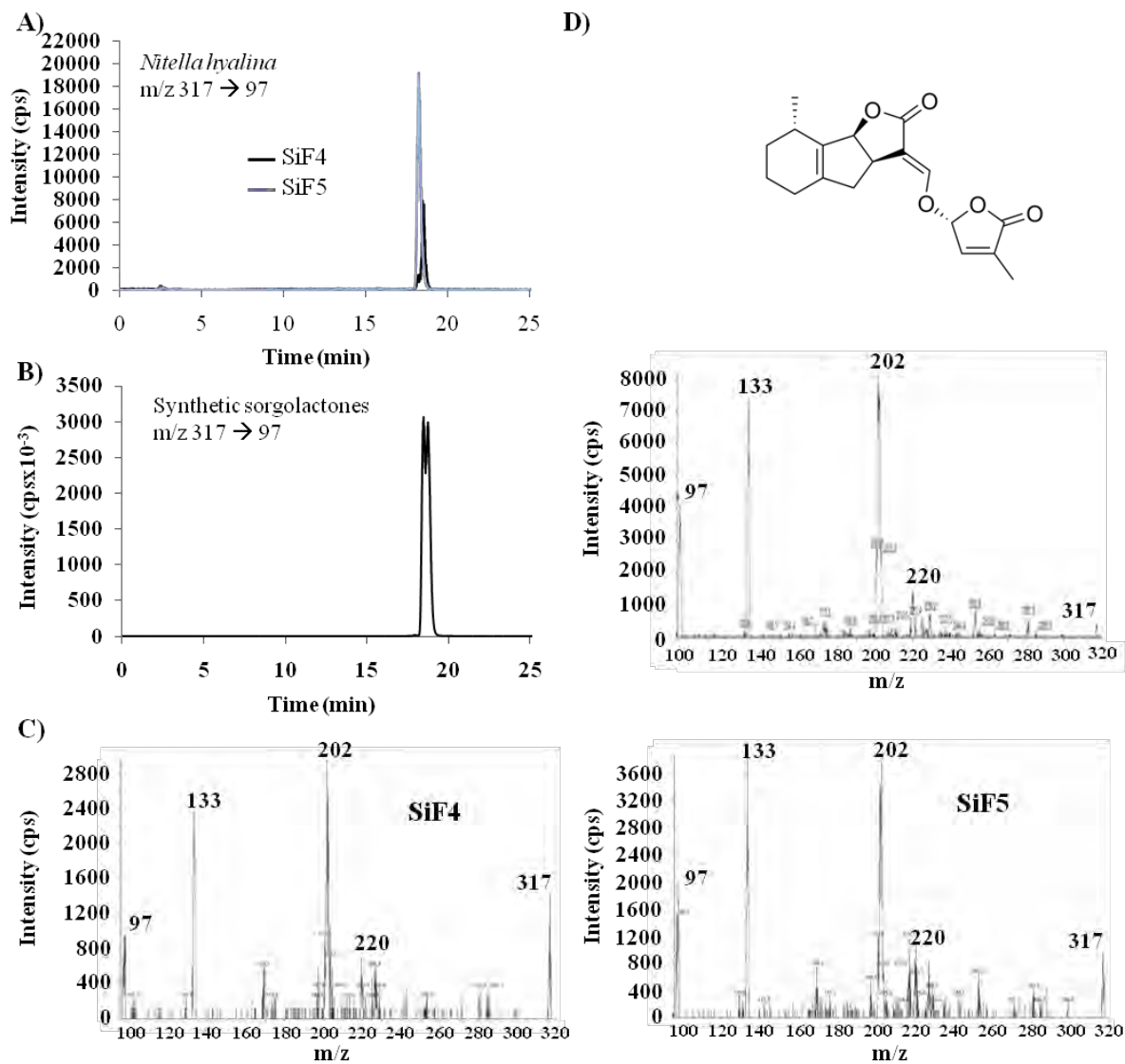
**Fig. 20. Hyphal branching activity of purified fractions of tissue extract of *Nitella hyalina*.** Stars indicate fractions with significant activity (n=20-30 spores,  $p < 0.05$ ), according to Mann-Whitney test.



for LC-MS/MS analyses. Before LC-MS/MS analyses, we also tested the activity of tissue extracts purified on Si solid phase extraction (SPE) column and we found activity in fractions SiF4, SiF5, SiF7 and SiF8 (Fig. 20). We analyzed these active fractions by LC-MS/MS to assess their SL content. The active molecules of SiF7 and SiF8 could not be characterized. For fractions SiF4 and SiF5 we identified by MRM two sorgolactone isomers ( $m/z$  317  $\rightarrow$  97, Rt 18.2 min and 18.5 min) as the major SLs produced by these organisms (Fig. 21). The same retention times and MS/MS spectra similar to that of the synthetic mix of sorgolactone stereoisomers confirmed the identity of sorgolactones as the major SLs present in *N. hyalina* (Fig. 21) and *N. pseudoflabellata* (data not shown). These results suggest that only Charales produce SLs in a detectable manner.

### Occurrence of strigolactone-related genes in the green lineage

Blastp was used to identify potential orthologs of the genes involved in SL biosynthesis (OsD27, AtCCD7 and AtCCD8) and signaling pathways (OsD14 and AtMAX2). The analyses were performed on all available sequenced genomes of Viridiplantae: in the Prasinophyceae, *Ostreococcus tauri* Courties & Chrétiennot-Dinet (Derelle et al., 2006), *Ostreococcus lucimarinus* (Palenik et al., 2007) and *Micromonas pusilla* (Worden et al., 2009); in the Chlorophytes, *Volvox carteri* (Prochnik et al., 2010), *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al., 2007), *Chlorella variabilis* Shihira & Krauss NC64A (Blanc et al., 2010); in the moss, *Physcomitrella patens* (Rensing et al., 2008); in the spikemoss, *Selaginella moellendorffii* (<http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html>). In the Charophycean only ESTs were available. The blast analyses were performed with the published EST sequences of *Coleochaete orbicularis* (Coleochaetales) and *Spirogyra pratensis* (Zygnematales) (Timme & Delwiche, 2010). To increase the dataset on Charophycean algae, we also screened ESTs (CF. Delwiche unpublished) of *Mesostigma*



**Fig. 21. LC-MS/MS analysis of strigolactones of *Nitella hyalina*.** (a) MRM (Multiple Reaction Monitoring) chromatogram ( $m/z$  317  $\rightarrow$  97) of fractions SiF4 (black) and SiF5 (blue) of *Nitella hyalina*. (b) MRM chromatogram ( $m/z$  317  $\rightarrow$  97) (left) and MS/MS spectrum of synthetic sorgolactone (right). (c) MS/MS Spectra of sorgolactone isomer 1 (left) and 2 (right) detected in *Nitella hyalina* extracts. (d) Structure of sorgolactone.

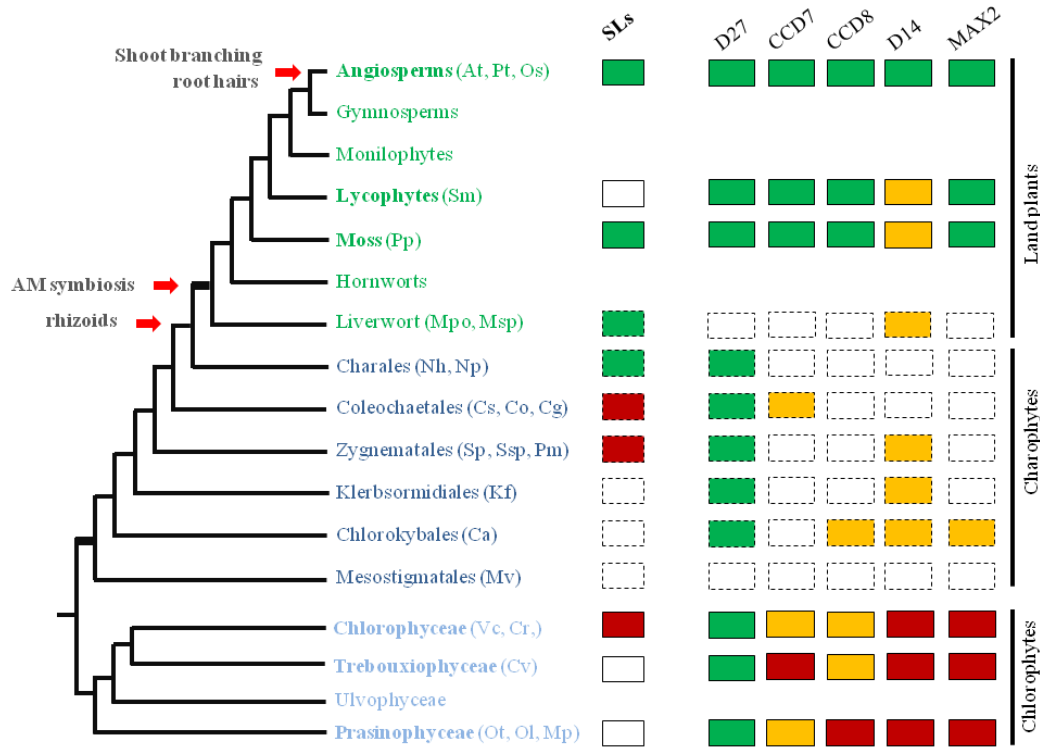
*viridae* (Mesostimatales), *Chlorokybus atmophyticus* (Chlorokybales), *Klerbsormidium flaccidum* (Klerbsormidiales), *Penium margaritaceum* (Zygnematales), *Chaetosphaeridium globosum* (Coleochaetales) and *Nitella hyalina* (Charales).

### ***Biosynthesis pathway***

Based on the results of blastp, good hits (E-values <  $10^{-40}$ ) for *OsD27*, the most recently identified gene in strigolactone biosynthesis (Lin et al., 2009), were found in all genomes examined (*O. tauri*, *O. lucimarinus*, *M. pusilla*, *V. carteri*, *C. reinhardtii*, *C. variabilis*, *P. patens*, *S. moellendorffii*) and in ESTs of *N. hyalina*, *C. globosum*, *S. pratensis*, *P. margaritaceum*, *K. flaccidum* and *C. atmophyticus* (Fig. 22), confirming the occurrence of putative orthologs of *OsD27* across the green lineage as proposed previously by Lin et al. (2009).

Potential orthologs of *AtCCD7* were found in each of the genomes tested, with the exception of *Chlorella variabilis*, and in ESTs of *Coleochaete orbicularis* and *Chaetosphaeridium globosum* (Fig. 23). In contrast, orthologs of *AtCCD8* were found in all tested genomes, except those of Prasinophyceae (*O. tauri*, *O. lucimarinus* and *M. pusilla*), and in the ESTs of *Chlorokybus atmophyticus* (Fig. 22). The lack of CCD8 in Prasinophyceae genome is probably due to genome compaction like for some other gene families in these organisms (Derelle et al., 2006). Phylogenetic analyses using Maximum Likelihood (ML) of the putative CCD7 and CCD8 sequences confirmed their assignment as homologous proteins (Figs. 23, 24).

In a recent study, Messing et al. (2010) resolved the crystallographic structure of ZmVP14. ZmVP14 is the maize orthologs of AtNCEDs (nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) an enzyme closely related to CCDs. Based on its structure, the authors proposed several amino acids as essential



**Fig. 22. Proposed scheme for the evolution of strigolactone-related genes in the green lineage.** Presence and absence of SLs and of proteins known to be involved in SL synthesis and signaling are indicated in green and red boxes, respectively. Orange boxes indicate putative homologous proteins. Red arrows show the proposed appearance of three strigolactone roles. (SLs: strigolactones, *n.d.*: not determined, AM: arbuscular mycorrhizal). Dotted boxes indicate data obtained from ESTs only. Angiosperms: At (*Arabidopsis thaliana*), Pt (*Populus trichocarpa*) and Os (*Oryza sativa*). Lycopods: Sm (*Selaginella moelendorffii*). Bryophytes: Pp (*Physcomitrella patens*), Msp (*Marchantia sp.*), Mpo (*Marchantia polymorpha*). Charophytes green algae: Nh (*Nitella hyalina*), Np (*Nitella pseudoflabellata*), Co (*Coleochaete orbicularis*), Cs (*Coleochaete scutata*), Cg (*Chaetosphaeridium globosum*), Sp (*Spirogyra pratensis*), Ssp (*Spirogyra sp.*), Pm (*Penium margaritaceum*), Kf (*Klerbsormidium faccidum*), Ca (*Chlorokybus atmophyticus*), Mv (*Mesostigma viride*). Chlorophytes green algae: Vc (*Volvox carteri*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Cv (*Chlorella variabilis*), Ol (*Ostreococcus lucimarinus*), Ot (*Ostreococcus tauri*) and Mp (*Micromonas pusilla*).

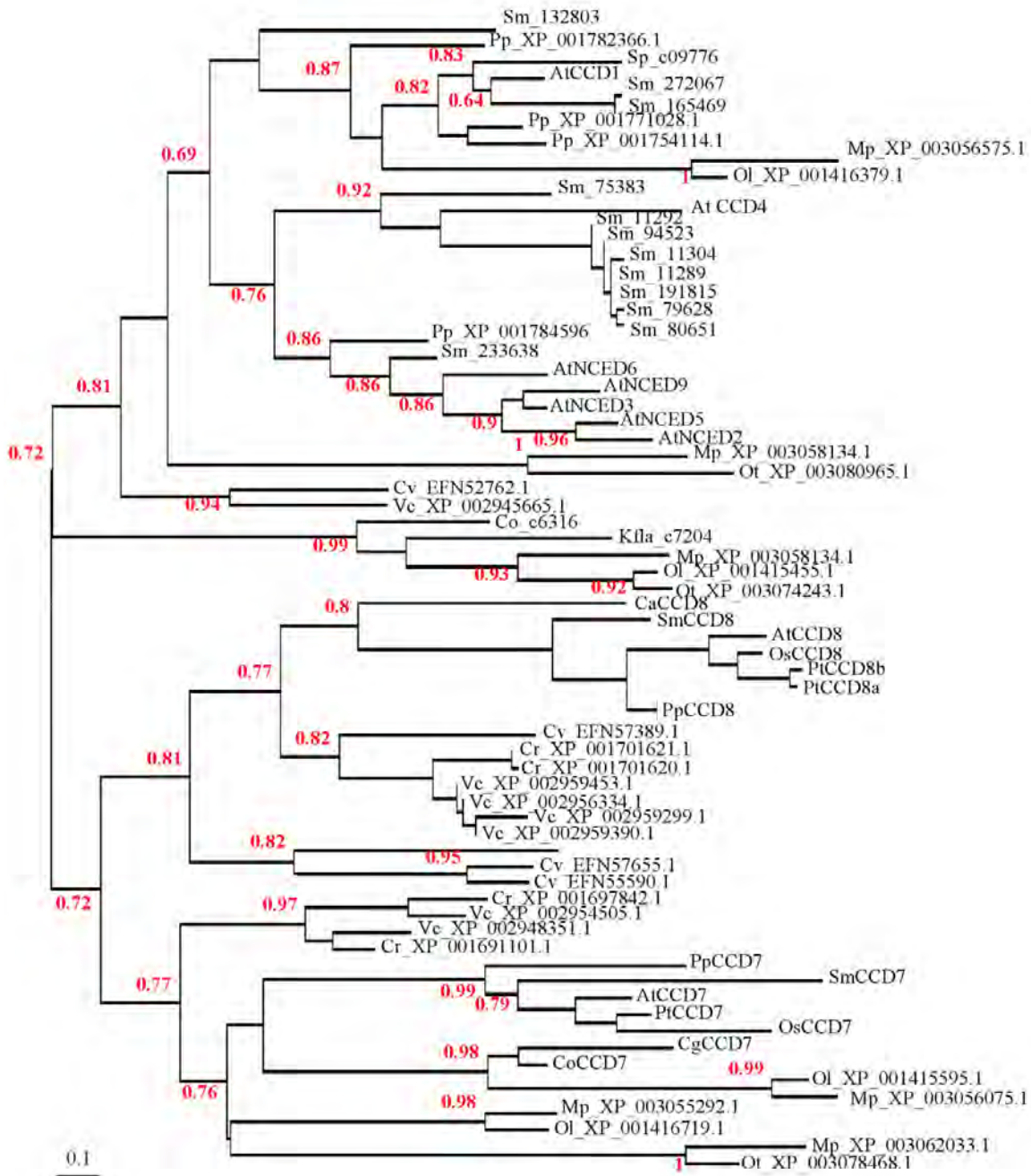
for substrate specificity (Phe-171, Phe-411, Val-478 and Phe-589) or cleavage activity (Four histidines). By alignment, they identified corresponding amino acids in other CCDs and validated their hypothesis by mutagenesis of some of these amino acids in ZmCCD1. Based on these results, the authors hypothesized that these amino acids are also crucial in other CCDs. Interestingly, the carotenoid cleavage oxygenase BtTSP3 of the fungus *Blakeslea trispora* which has a proposed product similar to that of AtCCD8 (Schwartz et al., 2004; Burmester et al., 2007) and AtCCD8 share the same four amino acids, Phe, Phe, Met, Leu at position corresponding to Phe-171, Phe-411, Val-478 and Phe-589 of ZmVP14, reinforcing this hypothesis (data not shown). As we did not find SLs in several algae which possess potential orthologs of CCD7 and CCD8, we aligned the sequence of these proteins with those of AtCCD7 and AtCCD8 and compared the important amino acids. We systematically found the four histidines essential for the cleavage activity of ZmVP14. Focusing on the four amino acids proposed to be crucial for substrate specificity (Messing et al., 2010), we found that the leucine of AtCCD7, corresponding to Phe-171 of ZmVP14, is generally well conserved with some exception in green algae (Fig. 23). The two phenylalanines of AtCCD7, corresponding to Val-478 and Phe-589 of ZmVP14, are systematically present in CCD7 proteins of land plants but not in those of algae (Fig. 23). The isoleucine of AtCCD7, at position corresponding to Phe-411 of ZmVP14, is neither conserved in land plants nor in algae, suggesting that this amino acid is less important for substrate specificity in CCD7. Regarding CCD8, we show that the four amino-acids of AtCCD8 (Phe, Phe, Met, Leu) corresponding to Phe-171, Phe-411, Val-478 and Phe-589 of ZmVP14 are present in all CCD8 proteins of land plants, with a minor modification (Leu instead of Ile) in SmCCD8, whereas CCD8 genes from green algae lack at least one of these four amino-acids (Fig. 23).



If we hypothesize that the amino acids considered to be essential for the carotenoid substrate specificity of CCD7 and CCD8 proteins are also required for strigolactone synthesis, our results suggest that the putative CCD7 and CCD8 proteins of green algae are not involved in SL biosynthesis but in some other biosynthetic pathways which remain to be characterized.

### ***Signaling pathway***

It has been proposed that D14 ( $\alpha/\beta$ -fold hydrolase) and MAX2/RMS4/D3 (F-BOX protein) play a key function in strigolactone perception (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006; Arite et al., 2009). Indeed, exogenously applied strigolactones did not rescue the highly branched phenotype of the corresponding mutants. OsD14 has a closely related homolog in the rice genome, named OsD14-like (Arite et al., 2009). We looked for homologs of these two proteins in the same organisms as above. We identified putative orthologs in the genomes of land plants and in the ESTs of *Chlorokybus atmophyticus*, *Klerbsormidium flaccidum* and *Spirogyra pratensis* (Fig. 22). To assess the identity of each potential ortholog, we constructed the ML tree of the D14 family using the putative D14 blast hits (Fig. 25). *Bacillus subtilis* RsbQ was used as outgroup (as proposed by Arite et al. 2009). Two distinct groups were formed: one with the OsD14 orthologs of angiosperms, the other one with the D14-like proteins of land plants and their potential orthologs from Charophytes green algae (Fig. 25), suggesting a duplication event at the base of the angiosperm lineage. We did not find potential orthologs of AtMAX2 in the Chlorophytes and in most of the Charophytes. However, we did identify closely related genes in *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens*, and in the basal Charophytes *Chlorokybus atmophyticus* (Fig. 23). However, according to maximum likelihood analysis, the putative F-BOX protein of



**Fig. 24. Maximum-likelihood tree of plant Carotenoid cleavage dioxygenases.** Bootstrap >50 are indicated in red. Angiosperms: *At* (*Arabidopsis thaliana*), *Pt* (*Populus trichocarpa*) and *Os* (*Oryza sativa*). Lycopods: *Sm* (*Selaginella moelendorffii*). Bryophytes: *Pp* (*Physcomitrella patens*). Charophytes green algae: *Co* (*Coleochaete orbicularis*), *Cg* (*Chaetosphaeridium globosum*), *Sp* (*Spirogyra pratensis*), *Ca* (*Chlorokybus atmophyticus*). Chlorophytes green algae: *Vc* (*Volvox carteri*), *Cr* (*Chlamydomonas reinhardtii*), *Cv* (*Chlorella variabilis.*), *Ot* (*Ostreococcus tauri*), *Ol* (*Ostreococcus lucimarinus*) and *Mp* (*Micromonas pusilla*).



*Chlorokybus atmophyticus* is more closely related to AtFBL4, a different F-BOX protein of *Arabidopsis thaliana*, than it is to AtMAX2 (Fig. 25). These data suggest that only land plants contain MAX2 orthologs and that only flowering plants possess both genuine D14 orthologs.

### **Effect of exogenously applied strigolactones on basal Streptophytes**

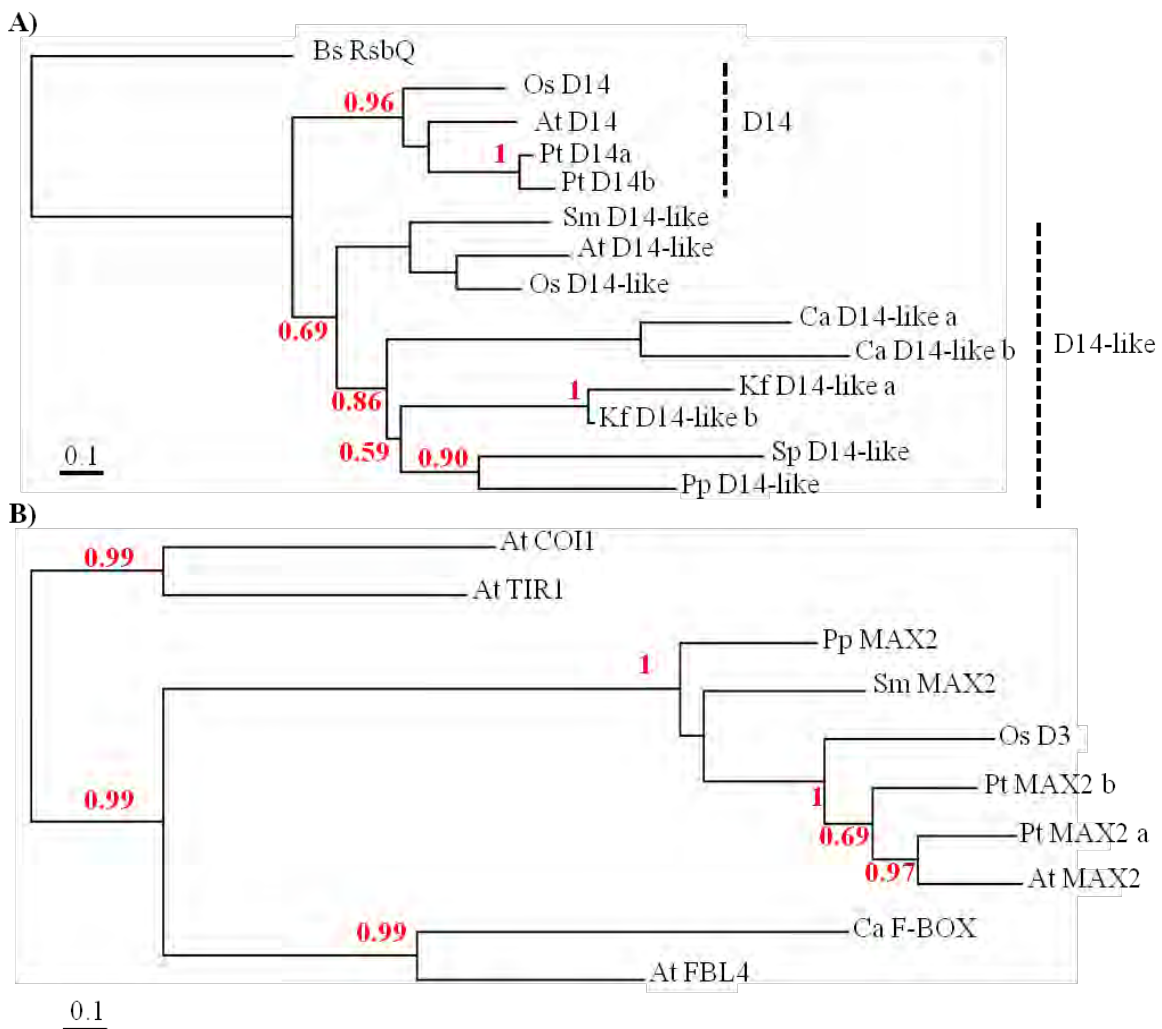
The occurrence in moss of the ortholog of the strigolactone signaling protein MAX2 suggests that SLs may have additional hormonal functions, other than the control of shoot branching. Proust et al. (2011) have demonstrated that SLs control colony growth of the moss *Physcomitrella patens*. We examined the effect of exogenously applied GR24 (10 nM) on gametophores of *Physcomitrella*. Treated gametophores exhibited a significant increase (+35%) of basal rhizoid length (Fig. 26A). No effect was noted on the leafy shoots.

Because SLs were also found in liverworts, we also tested the effect of GR24 (10 nM) on *Marchantia sp.* As in *Physcomitrella patens*, the length of the unicellular rhizoids was strongly increased (+42%; Fig. 26B).

## **Discussion**

### **Occurrence of strigolactones in the green lineage**

Over 40 years ago, the first two SLs, strigol and strigyl acetate, were characterized in cotton (Cook et al., 1966). Since then, several additional SLs have been identified in Angiosperms: in dicots like *Arabidopsis thaliana* (Goldwasser et al., 2008), Fabaceae (Kaori Yoneyama et al., 2008) and tobacco (Xie et al., 2007); and in monocots like sorghum, maize, common millet (Awad et al., 2006) and rice (Umehara et al., 2008; for review see Xie et al. 2010). The distribution of SLs in the plant lineage is expected to be wide because these

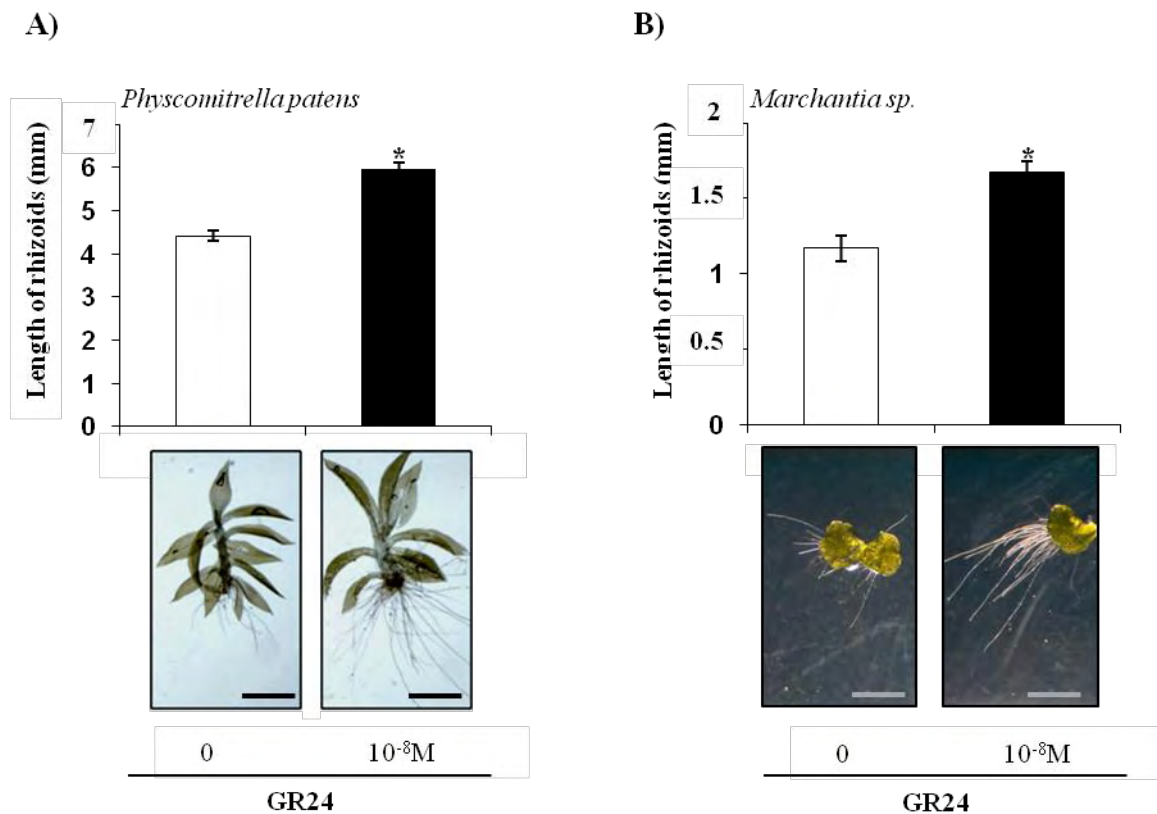


**Fig. 25. Maximum-likelihood (ML) tree of D14 and MAX2 homologs identified by blast-p.** (a) The ML tree of the D14 sequences is rooted with *Bacillus subtilis* RsbQ, as proposed by Arite *et al.* (2009). (b) The MAX2 ML tree is rooted with *AtCOI1* and *AtTIR1*. Bootstrap values >0.50 are indicated in red.

molecules are also suspected to occur in Gymnosperms *Pinus* spp. and were recently found in the moss *Physcomitrella patens* (Xie et al., 2010; Proust, B. Hoffmann, et al., 2011).

To gain insight into the occurrence of strigolactones in the green lineage, we looked for the presence of SLs in exudates or tissues of basal land plants. We used the *Gigaspora* hyphal branching bioassay (Buée et al., 2000) because it has proven to be extremely sensitive to detect the presence of SLs at concentrations down to  $10^{-13}$  M (Besserer et al., 2006). It also responds to a large variety of natural SLs (Akiyama et al., 2010). This bioassay has been successfully used in the recent years to detect the presence of SLs in various plant tissues and exudates (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006; Kaori Yoneyama et al., 2008; Balzergue et al., 2011). C18 purified exudates of the moss *Physcomitrella patens* induced hyphal branching whereas crude extracts were not active, perhaps due to complex molecular interactions (Fig. 1). We then focused our analysis on liverworts which are most likely the earliest diverging lineage of land plants (Qiu et al., 1998). Crude extracts of the liverworts, *Marchantia* sp. and *Lunularia cruciata* (data not shown), were active in the *Gigaspora* hyphal branching assay (Fig. 1). LC-MS/MS analyses confirmed the presence of SLs in *Marchantia* extracts. In *Marchantia polymorpha* we identified solanacol, two orobanchol isomers, orobanchyl acetate, fabacyl acetate and 5-deoxystrigol (Fig. 2). We found that the SL composition varied with the culture duration (data not shown), a possible explanation for finding only 5-deoxystrigol in another isolate of *Marchantia* sp (Fig. S1).

To determine the occurrence of SLs deeper in the green lineage, we also analyzed the SL content of several Charophytes and Chlorophytes. We found SLs (sorgolactone) in two species of Charales (Figs. 3, 4) but not in the Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* or in the Charophytes *Spirogyra* sp. (Zygnematales) and *Coleochaete scutata* (Coleochaetales) (Fig. 3) The fact that we detected homologs of CCD7 and CCD8 in green algae but no SLs could be explained by the lack of some amino-acids shown by Messing et al. (2010) to be



**Fig. 26. Effect of exogenously applied GR24 on Bryophytes.** (a) The rhizoids of treated gametophores of the moss *Physcomitrella patens* are longer than those in the control condition (n=30-40 gametophores per treatment). (b) The rhizoids of treated thalli of the liverwort *Marchantia sp.* are also longer than those in the control condition (n=50-70 gemmae per treatment). Bars represent 1 mm. Error bars correspond to SEM. Stars indicate significant differences between the two treatments, according to Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

essential for substrate specificity of CCDs. One can speculate that the green algae CCD7 and CCD8 (Fig. 22) have functions other than SL synthesis. To further confirm this hypothesis, we should have confirmed the presence of the correct amino-acids in CCD7 and CCD8 of *Nitella hyalina* (Charales). Our attempt to identify the *CCD7* and *CCD8* sequences of *Nitella hyalina* by PCR with degenerated primers or EST sequencing, failed. One explanation could be the very low level of expression of *CCD7* and *CCD8* as observed in land plants. For example, we found only one EST corresponding to *CCD8* gene in the one million available *Arabidopsis thaliana* ESTs.

Taken together our results suggest that SLs are absent of Chlorophytes and of several Charophytes green algae but are present in Charales. Several recent studies have proposed that Zygnematales and/or Coleochaetales are the closest algal relatives to land plants (Lemieux et al., 2007; Finet et al., 2010, Wodniok et al., 2011). One hypothesis could be that SLs appeared with advanced Charophytes and have been conserved since to become a common trait of the embryophytes; they would have been independently lost in Zygnematales and Coleochaetales. An alternative hypothesis could be that Charales, as proposed by Karol et al. (2001) and Turmel et al. (2003), are in fact the closest order to land plants. This would explain why they are the only Charophytes synthesizing SLs.

### **Primitive function of strigolactones**

One aim of our work was to determine the original function(s) of SLs that could have been positively selected through the evolution of plants. Interestingly, the structure of the SLs that we found in basal Streptophytes is similar to that of flowering plants (Figs. 17, 21). Thus, the evolution of the functions of SLs probably involved the emergence of new signaling pathway components. In angiosperms, SLs have two major biological activities, a hormonal role in the control of shoot branching and a rhizospheric signaling role for parasitic weeds and



AM fungi. Shoot branching is a specific trait of vascular plants and at least two genes, D14 and FC1 (OsTB1, Minakuchi et al., 2010), which act downstream of SLs to inhibit bud outgrowth, are specific to Angiosperms (Navaud et al., 2007; Fig. 7). Shoot branching control could therefore be a recent hormonal function of SLs. Similarly, the SL control of protonema expansion found in the moss *Physcomitrella patens* (Proust, B. Hoffmann, et al., 2011) cannot occur in liverworts which are devoid of this developmental stage. By contrast, 80% of land plants can live symbiotically with AM fungi, including mosses and liverworts (Wang & Qiu, 2006; Smith & Read, 2008). Because SLs are present in these basal land plants, a primitive signaling function to promote the terrestrial adaptation of plants with a beneficial symbiosis may be hypothesized. However, this hypothesis is contradicted by the fact that Charales also produce and exude SLs and they do not form AM symbiosis. Thus another, more primitive, role for SL must be considered.

Several years ago, Menand et al. (2007) demonstrated that a basic-helix-loop-helix transcription factor (AtRHD6/PpRSL1) regulates root hair development in *Arabidopsis thaliana* and rhizoid development in *Physcomitrella patens*, suggesting that root hairs and rhizoids share a similar developmental pathway. In a previous study, we demonstrated that an exogenous treatment with the SL analog GR24 stimulates the elongation of *Arabidopsis thaliana* root hairs (Kapulnik et al., 2011). Here, we show a similar effect on the rhizoids of two Bryophytes, the model moss *Physcomitrella patens* and the liverwort *Marchantia* (Fig. 26). Interestingly, Charales are the first organisms in the green lineage which develop similar true rhizoids (McCourt et al., 2004). Unfortunately, because of the difficulty to introduce a *Nitella* species *in vitro*, we failed in our attempt to identify the function of SLs in Charales, and in particular their potential effect on rhizoids. However, we can hypothesize that SLs appeared with these organisms to play a role in rhizoid elongation and thus increase their anchorage ability, a positive trait for plant terrestrial colonization. Later, SLs could have been





recruited to facilitate symbiotic fungal interaction. SLs would have been positively conserved during land plant evolution for these two underground functions, and more recently used as a root hormone to control root hair development and the aerial architecture of flowering plants (Fig. 22).

In previous studies Besserer et al. (2006, 2008, 2009) showed that hyphal branching of the fungus *Gigaspora rosea* in response to SLs correlates with a strong mitochondrial activation. Indeed, the activation of the fungal energy metabolism (NADP(H) and ATP synthesis) occurs immediately after application of SLs and independently of transcriptional induction (Besserer et al., 2008). Fungal hyphae of *Gigaspora rosea*, like rhizoids of *Physcomitrella patens* (Menand et al., 2007b) and *Chara fragilis* (Hodick, 1993), or root hairs and pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* (Samaj et al., 2006), are tip growing cells. In plants, apical growth requires the mitochondrial release of ROS and  $\text{Ca}^{++}$  at the tip of the cell (Cárdenas, 2009). The stimulation of rhizoid and root hair elongation by SLs could therefore be the result of an early mitochondrial activation, as for *Gigaspora* hyphal branching.

The occurrence in flowering plants of an intimate connection between SL and auxin signaling (Sorefan et al., 2003; Foo et al., 2005; Bennett et al., 2006; Arite et al., 2007; Mashiguchi et al., 2009; Stirnberg et al., 2010; Crawford et al., 2010; Ruyter-Spira et al., 2011) supports another hypothesis where SL stimulation of rhizoid elongation in liverworts, would involve auxin-dependent hormonal control. Interestingly, even though auxin synthesis occurs in the entire green lineage (Lau et al., 2008), auxin signaling elements lack in Chlorophyceae. Indeed, putative forms of the auxin signaling pathway have been shown only down to Coleochaetales (De Smet et al., 2011). In addition, rhizoid development of many basal Streptophytes has been shown to be controlled by auxin (Kaul et al., 1962; Klambt et al., 1992; Sakakibara et al., 2003; Eklund et al., 2010). In *Physcomitrella patens*, auxin-



biosynthesis mutants have longer rhizoids than the WT whereas the number of leaves is not affected (Eklund et al., 2010). Similarly, in our experiments, only the rhizoid length of *Physcomitrella patens* (Fig. 7a), and not the number of leaves, was modified by SL treatment. Whether the control of elongation of rhizoids in basal plants and perhaps of root hairs in vascular plants is dependent on SL mitochondrial activation and/or on SL-auxin cross-talk is a question that will require additional work.

## Conclusion

Our study shows that like auxin and gibberellins (Stirk et al., 2009; Ross & Reid, 2010), SLs are a widespread class of hormones in the plant kingdom occurring down to advanced Charophytes algae like Charales. One primitive role of SLs in early diverging land plants, like mosses and liverworts, and in Charales, could have been the promotion of rhizoid development and anchorage. In mycotrophic liverworts SLs would also have promoted the AM symbiosis. These two primitive SL functions could have been crucial for land colonization by plants.

The occurrence of SLs and rhizoids in Charales but not in other green algae supports the hypothesis that Charales, rather than Coleochaetales (Finet et al., 2010) or Zygnematales (Wodniok et al., 2011), are the closest algal relatives to land plants. Much more work will be required to further support this hypothesis. In any case, our study highlights the strategic position of the advanced Charophytes algae to study land plant evolution and pleads for the development of representative models for further molecular, genomic and phylogenetic investigation of the conquest of land by plants.



## Abbreviation

SLs: Strigolactones; CCD: Carotenoid Cleavage Dioxygenase; MRM: Multiple Reaction Monitoring; AM: Arbuscular mycorrhizal

## Acknowledgements

The authors thank Dr Jean-Pierre Vors (Bayer CropScience) for stimulating discussions, Dr. Soizic Rochange (Toulouse University, France) for critically reading the manuscript and Pr. Brigitte Crouau-Roy (Toulouse University, France) for help in phylogenetic analysis. They are grateful to Pr. Ilse Foissner (Salzburg University, Austria) for providing *Nitella hyalina* and *Nitella pseudoflabellata*, to Dr. Catherine Rameau (INRA Versailles, France) for the *Physcomitrella patens* strain, and to Dr. Patricia Jargeat (Toulouse University, France) for *Lunularia cruciata* sampling. Mass spectrometry experiments (Q-Trap) were carried out on the Metabolomics and Fluxomics platform of Toulouse (MetaToul).

## Funding resources

Pierre-Marc Delaux was funded by Grant Award No. CIFRE0391/2008 from Bayer CropScience. Xiaonan Xie was supported by the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS) Post-Doctoral Fellowship for Foreign Researchers. Part of the work of Koichi Yoneyama's group was supported by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

**Table 1. Organisms used in the study.**

Organism	Abbreviation	Classification	Origin	sequences
<i>Populus trichocarpa</i>	Pt	Vascular plant (Angiosperm)		NCBI (complete genome)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At	Vascular plant (Angiosperm)		NCBI (complete genome)
<i>Oryza sativa</i>	Os	Vascular plant (Angiosperm)		NCBI (complete genome)
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Sm	Vascular plant (Lycopod)		<a href="http://genome.jgipsf.org/Selmo1/Selmo1.home.html">http://genome.jgipsf.org/Selmo1/Selmo1.home.html</a>
<i>Physcomitrella patens</i>	Pp	Bryophytes (Moss)	Dr. C. Rameau (Versailles, France)	NCBI (complete genome)
<i>Marchantia polymorpha</i>	Mp	Bryophytes (Liverwort)		
<i>Marchantia sp.</i>	Msp	Bryophytes (Liverwort)	Pyrenees mountains (Ariège)	
<i>Lunularia cruciata</i>	Lc	Bryophytes (Liverwort)	Pyrenees mountains (Pyrénées Orientales)	
<i>Nitella hyalina</i>	Nh	Charophyte (Charales)	Pr. I. Foissner (Salzburg, Austria)	Unpublished ESTs
<i>Nitella pseudoflabellata</i>	Np	Charophyte (Charales)	Pr. I. Foissner (Salzburg, Austria)	
<i>Coleochaete orbicularis</i>	Co	Charophyte (Choleochaetales)		ESTs (Timme and Delwiche, 2010)
<i>Coleochaete scutata</i>	Cs	Charophyte (Choleochaetales)	SAG *	
<i>Spirogyra pratensis</i>	Sp	Charophyte		ESTs (Timme and

		(Zygnematales)		Delwiche, 2010)
<i>Spirogyra sp.</i>	Ssp	Charophyte (Zygnematales)	SAG *	
<i>Penium margaritaceum</i>	Pm	Charophyte (Zygnematales)		Unpublished ESTs
<i>Klerbsormidium flaccidum</i>	Kf	Charophyte (Klerbsormidiales)		Unpublished ESTs
<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	Ca	Charophyte (Chlorokybales)		Unpublished ESTs
<i>Mesostigma viride</i>	Mv	Charophyte (Mesostigmatales)		Unpublished ESTs
<i>Volvox carteri</i>	Vc	Chlorophyte (Chlorophyceae)		NCBI (complete genome)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cr	Chlorophyte (Chlorophyceae)	CEA Cadarache	NCBI (complete genome)
<i>Chlorella sp. NC64A</i>	Csp	Chlorophyte (Trebouxiophyceae)		NCBI (complete genome)
<i>Ostreococcus tauri</i>	Ot	Chlorophyte (Prasinophyceae)		NCBI (complete genome)
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Ol	Chlorophyte (Prasinophyceae)		NCBI (complete genome)
<i>Micromonas pusilla</i>	Mp	Chlorophyte (Prasinophyceae)		NCBI (complete genome)

\*[http://www.epsag.uni-goettingen.de/cgi-bin/epsag/website/cgi/show\\_page.cgi?kuerzel=about](http://www.epsag.uni-goettingen.de/cgi-bin/epsag/website/cgi/show_page.cgi?kuerzel=about)





### III. Conclusion

Dans cet article la question adressée portait sur l'origine et l'évolution des strigolactones.

Nos résultats montrent que :

- Ces molécules (Solanacol, Orobanchol, Orobanchyl acetate, 5-deoxystrigol, Fabacyl acetate) sont présentes chez deux isolats de l'Hépatique *Marchantia*, représentant des plantes terrestres les plus basales.
- Deux espèces de Charales (algues d'eau douce), *Nitella pseudoflabellata* et *Nitella hyalina* produisent la sorgolactone.
- Les algues ayant divergées plus tôt (Charophytes : *Coleochaete scutata* et *Spirogyra sp.*, et Chlorophytes : *Chlamydomonas reinhardtii*) ne semblent pas produire de strigolactones.
- Cette absence de strigolactones chez ces algues pourrait être corrélée à des différences de séquences importantes sur les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des strigolactones telles que CCD7 et CCD8.
- La fonction primitive des strigolactones chez *Nitella*, une algue non-mycotrophe, n'était probablement pas liée à la symbiose endomycorhizienne, mais plutôt à un rôle hormonal (stimulation de la croissance des rhizoïdes), comme mis en évidence chez les Bryophytes.
- Notre hypothèse est que les strigolactones ont par la suite été utilisées comme signaux symbiotique par les Gloméromycètes, puis par les plantes parasites Orobanche et Striga comme inducteur de germination des graines.



## Chapitre 2 : Effet des strigolactones sur le développement racinaire d'*Arabidopsis thaliana*

### I. Introduction

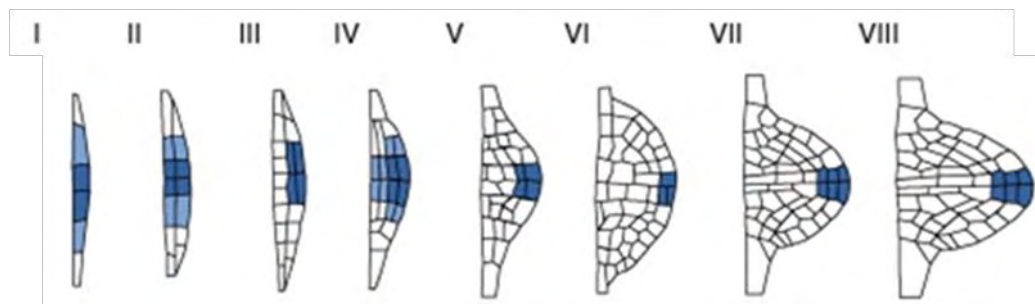
Dans la littérature, sans parler d'homologie réelle, les rhizoïdes de mousses sont souvent comparés aux poils absorbants des Angiospermes. En effet, ces deux types cellulaires possèdent une morphologie proche, une croissance apicale et une fonction similaire : l'augmentation de la surface d'échange avec leur environnement.

Le contrôle génétique de leur développement semble aussi posséder de nombreux points communs. Chez *Arabidopsis thaliana* les facteurs de transcription Root Hair Defective 6 (RHD6)-like sont impliqués dans la formation des poils absorbants (Menand et al., 2007). L'orthologue de ce gène chez la mousse *Physcomitrella patens*, PpRSL1, est impliqué dans le développement des rhizoïdes et son expression chez le mutant *rh6* d'*A. thaliana* permet de restaurer le phénotype sauvage (Menand et al., 2007).

Nous avons précédemment montré que les strigolactones étaient actives sur le développement des rhizoïdes de mousse et d'Hépatique (Chapitre 1).

Nous nous proposons maintenant d'étudier le rôle (éventuel) des strigolactones sur les poils absorbants de la plante modèle *A. thaliana*, et de façon plus générale sur son développement racinaire.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Y. Kapulnik (The Volcani Center, Bet Dagan, Israël). Dans cette étude, nous avons réalisé un phénotypage précis chez *A. thaliana* des systèmes racinaires des mutants de synthèse de strigolactones *max3* (CCD7 ;



**Fig. 27. Les sept stades de formation d'une racine latérale.** La coloration bleue correspond à la présence d'activité GUS, sous le contrôle du promoteur DR5, rapportant ainsi la présence d'auxine. Adapté de (Péret et al., 2009).

Sorefan et al., 2003) et *max4* (CCD8 ; Booker et al., 2004), et des mutants de perception *max2* (Protéine à domaine FBOX, Stirnberg et al., 2002). Ces mutants présentent un phénotype aérien hyper ramifiés, et un ajout de strigolactone exogène restaure le phénotype des mutants de synthèse (*max3* et *max4*). En plus du phénotypage du système racinaire des mutants, nous avons cherché à voir l'effet d'un ajout de GR24 sur le développement des racines latérales et des poils absorbants des trois mutants et du sauvage correspondant (Col0). Pour cela le nombre de racines latérales, la longueur de la racine principale et des poils absorbants ont été mesurés pour les lignées mutantes (*max3*, *max4* et *max2*) et sauvage (Col-0), cultivées en présence ou en absence de GR24 à différentes concentrations.

La première des sept étapes de la formation des racines latérales (Fig. 16) nécessite la division d'une cellule du péricycle. Cette division, comme les étapes suivantes, est initiée par un fort influx d'auxine. Ainsi, l'observation au niveau tissulaire de la concentration d'auxine permet d'étudier finement la formation et le développement des racines latérales. L'effet du GR24 a donc été testé sur une lignée d'*A. thaliana* exprimant la protéine GUS sous le contrôle du promoteur DR5, ce promoteur étant spécifiquement induit en présence d'auxine.



**II. Article : Strigolactones affect lateral root formation and root hair elongation in *Arabidopsis***

(Article publié dans le journal « Planta », 2011 Jan;233(1):209-16. Epub 2010 Nov 16.)





**Strigolactones affect lateral root formation and root hair elongation in *Arabidopsis***

**Yoram Kapulnik<sup>1\*</sup>, Pierre-Marc Delaux<sup>2,3\*</sup>, Natalie Resnick<sup>1</sup>, Einav Mayzlish-Gati<sup>1</sup>,  
Smadar Wininger<sup>1</sup>, Chaitali Bhattacharya<sup>1</sup>, Nathalie Séjalon-Delmas<sup>2,3</sup>, Jean-Philippe  
Combier<sup>2,3</sup>, Guillaume Bécard<sup>2,3</sup>, Eduard Belausov<sup>1</sup>, Tom Beeckman<sup>4,5</sup>, Evgenia Dor<sup>6</sup>,  
Joseph Hershenhorn<sup>6</sup>, Hinanit Koltai<sup>1,§</sup>**

\* Equal contribution

<sup>1</sup>Institute of Plant Sciences, Agricultural Research Organization (ARO), the Volcani Center,  
PO Box 6, Bet Dagan 50250, Israel

<sup>2</sup> Université de Toulouse ; UPS ; UMR 5546, Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les  
Végétaux ; BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup> CNRS; UMR 5546; BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>4</sup>Department of Plant Systems Biology, VIB, Technologiepark 927, B-9052 Ghent, Belgium

<sup>5</sup>Department of Plant Biotechnology and Genetics, Ghent University, Technologiepark 927,  
B-9052 Ghent, Belgium

<sup>6</sup>Department of Phytopathology and Weed Research, Newe-Ya'ar Research Center, PO Box  
1021, Ramat-Yishay, Israel

<sup>§</sup>Corresponding Author: Hinanit Koltai, Institute of Plant Sciences, Agricultural Research  
Organization (ARO), the Volcani Center, PO Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; Tel: +972-3-  
9683483; Fax: +972-3-9669642; Email: [hkoltai@volcani.agri.gov.il](mailto:hkoltai@volcani.agri.gov.il)

Running head: Strigolactones affect lateral root formation and root hair elongation



**Abstract** Strigolactones (SLs) have been proposed as a new group of plant hormones, inhibiting shoot branching, and as signaling molecules for plant interactions. Here, we present evidence for effects of SLs on root development. Analysis of mutants flawed in SLs synthesis or signaling suggested that absence of SLs enhances lateral root formation. In accordance, roots grown in the presence of GR24, a synthetic bioactive SL, showed reduced number of lateral roots in WT and in *max3-11* and *max4-1* mutants, deficient in SL synthesis. The GR24-induced reduction of lateral roots was not apparent in the SL signaling mutant *max2-1*. Moreover, GR24 led to increased root-hair length in WT and in *max3-11* and *max4-1* mutants, but not in *max2-1*. SLs effect on lateral root formation and root hair elongation may suggest a role for SLs in regulation of root development, perhaps as a response to growth conditions.

**Keywords:** GR24, Lateral root, Root development, Root hair, Strigolactone

**Abbreviations:**

CCD7- Carotenoid cleavage dioxygenase 7

CCD8- Carotenoid cleavage dioxygenase 8

SL- Strigolactone

WT- Wild type



## Introduction

Strigolactones (SLs) or closely related metabolites have recently been found to be a new group of plant hormones. Studies of *Arabidopsis*, pea and rice mutants flawed in SL production or signaling (e.g., Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Vogel et al., 2009) have revealed SLs roles in plant biology: they are suggested to play a pivotal role in the regulation of aboveground plant architecture (e.g., Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Vogel et al., 2009). Among the several mutants that were identified in *Arabidopsis* as involved in the SLs pathway are *max2* plants, which are mutated in an F-box protein which is suggested to be involved in SL signaling (Bennett et al. 2006; Stirnberg et al. 2007; Umehara et al. 2008), and *max3* and *max4* plants that are mutated in carotenoid cleavage dioxygenase 7 (CCD7) and carotenoid cleavage dioxygenase 8 (CCD8), respectively; these two enzymes are suggested to be involved in SL synthesis (Booker et al., 2004; Bainbridge et al., 2005; Umehara et al., 2008; Gomez-Roldan et al. 2008).

Below ground, SLs are involved in plant interactions with the parasitic plants *Orobanche* and *Striga* (e.g., Matusova et al., 2005; Bouwmeester et al., 2007; Goldwasser et al., 2008; Xie et al., 2008) and with the symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi (e.g., Akiyama et al., 2005; Akiyama & Hayashi, 2006; Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008; Gomez-Roldan et al., 2008; Yoneyama et al., 2008). In addition, SLs have been suggested to affect root growth in the presence of exogenously applied auxin (Koltai et al., 2009).

SLs are thought to be synthesized mainly in the lower parts of the stem and in the roots (reviewed by Dun et al., 2009), as a product of a novel branching pathway of carotenoid cleavage (e.g. Gomez-Roldan et al., 2008; Rani et al., 2008; Umehara et al., 2008; Floss & Walter, 2009; reviewed by Dun et al. 2009), and to move acropetally toward the shoot apex (reviewed by Ongaro and Leyser 2008; Leyser 2009; Stirnberg et al. 2010).



Additional studies have suggested cross-talk between SLs and auxin in determining shoot architecture, based on several hypotheses: SLs act primarily by reducing the plant's capability for polar auxin transport from the apical meristem, thereby inhibiting polar auxin transport from buds and resulting in restrained bud outgrowth (Bennett et al., 2006); alternatively, SLs act as auxin-induced secondary messengers that move up into the buds to repress their outgrowth (Brewer et al., 2009; Ferguson & Beveridge, 2009; reviewed by Dun et al., 2009). Another model has suggested that auxin, moving by polar transport, promotes the expression of SL-synthesis genes; this leads to increased SL production, which in turn leads to reduced auxin export, mediated via polar auxin transport from the buds, and to reduced bud outgrowth (Hayward et al., 2009).

Previously, we have shown that a synthetic SL, GR24, affects tomato root development by modulating auxin efflux from cells (Koltai et al., 2009). In the present study, we have investigated SLs effect on root development and root system architecture. Analysis of the root phenotype of mutants flawed in SLs synthesis or signaling suggested that absence of SLs enhances lateral root formation. Accordingly, root treatments with the synthetic bioactive GR24 led to reduction in lateral root formation for WT and *max3-11* and *max4-1* mutants, but not for *max2-1* mutant. Also, treatment of roots with GR24 led to changes in root-hair length. This effect was significant in WT, and in *max3-11* and *max4-1* mutants but not in *max2-1* mutant. The results suggest that SLs may be mediators of plant root development.





## Materials and methods

### *Arabidopsis* strains and growth conditions

Seeds of *Arabidopsis thaliana*, wild type (WT; Columbia; Col-0), Col-0 homozygous lines *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997), *max2-1*, *max3-11* and *max4-1* (obtained from the ABRC stock center <http://abrc.osu.edu/>) were surface-sterilized and germinated on 1/2 Murashige and Skoog (MS) plates, or on modified Long Ashton nutrient solution (Hewitt, 1966; 7.5  $\mu\text{M}$  sodium phosphate instead of 750  $\mu\text{M}$ ) solidified with 0.7% agar (for lateral root density determination under concentrations of  $1 \times 10^{-6}$  M GR24 and lower, see below). Plates were incubated vertically in the dark at 4°C for two days to synchronize germination. Three days after germination, seedlings were gently transferred using forceps to 1/2 MS plates or to Long Ashton nutrient solution plates containing various concentrations of GR24. GR24 is used as a mixture of four isomers [(±)-GR24 and (±)-2'-epi-GR24] (Johnson et al., 1981), and was kindly provided by Dr. Koichi Yoneyama (Utsunomiya University, Japan). The root tip of the transferred seedling was marked on the plates. Plates remained unsealed to prevent accumulation of gases (e.g., ethylene), and were positioned in an upright 45° position, and incubated at 22°C with a light intensity of 50-60 mol photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided by white fluorescent tubes and under a photoperiod of 16 hours light / 8 hours dark for 6-12 days.

GR24 treatments were conducted at concentrations ranging from  $1 \times 10^{-11}$  to  $13.5 \times 10^{-6}$  M. GR24 was initially dissolved in acetone (5 mg GR24/3 ml acetone) to give a 4.5 mM solution, and this solution was then further diluted with double-distilled sterile water. Hence, in addition to non-treated roots, experimental controls included roots treated with acetone at the concentrations used in the respective GR24 treatments. In each of the experiments, non-treated roots were compared to the respective acetone control. Where no difference was observed between the various controls, non-treated roots are shown. Where differences were recorded between non-treated and acetone controls, the comparison was made between GR24-



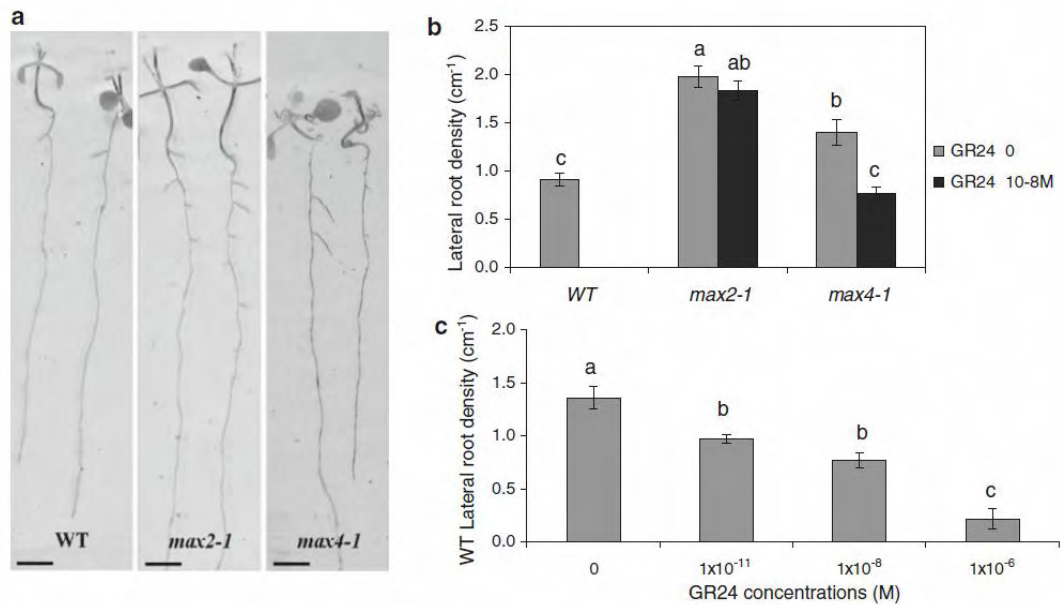
treated and acetone-treated roots. For lateral root density determination at  $10^{-6}$  M,  $10^{-8}$  M or  $10^{-11}$  M GR24, final concentration of acetone was 0.001%; this concentration was used as control. Means of replicates were subjected to statistical analysis of Kruskal-Wallis test and box-plot analysis.

#### *Determination of lateral root formation*

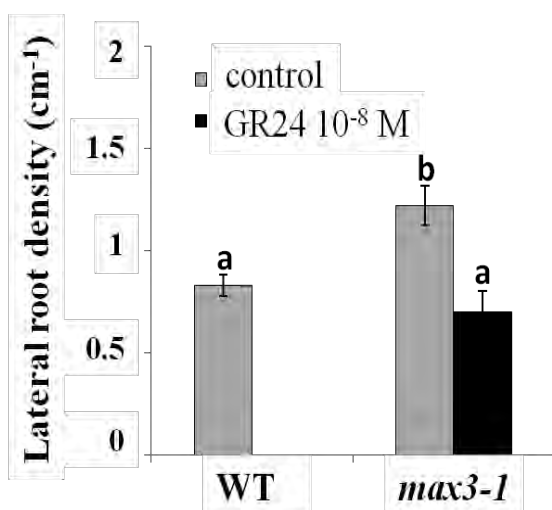
Length and number of lateral roots developed on the plates were recorded following 6 days of seedling growth. Experiments were repeated four times; each treatment within each experiment included three replicates, four germinated seedlings per replicate ( $n=48$ ). For the *DR5::GUS* line, grown on plates for 144 h, seedlings were harvested for GUS staining (Jefferson et al., 1987). Following GUS staining lateral root primordia were counted and lateral root primordia were photographed with a Leica DMLB light microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with a Nikon DS-Fi1 camera. Primordium developmental stage was categorized according to Malamy and Benfey's (1997) definition of lateral root primordium development. Experiments were repeated twice; each treatment within each experiment included two replicates, four germinated seedlings per replicate ( $n=16$ ). Means of replicates were subjected to statistical analysis of 2 way-ANOVA by multiple-range test ( $P \leq 0.05$ ) using the JMP statistical package.

For determination of lateral root density under concentrations of  $1 \times 10^{-6}$  M GR24 and lower, the primary root length of the seedlings grown for 12 days was measured and the lateral root density was determined under a Leica RZ 75 stereomicroscope. The experiment was repeated three times ( $n > 20$  seedlings). Means of replicates were subjected to statistical analysis according to the Kruskal-Wallis test and box-plot analysis.

#### *Determination of root-hair length*



**Figure 28.** Lateral roots formation in wild-type *Arabidopsis* (Col-0, WT), *max4-1* and *max2-1* mutants grown under GR24 and control treatments. **a** Root morphology of 12 day-old WT, *max2-1* and *max4-1* seedlings. Bars represent 0.5 cm. **b** Effect of 10<sup>-8</sup> M GR24 on lateral root density of *max2-1* and *max4-1* mutants, after 12 days of seedling incubation (n=20). **c** Effect of different concentrations of GR24 on lateral root density of WT plants, after 12 days of seedling incubation (n=20). Error bars indicate s.e.m. Different letters (a,b,c) indicate statistically significant different means according to Kruskal-Wallis test and box-plot analysis.



**Figure 29.** Lateral root formation in wild-type *Arabidopsis* (Col-0, WT) and *max3-1* mutant grown under 10<sup>-8</sup> M GR24 and control treatments after 12 days of seedling incubation (n=40). Error bars indicate s.e.m. Different letters (a, b) indicate statistically significant different means according to Kruskal-Wallis test and box-plot analysis.

For examination of root-hair length, roots were grown on GR24 and control plates as described above. Following 6 days of growth, roots were examined on the plates using a stereomicroscope (Leica MZFLIII, Leica Microsystems GmbH). Pictures were taken of root segments that had grown on the plates every 24 h with a Nikon DS-Fi1 camera, six separate roots per treatment. Measurements of root-hair length were performed on 10 pictures per treatment; between 15 to 20 different root hairs were measured per picture, using IMAGEJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ( $n=200$ ). Means of replicates were subjected to statistical analysis by multiple-range test ( $P \leq 0.05$ ) using the JMP statistical package.

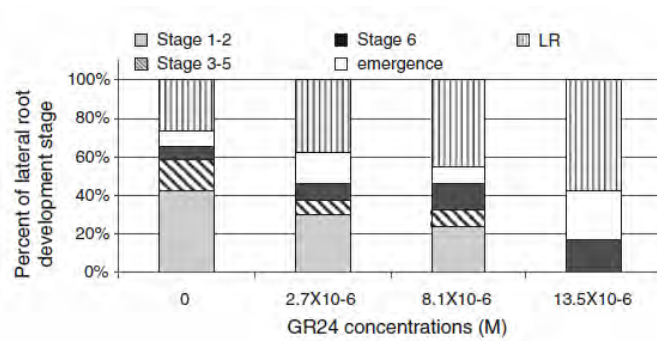
## Results

### *Strigolactones inhibits lateral root formation*

Under control conditions, *max2-1*, *max4-1* and *max3-11* exhibited increased density of lateral roots in comparison to WT controls (Figs. 28a, b and 29), suggesting that endogenous SLs control lateral root formation.

In accordance, exogenous GR24 treatments decreased lateral root density of WT *Arabidopsis*, at concentrations down to  $10^{-11}$  M (Fig. 28c). GR24 treatment affected *max4-1* lateral root development similarly to WT at  $10^{-6}$  M (-80%) and  $10^{-8}$  M (-60%), whereas GR24 at  $10^{-11}$  M had no statistically different effect (Kruskal-Wallis test and box-plot analysis,  $n=45$ ). The GR24 concentration (i.e.,  $10^{-8}$  M) that strongly reduced lateral root formation in the WT (Fig. 28c), affected *max3-11*, reducing its lateral root formation to that of the WT (Fig. 29), but did not affect lateral root formation in the *max2-1* mutant (Fig. 28b).

For a stage-specific assessment of GR24 effect on lateral root development, we recorded the stages of lateral root development in a *DR5::GUS* reporter line (Ulmasov, 1997);



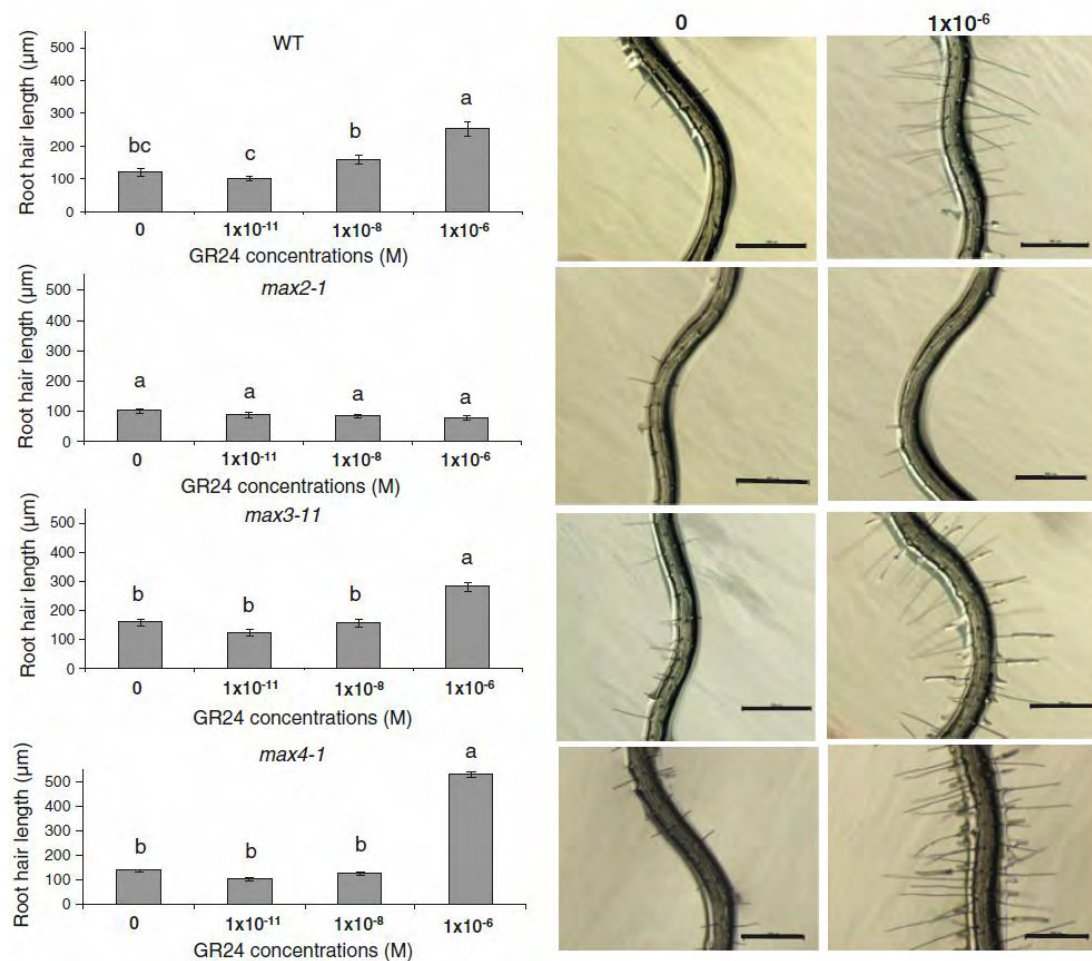
**Figure 30.** Effect of different concentrations of GR24 on developmental stages of lateral root formation (stages of lateral root formation are as defined by Malamy & Benfey, 1997) in wild-type *Arabidopsis* (Col-0, WT), at 144 h of seedling growth. Percentage of each stage is calculated from the total seedling lateral root primordia ( $n=16$ ). LR: lateral root.

seedlings were germinated on control plates and three days following germination were treated or not with GR24. The results suggest that under high GR24 concentrations (e.g.,  $13.5 \times 10^{-6}$  M), all lateral roots were more developmentally advanced than those under control or lower (e.g.  $2.7 \times 10^{-6}$  M) GR24 concentrations (Fig. 30); no de novo lateral root initiation sites or early stages of lateral root primordia were observed under high GR24 concentrations. These results suggest that the initiation of lateral roots, rather than their elongation, was affected by GR24.

#### *Strigolactones positively affect root-hair elongation*

Exposure of *Arabidopsis* seedlings to exogenous GR24 led, in the WT, to a significant increase in root-hair length in comparison to controls (Fig. 31). This effect was apparent under GR24 concentration of  $1 \times 10^{-6}$  M; under lower GR24 concentrations, no statistically significant effect was detected. Importantly, addition of GR24 to *max2-1* roots did not lead to an increase in root-hair length but promoted root-hair elongation in *max3-11* and *max4-1* roots (Fig. 31).

We also examined WT and mutant root hair responses to higher GR24 concentration ( $\geq 2.7 \times 10^{-6}$  M). First, the effect of GR24 treatments on root hair elongation was observed in the WT at different time points; GR24 effect was prominent at  $2.7 \times 10^{-6}$  M and at the latest time point (96 h) (Fig. 32; Table 2). Then, in order to assess the limits of *max2-1* resistance to GR24 treatment while maximizing GR24 root-hair effect, we determined the effect of high concentrations of GR24 at 96 h on WT and mutant lines. Similarly to the findings under lower GR24 concentrations and at earlier time points, addition of GR24 to WT and *max3-11* roots led to an increase in root-hair length, whereas its addition to *max2-1* roots did not (Fig. 33).



**Figure 31.** Effect of different concentrations of GR24 on length of root hairs of wild-type Arabidopsis (Col-0, WT) and *max2-1*, *max3-11* and *max4-1* mutants after 24 h of seedling growth in the presence of GR24 ( $n=200$ ). Error bars indicate s.e.m. Different letters (a,b,c) indicate statistically significant different means ( $P \leq 0.05$ ); Photographs show primary root segments of WT, *max2-1* and *max3-11* plants treated ( $1 \times 10^{-6}$  M) or not (0) with GR24. Bars represent 500  $\mu\text{m}$ .



For both WT and *max3-11*, stimulation of root hair elongation was reduced at the highest GR24 concentrations (Fig. 33).

## Discussion

In a previous study, we showed on tomato wild-type plants that GR24 affected root development at relatively high concentrations (Koltai et al., 2010). In the present study, based on analyses of *Arabidopsis* mutants flawed in SLs biosynthesis or signaling and the use of the bioactive GR24, we provide some additional evidence for the involvement of endogenous SLs in plant root development.

The increase in lateral root development recorded in the SL signaling mutant *max2-1* suggested that SLs repress lateral root growth: once SL sensing is hampered, lateral roots growth is enhanced. This phenotype of *max2-1* might result from the previously recorded increased level of auxin transport in *max2-1* shoot (Bennett et al., 2006; Prusinkiewicz et al., 2009). Mild increases of auxin flow to the root might promote lateral root formation (e.g., Marchant, et al., 2001; Casimiro et al., 2003).

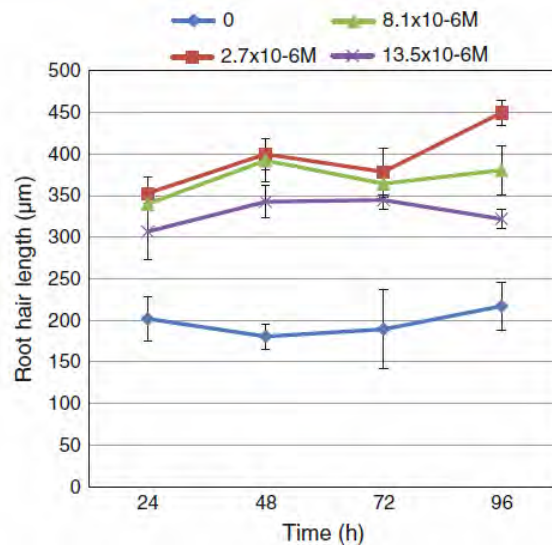
The SL synthesis mutants *max3-11* and *max4-1* showed an intermediate phenotype (i.e., between WT and *max2-1*) of lateral root formation. Similarly, in rice, mutant of SLs signaling had a more severe phenotype than mutants flawed in SLs synthesis in terms of mesocotyl elongation (Hu et al., 2010). It was suggested by Hu et al. (2010) that in the SLs synthesis mutants, SLs may be synthesized by other pathways, or that even in the absence of SLs, the MAX2 F-Box protein or equivalent might still interact with its substrate, resulting in a more moderate phenotype.

In accordance with the suggestion that endogenous SLs repress lateral root formation, GR24 treatment reduced lateral root initiation in WT, whereas the phenotype of *max3-11* and

GR24 treatment/ time (h)	0	$2.7 \times 10^{-6}$	$8.1 \times 10^{-6}$	$13.5 \times 10^{-6}$
24	ef	bcd	bcde	cdef
48	f	abc	abc	bcd
72	f	bc	bc	bed
96	def	ab	abc	bcde

**Table 2.** Representation of statistical significance of root-hair length means of wild-type (WT) plants (results are presented in Fig. 32), grown on plates supplemented with different concentrations of GR24 (M concentrations are shown).

Multiple-range test for two-way ANOVA analysis was performed; different letters (a–f) represent significantly different means

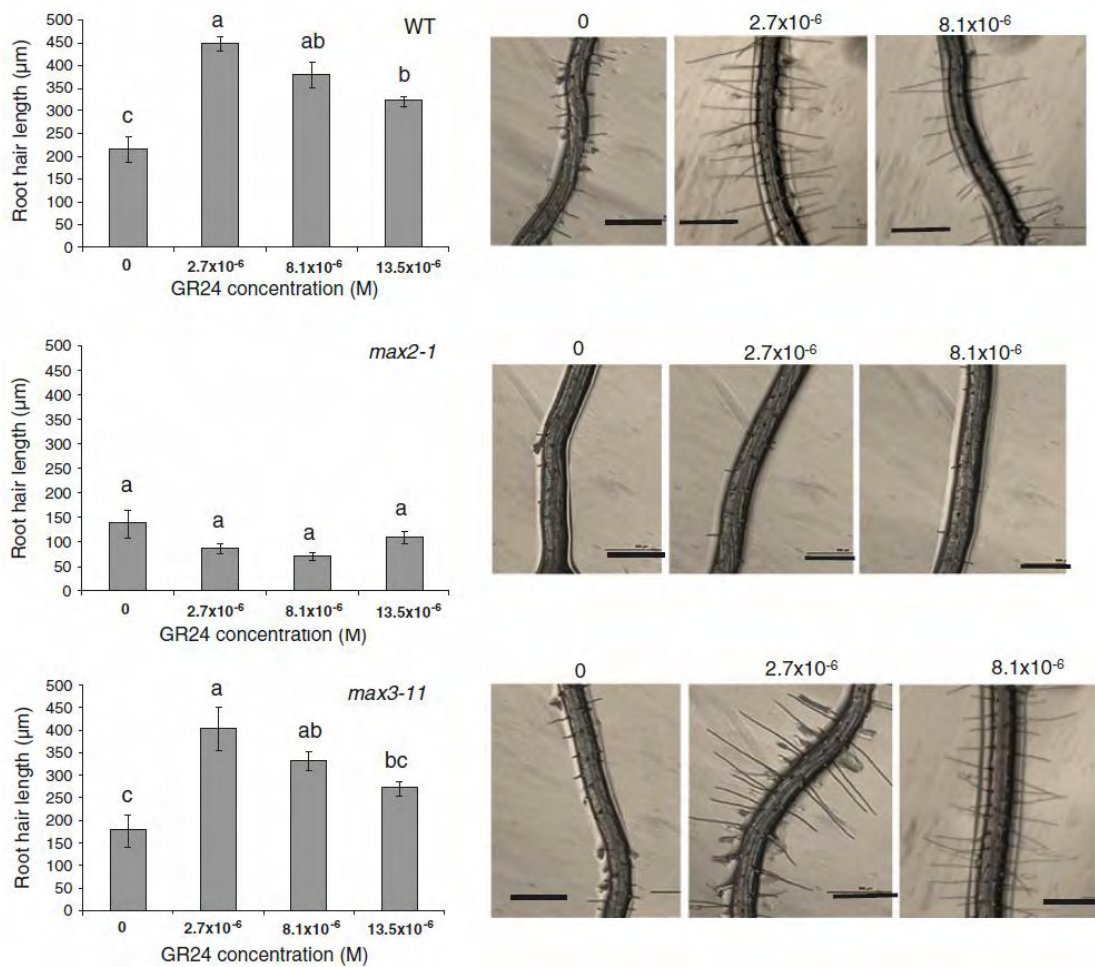


**Figure 32.** Effect of different concentrations of GR24 on length of root hairs of wild-type Arabidopsis (Col-0, WT), at 24, 48, 72 and 96h of seedling growth in the presence of GR24 ( $n=200$ ). Error bars indicate s.e.m.

*max4-1*, exhibiting more lateral roots, could be reverted with GR24 treatment to that of the WT. In contrast, *max2-1* was insensitive to GR24 in its lateral root production. All together these data strongly suggest that SLs inhibits lateral root formation of *Arabidopsis* via the MAX2 signaling pathway.

GR24 treatments also led to an increase in root-hair length of WT and *max3-11* and *max 4-1* mutants. Importantly, root hairs of *max2-1* plants, even when treated with high GR24 concentrations, were GR24-insensitive. This lack of *max2-1* response to GR24, along with the sensitivity of *max3-11* and *max 4-1* to this synthetic strigolactone, suggest that the effect of GR24 on root hair length reflects the effect of SLs on root-hair development, which is mediated via MAX2. Accordingly, the non-treated *max2-1* displayed somewhat reduced root-hair length compared to the non-treated WT, although this was not statistically significant. The WT-like root hair phenotype of the non-treated *max3-11* and *max 4-1* may result from the same reasons as above: SLs may be synthesized by other pathways in *max3-11* and *max 4-1* mutants or, even in the absence of SLs, the MAX2 F- Box protein or equivalent might still interact with its substrate, resulting in a more moderate or WT-like phenotype (Hu et al., 2010).

Root-hair elongation is a result of increased auxin levels in the epidermal cells and AUX1-dependent transport through non-hair epidermal cells (*e.g.* Evans et al., 1994; Pitts et al., 1998; Jones et al., 2009) SLs might be involved in root-hair elongation via the modulation of auxin efflux. Evidence for this comes from our study in tomato roots, suggesting that SLs interfere with the inhibitory effect of exogenously applied auxin on root elongation via an increase in root-cell length; auxin-efflux carriers were involved in this SLs` effect on root growth and root-hair elongation (Koltai et al., 2010). Hence, GR24 treatment may alter auxin efflux, thereby accounting for the observed increased length of the root hairs.



**Figure 33.** Effect of different concentrations of GR24 on length of root hairs of wild-type *Arabidopsis* (Col-0, WT) and *max2-1* and *max3-11* mutants after 96 h of seedling growth in the presence of GR24 ( $n=200$ ). Error bars indicate s.e.m. Different letters (a,b,c) represent statistically significant different means ( $P \leq 0.05$ ); Photographs show primary root segments grown under 0,  $2.7 \times 10^{-6}$ , or  $8.1 \times 10^{-6}$  M of GR24; Bars represent 500 µm.

However, high concentrations of GR24 (i.e., higher than  $2.7 \times 10^{-6}$  M) supplemented to roots reduced the GR24 stimulation of root hair elongation. Reduction in root-hair elongation has been demonstrated for excess amounts of NAA, but not IAA (Jones et al., 2009); NAA is not transported by auxin-influx carriers: it diffuses into the cells (Delbarre et al., 1996; (Marchant et al., 1999)). Accordingly, the authors suggested that auxin influx is an important factor for root-hair development (Jones et al., 2009). It might be that excess GR24 leads to disturbances in auxin efflux, and hence to an excess in cellular concentration of auxin; this, in turn, leads to reduction in the GR24-induction of root-hair elongation.

Root-hair formation is induced by, for example, low phosphate (Pi), low iron (Fe) and low nitrogen (N) conditions (López-Bucio et al., 2003; M. Müller & Schmidt, 2004). Furthermore, low Pi and low N conditions have been shown to induce SLs production in mycotrophic plants (López-Bucio et al., 2003; Yoneyama et al., 2007; Yoneyama et al., 2007; López-Ráez & Bouwmeester, 2008; López-Ráez et al., 2008). However, no reports have been published on the effects of N and Pi levels on SLs production in *A. thaliana*, a non-mycotrophic plant, whereas neither Pi nor N deficiency increase exudation of SLs in white lupin, which is, also, a non-mycotrophic plant (Yoneyama et al., 2008). Hence, although the effect of low Pi and low N conditions on SLs production still needs to be examined in *Arabidopsis*, it is tempting to speculate that SLs are mediators of the root response to low nutrient conditions: SLs affect root-hair elongation, the latter is thought to be directly associated with enhancement of the plant's ability to absorb nutrients (Clarkson, 1985; Gilroy & Jones, 2000), resulting in modulation of nutrient uptake by the plant.

To conclude, our results suggest that SLs have an additional hormonal role in plants, acting as negative regulator of lateral root initiation, and as positive regulator of root hair



elongation. They may play this hormonal role in plants to regulate root responses to growth condition (*e.g.* low nutrient status).

**Acknowledgements** We would like to thank Bruria Ben-Dor, Smadar Hai, Yulia Kaplan, Natalie Sakman, Maja Cohen and Niv Faig for technical help and Ori Cheshin for consultation. Pierre-Marc Delaux was granted by Grant Award No. CIFRE0391/2008 from Bayer CropScience; Einav Mayzlish-Gati was supported by Research Grant Award No. IS-4211-09F from BARD, The United States - Israel Binational Agricultural Research and Development Fund.





### III. Conclusion

Nous nous proposons d'étudier une éventuelle fonction des strigolactones dans le développement racinaire des Angiospermes.

Nous avons montré chez *Arabidopsis thaliana*:

- Que les plantes mutantes *max2*, *max3*, *max4* présentent plus de racines latérales que la plante sauvage (Col-0) correspondante.
- Qu'un traitement avec la strigolactone de synthèse GR24 à faible concentration (10 nM) restaure le phénotype sauvage (moins de racines latérales) chez les mutants de synthèse *max3* et *max4*.
- Que ce traitement ne restaure pas le phénotype du mutant de perception *max2*.
- Qu'un traitement avec le GR24 stimule fortement la croissance des poils absorbants des plantes sauvages et des plantes mutantes *max3* et *max4*, mais que ce traitement est sans effet sur les plantes mutantes *max2*.
- Que l'effet du GR24 sur les racines latérales et les poils absorbants est dose-dépendant.

Nous avons montré dans le chapitre 1 qu'un rôle primitif des strigolactones pouvait avoir été le contrôle de la croissance des rhizoïdes chez les Bryophytes. Nous apportons ici



des arguments expérimentaux pour proposer un nouveau rôle hormonal des strigolactones, non décrit jusqu'alors, dans le contrôle de la formation des racines latérales et dans la croissance des poils absorbants. Ainsi, tout comme pour les facteurs de transcription RDH6 et RLS1 impliqués dans le développement des poils absorbants d'*A. thaliana* et des rhizoïdes de mousse (Menand et al., 2007), les mécanismes de stimulation par les strigolactones de la croissance des poils absorbants et des rhizoïdes pourraient avoir une origine commune.



## Chapitre 3 : Evolution des mécanismes de régulation de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules

### I. Introduction

Les premières interactions entre plantes (Hépatiques) et Gloméromycètes ont probablement eu lieu dès la conquête du milieu terrestre (Redecker et al. 2000, Smith & Read 2008). Côté plante, cette interaction a probablement nécessité le développement de mécanisme de perception du partenaire et de régulation de sa croissance *in planta*. Aujourd'hui de plus en plus de régulateurs moléculaires impliqués dans les différents stades de l'établissement de la symbiose MA sont décrits chez les Angiospermes. Plusieurs gènes ont ainsi été caractérisés pour leur rôle dans la régulation des différents stades de l'établissement de la symbiose MA : le stade pré-symbiotique avec les gènes *CCD7*, *CCD8* et *D27* contrôlant la synthèse des strigolactones et le stade symbiotique avec une quinzaine de gènes codant pour les protéines Vapyrin, *STR1*, *STR2* (Zhang et al., 2010), *Sbt1*, *Sbt3* (Takeda et al., 2009), *CDPK1*, *LjNFR5/MtNFP*, *LjNUP133*, *LjNUP85*, *LjNENA*, *LjPOLLUX/MtDMI1*, *LjCASTOR*, *LjSYMRK/MtDMI2*, *LjCCaMK/MtDMI3*, *LjCYCLOP/MtIPD3*, *NSP2* (Bonfante et al., 2011). Les dix dernières protéines sont impliquées dans une voie de transduction appelée CSP, pour « Common Symbiosis Pathway » (Fig. 12). Enfin, le fonctionnement des arbuscules qui caractérise une symbiose effective est lui-même régulé via le contrôle des échanges de nutriments et notamment via le transport du phosphate (*MtPt4*, Javot et al., 2007).

Il a été montré que certains gènes de la voie CSP étaient présents uniquement à partir des Hépatiques (Wang et al., 2010). Mais la plupart des analyses phylogénétiques des « gènes



symbiotiques » n'ont pris en compte que les plantes terrestres, peut être parce que la symbiose MA ne concerne pas les algues vertes.

Dans ce chapitre nous avons regroupé les données phylogénétiques publiées dans la littérature et les avons complétées par de nouvelles analyses portant à la fois sur les plantes terrestres et les algues, en utilisant les bases de données utilisées précédemment dans le Chapitre 1 (Genbank, JGI).





## **II. Step-by-step evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the green lineage**

(Manuscript en préparation)



## **Step-by-step evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the green lineage**

**Pierre-Marc Delaux<sup>1,2</sup>, Guillaume Bécard<sup>1,2\*</sup> and Nathalie Séjalon-Delmas<sup>1,2#</sup>**

<sup>1</sup> Université de Toulouse, UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR 5546, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail:

[nathalie.sejalondelmas@ensat.fr](mailto:nathalie.sejalondelmas@ensat.fr) and [becard@lrsv.ups-tlse.fr](mailto:becard@lrsv.ups-tlse.fr)

# Present address: UMR5245 ECOLAB, ENSAT, Av de l'Agrobiopole, F-31326 Auzeville, Castanet-Tolosan, France



## Introduction

The green lineage comprises two monophyletic groups, the Chlorophytes green algae, which diverged between 1200 and 700 million years ago, and the Streptophytes (Floyd & Bowman 2007). Streptophytes include Charophytes green algae and land plants. Among the six classes of Charophytes green algae, Charales, Zygnematales or Coleochaetales have been alternatively proposed to be the closest relatives to land plants (Karol et al., 2001; Turmel et al., 2003, 2006; Finet et al., 2010; Wodniok et al., 2011). In land plants, Liverworts are considered as the earliest diverging lineage (Qiu et al., 1998). Based on fossil records, the conquest of land by the ancestors of liverworts took place around 450 MY ago, during the Mid-Ordovician (Kenrick & Crane 1997). After land colonization, plants evolved and acquired new developmental features like vascular system, roots, seeds and flowers (Langdale, 2008).

Just prior to this period of plant terrestrial colonization, 490 MY ago (Ordovician), a specific class (Glomeromycota) of soil fungi called arbuscular mycorrhizal (AM) fungi had appeared. Today most plant species in all terrestrial habitats live symbiotically with these fungi. By colonizing plant roots and extending their mycelium in the rhizosphere they greatly improve water and mineral nutrition of their plant host (Smith & Read, 2008). They also improve plant resistance to various biotic and abiotic stress (Liu et al., 2007; Smith & Read, 2008). The hypothesis of concomitant appearance of both land plants and AM symbiosis was supported by the discovery of Rhynia chert fossils, of 400 million years old. The Rhynia chert plants were all small and some of them lacked roots. In these plants, anchoring and perhaps absorptive functions were performed by non septate rhizoids emerging from subterranean stems (rhizomes). In a fossil plant, named *Aglaophyton major*, arbuscule-like intracellular structures were observed (Remy et al., 1994). This fossil was a strong evidence of the coexistence of Glomeromycota and land plants. Molecular clock studies (Simon et al., 1993;



Berbee & Taylor, 1992) led to the same conclusion that the first AM fungal association with plants dates back to the lower Devonian.

It has been proposed that the AM symbiosis coevolved with the ancestors of the contemporary Bryophytes (liverworts, mosses and hornworts), prior to the emergence of vascular plants (Redecker et al., 2000), allowing the first rootless plants to colonize terrestrial habitats. Today species of Bryophytes can be colonized in their gametophores by different species of AM fungi in the *Glomus*, *Paraglomus*, *Acaulospora* and *Gigaspora* genera (Zhang & Guo, 2007). In mosses, AM fungal colonization is not systematically found. For example *Physcomitrella patens* is supposed not to be mycotrophic (Zhang & Guo, 2007) but, in controlled conditions, *Funaria hygrometrica*, a common type of water moss, can be colonized (Parke & Linderman, 1980). Few studies have also reported that hornworts are mycotrophic species (Schüssler et al., 2000; Wang & Qiu 2006). The mycotrophy of liverworts has been more clearly established (Russell & Bulman, 2005; Duckett et al., 2006; Ligrone et al., 2007). Colonized gametophores exhibit fungal structures, either in the inner parenchymatous cells of the leaves or in the rhizoids (rhizoids are anchorage structures). Liverwort phylogeny supports the fact that the Glomeromycotan association is a basal trait of liverworts that predated AM symbiosis in vascular plants (Bidartondo et al., 2010). Accordingly, the absence of AM fungi in some basal and derived plant taxa could be interpreted as the result of multiple losses, maybe connected to habitat change (*e.g.* from edaphic to epiphytic) and regained several times independently.

### ***The host shifting hypothesis***

Liverworts are basal land plants, but the fact that their ancestors may have been colonized by AM fungi is not sufficient to conclude that AM mycotrophy is an ancestral character inherited by vascular plants throughout land plant evolution. Indeed, the lack of





Glomeromycetes endophytes in some basal liverwort genera, and the presence of *Glomus* group A in phylogenetically and geographically separated taxa could be the result of host shifting events from vascular plants to liverworts (Russell & Bulman, 2005; Selosse, 2005; Ligrone et al., 2007). Some authors suggest that, in that case, the fungus would have been primarily saprophytic (Davey & Currah, 2006). However, in vitro co-culture experiments between the liverwort *Lunaria cruciata* and *Glomus intraradices* or *Glomus proliferum*, led to fungal spore production in amounts sufficient to suggest that liverworts can be genuine symbiotic hosts for AM fungi (Fonseca et al., 2006). Reciprocally, the symbiosis established with thallus or liverwort leaves, accompanied with nutrient transfer and increased host plant growth (Fonseca & Berbara, 2008; Humphreys et al., 2010), suggests that the interaction can also be beneficial for the plant partner. These observations support the view that early interactions with AM fungi were mutualistic symbiotic interactions and that AM fungi have played a role for plant adaptation to terrestrial environment. Whether early AM fungal interactions were symbiotic or not, numerous host-shifting events may have occurred in plant evolution, with some plant groups having lost, and perhaps for some of them regained their abilities to interact with AM fungi.

### ***AM symbiosis: a common trait of land plants***

Arbuscular mycorrhizas can be formed with an extremely wide variety of modern land plants including Lycophytes, Monilophytes, Gymnosperms and Angiosperms (Smith & Read, 2008). However, some plant species cannot form AM association for unclear reasons. They are found in Azoaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Crassulaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Pinaceae, Proteaceae, Restionaceae and in the *Lupinus* genera among Legumes (Wang & Qiu, 2006). These plants have sometimes adopted other symbiotic partners, like ectomycorrhizal fungi or nitrogen-fixing Rhizobia, or live in an aquatic nutrient rich environment, or have



developed root hairs to increase soil foraging (Malloch et al., 1980; Bucher, 2007). The most likely hypothesis is that during evolution, these plant families have independently lost the ability to form the AM symbioses.

The evolution of genes involved in developmental processes, in a macro evolutionary context, is more and more studied (Floyd & Bowman, 2007; Yasumura et al., 2007; Hirano et al., 2007; Langdale, 2008; Prigge et al., 2010). However, the evolution of genes required for AM symbiosis establishment remains poorly known. Here, we propose to review our present knowledge on evolution and phylogeny of genes involved in the AM symbiosis establishment.

## Materials and Methods

### *Protein sequence collection and phylogenetic analyses*

A number of proteins (LysM-RLK of the NFP clade, MtDMI1/LjPOLLUX/LjCASTOR, MtDMI2/LjSYMRK, MtDMI3/LjCCaMK, CCD7, CCD8, D27, a specific phosphate transporter (PT), MtIPD3/LjCYCLOP, CDPK1, Vapyrin, NSP2, two half-ABC transporters STRs, NUP85, NUP133, NENA and two Subtilases SbtM1 and SbtM3) have been shown to play an important role in the establishment of the AM symbiosis. Phylogenetic studies of LysM-RLK, MtDMI1/LjPOLLUX/LjCASTOR, MtDMI2/LjSYMRK, MtDMI3/LjCCaMK, CCD7, CCD8, D27, MtIPD3/LjCYCLOP, have already been published (Zhu et al., 2006; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2010; Bonfante & Genre, 2010; Lin et al., 2009; Chapter 1). To present a more complete scheme of the AM symbiotic gene evolution, we collected by blastp potential orthologs of the remaining proteins Vapyrin, NSP2, STRs, PT, NUP85, NUP133, NENA, and the two Subtilases. By using the *Lotus japonicus* or *Medicago truncatula* sequences as query, we screened the available genomes of *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens*, *Volvox carteri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella*

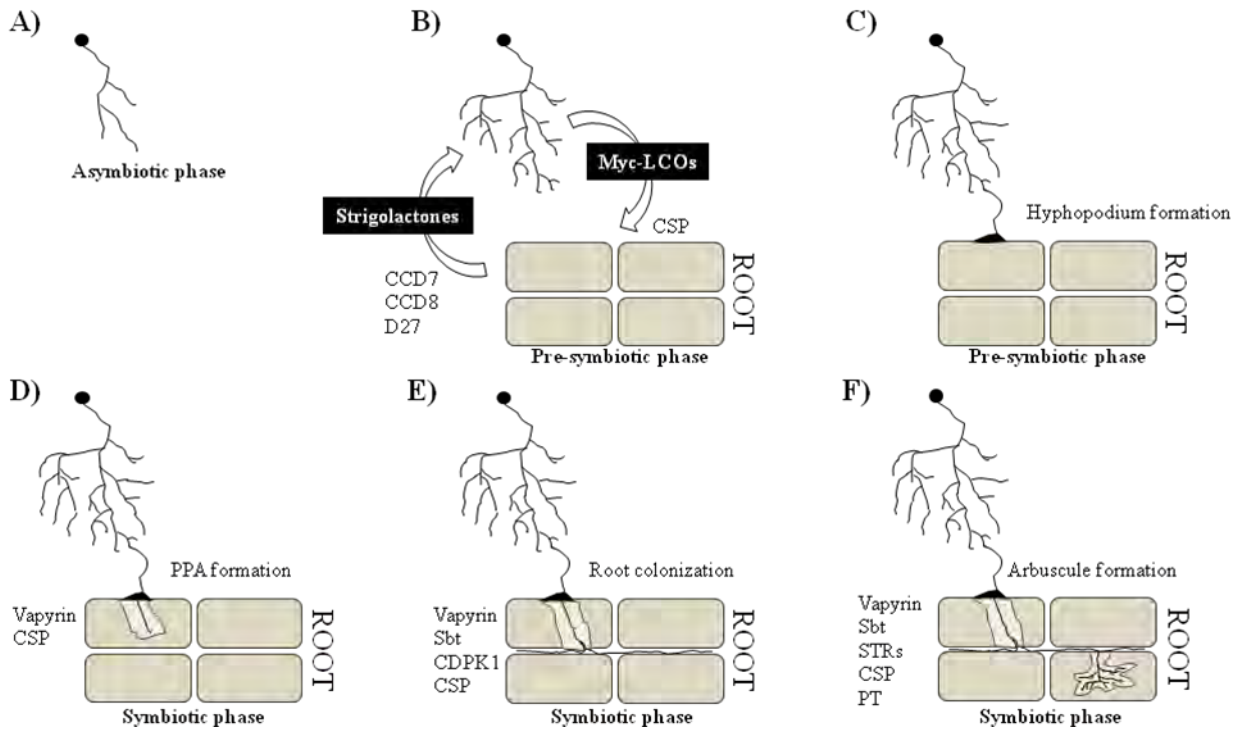


*variabilis*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri* and *Micromonas pusilla* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). We also used the specific genomic databases *Medicago truncatula* (<http://www.plantgdb.org/MtGDB/>). In addition, tblastn were systematically done on the available EST data of *Marchantia polymorpha*, *Nitella hyalina*, *Spirogyra sp.* and *Coleochaete scutata*. Sequences from other species were added in several occasions, as mentioned in the figure legends. Then, sequences were aligned using Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Phylogenetic trees were built with MEGA5 using Neibor-Joining analyses with the Poisson model, and with the complete deletion gap treatment method (<http://www.megasoftware.net/>). Each tree was rooted as followed: Vapyrin with a clade containing representative major sperm proteins (MSP) and VAMP-associated proteins (VAP), as proposed by Pumplin et al. (2009); NSP2 with a clade comprising AtSCL4 and AtSCL7, the closest GRAS proteins relative to AtSCL26, the homolog of NSP2; STRs with height sequences of *A. thaliana* ABC transporters of the group G; PT (phosphate transporter) with five phosphate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii*; NUP85 with NUP133 and NENA; NUP133 with NUP85 and NENA; NENA with NUP133 and NUP85. For the phylogenetic analysis of the two Subtilase genes, orthologs of the LjSubtilases, proposed by Takeda et al. (2010), were added and AtSDD1 was used as outgroup and several other Subtilases of *Arabidopsis thaliana* were also added.

## Results and Discussion

### *Establishment of the AM symbiosis*

The establishment of the symbiosis is divided in three phases: asymbiotic, pre-symbiotic and symbiotic (root colonization). The asymbiotic phase takes place in the absence of a host plant. During this stage the AM fungus can germinate and produce some slow growing germinating hyphae for few days only (Bécard et al., 2004, Fig. 34A). By contrast, if a host plant is present in the vicinity, the pre-symbiotic phase can start.



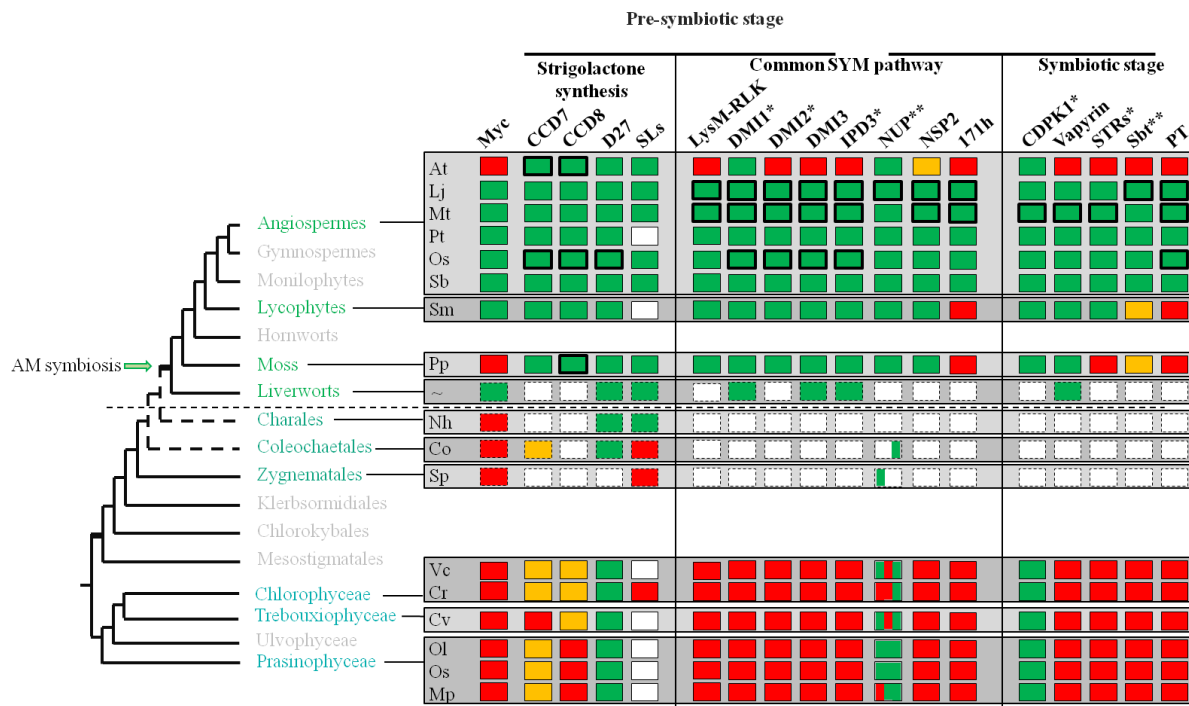
**Fig. 34. Scheme of the arbuscular mycorrhizal symbiosis establishment.** (A) During the asymbiotic stage, the spore germinates and produces a germ tube with few branches. (B) Both partners exchange molecular signals such as strigolactones and lipo-chito-oligosaccharides (Myc-LCOs). (C) The fungus develops an hyphopodium to enter the plant root. (D) In response, the host plant forms the pre-penetration apparatus (PPA) and (E) The fungus colonizes the root. (F) Finally, arbuscules are formed and nutrient exchanges take place. CSP: Common Symbiosis Pathway, Sbt: Subtilases, STRs: Stunted arbuscule (Half-ABC transporters), CCD: Carotenoid Cleavage Dioxygenase.

### *The pre-symbiotic phase*

#### *Host recognition signals*

At the vicinity of the host plant the fungus exhibits a strong hyphal branching in response to a pool of plant molecules (Giovannetti et al., 1996, Buée et al., 2000; Fig. 34B). One class identified with a key role in this process are strigolactones (Akiyama et al., 2005, Besserer et al., 2006). These molecules are important for the establishment of the symbiosis (Gomez-Roldan et al., 2008). Present at extremely low concentration in root exudates, they activate the fungus mitochondrial metabolism and stimulate hyphal growth (Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008). Recently these molecules have also been shown to be a new class of plant hormones inhibiting growth of axillary buds (Gomez-Roldan et al., 2008, Umehara et al., 2008).

Several genes participating in strigolactone biosynthesis have recently been described. The first two steps consist in the successive cleavage of the  $\beta$ -carotene by two Carotenoid Cleavage Dioxygenase, CCD7 and CCD8 (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Another protein, the D27 iron-containing enzyme, has also been identified in rice (Lin et al., 2009). Putative orthologs of D27, CCD7 and CCD8 are present in the entire green lineage starting from green algae (Chapter 1). However, the presence of strigolactones could not be detected in green algae, except in the Charales. Delaux et al. proposed that this was a consequence of a lack of several amino acids important for substrate specificity (Fig. 35; Messing et al., 2010). Charales, like others algae, are non-mycotrophic organisms. Indeed, the unique reported interaction between these algae and fungi is a fossil of a probable pathogenic interaction between a *Paleonitella* and a Chytridiomycete (Taylor et al., 1992). The presence of strigolactones in organisms like Charales which are non-mycotrophic and do not form buds indicates that these molecules have additional roles unrelated to mycorrhization and to shoot



**Fig. 35. Occurrence of AM symbiosis regulatory components in the green lineage.**

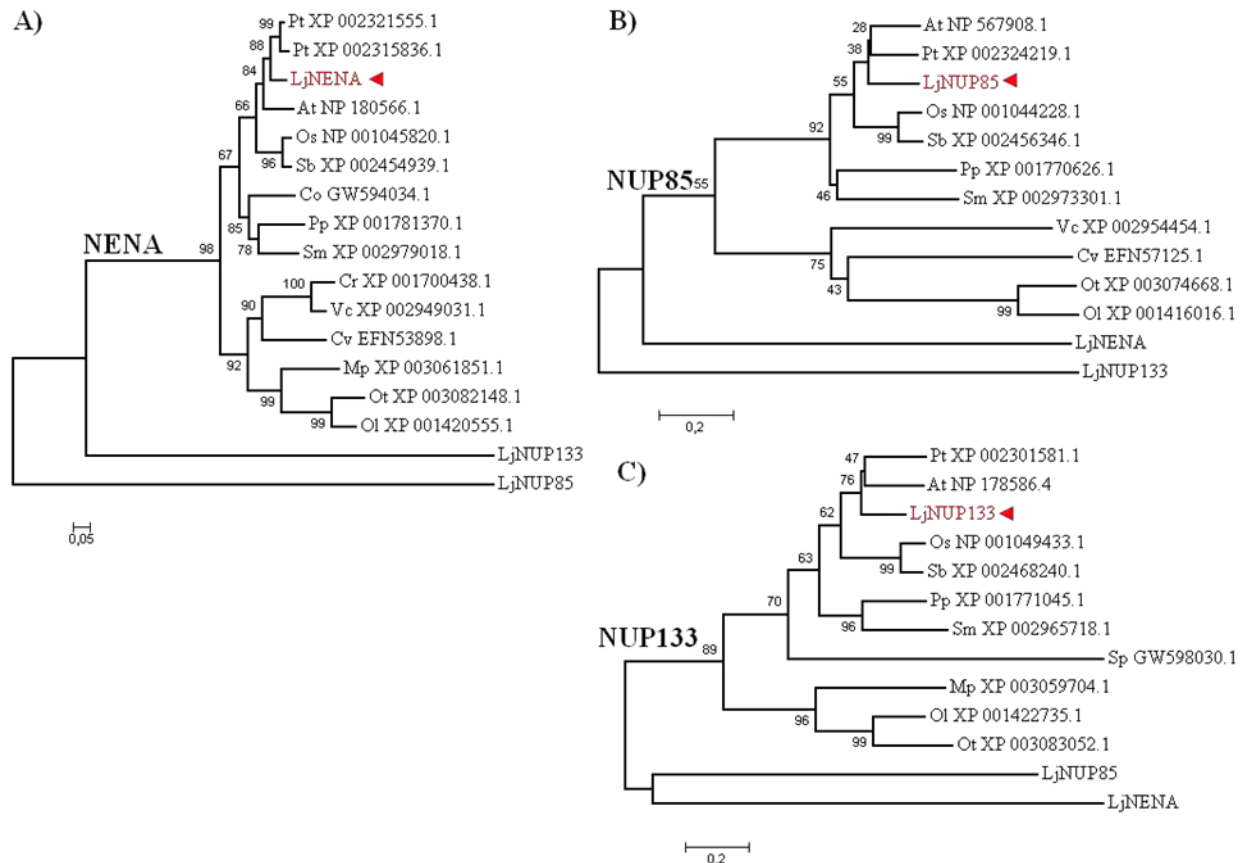
Presence and absence of proteins involved in AM symbiosis signaling are indicated in green and red boxes, respectively. Orange boxes show putative homologous proteins. White boxes indicate lack of data. Dotted boxes represent organisms with only EST data available. Bold boxes indicate mutants already characterized. NUP includes NUP85, NUP133 and NENA. \*= *Medicago truncatula* genes, \*\*= *Lotus japonicus* genes. Poorly resolved branches of the green lineage tree are indicated with dotted lines. PT: Phosphate transporter, CCD: Carotenoid Cleavage Dioxygenase, SLs: Strigolactones, Sbt: Subtilases, STRs : Stunted arbuscule ABC Transporters. ~ For liverworts, several genera were used in phylogenetic analyses.



branching. Delaux et al. (Chapter 1) proposed that one of them could have been the control of rhizoid development, a function later conserved to control root hair development of Angiosperms (Kapulnik et al. 2011). The promotion of AM symbiosis by strigolactones would have been an additional primitive function appearing later with the earliest land plants. The recent shoot branching controlling function observed in angiosperms would have been a much more recent acquisition.

### *Fungal signals*

AM fungi also produce diffusible signals that induce various plant responses. These responses include new gene expression (Bonfante & Requena, 2011), root branching (Olah et al., 2005, Maillet et al 2011),  $Ca^{++}$  signaling (Sørensen et al., 2011) and starch biosynthesis (Gutjahr et al., 2009). Some of these fungal signals have recently been characterized. They are lipochitooligosaccharides (LCOs) similar to the Nod Factors produced by *Rhizobium* (Maillet et al., 2011). These Myc-LCOs are expected to be perceived by the plant through the well described common symbiosis pathway (CSP, Maillet et al., 2011; Parniske, 2008) also involved in the Nod factor-induced nodulation process. At least nine proteins of the CSP are crucial for the formation of arbuscular mycorrhiza (Bonfante & Genre, 2010). A putative LysM receptor-like kinase of Myc-LCOs yet to be characterized (Op den Camp et al., 2010), another receptor like kinase (MtDMI2 / LjSymRK, Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002), a cation channel (MtDMI1 / LjCASTOR-LjPOLLUX, Imaizumi-Anraku et al., 2005) and three nucleoporins (LjNUP85, LjNUP133 and LjNENA, Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010) are necessary for generating a specific nuclear calcium spiking (Oldroyd & Downie, 2006). A calcium and calmodulin-dependent protein kinase (CCAMK) has been proposed to decode this specific calcium signature (MtDMI3 / LjSYM15, Levy et al., 2004, Tirichine et al., 2006). NSP2 and MtIPD3 / LjCYCLOPS are downstream targets of CCAMK



**Fig. S1. Phylogenetic trees of potential orthologs of Nucleoporin proteins.** a) NJ tree of NENA. b) NJ tree of NUP85 and c) NJ tree of NUP133. Red triangles indicate Nucleoporins of *Lotus japonicus*. Pt (*Populus trichocarpa*), At (*Arabidopsis thaliana*), Lj (*Lotus japonicus*), Mt (*Medicago truncatula*), Sb (*Sorghum bicolor*), Os (*Oryza sativa*), Sm (*Selaginella moellendorffii*), Pp (*Physcomitrella patens*), Co (*Coleochaete orbicularis*), Sp (*Spirogyra pratensis*), Vc (*Volvox carteri*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Ot (*Ostreococcus tauri*), Ol (*Ostreococcus lucimarinus*), Mp (*Micromonas pusilla*).

in the signaling pathway (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008, Parniske et al., 2008, Bonfante & Genre, 2010).

Several components of the CSP are widely distributed. Indeed, the three nucleoporins NUP133, NUP85 and NENA are orthologs of nucleoporins found in the entire eukaryotic lineage (Fig. 35, 36; Groth et al., 2010). In yeast, these proteins are involved in the formation of the Nup84 complex, a part of the nuclear pore complex (Siniosoglou et al., 2000) and are crucial for eukaryotic cell development (Harel et al., 2003; Walther et al., 2003; Wente & Rout, 2010). Interestingly, the plant mutants of NENA and NUP133 are affected only in AM symbiosis and display a wild type developmental phenotype, suggesting a specialization of these proteins for the AM symbiotic process (Saito et al., 2007, Groth et al., 2010).

By contrast, the appearance of the orthologous genes of *LysM-RLK*, *MtDMI1*, *MtDMI2*, *MtDMI3* and *MtIPD3* correlates with the emergence of the AM symbiosis with first land plants (Zhu et al., 2006, Zhang et al., 2009, Wang et al., 2010, Bonfante & Genre, 2010, Fig. 2). Thus, appearance of the CSP with basal land plants has probably been one of the key steps leading to AM symbiosis (Bonfante & Genre, 2010). The case of MtNFP/LjNFR5 is particularly interesting. This protein is composed of an extracellular LysM-domain, involved in LCOs perception (Radutoiu et al., 2007), and an intracellular kinase domain (Radutoiu et al., 2003). Orthologs of MtNFP/LjNFR5 containing both domains occurs at least down to the moss *Physcomitrella patens* whereas green algae possess only proteins containing the LysM domain (Zhang et al., 2009). In *Arabidopsis thaliana* and rice the LysM-domain proteins AtCERK1 and OsCEBiP have been shown to be involved in the perception of chitinic elicitors (Kaku et al., 2006; Miya et al., 2007). Taken together, these results suggest that these LysM-types of receptors, which are potentially involved in pathogenic interaction in algae,

PpNSP2	C G C A G A A G C T G G A G G A G T T G T
SmNSP2	A A G T C A T A C T T T T C C G C C T C C
OsNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
SbNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
BdNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
SiNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
RcNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
VcNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
PtNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
SlNSP2	G A G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
MeNSP2b	G G G T G A T A T T G A T T C G G C T C A
MeNSP2a	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
CcNSP2	A G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
CsNSP2	A G G T G A T A T T G A T T C G G C T C A
CpNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
AcNSP2	G A G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
LjNSP2	G A G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
MtNSP2	G A G T G A T A T T G A T C C G G C T C A
PsSYM7	G A G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
EgNSP2	G G G T G A T A T T G G T T C G G C T C A
AtSCL26	G G G T T A T A C T T G C A A G G C T T A
AINSP2	G A G T T A T A C T T G C A A G G C T T A

Mir171h binding sequences

**Fig. 37. Evolution of mir171h binding sequence.** Comparison of mir171h binding sequences. Sm (*Selaginella moellendorffii*), Sb (*Sorghum bicolor*), Os (*Oryza sativa*), Vv (*Vitis vinifera*), Rc (*Ricinus communis*), Sl (*Solanum lycopersicum*), Pt (*Populus trichocarpa*), At (*Arabidopsis thaliana*), Al (*Arabidopsis lyrata*), Lj (*Lotus japonicus*), Mt (*Medicago truncatula*), Ps (*Pisum sativum*), Cp (*Carica papaya*), Cs (*Citrus sinensis*), Cc (*Citrus clementina*), Me (*Manihot esculenta*), Si (*Setaria italica*), Bd (*Brachypodium distachyon*), Eg (*Eucalyptus gunnii*).

have been later recruited by the earliest mycotrophic land plants to perceive symbiotic fungal signals (Kaku et al., 2006). Similarly, CCAMK (MtDMI3/LjSYM15) came from a probable gene duplication and neo-functionalization of a green algae calcium-dependent protein kinase (Wang et al., 2010). Moreover, the mycorrhizal phenotype of the *dmi3 Medicago truncatula* mutant can be rescued by the corresponding gene in liverworts or hornworts, suggesting a conserved function for this protein in land plants (Wang et al., 2010).

Downstream of the CSP, NSP2 a member of the GRAS transcription factor family is also required for integration of Myc-LCOs signal by the plant (Maillet et al., 2011). NSP2 is present in all land plants (Engstrom, 2011; Fig. 2), even in *Arabidopsis thaliana*, and is supposed to be conserved since it has been shown that the symbiotic phenotype of the *nsp2* mutant of *Lotus japonicus* is rescued by the Rice NSP2 (Yokota et al., 2010). Based on deep sequencing of small RNA and “degradom” of *Medicago* roots, a recent work proposed that NSP2 is transcriptionally regulated by a microRNA, miR171h (Devers et al., 2011). Interestingly, we compared the gene sequence of several NSP2 genes and found that the mir171h binding sequence seems to be highly conserved in mycotrophic angiosperms but not in non-mycotrophic ones (Fig. 37). Moreover, we looked for mir171h sequences in mirbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) and we find orthologs of miR171h both in monocots and dicots, but not in *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata* (not shown data). Taken together these results led to the proposition that the miR171h regulation probably occurs only in mycotrophic Angiosperms (Fig. 37). Perception of LCOs by plants stimulates lateral root formation (Olah et al., 2005, Maillet et al., 2011). This root stimulation, together with the strigolactone effect on fungal hyphal branching, increase the probability of contact between both partners (Fig. 34B, Maillet et al., 2011; Bonfante & Requena, 2011).



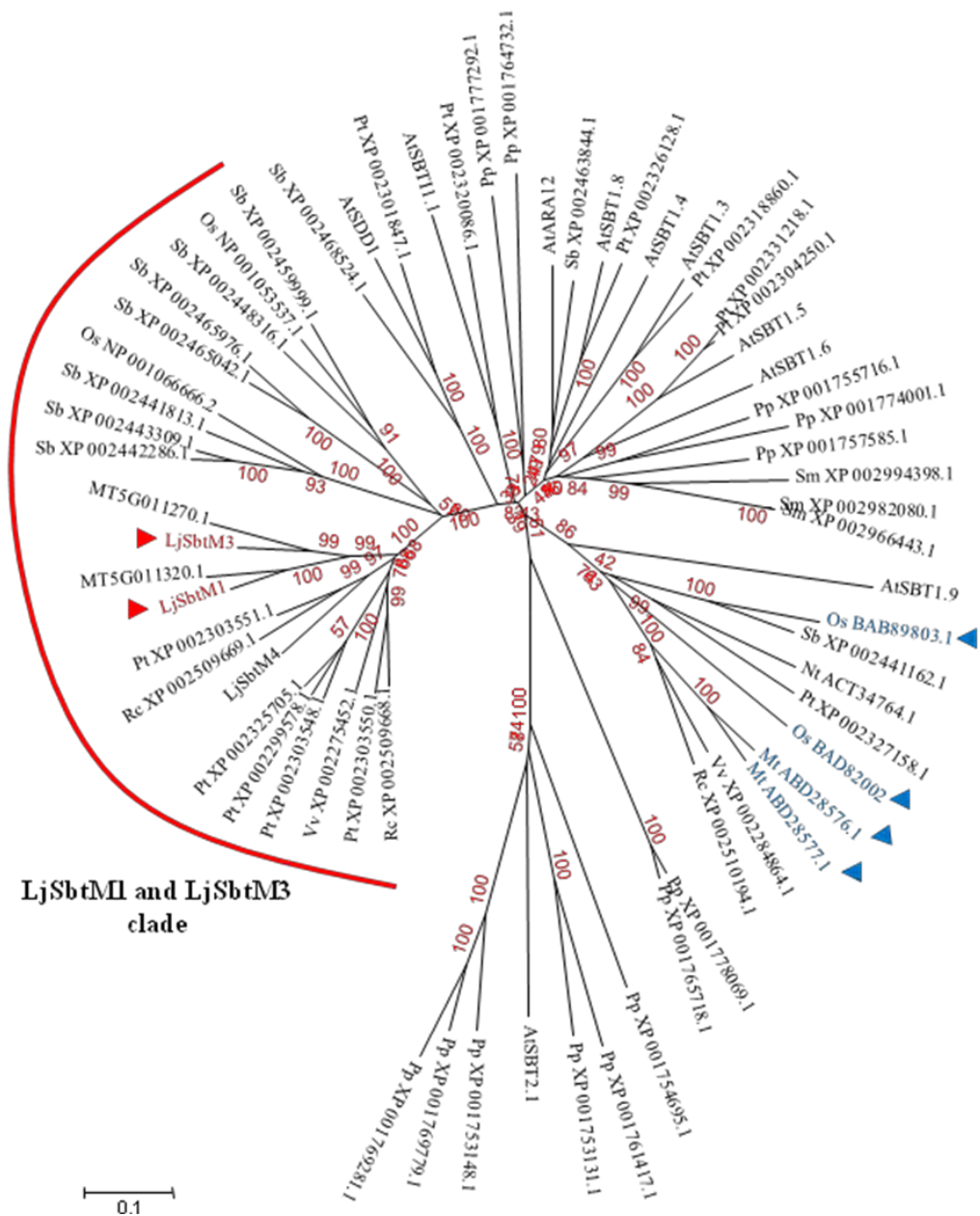
## *Symbiosis establishment*

### *Fungal colonization*

When the root contact occurs, the fungus forms hyphopodia at the surface of the root (Fig. 34C). The formation of these structures can be negatively regulated by the plant in the presence of high phosphate concentration, however the gene network necessary for that regulation is unknown (Balzergue et al., 2010; Breuillin et al., 2010; Breuninger et al., 2005; Sedas et al., 2009; Brechenmacher et al., 2004).

Root penetration by the fungus is also controlled by the plant which develops the pre-penetration apparatus (PPA, Fig. 34D, Genre et al., 2005). At least two components of the CSP, the receptor like kinase (MtDMI2/LjSymRK) and the CCAMK (MtDMI3/SYM15), are involved in the development of the PPA (Genre et al., 2005). In addition, the possible role of Vapyrin in this early stage has recently been pointed out (Pumplin et al., 2010, Fedderman et al., 2011a; Ercolin & Reinhardt 2011). Orthologs of Vapyrin were clearly found in all land plants tested, including *Physcomitrella patens* and *Marchantia polymorpha* (Fig. 35, Feddermann & Reinhardt, 2011; Pr. JL Bowman, personal communication), suggesting that, like the CSP, Vapyrin has been important for AM symbiosis.

The development of intraradical hyphae and arbuscules involves the CSP, Vapyrin and CDPK1, a calcium-dependent protein kinase (Fig. 34E, f, Ivashuta et al., 2005). Two Subtilases from *Lotus japonicus*, SbtM1 and SbtM3 (Takeda et al., 2009), and two Half-ABC transporters called STRs (Stunted arbuscules) - identified in *Medicago truncatula* (Zhang et al., 2010) also play a role in colonization and arbuscule development, respectively (Fig. 34E, F). We found clear orthologs of these two Subtilases in mycotrophic Angiosperms but not in *A. thaliana*, *S. moellendorffii* and *P. patens* sequences (Fig. 38). Takeda et al. (2009) proposed that the two Subtilases of *M. truncatula* and *Oryza sativa* which are transcriptionally induced during AM symbiosis are the analogs of LjSbtM1 and LjSbtM3.



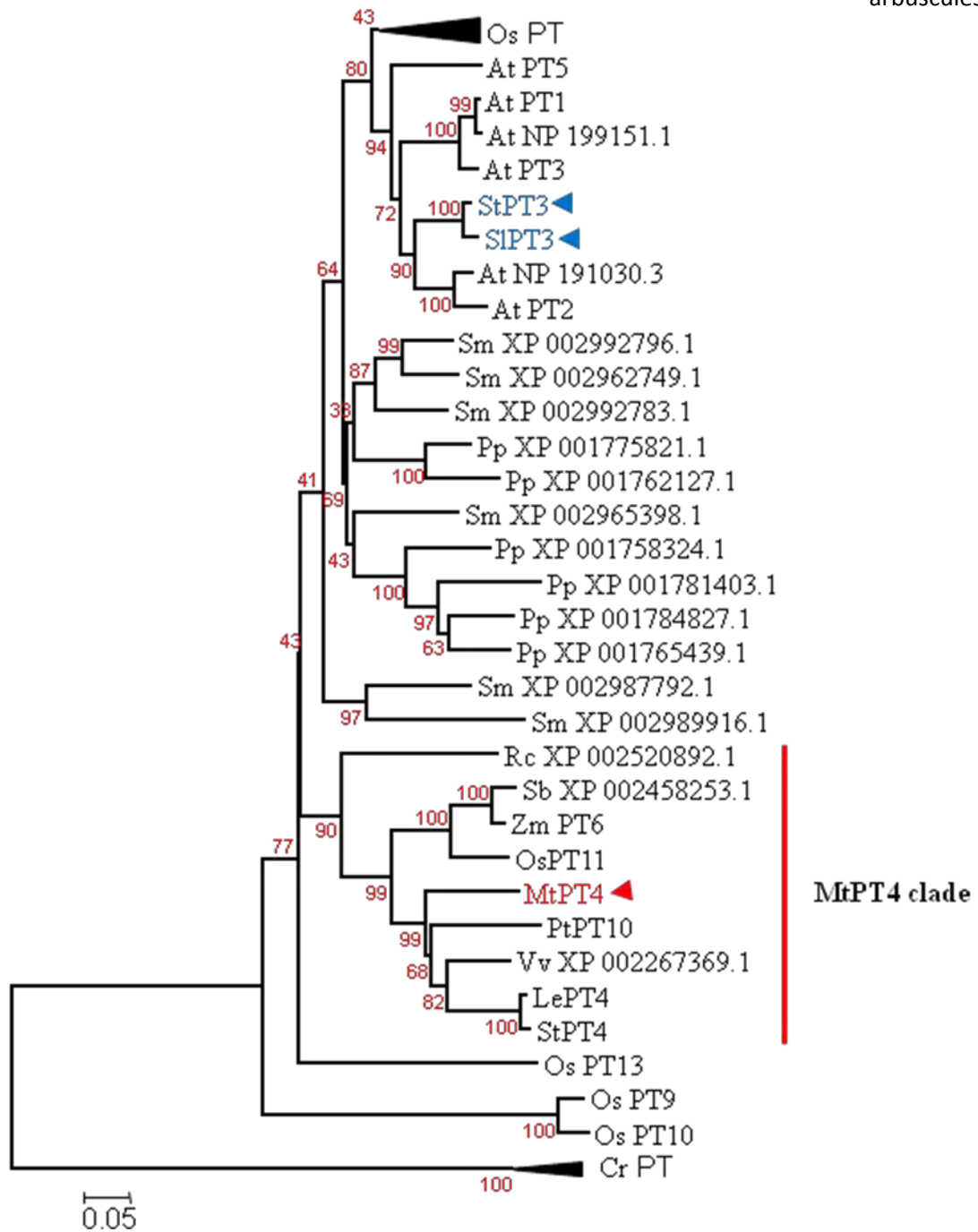
**Fig. S3. Phylogenetic tree of potential orthologs of two Subtilases LjSbtM1 and LjSbtM3.** Red triangles indicate the two subtilases of *Lotus japonicus*. The blue triangles indicate proteins proposed as orthologs by Takeda et al., (2009). Pt (*Populus trichocarpa*), At (*Arabidopsis thaliana*), Lj (*Lotus japonicus*), Mt (*Medicago truncatula*), Rc (*Ricinus communis*), Nt (*Nicotiana tabacum*), Vv (*Vitis vinifera*), Sb (*Sorghum bicolor*), Os (*Oryza sativa*), Sm (*Selaginella moellendorffii*), Pp (*Physcomitrella patens*), Co (*Coleochaete orbicularis*), Sp (*Spirogyra pratensis*), Vc (*Volvox carterii*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Ot (*Ostreococcus tauri*), Ol (*Ostreococcus lucimarinus*), Mp (*Micromonas pusilla*).



However, our phylogenetic analysis shows that these Subtilases and LjSbtM1 and LjSbtM3 form a polyphyletic family, suggesting an independent recruitment of these Subtilases for AM symbiosis establishment. Thus, we cannot exclude that Subtilases of basal land plants like *Physcomitrella patens* or *Selaginella moellendorffii*, which form specific clades in our phylogenetic tree, are also required for AM symbiosis.

The two half-ABC transporters STRs are specific of mycotrophic vascular plants (Fig. 35; Zhang et al., 2010). In vascular plants, fungal colonization is restricted to root endodermis (Smith & Read, 2008). Because Bryophytes are devoid of roots, STRs could have been specifically selected to control fungal development in roots. It would be interesting to know if these two genes are present in liverworts where the fungus is exclusively located in the inner parenchyma cells (Russel et al., 2003; Fonseca & Barbera, 2006).

After the formation of arbuscules where nutrient exchange between the two partners takes place, the symbiosis is considered to be established. These trophic exchanges require specific transporters at the interface of both partners including fungal hexose transporters (Schussler *et al.*, 2006) and specific plant phosphate transporters like MtPT4 in *Medicago truncatula*, ZmPT6 in *Zea mays*, PtPT10 in *Populus trichocarpa* or OsPT11 in rice (Javot et al., 2007; Nagy et al., 2005a; Nagy et al., 2005b; Paskowski et al., 2002; Rausch et al., 2001, Loth-Pereda et al., 2011). These specific phosphate transporters, found in each mycotrophic Angiosperms investigated, cluster in a specific clade (Loth-Pereda et al., 2011). Figure S4 shows a lack of similar phosphate transporters in the moss *Physcomitrella patens* and in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* suggesting a recent appearance of this clade (Fig. 39). However, phosphate transfer from the fungus to the liverworts *Lunularia cruciata* or *Marchantia palacea* was described with several *Glomus* species, supporting a close conservation of this specific function in mycotrophic land plants (Fonseca & Barbera, 2008; Humphreys et al., 2010). The transporters involved in this case are not known yet.



**Fig. 38. Phylogenetic tree of potential orthologs of the phosphate transporter MtPT4.**

Red triangles indicate MtPT4. The blue triangles indicate the other phosphate transporters induced during AM symbiosis in *Solanum lycopersicum* (Sl) and *Solanum tuberosum* (St). Pt (*Populus trichocarpa*), At (*Arabidopsis thaliana*), Lj (*Lotus japonicus*), Mt (*Medicago truncatula*), Rc (*Ricinus comunis*), Nt (*Nicotiana tabacum*), Vv (*Vitis vinifera*), Sb (*Sorghum bicolor*), Os (*Oryza sativa*), Sm (*Selaginella moellendorffii*), Pp (*Physcomitrella patens*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*).

Interestingly in Solanaceae species, expression of two other PTs is specifically induced during AM symbiosis (Nagy et al., 2005). These genes are specifically found in Solanaceae and came from a recent duplication event (Nagy et al., 2005).

Symbiotic genes appeared in different manners. A part of them emerged from duplication and neofunctionalization, or sub-functionalization of green algae genes and were probably crucial for the emergence of the interaction between AMF and first land plants. Another part appeared concomitantly with land plant emergence and evolution (Fig. 40).

### ***How to increase our knowledge on the evolution of AM symbiosis ?***

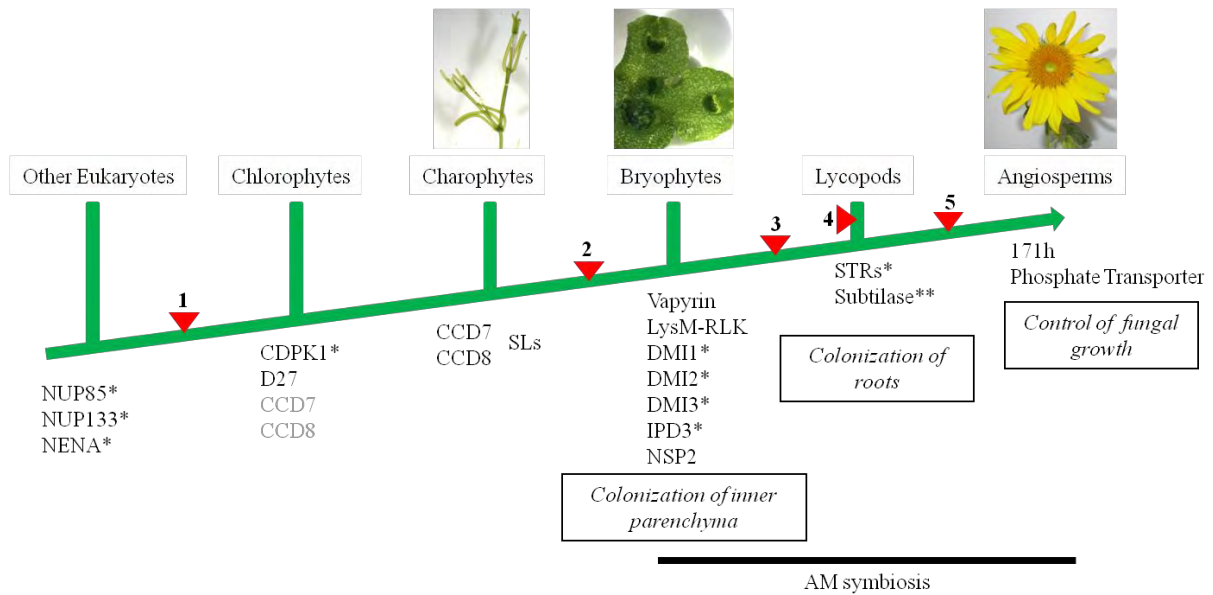
The components involved in the regulation of AM symbiosis must have been acquired step by step during the evolution of the green lineage. However, the evolutionary scheme is still puzzling and need further investigation. A first insight into the evolution of AM symbiosis regulatory components can be addressed through a large scale phylogenetic approach. However, because sequenced genomes are only available for several Angiosperms, one Lycophyte (*Selaginella moellendorffii*), the non mycotrophic moss *Physcomitrella patens*, and five Chlorophytes green algae, several major gaps have to be filled.

The first gap occurs between Chlorophytes and Charophytes green algae. Charophytes green algae have been proposed to be an intermediate node between seawater green algae and land plants (Becker & Marin, 2009). Sequencing the genome of Charophytes organisms like Coleochaetales, Zygnematales and Charales, sister groups to Embryophyta, should help to conclude on the acquisition of symbiotic genes as being specific to land plant or as a Streptophyta innovation. A second gap like the elucidation of the origin of genes proposed to be specific of vascular plants would be filled with the sequencing of a mycotrophic liverwort genome. Unfortunately, the *Marchantia polymorpha* which is currently sequenced is non mycotrophic (Pr. JL Bowman, personal communication).



The systematic complementation assay of angiosperm mutants with the corresponding ancestral genes from extant lineage, in an evo-devo approach, would also give some indications on the functional conservation of these genes along the green lineage (Wang et al., 2010). And of course reverse genetic approaches in basal mycotrophic plants would be best to confirm the preliminary indications obtained by phylogenetic studies and complementation assays.

In dicots, the legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* are currently used as mycotrophic models as well as rice for monocots (Paszkowski et al., 2002; Bamba et al., 2008; Gutjahr et al., 2008; Parniske et al., 2008). By contrast, no model of basal plants like in Bryophytes and Monilophytes have emerged to study AM symbiosis. Langdale (2008) plead in favor of the aquatic fern *Ceratopteris richardii* as an interesting species to fill the gap between Angiosperms and Lycophytes because molecular and genetic tools are available (Rutherford et al., 2004; Kramer, 2009). Unfortunately, *C. richardii* is a non-mycotrophic species. *Pteris vitata* could become an interesting alternative because it can be mycorrhized in vitro (Bonfante & Selosse, 2010) and transformed (Indriolo et al., 2010). In Bryophytes, the moss *Physcomitrella patens* could also be used. Indeed, even if *Physcomitrella patens* is non-mycotrophic, the actual presence of the entire CSP pathway, and of Vapyrin, suggest that several questions about the origin of the symbiotic signaling pathway can be addressed with this model. We think that the most relevant plant missing link to clarify the evolutionary story of the AM symbiosis is a mycotrophic liverwort. Following this line, *Marchantia paleacea* (Humphreys et al., 2010) or *Lunularia cruciata* which is easily cultivable *in vitro* (Fonseca et al., 2006) could be chosen.



**Fig. 3. Scheme of the step-by-step acquisition of AM symbiosis related genes.** Red triangles indicate 1) Establishment of plastid 2) Land conquest, 3) Vascularisation, 4) and 5) Independent appearances of roots. \*= *Medicago truncatula* genes, \*\*= *Lotus japonicus* genes.

## **Conclusion**

Components involved in the pre-symbiotic phase of the AM symbiosis establishment seem to be present in early diverging land plants and conserved during land plant evolution. Along with the increase of plant complexity, multiplication of regulatory mechanisms required for AM symbiosis also emerged (Fig. 40). Further functional studies in basal plants of genes involved in AM symbiosis, and the access to additional genomes of mycotrophic basal plants, will help establish a more resolved picture of the origin and evolution of AM symbiosis, an ecologically important and widespread plant-fungus interaction.





### III. Conclusion

Nous cherchions à proposer un premier schéma évolutif global, basé sur les données génomiques actuellement disponibles et sur des études phylogénétiques antérieures (Zhu et al., 2006 ; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2010; Bonfante et al 2010; Feddermann et al., 2011b; Engstrom, 2011).

Il apparaît que :

- Les protéines impliquées dans la phase pré-symbiotique (synthèse de strigolactones, perception et transduction des Myc-LCOs) sont présents dès les Bryophytes.
- Certaines de ces protéines CCD7, CCD8, CDPK1, NUP133, NUP85, NENA et D27 étaient déjà présentes chez des algues non mycotrophes.
- Les plantes vasculaires, puis les angiospermes, ont progressivement acquis de nouvelles fonctions permettant de réguler plus finement la symbiose.
- La nature non mycotrophe d'*Arabidopsis thaliana* est probablement liée à une perte d'un certain nombre de gènes importants pour l'établissement de la symbiose tels que ceux codant pour les orthologues de NFP, DMI2, DMI3, IPD3, Vapyrin, Subtilases, STRs et PT4.

En conclusion de ce travail, nous proposons que les mécanismes de régulation de l'établissement de la symbiose MA sont apparus étape par étape au cours de l'évolution, en parallèle de l'évolution développementale des végétaux de la lignée verte, depuis les algues non mycotrophes jusqu'aux Angiospermes (Fig. 41).



## Discussion et Perspectives



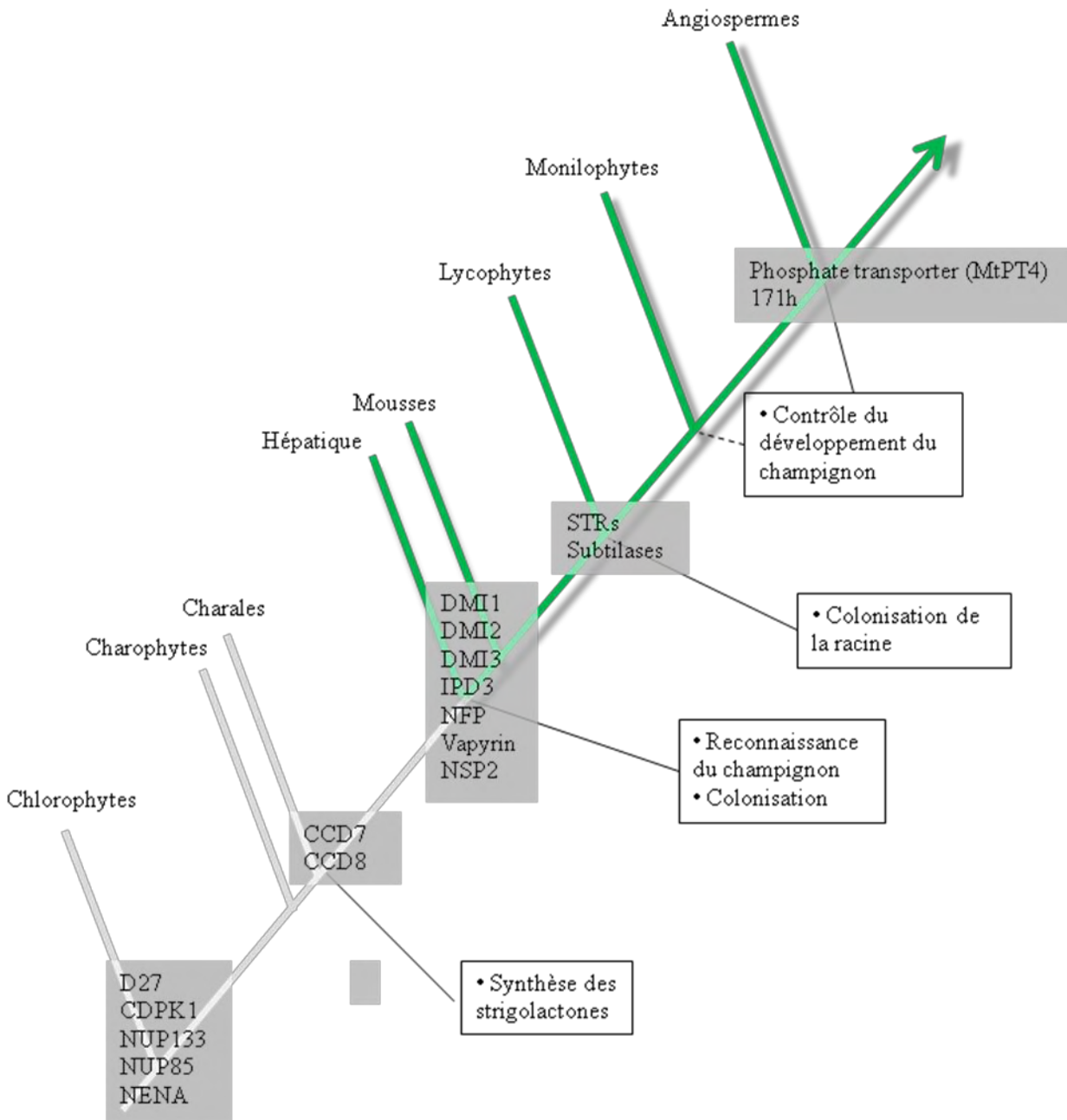
## Discussion-perspectives

De nombreux acteurs moléculaires (signaux symbiotiques, récepteurs, messagers secondaires, calciprotéines, facteurs de transcription, transporteurs membranaires, etc.) sont recrutés par les plantes pour déclencher et mettre en œuvre le programme génétique qui conduit à l'établissement d'une symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA) fonctionnelles. En tant que caractères symbiotiques, ils commencent à être progressivement caractérisés chez les plantes à fleurs (Angiospermes), mais peu d'études ont été conduites sur leur évolution dans la lignée verte. Avec les données génomiques actuellement disponibles, et malgré l'absence de génomes connus d'Hépatique mycotrophe ou de Charale (algue verte), nous avons pu tracer un aperçu de l'évolution de certains des caractères qui jouent un rôle important dans l'établissement de la symbiose MA (Fig. 41).

### **I. Un schéma évolutif différent pour chaque élément de la régulation de l'établissement de la symbiose**

#### **1. Présentes dès les algues**

Certaines protéines impliquées dans l'établissement de la symbiose, à savoir les trois nucléoporines NENA, NUP85 et NUP133, et CDPK1 sont présentes même chez les algues Chlorophytes, voir même chez tous les eucaryotes dans le cas des nucléoporines. Ces différentes protéines interviennent dans de nombreux contextes cellulaires ou développementaux (Siniosoglou et al., 1996; Harel et al., 2003; Walther et al., 2003; Ivashuta et al., 2005; Went & Rout 2010), suggérant que leurs fonctions initiales ont été détournées plus tard par les voies de signalisation symbiotiques (Fig. 41).



**Fig. 41.** Apparition dans la lignée verte des gènes impliqués dans l'établissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules. La partie de l'arbre colorée en vert indique les clades concernés par la symbiose MA.

## 2. Spécifiques des plantes terrestres

Nos connaissances actuelles, en l'absence de données génomiques plus complètes de Charales, suggèrent que la voie CSP, NSP2 et la Vapyrin sont par contre apparues avec les plantes terrestres. L'apparition de ces protéines chez les Bryophytes coïnciderait avec l'émergence des Gloméromycètes et les premières interactions entre les deux partenaires (Redecker et al., 2000; Qiu et al., 1998; Humphreys et al., 2010). Les produits de ces gènes sont entre autre impliqués dans la perception du champignon par la plante (Maillet et al., 2011) et les premières étapes de l'infection (Pumplin et al., 2010). Il est donc envisageable que ces gènes aient été sélectionnés pour promouvoir la reconnaissance des champignons MA, une étape clé pour aiguiller les réponses végétales vers un contexte symbiotique et non de défense face à un pathogène.

## 3. Apparues au cours de l'évolution des plantes terrestres

Bien que la symbiose soit effective entre Bryophytes et champignons MA, les plantes terrestres ont sélectionné des mécanismes d'optimisation de l'interaction. Cette amélioration de la symbiose en terme de gain pour la plante passe par deux stratégies : (i) optimiser l'import de nutriments et (ii) contrôler la colonisation par le champignon pour limiter le coût carbone de l'association. Ces mécanismes passent entre autre par les protéines STRs et Subtilases. Le transporteur de phosphate de *Medicago truncatula* MtPT4, et potentiellement ses orthologues présents chez les autres Angiospermes, représente un très bon exemple de l'émergence de tels mécanismes (Javot et al., 2007). En effet, ce transporteur de phosphate est spécifiquement exprimé chez les plantes au niveau des arbuscules, et permet ainsi le transfert





vers la plante du phosphate puisé par le champignon dans le milieu. Il a été montré que les champignons colonisant les mutant *Mtpt4* présentaient une croissance extra racinaire altérée, corrélée à un grand nombre d'arbuscules dégénérées. Ainsi, MtPT4 servirait aussi de régulateur, favorisant les champignons efficaces dans le transfert de phosphate à la plante ou au contraire, limitant la croissance des champignons mauvais pourvoyeurs de phosphate (Javot et al., 2007).

## II. Le cas particulier des strigolactones

### 1. Quels organismes pour quelle approche ?

Notre stratégie était basée sur la recherche du premier groupe de la lignée verte producteur de strigolactones, via deux approches menées en parallèle : la détection et l'identification des strigolactones produites par différents organismes de la lignée verte, et la phylogénie des gènes de synthèse des strigolactones D27, CCD7 et CCD8. Dans les deux cas, le choix des organismes à étudier était déterminant. Etant donnée la concomitance de l'apparition des ancêtres des Hépatiques et des champignons MA, notre hypothèse initiale était que les strigolactones étaient apparues avec les Hépatiques. Pour tester notre hypothèse il était alors crucial de renforcer l'étude autour du nœud Hépatiques / Charophytes.

Pour la recherche des strigolactones par bio-essais et spectrométrie de masse, nous avons tout d'abord sélectionné *Marchantia* qui émerge comme l'Hépatique modèle (Langdale 2008). En parallèle, nous avons étudié *Lunularia cruciata*, une autre Hépatique moins étudiée mais mycotrophe, alors que toutes les espèces du genre *Marchantia* ne le sont pas forcément. De l'autre côté de ce nœud évolutif la phylogénie reste mal résolue. En effet, la position des Charales, des Coléochaetales, voire des Zygnématales, comme groupes frère des



embryophytes reste ambiguë (Karol et al., 2001; Turmel et al., 2003; Turmel et al., 2006; Finet et al., 2010; Wodniok et al., 2011). Il était donc important de tester au moins un représentant de chacune de ces familles.

Les différentes algues étaient disponibles en culture *in vitro* dans des banques (*Spirogyra* sp, *Coleochaete scutata*) ou en culture semi-axénique dans des instituts (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Nitella hyalina* et *Nitella pseudoflabelatta*). Par contre, les groupes travaillant sur les Hépatiques n'ont pu nous fournir leurs cultures *in vitro* ; il a donc été nécessaire de les isoler et de les introduire en culture axénique, une étape souvent délicate. L'isolement a été réalisé dans les Pyrénées. Le genre *Lunularia* n'étant représenté que par une seule espèce, *Lunularia cruciata*, l'identification basée sur la présence de corbeille à propagules semi-circulaire était suffisante. Le genre *Marchantia*, lui, comprend de nombreuses espèces. Si des marqueurs moléculaire « genre-spécifique » ont été développés (cluster trnA-trnT-nad7; Wahrmund et al., 2008) il n'existe pour l'instant aucun marqueur d'espèce, rendant très difficile une identification plus précise.

En utilisant le protocole de stérilisation proposé par Fonseca et al. (2006) pour *Lunularia*, le taux de survie des propagules était nul. Toutefois, après de nombreux essais de mise au point, un taux de survie d'environ 5% des propagules a été obtenu et a permis l'initiation de cultures *in vitro* de *Marchantia* et de *Lunularia*.

Pour l'étude phylogénétique, nous disposions de plusieurs génomes entièrement séquencés. C'était le cas chez les Angiospermes, aussi bien dicotylédones que monocotylédones, avec *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* et *Oryza sativa*, chez les Chlorophytes avec *Micromonas pusilla*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* et *Chlorella variabilis*, chez la Lycophyte *Selaginella moellendorffii* et chez la mousse modèle *Physcomitrella patens*. Par contre aucun génome de Charophytes n'était disponible. Grâce à une collaboration avec le professeur CF.



Delwiche (Université du Maryland, USA) nous avons pu avoir accès à des banques EST de huit espèces de Charophytes, notamment de Coléochaetales, Zygnématales et Charales, générées initialement pour affiner la phylogénie des Charophytes (Finet et al., 2010).

## 2. Déterminer le point de départ de l'évolution des strigolactones

Nous avons pu mettre en évidence la présence de strigolactones dans les extraits de deux isolats de *Marchantia* (Hépatique) et de deux espèces de *Nitella* (Charales). De plus, nous avons trouvé une activité d'induction de la ramification du champignon dans les extraits de *Lunularia cruciata* (Hépatiques) et *Chara coralina* (Charales).

Chez des algues plus basales (Chlorophyceae, Zygnématales et Coléochaetales) nous n'avons pu montrer la présence de strigolactones, même en utilisant un test biologique très sensible (ramification des hyphes de *Gigaspora rosea*). Ces résultats et l'étude phylogénétique des gènes de biosynthèse des strigolactones (D27, CCD7 et CCD8) ainsi que l'analyse plus poussée de la séquence des deux CCDs ont renforcé l'hypothèse selon laquelle les strigolactones ne seraient apparues qu'avec les Charales. Malheureusement aucune EST correspondant à CCD7 ou CCD8 n'ont été retrouvés dans les banques EST de *Chara* probablement à cause d'un niveau d'expression faible chez ces organismes, tout comme chez les plantes terrestres. En effet, la banque EST très fournie d'*Arabidopsis thaliana* (1,5 millions d'ESTs) ne contient par exemple qu'une seule séquence correspondant au gène CCD8. Pour affiner la phylogénie des gènes CCD7 et CCD8, il sera donc nécessaire de rechercher ces gènes directement sur l'ADN génomique de Charophytes en utilisant par exemple des amorces dégénérées. Toutefois, du fait de l'échelle de temps très importante entre les différents organismes de la lignée verte dont le génome a été entièrement séquencé, on peut anticiper que les séquences de Chlorophytes et de *Physcomitrella patens*, qui sont les plus proches des Charophytes et pourraient être utilisées pour dessiner les amorces, seront très



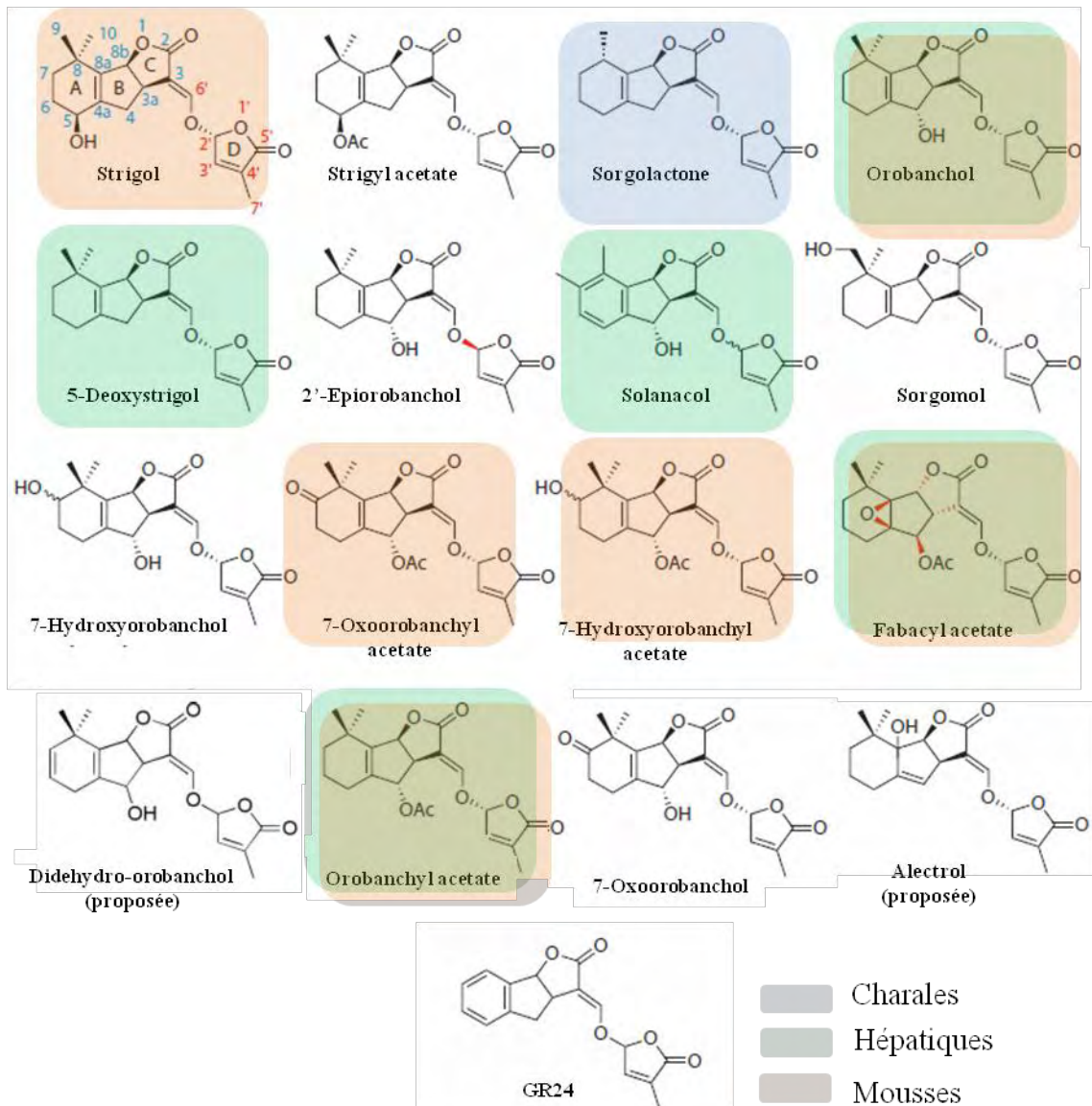
divergentes. Illustrant ce fait, nous avons essayé de calculer le facteur  $\omega$  (Ka/Ks, déterminant le type de sélection, positive ou négative le long d'une branche) pour les différentes branches de l'arbre en utilisant le logiciel PALM4 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>). Malheureusement, le calcul a été impossible du fait de la trop grande variabilité des séquences.

Parallèlement, il sera nécessaire d'analyser les extraits d'autres algues appartenant aux Chlorophytes et aux Charophytes pour nous assurer que l'absence de détection de strigolactones chez les algues que nous avons étudiées n'était pas le résultat d'une perte de fonction survenue de façon indépendante au cours de l'évolution ou la conséquence d'une régulation négative de la synthèse de ces molécules dans les conditions expérimentales utilisées.

### 3. Conservation des strigolactones le long de la lignée verte

Nous avons montré que les strigolactones étaient présentes dès les Charales et les Hépatiques. Par ailleurs, la présence des gènes CCD7, CCD8 et D27 chez la Lycophyte *Selaginella moellendorffii*, tout comme la présence de strigolactones suspectée chez un Gymnosperme *Pinus sp* (Xie et al., 2010), suggère que les strigolactones, depuis les Charales, pourraient être distribuées plus largement dans toute la lignée verte. Cette hypothèse est également soutenue par la présence de strigolactones chez toutes les espèces d'Angiospermes analysées, qu'elles soient monocotylédones ou dicotylédones. Afin de déterminer si les strigolactones représentent un caractère commun à toutes les plantes terrestres, il sera nécessaire d'analyser des exsudats de Lycophytes et de Monilophytes, groupes chez lesquels aucune étude n'a pour l'instant été réalisée.

Les strigolactones retrouvées chez la mousse (Strigol, 7-oxoorobanchyl Acetate, 7-Hydroxyorobanchyl acetate, Fabacyl acetate, Orobanchol et Orobanchyl acetate ; Proust et al., 2011), les Hépatiques (Solanacol, orobanchol, fabacyl acetate, orobanchyl acetate, 5-



**Fig. 42. Conservation de la structure des strigolactones dans la lignée verte.** Les cadres verts, oranges et bleu indiquent les strigolactones retrouvées respectivement chez des Charales, chez des Hépatiques, et des mousses. Adapté de Xie et al. (2010).



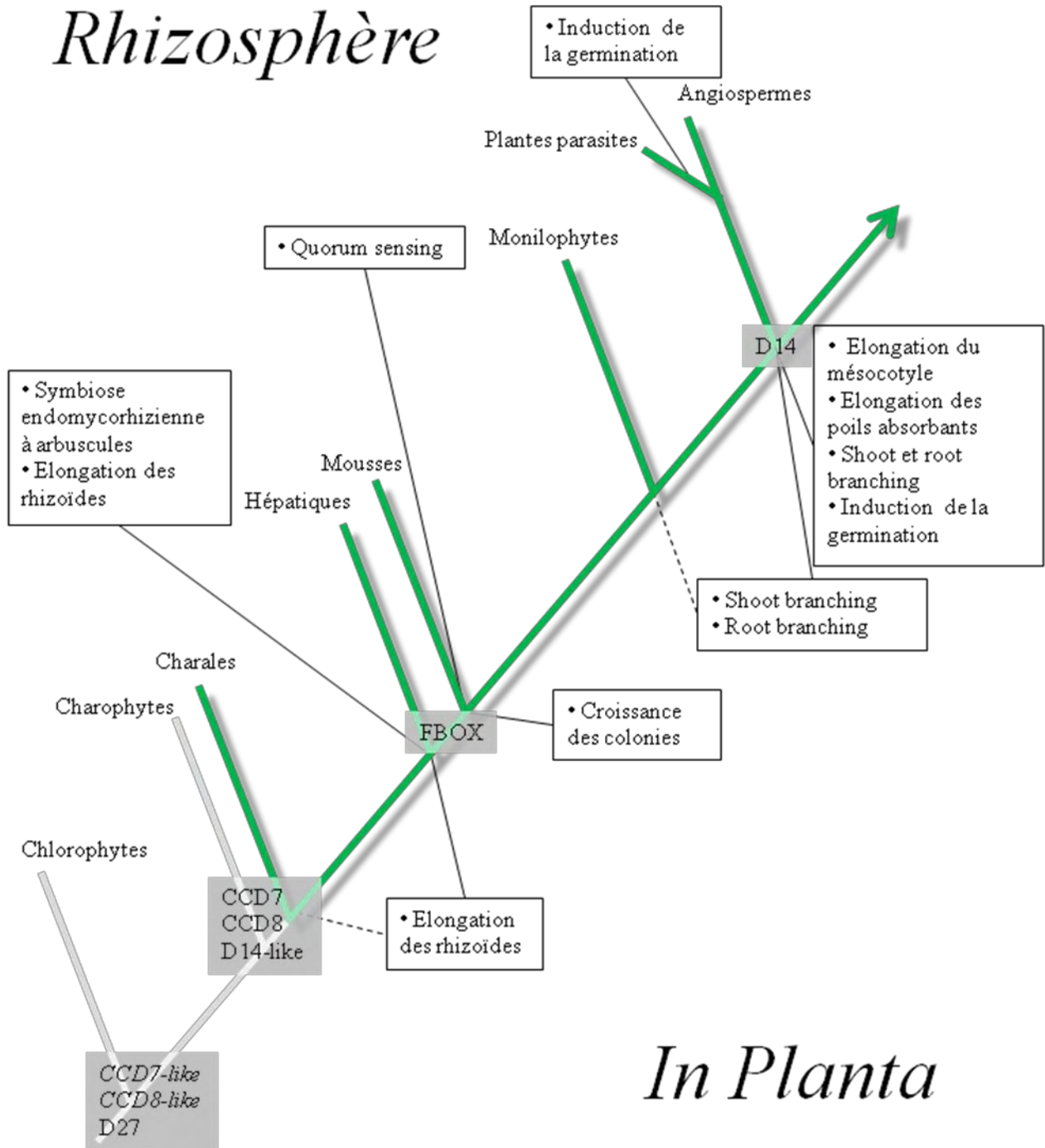
deoxystrigol) et les Charales (Sorgolactone) sont les mêmes que celles trouvées chez les plantes à fleurs et présentent une diversité et une complexité structurale déjà importante (Fig. 42). L'expansion de la famille semble donc avoir eu lieu rapidement après l'apparition de la structure canonique des strigolactones chez les Charales (cycle A, B, C et D). Cette forme canonique a pu évoluer depuis un intermédiaire présent chez les algues plus basales que nous n'avons pas détecté car incapable de stimuler la ramification de *Gigaspora rosea*. Une autre classe d'hormone végétales, les gibbérellines, sont par exemple présentes sous leur forme actuelle seulement depuis les premières plantes vasculaires (Hirano et al., 2007; Yasumura et al., 2007), et auraient évolué à partir d'un intermédiaire de synthèse présent dès les mousses (Hayashi et al., 2010).

### III. Les strigolactones : des molécules aux multiples facettes

#### 1. Des molécules contrôlant le développement des plantes

##### A. Evolution de la fonction hormonale des strigolactones

Si dès leur apparition les strigolactones ont présenté une diversité structurale importante, conservée dans la lignée verte, les activités biologiques de ces molécules ont largement évolué. Malgré de nombreux essais, nous n'avons pas réussi à identifier la fonction de ces molécules chez les Charales. Dans la littérature, le seul cas d'interaction Charales-Champignon rapporté concerne un fossile du Dévonien de *Paleonitella* dont la paroi était colonisée par un champignon Chytridiomycète (Taylor et al., 1992). Aujourd'hui, les Charales présentent une quantité importante d'épiphytes à leur surface sans toutefois qu'une relation symbiotique n'ait été établie. Ainsi, aucune symbiose faisant intervenir ces algues n'a pour le moment été caractérisée, rendant l'hypothèse d'une fonction symbiotique des strigolactones peu probable. Par contre, un rôle hormonal des strigolactones chez ces organismes reste



**Fig. 43.** Schéma proposé de l'évolution des rôles joués par les strigolactones dans la lignée verte. La partie de l'arbre colorée en vert indique les clades produisant des strigolactones. Les traits noirs pleins associent clades et fonctions biologiques des strigolactones. Les traits noirs pointillés indiquent à quelle période ces fonctions sont possiblement apparues.

envisageable. Les Charales présente en particulier des rhizoïdes, structurellement similaires à ceux des Hépatiques. Nos observations sur la stimulation des rhizoïdes de Bryophytes par le GR24 suggèrent qu'une fonction des strigolactones chez les Charales pourrait également être le contrôle de ces structures. Pour confirmer, ou infirmer, cette hypothèse il sera nécessaire de développer des conditions de culture et de phénotypage facilitant la formation et l'observation des rhizoïdes de Charales.

Chez les Bryophytes les études morphologiques sont facilitées par la possibilité de cultiver ces organismes *in vitro* et de les multiplier rapidement. Ainsi, en utilisant l'Hépatique *Marchantia sp* et la mousse *Physcomitrella patens* nous avons pu montrer que les strigolactones stimulent la croissance des rhizoïdes de ces deux Bryophytes, suggérant que cette activité pourrait être une fonction primitive des strigolactones (Figure 43).

Chez la mousse *Physcomitrella patens* les strigolactones contrôlent également la croissance radiale des colonies protonemales issues de la germination de spores, ou régénérées à partir de broyat de gamétophores (Proust et al., 2011). De plus, les strigolactones produites par une colonie impactent la croissance des colonies adjacentes, par un effet de *quorum sensing*-like (Proust et al., 2011). Quelques Hépatiques présentent durant leur cycle de développement, après germination de la spore, un rapide stade protonema. Cette activité de *quorum sensing* pourrait donc être une autre fonction primitive des strigolactones chez les plantes terrestres (Fig. 43).

Plus tard, le contrôle de l'élongation des rhizoïdes par les strigolactones a pu avoir évolué vers la régulation du développement des poils absorbants des Angiospermes (Chapitre 2; Fig. 43). Cette fonction racinaire des strigolactones n'est pas la seule. En effet, les strigolactones inhibent également la formation des racines latérales. Cependant, cet effet semble être dépendant des conditions environnementales. En effet, en présence de faible teneur en



phosphate, les strigolactones joueraient au contraire un rôle de stimulateur du développement des racines latérales (Ruyter-Spira et al., 2011). Par ailleurs, il existe un lien important entre strigolactone et phosphate. Ainsi, un appauvrissement du milieu en phosphate induit une stimulation de la production de strigolactones chez *Sorghum bicolor* (Yoneyama et al., 2007), le pois *Pisum sativum* (Balzergue et al., 2011), la tomate (Lopez-Raez et al., 2008) ou l'arabette *Arabidopsis thaliana* (Kohlen et al., 2010), mais pas chez le Lupin *Lupinus albus* (Yoneyama et al., 2008). De plus, la réponse architecturale des plantes cultivées en condition de carence phosphatée telles que la diminution du nombre de ramification de la tige, l'augmentation du nombre de racines latérales et de la longueur des poils absorbants, semble être dépendante des strigolactones (Ruyter-Spira et al., 2010; Umehara et al., 2010; Chapitre 2). En effet, la diminution du nombre de ramification de la tige en cas de carence en phosphate, n'est par exemple observée qu'en présence de strigolactones exogène chez le mutant de synthèse des strigolactones *d10* (Umehara et al., 2010). Par ailleurs, cette réponse n'apparaît jamais chez le mutant de perception *d3* (Umehara et al., 2010).

Chez la mousse *Physcomitrella patens* une carence en phosphate, tout comme l'ajout de strigolactones, induit une augmentation de la longueur des rhizoïdes (Wang et al., 2008; Chapitre 1). Les deux processus pourraient donc être liés. Toutefois, lors des essais réalisés pour augmenter la production de strigolactones par *Physcomitrella patens* une diminution de la concentration en phosphate dans le milieu de culture n'a eu aucun effet sur le niveau de strigolactones détecté (résultats non montrés). Basé sur ce seul fait nous ne pouvons toutefois exclure le lien entre phosphate et strigolactones chez cet organisme. Plutôt qu'une augmentation de la production, une augmentation de la sensibilité aux strigolactones pourrait relier strigolactones, phosphate et élongation des rhizoïdes. Un mécanisme similaire est par exemple connu pour l'auxine. Chez l'arabette, en réponse à une carence en phosphate,

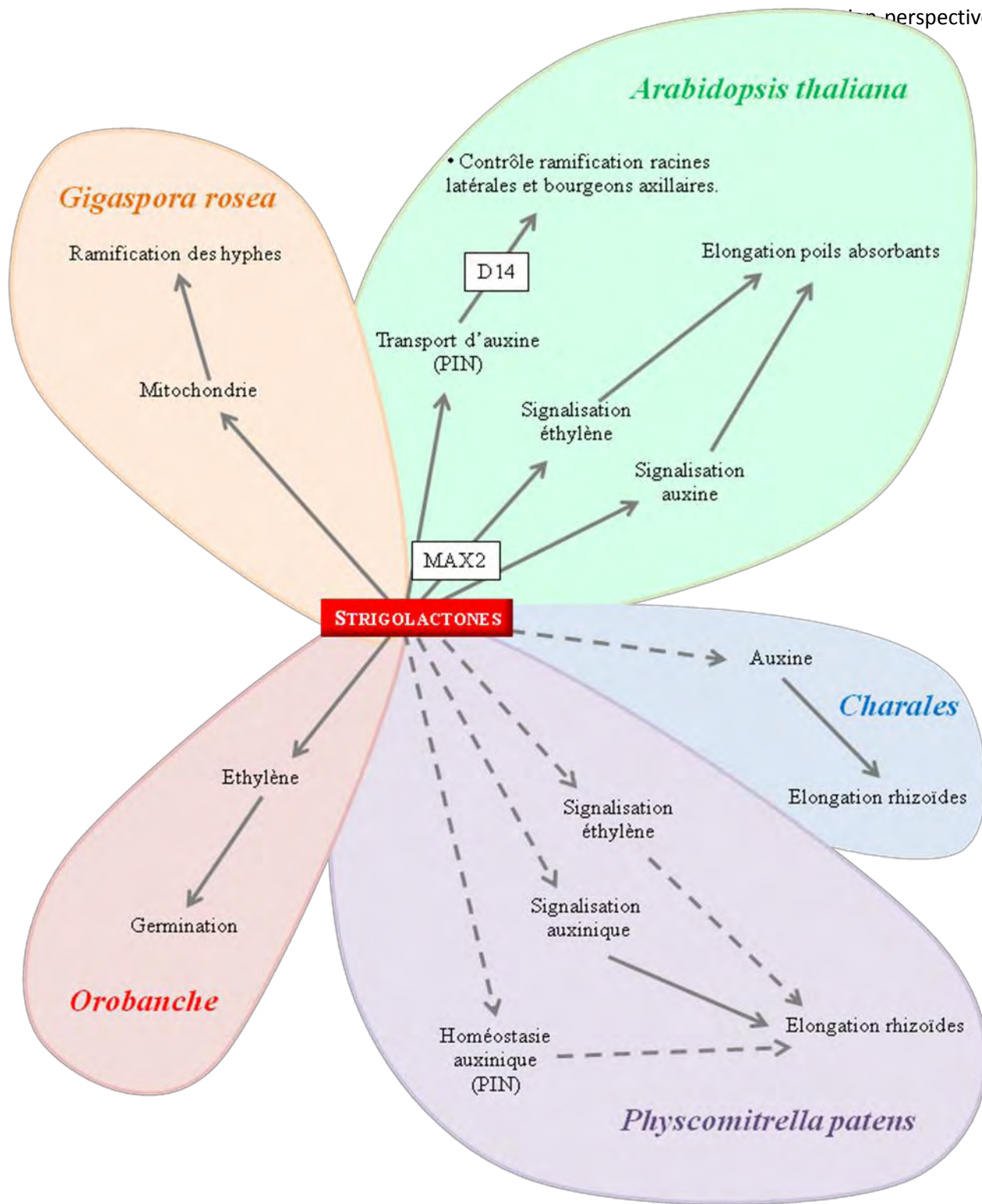


l'augmentation de l'expression du récepteur auxinique TIR1 accentue la sensibilité à l'auxine, permettant ainsi la stimulation du développement des racines latérales (Pérez-Torres et al., 2008).

Ce lien entre modification du développement des plantes en réponse au phosphate et aux strigolactones pourrait représenter une piste sérieuse pour la mise en évidence du rôle des strigolactones chez les plantes vasculaires basales comme les Lycophytes, les Monilophytes ou les Gymnospermes. Une autre piste à étudier chez ces plantes serait le contrôle de la ramification de la tige. En effet, à l'instar des Angiospermes, Lycophytes, Monilophytes et Gymnospermes présentent une tige se ramifiant via la formation de nouveaux méristèmes apicaux secondaires maintenus en état de dormance (Langdale et al., 2008 ; Banks, 2009; Domagalska et Leyser, 2010 ; Sanders et al., 2011). Chez les Angiospermes ce mécanisme est dépendant de l'auxine et des strigolactones (Domagalska & Leyser, 2010). Pour vérifier si les strigolactones agissent de manière similaire sur les méristèmes apicaux secondaires de Lycophyte et de Monilophyte, il serait intéressant d'analyser l'architecture aérienne de mutants déficients dans la synthèse ou la perception des strigolactones chez *Selaginella kraussiana* (Lycophyte) et *Ceratopteris richardii* (Monilophyte), chez qui des outils de génétiques directes et de phénotypage sont en cours de développement.

### ***B. Mécanisme d'action des strigolactones***

Nos connaissances sur les mécanismes d'action des strigolactones sont très fragmentaires. La stimulation de croissance présymbiotique des champignons MA passe par l'activation en quelques minutes du métabolisme mitochondrial et en quelques heures du cycle cellulaire (Besserer et al 2006, 2008, 2009, Fig. 44). La stimulation de la germination des graines d'*Orobanche* se ferait via une induction de la production d'éthylène (Logan & Stewart, 1991). Si des inhibiteurs de synthèse ou de perception de l'éthylène sont ajoutés, l'induction de la



**Fig. 44. Mécanismes putatifs d'action des strigolactones.** Les cadres indiquent des protéines impliquées dans la voie de signalisation strigolactones. Les flèches pleines indiquent des régulations caractérisées alors que les flèches pointillées indiquent des régulations hypothétiques.



germination des graines par les strigolactones diminue drastiquement (Logan et al., 1991). Enfin les strigolactones inhiberaient la ramification de la tige des plantes et des racines en contrôlant le transport d'auxine, via une régulation post-transcriptionnelle des transporteurs d'efflux d'auxine de la famille des PINs (Crawford et al., 2010; Domagalska & Leyser 2010; Ruyter-Spira et al., 2010; Fig. 44). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été proposé que la stimulation de l'élongation des poils absorbants par les strigolactones se ferait via des voies de signalisation impliquant l'auxine et l'éthylène (Kapulnik et al., 2011; Fig. 44). Du fait de la présence d'au moins une de ces différentes plateformes signalétiques (auxinique) chez les Bryophytes et les Charophytes (De Smet et al., 2011), la régulation de l'élongation des rhizoïdes chez ces organismes pourrait s'effectuer via un mécanisme similaire. Des mutants de signalisation impliquant l'auxine et l'éthylène sont disponibles chez *Physcomitrella patens* (Prigge et al., 2010; Yasumura et al., soumis) et pourraient être testés pour leur capacité de réponse aux strigolactones. Dans le même sens, plusieurs gènes codant pour des protéines PINs ont été retrouvées dans le génome entièrement séquencé de la mousse *Physcomitrella patens* (Krecek et al., 2009). Nous avons également retrouvé un gène similaire dans les EST de l'Hépatique *Marchantia polymorpha* (résultat non montré). Les mutants correspondant pourraient être obtenus et l'effet des strigolactones testé. Enfin, les promoteurs induit par l'auxine DR5 et GH3 étant utilisables chez la mousse *Physcomitrella patens* (Bierfreund et al., 2003), l'effet des strigolactones sur la distribution de l'auxine au sein des gamétophores pourrait donc être étudiée sur des mousses exprimant les protéine GUS sous le contrôle d'un de ces promoteurs.

## **2. Les strigolactones : un acteur de l'établissement de la symbiose MA**

### ***A. . Phase pré-symbiotique***



Les strigolactones jouent un rôle important dans l'établissement de la symbiose MA lors de la phase pré-symbiotique (Fig. 43). Ainsi, les mutants de pois déficients dans la synthèse des strigolactones (*ccd7* et *ccd8*) sont significativement moins mycorhizés que le sauvage (Gomez-Roldan et al., 2008). Nous avons montré que les exsudats des Hépatiques *Lunularia cruciata* et *Marchantia sp* induisaient la ramification des hyphes du champignon MA *Gigaspora rosea*, et contiennent des strigolactones. De plus, les hyphes de *Glomus intraradices* à proximité de *Lunularia cruciata* présentent de nombreuses ramifications similaires à celles formées par ce même champignon à proximité d'une racine de plante (résultats non montrés). *Lunularia cruciata* est par ailleurs connue pour être mycotrophe. Les strigolactones en stimulant le développement du champignon favorisent probablement, comme chez les angiospermes, l'interaction entre les deux partenaires (Fonseca et al., 2006, Fig. 43). Pour confirmer cette fonction, l'obtention de mutant déficient dans la synthèse de strigolactones chez cette Hépatique est nécessaire. Toutefois, en absence d'outil génétique, une première approche pourrait consister à bloquer la synthèse des strigolactones à l'aide d'inhibiteurs comme la fluridone (Matusova et al., 2005; Gomez-Roldan et al., 2007), certains acides arylalkyl-hydroxamic (Sergeant et al., 2009) ou encore certains ester de phényle (Fukui et al., 2011).

Chez *Medicago truncatula*, lors de la phase pré-symbiotique les Myc-LCOs produit par le champignon stimulent la formation des racines latérales (Maillet et al., 2011). Par ailleurs, la mycorhization entraîne une forte diminution de la production des strigolactones par la plante (Lopez-Raez et al., 2010). Enfin, nous avons montré que les strigolactones pouvaient inhiber la formation des racines latérales. Ainsi, les Myc-LCOs pourraient entraîner une diminution de la quantité de strigolactones produite par la plante et ainsi lever l'inhibition de la formation des racines latérales.



## ***B. La phase symbiotique***

Si le rôle des strigolactones comme stimulateur de la phase pré-symbiotique semble assez bien démontré, on ne sait rien de leur rôle potentiel dans les phases symbiotiques plus tardives. Zhang et al. (2010) ont proposé que les demi ABC transporteurs STRs, localisés au niveau de la membrane péri-arbusculaire, pourraient faciliter l'adressage des strigolactones dans les arbuscules où elles stimuleraient l'hyper ramification de ces dernières. L'analyse du phénotype mycorhizien des mutants de pois *ccd7* et *ccd8* amène un premier élément de réponse. En effet, les rares cas de colonisation des mutants par le champignon sont suivis d'un développement normal d'arbuscules (Gomez-Roldan et al., 2008). Toutefois, ces mutants produiraient toujours des strigolactones, en très faible quantité, détectables avec des spectromètres de masse de dernière génération (Pr. K. Yoneyama, communication personnelle). Si cette quantité de strigolactones est insuffisante pour stimuler les champignons MA présents dans le sol, ce qui expliquerait le faible niveau d'infection, l'accumulation de ces strigolactones résiduelles à l'échelle cellulaire pourrait être suffisante pour stimuler la formation d'arbuscules. Afin de vérifier cette hypothèse il serait nécessaire de développer des rapporteurs de la présence de strigolactones, équivalent du rapporteurs DR5-GFP pour l'auxine, au niveau cellulaire.



## **Conclusion**





## Conclusion

Il ressort de nos travaux que les strigolactones sont vraisemblablement apparues avec l'ancêtre commun des algues les plus proches des plantes terrestres (*i.e* les Charophytes) et des Hépatiques. Nous proposons que ces molécules signal jouaient alors un rôle hormonal, pour contrôler le développement des rhizoïdes. Cette activité biologique ancestrale a ensuite été conservée chez les Hépatiques et les mousses, et est aujourd'hui retrouvée associée au développement des poils absorbants des Angiospermes (*Arabidopsis thaliana*). Une deuxième fonction ancestrale des strigolactones a sans doute été celle de stimuler la croissance des premiers champignons Gloméromycètes et l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Tout comme la stimulation de la croissance des rhizoïdes, cette fonction a pu être déterminante pour la colonisation du milieu terrestre par les plantes.

Ensuite, chez les Angiospermes, l'activité des strigolactones s'est diversifiée en tant qu'hormones impliquées dans le contrôle de la ramification des tiges et des racines. D'autres fonctions restent probablement à découvrir, notamment chez les Lycophytes, les Monilophytes et les Gymnospermes qui n'ont encore jamais été étudiés dans cette direction.

Nous avons également montré qu'à l'instar des différents rôles joués par les strigolactones les autres acteurs moléculaires impliqués dans l'établissement de la symbiose MA étaient apparues étape par étape au cours de l'évolution des plantes terrestres. Chez les Bryophytes et les Lycophytes, l'absence de gènes codant pour des protéines réputées importantes pour la symbiose MA chez les angiospermes laisse penser que d'autres mécanismes restent à découvrir chez ces plantes tout aussi mycotrophes. Leur identification sera du plus grand intérêt dans le cadre d'une étude évo-dévo plus poussée afin de comprendre les mécanismes de mise en place de la symbiose chez ces organismes, mais



également pour mettre en évidence de nouveaux acteurs moléculaires de la régulation symbiotique.

De manière générale, notre travail met en évidence le manque criant d'organismes modèles parmi les plantes basales. Ainsi, pour confirmer la fonction primitive des strigolactones la mise au point d'un modèle Charales est indispensable. De même, des modèles d'Hépatique et de Monilophyte mycotrophe devraient être développés. Une fois ces modèles disponibles, la mise au point de conditions de culture *in vitro* et de méthode de phénotypage, le séquençage de leur génome et la mise en place d'outils génétiques permettraient d'appréhender plus facilement la question cruciale des processus ayant permis l'adaptation des plantes au milieu terrestre.



## **Bibliographie**



## Bibliographie

- Akiyama K, Hayashi H. 2006. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany* 97: 925-931.
- Akiyama K, Matsuzaki K-ichi, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito Seisuke, Hayashi H. 2010. Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant & Cell Physiology* 51: 1104-1117.
- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GED, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Dénarié J, Gough C. 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal* 34: 495-506.
- Ané J-M, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GED, Ayax C, Lévy J, Debelle F, Baek J-M, Kalo P, et al. 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364-1367.
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J. 2007a. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal* 51: 1019-1029.
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyojuka J. 2009. d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant & Cell Physiology* 50: 1416-1424.
- Awad A, Sato D, Kasumoto D, Kamioka H, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2006. Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobanche*, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regulation* 48: 221-227.
- Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard Guillaume, Rochange SF. 2011. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany* 62: 1049-1060.
- Banks JA. 2009. Selaginella and 400 million years of separation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 223-238.
- Bécard G, Piché Y. 1989. Fungal Growth Stimulation by CO<sub>2</sub> and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2320-2325.
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE. 1992. Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO<sub>2</sub> and Flavonols. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 821-825.





- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*: 1186-1197.
- Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218.
- Becker B, Marin B. 2009. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany* 103: 999-1004.
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker Jon, Luschnig C, Leyser O. 2006. The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology: CB* 16: 553-563.
- Berbee ML, Taylor JW. 1992. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *Bio Systems* 28: 117-125.
- Besserer A, Bécard Guillaume, Jauneau Alain, Roux Christophe, Séjalon-Delmas N. 2008a. GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* 148: 402-413.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau Alain, Roy S, Portais J-C, Roux Christophe, Bécard Guillaume, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4: e226.
- Bischoff, H.W. & Bold, H.C. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publications 6318: 1-95
- Bidartondo MI, Read DJ, Trappe JM, Merckx V, Ligrone R, Duckett JG. 2011. The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters*.
- Bierfreund NM, Reski R, Decker EL. 2003. Use of an inducible reporter gene system for the analysis of auxin distribution in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Reports* 21: 1143-1152.
- Blanc Guillaume, Duncan G, Agarkova I, Borodovsky M, Gurnon J, Kuo A, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Polle J, et al. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *The Plant Cell* 22: 2943-2955.
- Bonfante P, Genre A. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science* 13: 492-498.
- Bonfante P, Requena N. 2011. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Bonfante P, Selosse M-A. 2010. A glimpse into the past of land plants and of their mycorrhizal affairs: from fossils to evo-devo. *The New Phytologist* 186: 267-270.



- Booker Jonathan, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O. 2004a. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Current Biology: CB* 14: 1232-1238.
- Booker Jonathan, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O. 2005a. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell* 8: 443-449.
- Bouwmeester HJ, Roux Christophe, Lopez-Raez JA, Bécard Guillaume. 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12: 224-230.
- Braun M. 1996. Anomalous gravitropic response of Chara rhizoids during enhanced accelerations. *Planta* 199: 443-450.
- Bucher M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *The New Phytologist* 173: 11-26.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 13: 693-698.
- Burmester A, Richter M, Schultze K, Voelz K, Schachtschabel D, Boland W, Wöstemeyer J, Schimek C. 2007. Cleavage of beta-carotene as the first step in sexual hormone synthesis in zygomycetes is mediated by a trisporic acid regulated beta-carotene oxygenase. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44: 1096-1108.
- Cárdenas L. 2009. New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells. *Plant Signaling & Behavior* 4: 4-8.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, et al. 2001. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell* 13: 843-852.
- Casimiro Ilda, Beeckman Tom, Graham Neil, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg Goran, Bennett Malcolm J. 2003. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science* 8: 165-171.
- Clarkson DT. 1985. Factors Affecting Mineral Nutrient Acquisition by Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 77-115.
- Cook CE, Whichard L P, Turner B, Wall M E, Egley G H. 1966. Germination of Witchweed (Striga lutea Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* 154: 1189-1190.
- Cook CE, Whichard Leona P., Wall M, Egley Grant H., Coggon P, Luhan PA, McPhail AT. 1972a. Germination stimulants. II. Structure of strigol, a potent seed germination stimulant for witchweed (Striga lutea). *Journal of the American Chemical Society* 94: 6198-6199.



- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska MA, Leyser O. 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development (Cambridge, England)* 137: 2905-2913.
- Davey ML, Currah RS. 2006. Interactions between mosses (Bryophyta) and fungi. *Canadian Journal of Botany* 84: 1509-1519.
- Delbarre Akin, Muller Philippe, Imhoff V, Guern J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198.
- Delwiche C F, Graham LE, Thomson N. 1989. Lignin-like compounds and sporopollenin coleochaete, an algal model for land plant ancestry. *Science* 245: 399-401.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J-F, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 36: W465-469.
- Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouzé P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynié S, Cooke R, et al. 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11647-11652.
- Devers EA, Branscheid A, May P, Krajinski F. 2011. Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*.
- Domagalska MA, Leyser O. 2011. Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011. 12(4):211-21.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle Mark. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Drummond RSM, Martínez-Sánchez NM, Janssen BJ, Templeton KR, Simons JL, Quinn BD, Karunairetnam S, Snowden KC. 2009. *Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7 is involved in the production of negative and positive branching signals in *petunia*. *Plant Physiology* 151: 1867-1877.
- Duckett JG, Carafa A, Ligrone R. 2006. A highly differentiated glomeromycotean association with the mucilage-secreting, primitive antipodean liverwort *Treubia* (Treubiaceae): clues to the origins of mycorrhizas. *American Journal of Botany* 93: 797-813.
- Dun EA, Brewer PB, Beveridge Christine A. 2009. Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science* 14: 364-372.
- Dupuy L, Mackenzie J, Haseloff J. 2010. Coordination of plant cell division and expansion in a simple morphogenetic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 2711-2716.



- Eklund DM, Thelander M, Landberg K, Ståldal V, Nilsson A, Johansson M, Valsecchi I, Pederson ERA, Kowalczyk M, Ljung K, et al. 2010. Homologues of the Arabidopsis thaliana SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss Physcomitrella patens. *Development (Cambridge, England)* 137: 1275-1284.
- Elias KS, Safir GR. 1987. Hyphal Elongation of Glomus fasciculatus in Response to Root Exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1928-1933.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.
- Engstrom EM. 2011. Major GRAS gene subfamilies arose early in land plant evolution. *Plant Signaling & Behavior* 6.
- Evans M, Ishikawa H, Estelle MarkA. 1994. Responses of Arabidopsis roots to auxin studied with high temporal resolution: Comparison of wild type and auxin-response mutants. *Planta* 194.
- Feddermann N, Reinhardt D. 2011. Conserved residues in the ankyrin domain of VAPYRIN indicate potential protein-protein interaction surfaces. *Plant Signaling & Behavior* 6.
- Feddermann N, Muni RRD, Zeier T, Stuurman J, Ercolin F, Schorderet M, Reinhardt D. 2010. The PAM1 gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN. *The Plant Journal* 64: 470-481.
- Finet C, Timme RE, Delwiche Charles F, Marlétaz F. 2010. Multigene phylogeny of the green lineage reveals the origin and diversification of land plants. *Current Biology: CB* 20: 2217-2222.
- Fischer NH, Weidenhamer JD, Riopel JL, Quijano L, Menelaou MA. 1990. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry* 29: 2479-2483.
- Floss DS, Walter MH. 2009. Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signaling & Behavior* 4: 172-175.
- Floyd SK, Bowman JL. 2007. The Ancestral Developmental Tool Kit of Land Plants. *International Journal of Plant Sciences* 168: 1-35.
- Fonseca HMA, Berbara RLL. 2008. Does Lunularia cruciata form symbiotic relationships with either Glomus proliferum or G. intraradices? *Mycological Research* 112: 1063-1068.
- Fonseca HMA, Berbara RLL, Pereira ML. 2006. Lunularia cruciata, a potential in vitro host for Glomus proliferum and G. intraradices. *Mycorrhiza* 16: 503-508.
- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge Christine Anne. 2005. The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *The Plant Cell* 17: 464-474.





- Fukaki H, Tasaka M. 2009. Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* 69: 437-449.
- Fukui K, Ito Shinsaku, Ueno K, Yamaguchi S, Kyojuka J, Asami T. 2011. New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* 17: 3489-3499.
- Gilroy S, Jones DL. 2000. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science* 5: 56-60.
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS. 1999. Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5571-5575.
- Goldwasser Y, Yoneyama Kaori, Xie X, Yoneyama Koichi. 2008. Production of Strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobancha aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regulation* 55: 21-28.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, Bouwmeester H, Bécard Guillaume, Beveridge Christine A, Rameau C, Rochange SF. 2008a. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189-194.
- Gomez-Roldan V, Roux Christophe, Girard D, Bécard Guillaume, Puech-Pagés V. 2007. Strigolactones: promising plant signals. *Plant Signaling & Behavior* 2: 163-164.
- Gorman DS, Levine RP. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54: 1665-1669.
- Graham JH. 1982. Effect of Citrus Root Exudates on Germination of Chlamydospores of the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus epigaeum*. *Mycologia* 74: 831-835.
- Gray J, Boucot AJ. 1971. Early silurian spore tetrads from new york: earliest new world evidence for vascular plants? *Science* 173: 918-921.
- Grimsley NH, Ashton N. W., Cove DJ. 1977. The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, *Physcomitrella patens*. *MGG Molecular & General Genetics* 154: 97-100.
- Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Dräxl S, Brachmann A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Wang TL, et al. 2010. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant Cell* 22: 2509-2526.



- Gutjahr C, Casieri L, Paszkowski U. 2009. Glomus intraradices induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *The New Phytologist* 182: 829-837.
- Gutjahr C, Novero M, Guether M, Montanari O, Udvardi M, Bonfante P. 2009. Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *The New Phytologist* 183: 53-61.
- Harel A, Orjalo AV, Vincent T, Lachish-Zalait A, Vasu S, Shah S, Zimmerman E, Elbaum M, Forbes DJ. 2003. Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Molecular Cell* 11: 853-864.
- Hayashi K-ichiro, Horie K, Hiwatashi Y, Kawaide H, Yamaguchi S, Hanada A, Nakashima T, Nakajima M, Mander LN, Yamane H, et al. 2010. Endogenous diterpenes derived from entkaurene, a common gibberellin precursor, regulate protonema differentiation of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 153: 1085-1097.
- Hedges S, Blair J, Venturi M, Shoe J. 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology* 4: 2.
- Hirano K, Nakajima M, Asano K, Nishiyama T, Sakakibara H, Kojima M, Katoh E, Xiang H, Tanahashi T, Hasebe M, et al. 2007. The *GID1*-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 19: 3058-3079.
- Hodick D. 1993. The protonema of *Chara fragilis* Desv.: regenerative formation, photomorphogenesis, and gravitropism. *Botanica Acta: Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft = Journal of the German Botanical Society* 106: 388-393.
- Humphreys CP, Franks PJ, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR, Beerling DJ. 2010. Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications* 1: 103.
- Hu Z, Yan H, Yang J, Yamaguchi S, Maekawa M, Takamure I, Tsutsumi N, Kyojuka J, Nakazono M. 2010. Strigolactones negatively regulate mesocotyl elongation in rice during germination and growth in darkness. *Plant & Cell Physiology* 51: 1136-1142.
- Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, Perry J, Miwa H, Umehara Y, Kouchi H, Murakami Y, Mulder L, Vickers K, et al. 2005. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433: 527-531.
- Indriolo E, Na G, Ellis D, Salt DE, Banks JA. 2010. A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *The Plant Cell* 22: 2045-2057.
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyojuka J. 2005. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant & Cell Physiology* 46: 79-86.



- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1720-1725.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jobson RW, Qiu Yin-Long. 2011. Amino acid compositional shifts during streptophyte transitions to terrestrial habitats. *Journal of Molecular Evolution* 72: 204-214.
- Joel DM, Chaudhuri SK, Plakhine D, Ziadna H, Steffens JC. 2011. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* 72: 624-634.
- Johnson AW, Gowada G, Hassanali A, Knox J, Monaco S, Razavi Z, Rosebery G. 1981. The preparation of synthetic analogues of strigol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*: 1734.
- Johnson X, Brcich T, Dun EA, Goussot M, Haurogné K, Beveridge Christine A, Rameau C. 2006. Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiology* 142: 1014-1026.
- Jones AR, Kramer Eric M, Knox K, Swarup Ranjan, Bennett Malcolm J, Lazarus CM, Leyser HMO, Grierson CS. 2009. Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nature Cell Biology* 11: 78-84.
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiya C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11086-11091.
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, et al. 2005. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786-1789.
- Kanamori N, Madsen Lene Heegaard, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, et al. 2006. A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 359-364.
- Kapulnik Y, Delaux P-M, Resnick Natalie, Mayzlish-Gati E, Winer S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combiér J-P, Bécard Guillaume, Belausov E, et al. 2011. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* 233: 209-216.



- Kapulnik Y, Resnick Natalie, Mayzlish-Gati E, Kaplan Y, Wininger S, Hershenhorn J, Koltai H. 2011. Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62: 2915-2924.
- Karol K G, McCourt R M, Cimino MT, Delwiche C F. 2001. The closest living relatives of land plants. *Science* 294: 2351-2353.
- Kaul KN, Mitra GC, Tripathi BK. 1962. Responses of *Marchantia* in Aseptic Culture to Well-known Auxins and Antiauxins. *Annals of Botany* 26: 447 -466.
- Kenrick P, Crane PR. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33-39.
- Klamt D, Knauth B, Dittmann I. 1992. Auxin dependent growth of rhizoids of *Chara globularis*. *Physiologia Plantarum* 85: 537-540.
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C. 2010. Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2011 155(2):974-87.
- Koltai H, Dor Evgenia, Hershenhorn J, Joel DM, Weininger S, Lekalla S, Shealtiel H, Bhattacharya C, Eliahu E, Resnick Nathalie, et al. 2009. Strigolactones' Effect on Root Growth and Root-Hair Elongation May Be Mediated by Auxin-Efflux Carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 129-136.
- Koltai H, LekKala SP, Bhattacharya C, Mayzlish-Gati E, Resnick Nathalie, Wininger S, Dor Evgenya, Yoneyama Kaori, Yoneyama Koichi, Hershenhorn J, et al. 2010. A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany* 61: 1739-1749.
- Kramer Elena M. 2009. Chapter 4. New model systems for the study of developmental evolution in plants. *Current Topics in Developmental Biology* 86: 67-105.
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalová E. 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10: 249.
- Kuhn H, Küster H, Requena N. 2010. Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *The New Phytologist* 185: 716-733.
- Langdale JA. 2008. Evolution of developmental mechanisms in plants. *Current Opinion in Genetics & Development* 18: 368-373.
- Lau S, Jürgens G, De Smet I. 2008. The evolving complexity of the auxin pathway. *The Plant Cell* 20: 1738-1746.
- Ledger SE, Janssen BJ, Karunairetnam S, Wang Tianchi, Snowden KC. 2010. Modified CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 expression correlates with altered branching in kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *The New Phytologist* 188: 803-813.





- Lemieux C, Otis C, Turmel M. 2007. A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biology* 5: 2.
- Lévy J, Bres C, Geurts René, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet E-P, Ané J-M, Lauber E, Bisseling T, et al. 2004. A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.
- Liang J, Zhao L, Challis R, Leyser O. 2010. Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Journal of Experimental Botany* 61: 3069-3078.
- Ligrone R, Carafa A, Lumini E, Bianciotto V, Bonfante P, Duckett JG. 2007. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *American Journal of Botany* 94: 1756-1777.
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, et al. 2009. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant Cell* 21: 1512-1525.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529-544.
- Logan DC, Stewart GR. 1991. Role of Ethylene in the Germination of the Hemiparasite *Striga hermonthica*. *Plant Physiology* 97: 1435-1438.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287.
- López-Ráez JA, Bouwmeester H. 2008. Fine-tuning regulation of strigolactone biosynthesis under phosphate starvation. *Plant Signaling & Behavior* 3: 963-965.
- López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard Guillaume, Mulder P, et al. 2008. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *The New Phytologist* 178: 863-874.
- Loth-Pereda V, Orsini E, Courty P-E, Lota F, Kohler A, Diss L, Blaudez D, Chalot M, Nehls U, Bucher M, et al. 2011. Structure and expression profile of the phosphate Pht1 transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology*.
- Lynn DG, Steffens JC, Kamut VS, Graden DW, Shabanowitz J, Riopel JL. 1981. Isolation and characterization of the first host recognition substance for parasitic angiosperms. *Journal of the American Chemical Society* 103: 1868-1870.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J. 2011. Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. 2011 469(7328):58-63.



- Malloch DW, Pirozynski KA, Raven PH. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 2113-2118.
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett M J. 1999. AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *The EMBO Journal* 18: 2066-2073.
- Mashiguchi K, Sasaki E, Shimada Y, Nagae M, Ueno K, Nakano T, Yoneyama Koichi, Suzuki Y, Asami T. 2009. Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in Arabidopsis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 2460-2465.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ. 2005a. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* 139: 920-934.
- Mayzlish-Gati E, LekKala SP, Resnick Nathalie, Wininger S, Bhattacharya C, Lemcoff JH, Kapulnik Y, Koltai H. 2010. Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato. *Journal of Experimental Botany* 61: 3129-3136.
- McCourt Richard M, Delwiche Charles F, Karol Kenneth G. 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology & Evolution (Personal Edition)* 19: 661-666.
- Menand B, Calder G, Dolan L. 2007. Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* 58: 1843-1849.
- Menand B, Yi K, Jouannic S, Hoffmann L, Ryan E, Linstead P, Schaefer DG, Dolan L. 2007. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* 316: 1477-1480.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, et al. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.
- Messinese E, Mun J-H, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Barre A, Lougnon G, Schornack S, Bono J-J, Cook DR, et al. 2007. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 20: 912-921.
- Messing SAJ, Gabelli SB, Echeverria I, Vogel JT, Guan JC, Tan BC, Klee HJ, McCarty DR, Amzel LM. 2010. Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *The Plant Cell* 22: 2970-2980.
- Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, Umehara M, Luo L, Kobayashi K, Hanada A, Ueno K, Asami T, Yamaguchi S, et al. 2010. FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant & Cell Physiology* 51: 1127-1135.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor



signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19613-19618.

Morris SE, Turnbull CG, Murfet IC, Beveridge C A. 2001. Mutational analysis of branching in pea. Evidence that Rms1 and Rms5 regulate the same novel signal. *Plant Physiology* 126: 1205-1213.

Müller M, Schmidt W. 2004. Environmentally induced plasticity of root hair development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134: 409-419.

Mukherjee A, Ané J-M. 2011. Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi: molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 24: 260-270.

Muthukumar T, Udaiyan K. 2002. Arbuscular mycorrhizas in cycads of southern India. *Mycorrhiza* 12: 213-217.

Nagahashi G, Douds Jr. DD. 2000. Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research* 104: 1453-1464.

Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M'barek, Xu G, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M. 2005. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *The Plant Journal* 42: 236-250.

Navaud O, Dabos P, Carnus E, Tremousaygue D, Hervé C. 2007. TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *Journal of Molecular Evolution* 65: 23-33.

Oláh B, Brière C, Bécard Guillaume, Dénarié J, Gough C. 2005. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44: 195-207.

Oldroyd GED, Downie JA. 2006. Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 351-357.

Palenik B, Grimwood J, Aerts A, Rouzé P, Salamov A, Putnam N, Dupont C, Jorgensen R, Derelle E, Rombauts S, et al. 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7705-7710.

Parke JL, Linderman RG. 1980. Association of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica*. *Canadian Journal of Botany* 58: 1898-1904.

Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology* 6: 763-775.

Paszkowski U, Kroken S, Roux Christophe, Briggs SP. 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13324-13329.



- Péret B, De Rybel B, Casimiro Ilda, Benková E, Swarup Ranjan, Laplaze L, Beeckman Tom, Bennett Malcolm J. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* 14: 399-408.
- Pérez-Torres C-A, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle Mark, Herrera-Estrella L. 2008. Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *The Plant Cell* 20: 3258-3272.
- Pitts RJ, Cernac A, Estelle M. 1998. Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *The Plant Journal* 16: 553-560.
- Prigge MJ, Lavy M, Ashton Neil W, Estelle Mark. 2010. Physcomitrella patens auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway. *Current Biology: CB* 20: 1907-1912.
- Prochnik SE, Umen J, Nedelcu AM, Hallmann A, Miller SM, Nishii I, Ferris P, Kuo A, Mitros T, Fritz-Laylin LK, et al. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* 329: 223-226.
- Proust H, Hoffmann B, Xie X, Yoneyama Kaori, Schaefer DG, Yoneyama Koichi, Nogué F, Rameau C. 2011. Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 138: 1531-1539.
- Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ. 2010. *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 61: 482-494.
- Qiu YL, Cho Y, Cox JC, Palmer JD. 1998. The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* 394: 671-674.
- Radutoiu S, Madsen Lene H, Madsen Esben B, Jurkiewicz Anna, Fukai E, Quistgaard EMH, Albrechtsen AS, James EK, Thirup S, Stougaard J. 2007. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO Journal* 26: 3923-3935.
- Radutoiu S, Madsen Lene Heegaard, Madsen Esben Bjørn, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, et al. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- Raven JA, Edwards D. 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Botany* 52: 381-401.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Remy W, Taylor T N, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841-11843.





- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P-F, Lindquist EA, Kamisugi Y, et al. 2008. The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Reski R, Abel WO. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165: 354-358.
- Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D. 2007. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annual Review of Genetics* 41: 147-168.
- Ross JJ, Reid JB. 2010. Evolution of growth-promoting plant hormones. *Funct. Plant Biol.* 37: 795-805.
- Russell J, Bulman S. 2005. The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. *The New Phytologist* 165: 567-579.
- Rutherford G, Tanurdzic M, Hasebe M, Banks JA. 2004. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biology* 4: 6.
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, et al. 2011. Physiological Effects of the Synthetic Strigolactone Analog GR24 on Root System Architecture in Arabidopsis: Another Belowground Role for Strigolactones? *Plant Physiology* 155: 721-734.
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, et al. 2007. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* 19: 610-624.
- Sakakibara K, Nishiyama T, Sumikawa N, Kofuji R, Murata T, Hasebe M. 2003. Involvement of auxin and a homeodomain-leucine zipper I gene in rhizoid development of the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 130: 4835-4846.
- Samaj J, Müller Jens, Beck M, Böhm N, Menzel D. 2006. Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* 11: 594-600.
- Sanders HL, Darrah PR, Langdale JA. 2011. Sector analysis and predictive modelling reveal iterative shoot-like development in fern fronds. *Development* 138: 2925-2934.
- Sanders IR, Croll D. 2010. Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual Review of Genetics* 44: 271-292.
- Sato Daisuke, Awad AA, Chae SH, Yokota T, Sugimoto Y, Takeuchi Yasutomo, Yoneyama Koichi. 2003. Analysis of strigolactones, germination stimulants for striga and orobanche, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1162-1168.
- Schüssler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D. 2006. Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444: 933-936.



- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Schwartz SH, Qin X, Loewen MC. 2004a. The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 46940-46945.
- Selosse M-A. 2005. Are liverworts imitating mycorrhizas? *The New Phytologist* 165: 345-349.
- Sergeant MJ, Li J-J, Fox C, Brookbank N, Rea D, Bugg TDH, Thompson AJ. 2009. Selective inhibition of carotenoid cleavage dioxygenases: phenotypic effects on shoot branching. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 5257-5264.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J, et al. 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400-405.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Siniooglou S, Lutzmann M, Santos-Rosa H, Leonard K, Mueller S, Aebi U, Hurt E. 2000. Structure and assembly of the Nup84p complex. *The Journal of Cell Biology* 149: 41-54.
- De Smet I, Voss U, Lau S, Wilson M, Shao N, Timme RE, Swarup Ranjan, Kerr I, Hodgman C, Bock R, Bennett Malcolm, Jürgens G, Beeckman Tom. 2011a. Unraveling the evolution of auxin signaling. *Plant Physiology* 155: 209-221.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis, Third Edition*. Academic Press.
- Smit P, Limpens E, Geurts Rene, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T. 2007. Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiology* 145: 183-191.
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T, Geurts René. 2005. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789-1791.
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ. 2005. The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The Plant Cell* 17: 746-759.
- Sorefan K, Booker Jon, Haurogné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, Leyser O. 2003a. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes & Development* 17: 1469-1474.



- Sørensen I, Pettolino FA, Bacic A, Ralph J, Lu F, O'Neill MA, Fei Z, Rose JKC, Domozych DS, Willats WGT. 2011. The Charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *The Plant Journal*.
- Stirk WA, Novák O, Hradecká V, Prončík A, Rolčík J, Strnad M, Van Staden J. 2009. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Dictyota humifusa* (Phaeophyta): towards understanding their biosynthesis and homeostasis. *European Journal of Phycology* 44: 231.
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HMO. 2002. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129: 1131-1141.
- Stirnberg P, Ward S, Leyser O. 2010. Auxin and strigolactones in shoot branching: intimately connected? *Biochemical Society Transactions* 38: 717-722.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, et al. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962.
- Takeda N, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Parniske M. 2009. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* 58: 766-777.
- Tamasloukht M'Barek, Séjalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau Alain, Roux Christophe, Bécard Guillaume, Franken P. 2003. Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* 131: 1468-1478.
- Tawarayama K, Watanabe S, Yoshida E, Wagatsuma T. 1995. Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 6: 57-59.
- Taylor Thomas N., Hass Hagen, Remy Winfried. 1992. Devonian Fungi: Interactions with the Green Alga *Palaeonitella*. *Mycologia* 84: 901-910.
- Timme RE, Delwiche Charles F. 2010. Uncovering the evolutionary origin of plant molecular processes: comparison of Coleochaete (Coleochaetales) and *Spirogyra* (Zygnematales) transcriptomes. *BMC Plant Biology* 10: 96.
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen Lene H, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, et al. 2006. Dereglulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441: 1153-1156.
- Trépanier M, Bécard Guillaume, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux J-A. 2005. Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5341-5347.



- Tsuchiya Y, Vidaurre D, Toh S, Hanada A, Nambara E, Kamiya Y, Yamaguchi S, McCourt P. 2010. A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nature Chemical Biology* 6: 741-749.
- Turmel M, Otis C, Lemieux C. 2003. The mitochondrial genome of *Chara vulgaris*: insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *The Plant Cell* 15: 1888-1903.
- Turmel M, Otis C, Lemieux C. 2006. The chloroplast genome sequence of *Chara vulgaris* sheds new light into the closest green algal relatives of land plants. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1324-1338.
- Turmel M, Otis C, Lemieux C. 2007. An unexpectedly large and loosely packed mitochondrial genome in the charophycean green alga *Chlorokybus atmophyticus*. *BMC Genomics* 8: 137.
- Turnau K, Anielska T, Jurkiewicz A. 2005. Mycothallic/mycorrhizal symbiosis of chlorophyllous gametophytes and sporophytes of a fern, *Pellaea viridis* (Forsk.) Prantl (Pellaeaceae, Pteridales). *Mycorrhiza* 15: 121-128.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama Koichi, et al. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-200.
- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N, Yamaguchi S. 2010. Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol.* 2010 51(7):1118-26.
- Vogel JT, Walter MH, Giavalisco P, Lytovchenko A, Kohlen W, Charnikhova T, Simkin AJ, Goulet C, Strack D, Bouwmeester HJ, Fernie AR, Klee HJ. 2010a. *SlCCD7* controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal* 61: 300-311.
- Vogel JT, Walter MH, Giavalisco P, Lytovchenko A, Kohlen W, Charnikhova T, Simkin AJ, Goulet C, Strack D, Bouwmeester HJ, Fernie AR, Klee HJ. 2010b. *SlCCD7* controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal* 61: 300-311.
- Wahrmund U, Groth-Malonek M, Knoop V. 2008. Tracing plant Mitochondrial DNA evolution: rearrangements of the ancient mitochondrial gene cluster *trnA-trnT-nad7* in liverwort phylogeny. *Journal of Molecular Evolution* 66: 621-629.
- Walther TC, Alves A, Pickersgill H, Loiodice I, Hetzer M, Galy V, Hülsmann BB, Köcher T, Wilm M, Allen T, et al. 2003. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell* 113: 195-206.





- Wang B, Qiu Y-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Wang Bin, Yeun LH, Xue J-Y, Liu Y, Ané J-M, Qiu Yin-Long. 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *The New Phytologist* 186: 514-525.
- Wang Yong, Secco D, Poirier Y. 2008. Characterization of the PHO1 gene family and the responses to phosphate deficiency of *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 146: 646-656.
- Weidmann S, Sanchez L, Descombin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2004. Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 17: 1385-1393.
- Wellman CH, Osterloff PL, Mohiuddin U. 2003. Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425: 282-285.
- Wente SR, Rout MP. 2010. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a000562.
- Winther JL, Friedman WE. 2008. Arbuscular mycorrhizal associations in Lycopodiaceae. *The New Phytologist* 177: 790-801.
- Wodniok S, Brinkmann H, Glöckner G, Heidel AJ, Philippe H, Melkonian M, Becker B. 2011. Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key? *BMC Evolutionary Biology* 11: 104.
- Worden AZ, Lee J-H, Mock T, Rouzé P, Simmons MP, Aerts AL, Allen AE, Cuvelier ML, Derelle E, Everett MV, et al. 2009. Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science* 324: 268-272.
- Xie X, Kusumoto D, Takeuchi Yasutomo, Yoneyama Kaori, Yamada Y, Yoneyama Koichi. 2007. 2'-epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8067-8072.
- Xie X, Yoneyama Kaori, Yoneyama Koichi. 2010. The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology* 48: 93-117.
- Yano K, Yoshida S, Müller Judith, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, et al. 2008. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20540-20545.
- Yasumura Y, Crumpton-Taylor M, Fuentes S, Harberd NP. 2007. Step-by-step acquisition of the gibberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. *Current Biology: CB* 17: 1225-1230.



- Yokota K, Soyano T, Kouchi H, Hayashi M. 2010. Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis is retained in homologs of a non-legume, rice. *Plant & Cell Physiology* 51: 1436-1442.
- Yoneyama Kaori, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Yasutomo, Yoneyama Koichi. 2007. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227: 125-132.
- Yoneyama Kaori, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Yasutomo, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama Koichi. 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *The New Phytologist* 179: 484-494.
- Yoneyama Kaori, Yoneyama Koichi, Takeuchi Yasutomo, Sekimoto H. 2007. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* 225: 1031-1038.
- Yoneyama Koichi, Xie X, Yoneyama Kaori, Takeuchi Yasutomo. 2009. Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Management Science* 65: 467-470.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D. 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 21: 809-818.
- Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ. 2010. Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* 22: 1483-1497.
- Zhang X-C, Cannon SB, Stacey G. 2009. Evolutionary genomics of LysM genes in land plants. *BMC Evolutionary Biology* 9: 183.
- Zhang Y, Guo L-D. 2007. Arbuscular mycorrhizal structure and fungi associated with mosses. *Mycorrhiza* 17: 319-325.
- Zhu H, Riely BK, Burns NJ, Ané J-M. 2006. Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics* 172: 2491-2499.

**Auteur : Pierre-Marc Delaux**

**Titre : Rôles des strigolactones et évolution des compétences mycorhiziennes dans la lignée verte.**

**Directeurs de Thèse : M. Guillaume Bécard et Mme Nathalie Séjalon-Delmas**

**Soutenance : Le 22 septembre 2011, Salle de la FR3450,**

### **Résumé**

La lignée verte comprend les algues vertes et les plantes terrestres. Grâce à une association symbiotique avec des champignons Gloméromycètes, la symbiose mycorhizienne à arbuscules, les plantes terrestres ont pu s'adapter plus facilement à leurs nouvelles conditions de vie. Cette symbiose se met en place grâce à des échanges de signaux entre les partenaires. Ainsi, dans les stades précoces une famille de petites molécules produites par les plantes, les strigolactones, stimulent de façon remarquable le développement du champignon. Ces molécules sont par ailleurs connues chez les Angiospermes comme régulateur hormonal de la ramification des tiges. Nous nous sommes posé la question de savoir quand les strigolactones étaient apparues au cours de l'évolution des plantes et quelles étaient alors leurs fonctions primitives. Nous avons pu montrer que les strigolactones étaient apparues avec les Charales, qui sont les algues vertes les plus proches des plantes terrestres. Elles sont aussi présentes chez les Hépatiques, les descendantes des premières plantes terrestres. Nous avons découvert qu'un apport exogène de GR24, un analogue de synthèse des strigolactones, pouvait stimuler la croissance des rhizoïdes d'une Hépatique et d'une Mousse. Nous avons également montré que les strigolactones participaient au contrôle de la formation des racines latérales et des poils absorbant chez l'Angiosperme modèle *Arabidopsis thaliana*. Notre hypothèse est que les fonctions primitives des strigolactones étaient de stimuler le développement des rhizoïdes chez les premières plantes terrestres, puis de promouvoir la symbiose mycorhizienne à arbuscules, deux fonctions primordiales pour la conquête du monde terrestre. Plus tardivement, avec l'apparition des angiospermes, l'activité sur les rhizoïdes a pu être recrutée pour contrôler l'élongation des poils absorbants, des cellules proches des rhizoïdes. Puis les strigolactones ont acquis de nouvelles fonctions comme celles de contrôler la ramification des racines et des tiges. Enfin, nous proposons un schéma plus global montrant l'apparition étape par étape des principaux gènes impliqués dans l'établissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscule tout au long de la lignée verte.

**Mots Clés : Symbiose – Evolution – Strigolactones – Lignée verte**

**Discipline : Biosciences végétales**

**UMR5546 / Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales**

**24 Chemin de Borde Rouge - BP 42617 - 31326 Castanet-Tolosan**