

Université de Montréal

Expansion d'une nouvelle famille de protéines kinases (MAPKKKs) impliquée dans le développement reproductif chez les Solanacées

Par Caroline Daigle

Département de Sciences Biologiques, Institut de Recherche en Biologie Végétale Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Arts et des Sciences en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph. D.) en sciences biologiques

Mai, 2016

© Caroline Daigle, 2016

Résumé

Les cascades de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) sont présentes chez tous les eucaryotes et permettent la transduction des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Chez les végétaux, elles sont très abondantes et actives dans une multitude de processus, autant lors de la réponse aux stress que lors du développement. Elles fonctionnent comme un système de phosphorelais, se transférant un groupement phosphate d'une protéine à l'autre, de la MAPKKK à la MAPKK (MKK), puis de la MKK à la MAPK (MPK) et finalement, de la MPK vers des facteurs de transcription ou toute autre protéine qui permettra un changement au niveau de la réponse cellulaire.

Depuis quelques années, plusieurs membres de la grande famille des MAPKs ont été étudiés pour leur rôle dans la reproduction sexuée des végétaux. Des mutants ont été caractérisés, mais jusqu'à maintenant, peu de voies complètes ont été décelées. Des précédents travaux dans le laboratoire ont démontré que deux MAPKKKs, de la sous-famille des MEKKs, *ScFRK1* et *ScFRK2*, sont importantes pour le développement normal de l'ovule et du pollen chez *Solanum chacoense*, une espèce de pomme de terre sauvage diploïde. Sachant que les mutants des gènes les plus orthologues chez *Arabidopsis thaliana* ne possèdent pas les mêmes phénotypes, nous avons émis l'hypothèse que les Solanacées, du moins *S. chacoense*, possèdent une famille de MAPKKKs différente, qui n'est pas présente chez *A. thaliana*.

Nous avons donc analysé les génomes/transcriptomes/protéomes de 15 espèces issues de différents clades du règne végétal afin d'étudier les relations phylogénétiques à l'intérieur de la sous-famille des MEKKs. Cela nous a permis d'observer que *ScFRK1* et *ScFRK2* ne sont pas seuls, mais sont inclus dans un groupe monophylétique que nous avons nommé la classe des FRKs (FRK pour Fertilization-Related Kinase). De plus, nous avons observé une expansion considérable de cette classe chez les Solanacées, comparativement à d'autres dicotylédones comme le peuplier, la vigne ou le coton. La classe des FRKs est absente chez les monocotylédones étudiées (riz et maïs) et ne possède qu'un seul membre (une FRK primitive) chez l'angiosperme basal *Amborella trichopoda*. Cette analyse phylogénétique des MEKKs nous a poussés à nous poser des questions sur l'origine de la classe des FRKs ainsi que sur son rôle au sein des Solanacées.

Dans un deuxième temps, nous avons fait la caractérisation fonctionnelle de *ScFRK3*, un troisième membre de la classe des FRKs chez *S. chacoense*, aussi impliqué dans le développement des gamétophytes mâle et femelle. Du patron d'expression jusqu'à l'établissement d'une voie de signalisation potentielle, en passant par la caractérisation phénotypique des mutants, plusieurs expériences ont été réalisées dans le but de comprendre le rôle de *ScFRK3* au niveau de la reproduction chez *S. chacoense*. Dans un contexte plus global, il est important de se questionner sur les rôles semblables, mais forcément différents, des trois membres de la famille FRKs qui ont été caractérisés jusqu'à présent.

Mots-clés

Signalisation, *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs), MAPKKKs, Développement, Gamétophyte femelle, Ovule, Gamétophyte mâle, Pollen, Solanacées, Évolution.

Abstract

Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) signaling cascades are found in all Eucaryotes and allow signal transduction from the outside of the cell to the inside. In plants, they are particularly numerous and play roles in several signaling processes, including stress responses and response to developmental cues. Their system involves a phosphorelay: they interact with each other to transfer a phosphate group. It starts with an activated MAPKKK, which transfers the phosphate group to a MAPKK (MKK), then this MKK transfers the signal to a MAPK (MPK), which ends this relay by phosphorylating transcription factors or any other proteins that will, in a way or an other, change the cell response according to the signal.

During the last few years, many MAPKs members have been studied for their role in plants sexual reproduction. Some mutants were characterized, but until now, our knowledge of complete signaling cascades is very limited. Previous studies in our lab have shown that two MAPKKKs from the MEKK subfamily, *ScFRK1* and *ScFRK2*, are important for male and female gametophytes development in *Solanum chacoense*, a wild diploid potato species. Genes that are the most orthologous to *ScFRK1* and *ScFRK2* in *Arabidopsis thaliana*, *AtMAPKKK19*, *20* and *21*, do not seem to play the same roles in reproduction, which led us to make the hypothesis that in solanaceous species, at least in *S. chacoense*, there is one MAPKKK family that is different and not present in *A. thaliana*.

At first, we did analyze the genomes/transcriptomes/proteomes of 15 species from different clads of the plant kingdom to find all the members of the MEKK subfamily of MAPKKKs in order to study their phylogenetic relationship. We then observed that *ScFRK1* and *ScFRK2* are included in a large monophyletic group which was called the FRK class (Fertilization Related Kinase). Moreover, we also observed that this class has considerably expanded within the solanaceous species, compared to other species like *A. thaliana*, poplar, cotton or grape vine. The FRK class is totally absent in the monocot species studied (rice and maize) and only one member is found in the basal angiosperm *Amborella trichopoda*. This phylogenetic analysis led us to ask questions about the origins of the FRK class and its role inside the *Solanaceae* family.

Secondly, we characterized *ScFRK3*, a third member of the FRK class in *S. chacoense*, which is also involved, as its two FRK sisters, in male and female gametophytes development. From

its expression pattern to the establishment of a potential signaling cascade, analysis and phenotyping of *ScFRK3* mutant lines, many experiments were realized in order to understand the role of *ScFRK3* in *S. chacoense* sexual reproduction. Overall, the appearance of this new and expanded class of MEKKs questions its specific role in comparison to other species that have much lesser members, mainly when compared to the model plant *A. thaliana*, which harbor only a fifth of the FRKs found in solanaceous species.

Keywords

Signaling, Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), MAPKKKs, Development, Female gametophyte, Ovule, Male gametophyte, Pollen, *Solanaceae*, Evolution.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des tableaux supplémentaires	ix
Liste des figures	x
Liste des figures supplémentaires	xii
Sigles et abréviations utilisés	xiii
Remerciements	xvi
1. Introduction	1
1.1. Généralités sur les cascades de signalisation chez les plantes	1
1.1.1. Exemples de cascades de signalisation impliquées dans les mécanismes de défense	4
1.1.2. Exemples de cascades de signalisation impliquées dans la réponse aux stress abiotiques	6
1.1.3. Exemples de cascades de signalisation impliquées dans le développement	8
1.2. Développement du gamétophyte femelle.....	12
1.3. Développement du gamétophyte mâle.....	18
1.4. Pollinisation et fécondation : des exemples de communication intercellulaire	23
1.5. Développement de l’embryon : d’autres exemples de signalisation.....	28
1.6. La classe FRK et ses relations dans la reproduction chez <i>Solanum chacoense</i>	33
1.6.1. <i>ScFRK1</i> et <i>ScFRK2</i> ainsi que leurs orthologues connus chez <i>A. thaliana</i>	33
1.6.2. Les FRKs : vers un projet de doctorat	37
2. Caractérisation phylogénétique de la classe FRK chez 15 espèces appartenant à divers clades du règne végétal	38
2.1. L’analyse à l’échelle génomique des MAPKKKs montre une expansion et une évolution d’une nouvelle classe de MEKKs impliquée dans la reproduction sexuée des Solanacées.....	38
2.1.1. Préambule	38
2.1.2. Sommaire.....	38
2.2. Genome-wide analysis of MAPKKKs shows expansion and evolution of a new MEKK class involved in solanaceous species sexual reproduction.....	39
2.2.1. Apport original.....	39

2.2.2.	Abstract.....	39
2.2.3.	Background.....	40
2.2.4.	Méthods	44
	<i>RNA sequencing and de novo assembly</i>	44
	<i>S. chacoense MEKK subfamily analysis</i>	44
	<i>MEKK subfamily analysis in other species</i>	45
	<i>Expression analysis of the FRK class in S. chacoense</i>	45
	<i>Expression analysis of the MEKK subfamily in Solanum lycopersicum, Solanum tuberosum and Populus trichocarpa</i>	45
	<i>Kinase domains sequence logos</i>	46
	<i>Test of variable dN/dS ratios among the FRK class</i>	46
2.2.5.	Results.....	46
	<i>A deep transcriptomic analysis of the MEKK subfamily in Solanum chacoense unveils a much larger FRK class than in Arabidopsis thaliana</i>	46
	<i>Comparison of the MEKK subfamily shows an expansion of the FRK class in Solanaceous species</i>	50
	Uniqueness and overrepresentation of FRK class members in Solanaceous species	51
	<i>FRKs motifs and signatures</i>	57
	<i>Group I from the FRK class shows a faster evolution rate</i>	57
	<i>The FRK class members are expressed in reproductive tissues</i>	58
2.2.6.	Discussion.....	59
	<i>Evolution of the MEKK and the FRK families</i>	59
	<i>What makes a FRK?</i>	61
	<i>The role of the FRK class through evolution of the plant kingdom</i>	64
2.2.7.	Conclusion	64
2.2.8.	Availability of supporting data	65
2.2.9.	Aknowledgements	65
2.2.10.	Supplementary data.....	65
3.	Implication de ScFRK3 dans le développement reproductif chez <i>Solanum chacoense</i>	99
3.1.	<i>ScFRK3, une nouvelle MAPKKK impliquée dans le développement reproductif chez S. chacoense</i>	99
3.1.1.	Préambule	99
3.1.2.	Sommaire.....	99

3.2.	<i>ScFRK3</i> , a new MAPKKK involved in signaling during reproductive development of <i>Solanum chacoense</i>	100
3.2.1.	Apport original.....	100
3.2.2.	Abstract.....	100
3.2.3.	Introduction.....	101
3.2.4.	Methods	105
	<i>Plant material and transformation</i>	105
	<i>RNA expression and in situ hybridization</i>	106
	<i>Ovule clearing and microscopy</i>	106
	<i>Pollen development analysis</i>	107
	<i>MKKs and MPKs retrieving and RACs</i>	107
	<i>Directed Yeast-two hybrid assays</i>	107
	<i>Subcellular localization and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays</i>	107
3.2.5.	Results.....	108
	<i>ScFRK3</i> , a MEKK related to the <i>Arabidopsis</i> MAPKKK19, 20 and 21	108
	<i>ScFRK3</i> expression pattern suggests a role in reproductive development	110
	<i>ScFRK3 RNAi</i> plants show reproductive defects	112
	<i>Ovule development is affected in ScFRK3 RNAi mutants</i>	114
	<i>ScFRK3</i> directly interacts with <i>ScMKK3</i>	119
	121
	<i>ScMKK3</i> physically interacts with <i>ScMPK4</i>	122
3.2.6.	Discussion.....	124
	<i>An addition to signaling during gametophyte development</i>	125
3.2.7.	Aknowledgements	126
3.2.8.	Supplementary data.....	126
4.	Discussion générale et perspectives futures	134
4.1.	Étudier les FRKs comme projet de doctorat	134
4.2.	La signalisation par voies MAPK et leurs implications dans la reproduction	136
4.3.	Perspectives futures pour ce projet	137
5.	Conclusion	140
6.	Références	141

Liste des tableaux

Table I: Number of MEKKs and FRKs, genome size and expected number of expressed genes for all the species.....56

Table II: Evolutionary rate assessment of group I FRKs as determined by the log likelihood values and parameter estimates under the two model analyzed59

Table III: Number of seeds per fruit in *ScFRK3* RNAi mutants.....113

Table IV: Correlation between ovule development stages and bud size in WT and iFRK3 mutants.....116

Liste des tableaux supplémentaires

Supplementary Table I: Protein sequences of the 21 ScMEKKs found in <i>S. chacoense</i> ovule and pollen tube transcriptome.....	67
Supplementary Table II: Genomic data resources used to retrieve MEKK subfamily members.....	73
Supplementary Table III: Gene IDs and locus tags (if necessary) of all the MEKKs found.....	75
Supplementary Table IV Primers used for RT-PCRs.....	91
Supplementary Table V: List of primers.....	128
Supplementary Table VI: All MKKs and MPKs found in <i>S. chacoense</i> ovule and pollen transcriptome and their orthologs (if clearly identifiable in a phylogenetic tree) in <i>A. thaliana</i>	129

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d’une cascade de signalisation par voies MAPK typique.....	3
Figure 2 : Représentation graphique des deux voies de signalisation de la flg22	5
Figure 3 : Représentation schématique des différentes cascades de signalisation impliquées dans la réponse à certains stress abiotiques	7
Figure 4 : Voies de signalisation du patron de formation des stomates.....	9
Figure 5 : Voie de signalisation menant à la cytokinèse chez <i>A. thaliana</i>	11
Figure 6 : Le gamétophyte femelle	13
Figure 7 : Développement du gamétophyte femelle chez <i>A. thaliana</i>	14
Figure 8 : Développement du gamétophyte mâle.....	20
Figure 9 : Les différents phénotypes observés chez les mutants dont la PMI est affectée	22
Figure 10 : Les différentes étapes de la pollinisation chez les espèces à pollen sec.....	24
Figure 11 : Communications moléculaires possibles entre le tube pollinique et le gamétophyte femelle juste avant la fécondation	27
Figure 12 : Embryogénèse chez <i>A. thaliana</i>	30
Figure 13 : Division asymétrique du zygote et contrôle du destin des cellules apicale et basale avec la voie de YODA.....	32
Figure 14 : Patron d’expression de ScFRK1	34
Figure 15 : Phénotype des fruits des mutants dont l’expression de ScFRK1 est réduite. 	35
Figure 16 : Phénotype des mutants surexprimant ScFRK2.....	36
Figure 17 : Phylogenetic analysis of the MEKK subfamily in <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Solanum chacoense</i>	48
Figure 18 : Phylogenetic analysis of the FRK class in solanaceous species	49
Figure 19 : Phylogenetic analysis of the FRK class in representative species of the plant kingdom	53
Figure 20 : Preponderance of the FRK class members among the MEKKs from various species.....	56
Figure 21 : Evolution of the FRK class through the plant kingdom	63
Figure 22 : Phylogenic positioning of ScFRK3 inside the FRK class and cellular localization.....	109

Figure 23: *ScFRK3* expression pattern in reproductive development. 111
Figure 24: *iFRK3* mutants produce smaller fruits. 113
Figure 25: Ovule phenotyping in *iFRK3* mutants. 116
Figure 26: Pollen phenotyping in *iFRK3* mutants. 118
Figure 27: *ScFRK3* interacts with *ScMKK3* 121
Figure 28: *ScMKK3* interacts with *ScMPK4* 123

Liste des figures supplémentaires

Figure S1: Phylogenetic analysis of the MEKK subfamily in four Solanaceous species (<i>S. chacoense</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>S. lycopersicum</i> , and <i>N. benthamiana</i>).....	93
Figure S2: Phylogenetic analysis of the whole MEKK subfamily into the 15 studied species and <i>S. chacoense</i>	94
Figure S3: Phylogenetic analysis of the whole MEKK subfamily in <i>P. abies</i> , <i>P. glauca</i> and <i>A. thaliana</i>	95
Figure S4: Sequence logos of the 12 subdomains of the kinase catalytic domain from all FRKs orthologs, AtMAPKKK15-18 orthologs, AtMAPKKK13-14 orthologs, and AtMAPKKK1-12 orthologs.....	96
Figure S5: Expression analysis of members of the <i>FRK class</i> in four species.....	99
Figure S6: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMKKs, the SIMKKs and the ScMKKs found in the <i>S. chacoense</i> transcriptome.....	131
Figure S7: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMPKs, StMPKs and the ScMPKs found in the <i>S. chacoense</i> transcriptome.....	132
Figure S8: <i>ScMKK3</i> and <i>ScMPK4</i> expressions and localizations.....	133

Sigles et abréviations utilisés

Ade : Adénine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : ARN ribosomal

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

CRP : *Cystein-rich Protein*

dATP : *Deoxyadenosine triphosphate*

DTT : DiThioThréitol

ER : ERECTA

ERL : ERECTA-like

EST : *Expressed Sequence Tag*

FG : *Functional Megaspore* (Mégaspore fonctionnelle)

FRK : *Fertilization-Related Kinase*

FT : Facteur de Transcription

HAE : *HAESA*

HIK : HINKEL

His : Histidine

HSL2 : *HAESA-like 2*

IDA : *Inflorescence Deficient in Abscission*

Leu : Leucine

LRT : *Likelihood-Ratio Test*

MAPK ou MPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MAPKK ou MKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*

MAPKKK ou MEKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*

MMC : *Meristemoid Mother Cell* (Cellule-mère de la Méristémoïde)

MMC : *Megaspore Mother Cell* (Cellule-mère de la Mégaspore)

MW : *Molecular Weight*

NBT/BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium

ORF : *Open Reading Frame* (Cadre de lecture ouvert)

PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PCR : *Polymerase Chain Reaction* (Réaction en chaîne par polymérase)
PMC : *Pollen Mother Cell* (Cellule-mère du pollen)
PMI : *Pollen Mitosis I* (Première mitose du pollen)
PMII : *Pollen Mitosis II* (Deuxième mitose du pollen)
PTI : *PAMP-Triggered Immunity*
RLM-RACEs : *Ligase-mediated Rapid Amplification of cDNA Ends*
ROS : *Reactive Oxygen Species* (Dérivés réactifs de l'oxygène)
RT-PCR : *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (Transcription inverse PCR)
SPCH : *SPEECHLESS*
TCS : *Two-component Signaling* (Signalisation à double-composante)
TES : TETRASPORE
TF : Transcription Factor (Facteur de transcription)
TMM : *Too Many Mouths*
Trp : Tryptophane
UTP : Uridine triphosphate
Y2H : *Yeast-two hybrid* (Double-hybride chez la levure)
YDA : YODA

*Je dédie cette thèse à mon père, qui m'a transmis cet amour
de la nature et de la biologie, sans trop le savoir. Lui, qui
m'a toujours poussée à aller jusqu'au bout de mes
capacités, comme un père racontant à sa fille qu'elle est
capable de le faire.*

Caroline Daigle

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Daniel, qui m'a fait confiance depuis mon tout premier stage au laboratoire en 2007, malgré mon stress et ma timidité. Il a su me transmettre sa passion pour la recherche et l'enseignement, puis il m'a bien guidée à travers les tortueux chemins que peut prendre un projet de doctorat pour me mener ici, à bon port. Daniel, j'admire ta passion, ta détermination et ta capacité à trouver et exploiter ce qu'il y a de meilleur en nous. Merci !

Je remercie aussi tous mes collègues de laboratoire, présents ou passés, qui m'ont permis de partager un peu de tout, des expériences personnelles et professionnelles, des joies, mais aussi des peines. Merci à Éric Chevalier, qui a longtemps été mon idole au laboratoire, Faiza Tebbji, Édith Lafleur, Hugo Germain, Josée Houde, Audrey Loubert-Hudon, Mohammed Sabar, Mohammad-Gabriel Alameh, Rachid Benhammen, Yang Liu, Fangwen Bai, Valentin Joly, Claire Viallet, Benjamin Mazin et tous les stagiaires, notamment Aude Decor et Sophie Carpentier, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Un merci spécial aussi à mes propres stagiaires : Valentin, Sadia, et particulièrement Benjamin, qui a passé un été complet à observer des ovules au microscope, le chanceux ! Je veux aussi dire merci à mes autres collègues de l'IRBV, étudiants et chercheurs avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, notamment mes collègues depuis le baccalauréat : Audrey, Mathieu, Steve et Evgenia.

Merci aussi à tous ceux qui ont travaillé, de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse. Merci à Mathieu et Aurélien pour la lecture, la correction et les suggestions apportées à l'introduction. Un autre merci à vous deux pour les coups de pied au derrière quand c'était le temps, surtout dans les derniers mois ! Merci à Audrey pour les précieux conseils de microscopie et plus particulièrement, pour les expériences d'hybridations *in situ* ! Sans toi, je serais encore en train de faire des coupes...

Merci David pour tous ces beaux moments passés à tes côtés pendant presque toutes mes études doctorales. La fin n'a pas été facile, nous en conviendrons tous les deux, mais cela n'efface pas tout le support que tu m'as apporté pendant toutes ces années. Merci pour ce chemin parcouru à tes côtés.

J'aimerais remercier mes parents, Ginette et Jean Marc, ma sœur, Johany et mon frère, Sébastien, pour leur support tout le long de mes études. Merci de m'avoir fait comprendre que dans la vie, en y croyant et en travaillant fort, tout est possible. C'est peut-être plus long que prévu, mais c'est possible ! Un gros merci spécial à ma sœur Johany, son mari Marco et leurs deux belles filles d'amour, Laury-Ann et Lily-Maude, qui m'ont recueillie dans l'un des moments les plus difficiles de ma vie. Je l'apprécie énormément. Une partie de cette thèse vous appartient assurément ! Je vous aime !

1. Introduction

1.1. Généralités sur les cascades de signalisation chez les plantes

Chez tout organisme multicellulaire, une communication entre les différentes cellules doit s'effectuer afin d'assurer un développement fonctionnel et normal. Chez les eucaryotes, il existe un système de signalisation efficace, effectué par un système de phosphorelais à l'aide d'au moins trois protéines kinases que l'on nomme les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs). Chez les plantes, où les protéines de type kinase sont abondantes, représentant 4% du protéome, on retrouve ce système surtout sous la forme de sérine-thréonine protéines kinases (Ser/Thr) (Dissmeyer & Schnittger, 2011). Bien que plusieurs variantes aient été démontrées, il existe un patron général de la cascade de signalisation. Lorsqu'un signal, généralement extracellulaire, est capté par son récepteur, souvent situé à la surface de la cellule, celui-ci s'active par phosphorylation et une MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) est alors phosphorylée. Son domaine régulateur, situé sur la partie N ou C-terminale, change de conformation et libère ainsi le domaine kinase de la protéine. Une fois la MAPKKK activée, elle phosphoryle une MAPK Kinase (MAPKK ou MKK) sur ses résidus S/T-X₃₋₅-S/T (X=5 chez les végétaux, X=3 chez les levures et les animaux) qui est alors activée (Group et al., 2002; Zheng & Guan, 1994). À son tour, la MAPKK activée active une MAPK ou MPK, qui, une fois phosphorylée sur ses résidus T-X-Y (thréonine – acide aminé – tyrosine), phosphorylera un ou plusieurs facteurs de transcription, des activateurs ou des répresseurs qui iront directement lier l'ADN et changeront ainsi l'expression des gènes cibles. Les MPKs peuvent aussi phosphoryler d'autres types de protéines, comme des *Microtubule-Associated Proteins* (MAPs) ou d'autres protéines kinases (Mishra, Tuteja, & Tuteja, 2006). Ainsi, ces cascades permettent aux cellules de communiquer entre elles grâce à un signal extracellulaire qui peut être perçu à l'intérieur de la cellule, permettant à cette dernière de changer l'expression de certains gènes en fonction du signal reçu. La [figure 1](#) montre le schéma général d'une cascade de MAPK.

Depuis plus de vingt ans, les cascades de MAPKs sont étudiées chez une multitude d'organismes, des levures jusqu'aux mammifères, en passant par les plantes. C'est d'ailleurs chez ces dernières que la grande famille de MAPKs est la plus imposante et la plus diversifiée. À titre d'exemple, le génome d'*Arabidopsis thaliana* possède 60 MAPKKKs, séparées en trois familles (les Ziks, les Rafs et les MEKKs), dont jusqu'à maintenant, seules les MEKKs sont

reconnues en tant qu'actrices dans des cascades de signalisation typiques. En y ajoutant les 10 MKKs et les 20 MPKs (Group et al., 2002), cela rend important le nombre potentiel des différentes cascades de signalisation. De plus, le manque de corrélation entre le nombre de MEKKs, de MKKs et de MPKs suggère qu'il existe beaucoup de redondance fonctionnelle et de croisements entre les différentes voies de signalisation (Jonak, Okresz, Bogre, & Hirt, 2002; Smékalová, Doskočilová, Komis, & Šamaj, 2014). Par exemple, une MPK seule peut être activée par différents signaux, via différentes voies MEKKs/MKKs en amont (J. S. Lee, Huh, Bhargava, & Ellis, 2008). Inversement, plusieurs MPKs peuvent être activées par un même signal et emprunter une seule voie MEKK/MKK en amont (Andreasson & Ellis, 2010). Plusieurs mécanismes peuvent être mis en œuvre afin d'éviter la redondance, comme la séparation spatio-temporelle des voies ainsi que la présence ou l'absence d'un ou de plusieurs acteur(s) important(s) de la voie, tels que les ligands ou les substrats (Xu & Zhang, 2015). Jusqu'à maintenant, encore peu de ces cascades sont entièrement connues, mais elles sont de plus en plus étudiées, particulièrement au niveau des mécanismes de défense, de réponse aux stress abiotiques, ainsi qu'au niveau du développement général de la plante. Quelques exemples de cascades de signalisation activées lors de ces trois mécanismes seront présentés ici.

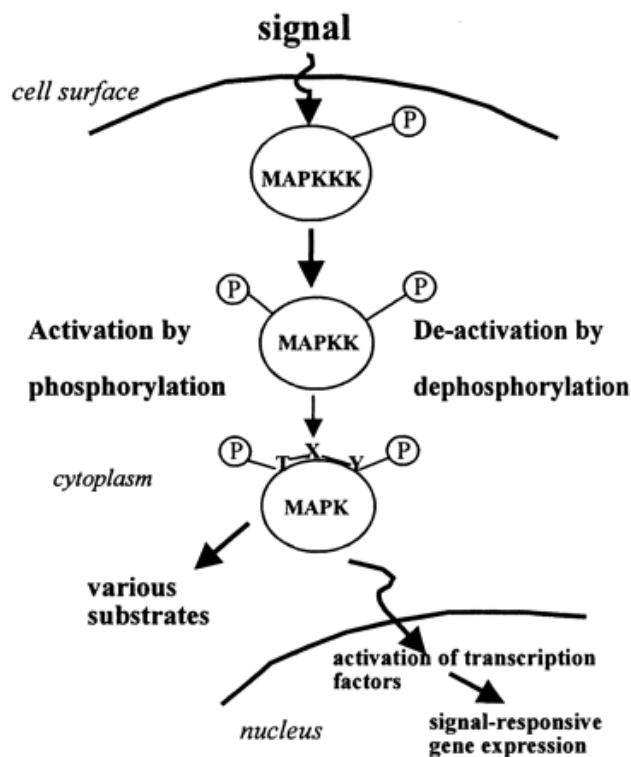


Figure 1 : Représentation schématique d’une cascade de signalisation par voies MAPK typique

Une MAPKKK est phosphorylée et activée suite à la réception d’un signal extracellulaire. Par la suite, cette MAPKKK active une MAPKK (MKK) en la phosphorylant à deux reprises sur ses résidus sérine et/ou thréonine situés à l’intérieur du motif S\T – X₃₋₅ – S/T (où X=3 chez les animaux et les levures et X=5 chez les végétaux). Une fois activée, la MAPKK active une MAPK en la phosphorylant également à deux reprises, mais cette fois, sur ses résidus thréonine et tyrosine du motif T – X – Y. Cette MAPK active peut alors phosphoryler de nombreux substrats, autant à l’intérieur qu’à l’extérieur du noyau. Figure tirée de (Neill, Desikan, Clarke, Hurst, & Hancock, 2002).

1.1.1. Exemples de cascades de signalisation impliquées dans les mécanismes de défense

Bien qu'elles ne puissent se déplacer ou attaquer, comme le font les animaux, les plantes ont adopté des mécanismes moléculaires de défenses tout aussi efficaces, dont plusieurs passent par des cascades de MAPKs. La plus étudiée est sans doute la voie de la flagelline 22 (flg22), une molécule provenant du flagelle de l'agent pathogène bactérien qui active la voie des *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), première ligne de défense chez les plantes, aussi appelée *PAMP-Triggered Immunity* (PTI). Chez *A. thaliana*, ce peptide de 22 acides aminés est reconnu par le récepteur FLS2 de la plante, un récepteur kinase de type *Leucine-Rich Repeat* (LRR) (Gómez-Gómez & Boller, 2000) qui, en synergie avec le récepteur BAK1, active plusieurs cascades de MAPKs, comme le montre la [figure 2](#) (Heese et al., 2007). L'une de ces voies, qui implique MEKK1, MKK1/2 ainsi que MPK4, est liée à la synthèse de phytoalexines, des molécules antimicrobiennes (Gao et al., 2008; Suarez-Rodriguez et al., 2007). L'autre voie, qui implique une MEKK non identifiée, MKK4/5 ainsi que MPK3/6, est liée à une panoplie de changements impliqués dans la réponse de défense (Asai et al., 2002), dont l'augmentation de la biosynthèse de l'éthylène, le renforcement de la paroi, la réponse d'hypersensibilité, la mort cellulaire programmée puis, éventuellement, la résistance induite (Jones & Dangl, 2006; Meng & Zhang, 2013).

La deuxième ligne de défense, nommée *Effector-Triggered Immunity* (ETI), est un type d'immunité plus spécifique et qui est basée sur la reconnaissance des molécules effectrices produites par l'agent pathogène. Diverses protéines de réponses (Protéines R) sont donc apparues au cours de l'évolution pour reconnaître les molécules effectrices de l'agent pathogènes, puis des cascades de signalisation sont finalement enclenchées (Jones & Dangl, 2006). Chez la tomate, l'effecteur Pto permet l'activation de deux cascades de signalisation, soit MEK2-SIPK/WIPK et MEK1-NTF6, toutes deux activées par la MAPKKK α (del Pozo, Pedley, & Martin, 2004). Chez *A. thaliana*, les voies complètes ne sont pas connues, mais les MPKs *MPK3* et *MPK6* sont impliquées dans l'ETI, puisqu'elles sont toutes deux activées suite à l'infection de *Pseudomonas syringae* présentant l'effecteur avrRPT2 (Tsuda, Sato, Stoddard, Glazebrook, & Katagiri, 2009).

Toutes ces voies, ainsi que de nombreuses autres à découvrir, permettent aux plantes d'utiliser tous les moyens possibles pour se défendre de manière efficace, que ce soit spécifique ou non. Tôt ou tard, elles impliquent la synthèse, l'accumulation ou l'induction de plusieurs hormones générant elles-mêmes plusieurs cascades de signalisation afin d'induire une réponse défensive, dont l'acide salicylique, l'éthylène ou l'acide jasmonique (Meng & Zhang, 2013).

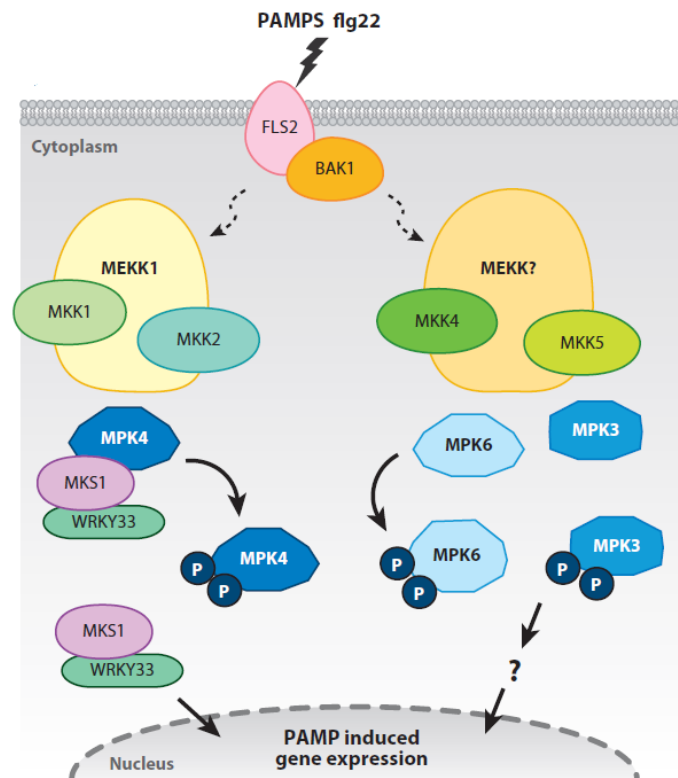


Figure 2 : Représentation graphique des deux voies de signalisation de la flg22

Le ligand, la flg22, se lie à son récepteur FLS2, qui, avec BAK1, active deux voies de signalisation. Une première voie implique MEKK1, MKK1/2 et MPK4, alors que la deuxième implique une MEKK encore inconnue, MKK4/5, puis MPK3/6. Ces deux voies permettent l'induction de gènes de défense. Image adaptée de (CristinaRodriguez, Petersen, & Mundy, 2010).

1.1.2. Exemples de cascades de signalisation impliquées dans la réponse aux stress abiotiques

Il existe différents types de stress abiotiques pouvant affecter la croissance et le cycle de vie des plantes. De plus, les conditions de stress abiotiques n'apparaissent rarement seules, que l'on parle de stress de température, de blessure, de manque d'eau, de présence de métaux lourds, de stress oxydatif ou salin. Par exemple, le manque d'eau, le stress salin et l'augmentation de la température surviennent régulièrement en même temps et déclenchent les mêmes effets physiologiques chez les plantes. Ce phénomène implique un niveau élevé et complexe de réception, de transmission et d'amplification des signaux : il n'y aura pas seulement l'effet d'une seule voie de signalisation linéaire, mais l'effet cumulé de plusieurs voies ou d'un réseau de signalisation (Moustafa, AbuQamar, Jarrar, Al-Rajab, & Trémouillaux-Guiller, 2014). Chez *A. thaliana*, certaines protéines kinases, comme *MEKK1*, *MKK1*, *MKK2*, *MPK3*, *MPK4* et *MPK6*, sont impliquées dans plusieurs de ces voies. La [figure 3](#) résume l'ensemble des cascades de signalisation impliquées dans les stress abiotiques. Voici un aperçu des différents croisements possibles entre les voies impliquées dans la réponse à certains stress abiotiques.

En plus de l'activation de MAPKs, un stress de basse température provoque une augmentation de la rigidité membranaire, la mobilisation de calcium (Ca^{2+}), l'activation de l'activité histidine kinase et la génération de composés bioactifs (acide phosphorique (PA), phosphatidylinositol). La perception du froid entraîne l'activation de deux voies de signalisation : une via *MEKK1*, *MKK2* et *MPK4/6*, puis l'autre via une *MEKK* encore inconnue, *MKK1* et *MPK4* (Moustafa et al., 2014). Curieusement, *MPK6* est aussi impliquée dans la réponse à la chaleur, puisqu'elle phosphoryle *HsfA2*, un facteur de transcription bien connu pour son implication dans la réponse à la chaleur (Evrard et al., 2013).

Plusieurs stress abiotiques, comme la blessure mécanique, la présence de métaux lourds, le stress oxydatif, le stress osmotique et le manque d'eau, impliquent la formation de dérivés réactifs d'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS), qui ont un rôle très important dans la signalisation cellulaire (Jalmi & Sinha, 2015; Moustafa et al., 2014). Tout comme la perception du froid, ces ROS, impliqués dans une toute une gamme de réponses, activent une voie de signalisation impliquant *MEKK1*, *MKK1/2* et *MPK4* (Pitzschke, Djamei, Bitton, & Hirt, 2009). La blessure engendre aussi une hausse de calcium, ce qui aura un effet sur *MPK8*, une hausse

d'acide phosphorique, ce qui, tout comme le froid, aura un effet sur MPK6, ainsi qu'une hausse d'acide jasmonique, ce qui active une autre voie impliquant MKK3 et MPK8 (F. Takahashi, Mizoguchi, Yoshida, Ichimura, & Shinozaki, 2011). Une autre hormone, l'acide abscissique entraîne la fermeture des stomates lorsqu'il y a un manque d'eau, afin d'éviter la perte d'eau par la transpiration. Deux MPKs, MPK9 et MPK12, sont reconnues pour leur implication dans l'ouverture de canaux ioniques des cellules de garde, provoquant leur plasmolyse et donc, la fermeture des stomates (Salam et al., 2013).

Ces deux exemples démontrent bien les croisements et la grande complexité de l'interaction entre les différentes voies, en fonction du stress perçu par la plante. Il est donc très difficile d'étudier avec précision le rôle d'une protéine lors d'un stress particulier ; il reste encore beaucoup de travail à faire.

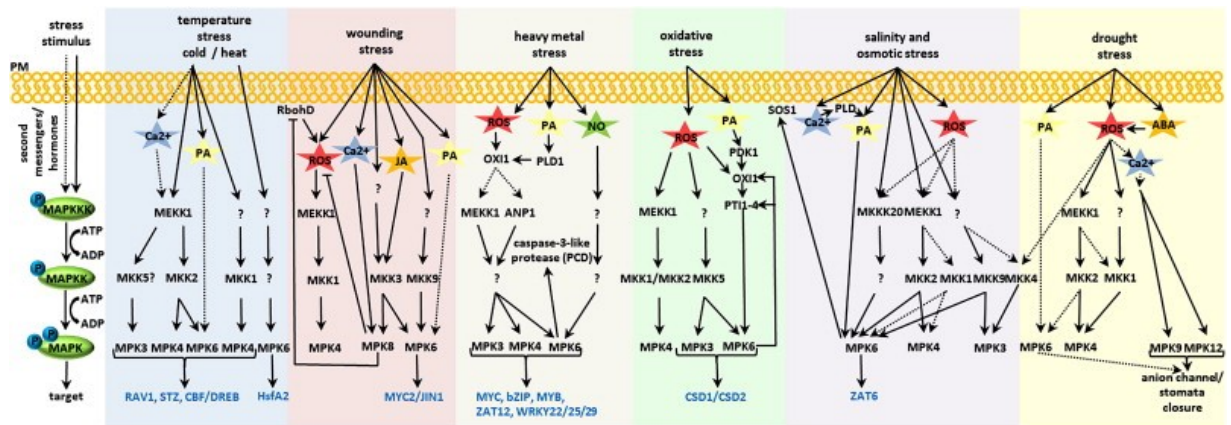


Figure 3 : Représentation schématique des différentes cascades de signalisation impliquées dans la réponse à certains stress abiotiques

Les stress liés à la température, à la blessure, à la présence de métaux lourds, les stress oxydatif et osmotique de même que le stress de sécheresse y sont représentés. Figure tirée de (Smékalová et al., 2014).

1.1.3. Exemples de cascades de signalisation impliquées dans le développement

Peu de voies impliquées dans le développement végétal sont entièrement connues, mais celle du développement des stomates représente une des voies les plus complètes jusqu'à présent. Les stomates forment des espaces généralement situés sur l'épiderme des feuilles (ou autres organes photosynthétiques) et permettent les échanges gazeux entre la plante et son environnement. Ils sont constitués de deux cellules de garde, qui, une fois gonflées d'eau, se courbent et permettent l'ouverture de l'ostiole. Inversement, lorsqu'elles deviennent plasmolysées, elles se collent et empêchent l'ouverture de l'ostiole. Puisque pour accomplir leur tâche, les cellules de garde ont besoin d'espace, deux stomates doivent obligatoirement être séparés par au moins une cellule épidermale, non stomatique. Le patron de développement des cellules constituant l'épiderme des organes photosynthétiques doit donc être rigoureusement régulé. La [figure 4](#) montre la cascade de signalisation impliquée dans ce processus. Chez *A. thaliana*, deux peptides, EPF1 et EPF2, sont sécrétés par les cellules de garde ainsi que les précurseurs des cellules de gardes, les *Meristemoid Mother Cells* (MMC) et *TOO MANY MOUTHS* (TMM), un récepteur sans domaine kinase situé à la membrane des cellules de l'épiderme qui ne sont pas encore différenciées. Le récepteur TMM forme alors un complexe avec *ERECTA* (ER) et *ERECTA-like 1 et 2* (ERL1 et ERL2), d'autres récepteurs pourvus d'un domaine kinase. Le signal est ainsi transmis à la cascade de MAPK formée par *YODA* (MAPKKK4), *MKK4/5* ainsi que *MPK3/6*. Ces dernières vont directement phosphoryler et inhiber *SPEECHLESS* (SPCH), un facteur de transcription qui promeut la formation d'une lignée cellulaire stomatale (sujet révisé en détail par (Pillitteri & Torii, 2012)). Ainsi, un peptide sécrété par un stomate en devenir est capté par les cellules voisines, communiquant à ces mêmes cellules l'obligation de ne pas se développer en cellules de garde.

Un autre exemple est la voie menant à l'abscission, un phénomène naturel du développement végétal qui consiste en la séparation programmée d'un organe devenu inutile. Chez *A. thaliana*, l'abscission de l'organe floral est aussi régulée par une cascade de signalisation via les MAPKs. En effet, *HAESA* (HAE) et *HAESA-like 2* (HSL2) sont des récepteurs kinases de type RLK qui sont exprimés au niveau de la zone d'abscission des organes (Butenko et al., 2003; Stenvik et al., 2008). Suite à leur liaison avec le ligand *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* (IDA), une cascade de signalisation

impliquant MKK4/5 ainsi que MPK3/6 est activée et promeut l'abscission de la fleur (Cho et al., 2008). Bien que la plupart des acteurs de cette cascade aient été révélés grâce au criblage génétique et que peu d'analyses biochimiques ont été effectuées jusqu'à présent, la concordance entre les phénotypes des mutants semble suffisante pour parler d'une véritable cascade de signalisation. Pour le moment, aucune MEKK n'a été considérée pour jouer un rôle dans cette cascade, de même qu'aucun facteur n'a été retrouvé en aval de la cascade.

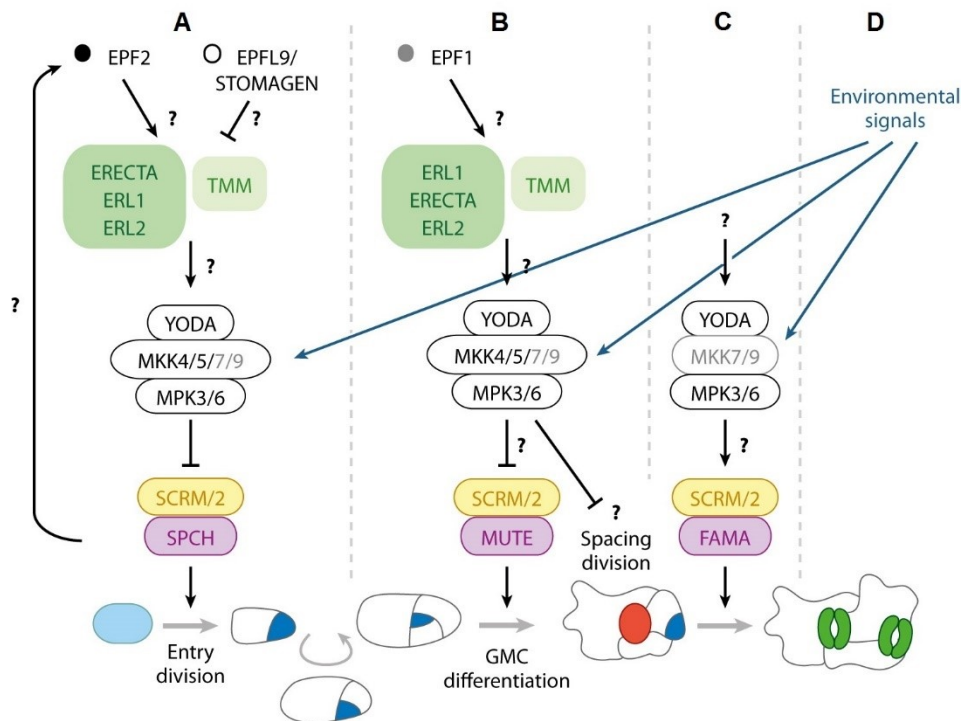


Figure 4 : Voies de signalisation du patron de formation des stomates

Les ligands diffèrent en fonction du stade de développement (A, B et C) et probablement des conditions environnementales (D). Les ligands EPF1 et EPF2 régulent négativement l'entrée en division de la MMC et la différenciation de la GMC en cellule méristémoïde. Une fois les ligands liés aux récepteurs (ERECTA, ERL1, ERL2 et TMM), une cascade de voie MAPK est activée menant à la répression des TFs SCRM et SCPH, qui promeuvent la division et la différenciation des cellules en précurseurs des cellules de garde. D'autres ligands peptidiques effectuent un rôle contraire à EPF1 et EPF2, comme STOMAGEN, qui lie les mêmes récepteurs pour les inhiber. Code des couleurs : bleu pâle : MMC ; bleu foncé : GMC ; rouge : cellule méristémoïde ; vert : cellules de garde. Figure adaptée de (Pillitteri & Torii, 2012).

Une troisième voie bien caractérisée est la cascade menant à la formation du phragmoplaste. À la fin de la mitose, les cellules végétales se séparent en formant d'abord un phragmoplaste : des vésicules de Golgi contenant plusieurs molécules, dont des composés pectiques, migrent sur le plan équatorial de la cellule grâce aux microtubules et fusionnent, permettant ainsi de créer la future paroi cellulaire. L'une des cascades de signalisation les plus connues en biologie végétale est directement impliquée dans la formation et l'expansion du phragmoplaste. Elle a d'abord été découverte chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), mais elle est aussi présente chez *A. thaliana*. Dans cette voie, comme le montre la [figure 5](#), ce sont les kinésines (Kinesine-like proteins, KLP) nommées AtNACK1 (HIK)/AtNACK2 (TES) (NtNACK1) qui agissent comme des senseurs (récepteurs) et activent une cascade de MAPK composée des MAPKKKs AtANP1/AtANP2/AtANP3 (NtNPK1), de AtMKK6 (NtNQK) et de AtMPK4 (NtNRK1/NtNTF6) (Ryuichi Nishihama et al., 2001; R. Nishihama et al., 2002; Soyano, Nishihama, Morikiyo, Ishikawa, & Machida, 2003; Y. Takahashi, Soyano, Kosetsu, Sasabe, & Machida, 2010). La MPK phosphoryle directement MAP65, une protéine associée aux microtubules (*Microtubule-Associated Protein*, MAP). Chez le tabac, la phosphorylation de NtMAP65 par NtNRK1 diminue son action sur les microtubules, leur permettant ainsi d'accomplir l'expansion du phragmoplaste (Sasabe et al., 2006).

D'autres MAPKs sont également impliquées dans plusieurs aspects du développement de la plante, comme MEKK1 au niveau de la formation de la racine latérale (Forde, Cutler, Zaman, & Krysan, 2013) ou comme AtMKK7, impliquée dans le transport polaire de l'auxine (Dai et al., 2006). Dans la majorité des cas, leur découverte a été faite grâce aux nombreux criblages génétiques, mais leurs partenaires d'interaction, en amont ou en aval de leurs voies respectives, sont difficiles à déterminer, probablement dû à la forte redondance entre les différentes MAPKs ou à la difficulté d'observer les phénotypes obtenus, qui peuvent parfois être subtils.

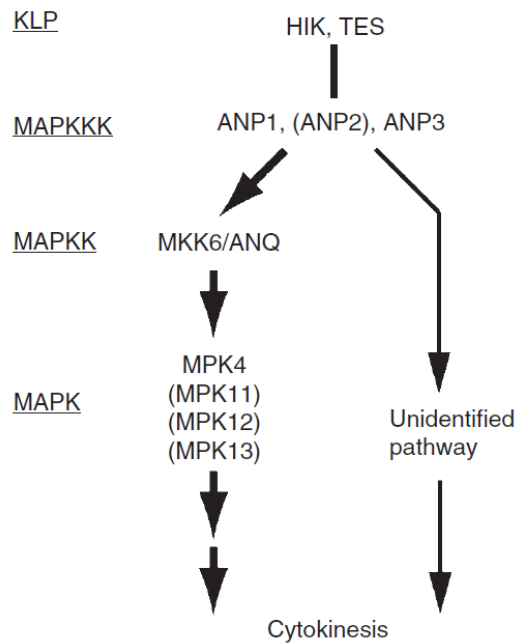


Figure 5 : Voie de signalisation menant à la cytokinèse chez *A. thaliana*

Les protéines de type kinésine (KLP) KIK et TES lient et activent les MAPKKKs ANP1, ANP2 et ANP3. Ces trois MAPKKK activent à MKK6, qui active à son tour MPK4 (MPK11, MPK12 et MPK13 sont possiblement aussi activées, puisqu'elles font partie du même groupe phylogénétique MPK4, mais leur activité et leurs interactions ont été moins étudiées). L'activation de MPK4 mène à la phosphorylation de plusieurs autres protéines, dont des protéines associées aux microtubules permettant la mise en place du cytosquelette pour effectuer la cytokinèse. Figure tirée de (Y. Takahashi et al., 2010).

1.2. Développement du gamétophyte femelle

Les ovules sont retrouvés à l'intérieur de l'ovaire et sont composés d'un ou deux téguments pour la plupart des espèces et d'un sac embryonnaire comme illustré à la [figure 6](#). Le sac embryonnaire est composé à maturité de plusieurs cellules haploïdes et d'une cellule diploïde ; c'est le gamétophyte femelle (É. Chevalier, Loubert-Hudon, Zimmerman, & Matton, 2011). Son développement, montré à la [figure 7](#) commence à l'intérieur du nucelle par la différenciation d'une cellule qui devient alors la cellule mère ou mégasporocyte (Megaspore Mother Cell, MMC). Cette dernière entre en méiose et produit alors quatre cellules haploïdes, c'est la mégasporogénèse. Pour la plupart des espèces (les espèces de type *Polygonum*, représentant environ 70% des Angiospermes), seulement une des quatre cellules va survivre et se différencier alors que les trois autres dégènèrent, c'est le stade FG1 ou le stade de la mégaspore fonctionnelle (FG). Par la suite, à partir de cette mégaspore, trois mitoses successives auront lieu sans toutefois compléter la cellularisation afin d'obtenir deux, puis quatre, et finalement, huit noyaux : c'est la mégagamétogénèse. Dès la première mitose, une polarité s'établit à l'intérieur du sac embryonnaire ; l'un des deux noyaux migre vers le pôle chalazal et l'autre se déplace vers le côté micropylaire. Au terme de ces mitoses, quatre noyaux sont formés de chaque côté, puis un noyau de chaque côté migre vers le centre du sac embryonnaire. À ce moment, la cellularisation des différentes cellules a lieu, donnant ainsi naissance à trois cellules antipodales, positionnées au pôle chalazal, ainsi qu'à deux cellules synergides et une cellule œuf du côté micropylaire. Les deux noyaux ayant migré vers le centre fusionnent et donnent naissance à la cellule centrale, une cellule diploïde, la seule au niveau du sac embryonnaire (É. Chevalier et al., 2011; Drews & Koltunow, 2011; Yadegari & Drews, 2004).

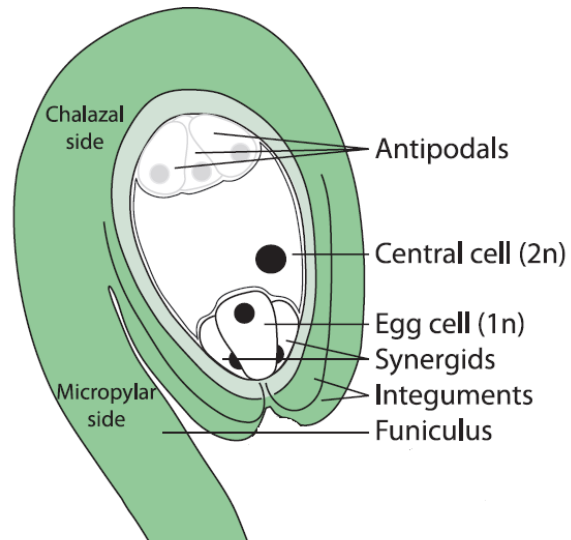


Figure 6 : Le gamétophyte femelle

À maturité, le sac embryonnaire est composé de trois cellules antipodales (dégénéréscentes), deux cellules synergides, une cellule œuf et une cellule centrale (2n). Le tout est entouré d'un ou deux téguments. Figure adaptée de (É. Chevalier et al., 2011).

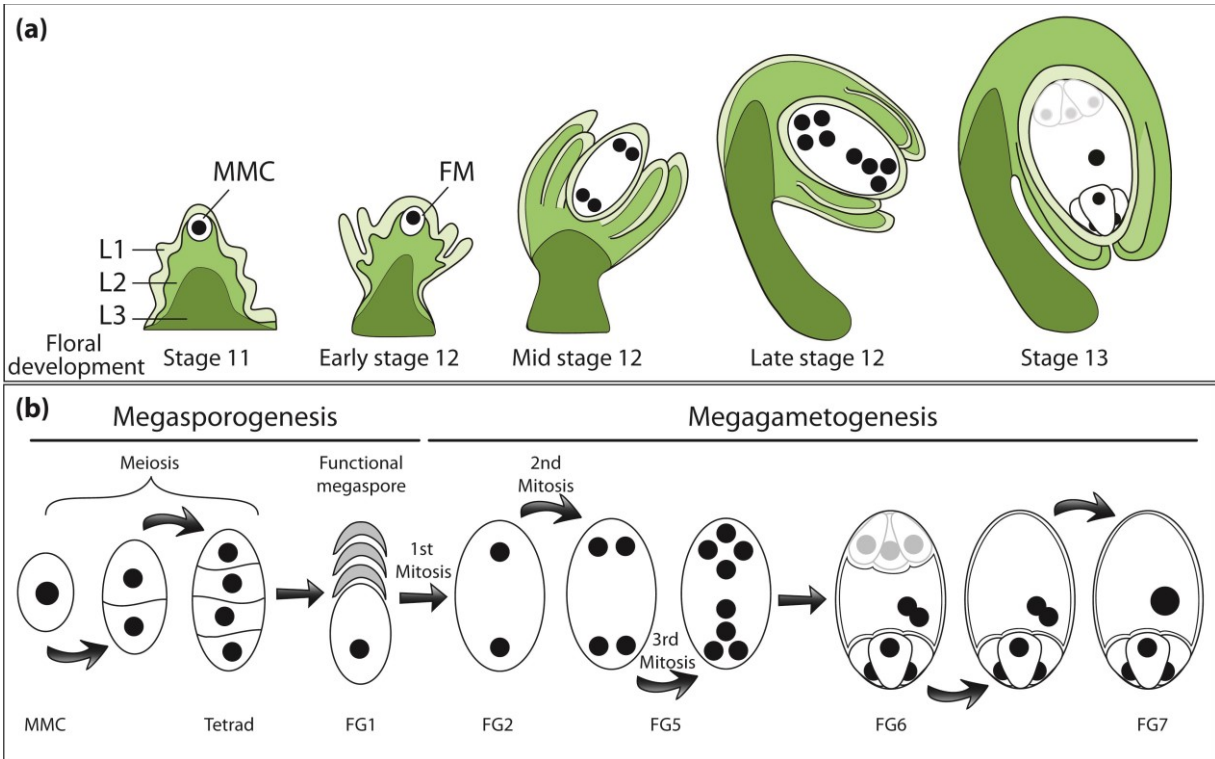


Figure 7 : Développement du gamétophyte femelle chez *A. thaliana*

Haut : développement de l'ovule en général, incluant le sac embryonnaire et les deux téguments qui l'entourent à travers les différents stades développementaux. Bas : étapes de développement du gamétophyte femelle. Le développement commence avec la mégasporogénèse, lorsque la MMC entre en méiose pour obtenir la mégaspore fonctionnelle. Ensuite, c'est la mégagamétogénèse qui s'enclenche lorsque la mégaspore fonctionnelle subit trois mitoses successives pour arriver, au stade FG5, à un total de huit noyaux haploïdes. Il y a alors cellularisation : les trois noyaux au pôle chalazal deviennent les cellules antipodales, alors qu'au pôle micropylaire, deux synergides et une cellule œuf se forment. Les deux noyaux centraux, dits polaires fusionnent pour former la cellule centrale, qui est donc diploïde. Figure adaptée de (É. Chevalier et al., 2011).

La formation du gamétophyte femelle est très complexe, notamment à cause de ses multiples cellules au rôle unique, comme la cellule œuf, les synergides ou la cellule centrale. De plus, sa petite taille rend les manipulations expérimentales difficiles à accomplir, il est donc particulièrement ardu d'étudier les origines moléculaires de son développement. C'est surtout grâce à la caractérisation de différents mutants, souvent chez *A. thaliana*, qu'il a été possible d'identifier plusieurs gènes impliqués dans chacune des différentes étapes du développement du sac embryonnaire. Le gène *SPOROCTELESS (SPL)* est impliqué dans l'initiation de la mégasporogénèse et dans l'établissement de la MMC. *SPL* code pour un répresseur transcriptionnel à motif EAR qui réprime l'expression de plusieurs gènes importants du développement de l'ovule (*BEL1*, *AINTEGUMENTA*, *INO*, *YUCCA2*) (G.-H. Chen, Sun, Liu, Liu, & Yang, 2014; B. Wei et al., 2015). Plusieurs gènes sont impliqués au niveau de la méiose, comme les facteurs de transcription (FTs) de type MYB *FOUR LIPS (FLP)* et *MYB88*, dont les mutants, suite à la méiose, contiennent plus d'une mégaspore fonctionnelle. Ces deux FTs régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Makkena, Lee, Sack, & Lamb, 2012). Un phénotype semblable est aussi observé chez les mutants de la *Ribosomal Protein L27a (RPL27a)*, rendant les plantes stériles au niveau du gamétophyte femelle (Zsögön, Szakonyi, Shi, & Byrne, 2014). Plusieurs autres gènes sont aussi impliqués dans la recombinaison de l'ADN et l'intégrité des chromosomes lors de la méiose, tels que *ASH1 Homolog 2 (ASHH2)*, une histone H3 méthyltransférase (Grini et al., 2009) ou *MMS21*, une E3 ligase de type SUMO (M. Liu et al., 2014).

De nombreux gènes sont aussi impliqués au niveau des mitoses suivant l'établissement de la mégaspore fonctionnelle. Par exemple, le FT de type MADS-box *AGL23*, dont le développement de l'ovule mutant s'arrête au stade de la FG (Colombo et al., 2008), ou *GEX1*, un gène codant pour une protéine de la membrane plasmique (Alandete-Saez, Ron, Leiboff, & McCormick, 2011). Le gène codant pour la nucléoporine *Nup88-homolog MOS7* est aussi impliqué dans les mitoses suivant le stade de la FG. Au niveau du pollen, la protéine est généralement co-localisée avec les microtubules durant la mitose et cette co-localisation n'est pas retrouvée chez les mutants (G. T. Park et al., 2014). Toujours chez *A. thaliana*, le seul représentant de la famille des kinésines de type 1 (*kinesin-1 family*), *AtKIN-1*, est aussi impliqué dans la mitose de la FG. En effet, les mutants forment moins de graines et ceci est causé par la

dégénérescence de la FG suivant un arrêt du développement du sac embryonnaire au stade FG1, soit tout juste avant les mitoses (Haiqing Wang et al., 2014). Les kinésines de type 1 sont des protéines moteur dépendant des microtubules actives dans le transport des organelles, vésicules, chromosomes et ARN sur de longues distances (Vale, 2003; Haiqing Wang et al., 2014). Chez *Solanum chacoense*, un proche parent de *S. tuberosum*, la pomme de terre, deux MAPKKKs, *ScFRK1* et *ScFRK2*, ont aussi un rôle au niveau des mitoses de la FG. Comme pour les mutants précédents, chez les mutants dont l'expression de *ScFRK1* ou *ScFRK2* est perturbée, le développement du sac embryonnaire est arrêté au stade de la FG, puis dégénère (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015).

Une fois les mitoses accomplies, d'autres gènes permettent la maturation du sac embryonnaire, soit le bon positionnement des noyaux, la cellularisation et la fusion des deux noyaux polaires pour former la cellule centrale. Une protéine de type Histidine kinase (AHK), CYTOKININ-INDEPENDANT 1 (CKI1), active les voies de signalisation à double composante liées à la cytokinine, sans lier la cytokinine, et sa mutation affecte le développement du sac embryonnaire suite aux trois mitoses. En effet, chez ces mutants, la morphologie du sac embryonnaire est anormale : les noyaux ne sont pas positionnés correctement, montrent des défauts de cellularisation et parfois, des noyaux supplémentaires sont visibles (Deng et al., 2010; Pekárová et al., 2011). Les mutants sous-exprimant les FTs *MYB64* et *MYB119* ont aussi un problème au niveau de la cellularisation suite aux mitoses, laissant alors le sac embryonnaire propice à une expansion suite à des divisions nucléaires additionnelles (de 10 à 18 noyaux supplémentaires). Les cellules du sac embryonnaire n'expriment donc pas correctement les marqueurs qui leur sont spécifiques, prouvant ainsi que la différenciation cellulaire est affectée. De plus, *MYB119* et *CKI* sont génétiquement liés, puisque l'expression de *MYB119* est fortement réduite dans les mutants *cki* et ceci, en addition avec les phénotypes semblables obtenus chez les mutants respectifs, permet de conclure que *CKI* agit en amont de *MYB119*, dans une voie permettant de réguler la maturation du sac embryonnaire (Rabiger & Drews, 2013).

Les mitochondries semblent jouer un rôle important dans la signalisation contrôlant la spécialisation cellulaire et la mort cellulaire au niveau du sac embryonnaire. En effet, il existe de nombreux mutants de gènes codant pour des protéines mitochondriales ayant un phénotype

au niveau du développement du gamétophyte femelle. Normalement, il y a beaucoup de mitochondries dans la zone centrale du sac embryonnaire au cours de son développement, puis dans la cellule centrale alors qu'il y en a très peu dans la zone de l'appareil ovulaire (*egg apparatus*, zone formée par la cellule œuf et les synergides). Le contraire est observé dans le mutant *oiwa*, mutant du gène *MSD1*, codant pour une Mn-superoxyde dismutase, dont les cellules du sac embryonnaire n'acquièrent pas leur identité respective, puisqu'une proportion des synergides et des cellules œufs acquièrent plutôt l'identité de la cellule centrale (Martin et al., 2014; Martin, Fiol, Sundaresan, Zabaleta, & Pagnussat, 2013). Les dismutases ont un rôle de détoxification dans les cellules ; elles désactivent les ROS. D'ailleurs, les quantités de ROS à l'intérieur du sac embryonnaire fluctuent tout au long de son développement, ils régulent les gradients de calcium, ce qui a un impact au niveau de la régulation de certaines enzymes telles que les MAPKs et les MAPs, ces dernières étant impliquées au niveau de l'organisation des microtubules et de la mitose (Livanos, Apostolakis, & Galatis, 2012; Martín, Distefano, Zabaleta, & Pagnussat, 2013). Les mitochondries ont aussi un rôle au niveau de la fusion des deux noyaux polaires afin de former la cellule centrale ainsi que la fusion des cellules durant la fécondation, puisque plusieurs mutants de gènes codant pour des protéines mitochondriales présentent des problèmes à ces niveaux, tels que *nfd1-6* (*Nuclear Fusion Defective*) (Portereiko et al., 2006), *gaf2* (*Gametophytic Factor 2*) (Christensen et al., 2002), *sdh1-1* (*Succinate Dehydrogenase*) (León, Holuigue, & Jordana, 2007) et *fiona/syco* (*Mitochondrial Cysteinyl t-RNA Synthase*) (Kägi, Baumann, Nielsen, Stierhof, & Groß-Hardt, 2010).

Bien que la génétique ait mis en lumière de nombreux intervenants du développement du gamétophyte femelle, il est impossible de tous les lier afin de former une seule et belle histoire, puisqu'il manque encore beaucoup trop d'information. Malgré sa très grande utilité, la génétique a ses limites, par exemple la redondance fonctionnelle de différents gènes, comme les MAPKs et les gènes de type MADS-box (Bemer, Heijmans, Airoidi, Davies, & Angenent, 2010). De plus, la petitesse du sac embryonnaire ainsi que les particularités physiques et fonctionnelles de chacune de ses cellules font en sorte qu'il reste encore bien du chemin à parcourir afin d'obtenir une meilleure idée de ses origines moléculaires.

1.3. Développement du gamétophyte mâle

Le pollen, le gamétophyte mâle, est situé à l'intérieur des anthères et possède une structure plus simple que celle du sac embryonnaire. En effet, à maturité, il ne possède que deux ou trois cellules haploïdes selon les espèces. Son développement, comme le montre la [figure 8](#), commence par une cellule-mère du pollen (*Meiocyte, Pollen Mother Cell, PMC*), diploïde, produisant quatre cellules haploïdes suite à la méiose. Les quatre cellules demeurent attachées les unes aux autres et forment une structure appelée tétrade de microspores. Une paroi de callose se forme, il y a formation d'intine et d'exine à la paroi des microspores, puis les tétrades se séparent de façon synchrone. Les petites microspores ainsi libérées grossissent rapidement, l'apparition d'une très grosse vacuole polarise la cellule en poussant le noyau vers la membrane plasmique. Une division mitotique asymétrique (*Pollen Mitosis I, PMI*) a alors lieu, donnant ainsi naissance à deux cellules différentes : la cellule végétative, très grosse, et la cellule générative, plus petite, poussée vers la paroi du pollen. C'est la cellule végétative qui produira, suite à la pollinisation, un long tube, le tube pollinique, qui traversera tout le style pour aller féconder les ovules à l'intérieur de l'ovaire (Boavida, Becker, & Feijo, 2005; Hafidh, Fíla, & Honys, 2016). Chez certaines espèces, comme *A. thaliana*, une deuxième division mitotique (*Pollen Mitosis II, PMII*), symétrique cette fois, a lieu à l'intérieur même du grain de pollen, produisant ainsi deux petites cellules spermatiques identiques, mais chez la plupart des espèces, comme *S. chacoense*, la PMII a lieu alors que le tube pollinique s'allonge à travers le style (Hafidh et al., 2016). Les deux cellules spermatiques iront alors féconder, à l'intérieur du sac embryonnaire, la cellule œuf, d'une part, puis la cellule centrale (Hafidh et al., 2016). Le développement du pollen se fait en collaboration avec le *tapetum* ou tapis de l'anthère, une couche de cellules diploïdes à l'intérieur de l'anthère et qui est considéré comme un tissu nourricier au grain de pollen. En effet, les cellules du *tapetum* demeurent métaboliquement très actives lors du développement du pollen et sécrètent de nombreuses molécules (lipides, protéines, produits du métabolisme secondaire) afin d'aider à la synthèse de la paroi d'exine et de sporopollénine des microspores (Hafidh et al., 2016; Shi, Cui, Yang, Kim, & Zhang, 2015).

La structure très réduite du pollen a grandement facilité la découverte de nombreux gènes impliqués dans son développement. Outre de nombreux gènes impliqués dans la recombinaison lors de la méiose, d'autres gènes sont impliqués dans le cycle cellulaire et les transitions entre

les différentes phases de la méiose. Par exemple, la progression méiotique de la PMC est orchestrée par une activité cycline-CDK encore inconnue, mais qui est modulée par les interactions de trois gènes impliqués dans le cycle cellulaire, soit *SMG7* (*Suppressor with Morphogenic effects on Genitalia 7*), *TDMI* (*Three Division Mutant 1*) et *TAM* (*Tardy Asynchronous Meiosis*) (Bulankova, Riehs-Kearnan, Nowack, Schnittger, & Riha, 2010). La microspore résultante doit alors grossir et se transformer avant la PMI. Ce processus est aussi régulé, par exemple par les gènes *PIRL1* et *PIRL9* (*Plant Intracellular Ras-group-Related Leucine-rich repeat*), codant pour des protéines riches en acide aminé leucine. En effet, chez le double mutant *pir11;pir19*, les microspores cessent de croître et finissent par dégénérer juste avant la PMI suite à un problème avec la formation de leur vacuole (Forsthoefel, Dao, & Vernon, 2010).

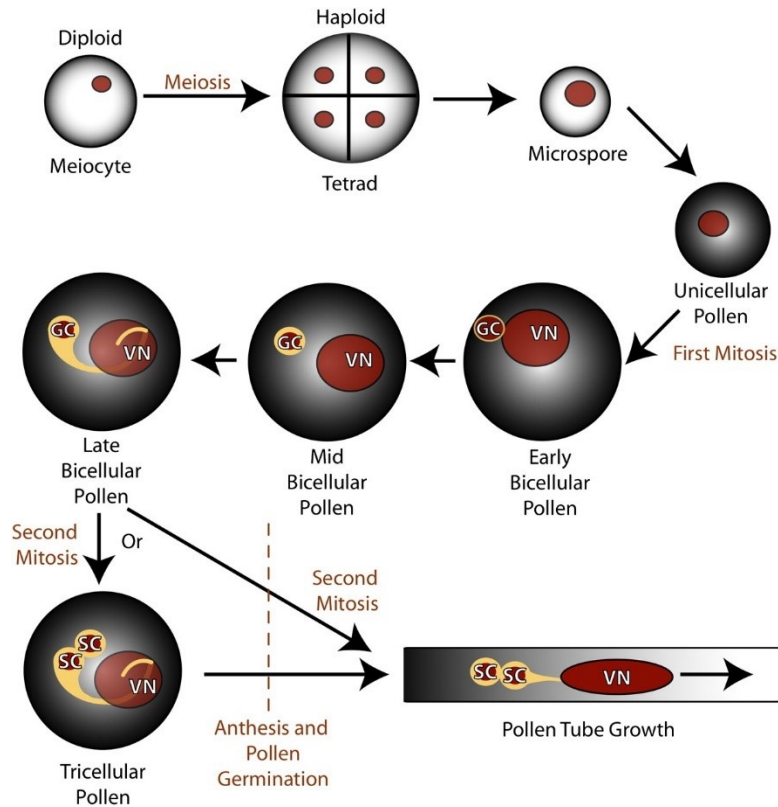


Figure 8 : Développement du gamétophyte mâle

Le développement commence lorsque la cellule mère du pollen produit par méiose quatre microspores haploïdes, appelée tétrade de microspores. Les microspores se séparent, puis la première mitose (PMI), asymétrique, s'effectue, produisant deux cellules : la grande cellule végétative (VN) et la petite cellule germinative (GC). Chez certaines espèces, la cellule germinative se divise de façon symétrique pour former deux cellules spermatisques (SC) identiques. Chez d'autres espèces, cette division se produit à l'intérieur du tube pollinique, suite à la pollinisation. Il existe des connexions entre les deux cellules spermatisques et la cellule végétative, permettant aux trois cellules de communiquer entre-elles. Figure tirée de (McCue, Cresti, Feijó, & Slotkin, 2011).

Plusieurs gènes sont impliqués dans la PMI et particulièrement dans l'étape de cytokinèse, notamment au niveau de l'organisation des microtubules. En effet, *GEMI* (*GEMINI POLLEN 1*) code pour une protéine associée aux microtubules (*Microtubule-Associated Protein*, MAP) impliquée dans la cytokinèse de la PMI. La division asymétrique est altérée chez les mutants *gem1* de même que les mutants *gem2* (S.K. Park, Howden, & Twell, 1998; Soon Ki Park, Rahman, Oh, & Twell, 2004). L'orientation de la division asymétrique est également importante pour l'établissement des différents destins cellulaires des cellules du pollen, comme le démontre le mutant *scp* (*sidecar pollen*). Chez ce mutant, dont l'orientation de la PMI est altérée, l'asymétrie de la division est perdue, puis un grain de pollen à quatre cellules se développe et une deuxième cellule végétative est observée (S. A. Oh, Park, Twell, & Park, 2010; S. A. Oh, Twell, & Park, 2011). De plus, des mutants de gènes codant pour la γ -tubuline (TUBG1 et TUBG2) ont aussi des problèmes au niveau de la mitose : ils sont requis pour l'organisation du fuseau mitotique et du phragmoplaste, soulignant ainsi l'importance du dynamisme des microtubules dans la division asymétrique des microspores (Pastuglia et al., 2006). Le mutant *tio* (*two-in-one*), dont le gène muté code pour une protéine de la famille des kinases de type sérine/thréonine (*FUSED Ser/Thr protein kinase family*), a aussi des problèmes au niveau de la cytokinèse. En effet, la plaque cellulaire est petite et demeure incomplète, le mutant se retrouve alors avec un pollen binucléé (S. A. Oh et al., 2005). La protéine TIO est d'ailleurs localisée au phragmoplaste naissant du pollen en devenir et elle interagit avec PARKP1/Kinesin-12A, une protéine de type kinésine bien connue pour son rôle associé aux microtubules lors de la division mitotique (S. A. Oh et al., 2012). De plus, en double-hybride chez la levure, TIO interagit aussi avec AtNACK1/TETRASPORE (TES), une autre protéine de type kinésine (S. Oh, Bourdon, Dickinson, Twell, & Park, 2014). TES et HINKEL (HIK) sont deux protéines de type kinésine redondantes importantes pour l'expansion du phragmoplaste lors de la PMI; si ces deux gènes sont mutés, la cytokinèse de la PMI est incomplète, soit le même phénotype que chez le mutant *tio* (S.-A. Oh, Bourdon, Das 'Pal, Dickinson, & Twell, 2008). TES (AtNACK2) et HIK (AtNACK1) sont les orthologues de NtNACK1, une kinésine bien connue dans la voie de la cytokinèse chez le tabac dont il a été question un peu plus tôt (voir section 1.1.3 Exemples de cascades de signalisation impliquées dans le développement). Avec tous ces indices, il est donc possible d'émettre l'hypothèse d'une voie de signalisation permettant la mise en place du phragmoplaste afin de compléter la

cytocinèse de la PMI avec la protéine de type Ser/Thr TIO, qui, seule ou liée avec PARKP1/Kinesine-12A, lierait et activerait TES, menant ainsi à la cascade de voie MAPK permettant la cytocinèse (ANP1-3 → MKK6 → MPK4 → MAP56 et autres MAPs). La [figure 9](#) résume les différences entre les phénotypes des mutants impliqués dans la PMI.

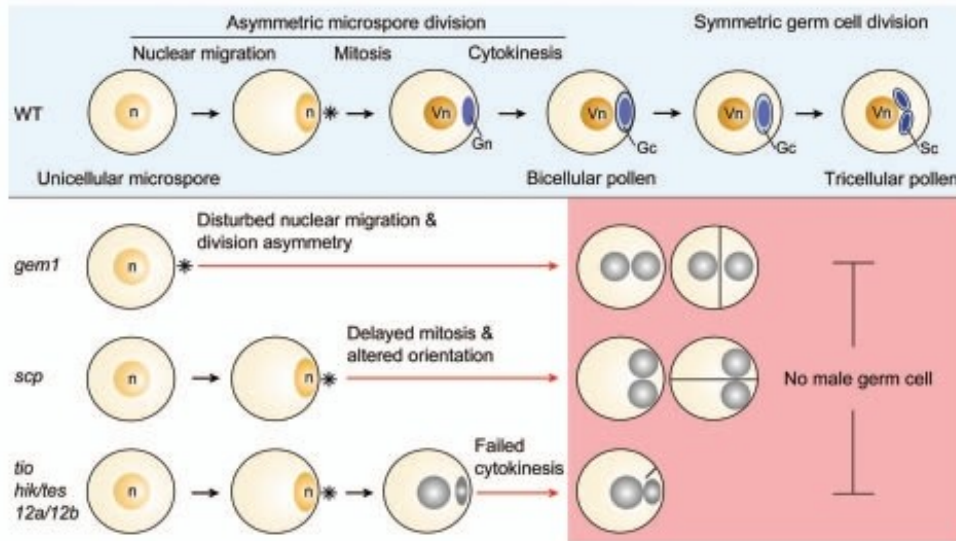


Figure 9 : Les différents phénotypes observés chez les mutants dont la PMI est affectée

Le développement normal du pollen est illustré dans la partie du haut (en bleu pâle). Chez le mutant *gem1*, la division est complétée, mais l'asymétrie n'est pas respectée, alors que chez le mutant *scp*, non seulement l'asymétrie n'est pas respectée, mais l'orientation de la division est incorrecte. Chez les mutants *tio*, *hik/tes* et *kinesin12a/b*, c'est la division elle-même qui n'est pas complétée. L'asymétrie et l'orientation de la division sont respectées, mais la cytocinèse est incomplète. Figure tirée de (S. A. Oh et al., 2011).

La PMII est bien différente de la PMI puisqu'elle implique une division symétrique de la cellule générative pour former deux cellules spermatiques identiques. Des gènes sont aussi impliqués dans cette division, notamment *CDKA*, codant pour une protéine kinase cycline-dépendante de type A, impliquée dans le cycle cellulaire. D'ailleurs, chez *A. thaliana*, un retard dans le cycle cellulaire est observé chez les mutants *cdka* : l'entrée en mitose de la cellule germinative est retardée jusqu'au moment où le pollen germe (Iwakawa, Shinmyo, & Sekine, 2006). Le mutant *fb17* possède le même phénotype que *cdka*, *FBL17* code pour une protéine

de type F-box ciblant des inhibiteurs de CDKs (KRP6 et 7) vers le protéasome. *FBL17* n'est exprimé que dans la cellule germinative, inhibant KRP6 et 7, ce qui permet à CDKA de permettre l'entrée de la cellule en mitose (H. J. Kim et al., 2008). Pendant ce temps, dans la cellule végétative, RBR (*RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN*) ainsi que KRP6 et 7 bloquent le cycle cellulaire et empêchent la cellule d'entrer en mitose (Twell, 2011). Le FT de type R2R3 MYB nommé DUO1 joue aussi un rôle dans l'entrée mitose de la cellule germinative. Chez le mutant *duo1*, une diminution de l'expression des gènes spécifiques à la lignée germinale est notée, et l'échec de la PMII résulte en partie de la baisse d'expression de *CYCLYNB1;1*, un régulateur de la phase G2/M du cycle cellulaire (Borg et al., 2011; Brownfield, Hafidh, Borg, et al., 2009; Rotman et al., 2005). DUO3, qui régule aussi l'expression de certains gènes régulés par DUO1, est aussi requis pour la transition G2/M de la PMII (Brownfield, Hafidh, Durbarry, et al., 2009). Selon une hypothèse, DUO1 et DUO3 coopéreraient ensemble dans un complexe de transcription des gènes cibles communs pour réguler la transition G2/M de la PMII (Brownfield & Twell, 2009).

Comme pour le gamétophyte femelle, chaque étape du développement du gamétophyte mâle est hautement régulée afin d'obtenir un pollen avec trois cellules bien spécialisées. Il reste aussi de nombreux autres gènes à découvrir pour leur rôle dans le développement du pollen, mais sa simplicité et sa facilité d'accès rendent les recherches beaucoup plus aisées que celles à propos du sac embryonnaire.

1.4. Pollinisation et fécondation : des exemples de communication intercellulaire

L'arrivée d'un grain de pollen sur un stigmate produit un grand nombre d'évènements menant éventuellement à la double fécondation, soit l'union d'une cellule spermatique à la cellule œuf et celle de l'autre cellule spermatique avec la cellule centrale. Afin de parvenir aux ovules, le pollen doit pénétrer à travers le style et pour se faire, il produit un tube pollinique qui part du stigmate et s'allonge vers les ovules. Il existe différents types de stigmates selon les espèces, soit sec comme celui de la famille des Brassicacées (*A. thaliana*) ou humide comme celui de la famille des Solanacées (*S. chacoense*), et les évènements permettant la formation du tube pollinique diffèrent un peu selon le type de stigmate. En règle générale, pour les espèces à stigmate sec, le pollen passe par six étapes avant d'arriver aux ovules, comme le montre la [figure 10](#). Il doit d'abord être capturé par les papilles du stigmate, il y a ensuite adhérence à ce dernier

puis il s'hydrate. Il germe alors, pénètre le stigmate grâce à la formation du tube pollinique et celui-ci s'allonge à travers le tissu transmissif pour aller retrouver les ovules (Hiscock & Allen, 2008). Afin de parvenir aux ovules adéquatement, deux types de guidages sont nécessaires : d'abord, le guidage sporophytique, dont les signaux sont transmis au tube via les tissus sporophytiques femelles, comme le style, puis ensuite, le guidage gamétophytique, dont les signaux sont envoyés au tube depuis l'appareil ovulaire.

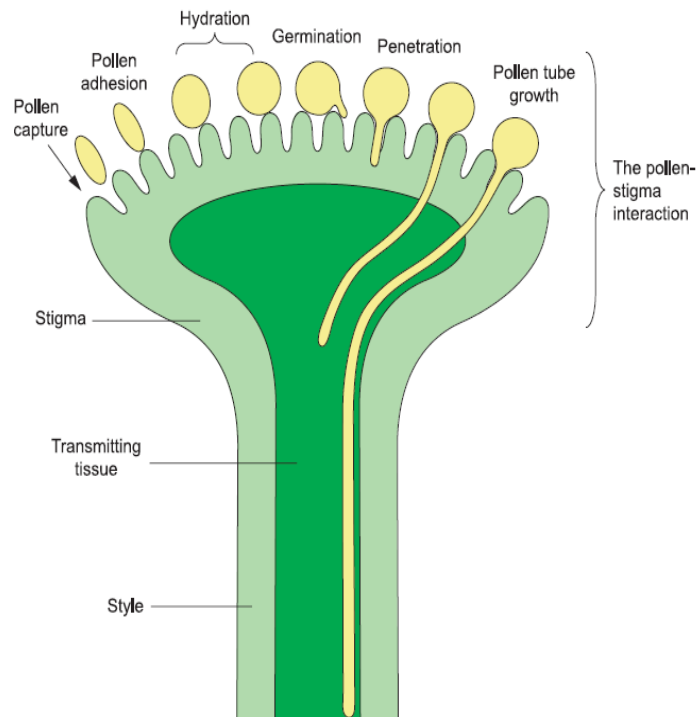


Figure 10 : Les différentes étapes de la pollinisation chez les espèces à pollen sec

Une fois le pollen capturé par le stigmate, il s'hydrate et finit par germer. La cellule végétative située à l'intérieur du pollen permet la production et l'élongation du tube pollinique, qui pénètre assez rapidement à travers le stigmate, puis le long du tissu transmissif situé à l'intérieur du style pour aller rejoindre les ovules situés à l'intérieur de l'ovaire.

Figure tirée de (Hiscock & Allen, 2008).

Lors du guidage du tube pollinique, plusieurs indices nous laissent croire qu'il existe un relais de communication entre les ovules et les tubes. Deux récepteurs de type kinase situés sur la membrane des synergides, FERONIA (FER) et SIRENE (SRN), ainsi qu'une protéine de type glucosylphosphatidylinositol (GPI-anchored protein) située dans les synergides, LORELEI (LRE), sont impliqués dans la décharge des noyaux contenus dans le tube pollinique lorsque celui-ci est rendu à destination. En effet, les tubes polliniques des mutants *srn/fer* se rendent à destination, mais ne sont pas capables de décharger leurs noyaux afin de féconder l'œuf et la cellule centrale. Le même phénotype est également observé chez les mutants *lorelei (lre)*, liant génétiquement LRE à SRN/FER dans une voie de signalisation permettant la rupture du tube pollinique à l'intérieur du sac embryonnaire (Capron et al., 2008; Escobar-Restrepo et al., 2007). À l'opposé, du côté du tube pollinique, ANXUR1 et ANXUR2 sont des récepteurs kinases qui préviennent la décharge trop précoce des deux cellules spermatiques, comme le suggère le mutant double *anxur1;anxur2*, dont la rupture du tube s'effectue bien avant l'entrée dans l'ovule (Boisson-Dernier et al., 2009; Miyazaki et al., 2009). Plusieurs hypothèses ont été émises pour comprendre le fonctionnement des signaux émis et captés par les ovules et les tubes polliniques juste avant la fécondation et la plupart de ces hypothèses relie SRN/FER et ANXUR comme faisant partie d'un même réseau de signalisation. Par exemple, il se pourrait que le tube pollinique en croissance envoie un signal à l'ovule qui est capté par SRN/FER lorsqu'il se rapproche et le sac embryonnaire renvoie un signal au tube qui est capté par ANXUR. Ce système pourrait prévenir la rupture précoce du tube pollinique, mais ceci explique mal la raison de la rupture du tube chez le mutant *anxur* qui s'effectue à une distance des ovules qui est trop grande pour percevoir un ligand envoyé par ceux-ci (Berger, 2009). Il existe bien d'autres hypothèses, mais elles n'ont pas encore été étudiées.

La recherche des signaux permettant au tube pollinique d'atteindre correctement l'ovule demeure l'un de sujets les plus d'actualité en biologie moléculaire de la reproduction végétale. Bien que les biologistes ne s'entendent pas tous sur la nature de la ou des molécule(s) attractante(s), il semble de plus en plus évident que le signal soit de nature protéique ou peptidique. En effet, puisque l'attraction est spécifique à chaque espèce, il est peu probable que l'attractant soit une molécule commune à tous, tel que l'oxyde nitrique (NO) ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Des recherches chez le lys (*Lilium longiflorum*) ont permis de caractériser

deux peptides sécrétés riches en cystéine (*Cystein-Rich Proteins*, CRPs) qui permettent l'attraction et le changement de direction du tube pollinique. STIGMA/STYLE CYSTEIN-RICH ADHESIN (SCA) est l'un de ces peptides de type *Lipid transfer proteins* (LTPs) qui sont exprimés dans les organes floraux (dans les tissus transmissifs du pistil pour SCA). Il existe des orthologues chez *A. thaliana*, nommés LTP1 à 7 et qui sont exprimés aussi un peu partout dans les organes floraux. Ces peptides pourraient constituer des ligands pour des récepteurs à la surface du tube pollinique afin de la guider vers les ovules (Chae & Lord, 2011). D'autres études, chez *Torenia fournieri*, ont permis de caractériser des peptides sécrétés de 9 kDa de type CRPs exprimés dans les synergides, les LUREs (TfLUREs), nommés ainsi puisqu'ils attirent et guident les tubes polliniques vers les ovules. Il existe de nombreux peptides de type CRPs chez *A. thaliana* et plusieurs semblent être exprimés au niveau des synergides et sécrétés via l'appareil ovulaire (AtLUREs) (Okuda & Higashiyama, 2010). Chez le maïs, ZmEA1 est un peptide unique aux monocotylédones exprimé au niveau de l'appareil ovulaire et sécrété qui agit pour attirer le tube pollinique. Du côté du tube pollinique, ces peptides sont perçus de manière indirecte par les récepteurs kinases LIP1/2 (*Lost In Pollen tube guidance*). Tout récemment, chez *A. thaliana*, trois récepteurs kinases de type *Leucine-Rich Repeat* (LRR), MDSIS1, MIK1 et MIK2, ont été rapportés pour percevoir AtLURE1 à la surface du tube pollinique (T. Wang et al., 2016). De plus, des CRPs sont aussi sécrétés par le tube pollinique (LAT52, LTP5), mais leur rôle dans le guidage vers l'ovule n'est pas encore déterminé (Hafidh et al., 2016). La [figure 11](#) résume l'ensemble des communications moléculaires possibles connues jusqu'à présent entre le tube pollinique et le sac embryonnaire.

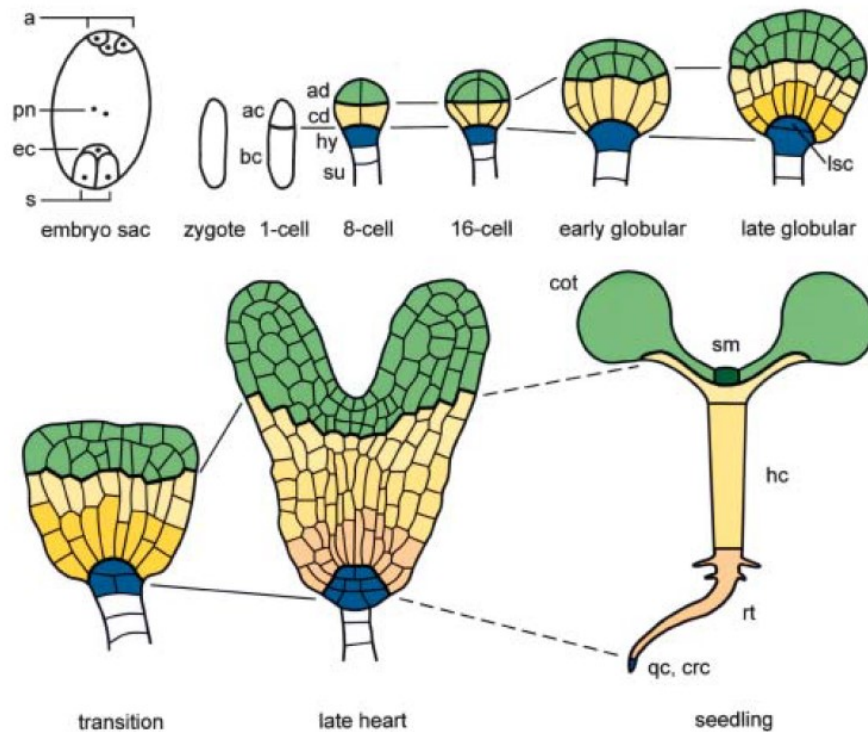
La fécondation chez les plantes à fleurs est un phénomène unique qui diffère énormément de chez les animaux puisqu'elle est double. En effet, lorsque le tube pollinique, généré par le noyau végétatif, a atteint les ovules, il entre dans le sac embryonnaire par le micropyle et fait éclater une des deux cellules synergides. Il se rompt et libère donc les deux cellules spermatiques à l'intérieur du sac embryonnaire. Alors qu'une des deux cellules ira féconder la cellule œuf, l'autre fécondera la cellule centrale, et cela donnera respectivement naissance au zygote, diploïde, et à l'albumen, qui sera donc triploïde (Dumas & Rogowsky, 2008; Sundaresan & Alandete-Saez, 2010).

1.5. Développement de l'embryon : d'autres exemples de signalisation

Dès la fécondation, le zygote subit plusieurs divisions pour aboutir à un embryon à l'intérieur d'une graine, qui est générée par les téguments de l'ovule. Les graines se développent à l'intérieur du fruit, qui est généré par le développement de l'ovaire. Le développement de l'embryon chez les plantes est unique puisqu'il est interrompu par un moment de dormance et le destin de chacune des cellules le constituant est déterminé par la présence d'hormones ou d'autres molécules de signalisation. Comme montré à la [figure 12](#), dès le stade du zygote, le destin cellulaire extrêmement contrôlé s'établit par une division asymétrique : elle produit une petite cellule apicale qui, après plusieurs divisions formera l'embryon, et une grosse cellule basale, qui formera le suspenseur. Alors que la cellule apicale se divise autant de façon transversale que longitudinale pour donner une forme plutôt sphérique, la cellule basale se divise beaucoup plus souvent longitudinalement pour produire une forme allongée, comme une file de cellules. Il y a trois étapes majeures à considérer durant le développement précoce de l'embryon : l'acquisition de l'axe apico-basal qui se produit dès les premiers moments, la différenciation de l'épiderme qui se produit entre les stades huit et seize cellules ainsi que la formation des méristèmes racinaire et apical qui s'effectue lorsque l'embryon atteint le stade de 16 cellules. Au stade mi-globulaire (un peu plus de 32 cellules), tous les tissus majeurs (provasculaire, cortex et épiderme) sont déjà spécifiés ou déterminés. Suite à cela, l'embryon passera par les stades globulaire, cordiforme et torpille avant d'entrer en dormance jusqu'à ce que les conditions externes soient propices à la germination de la graine (Dumas & Rogowsky, 2008; Jenik, Gillmor, & Lukowitz, 2007; Lau et al., 2010; Laux, Würschum, & Breuninger, 2004).

La mise en place de l'axe apico-basal est dépendant de plusieurs facteurs, dont le flux d'auxine, qui est dirigé vers la partie apicale de l'embryon au cours des stades précoces (2, 4, 8 et 16 cellules) grâce aux transporteurs polarisés PINs. À partir du stade globulaire, l'auxine se concentre à des endroits clés de l'embryon : à l'hypophyse pour permettre la croissance de la racine et là où les cotylédons se formeront pour permettre leur croissance (Bowman & Floyd, 2008). Le transport polaire du transporteur d'auxine PIN1 semble être dirigé par une protéine ARF-GEF, nommée GNOM, dont les mutants sont petits, ont des défauts dans la formation de la racine et des cotylédons (Wolters, Anders, Geldner, Gavidia, & Jürgens, 2011). Les facteurs

de transcription WUSCHEL HOMEODOMAIN (WOX) sont aussi impliqués dans l'acquisition de la polarité (axe apico-basal) et des précurseurs des méristèmes apical et racinaire. Au cours des différents stades de développement, *WOX2*, *WOX5*, *WOX8*, *WOX9* et WUSCHEL (*WUS*) s'installent dans les différentes parties de l'embryon faisant en sorte que chaque facteur de transcription sera exprimé à un endroit différent. Lors de la première division du zygote, *WOX2* est exprimé au niveau de la cellule apicale alors que *WOX8/9* sont exprimés au niveau de la cellule basale, et des évidences génétiques montrent que ces deux protéines s'influencent l'une sur l'autre, prouvant une communication cellulaire entre les deux cellules de l'embryon en devenir. En effet, l'expression de *WOX2* dans la cellule apicale dépend de la bonne expression de *WOX8/9* dans la cellule basale (Lau et al., 2010; Ueda, Zhang, & Laux, 2011).



Lorsque la cellule œuf du sac embryonnaire est fécondée par la cellule spermatique du pollen, un zygote est formé. Ce dernier s'allonge d'environ trois fois avant de se diviser de façon

Figure 12 : Embryogénèse chez *A. thaliana*

asymétrique. La cellule apicale, plus petite et plus ronde, formera l'embryon en devenir alors que la cellule basale, plus allongée, formera le suspenseur. L'embryon passera par les stades globulaire, cœur et torpille avant d'être prêt à germer. a, antipodales; ac : cellule apicale ; ad : domaine apicale de l'embryon ; bc : cellule basale ; cd : domaine central de l'embryon ; cot : cotylédons ; crc : coiffe racinaire ; ec : cellule œuf ; hc : hypocotyle ; hy : hypophyse ; lsc : lens-shaped cell ; pn : cellule centrale ; qc : zone quiescente ; rt : racine ; s : synergides ; sm : méristème apicale ; su : suspenseur. Figure tirée de (Laux et al., 2004).

La MAPKKK YODA (ou YDA) joue un rôle clé dans le développement du suspenseur, puisque les mutants *yda* développent un suspenseur environ trois fois plus petit que la normale.

En effet, les divisions cellulaires sont désordonnées chez le mutant et mènent à un suspenseur en forme de boule plutôt qu'une ligne de cellules relativement droite, alors que l'embryon semble normal (Lukowitz, Roeder, Parmenter, & Somerville, 2004). Un récepteur kinase de type Pelle/IRAK, SHORT SUSPENSOR (SSP) agit en amont de YDA et promeut son activation, mais les transcrits de *SSP* ne se retrouvent que dans le pollen mature et la protéine ne se retrouve que dans le zygote. Donc, ce n'est qu'au stade du zygote que la protéine SSP peut activer la cascade de signalisation de la voie YDA, permettant la première division asymétrique de l'embryon ainsi que le développement normal du suspenseur. En fait, la protéine SSP serait un indice temporel permettant au zygote de se diviser suite à la fécondation de la cellule œuf par la cellule spermatique du pollen (Bayer et al., 2009). Cette découverte est non seulement importante pour la voie de signalisation de YODA elle-même, mais aussi parce que c'est la première fois que l'on parle de contrôle paternel sur le développement de l'embryon, puisque le signal, les transcrits de *SSP*, viennent exclusivement du pollen. Comme mentionné plus tôt, YODA joue aussi un rôle au niveau de la division asymétrique des futures cellules de garde qui formeront les stomates de l'épiderme foliaire, tout comme MKK4/5 et MPK3/6 (voir la section 1.1.3 Exemples de cascades impliquées dans le développement). Jusqu'à maintenant, seulement des évidences génétiques ont été publiées concernant les liens entre YODA, MKK4/5 et MPK3/6 dans la division asymétrique du zygote, mais cela semble suffisant pour maintenir l'hypothèse de cette voie. De plus, des évidences génétiques associeraient la voie YODA avec les facteurs de transcription WOX2 et 8/9. La [figure 13](#) montre les nombreux acteurs contrôlant la division asymétrique du zygote et le maintien du destin cellulaire bien différent des cellules apicale et basale.

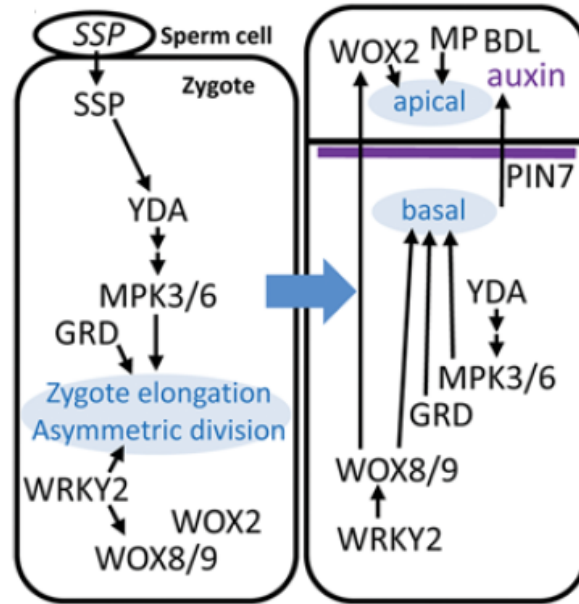


Figure 13 : Division asymétrique du zygote et contrôle du destin des cellules apicale et basale avec la voie de YODA

L'ARNm de la protéine SSP, contenu uniquement dans le pollen, est traduit à l'intérieur du zygote, permettant ainsi à la voie de signalisation de YODA de s'effectuer. La voie de YODA permet l'élongation du zygote et sa division asymétrique. Le destin de la cellule basale est contrôlé par la voie de YODA, ainsi que les FTs WRKY2, WOX8/9 et GRD, alors que le destin de la cellule apicale est contrôlé par WOX2. La diffusion asymétrique de l'auxine, vers la cellule apicale, contrôle aussi le destin de la cellule apicale. Figure adaptée de (Musielak & Bayer, 2014).

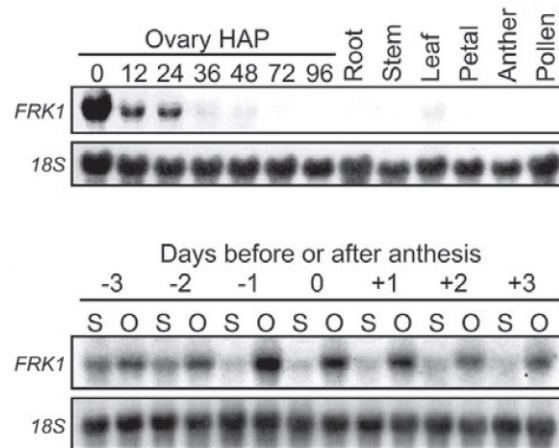
1.6. La classe FRK et ses relations dans la reproduction chez *Solanum chacoense*

1.6.1. *ScFRK1* et *ScFRK2* ainsi que leurs orthologues connus chez *A. thaliana*

Chez *Solanum chacoense*, il existe un groupe de MAPKKKs, les *Fertilization-Related Kinases* (FRKs), qui sont classées dans la sous-famille des MEKKs. ScFRK1 et ScFRK2 sont de petites MEKKs d'un peu plus de 300 acides aminés, composées majoritairement d'un domaine kinase et d'un petit domaine variable situé en C-terminal. Lorsque comparées aux 21 MEKKs d'*A. thaliana*, elles forment un petit groupe monophylétique, supporté à 100%, avec AtMAPKKK19, 20 et 21. Jusqu'à présent, peu de choses sont connues sur ce groupe de AtMEKKs, mis à part leur patron d'expression via les biopuces d'ADN commerciales d'*A. thaliana*. Selon ces données, *AtMAPKKK19* (At5g67080) est exprimé au niveau de la graine et du pollen, *AtMAPKKK20* (At3g50310) n'est exprimé que dans le pollen alors que *AtMAPKKK21* (At4g36950), considéré comme un pseudogène, n'est pas inclus sur les biopuces. Des études plus récentes ont démontré que *AtMAPKKK20* est une cible du FT DUO1, connu pour son implication dans l'établissement de la deuxième mitose du pollen, la PMII (voir la section 1.3. Développement du gamétophyte mâle), suggérant ainsi un rôle de cette MAPKKK dans le pollen (Borg et al., 2011). Il a aussi été démontré que AtMAPKKK20 interagit avec certaines protéines de type calmoduline ou calmoduline-like (CML), dont CaM1, CaM6 et CML9. Ces protéines sont de véritables détecteurs de calcium à l'intérieur de la cellule, le calcium étant largement utilisé dans les réponses aux stimuli et les cascades de signalisation (Popescu et al., 2007). Récemment, les gènes orthologues de *AtMAPKKK19* et *AtMAPKKK20* ont été étudiés chez *Brassica napus*, *BnMAPKKK19* et *BnMAPKKK20*, et ils semblent régulés par la réponse au stress. De plus, des expériences d'interaction en double-hybride chez la levure ont montré que BnMAPKKK19 interagit avec BnMKK8 et BnMKK9 (les orthologues de AtMKK8 et AtMKK9) et BnMAPKKK20 interagit avec ces deux dernières MKKs en plus de BnMKK3 (l'orthologue de AtMKK3) (Sun et al., 2014). Mis à part tout cela, rien d'autre n'est connu sur ce groupe de MAPKKKs chez *A. thaliana* ou les autres *Brassicaceae*. On ne connaît donc pas leurs véritables partenaires d'interactions ni même leur(s) rôle(s) à l'intérieur de la cellule.

C'est chez les *Solanaceae* que les membres de cette classe de MEKKs sont les mieux caractérisés. En effet, les deux ScFRKs mentionnées plus tôt, soit ScFRK1 et ScFRK2, ont déjà

fait l'objet de diverses publications, toutes reliées à leur rôle au niveau de la reproduction. Elles possèdent 46% d'identité au niveau de leur séquence en acides aminés et possèdent toutes les deux des signaux d'importation nucléaire (NLS). Elles sont aussi toutes les deux régulées temporellement lors du développement des gamétophytes, par la pollinisation, la fécondation et le développement du fruit. L'expression de *ScFRK1* est très spécifique aux gamétophytes, l'ARNm étant fortement détecté dans l'ovaire peu avant l'anthèse et à l'anthèse, puis les niveaux diminuent rapidement après la pollinisation et devient presque indétectable suite à la fécondation, qui s'effectue environ 36 heures après la pollinisation. Plus précisément, les ARNm de *ScFRK1* sont détectés à l'intérieur du sac embryonnaire, dans la cellule œuf et les synergides. *ScFRK1* est aussi exprimé à l'intérieur du pollen en développement, au niveau des cellules mères du pollen (*Pollen Mother Cells, PMC*) (Lafleur et al., 2015). La [figure 14](#) montre le patron d'expression de *ScFRK1*.



Le patron d'expression

a été déterminé par

Figure 14 : Patron d'expression de *ScFRK1*

hybridation sur gel d'ARNs (Northern blot). *ScFRK1* est fortement exprimé dans les tissus reproductifs, principalement dans l'ovaire à l'anthèse et quelques jours précédents l'anthèse. Son expression diminue rapidement suite à la pollinisation (12 et 24 HAP) et complètement suite à la fécondation (36 HAP et plus). HAP : Hours after pollination ; S : Style ; O : Ovaire. Figure adaptée de (Lafleur et al., 2015).

L'expression de *ScFRK1* corrèle parfaitement avec son rôle au niveau développemental, puisque les mutants dont l'expression de *ScFRK1* a été diminuée présentent des défauts uniquement au niveau de la reproduction. En effet, les mutants forment des fruits plus petits et qui contiennent moins de graines que les fruits provenant de la plante de type sauvage (Wild Type, WT), comme le montre la [figure 15](#). L'investigation plus poussée du phénotype montre que les gamétophytes présentent des problèmes au niveau de leur développement : à maturité, le sac embryonnaire est soit dégénéré, c'est-à-dire qu'il ne possède pas de cellules, le tégument de l'ovule prenant tout l'espace, soit bloqué au stade de la mégaspore fonctionnelle alors que de son côté, presque tout le pollen est mort. Dans les deux cas, le développement s'arrête juste avant les premières mitoses, soit au stade de la mégaspore fonctionnelle du côté femelle et au stade de la microspore juste avant la PMI du côté mâle. Évidemment, n'ayant pas de sac embryonnaire fonctionnel à maturité, le guidage du tube pollinique est sévèrement affecté chez les mutants, ce qui en fait un modèle dans l'étude des gènes reliés au guidage (Lafleur et al., 2015).

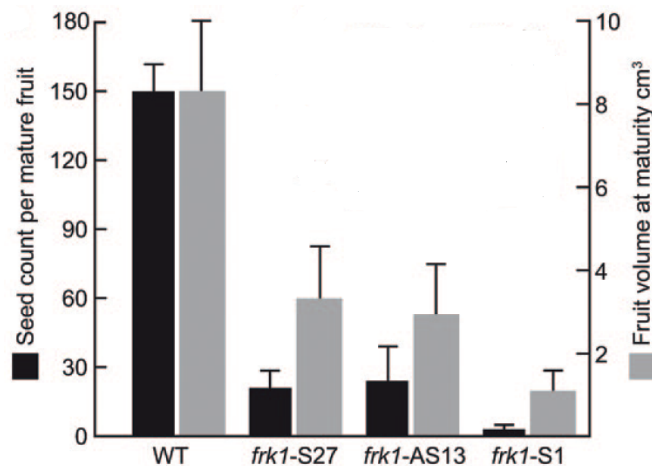


Figure 15 : Phénotype des fruits des mutants dont l'expression de *ScFRK1* est réduite

Le nombre de graines par fruit (noir) et son volume (gris) à maturité diminue grandement chez les mutants dont l'expression de *ScFRK1* est fortement réduite. Image adaptée de (Lafleur et al., 2015).

Le gène *ScFRK2* a un patron d'expression différent de *ScFRK1* : on retrouve des ARNm dans les bourgeons floraux, mais son expression est à son maximum au niveau de l'ovaire lorsqu'il y a eu fécondation (deux jours après la pollinisation). En effet, selon des expériences d'hybridation *in situ*, *ScFRK2* est exprimé dans les ovules nouvellement fécondés, principalement au niveau du zygote (Gray-Mitsumune et al., 2006). Les ARNm de *ScFRK2* sont aussi détectés dans les tétrades de microspores, puis dans les microspores seules, mais l'expression diminue alors que le pollen devient mature (O'Brien, Gray-Mitsumune, Kapfer, Bertrand, & Matton, 2007). Les phénotypes observés chez les mutants surexprimant *ScFRK2* ne sont visibles qu'au niveau des organes reproducteurs, mais sont tout de même nombreux et importants. Le pollen n'est pas viable à maturité, il dégénère alors qu'il est au stade de la microspore (O'Brien et al., 2007). Au niveau de l'ovule, tout comme pour les mutants *scfrk1*, le développement du sac embryonnaire s'arrête au stade de la mégaspore fonctionnelle (données non publiées). Les mutants présentent aussi un ovule avec une structure étrange : le tégument s'allonge parfois pour se transformer en une sorte de structure carpelloïde rappelant le style et le stigmate de la fleur, comme le montre la [figure 16](#) (Gray-Mitsumune et al., 2006).

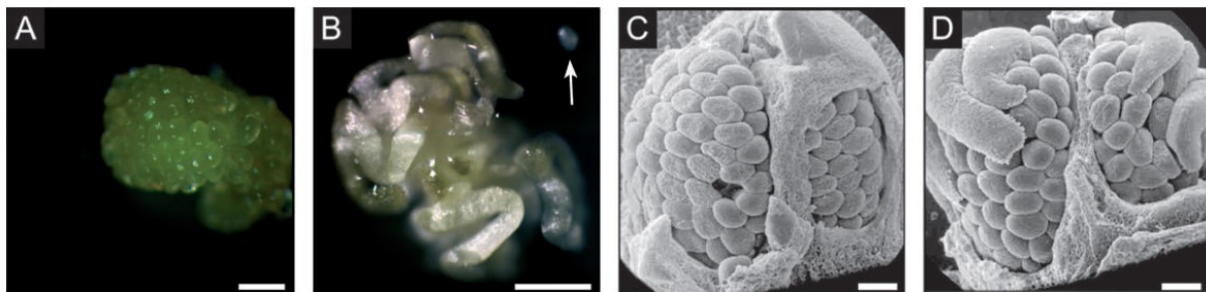


Figure 16 : Phénotype des mutants surexprimant *ScFRK2*

En A et C, ovules provenant d'un ovaire déparicarpé d'un plant de type sauvage. En B et D, ovules provenant des mutants surexprimant *ScFRK2*. Il y a désorganisation des ovules et transformation homéotique des téguments de certains ovules en structure de type carpelloïde. Barres de mesure : 1 mm pour A et B, 100 μ m pour C et D. Figure adaptée de (Gray-Mitsumune et al., 2006).

1.6.2. Les FRKs : vers un projet de doctorat

Alors que les membres de la classe des FRKs chez *A. thaliana* ne semblent pas jouer les mêmes rôles que ceux chez *S. chacoense*, nous avons émis l'hypothèse que les Solanacées, du moins *S. chacoense*, possèdent une classe de MAPKKKs différente, qui n'est pas présente chez *A. thaliana*. Pour répondre à la question, nous avons analysé les génomes/transcriptomes/protéomes de 15 espèces issues de différents clades du règne végétal afin d'étudier les relations phylogénétiques à l'intérieur de la sous-famille des MEKKs. Cela nous a permis d'observer que *ScFRK1* et *ScFRK2* ne sont pas seuls, mais sont inclus dans un groupe monophylétique que nous avons nommé la classe des FRKs (FRK pour Fertilization-Related Kinase). De plus, nous avons observé une expansion considérable de cette classe chez les Solanacées, comparativement à d'autres dicotylédones comme le peuplier, la vigne ou le coton. La classe des FRKs est absente chez les monocotylédones étudiées (riz et maïs) et ne possède qu'un seul membre (une FRK primitive) chez l'angiosperme basal *Amborella trichopoda*. Cette analyse phylogénétique des MEKKs nous a poussés à nous poser des questions sur l'origine de la classe des FRKs ainsi que sur son rôle au sein des Solanacées.

Dans un second temps, nous avons fait la caractérisation fonctionnelle de *ScFRK3*, un troisième membre de la classe des FRKs chez *S. chacoense*. Du patron d'expression jusqu'à l'établissement d'une voie de signalisation potentielle, en passant par la caractérisation phénotypique des mutants, plusieurs expériences ont été réalisées dans le but de comprendre le rôle de *ScFRK3* au niveau de la reproduction chez *S. chacoense*.

2. Caractérisation phylogénétique de la classe FRK chez 15 espèces appartenant à divers clades du règne végétal

2.1. L'analyse à l'échelle génomique des MAPKKKs montre une expansion et une évolution d'une nouvelle classe de MEKKs impliquée dans la reproduction sexuée des Solanacées

Caroline Daigle

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

2.1.1. Préambule

Un projet de séquençage du transcriptome de l'ovule, du pollen et du tube pollinique chez *S. chacoense* a débuté alors que les technologies de nouvelles générations (NGS) sont devenues relativement abordables. À la suite des résultats du séquençage, je suis partie à la recherche des MAPKKKs, MKKs et MPKs présentes dans le transcriptome. J'y ai fait une découverte surprenante, ce qui m'a amenée à étudier les relations phylogénétiques à l'intérieur de la sous-famille des MEKKs chez une multitude d'espèces végétales.

2.1.2. Sommaire

Les membres de la grande famille des MAP Kinases ont été étudiés plus particulièrement chez *Arabidopsis thaliana* et peu d'information est connue à propos des autres espèces végétales. Chez *Solanum chacoense*, une espèce de pomme de terre sauvage, deux membres faisant partie d'un groupe spécifique de MEKKs, nommés ScFRK1 et ScFRK2, sont connus pour leur implication dans le développement reproductif mâle et femelle. Mis à part ces deux kinases, aucune autre information n'est disponible concernant cette famille particulière.

Grâce aux récents progrès réalisés dans les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS), les génomes et les transcriptomes de plusieurs espèces végétales ont pu être récemment séquencés, ce qui permet l'accès à une multitude de données brutes. Dans le but d'identifier tous les membres de la sous-famille des MEKKs, nous avons criblé les génomes de 15 espèces issues de différents clades du règne végétal. Étonnamment, la sous-famille des MEKKs s'est développée grandement au cours de l'évolution, spécialement chez les *Solanaceae*, et ceci est particulièrement vrai au niveau de la classe des FRKs, dont les membres se sont grandement dupliqués et ont divergé.

L'expansion et l'évolution rapide des membres de la classe des FRKs chez les *Solanaceae* supportent l'hypothèse affirmant qu'ils aient acquis de nouveaux rôles au cours de l'évolution, principalement au niveau du développement reproductif mâle et femelle.

2.2. Genome-wide analysis of MAPKKs shows expansion and evolution of a new MEKK class involved in solanaceous species sexual reproduction

Caroline Daigle and Daniel P. Matton

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2

Publié dans BMC Genomics (2015) 16:1037.

2.2.1. Apport original

Caroline Daigle est l'instigatrice principale du papier. À la suite des résultats du transcriptome, elle a proposé et réalisé toutes les analyses bioinformatiques et phylogénétiques ainsi que les expériences décrites à l'intérieur de l'article. Elle a aussi rédigé l'article.

Daniel P. Matton, en tant que directeur de recherche, a supervisé et subventionné les travaux. Il a aussi contribué aux résultats, à la conception des figures, à l'écriture et à la correction de l'article.

2.2.2. Abstract

Members of the plant MAP Kinases superfamily have been mostly studied in *Arabidopsis thaliana* and little is known in most other species. In *Solanum chacoense*, a wild species close to the common potato, it had been reported that members of a specific group in the MEKK subfamily, namely ScFRK1 and ScFRK2, are involved in male and female reproductive development. Apart from these two kinases, almost nothing is known about the roles of this peculiar family.

MEKKs were identified using BLAST and hidden Markov model (HMM) to build profiles using the 21 MEKKs from *A. thaliana*. Following protein sequence alignments, the neighbor-joining method was used to reconstruct phylogenetic trees of the MEKK subfamily. Kinase subdomains sequence logos were generated with WebLogo in order to pinpoint FRK distinct motifs. Codon alignments of the FRKs kinase subdomains and maximum-likelihood

phylogenetic trees were used in the codon substitution models of the codeml program in the PAML package to detect selective pressure between FRK groups.

With the recent progress in Next-Generation Sequencing technologies, the genomes and transcriptomes of numerous plant species have been recently sequenced, giving access to a vast amount of data. With the aim of finding all members of the MEKK subfamily members in plants, we screened the genomes of 15 species from different clades of the plant kingdom. Interestingly, the whole MEKK subfamily has significantly expanded throughout evolution, especially in solanaceous species. This holds true for members of the FRK class, which have also strongly expanded and diverged.

Expansion and rapid evolution of the FRK class members in solanaceous species support the hypothesis that they have acquired new roles, mainly in male and female reproductive development.

2.2.3. Background

Protein phosphorylation is the most widespread post-translational modification in eukaryotic cells (Khoury, Baliban, & Floudas, 2011). Its pivotal role is exemplified by the vast array of cellular processes that it regulates and the preponderance of protein kinases (PKs) in the cell proteome, even more for plants, where PKs represent around 4% of the proteome, a two-fold increase compared to other eukaryotes (Dissmeyer & Schnittger, 2011). In plants, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are one of the largest PKs family, second only to the receptor kinases superfamily. MAPKs form signaling cascades that can quickly transfer information from upstream sensors to downstream effectors, allowing cells to mount an appropriate response. They are minimally composed of three distinct modules that are widely conserved among eukaryotes. Once activated, the first member of the signaling cascade, the mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK, MKKK or MEKK) phosphorylates and activates the second member, a mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK or MKK) on a [S/T] - X₃₋₅ - [S/T] motif (X=5 in plants; X=3 in animal and yeast) (Group et al., 2002; Zheng & Guan, 1994). The activated MKK can then phosphorylate the third player, the mitogen-activated protein kinase (MAPK or MPK), on a T - [D/E] - Y motif located in the MAPK activation loop. Once activated, the MAPK can phosphorylate a variety of downstream target

proteins including transcription factors, other kinases and cytoskeleton-associated proteins (Mishra et al., 2006). Activation of the MAPKKK itself most often occurs through the intervention of cell surface receptors. Upon ligand binding, receptor-mediated activation of the MAPKKK can proceed through direct or indirect phosphorylation (through a mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase (MAPKKKK), or by a physically induced conformational changes (Deribe, Pawson, & Dikic, 2010). Although MAPK pathways have been intensively studied in yeast, drosophila and mammalian cells, functional characterization of canonical MAPK pathways in plants is still in its infancy. Most of our knowledge about plant MAPKs cascades comes from the model species *Arabidopsis thaliana*, the first plant to have its genome sequenced (Arabidopsis Genome, 2000). Although *A. thaliana* contains 10 MAPKKKKs, around 80 MAPKKs (divided into three subfamilies, the MEKKs, the RAFs and the ZIKs) (Jonak et al., 2002), 10 MAPKKs and 20 MAPKs (Group et al., 2002; Šamajová, Komis, & Šamaj, 2013), only few complete cascades have been deciphered. These include the MEKK1 - MKK4/5 – MPK3/6 cascade that positively regulates plant innate immunity (Asai et al., 2002) and also acts in phytoalexin biosynthesis (Ren et al., 2008). MEKK1 with different partners, MKK1/2 – MPK4, also acts in an independent signaling cascade involved in stress signaling such as oxidative, salt and cold stresses (Gao et al., 2008; Ichimura et al., 1998) as well as in defense responses against pathogens (Qiu et al., 2008) and innate immunity (Q. Kong et al., 2012). Very recently, another complete cascade involving MKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14 was also shown to be involved in stress signaling under the control of the phytohormone abscisic acid (ABA) (Danquah et al., 2015). Signaling cascades involved in plant development have also been uncovered, like the YODA – MKK4/5 – MPK3/6 cascade involved in both stomatal and embryonic development (Bayer et al., 2009; Lampard, Lukowitz, Ellis, & Bergmann, 2009; Lampard, MacAlister, & Bergmann, 2008; Lukowitz et al., 2004). The YODA signaling pathway was the first well-described MAPK signaling pathway acting in plant reproductive development. In the *yda* mutant, it was shown that the zygote could not divide properly, leading to inappropriate cell divisions of the suspensor and, eventually, to the development of an embryo without the root primordium (Lukowitz et al., 2004).

No complete MAPK signaling cascade has yet been reported in plant species other than *A. thaliana*, with the exception of the tobacco NACK-PQR cascade involved in sporophytic

cytokinesis (Krysan, Jester, Gottwald, & Sussman, 2002; R. Nishihama et al., 2002; Soyano et al., 2003), but with the recent advent of Next-Generation Sequencing (NGS) technologies, genomes and transcriptomes from rice (*Oryza sativa*) (Ouyang et al., 2007), maize (*Zea mays*) (F. Wei et al., 2007), poplar (*Populus trichocarpa*) (Tuskan et al., 2006), potato (*Solanum tuberosum*) (T. P. G. S. Consortium, 2011), tomato (*Solanum lycopersicum*) (T. G. Consortium, 2012) and many other species are now available. This enables kinome comparison between genomes in order to trace their evolutionary histories. Comparative phylogenetic studies of MAPKs families revealed that there were only few differences in sequences and numbers of family members among the studied species (L. Chen et al., 2012; Hamel et al., 2006; F. Kong et al., 2012; Kong et al., 2013; Achal Neupane et al., 2013; Rao, Richa, Kumar, Raghuram, & Sinha, 2010; Singh et al., 2012). Similarly to *Arabidopsis*, 75 MAPKKKs, 8 MKKs and 17 MAPKs were identified in rice (Hamel et al., 2006; Rao et al., 2010). Sequence identity between MPKs from these two and others species is very high, suggesting a high degree of conservation between the MPK family (L. Chen et al., 2012; Hamel et al., 2006; F. Kong et al., 2012; Mohanta, Arora, Mohanta, Parida, & Bae, 2015; Neupane, Nepal, Benson, MacArthur, & Piya, 2013; Achal Neupane et al., 2013; Zhang, Xu, Luo, Jiang, & Shu, 2013). High amino acid sequence identity was also observed within orthologous MKKs from numerous species (L. Chen et al., 2012; Hamel et al., 2006; Rao et al., 2010; Zhang et al., 2013). The MAPKKKs however, showed high sequence diversity, mainly outside the kinase domain. Compared to the MKKs and MPKs, most MAPKKKs comprise long N or C-terminal extensions harboring regions that play specific roles including kinase activity control, selection of their cognate MKKs or act as scaffolds for the recruitment of other proteins in the signaling cascade (CristinaRodriguez et al., 2010). Among the MAPKKKs, the MEKK subfamily is the only one known to be involved in canonical MKKK-MKK-MPK cascades, and one group departs from the others having no lengthy N or C-terminal extensions. In *A. thaliana*, this group comprises three closely related MEKKs, the AtMAPKKK 19, 20 and 21 (At5g67080, At3g50310 and At4g36950, respectively). They exhibit from 56-75% pairwise amino acid sequence identity (70-86% similarity), and are much smaller than all other MEKKs ranging from 336 to 344 amino acids (MW ~37 kDa). Although little information about these proteins is available, evidences show that AtMAPKKK20 interacts with numerous calmodulins and calmodulin-like proteins (Popescu et al., 2007) and is involved in osmotic stress responses (J.-M. Kim et al., 2012). As a

target of the DUO1 transcription factor involved in sperm cell differentiation (Borg et al., 2011), *AtMAPKKK20* is most probably also involved in pollen development. It was also recently shown that the orthologs of *AtMAPKKK19* and *20* in *Brassica napus* are also regulated by stress responses (Sun et al., 2014). Three putative orthologs of these MAPKKKs had been identified in *Solanum chacoense*, a wild diploid potato species close to *Solanum tuberosum*: ScFRK1, ScFRK2 and ScFRK3 (for *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase) (H. Germain et al., 2005; Tebbji, Nantel, & Matton, 2010). All three are involved in plant sexual reproduction, affecting both male and female floral organs. In plants overexpressing *ScFRK2*, a homeotic transformation of the integument into a carpelloid structure leads to severely reduced seed set (Gray-Mitsumune et al., 2006). The female gametophyte, the embryo sac, was also affected (Daigle, C., Mazin, B., Matton, D. P. unpublished results). Pollen viability is also severely reduced in these transgenic lines (O'Brien et al., 2007). RNAi and cosuppression transgenic lines for *ScFRK1* (Lafleur et al., 2015) and *ScFRK3* (Daigle et al., unpublished results) also showed severe defects in female gametophytes due to abnormal progression through megagametogenesis, leading to embryo sac collapse. Pollen viability is also severely reduced in those mutants. Except for the work done in *Solanum chacoense*, *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*, nothing else is known about these MAPKKKs in others species.

With the aim of building full MAPK cascades acting in plant reproduction, a deep transcriptomic analysis was performed on pollen and ovule samples in *Solanum chacoense*. Surprisingly, analysis of the MEKK subfamily showed a two-fold increase from the FRK group in *Solanum chacoense* compared to *Arabidopsis thaliana*, with six different FRKs (*ScFRK1-6*) retrieved. Considering the highly specialized roles of the ScFRKs in plant reproductive development, this prompted us to analyze when this expansion arose during plant evolution by revisiting the MEKK classification in other species. In total, 15 genomes were analyzed, identifying the solanaceous species as harboring the largest MEKK subfamily. Furthermore, inside the plant MEKK subfamily, the proportion of FRKs among solanaceous species was two to three times higher than in other species. This expansion unique to solanaceous species suggests the emergence of new specific roles, particularly in reproductive development. This study highlights the compendium of all MEKK subfamily members from various clades in the plant kingdom and uncovers an important family involved in reproductive development.

2.2.4. Méthods

RNA sequencing and de novo assembly

Solanum chacoense Bitt. plants (genotype G4, S₁₂S₁₄ self-incompatibility alleles) were greenhouse-grown under long-day condition (16h light/8h dark). The 454 GS-FLX Titanium next generation sequencing (NGS) platform was used to perform RNA-seq (one full plate per sample producing between 1 to 1,5 million reads each) on wild-type ovules at anthesis, ovules two days before anthesis, and anthesis ovules from the *ScFRKI* embryo sac-less mutant (Lafleur et al., 2015), as well as from mature dry pollen and from *in vitro* grown pollen tubes. For ovule collection, ovaries were hand dissected to remove the pericarp (ovary wall) and ovules were snap frozen in liquid nitrogen until use. Pollen was collected from mature anthers using a manual or electric vibrator device, while pollen tubes were obtained from germinating pollen grains in BK liquid medium for 5 hours and collected on a 0.45 µM cellulose filter through gentle vacuum filtration (Brewbaker & Kwack, 1963). Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Life Technologies; Cat No 15596-026) as recommended by the manufacturer. cDNA libraries were constructed for each condition with the GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche; Cat No 05608228001) after an mRNA enrichment step performed with Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (Life Technologies; Cat No 25-61002). Long reads obtained from the 454 platform at The Center for Applied Genomics (TCAG, Toronto, Canada) were *de novo* assembled into 2141 contigs and 51 162 isotigs leading to 26 838 isogroups using the Newbler software (Roche) (Margulies et al., 2005). The 53 303 sequences are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDZX01>.

S. chacoense MEKK subfamily analysis

The assembled transcriptomes of the four samples were merged together and the whole 454 database was screened to retrieve all members of the MEKK subfamily. Amino acids sequences from the kinase domains of the 21 MEKKs in *Arabidopsis thaliana* were used to screen against the *Solanum chacoense* transcriptome. The BLAST algorithm (tblastn) was used to compare the *Arabidopsis thaliana* sequences against the *Solanum chacoense* database. The matching transcripts (20 best hits for each *Arabidopsis thaliana* MEKKs screened) were then compared with the NCBI database to ensure that they corresponded to true MEKKs. Pfam 27.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) and HMM (HMMER 3.1b1; hmmmer.org) analyses were also used to

ascertain their status as MEKKs. In total, 21 different MEKKs were found in the *Solanum chacoense* combined ovule and pollen transcriptome. Protein sequences of those 21 ScMEKKs can be found in [supplementary table I](#). Sequence alignments were made with ClustalW and all phylogenetic trees were performed with the Neighbor-Joining algorithm with a 1000 bootstrap replicates (only bootstrap value >50% are mentioned) and rooted with the kinase domain sequence of the *Arabidopsis thaliana* BRI1 receptor kinase (At4g39400) in Geneious 8.0 (www.geneious.com).

MEKK subfamily analysis in other species

Genomes, transcriptomes, cDNAs, CDS or peptides databases were downloaded and used to retrieve MEKK sequences corresponding to the *Arabidopsis* MEKK subfamily, and further validated as done previously for the *S. chacoense* transcriptome. Data resources retrieved from the other 13 species tested are listed in [supplementary table II](#). Genes ID and locus tags of all the MEKKs found in the databases are listed in [supplementary table III](#).

Expression analysis of the FRK class in S. chacoense

Total RNA was isolated with the TRIzol® Reagent from Life Technologies (Cat. No 15596-026). Reverse transcription from 2.5 µg of total RNA extracted from various tissues was performed using the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) from Invitrogen (Cat. No 28025). PCR amplification cycles were as follows: 25 cycles for the actin gene; 27 cycles for *ScFRK1* and 2; 28 cycles for *ScFRK3*, 4 and 5; and 39 cycles for *ScFRK6*. To ascertain RT-PCR primers specificity for the *ScFRK1-6* genes, the forward primer was positioned in the C-terminal domain following the kinase domain where pairwise nucleotide sequence identity varied from 19 to 71 %. The reverse primer was designed using the highly divergent 3' UTR region where pairwise nucleotide sequence identity varied from 29 to 54 %. Primers shared lesser than 60% identity between the *ScFRK1-6* genes. PCR primers and amplicons size are listed in [supplementary table IV](#).

Expression analysis of the MEKK subfamily in Solanum lycopersicum, Solanum tuberosum and Populus trichocarpa

Expression analysis data were taken from the Bio-Analytic Resources for Plant Biology (BAR, <http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>). For *Solanum tuberosum*, gene names

(PGSC0003DMTXXXXXXXXXX) were retrieved from the Sol Genomics Network website (<http://solgenomics.net/>). For *Solanum lycopersicum*, the Solyc code (SolycXXgXXXXXX) was used. For poplar, microarray IDs corresponding to their orthologous FRK proteins were retrieved from the Plant Compliant Gene Expression Resources for Plants and Plant Pathogens (PLEXdb) website (<http://www.plexdb.org/index.php>).

Kinase domains sequence logos

Sequence alignments of all AtMAPKKK1-12 orthologs were used to create a sequence logo using the WebLogo website (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) in order to compare the 12 kinase subdomains. The same procedure was applied to AtMAPKKK13-14 orthologs, the AtMAPKKK15-18 orthologs and all the FRK-like proteins, separately. Sequence logos were also used to compare each group (groups I to IV) of the FRK class.

Test of variable dN/dS ratios among the FRK class

Codon alignments of the FRKs 12 subdomains of the kinase domain and its Maximum-likelihood phylogenetic tree were used in the codon substitution models of the codeml program in the PAML package (Yang, 2007) to detect if there is a difference in selective pressure between group I and the three others groups. A branch-specific codon model was set to allow the dN/dS ratio (ω) to vary for group I. A likelihood ratio test (LRT) was used to determine whether there is a statistically significant difference in ω ratio or not.

2.2.5. Results

A deep transcriptomic analysis of the MEKK subfamily in Solanum chacoense unveils a much larger FRK class than in Arabidopsis thaliana

The *Arabidopsis thaliana* MEKK subfamily comprises 21 MAPKKKs with AtMAPKKK 19, 20 and 21 clustering with the *Solanum chacoense* FRKs, forming a highly supported clade. In order to find all *Solanum chacoense* MEKKs that could be involved in plant reproduction, we screened the *Solanum chacoense* ovule and pollen tube transcriptomes with each *Arabidopsis thaliana* MEKKs. From 26,838 different transcripts, 21 different MEKKs were retrieved ([supplementary table I](#)). Interestingly, apart from the already known FRKs, ScFRK1, 2 and 3, three new FRK members were found in the combined ovule/pollen transcriptome and named ScFRK4, 5 and 6. All six *Solanum chacoense* members grouped

together in a phylogenetic tree with the AtMAPKKKs 19, 20 and 21. Apart from being the smallest MEKKs, they also share similar specific motifs like the “YMAPE” signature of subdomain VIII instead of the WMAPE or FMAPE signature present in the other MEKKs ([Figure 17](#)). The family can be further divided in three groups: 1) one including ScFRK1, 2 and 6 with no *Arabidopsis* ortholog; 2) one including ScFRK3, 4 and AtMAPKKK19, 20 and 21; 3) and a third group represented by ScFRK5 alone.

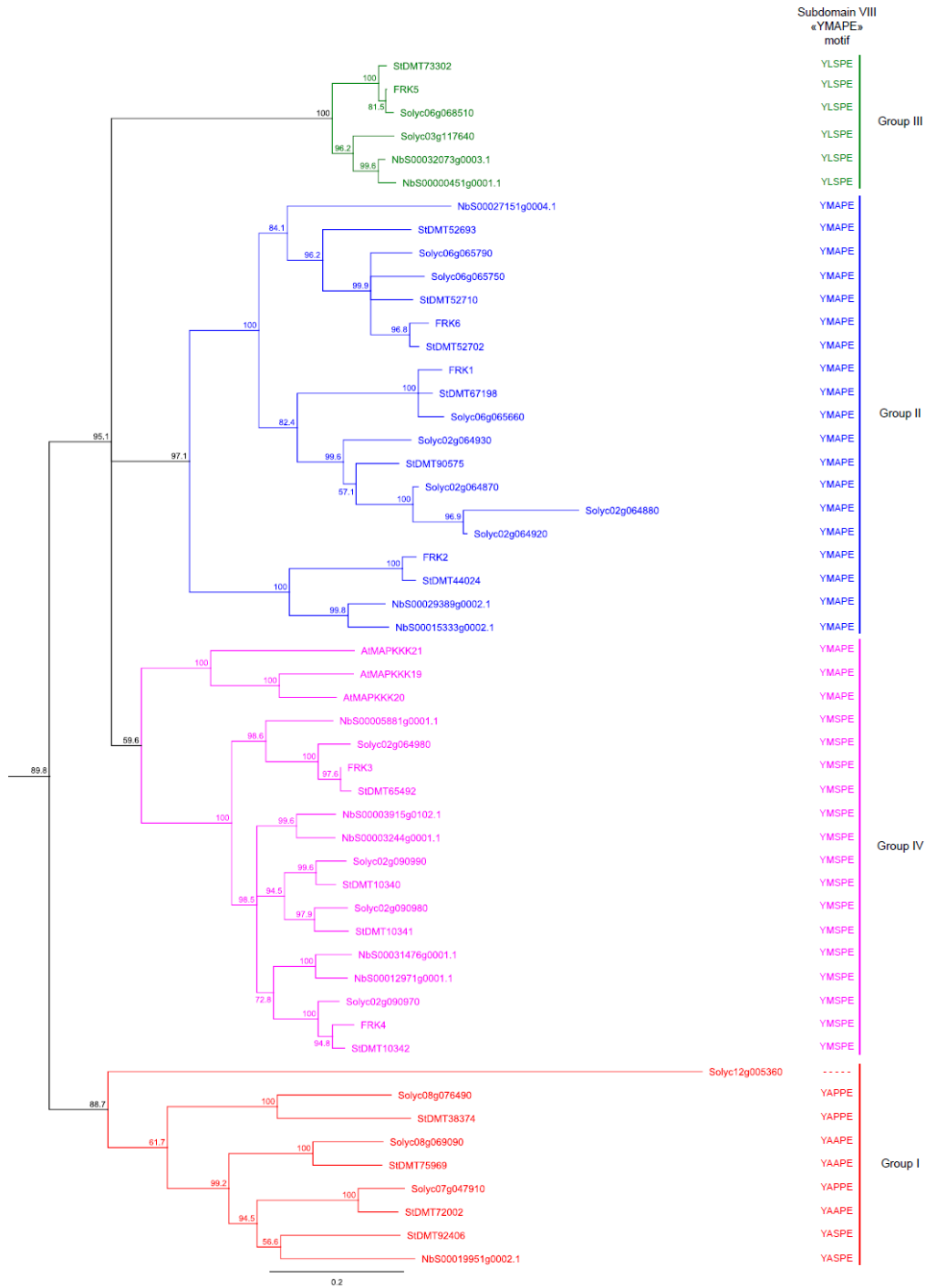


Figure 18 : Phylogenetic analysis of the FRK class in solanaceous species

Phylogenetic relationships between members of the FRK class in *Arabidopsis thaliana*, *Solanum chacoense*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* and *Nicotiana benthamiana*. The four FRK subgroups are color coded in the tree. Gene IDs and locus tags can be found in [supplementary table II](#).

Comparison of the MEKK subfamily shows an expansion of the FRK class in Solanaceous species

To determine if the expansion of the FRK class is unique to the *Solanaceae*, the genomes of three recently sequenced solanaceous species (*Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* and *Nicotiana benthamiana*) were screened using the kinase domains of AtMEKKs. To simplify the phylogenetic analysis, only MEKKs that showed less than 95% pairwise sequence identity within a species were considered. The others may result from recent duplication, be alleles or minor splice variants. As for *Arabidopsis thaliana*, alignment of the 21 MEKKs kinase domains showed only a single pair of MEKKs (AtMAPKKK6 and AtMAPKKK7) with slightly more than 95% identity (96,1%), the others being lesser than 93% identical. Interestingly, 39, 36 and 40 different MEKKs were retrieved from the *Solanum lycopersicum* (*Sl*), *Solanum tuberosum* (*St*) and *Nicotiana benthamiana* (*Nb*) genomes, respectively, which is almost twice than in *Arabidopsis thaliana*. A phylogenetic analysis of the MEKK subfamily in these four solanaceous species is presented in [Supplementary figure 1](#) and a close-up of the FRK class is shown in [Figure 18](#). Of all the MEKKs found, 17 out of 39 SlMEKKs, 15 out of 36 StMEKKs and 11 out of 40 NbMEKKs were grouped in the FRK class. Compared to *Arabidopsis*, not only has the whole MEKK subfamily expanded in solanaceous species but the FRK class is also proportionally more preponderant. In *Arabidopsis thaliana*, the FRK class represents only 14% of the MEKKs (3/21) compared to 44% (17/39) in *Solanum lycopersicum*, 42% (15/36) in *Solanum tuberosum*, and 28% (11/40) in *Nicotiana benthamiana*. The fact that the FRK class has expanded twice or thrice in solanaceous species compared to *Arabidopsis thaliana* suggests the evolution of new and specific roles in these species.

Although the FRK class represents a highly supported clade, its members can be further clustered into four groups ([Figure 18](#)). Group I (in red) comprised four MEKKs from *Solanum lycopersicum*, four from *Solanum tuberosum*, one from *Nicotiana benthamiana* but none from the *Solanum chacoense* ovule and pollen tube transcriptome. Group II (in blue) comprised seven MEKKs from *Solanum lycopersicum*, six from *Solanum tuberosum*, three from *Nicotiana benthamiana* and three from *Solanum chacoense* (ScFRK1, ScFRK2, ScFRK6). Group III (in green) comprised two MEKKs from *Solanum lycopersicum*, one from *Solanum tuberosum*, two from *Nicotiana benthamiana* and one from *Solanum chacoense* (ScFRK5). Group IV (magenta)

comprised four MEKKs from *Solanum lycopersicum*, four from *Solanum tuberosum*, five from *Nicotiana benthamiana*, two from *Solanum chacoense* (ScFRK3 and ScFRK4), and the *Arabidopsis* MAPKKK19, 20, and 21. As for the AtMAPKKK19, 20 and 21, the whole FRK class shared the tyrosine (Y) in the YMAPE motif of subdomain VIII, with the exception of the *Solanum lycopersicum* Solyc12g005360 that completely lacked the motif, most probably leading to an inactive protein kinase. With its YAAPE, YAPPE, and YASPE motifs, group I displayed the most diversified motifs. Groups II and III encompassed MEKKs that harbor the *stricto sensu* YMAPE or the YLSPE motif, respectively, while group IV kinases had either the YMSPE or YMAPE motifs. The tyrosine in that motif is clearly a distinctive feature of the FRK class, not being found in any other MEKKs in solanaceous species or in *Arabidopsis thaliana*, except for a group of four MEKKs in *Nicotiana benthamiana* that shares the YMAPE motif with the FRK class (see [supplementary figure 1](#), group in burgundy). These four MEKKs are more or less related to AtMAPKKK15, 16, 17 and 18 that are the closest relatives to the AtMAPKKK19, 20 and 21.

Uniqueness and overrepresentation of FRK class members in Solanaceous species

In order to ascertain if the expansion of the FRK class is unique to the *Solanaceae*, a family inside the asterid clade, we screened the available genomes of various species spanning the plant kingdom. From the eudicots, the genomes of *Mimulus guttatus*, an asterid in the *Phrymaceae* family, and three other members of the rosid clade, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* and *Gossypium raimondii*, were mined to assemble the full compendium of MEKKs. In addition to the above-mentioned dicots species, the genomes of two monocots (*Oryza sativa* and *Zea mays*), an ancient angiosperm (*Amborella trichopoda*, the unique representent of the *Angiospermea* sister clade), two members of the *Gymnospermea* (*Picea glauca* and *Picea abies*), a tracheophyta (*Selaginella mollendorffii*), a moss (*Physcomitrella patens*), and a green algae (*Chlamydomonas reinhardtii*) were also screened. The resulting MEKK phylogenetic tree is shown in [supplementary figure 2](#), while a close-up of the FRK class is shown in [figure 19](#). The FRK class is clearly separate from the rest of the MEKKs, still forming a monophyletic group. Interestingly, no FRK were retrieved from the genomes of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the moss *Physcomitrella patens*, the tracheophyta *Selaginella mollendorffii*, the gymnosperms *Picea glauca* and *Picea abies* and from the monocots *Oryza*

sativa and *Zea mays*. Furthermore, only one MEKK from the basal angiosperm *Amborella trichopoda* could be classified as a FRK class member, standing at the base of the FRK clade (represented in brown). The FRK class can now be divided into 5 groups: groups I (red) and II (blue) comprised only solanaceous species members (except one from *Mimulus guttatus* in group II); group III (green), the most heterogeneous group with a low bootstrap value, included proteins from all dicot species; and group IV (magenta), containing proteins from all dicot species, including AtMAPKKK19 to 21. In addition, a fifth group (light orange) appeared, containing only two *Vitis vinifera* proteins and possibly one FRK-like MEKK from poplar, Pt18227118.

All FRK class members, regardless of the species, harbored the tyrosine residue in the YMAPE motif of subdomain VIII. When considering all species, the various subdomain VIII motifs were similarly spread as observed for the five groups in the solanaceous tree ([figure 18](#)), with three exceptions: one *Mimulus guttatus* MEKK at the base of group II contained a YAAPE motif; group III, the most diversified group, not only contained the YLSPE motif, but also the YMSPE and YMAPE motifs and; in group IV, the two FRK-like proteins harbored NLAPE and SMAPE motifs, which is totally different from any other MEKKs (Y, W or F). The only *Amborella trichopoda* FRK-like protein (AmTr_v1.0_scaffold00015.13) harbored a YMSPE motif. MEKKs harboring a YMAPE motifs outside the FRKs are scarce with four in *Nicotiana benthamiana*, two in *Populus trichocarpa*, three in *Mimulus guttatus*, and two in *Physcomitrella patens* (see [supplementary figure 2](#)). No other MEKKs from any other species were found to contain the tyrosine residue in the subdomain VIII motif.

[Table I](#) summarizes the total MEKK numbers, number of FRK members among those MEKKs, genome size and the approximate number of genes for each species. Apart from the single-cell green alga *Chlamydomonas reinhardtii* where only 4 MEKKs were retrieved from a genome comprising ~17,737 genes, land plants from the embryophyta onward, here exemplified by the moss *Physcomitrella patens*, have roughly five fold or more MEKKs with the exception of *Picea glauca* where only 5 MEKKs could be identified from its enormous and complex genome estimated at 20,800 Mbp. Most of the proteins found were either incomplete or had frameshifts, complicating the assembly and analysis of the white spruce MEKK subfamily. Considering this, the *Picea abies* database was also queried. From a genome size of 20,000 Mbp, similar to one from *Picea glauca*, 19 different MEKKs including 9 partial sequences were retrieved in *Picea abies*. A phylogenetic tree showing the MEKKs from *Arabidopsis thaliana*, *Picea glauca* and *Picea abies* is shown in [supplementary figure 3](#). The first occurrence of a FRK class kinase was in the *Angiospermae*, where the basal angiosperm *Amborella trichopoda* harbored one FRK out of 15 MEKKs. Interestingly, the two monocots, maize and rice, did not harbor any FRK from their 22 MEKKs. In the eight dicots analyzed, the number of MEKKs varied by 2-fold, ranging from 21 to 40, while the number of FRKs among the MEKKs varied from 2 to 17, up to an 8-fold difference. [Figure 20](#) summarizes the number of MEKKs found in the 15 species examined compared to the FRK class members. From [table I](#), genome size in all those species varied from 119 Mbp to 20,800 Mbp and is around 900 Mbp in the solanaceous species, except for *Nicotiana benthamiana* that is expected to be around 3500 Mbp. Regardless of genome size, solanaceous species displayed the largest MEKK subfamily. This is particularly true with the FRK class, with first signs of expansion in asterid species (27%, 7/26 in *Mimulus guttatus*), with a peak in solanaceous species where around 40% of all MEKKs are part of the FRK class ([figure 20b](#)). Taken together, these data show a global expansion of the whole MEKK subfamily, especially within the FRK class in solanaceous species.

Table I: Number of MEKKs and FRKs, genome size and expected number of expressed genes for all the species.

Species	Number of MEKKs	Number of FRKs	Genome size (Mbp)	Number of expressed genes	References
<i>C. reinhardtii</i>	4	0	111	17737	Phytozome
<i>P. patens</i>	20	0	473	26610	Phytozome
<i>S. moellendorffii</i>	14	0	212.5	22273	Phytozome
<i>P. glauca</i>	5	0	20800	>40000	Dendrome Genome Project, (Birol et al., 2013)
<i>P. abies</i>	19	0	20000	28354	Spruce Genome Project, (Nystedt et al., 2013)
<i>A. trichopoda</i>	15	1	748	26846	Amborella Genome Project
<i>O. sativa</i>	22	0	372	39049	Phytozome
<i>Z. mays</i>	22	0	3233	39475	Gramene, EnsemblGenomes
<i>V. vinifera</i>	21	4	487	26346	Phytozome
<i>A. thaliana</i>	21	3	135	27416	Phytozome
<i>G. raimondii</i>	22	2	820	40976	(K. Wang et al., 2012)
<i>P. trichocarpa</i>	32	7	422.9	41335	Phytozome, (Tuskan et al., 2006)
<i>M. guttatus</i>	26	7	312.7	28140	Phytozome
<i>N. benthamiana</i>	40	11	3500	N/A	Sol Genomics Network
<i>S. lycopersicum</i>	39	17	950	35961	Sol Genomics Network
<i>S. tuberosum</i>	36	15	840	35250	Sol Genomics Network

References: Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>); Dendrome Genome Project (<http://dendrome.ucdavis.edu>); Tuskan *et al.*, 2006; Amborella Genome Project (<http://www.amborella.org>); Gramene, EnsemblGenomes (<http://ensembl.gamene.org/>); Wang *et al.*, (2012); Birol *et al.*, 2013; Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net>); Spruce Genome Project (<http://congenie.org/>); and Nystedt *et al.*, 2013.



Figure 20 : Preponderance of the FRK class members among the MEKKs from various species

A. Absolute number of FRK class members (blue) and number of other MEKKs (pink). B. Percentage of the FRK class members (blue) among the MEKK subfamily (pink).

FRKs motifs and signatures

The presence of a tyrosine in the subdomain VIII MAPE motif (YMAPE) is the most obvious distinctive feature of the whole FRK class, but is not the only one. In order to uncover other FRK specific signatures, sequence conservation levels from the 12 kinase subdomains were compared using a sequence logo graphical representation. In *Arabidopsis thaliana*, the FRKs orthologs, AtMAPKKK19-21, are closely related to the AtMAPKKK15-18, and AtMAPKKK15-21 are related to AtMAPKKK13-14 (see [figure 17](#)). Considering this association, we compared sequence logos from the FRKs alignment, the AtMAPKKK15-18 orthologs alignment, the AtMAPKKK13-14 orthologs alignment and from the AtMAPKKK1-12 orthologs alignment from all relevant species ([supplementary figure 4](#)). Changes that can be observed between the FRKs and the three other sequence logos are either spontaneous change from one amino acid to another as observed for the proline at position 2 (P₂) in subdomain II or, more frequently, a gradual transition where an underrepresented amino acid in one logo becomes more predominant in the other logos, as observed for R₃ in subdomain I, G₁ and C₅ in subdomain VIb and many others. As for the YMAPE motif and other positions where changes led to more or less specific signatures, changing them one by one or as a whole did not alter the position of the modified FRKs in the phylogeny. Thus, specific alterations in the FRKs kinase subdomain sequences are not sufficient to change the phylogeny, suggesting that sequences outside the 12 subdomains are also involved in FRKs specificity.

Group I from the FRK class shows a faster evolution rate

Sequence alignments comparison between the four different groups from the FRK class revealed that sequences from group I are more divergent than sequences from others groups. In order to verify if group I evolved more rapidly than the others, we calculated the dN/dS ratios (ω) under two different models ([table II](#)). The first model (ω_b) evaluated the background ratio of the whole family, assuming all members evolved at the same rate. The second model (ω_b, ω_{grI}) evaluated the background and group I ratios separately, assuming that group I is evolving at a different rate. The likelihood ratio test (LRT) was done using the log likelihood values of the two models and the group I branch-specific ratio model was largely accepted ($p = 0.000028$). Taken together, these results show that the FRK class group I is unique to the solanaceous species, and it evolved 1.5 time more rapidly ($\omega_{grI} 0.2165$) than groups II to IV ($\omega_b 0.1382$).

Table II: Evolutionary rate assessment of group I FRKs as determined by the log likelihood values and parameter estimates under the two models analyzed.

Model	p^a	lnL^b	ω_b^c	ω_{grI}^d
ω _b (for all)	138	-18915.804837	0.1471	-
ω _b , ω _{grI}	139	-18907.030984*	0.1382	0.2165

^a Number of parameters

^b Log likelihood values

^c Background dN/dS ratio

^d Group I dN/dS ratio (if two ratios are estimated)

* LRT statistically significant (p = 0.000028)

The FRK class members are expressed in reproductive tissues

Studied members of the *FRK class* in *Solanum chacoense* were previously shown to be tightly regulated and preferentially expressed in reproductive tissues. Indeed, *ScFRK1* is expressed in ovules (synergids and egg cell) at anthesis, and its expression decreases rapidly after pollination (Lafleur et al., 2015). *ScFRK2* is weakly expressed in most tissues, but is slightly more expressed in stamen and style, and transiently peaks in ovary immediately following fertilization (Gray-Mitsumune et al., 2006). *ScFRK3* is expressed in developing ovaries as well as in stamens (Daigle et al., unpublished results). Down-regulation of either those three genes also show reduction of fruit size and seed set due to defects in male and female gametophyte development (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015). This suggests a specialization of the *FRK class* members in reproductive development. As a first step to support this, we screened databases to determine if *FRK class* members showed preferential expression in reproductive tissues. In *Arabidopsis thaliana*, both *MAPKKK19* and *20* are highly and specifically expressed in pollen, while no data are available for *MAPKKK21*, absent from the ATH1 chip. In *Solanum chacoense*, RT-PCRs of *ScFRK3* to *6* showed that others members of the *FRK class* are expressed in reproductive and non-reproductive tissues at various levels ([supplementary figure 5a](#)). For *Populus trichocarpa*, in group IV, one out of three *FRKs* was found within the microarray data (Pt18208810) and is highly expressed in both female and male catkins as well as in roots ([supplementary figure 5b](#)). Of the four others *Populus trichocarpa* *FRKs*, three were found in the microarray data (Pt18227118, Pt18213743 and Pt18217041) and are highly expressed in male catkins and moderately expressed in female catkins, while

Pt18217041, in group III, is ubiquitously expressed ([supplementary figure 5b](#)). In *Solanum lycopersicum*, of the 17 FRKs, five from group II were not represented in any available expression database (Solyc02g064870, Solyc02g064880, Solyc02g064920, Solyc02g064930 and Solyc07g047910). Of the remaining 12 FRKs, members from group I are mostly expressed in flower buds and slightly in young fruits; members from group II are expressed in reproductive tissues and also in leaves; members from group IV are also expressed mostly in reproductive tissues and with lesser levels in roots and leaves; while members from group III are mostly ubiquitously expressed ([supplementary figure 5c](#)). In *Solanum tuberosum*, from the 15 FRKs, 10 were found in expression databases. The two group I members have different expression patterns; PGSC0003DMG400014807 (St38374) being mostly expressed in somatic tissues while PGSC0003DMG400029548 (St75969) is only expressed inside the fruit. As for tomato, members from group II and IV are expressed in reproductive tissues (immature and mature fruits) and some somatic tissues (stolon for group II and tuber and stolon for group IV). The only member from group III is mostly expressed ubiquitously, as the ones in tomato ([supplementary figure 5d](#)). These results show that many members of the FRK class, among the four species analyzed (*Populus trichocarpa*, *Solanum chacoense*, *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum*) are preferentially expressed in reproductive tissues, especially in groups I and II. Taken together and considering the reproductive defects observed in *Scfrk1*, *Scfrk2* and *Scfrk3* mutant plants, these results suggest that members of the FRK class may have a more specific role in cellular signaling events during plant reproductive development.

2.2.6. Discussion

Evolution of the MEKK and the FRK families

The MAPKKK family comprises 80 members in *Arabidopsis thaliana*, of which 21 are members of the MEKK subfamily (<https://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/MAPKKK.jsp>). Similarly, 22 MEKKs were identified in rice (Rao et al., 2010), maize (Kong et al., 2013) and in the diploid cotton *Gossypium raimondii* (Yin et al., 2013) among the 75, 74 and 78 MAPKKKs identified, respectively. A recent study in tomato identified 89 MAPKKKs with 33 of them classified as MEKKs (J. Wu et al., 2014). Our study extends the knowledge on MAPKKKs with the analysis of 10 other species, from algae to flowering plants. As shown in [figure 4](#) and [table I](#), from the

embryophyta *Physcomitrella patens* to the rosid *Arabidopsis thaliana*, the number of the MEKK subfamily members ranged from 14 to 22, except for the gymnosperm *Picea glauca*, most probably due to assembly problems arising from its large genome size, although the current number of expressed genes is more or less the same as for other plant species (Rigault et al., 2011). In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, only four MEKKs were found. This can be expected considering the unicellular nature of this organism. As a comparison, yeast also has only four MEKKs (García, Rodríguez-Peña, Bermejo, Nombela, & Arroyo, 2009; B. N. Lee & Elion, 1999; Posas & Saito, 1998; Tatebayashi, Takekawa, & Saito, 2003). Genomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* also reported that of its 1226 gene families, only 26 families harbor 10 or more members and these do not include the MAPK family (Merchant et al., 2007). The number of MEKKs is higher in the poplar genome, with 32 MEKKs. This can be partly explained by the complexity of its genome, with over 40,000 protein-coding genes, a high level of somatic mosaicism (Cohen et al., 2010) and numerous genome duplications, including the duplication that gave rise to the divergence between the poplar lineage from *Arabidopsis* over 100 million years ago (Ma) (Tuskan et al., 2006).

With a total of 26, the number of MEKKs is increasing in the asterid *Mimulus guttatus*, but it reaches the highest number within the *Solanaceae* family, with 40, 39 and 36 MEKKs for *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum*, respectively. As shown in [table I](#), their genome might be slightly more complex, but their *loci* number is similar to the one from other species. Furthermore, unlike *Brassicaceae*, the *Solanaceae* family has mostly evolved in the absence of polyploidization, except for the cultivated potato and tobacco that are recent polyploids. For instance, tomato, wild potatoes, eggplant and pepper have the same chromosome number architecture (F. Wu & Tanksley, 2010). The fact that the MEKK subfamily is much larger in solanaceous species is probably due to specific duplications of those genes and further evolution that led to novel roles in those species.

The size of the FRK class across the different species of the plant kingdom follows mostly the same pattern than the MEKK subfamily. Indeed, from the *Algae* to the *Gymnospermae*, no FRK class member was found. The first FRK-like kinase member is found in the basal *Angiospermae* *Amborella trichopoda* while none is found in rice and maize, suggesting an early loss of the FRKs in monocots. In poplar, *Arabidopsis thaliana* and *Mimulus*

guttatus, 7, 3 and 7 FRK class members have been found, respectively. Again, it is in the *Solanaceae* family that the largest FRK class is found and this holds true when the FRKs ratio is taken into account. Indeed, 28 to 44% of MEKKs are members of the FRK class in the solanaceous species compared to 0 to 22% for the others species and 27% for *Mimulus guttatus*. Clearly, the predominance of the FRK class in solanaceous species suggests the emergence of specific functions unique to those species.

What makes a FRK?

As observed in [supplementary figure 4](#), some amino acid sequence alterations are visible in the FRK class when compared to the other MEKKs orthologs. Indeed, most of the amino acid transitions appear in the AtMAPKKK13-14 orthologs, then become more frequent in the AtMAPKKK15-18 orthologs, to finally become unique or almost unique in the FRKs (such as the A₁₈ of subdomain I, the S₉ in subdomain II, the G₁ and C₅ in subdomain VIb, or the A₆ and G₁₇ of subdomain IX). This can be explained by recent duplications of the AtMAPKKK13-14 and AtMAPKKK15-18 orthologs and their evolution under specific conditions, which gave rise to the FRK class. New genes tend to be smaller and have a simpler structure (less introns/exons) than older genes (Cui et al., 2015). For example in *Arabidopsis thaliana*, AtMAPKKK13 to 21 are the smallest of the MEKKs family as well as the only one without introns in their gene structure (Danquah et al., 2015). This supports the idea of a relatively recent origin of the FRK class.

The first FRK-like protein seems to appear within the *Angiospermae* or might have originated in the common ancestor between the *Angiospermae* and *Gymnospermae*, considering the lack of information from the *Gymnospermae* ([figure 21](#)). It has rapidly duplicated and diverged in dicots ([figure 21](#), yellow stars), creating groups III and IV (groups III and IV are present in all dicots species analyzed) while being rapidly lost in the monocots ([figure 21](#), red star). Duplications occurred again within the asterids (group II) and especially within the *Solanaceae* family ([figure 21](#), yellow stars), from which group I originated. Although being the most recent, group I is also the most divergent with 49.1% pairwise identity compared to 53.8%, 57.8% and 61.6% for group II, III and IV, respectively. Group I kinase subdomain sequence logos are also the most variable, showing lesser conservation than groups II-IV. With a ω_{gr1} 1.6 times greater than others groups (ω_b), the most recent group, group I, is evolving more rapidly.

This suggests that this group, which is unique to the *Solanaceae*, is under conditions of higher selective pressure. The slight dN/dS ratios (0.1382 for groups II to IV and 0.2165 for group I) indicate that these proteins are evolving at a relatively slow rate, which is normal considering the need to conserve their catalytic activity towards specific targets, e. g. MKKs. Studies on human kinase proteins also showed low evolutionary rates (Lachowiec, Lemus, Borenstein, & Queitsch, 2015). When available, access to the genomes of other ancient angiosperms like water lily (*Nymphaeaceae* family) or *Magnolia* (*Magnoliaceae* family) as well as close species from other Solanales families such as *Ipomea batatas* (*Convolvulaceae* family), should give us better resolution of the FRK class evolution.

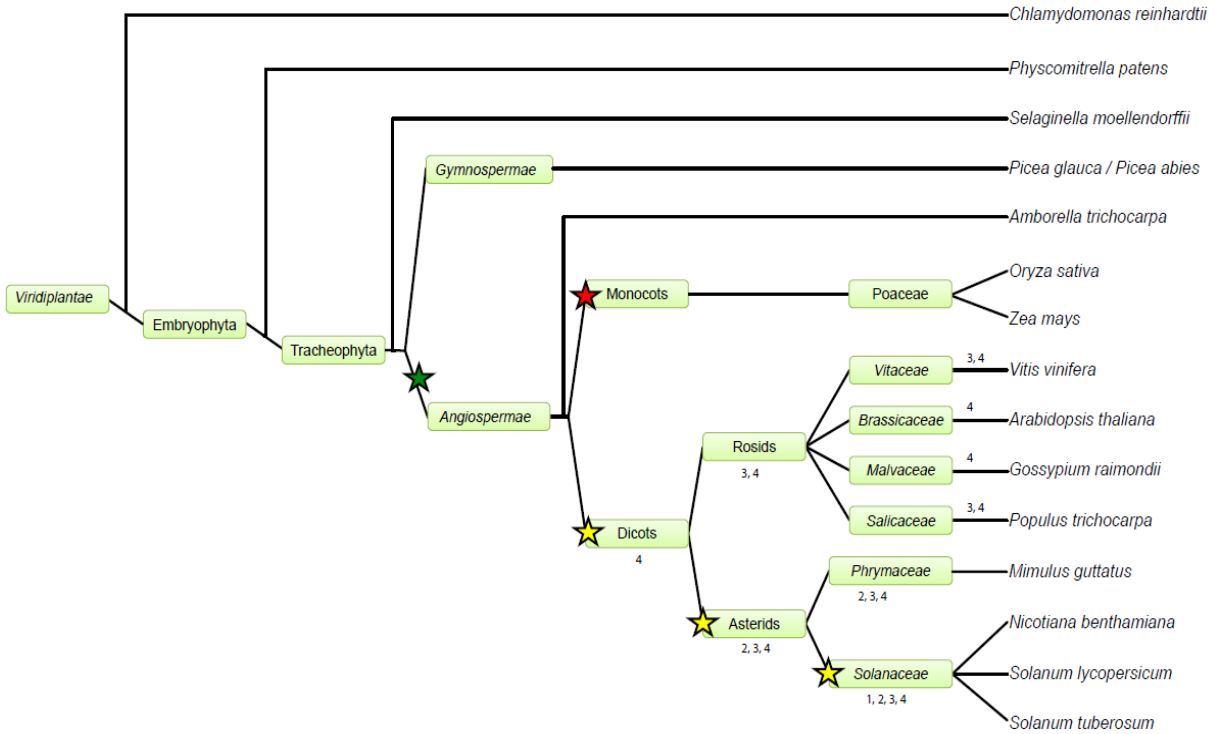


Figure 21 : Evolution of the FRK class through the plant kingdom

All species analyzed are represented. The green star shows the first appearance of a FRK-like gene in the genome of *Amborella trichopoda*. Because of the challenging task of genome sequence assembly in Gymnosperms, it cannot be determined with certainty if the first FRK-like gene appeared before or after *Angiospermae* diversification. The red star shows the loss of the FRK class in monocots while the yellow stars refer to the expansion and emergence of new FRK groups. Numbers refer to FRK groups (1 to 4) found in each species.

The role of the FRK class through evolution of the plant kingdom

The fact that there is one primitive FRK-like MEKK in *Amborella trichopoda*, and that it has been duplicated in other *Angiospermae* (except for the lost in monocots) should be investigated in terms of gametophyte developmental processes. The FRK class appearance in the *Angiospermae* matches the arrival of the three mitotic divisions of the functional megaspore and cellular specialization, to achieve embryo sac (female gametophyte) maturation (Mazliak, 2009; Williams, 2009). This is consistent with the phenotypes observed in the three FRKs that have been characterized, with a block in mitosis steps, with the vast majority being halted before the first mitosis (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015; O'Brien et al., 2007). In *Tracheophyta* and *Gymnospermae*, one egg cell takes place inside the archegonium within the female gametophyte. Although the number of archegonia found inside an ovule can be highly variable, ranging from 1 to 25 (Williams, 2009), mitotic divisions and cellular specialization is totally different from what is found in the *Angiospermae*. In *Amborella*, the embryo sac follows the same development pattern than most other *Angiospermae* species, with the exception of one more mitotic division of one of the two synergids, producing a third synergid and an egg cell (Friedman & Ryerson, 2009). Further analyses with more species genomes may be an interesting avenue for this research. Moreover, the roles of the FRKs may not be specific to reproduction since most of them are also expressed in other tissues. Investigations using mutants from species other than *Solanum chacoense* should also lead to a better understanding of this MAPKKK family and help revealing their roles.

2.2.7. Conclusion

In *Solanum chacoense*, three MEKKs, ScFRK1, ScFRK2 and ScFRK3, are involved in reproductive development. Until now, these we thought to be the direct orthologs to the AtMAPKKK19 to 21. Using a deep transcriptomic sequencing of *Solanum chacoense* ovules and pollen tubes, and the genomes and transcriptomes of 15 other species, the current analysis sheds light on the evolution of the MEKK subfamily, more specifically, the FRK class. Beginning with only one member in *Amborella trichopoda*, the FRK class expanded during *Angiospermae* evolution, most probably through gene duplication followed by diversification, reaching a maximum in the lineage leading to solanaceous species, where it reached more than 15 members in some cases. The predominance of the FRK class in solanaceous species,

representing more than 40% of the whole MEKK subfamily, strongly suggests the acquisition of new specific roles in these species.

2.2.8. Availability of supporting data

Contigs assembly can be downloaded from the NCBI Shotgun Assembly Sequences: Genome (WGS) and Transcriptome (TSA) at the following URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDZX01>.

2.2.9. Acknowledgements

We thank Dr. Simon Joly for his advices and help with the PAML software and dN/dS analyses. This work was supported by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to D.P.M. C.D. is a recipient of PhD fellowships from NSERC and from Le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT).

2.2.10. Supplementary data

Supplementary Tables

Supplementary Table I: Protein sequences of the 21 ScMEKKs found in *S. chacoense* ovule and pollen tube transcriptome.

Supplementary Table II: Genomic data resources used to retrieve MEKK subfamily members.

Supplementary Table III: Gene IDs and locus tags (if necessary) of all the MEKKs found.

Supplementary Table IV Primers used for RT-PCRs.

Supplementary Table I: Protein sequences of the 21 ScMEKKs found in *S. chacoense* ovule and pollen tube transcriptome.

	Sequence (in amino acids)
FRK1	MEKNQEAEIMWKRGRITLGQGGFGFVSLACTTHSDDSPLIPSLIA VKSCMLSHSESLEDEIEFLRMCQDCPHVIRSFVGVKVTQEDDILLY NLLLEYASAGSLADRLNNDQLGLPEFQVQKHTKNVLLGLRFIH RKGIIHCDIKPHNILLTSTDDDDAEVAKIADFGLSLTLEQSWTQ KQGMRGTKRYMAPESLLKQEYGPEDIWALGCTVYELITGTPL WESSNSDPEFDDVLHRIMYEENLENDKLSTEAKDFMSYCLIKN PKSRWSAGLLLNHSFLKSADSVLPPKRRKRQHGYSRLQRRKK AFRTQPHIRHLVIDL*
FRK2	MASIRWSRGRITIGKGAEGTVTLATTHNNFSIAVKSSLFSCSKSLQ KEREFLNEFQDCSQIIRCFGADVTEEDNNILYNILLEYAIGGSLAH RIGKKSGLPDFEVKKYSKPILLGLRVVHGKGFVHGDIKPHNILLV GTEKRAKIADFGFASKVGIGSKKRKLRGTPMYMAPESVLDDEY GTPADIWAFGCTVFEMITGKKVWDCTGINDPLHLLCKIGMQSPD LHDDKMSKQAEDFLNKCVDKDRPHSRWTADLLLNHPFLSSDND VHQRKRKELNLVDLCNSTELKPMKLLTNKRRRKLVERC*
FRK3	MDWVRGEAVGHGSFGKVNLAIPRKQSTQFLPLMVMKSSGVSHS VSLVNEKKILDELNGCPEIIRCFGESYSFENGDSLNNLLLEYATGG SLAEKLLKSENYKLSEFEVSGYTKGILKGLQYVHEVGYAHCDIK LQNILLGEDGKVKIADFGFLAKRVDELRYELRGTPLYMSPMVT GGEQGTADIWALGCVVAEMVAGVPAFRFSNVTELLMAIGVKN QLPQIPEELSEEGKDFLSKCFVQDPRKRWTAEMLLKHFPVADHD TVTLLNEEIKNGVPSISPKCPDFPDWVSDESAQSSVTCITFLPSP ENLNSSCGRWSTSPAERLMGLVSEFSTESEWCSDHWVTVR*
FRK4	MDWVRGETVGHGSFGKVSFAIPRNQSTLFSPSMVVKSSSASCSA TLMNEKMILDELKGCPIINCVDGDSYSYENGEKLYNVLLLEYACG GALSDKLNNSGDQRLPEFEVRKYTKGLIKGIHYIHKNGYVHCDI KLPNILLGKNGQVKISDFGLSKRAESKKYDKLRCELRGTPLYMS PEMVGGEQDTPADIWALGCVVAEMATGNPVWRCSITKLLMT IGLGDQLPEIPQNLSEEGKDFLEKCLVKDPKKRWTAEMLLKHPF VADEDDTVLLNEERCNSGSPSTSPRCDFPDWVSNKSAESSVTC SITSLPSPAFQESMNWSDESWSSTPTEIRELVCECRPEFEWSTAD GWVSVR*
FRK5	MQQGMESKKKIEVEELKNVNEFGDGVSWYRGAMLGKGSFGYV YLANLKNPKSKNRYLPSVMAVKSAEVSVSGSIQKEREVLSNIKG CPYVIRCFGDETTSGNNGVMAYNLLLEYGSGGTLAERINKLGLA EFEVRLYTRSMLRGLNHIHAIGYVHCDMKPENVLLVPNSSKGSV EFRAKIGDLGLAKRENQSKRRLETYWRGTPMYLSPEAVADNV QESPADIWALGCIVLEMLTGKPPWDRKDAEDVLKKIGEGHELPE IPGDLSEAKDFLKGCFVRKPTYRWTAEMLLIHPFVEGLCDNDD GVEERQEVEDINEVDSMQLVTETDDEVSIKKGAAFRRGIRWY WSEDDTEITEDEIASSFAEERMSSIRSSSIDSGFNMSMIDTSSQVASRN PSNNSKCPKFTIPAGVLALGGRREI*

FRK6	MAGLLWKRGTTLGQGGFGVVSLASTSNALFRSVTLPSLIAKSC NYSASQSLKEEVEILRMFKHSPYIAHCFGANVVSFEDNVNLYNSLP EYASGGSLADRLQNCNSLSESEVKKHTKNVLLGLSCIHNNGIIHC DIKYGNILLVGRDKTAKIADFGLSVTLEQGMNQKQGVIRGTERY MAPESVINTEYTSQVDI WALGCTVHELITGTPMWEDADGDDVL DKIEFEFPKFQNSKLSNEAQN FLEKCLVKNPSTRWTADM LLNHT FLQNSSKVANTAKTRKKKSDSMSLLHKPIQKITFKIDHHKFSRQL LDPKPLLDKPIK KITFKFGNHKFSRQLLDPKPLLHKPIQKITFKIGN HKFMRQSPDLKEVEN EPCGRVLGTDNR
isotig10269	MSRQMANAAFHKSKTLDNKYMLGDEIGKGAYGRVYKGLDLEN GDFVAIKQV SLENIAQEDLNVIMQEIDLLKNLNHNKIVKYLGSLK TKSHLFILEYVENGLANIVKPNKFGPFPELVAVYISQVLEGLV YLHEQGV IHRDIKGANILTTKEGLVKLADFGVATKLTEADVNT SVVGTPYWM APEVIEMSGVCAASDIWSVGCTVIELLTCLPPYYD LQPM PALFRIVQDDHPPIDSLSPAITDFLRQC FKKDARQRPDAK TLLSHPWIQNSRRALQSSLRHSGTIRNIEEDGSAVREASNEDDKG AAGSSSSDKAKESSTLASPEVLETSKSEEVDRSSSIRIEERTDKIE DQFTSDPVPTLAIHEKSPIQHNADGLAVNKESALQSSTDLGEPDK VFANGELEFSES RGGNTVGRKVEEKGHGVNVYSASSSSGQKNT DYSPRKA VKTSVVPQGNELSRFSDPPGDASLDDLFHPLEKNLEN RAAEVSL SASSSQIAQNNAIAETGKNDLATKLRATI AKKQMESES GPPNGDDL SIMMGVLKEDVIDMDGLGFDDKLP TENL FHLQAV EFSKLVSSLRTDESEDVIVSACQKLI AFFHQRPDQKLVFVTQHGL LPLMELLEVPKTRVMCSVLQVLNLIVQDNTDSQENACLVLIPV VMSFAAPDRPREIRMEAA YFFQQLCQSSPLTLQMFIANRGIPVLV GFLEADY AKYREMVHMAIDGMWQVFKLQRSTSRNDFCRIA AK NGILLRLINTLYSLNEAARLASASGGGGFPDGLAPRPRSGPLDP GNSSFMQTEMPSYGTDQPDM LKIKNGDRVLP SGMQEPSRTSAS HSPDSPFFRQDGERPRSSNATMEASGLSRLPDGNLVTKDRESLD RYKNDL FRAEIDLRQQRGGNTSRISTDRGSKQMEGGSYGFPAST ASQQENVRPLLSLLEKEPPSRHFSGQLEYHNLPGLEKHESILPLLH ASNEKKTNGLD FLMAEFAEVSGRGRENTNLES LPRSPHKAATKK VGGAASTDGIAS TSGFASQTASGVLSGSGVLNARPGSAASSGILS HMAPPWNADVAREYLEKVADL LLEFSAADTTVKS YMCQSLLS RLFQMFNKIEPILLKLLK CINHLSTDPHCLENLQRADAIKYLIPN LDLKEGPLVSQIHHEVLN ALFNLCINKRRQEQA AENGIIPHLMH FIMTSSPLKQYALPLLCDMAHASRNSREQLRAHGGLDVYLSLLE DELWSVTALDSIAVCLAHDNESRKVEQALLKKDAIQKMV KFFE CCPEQHFLHILEPFLKIITKSSRINTTLAVNGLTPLLVSRLDHRDAI ARLNLLKLIKAVYEHHPRPKQLIVENDLPQKLQNLIEERRD GQTS GGQVLVKQMATSL LKALHINTVL
isotig14157	MPSWWKSSKEAKKKPTKESFIDSLHRKFKSPA EVKSPGKSGGSR RHSSDIASEKGSLSQAQSRASSPSKHVSRCQSFAERPMAQPLPLP GVRPANVGR LDSGISPSAKSRVEKASKPSLLPLPKPACIRHRLDP ADTDGELVFASISSECSIESDDPIDSRQRSPLATDYEAGSRIAAGSP

	<p>SSLVVKDQSAVGGQISLKETTRPVSLSPSRNVSSVSPKRRPLSSHVT TLQVPPPGAFCSAPDSSMSSPSRSPMRAAASEQVTSSTLWAGRA YDLPPLGSGHCSSPGSGQNSGHNSMGGDMSGQLFWQPCRGSP EYSPIPSPRMTSPGPSSRIHSGAVTPIHPRAVGGAAELQTSWPDDG KAQSHPLPLPLTISNSSPFSHSNSVATSPSVPRSPGRAENLASPGS RWKKGKLLGRGTFGHVYVGFNSDSGEMCAMKEVTLFSDDAKS KESAKQLAQEIALLSRLRHPNIVQYYGTETVGDKLYIYLEYVSG GSIYKLLQEYGAFGEEAIRSYTHQILSGLAYLHAKNTVHRDIKGA NILVDPNGRIKLADFGMAKHITGQSCPLSFKGSPYWMAPEVIKNS SGCNLAVDIWSLGCTVLEMATSKPPFSQYEGVAAMFKIGNSKEL PTIPEQLSDEAKDFVRKCLQREPRLRPTAAQLLDHPFVKNVATLE KPNISPAPADPPCAGANGVKS LGIGQTRNIPTSESERLATHSSRVS KSNFHCRSFLLIILYFLTYLIFIEKLSKESI</p>
isotig15589	<p>MPSWWGKSKAKKKATKESFIDSLHRKFKSPAFAKSPSKSGGSRR HNNDIASEKGSQSQAQSRSSSSPSKNVSRCSFAESALAQPLPLPG LPSASVVRADSGISQSAKPRVEKGSKSSLFLPLPKACIRHRLDPA DADGELVFASISSECSVESDDPTDSRQRSPLAFDYETGNRTPLGS PPRLAVKDQSAVGGQISIKEATEPVNLSPSGHVSSRSPKRRPLNSHL SSIQIPSHGALCSAPDSSISSPSRSPMRAAGCEQVSSSTFWAGKTY PDLPLLGGSGHCSSPGSGQNSGHNSMGGDMVGQLFWHPSRGSPE YSPIPSPRMTSPGPSSRIHSGAVTPIHPRAGGGASELQTNWPDDTK PESHPLPRPPLAISNSSPFSHSNSVATSPSVPRSPGRAENLSSPGSR WKKKGKLLGRGTFGHVYVGFNSDSGEMCAMKEVTLFSDDAKSK ESAKQLTQEISLLSRLRHPNIVQYYGSEMVPDKLYIYLEYVSGGSI YKLLQEYGPGETAIRSYTQILSGLAYLHAKNTVHRDIKGANIL VDPNGRIKLADFGMAKHITGQSCPLSFKGSPYWMAPEVIKHTSG CNLAVDVWSLGCTVLEMATSKPPWSQYEGVAAMFKIGNGKELP AIPPELSDEGKDFVRKCLQREPRNRPTAAELLEHPFVKDAAPPEK PNMFPTSFDLPCAAANGIKPLVVGSAARNYPTPDSERLAIHSSRAS KSKFHCS DILIPKNISCPVSPIGSPLPRSPHNLNGRMSPPSPISPLNT SGSSTPISGGNGAIPFRHINQSVYLQEARTVPNSPYMNGSSYWDP DVLRGSPSGSHAFQELASVEYDALGKQFGRLATGELCNGQSALA NRVSQQLLRDHVKSISVVDLNPCPPLGGRTGGT</p>
isotig24879	<p>MYAKQKCLRPRDLRDNALKNVDYDASQSVPTSPSSLRDQPAHR TRSLDLYPVPDRTSFRIDGAAGEFDTICRSLGLSPEDFAIPVAAWE AGKPCSRSDRLRSTRLSDDRRDS DIKLEDANELSDSVRTAARVT VDAESNIRLNNLPENVIEVTISESDVETECSHSDCFGSEDELETVD EVRNGVRGIVGGKLGKHLIYSSPENLIKVRVSESEDDNLPTDVKCG IKGFRPPRLAPPATDVDDFTSAWDFIKSFGPADDEGMVSPLPDES TSDDILVNEQVEEIAKNEERREEFVRNASQVSESSSEISTDRDND SVSR TENDGACEKPFEGQVRDAAESSKSPSGDSYSLIKTSSKSPT GESDDVISEMRSKSLSGDSYALILKPVHVSVPNGSPSIKSWQKGD FLGSGSFGTVYEGFTDDGFFFAVKEVSLIDPGNQQLFQLEQEISL LSRFRHRNIVRYHGTNKDESKLYIFLELVTKGSLASVYRKYRLR DSHVSDYTRQILSGLHYLHSREVMHRDIKCANILVDANGSVKLA</p>

	DFGLAKATQLNNIKSCKGTAFWMAPEVVNRKSNNGYGTADIWS LGCTVLEMLTGQIPYSHLEGMQALFRIGRGEPPPIPDTLSTEAQDF IKSCLRVPNDRPTAAELLEHPFVMKPPSNFSGPLAP
isotig27346	MIVRSSLDSHVIDVNSNGSRCGGGGSQCSGSGRVIDLGSKLIKED ICRYSDSSKASDVIQLQVQSVELNYDRGGVVCAARVISDVSGAG TRLDDGVTVNGVVSNGNEPVSLGGGGGGGIRGLRPPLLAPPV MSLPVDDACSTWDIFRAFGPEDHRESGIAGHGICRSEVVNGDEE YMKDEEDEENSARMILGVSSLLSQSSSFTNTSNDDSSSCTTERM SIISPNGRFTRFITGWDKGGLLGRGSFGSVYEGISHDGGFFAVKEV SLLDQGDGGRQSLYQLEQEIELLRQFEHENIVQYYGTDKNDSKL YIFLELVTQGSLLNLYQKYHLRDSQVSAYTRQILHGLKYLHDRN VVHRDIKCANILVHANGSVKLADFGGLAKATKLNVDKSFKGTAL WMAPEVVNRKNPGYGLAADIWSLGCTVLEMLTRQFPYSHLENP MQVLFQIGKGEPPVVPNTLSEDARNFINHCLQVDP SARPTATQLL EHPFVKQTL PSSSGSASPLNLGRRL
isotig27662	MPSLWKAFSLSSSSQHSSSSTTTTASTTSSPADSPNTRRIYGGGRK LTRQRKLRHVSDDDLGLRRPNIQALIIDERSKSLPGSPDSYADFGS GSRSSHHLRHCSNSSAVPLPLPELNSLPKQNSVDSNLPGRVD RELLSPPLARETFGRTPAEVKSSQHPRSSTPTYQRRGFPQDLNAE GVEFRLNVPARSAPSSGFTSPVRSPKRFSTQDLFHHPLHQASSSPS EAYSFQLSPTRVINSADHSPILPSSANRIRNSRSGAVHSHHK SLPESSLGWNEANNNNVHPLPLPPGVPRQPESCTMHSNMDKPCV SPAKGQWLKGLLGRGTFGSVYEATNCETGALCAMKEVDLTPD DPKSAECIKQLEQEIRVLQQLKHQIVQYYGSEVMEDRFCIYLEY VHPGSINKYVREHCGAMTESIVRNFRHIVSGLAYLHSTKTIHRD IKGANLLVDASGVVKLADFGGLAKHLSSCATDLSLKGSPHWMAP EVMQAVLRKDANPELALAVDIWSLGCTVIEMFTGQPPWGELSW VQAMFGVLNKSPPIPEKLSPEGKDFLQCCFRRKPADRPSAIKLE HAFLRSTSSLEHSVNVAGCEDSPGKKFHDTLSPKNPINHKKEQK PLLPGTSGRHAKSPCSSETCRQPQPETCEYGAASHHSPRSALVVF PCISSMELNSSSRAASPSSVPSSFR LGPENRSPYRIIGRKFQTSV
isotig33548	MHSWWGKSSSKDVRRKSTKESFIDIINRKLKIFTTEKSSGKSGSS RRQRKDTNSVKGSQSRVSRSPSPSTPDSRSQVFADRTSSQPLPLP EGHSSNVHLVSDNSASIILVTGEVSESSLTLPMPRHLPHGPAA AGVDRDLPTASVSCDSSSDSDDLTD S RLLSPQTSYENGSR TAL NSPSSLKQKVQSPIASNASSGEMVKSATLLSNNQAISTSPRQRLLS SHVPGQLQIPHHGASYSAPDSSMSSPSRSPMRVFGHETVMNSGF LGKPHGEITFLGSGHCSSPGSGQNSGHNSIGGDMSAQPFWPHSR CSPECSPVSPRMTSPGPGSRIHSGAVTPLHPRAGGTLTESSTASL DNGKQQSHRLPLPISIPHSSVFLSCSMAPAIPRSPGRTGNPPSPG PRWKKGRLIGRGTFGHVYRGFNSESGEMCAMKEVTLFSDDPKS RESAQQLGQEISLLSRLRHPNIVQYYGSETVDDKLYIYLEYVSGG SIYKILQEYQQLGELAIQSYTQQILSGLAYLHAKNTVHRDIKAN ILVDPNGRIKLADFGMAKHITGQYCPLSFKGSPYWMAPEVIKNS NGCNLAVDIWSLGCTVLEMATTKPPWSQYEGVAAIFKIGNSKEV

	PAIPYHLSDEGKDFVRQCLQRNPLHRPTASQLLKHPFVKSTAPM ERFIGIHLKDPPCVGSEEVAVHHQPRDSNFFPGFSDVPVPRSCP VSPVGIIESPIYHSQSPKHMSGRLSPSTISSPRAVSGSSTPLSGGGA VPLSNPMMSTTSSSEVDGTSPKTQSCFYPPDDYTSHGLKSDMFRE TLPYGNGFFGENFGGHAQSGVNGQPYQGQSVLANRVAQQLLRD QVKLSPSFDLNPVSPVFSWDNGV
isotig33816	GWCSIPWEIHKPRCSKKEKEHLGSRLSRKTPQKLHVADRVSDIRIS APISAPTPPYASPLSPLKAGDLLNHNYMAFPGAFQVCSAPEMPP SDRLQYPGFSYHVLPEKNAFSDNSPHHSRVSPPQRSRKIASGPA SPLHQLLPNENSTARRESSAQGNVHPLPLPPLGATPSHSTSIPPVP SNAELTPIKGQWQKGLIGRGTFGSVYVASNRETGALCAMKEV ELLPDDPKSAESIRQLEQEINVLSHLKHPNIVQYYGSEIVGDRFYI YLEYVHPGSINKFIRDHCETITESIVRNFRHILCGLAYLHKKTIH RDIKGANLLVDAYGVVKLADFGMAKHLNGQAANLSLKGSPYW MAPELLQSVMQTDTTTDLAFATDIWSLGCTVIEMLNRRPPWSEY EAAAAMFKVLKDTPIPETLSPEGKDFLRCCFCRNPAERPSASML LEHRFMRVSHQPDVPSFIKPVGVIRVKEKLNQKEQTTYNLDQG RLSLER
isotig34208	MPAWWGKKSTKNKDPQVKEKEREKYVKPRSFDELLGRNSPRTS KDFSGSGSGFSGFDSGSSLEKAHPLPKPSVSSLGNDHGVLGCGS VSVSSTSSSGSSDGGGAVNTDQAQLDTRGLGDNRLSPLSRSPV RSRGTTTTSSPLHPRFSSLNLDSPGTGLDDVRSECHQLPLPPGSP SPSTLPNPRTCVVAEGATINMSKWKKGRLLGRGTFGHVYLGFN ENGQMCAIKEVKVVSDDQTSKECLKQLNQEIILSNLTHPNIVRY HGSELDEETLSVYLEYVSGGSIHKLLQEYGPFPREPVIQNYTRQILS GLSFLHARNTVHRDIKGANILVDPNGEIKLADFGMAKHITSSASV LSFKGSPYWMAPEVVMNTSSYGLAVDIWSLGCTILEMATSKPP WSQYEGVAAIFKIGNSKDFPEIPEHLSNDAKSFIRSCLQREPSTRP TASQLEHPPFVKNQSTAKVAHVGVTKESYPRSFDDGSRTPPVLEL HPGGRNISPGRNISPAGNYASHPVITVSRPLICTRESVKAITSLPV SPTSSPLRQYEPARKSCYLSPPHPYGGGQSGYEANDYSMFQAR PSTRTTLEPWLEIPQFRAQTPSRSPRTRPIL
isotig34351	MIGCGAFGRVYMGMNVDSGELLAIKEVSIAMNGASRERAQAHV RELEEEVNLLKNLSHPNIVRYLGTAREVGSNLILLEFVPGGSISL LGKFGSFPESVIRMYTKQLLLGLEYLHKNMHRDIKGANILVD NKGCIKLADFGASKKVELATMTGAKSMKGTPYWMAPEVILQT GHSFSADIWSVGCTIEMATGKPPWSQQYQEVAAALFHIGTTKSH PIPEHLSAEAKDFLLKCLQKEPHLRTSASNLLQHPFVTGEHQEAR PFLRSSFLGNPENMAAQRMDVRTSTNPDIRATCNGLKDVCDVST VRCSTLYPENSLGNEISLWKIGNSDDDMCQMDNDDFMFGASVKC SSDLHSRANYKSFNPMSEPDNDWPCKFDEPELTKSQANLDFAQ ATIKPTNSPIMSYKEDAFVSGGQSAEEDDELTESKIRAFLEK AMDLLKQSPLYEFLNSMNVSSSTPSPAGIGNKENFNSNVNLPPK SRSPKRFLSRRLSTATEGACAPSPVTHSKRISNIGGLGNEAIQELQ

	SPRNNEWKDPLGSQRDTVNSSFSESRQRKWKEELDEELQRKREIM RQAVNLSPPMDPVLNRCRKRSPRASPGR
isotig36119	MIGCGAFGQVYMGMNLDSELLAVKQVMIAANSASKEKAQSH VKELEEEVKLLKNLSHQHIVRYLGIVREEDTLNILLEFVPGGSISS LLGKFGSFPEPVIRTYTKQLLLGLDYLHKNGIMHRDIKGANILVD NKGCIKLADFGASKKVVELATISGAKSMKGTPTYWMSPEVIRQTG HSFSADIWSVGCTVIEMTTGKPPWSQQYQEVAALFYIVGTTKAH PPIPEHVSVEAKDFLLKCLQKEPELRPSASELLQHPFVTGEAQLSL PDGSSMMGKAQGHSSYSSGHNAKSVAGSVDICNLGTLNISTENT DNLSEARNMWRGNSSDDDMCQIDDNDNLLLDGGTTTFSTVKTLD DFNKSFNPIAEPSSDDWNCYGMTPQSRQGNTDLVNNQEGGLGA GSSASPNNSAVLCGPSISEDEDELTESKIRAFLEKALELKKLQT PLYEEFYNSLNPSYSSPQLVEATIDETTPNYLRLPPKSRSPSRGP SPSTGIDIITSPSPGSSNRRTSCIGSGSN
isotig37024	MAEFSKCSCLKPTKWLKGVIGSGSFGSVHLAMDKATGGFFVL KSTDSEAGFKCLENVEILENLDSPHIVKFIGKDLSFEANGKRKLS LFLEFMTGGSLADVAEKFGGSLDEEVICLYTKGILKGLKCLHESG IVHCDLKCKNILLGTSGEIKLADLGC AKRIKDHKVKGITKSLKSI GGTPLWMAPEILRNEELDFAADIWSLGCTIEMATGKTPWGGDI CTNPLAAVLKIACSNEMPQFPHFSDVGLDFLIKCLERDSKKRW KVEQLLDHPFVSKGKSVKIKNFK VASTPASVLD SGIFSEMDFSD QLSSDEDESTSGNALRDHGFWISTREGKMDLESSESWINVRN
isotig37044	TSSPRNYKKNRVNPKSFDESIFIPKNSPTSFATNYGYYSYTYTQ DKKLHPVFPLPLPLDSPNFSTRSSSGSSPTSSQFNDDEEQGISPLFS PFRNKCNDWSRTSNESSKPNPCTSPPTYVELDSPNGKQEECNH PRHPLPLPPNSSTKGRGTGQWKKGKLLAKGTFGNVYAGFNSNNG QMCAIKEVRIIFNDTTSKERLKLQNLQEI TLLSQFSHPNIVQYYGSE LKGDKLSLYLEYVPGGSILKLLQEYGPFEEQIISYTRKILSGLVFL HERNIAHRDIKGATILVNAKGEIKLADFGMAKHINSCCLMDSFK GSPYWMAPEVVKDAGGFSVAVDIWSLGCTVVEMATAKPPYEG ADGKDSPEIPRNLSDNAKSFLKLC LQRNPSHRLTAVQLLHHPFV QA
isotig38767	MFMEYVQGGTSLDLIKKQGGALDESMIKLYAQQILQGLDYLHSI GIVHCDVKGQNILIGENDIKIADLGC AKLLRDEKNSGFSGTPAF MAPEVARGEEQGFAADIWAFGCTIEMATGSVPWSEIKDPVSAL FRIGYSGDLPQFPNNLSNDAREFLGKCLMKCPNERWTANQLLQH PFLQSVESNSWKFEELKRDSPTSILDQGFWNSFEVMESSSLESTN TVDSATDRIRQLIGNVGISCSLMPN WVEEDDWVTVRCNDTEENS IISEPNCMIDGFGELLDMEISESIVSEDEFVTLLNLEALLVD
isotig41825	VVSVAKSRFSDEVFAVKSVELSESQLLQKEQIILSQLSSSYVVSY KGYDVTKEKDKLMFNLMMEYMPDGTLSD EIQKQGGRMNERLI GYGTKQIVQGLDYLHSRSIAHCDLKGQNILVGKTGAKIADFGCA RWIDPVEREGNAEPIGGTPMFMapeVARGEEQGPCADIWGLGCT IEMATGGSPWTNVTNAASLLYKIAFSGQSPEIPKSSLYKQGIS

Supplementary Table II: Genomic data resources used to retrieve MEKK family members.

Species	Data assembly, version or reference	URL
<i>Solanum tuberosum</i>	Peptides from Assembly v3.4 (PGSC_DM_v3.4_pep)	http://solgenomics.net/organism/Solanum_tuberosum/genome
<i>Solanum lycopersicum</i>	Peptides from Assembly 2.40 were used (Solanum_lycopersicum.SL2.20.17.pep.all)	http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/tomato/download/index.jsp
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Peptides from Assembly v0.4.4 (Niben.genome.v0.4.4.proteins.annotated)	ftp://ftp.solgenomics.net/genomes/Nicotiana_benthamiana/annotation/
<i>Mimulus guttatus</i>	CDS from Assembly v1.1 (Mguttatus_140_cds)	ftp://ftp.jgi-psf.org/pub/compngen/phytozome/v9.0/Mguttatus_v1.1/
<i>Populus trichocarpa</i>	CDS from Assembly v8.0 (Ptrichocarpa_156_cds)	http://www.plantgdb.org/XGDB/phplib/download.php?GDB=Pt
<i>Amborella trichopoda</i>	Peptides from EVM 27 (Amborella EVM 27 predicted proteins)	http://www.amborella.org/
<i>Oryza sativa</i>	<i>In Silico</i> analysis as described by Rao <i>et al.</i> (2010) (Rao <i>et al.</i> , 2010)	
<i>Zea mays</i>	Data from Kong <i>et al.</i> (2013) (F. Kong <i>et al.</i> , 2012)	
<i>Picea glauca</i>	Unigenes contigs from TreeGenes (unigene_Picea glauca)	http://dendrome.ucdavis.edu/treegenes/transcriptome/transcriptome_summary.php

<i>Picea abies</i>	Peptides from the Spruce Genome Project (congenie.org)	http://congenie.org/start
<i>Physcomitrella patens</i>	Peptides from the V6 version (P.patens.V6_filtered_coss_moss_protein_codons)	http://www.plantgdb.org/XGB/phplib/download.php?GDB=Pp
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Proteins from the Creinhardtii_236 version (Creinhardtii_236_proteins)	ftp://ftp.jgi-psf.org/pub/compngen/phytozome/v9.0/Creinhardtii/annotation
<i>Selaginella mollendorffii</i>	Proteins from the version 9 (Smoellendorffii_91_protein)	ftp://ftp.jgi-psf.org/pub/compngen/phytozome/v9.0/Smoellendorffii
<i>Vitis vinifera</i>	Proteins from version 9 (Vvinifera_145_protein)	ftp://ftp.jgi-psf.org/pub/compngen/phytozome/v9.0/Vvinifera
<i>Gossypium Raimondii</i>	Data from Yin et al. (2013) (Yin et al., 2013)	

References

Supplementary Table III: Gene IDs and locus tags (if necessary) of all the MEKKs found

Species	MEKKs	Acc. Number NCBI	Other (known) names
<i>A. thaliana</i>	AtMAPKKK1	Gene ID: 837421 AT1G09000	ANP1, NP1, NPK1- related protein kinase 1
	AtMAPKKK2	Gene ID: 841937 AT1G54960	ANP2, NP2, NPK1- related protein kinase 2
	AtMAPKKK3	Gene ID: 841792 AT1G53570	
	AtMAPKKK4	Gene ID: 842674 AT1G63700	YDA, YODA
	AtMAPKKK5	Gene ID: 836819 AT5G66850	
	AtMAPKKK6	Gene ID: 819989 AT3G07980	MAP3K ϵ 2
	AtMAPKKK7	Gene ID: 820555 AT3G13530	MAP3K ϵ 1
	AtMAPKKK8	Gene ID: 826409 AT4G08500	MEKK1
	AtMAPKKK9	Gene ID: 826407 AT4G08480	MEKK2
	AtMAPKKK10	Gene ID: 826406 AT4G08470	
	AtMAPKKK11	Gene ID: 826810 AT4G12020	
	AtMAPKKK12	Gene ID: 819774 AT3G06030	ANP3, NP3, NPK1- related protein kinase 3
	AtMAPKKK13	Gene ID: 837226 AT1G07150	
	AtMAPKKK14	Gene ID: 817555 AT2G30040	
	AtMAPKKK15	Gene ID: 835600 AT5G55090	
	AtMAPKKK16	Gene ID: 828796 AT4G26890	
	AtMAPKKK17	Gene ID: 817812 AT2G32510	
	AtMAPKKK18	Gene ID: 839324 AT1G05100	
	AtMAPKKK19	Gene ID: 836843 AT5G67080	
	AtMAPKKK20	Gene ID: 824193 AT3G50310	
	AtMAPKKK21	Gene ID: 3770588 AT4G36950	

<i>S. lycopersicum</i>	Solyc01g079750		SIMAPKKK4
	Solyc01g098980		SIMAPKKK8
	Solyc01g103240		SIMAPKKK9
	Solyc01g104530		SIMAPKKK10
	Solyc02g064870		
	Solyc02g064880		
	Solyc02g064920		
	Solyc02g064930		SIMAPKKK13
	Solyc02g064980		SIMAPKKK14
	Solyc02g065110		SIMAPKKK15
	Solyc02g090430		SIMAPKKK20
	Solyc02g090970		SIMAPKKK21
	Solyc02g090980		SIMAPKKK22
	Solyc02g090990		SIMAPKKK23
	Solyc03g025360		SIMAPKKK26
	Solyc03g117640		SIMAPKKK29
	Solyc04g064590		SIMAPKKK33
	Solyc04g079400		SIMAPKKK35
	Solyc06g036080		SIMAPKKK37
	Solyc06g065660		
	Solyc06g065750		
	Solyc06g065790		
	Solyc06g068510		SIMAPKKK38
	Solyc07g047910		SIMAPKKK48
	Solyc07g051860		SIMAPKKK50
	Solyc07g051870		SIMAPKKK51
	Solyc07g051880		SIMAPKKK52
	Solyc07g051890		SIMAPKKK53
	Solyc07g051920		SIMAPKKK54
	Solyc07g051930		SIMAPKKK55
Solyc07g053170		SIMAPKKK56	
Solyc07g064820		SIMAPKKK59	
Solyc08g069090		SIMAPKKK63	
Solyc08g076490		SIMAPKKK64	
Solyc08g081210		SIMAPKKK66	
Solyc11g006000		SIMAPKKK80	
Solyc11g033270		SIMAPKKK82	
Solyc12g005360		SIMAPKKK83	
Solyc12g088940		SIMAPKKK87	
<i>S. tuberosum</i>	StDMT01980	PGSC0003DMP4000 01453#PGSC0003DM T400001980	

StDMT01981	PGSC0003DMP4000 01454#PGSC0003DM T400001981	
StDMT10340	PGSC0003DMP4000 07205#PGSC0003DM T400010340	
StDMT10341	PGSC0003DMP4000 07206#PGSC0003DM T400010341	
StDMT10342	PGSC0003DMP4000 07207#PGSC0003DM T400010342	
StDMT20760	PGSC0003DMP4000 14144#PGSC0003DM T400020760	
StDMT20761	PGSC0003DMP4000 14145#PGSC0003DM T400020761	
StDMT20764	PGSC0003DMP4000 14148#PGSC0003DM T400020764	
StDMT23236	PGSC0003DMP4000 15822#PGSC0003DM T400023236	
StDMT26091	PGSC0003DMP4000 17815#PGSC0003DM T400026091	
StDMT26093	PGSC0003DMP4000 17816#PGSC0003DM T400026093	
StDMT31805	PGSC0003DMP4000 21570#PGSC0003DM T400031805	
StDMT36857	PGSC0003DMP4000 25003#PGSC0003DM T400036857	
StDMT38374	PGSC0003DMP4000 26063#PGSC0003DM T400038374	
StDMT38860	PGSC0003DMP4000 26412#PGSC0003DM T400038860	
StDMT38861	PGSC0003DMP4000 26413#PGSC0003DM T400038861	

StDMT38863	PGSC0003DMP4000 26414#PGSC0003DM T400038863	
StDMT38864	PGSC0003DMP4000 26415#PGSC0003DM T400038864	
StDMT39934	PGSC0003DMP4000 27063#PGSC0003DM T400039934	
StDMT39935	PGSC0003DMP4000 27064#PGSC0003DM T400039935	
StDMT39936	PGSC0003DMP4000 27065#PGSC0003DM T400039936	
StDMT39937	PGSC0003DMP4000 27066#PGSC0003DM T400039937	
StDMT40869	PGSC0003DMP4000 27723#PGSC0003DM T400040869	
StDMT44024	PGSC0003DMP4000 29864#PGSC0003DM T400044024	
StDMT44025	PGSC0003DMP4000 29865#PGSC0003DM T400044025	
StDMT52693	PGSC0003DMP4000 35528#PGSC0003DM T400052693	
StDMT52702	PGSC0003DMP4000 35533#PGSC0003DM T400052702	
StDMT52710	PGSC0003DMP4000 35535#PGSC0003DM T400052710	
StDMT52743	PGSC0003DMP4000 35555#PGSC0003DM T400052743	
StDMT57171	PGSC0003DMP4000 38451#PGSC0003DM T400057171	
StDMT61013	PGSC0003DMP4000 41077#PGSC0003DM T400061013	

StDMT61014	PGSC0003DMP4000 41078#PGSC0003DM T400061014	
StDMT61015	PGSC0003DMP4000 41079#PGSC0003DM T400061015	
StDMT63857	PGSC0003DMP4000 43019#PGSC0003DM T400063857	
StDMT63858	PGSC0003DMP4000 43020#PGSC0003DM T400063858	
StDMT64172	PGSC0003DMP4000 43252#PGSC0003DM T400064172	
StDMT65492	PGSC0003DMP4000 44175#PGSC0003DM T400065492	
StDMT67126	PGSC0003DMP4000 45281#PGSC0003DM T400067126	
StDMT67198	PGSC0003DMP4000 45331#PGSC0003DM T400067198	
StDMT67237	PGSC0003DMP4000 45362#PGSC0003DM T400067237	
StDMT67238	PGSC0003DMP4000 45363#PGSC0003DM T400067238	
StDMT67244	PGSC0003DMP4000 45369#PGSC0003DM T400067244	
StDMT72002	PGSC0003DMP4000 48685#PGSC0003DM T400072002	
StDMT73302	PGSC0003DMP4000 49581#PGSC0003DM T400073302	
StDMT73303	PGSC0003DMP4000 49582#PGSC0003DM T400073303	
StDMT73304	PGSC0003DMP4000 49583#PGSC0003DM T400073304	

	StDMT73788	PGSC0003DMP4000 49944#PGSC0003DM T400073788	
	StDMT75969	PGSC0003DMP4000 51445#PGSC0003DM T400075969	
	StDMT83928	PGSC0003DMP4000 56168#PGSC0003DM T400083928	
	StDMT90575	PGSC0003DMP4000 62250#PGSC0003DM T400090575	
	StDMT90976	PGSC0003DMP4000 62651#PGSC0003DM T400090976	
	StDMT92406	PGSC0003DMP4000 64081#PGSC0003DM T400092406	
<i>N. benthamiana</i>	NbS00000157g0020.1		
	NbS00000451g0001.1		
	NbS00001100g0032.1		
	NbS00003244g0001.1		
	NbS00003915g0102.1		
	NbS00005060g0004.1		
	NbS00005088g0102.1		
	NbS00005088g0110.1		
	NbS00005881g0001.1		
	NbS00007599g0011.1		
	NbS00008390g0005.1		
	NbS00008866g0001.1		
	NbS00008984g0009.1		
	NbS00009115g0011.1		
	NbS00009351g0002.1		
	NbS00010186g0025.1		
	NbS00011174g0009.1		
	NbS00012971g0001.1		
	NbS00013054g0005.1		
	NbS00013254g0023.1		
	NbS00014457g0014.1		
	NbS00015333g0002.1		
	NbS00016417g0008.1		
NbS00016734g0008.1			
NbS00019856g0007.1			
NbS00019951g0002.1			

	NbS00021069g0005.1		
	NbS00023343g0001.1		
	NbS00024903g0006.1		
	NbS00026683g0007.1		
	NbS00027151g0004.1		
	NbS00028218g0004.1		
	NbS00028906g0101.1		
	NbS00029389g0002.1		
	NbS00031476g0001.1		
	NbS00031960g0003.1		
	NbS00032073g0003.1		
	NbS00036784g0001.1		
	NbS00041747g0015.1		
	NbS00045519g0007.1		
	NbS00047703g0009.1		
	NbS00053762g0005.1		
	NbS00057060g0004.1		
	NbS00058641g0004.1		
	NbS00058681g0001.1		
<i>M. guttatus</i>	Mg17669913	mgv1a019444m PACi d:17669913	
	Mg17670449	mgv1a025509m PACi d:17670449	
	Mg17673630	mgv1a008588m PACi d:17673630	
	Mg17675007	mgv1a021391m PACi d:17675007	
	Mg17675029	mgv1a009594m PACi d:17675029	
	Mg17675141	mgv1a022903m PACi d:17675141	
	Mg17676315	mgv1a021677m PACi d:17676315	
	Mg17676821	mgv1a021688m PACi d:17676821	
	Mg17677279	mgv1a003315m PACi d:17677279	
	Mg17677329	mgv1a025764m PACi d:17677329	
	Mg17677469	mgv1a020948m PACi d:17677469	
	Mg17677819	mgv1a024020m PACi d:17677819	

	Mg17682496	mgv1a003649m PACid:17682496	
	Mg17682524	mgv1a026298m PACid:17682524	
	Mg17682543	mgv1a003872m PACid:17682543	
	Mg17683764	mgv1a023179m PACid:17683764	
	Mg17684977	mgv1a008079m PACid:17684977	
	Mg17685306	mgv1a001468m PACid:17685306	
	Mg17687864	mgv1a019636m PACid:17687864	
	Mg17687895	mgv1a017805m PACid:17687895	
	Mg17688029	mgv1a006112m PACid:17688029	
	Mg17689954	mgv1a002847m PACid:17689954	
	Mg17689955	mgv1a002848m PACid:17689955	
	Mg17689956	mgv1a002852m PACid:17689956	
	Mg17691318	mgv1a002756m PACid:17691318	
	Mg17691840	mgv1a002030m PACid:17691840	
	Mg17692445	mgv1b019097m PACid:17692445	
	Mg17693018	mgv1a025547m PACid:17693018	
	Mg17695757	mgv1a001116m PACid:17695757	
	Mg17696182	mgv1a025013m PACid:17696182	
	Mg17697027	mgv1a017677m PACid:17697027	
	Mg17697537	mgv1a023811m PACid:17697537	
<i>P. trichocarpa</i>	Pt18206224	POPTR_0005s14170.1 PACid:18206224	
	Pt18206854	POPTR_0005s16210.1 PACid:18206854	

Pt18207901	POPTR_0005s03640. 1 PACid:18207901	
Pt18208810	POPTR_0005s18240. 1 PACid:18208810	
Pt18208825	POPTR_0005s06330. 1 PACid:18208825	
Pt18208980	POPTR_0005s18230. 1 PACid:18208980	
Pt18208984	POPTR_0005s09700. 1 PACid:18208984	
Pt18213743	POPTR_0006s19480. 1 PACid:18213743	
Pt18214134	POPTR_0021s00300. 1 PACid:18214134	
Pt18216310	POPTR_0003s12910. 1 PACid:18216310	
Pt18216602	POPTR_0003s13010. 1 PACid:18216602	
Pt18217041	POPTR_0003s18240. 1 PACid:18217041	
Pt18221893	POPTR_0013s02360. 1 PACid:18221893	
Pt18222326	POPTR_0014s15310. 1 PACid:18222326	
Pt18223733	POPTR_0014s03480. 1 PACid:18223733	
Pt18224506	POPTR_0004s00910. 1 PACid:18224506	
Pt18227118	POPTR_0009s13360. 1 PACid:18227118	
Pt18227472	POPTR_0009s07730. 1 PACid:18227472	
Pt18230291	POPTR_0012s12950. 1 PACid:18230291	
Pt18232632	POPTR_0015s12870. 1 PACid:18232632	
Pt18235201	POPTR_0001s28520. 1 PACid:18235201	
Pt18235697	POPTR_0001s09520. 1 PACid:18235697	
Pt18235698	POPTR_0001s09520. 3 PACid:18235698	
Pt18235699	POPTR_0001s09520. 2 PACid:18235699	

	Pt18235777	POPTR_0001s03390. 1 PACid:18235777	
	Pt18242206	POPTR_0010s10210. 1 PACid:18242206	
	Pt18242572	POPTR_0007s11420. 1 PACid:18242572	
	Pt18242944	POPTR_0007s10930. 1 PACid:18242944	
	Pt18243158	POPTR_0007s07900. 1 PACid:18243158	
	Pt18243224	POPTR_0007s04070. 1 PACid:18243224	
	Pt18244724	POPTR_0002s13050. 1 PACid:18244724	
	Pt18245706	POPTR_0002s08950. 1 PACid:18245706	
	Pt18246774	POPTR_0002s21350. 1 PACid:18246774	
	Pt18248307	POPTR_0008s14880. 1 PACid:18248307	
	Pt18248308	POPTR_0008s14880. 2 PACid:18248308	
<i>V. vinifera</i>	GSVIVT0100004700 1 PACid:17816662		
	GSVIVT0100025600 1 PACid:17816833		
	GSVIVT0100425400 1 PACid:17818962		
	GSVIVT0100744600 1 PACid:17820298		
	GSVIVT0100893800 1 PACid:17821456		
	GSVIVT0100957500 1 PACid:17821956		
	GSVIVT0101203100 1 PACid:17823759		
	GSVIVT0101390900 1 PACid:17825038		
	GSVIVT0101791500 1 PACid:17828009		
	GSVIVT0101973900 1 PACid:17829310		
	GSVIVT0101979600 1 PACid:17829353		

	GSVIVT0102211700 1 PACid:17831030		
	GSVIVT0102282700 1 PACid:17831503		
	GSVIVT0102304800 1 PACid:17831655		
	GSVIVT0102307900 1 PACid:17831673		
	GSVIVT0102321600 1 PACid:17831764		
	GSVIVT0102648700 1 PACid:17834182		
	GSVIVT0102889700 1 PACid:17835891		
	GSVIVT0103045200 1 PACid:17836951		
	GSVIVT0103876000 1 PACid:17842953		
	XP_002266649		
<i>G. raimondii</i>	Cotton_D_gene_1000 0305		
	Cotton_D_gene_1000 1555		
	Cotton_D_gene_1000 2230		
	Cotton_D_gene_1000 3410		
	Cotton_D_gene_1000 6972		
	Cotton_D_gene_1000 8602		
	Cotton_D_gene_1001 7021		
	Cotton_D_gene_1001 8040		
	Cotton_D_gene_1001 9751		
	Cotton_D_gene_1002 4896		
	Cotton_D_gene_1002 5330		
	Cotton_D_gene_1002 9669		
	Cotton_D_gene_1003 0314		

	Cotton_D_gene_1003 0328		
	Cotton_D_gene_1003 0510		
	Cotton_D_gene_1003 1221		
	Cotton_D_gene_1003 2983		
	Cotton_D_gene_1003 3856		
	Cotton_D_gene_1003 4692		
	Cotton_D_gene_1003 8046		
	Cotton_D_gene_1003 9321		
	Cotton_D_gene_1004 0437		
<i>O. sativa</i>	LOC_Os01g50370		
	LOC_Os01g50400		
	LOC_Os01g50410		
	LOC_Os01g50420		
	LOC_Os02g21700		
	LOC_Os02g32610		
	LOC_Os02g35010		
	LOC_Os02g44642		
	LOC_Os03g15570		
	LOC_Os03g18170		
	LOC_Os03g49640		
	LOC_Os03g55560		
	LOC_Os04g35700		
	LOC_Os04g47240		
	LOC_Os04g56530		
	LOC_Os05g46750		
	LOC_Os05g46760		
	LOC_Os07g02780		
	LOC_Os08g32600		
	LOC_Os09g21510		
	LOC_Os10g04000		
	LOC_Os10g04010		
<i>Z. mays</i>	AC209208.3-FGT001		ZmMAPKKK6
	BT034005.1		ZmMAPKKK3
	GRMZM2G017654- T01		ZmMAPKKK14

	GRMZM2G034877-T01		ZmMAPKKK8
	GRMZM2G041774-T01		ZmMAPKKK22
	GRMZM2G044557-T01		ZmMAPKKK13
	GRMZM2G064613-T01		ZmMAPKKK15
	GRMZM2G066120-T01		ZmMAPKKK11
	GRMZM2G093316-T01		ZmMAPKKK5
	GRMZM2G098828-T01		ZmMAPKKK16
	GRMZM2G130927-T01		ZmMAPKKK12
	GRMZM2G140726-T01		ZmMAPKKK1
	GRMZM2G156800-T01		ZmMAPKKK9
	GRMZM2G165099-T01		ZmMAPKKK19
	GRMZM2G173965-T01		ZmMAPKKK21
	GRMZM2G175504-T01		ZmMAPKKK4
	GRMZM2G180555-T01		ZmMAPKKK10
	GRMZM2G305066-T01		ZmMAPKKK18
	GRMZM2G439350-T01		ZmMAPKKK17
	GRMZM2G476477-T01		ZmMAPKKK20
	GRMZM2G540772-T01		ZmMAPKKK2
	LOC100281440 precursor_GRMZM2G378479-T01		ZmMAPKKK7
<i>A. trichopoda</i>	AmTr_v1.0_scaffold0007.31		
	AmTr_v1.0_scaffold0007.127		
	AmTr_v1.0_scaffold0007.128		

	AmTr_v1.0_scaffold0 0009.178		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0015.13		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0021.129		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0021.130		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0024.46		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0034.46		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0069.132		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0071.8		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0099.42		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0105.35		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0106.46		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0156.23		
	AmTr_v1.0_scaffold0 0169.27		
<i>P. glauca</i>	gnl UG Pgl#S4835911 3 - partial		
	gnl UG Pgl#S5534427 6 - partial		
	gnl UG Pgl#S5534649 1 - partial		
	gnl UG Pgl#S5534741 2 - partial		
	gnl UG Pgl#S5534773 4		
<i>S. moellendorffi i</i>	24258 PACid:154170 35		
	55695 PACid:154222 50		
	65764 PACid:154078 35		
	73444 PACid:154068 71		

	73721 PACid:154091 83		
	74353 PACid:154091 07		
	76216 PACid:154142 07		
	82067 PACid:154080 94		
	86240 PACid:154212 74		
	113703 PACid:15418 451		
	139837 PACid:15406 526		
	164743 PACid:15412 823		
	438664 PACid:15422 682		
	444546 PACid:15417 419		
<i>P. patens</i>	Pp1s8_299V6.1		
	Pp1s10_200V6.1		
	Pp1s17_36V6.1		
	Pp1s20_383V6.1		
	Pp1s35_323V6.1		
	Pp1s43_178V6.1		
	Pp1s44_113V6.1		
	Pp1s66_286V6.1		
	Pp1s99_12V6.1		
	Pp1s100_149V6.1		
	Pp1s131_142V6.1		
	Pp1s136_5V6.3		
	Pp1s151_3V6.1		
	Pp1s151_4V6.1		
	Pp1s188_1V6.1		
	Pp1s216_64V6.1		
	Pp1s281_41V6.1		
	Pp1s281_44V6.1		
	Pp1s351_40V6.1		
Pp1s387_39V6.1			
<i>C. reinhardtii</i>	Cre07.g317300.t1.3 P ACid:27563909		
	Cre10.g464100.t1.2 P ACid:27579952		

	Cre17.g733300.t1.3 P ACid:27571481		
	g396.t1 PACid:27578 203		
<i>P. abies</i>	MA_11360g0010 partial		
	MA_12842g0020 partial		
	MA_12842g0030		
	MA_15568g0010		
	MA_17530g0010		
	MA_21577g0010		
	MA_38298g0010 partial		
	MA_52416g0010		
	MA_72906g0010		
	MA_106297g0010		
	MA_130871g0010 partial		
	MA_183773g0010 partial		
	MA_238866g0010 partial		
	MA_276143g0010 partial		
	MA_10426326g0010		
	MA_10427758g0010		
	MA_10431188g0010 partial		
	MA_10431312g0010		
	MA_10434470g0010 partial		

Supplementary Table IV: Primers used for RT-PCRs

Primers	Sequences	Amplicon (bp)
FRK1 RT-PCR F	5'-CCAAAGAAGAGGAAGAGGCAAC-3'	350
FRK1 RT-PCR R	5'-GGTGAGAAATAACCCATACGACG-3'	
FRK2 RT-PCR F	5'-GGATTCGCAAGCAAGGTTGG-3'	360
FRK2 RT-PCR R	5'-CCTTCCTCTTCCTCTGATGAAC-3'	
FRK3 RT-PCR F	5'-GTCCATTTGATTTCCCAGATTG-3'	343
FRK3 RT-PCR R	5'-GTGGCAACCAATGTTATGTAC-3'	
FRK4 RT-PCR F	5'-GCAACAGTGGCAGCCCTTCAAC-3'	338
FRK4 RT-PCR R	5'-TGGCCTAGCCTAATCACTAAATTG-3'	
FRK5 RT-PCR F	5'-GAAATCGCCTCTTCGTTTGCTG-3'	227
FRK5 RT-PCR R	5'-CTACAGAGAGTGTAGCCAAATAAG-3'	
FRK6 RT-PCR F	5'-GCAATTGCTAGATCCGAAGC-3'	288
FRK6 RT-PCR R	5'-GGATCAAACCCATACATACTTC-3'	

Supplementary Figures

Figure S1: Phylogenetic analysis of the MEKK subfamily in four Solanaceous species (*S. chacoense*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, and *N. benthamiana*).

The kinase domain of the *A. thaliana* BRI1 receptor kinase was used as the outgroup to root the tree.

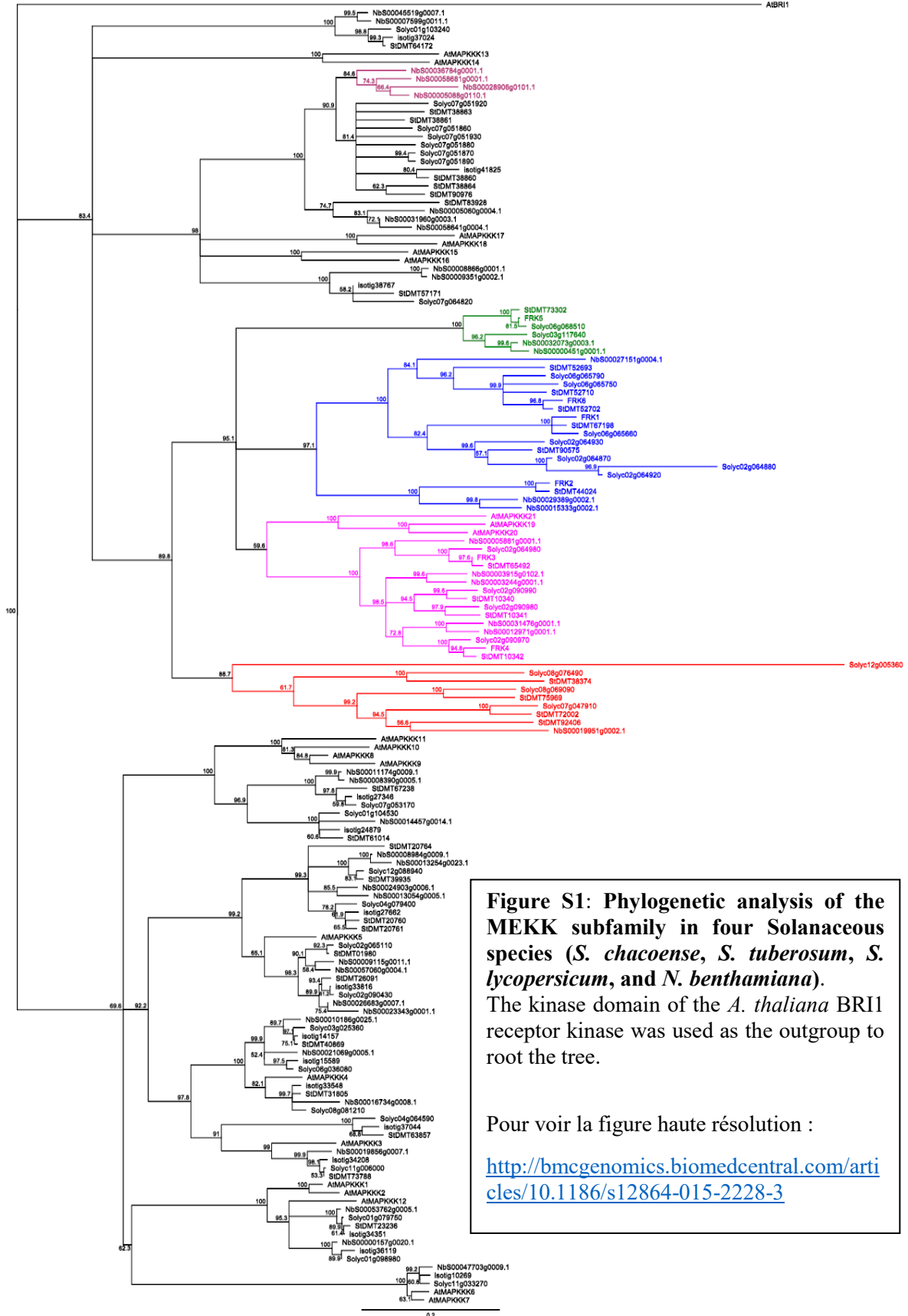
Figure S2: Phylogenetic analysis of the whole MEKK subfamily into the 15 studied species and *S. chacoense*. The kinase domain of the *A. thaliana* BRI1 receptor kinase was used as the outgroup to root the tree.

Figure S3: Phylogenetic analysis of the whole MEKK subfamily in *P. abies*, *P. glauca* and *A. thaliana*. Sequence from AtMPK1 was used as the outgroup to root the tree.

Figure S4: Sequence logos of the 12 subdomains of the kinase catalytic domain from all FRKs orthologs, AtMAPKKK15-18 orthologs, AtMAPKKK13-14 orthologs, and AtMAPKKK1-12 orthologs. Sequence alignments of all AtMAPKKK1-12 orthologs were used to create a sequence logo using the WebLogo website (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) in order to compare the 12 kinase subdomains. The same procedure was applied to AtMAPKKK13-14 orthologs, the AtMAPKKK15-18 orthologs and all the FRK-like proteins, separately. Sequence logos were also used to compare each group (groups I to IV) of the FRK class.

Figure S5: Expression analysis of members of the *FRK* class in four species.

A. RT-PCR expression analyses of *ScFRK1* to *6* from various tissues in *S. chacoense*. B-D. Absolute expression data taken from *P. trichocarpa* (B), *S. lycopersicum* (C), and *S. tuberosum* (D) available in The Bio-Analytic Resource (BAR) for plant biology, (<http://bbc.botany.utoronto.ca>). Columns in the heat maps are independent from each other. Lowest expression level is represented in yellow while the highest is in red.



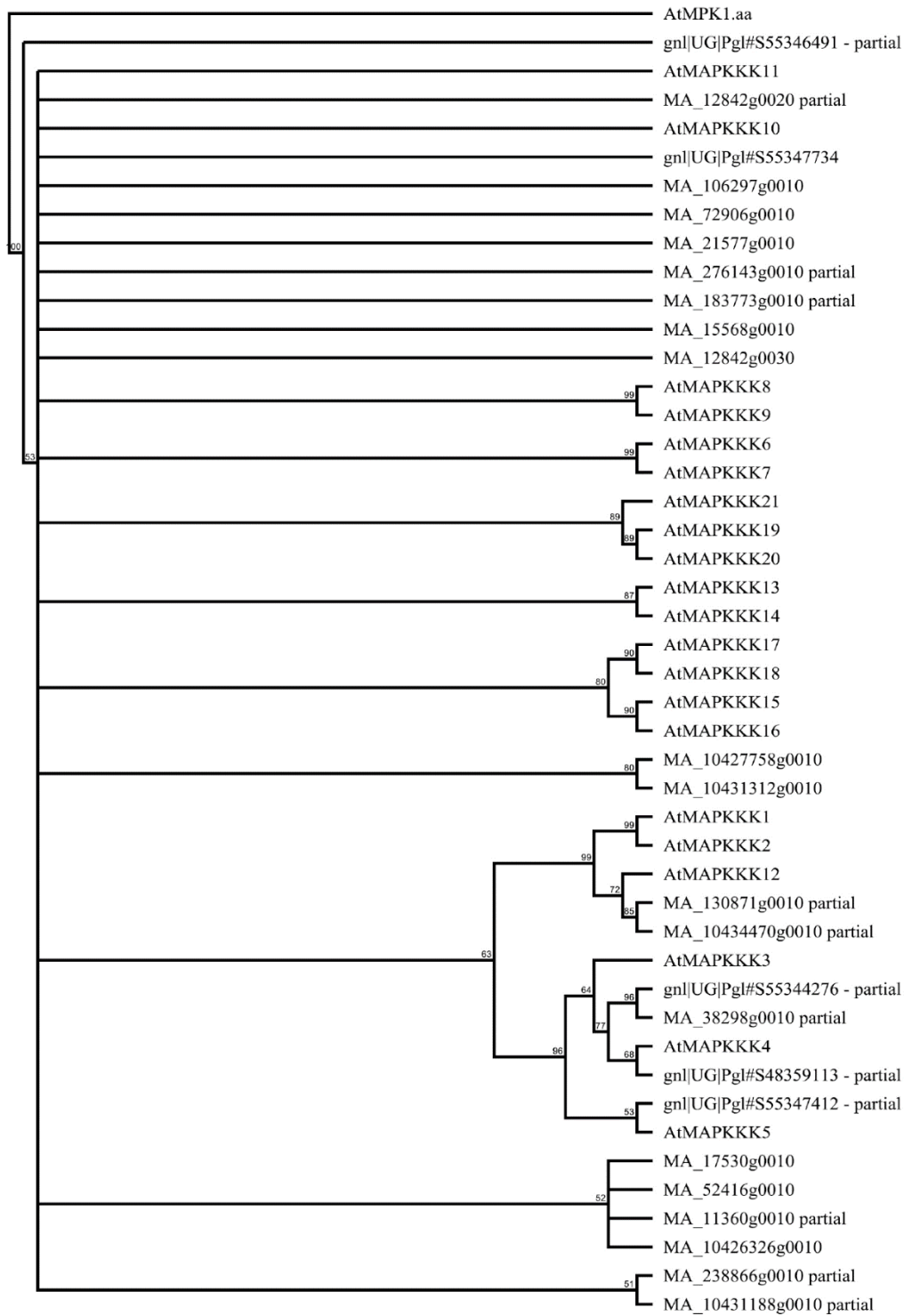


Figure S3: Phylogenetic analysis of the whole MEKK subfamily in *P. abies*, *P. glauca* and *A. thaliana*. Sequence from AtMPK1 was used as the outgroup to root the tree.

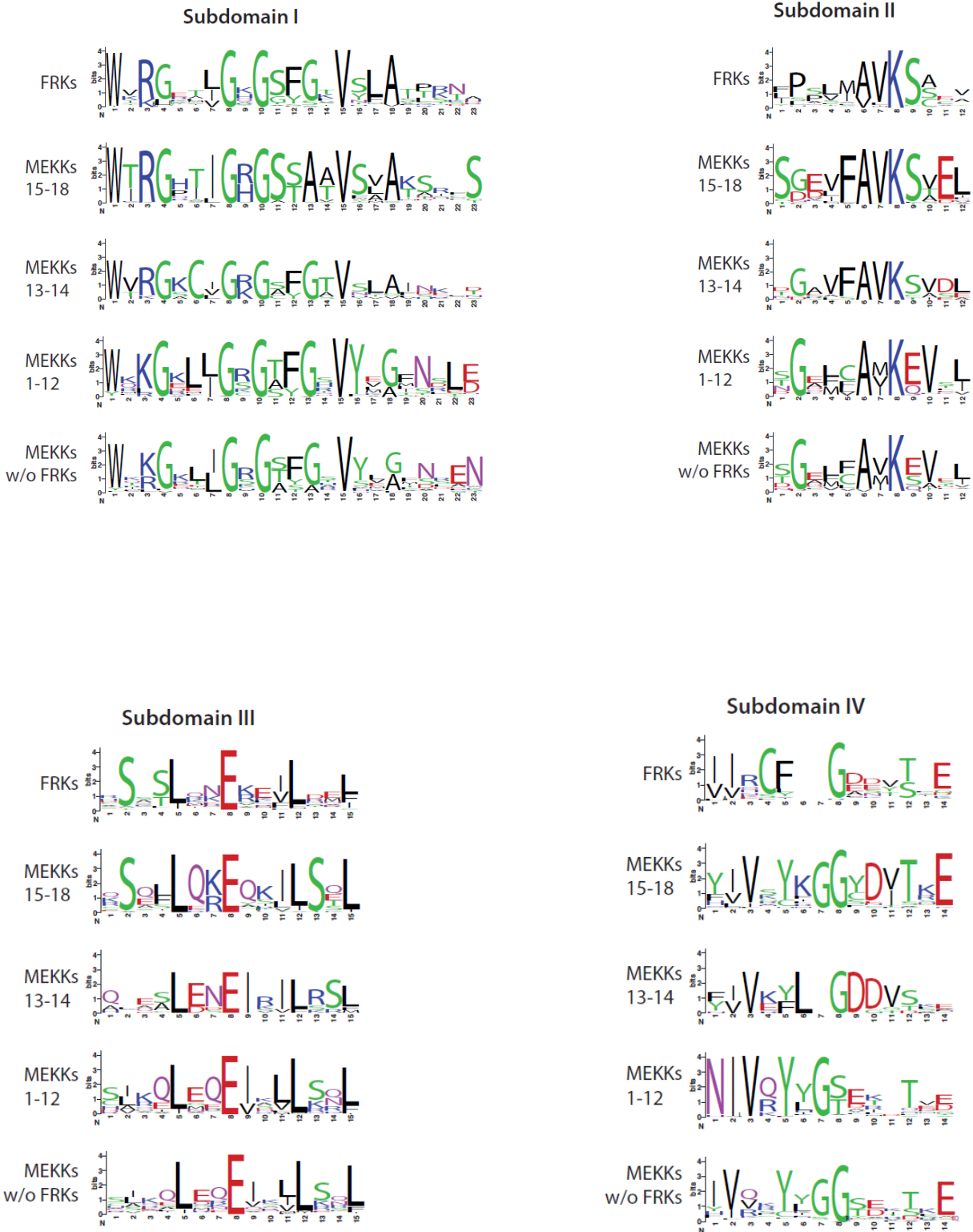


Figure S4 (Page 1)

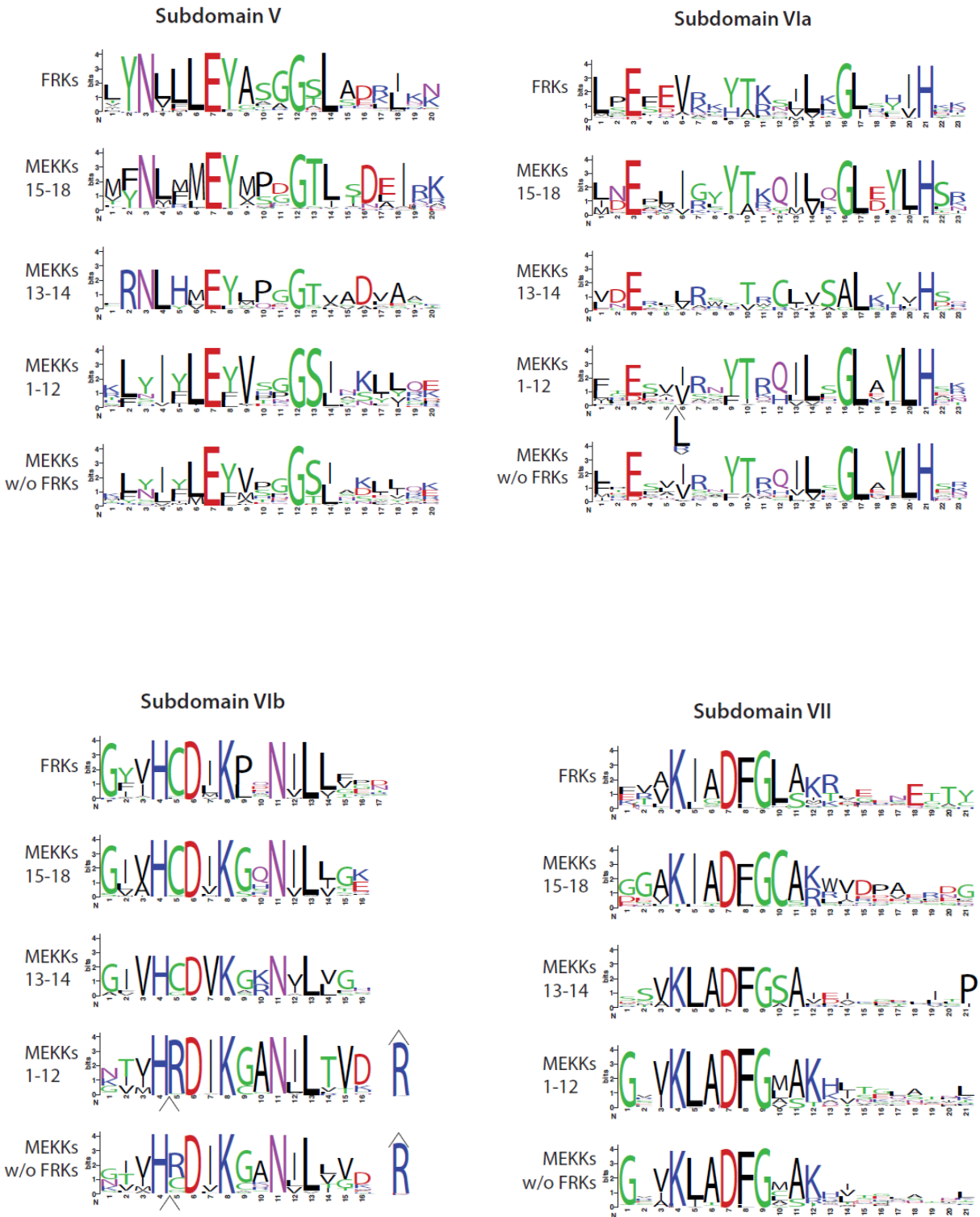


Figure S4 (Page 2)

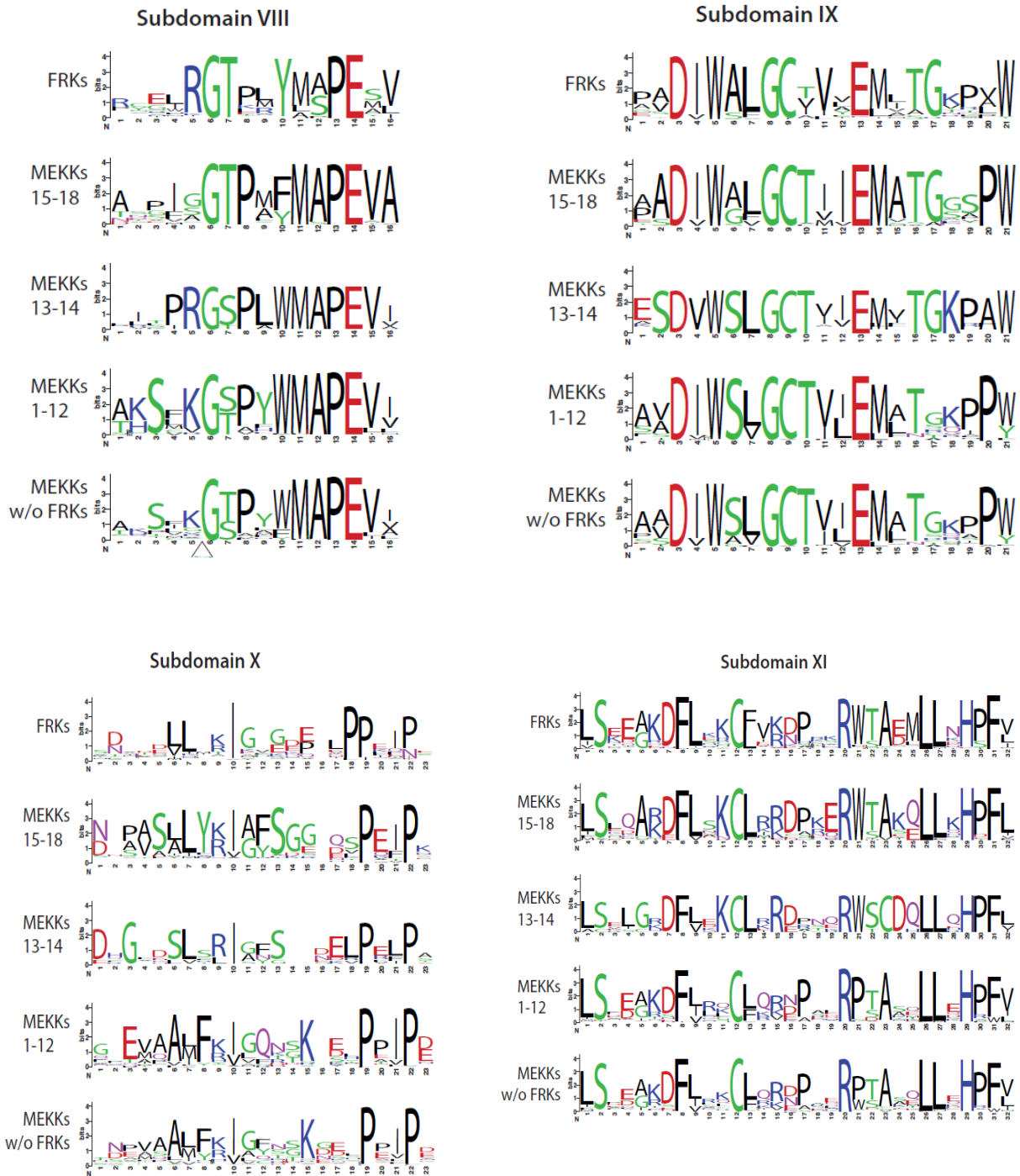


Figure S4 (Page 3): Sequence logos of the 12 subdomains of the kinase catalytic domain from all FRKs orthologs, AtMAPKKK15-18 orthologs, AtMAPKKK13-14 orthologs, and AtMAPKKK1-12 orthologs. Sequence alignments of all AtMAPKKK1-12 orthologs were used to create a sequence logo using the WebLogo website (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) in order to compare the 12 kinase subdomains. The same procedure was applied to AtMAPKKK13-14 orthologs, the AtMAPKKK15-18 orthologs and all the FRK-like proteins, separately. Sequence logos were also used to compare each group (groups I to IV) of the FRK class.

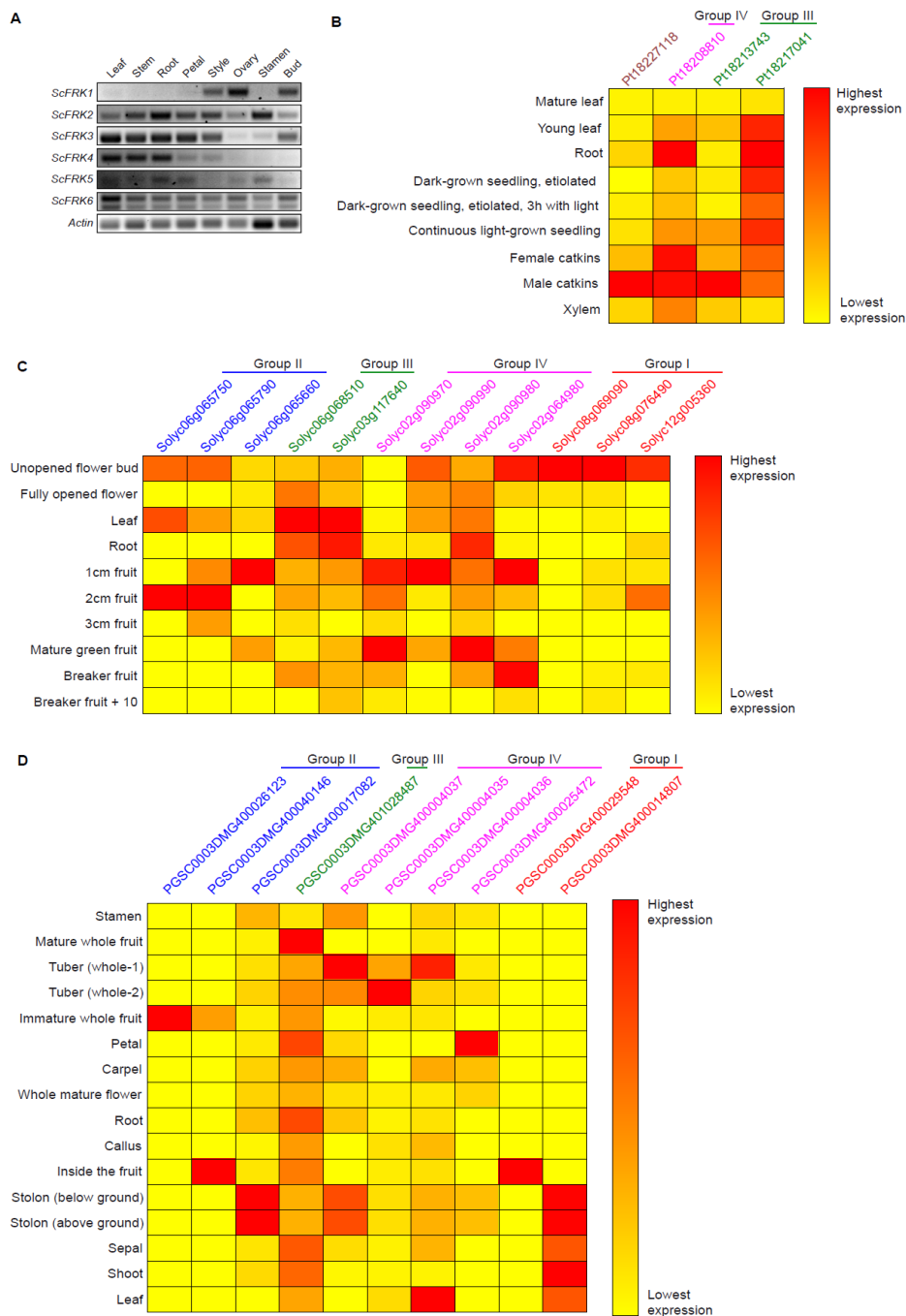


Figure S5: Expression analysis of members of the *FRK* class in four species.

A. RT-PCR expression analyses of *ScFRK1* to *6* from various tissues in *S. chacoense*. B-D. Absolute expression data taken from *P. trichocarpa* (B), *S. lycopersicum* (C), and *S. tuberosum* (D) available in The Bio-Analytic Resource (BAR) for plant biology, (<http://bbc.botany.utoronto.ca>). Columns in the heat maps are independent from each other. Lowest expression level is represented in yellow while the highest is in red.

3. Implication de *ScFRK3* dans le développement reproductif chez *Solanum chacoense*

3.1. *ScFRK3*, une nouvelle MAPKKK impliquée dans le développement reproductif chez *S. chacoense*.

Caroline Daigle

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

3.1.1. Préambule

Tout comme *ScFRK1* et *ScFRK2*, *ScFRK3* a été découvert dans une banque d'ESTs préférentiellement exprimés dans les ovaires fécondés de *Solanum chacoense*. Afin de parfaire nos connaissances sur la classe de FRKs, nous avons entrepris la caractérisation de *ScFRK3*.

3.1.2. Sommaire

Chez les plantes, les *Fertilization-related Kinases* (FRKs) forment une classe appartenant à la sous-famille des MEKKs, eux-mêmes inclus dans la famille des MAPKKKs. Récemment, il a été montré que la classe des FRKs a pris de l'expansion au cours de l'évolution chez les Angiospermes, atteignant un nombre maximal de membres dans la lignée menant aux Solanacées, et l'hypothèse de son rôle au niveau de la reproduction a été émise. Chez *Solanum chacoense*, une espèce de pomme de terre diploïde, deux membres de cette classe, *ScFRK1* et *ScFRK2*, ont déjà été étudiés pour leurs rôles au niveau du développement des gamétophytes. Dans cet article, nous montrons que *ScFRK3*, un troisième membre de la classe des FRKs, est aussi impliqué dans le développement des gamétophytes mâle et femelle. *ScFRK3* est exprimé dans le pollen et les ovules lors de leur développement, avec une expression maximale juste après la méiose et lors des étapes de la mitose. Conséquemment, la caractérisation des phénotypes des mutants dont l'expression de *ScFRK3* est perturbée montre des dérèglements graves au niveau de la reproduction, alors que les développements du sac embryonnaire et du pollen s'arrêtent tous les deux juste avant la première étape de la mitose. Par ailleurs, aucun phénotype n'ayant été observé ailleurs qu'au niveau des organes reproducteurs, cela accentue davantage le rôle spécifique des FRKs au niveau de la reproduction. Afin de caractériser une éventuelle cascade de signalisation impliquant *ScFRK3*, toutes les MKKs et MPKs ont été identifiées à partir d'un transcriptome d'ovules, de pollen et de tubes polliniques. Des essais de double-hybride chez la levure (Y2H) ont été faits en utilisant la MAPKKK *ScFRK3*, chacune

des cinq ScMKKs et les 16 ScMPKs retrouvées dans le transcriptome. Ceci nous a conduit vers une cascade de signalisation unique impliquant ScMKK3 et ScMPK4 en aval de ScFRK3. Ces interactions ont aussi été confirmées à l'aide de la technique de fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC). Cette étude révèle donc de nouveaux mystères concernant le développement des gamétophytes mâle et femelle, mettant en scène un nouvel acteur pouvant agir au sein d'une cascade de MAPK lors de la reproduction chez les plantes.

3.2. *ScFRK3*, a new MAPKKK involved in signaling during reproductive development of *Solanum chacoense*

Caroline Daigle, Benjamin Mazin and Daniel P. Matton

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2

Article en préparation pour Plant and Cell Physiology (soumission prévue pour 2016).

3.2.1. Apport original

Caroline Daigle est l'instigatrice principale du papier. Elle a réalisé l'ensemble des expériences décrites dans cet article Elle a aussi rédigé l'article.

Benjamin Mazin a aidé Caroline à faire l'analyse du phénotype du développement des ovules chez les mutants.

Daniel P. Matton, en tant que directeur de recherche, a supervisé et subventionné les travaux. Il a aussi contribué à l'écriture et à la correction de l'article, de même qu'à la conception des figures.

3.2.2. Abstract

The Fertilization-related kinases (FRK) form a class that belongs to the MEKK subfamily of plant MAPKKKs. It was recently shown that the FRK class kinases expanded during Angiospermae evolution, reaching their maximum numbers in the lineage leading to solanaceous species, and are thought to play roles in plant sexual reproduction. The first two studied members of the FRK class, namely *ScFRK1* and *ScFRK2*, have already been shown for their pivotal role in gametophytes development in the wild potato species *Solanum chacoense*. Here, we show that *ScFRK3*, a third member of the FRK class, is also involved in both male and female gametophytes development. *ScFRK3* is expressed in developing pollen and young

ovules, reaching its highest level immediately after meiosis and during the mitosis steps in both gametophytes. Consequently, *ScFRK3* RNAi mutants showed severe defects in reproduction, with embryo sac and pollen development both arrested before the first mitosis step. Obvious defects in vegetative organs were not observed, emphasizing the reproductive roles of the FRK class kinases. As a first step to characterize a MAPK cascade involving ScFRK3, a *Solanaum chacoense* transcriptome was made from male and female reproductive organs in order to isolate all MKKs and MPKs expressed in these tissues. Yeast-two hybrid assays were then performed using the ScFRK3 MAPKKK, the five ScMKKs and the 16 ScMPKs retrieved from the reproductive tissues transcriptome. This led to a unique canonical MAPK signaling cascade involving the ScFRK3 MAPKKK, the ScMKK3 MAPKK, and the ScMPK4 MAPK, that was also validated *in planta* through bimolecular fluorescence assays.

3.2.3. Introduction

Unlike in animals, gametes development in plants is a highly regulated process resulting not only from a meiosis, but also by a number of mitosis, giving rise to multicellular gametophytes. In most species, the female gametophyte, which is called the embryo sac (ES), contains at maturity eight nuclei embedded in seven cells (reviewed in (É. Chevalier et al., 2011)). Development of the female gametophyte is divided in two steps, megasporogenesis and megagametogenesis. In megasporogenesis, the megaspore mother cell (MMC) undergoes two rounds of meiosis resulting into four haploid tetrads of which only one will survive to become the functional megaspore (FG). During megagametogenesis, the FG undergoes three successive mitosis rounds. The resulting eight nuclei ES then becomes polarized, with four nuclei at the chalazal pole and four at the micropylar pole. One nuclei from each pole migrates to the center while others go through cellularization and differentiation. At the mature stage (FG7), two synergids and one egg cell are positioned at the micropylar pole while the three other cells, the antipodals, occupy the chalazal pole. The two nuclei in the center merge together to become the unique diploid central cell (reviewed in (É. Chevalier et al., 2011; Drews & Koltunow, 2011; Yadegari & Drews, 2004)).

On the male side, the pollen mother cell (PMC) undergoes two rounds of meiosis to produce a tetrad of microspores. The first pollen mitosis (PMI) occurs after maturation of the haploid microspore, producing two different cells inside the pollen grain: a large central cell,

called the vegetative cell, and a smaller one, the generative or germ cell (reviewed in (Bedinger, 1992; Borg, Brownfield, & Twell, 2009; Borg & Twell, 2010; Twell, 2011)). Once pollen grains land on the stigma of a suitable flower of the same species, the vegetative cell generates a pollen tube that will elongate through the style toward the ovules. In solanaceous species like *Solanum chacoense*, the second pollen mitosis (PMII) occurs within the generative cell during tube elongation to form two identical sperm cells. In others species, like in *Arabidopsis thaliana*, PMII occurs in dry mature pollen grains (Borg et al., 2009). When the pollen tube reaches the micropyle of the ovule, the two sperm cells are released from the pollen tube to fertilize the egg cell and the central cell, leading to double fertilization giving rise to the diploid embryo and the triploid endosperm (Hamamura, Nagahara, & Higashiyama, 2012).

Cell-cell communication and coordination of male and female gametophyte development involves complex and tightly regulated steps. Accordingly, genes shown to be essential for gametophyte development are found in a wide array of functionalities (É. Chevalier et al., 2011). Some of them are necessary for the MMC meiosis, like the R2R3 MYB transcription factors (TFs) *FOUR LIPS (FLP)* and *MYB88* that regulate the meiotic cell cycle (Makkena et al., 2012); the *Ribosomal Protein L27a (RPL27a)*, which mutation does not produce the right number of living cells after meiosis (Zsögön et al., 2014); as well as numerous genes involved in DNA recombination and chromosome integrity (Grini et al., 2009; M. Liu et al., 2014). Others are involved in FG maintenance and mitosis, their mutation leading to developmental arrest of the embryo sac before mitosis I, like the *AGL23* MADS-box TF (Colombo et al., 2008); the plasma membrane protein *GEX1* (Alandete-Saez et al., 2011); the mitochondrial proteins *ANK6* and *SIG5* (Yu et al., 2010); the nucleoporin complex protein member *Nup88-Homolog MOS7* (G. T. Park et al., 2014); and a kinesin (*AtKin-1*) (Haiqing Wang et al., 2014). *Atkin-1* is the unique member of the kinesin-1 family in *Arabidopsis thaliana* and is specifically expressed in stamen and ovules, though its function is only visible in ovule development (Haiqing Wang et al., 2014). In *Solanum chacoense*, a wild diploid potato species, two MAP Kinase Kinase Kinases (MAPKKKs, MEKKs) are also involved in FG maintenance and mitosis. *ScFRK1* and *ScFRK2* downregulated mutants showed development arrest at the FG stage (Lafleur et al., 2015); (Mazin, B, Daigle C. and Matton D. P. unpublished results). Other mutants, while going through mitosis, fail to position, cellularize or differentiate

inside the developing gametophyte. This is the case of the *Cytokinin-independent 1 (CKII)* histidine kinase that does not bind cytokinins, but nevertheless succeeds to activate cytokinin responses via the cytokinin two-component signaling (TCS) pathway. Mutations in *CKII* or genes inside the TCS pathway cause defaults starting after the mitosis: unusual embryo sac morphology, poor nuclei positioning, defective cellularization, and supplementary nuclei (Deng et al., 2010). Those phenotypes are also observed in the *MYB64* and *MYB119* mutants while *MYB119* expression is downregulated in *cki* mutants (Rabiger & Drews, 2013).

Because of its simple structure, pollen has been intensely used as a model to study plant mitosis and cytokinesis. Indeed, numerous mutant genes show defects going through PMC meiosis, PMI or PMII. Mutations in the Microtubule-Associated protein (MAP) *gemini pollen1 (gem1)* and *gemini pollen2 (gem2)* cause cytokinesis variable defects in asymmetric division of PMI (S.K. Park et al., 1998; Soon Ki Park et al., 2004). Mutation in the *TIO (two-in-one)* gene, coding for a FUSED Ser/Thr protein kinase, also shows cytokinesis defects at PMI, producing binucleate pollen due to an incomplete cell plate formed during cytokinesis (S. A. Oh et al., 2005). *TIO*, which is localized at the midline of the nascent phragmoplast, interacts with the PAKRP1/kinesin-12A protein, suggesting its role in cytokinesis microtubule organization (S. A. Oh et al., 2012). In yeast two-hybrid assays, *TIO* also interacts with AtNACK1/TETRASPORE (*TES*), another kinesin known to function in plant cytokinesis (S. Oh et al., 2014). Indeed, *TES* and *HINKEL (HIK)* are two redundant kinesins involved in PMI cytokinesis (S.-A. Oh et al., 2008). They are orthologous to the tobacco *NACK1*, involved in somatic cytokinesis. NtNACK1 is upstream of a MAPK signaling cascade, where it activates the MAPKKK NtNPK1 (AtANP1, 2, 3). Once activated, NtNPK1 activates the MAPKK NtNQK (AtMKK6), and finally, NtNQK activates the MPK NtNRK1/NTF6 (AtMPK4) (Ryuichi Nishihama et al., 2001; R. Nishihama et al., 2002; Soyano et al., 2003; Y. Takahashi et al., 2010). Activated NtNTF6 then promotes phragmoplast expansion by phosphorylating MAP65 and other Microtubule-Associated proteins (MAPs) (Sasabe et al., 2006). Many cell cycle regulators have also been shown to play roles prior to PMII, like the type A *Cyclin-dependant kinase CDKA* (Iwakawa et al., 2006), the *F-box-like 17 (FBL17)* (Gusti et al., 2009), and the *Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1)* (Z. Chen, Tan, Ingouff, Sundaresan, & Berger, 2008). *DUO1*, a R2R3 MYB transcription factor (TF), and *DUO3* are also required for germ

cell entry into PMII (Brownfield, Hafidh, Durbarry, et al., 2009; Durbarry, Vizir, & Twell, 2005). In *duo1* mutant, a lower expression level of germline-specific genes is observed, suggesting *DUO1* implication in the regulation of the expression of many target genes involved in cell cycle and entry into mitosis (Borg et al., 2011).

MAPK signaling is widely used to transduce signals from cell to cell, and plants own the largest MAPK family among all Eucaryots. For example, the genome of *Arabidopsis thaliana* contains 60 MAPKKKs divided into three families: the Rafs, the Ziks, and the MEKKs, 10 MAPKKs (MKKs), and 20 MAPKs (MPKs) (Group et al., 2002). MAPKs have been shown to be involved in numerous processes, such as stress response (reviewed in (Moustafa et al., 2014)), defense (reviewed in (Meng & Zhang, 2013)), hormone signaling (Y. Liu, 2012; Singh & Jwa, 2013; Smékalová et al., 2014), and development (reviewed in (Xu & Zhang, 2015)). This last process is probably the least investigated, since relatively little is known, especially in gametophytes development. In *Arabidopsis thaliana*, from the 21 MEKKs, two functionally redundant MEKKs have been found to play a role in pollen development: *map3kε1;map3kε2* (*mapkkk7;mapkkk6*) double mutants show defects in plasma membrane formation in developing pollen, and also in embryo development at globular or heart stage (Chaiwongsar, Otegui, Jester, Monson, & Krysan, 2006; Chaiwongsar, Strohm, Su, & Krysan, 2012). Embryo development is also affected in *yda* mutants, demonstrating the role of this MAPKKK in the asymmetric division of the zygote after fertilization (Bayer et al., 2009; Lukowitz et al., 2004). Some of the MPKs have also been found to play roles in gametophyte development, like *AtMPK4*, involved in the cell plate expansion in male-specific meiotic cytokinesis (Kosetsu et al., 2010; Zeng, Chen, & Ellis, 2011), or *AtMPK3* and *AtMPK6*, which function redundantly in ovule integument development (Huachun Wang et al., 2008), early pollen development (Guan, Meng, et al., 2014), and pollen tube guidance prior to fertilization (Guan, Lu, Xu, McClure, & Zhang, 2014). Others are involved in somatic cell division and cytokinesis, like the MAPKKKs *ANP1-3* (Krysan et al., 2002; Y. Takahashi et al., 2010), *MKK6* (Y. Takahashi et al., 2010), *MPK11* (Kosetsu et al., 2010), and *MPK18* (Walia, Lee, Wasteneys, & Ellis, 2009), and might also be involved in male and female gametophytic mitosis.

As mentioned earlier, in *Solanum chacoense*, a diploid species close to the cultivated potato (*Solanum tuberosum*), two MAPKKKs (*ScFRK1* and *ScFRK2*) have been found to play

roles in both female and male gametophytes development (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015; O'Brien et al., 2007). These MAPKKKs are members of a recently characterized MEKK class called the Fertilization-Related Kinases (FRKs) class, that showed rapid evolution and expansion in solanaceous species (Daigle & Matton, 2015). In *Arabidopsis*, *AtMAPKKK19*, *20* and *21* are their closest orthologs. A recent study suggests that *AtMAPKKK20* might be involved in pollen development, being highly expressed in pollen and a target of DUO1 (Borg et al., 2011). Apart from interacting with calmodulins and calmodulin-like proteins (Popescu et al., 2007), downstream targets of *AtMAPKKK20* are still unknown, except for its *Brassica napus* orthologs, where it has been demonstrated that *BnMAPKKK20* and *BnMAPKKK19* are stress regulated (Sun et al., 2014). In yeast two-hybrid assays, *BnMAPKKK19* was showed to interact with *BnMKK8* and *BnMKK9* whereas *BnMAPKKK20* interacted strongly with *BnMKK3* and to a lesser extent to *BnMKK8* and *BnMKK9* (Sun et al., 2014).

Herein, we provide the characterization of the MAPKKK *ScFRK3*, a third member of the FRK family in *Solanum chacoense*, which is phylogenetically closer to *AtMAPKKK19-21* than the other two previously characterized (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015; O'Brien et al., 2007). We describe its roles in both male and female gametophytes development, and provide a likely MAPK signaling cascade involving the MAPKKK *ScFRK3*, the *ScMKK3* and the *ScMPK4* in reproductive development.

3.2.4. Methods

Plant material and transformation

Solanum chacoense Bitt. plants (genotype G4, S₁₂S₁₄ self-incompatibility alleles and V22 S₁₁S₁₃ self-incompatibility alleles) were greenhouse-grown under long-day condition (16h light/8h dark). For crosses, genotype V22 was used as the pollen donor. Transgenic plants were produced in the G4 genotype by agroinfiltration and callus regeneration as described previously (Matton et al., 1997) using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. DNA cloning were done with GATEWAY® technology using pDONRTM/Zeo as the entry vector and pMDC32 for overexpression (Curtis & Grossniklaus, 2003) and pK7GWIWG2(I) for RNAi mutant plants (Karimi, Inzé, & Depicker, 2002) as destination vectors. After *in vitro* selection on appropriate antibiotics, twenty independent plants were chosen for further analyses. Polyploid plants were identified by stomatal guard cell chloroplast number and discarded. Semi-quantitative RT-PCRs

using the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) from Invitrogen (Cat. No 28025) were performed with 2.5 ug of total leaf RNA from of each mutant. Twenty-eight PCR cycles were required to amplify ScFRK3 RNA while twenty-five cycles were required for the actin control using the Crimson Taq polymerase. All primers used for PCRs are listed in [supplementary table V](#).

RNA expression and in situ hybridization

RNA from different tissues (leaf, stem, root, petal, anther, ovary, style and bud) were extracted using the [TRIzol® Reagent](#) from Life Technologies. RT-PCRs were performed as described earlier and northern blots were performed as described before (Germain, Chevalier, Caron, & Matton, 2005). Radioactive probes were produced with the High Prime DNA Labelling kit from Roche (<https://lifescience.roche.com/>) and [α -³²P] dATP from Perkin Elmer (<http://www.perkinelmer.com/>).

In situ hybridizations were performed from 8 μ m tissue sections as described in Lantin *et al.* (1999) ((Lantin, O'Brien, & Matton, 1999)) with VistaVision Histobond microscope slides from VWR (<https://www.vwr.com/>). Sense and antisense RNA probes were synthesized from a 600 bp *ScFRK3* PCR amplicon which includes the variable C-terminal domain (for primers, see supplementary table V) using digoxigenin-11-UTP with T3 (for sense probe) and T7 (for antisense probe) RNA polymerases from Roche (<https://lifescience.roche.com>). Microscope slides were hybridized with 50 ng of sense or antisense RNA probes corresponding to the best signal to ratio concentration. Probe hybridizations were made overnight at room temperature, while detection with the anti-DIG antibody was made for one hour at 37 °C. Slides staining was performed overnight at room temperature using NBT/BCIP solution from Roche (<https://lifescience.roche.com>).

Ovule clearing and microscopy

Ovules from young buds (from 3 to 8 mm) and from mature flowers at anthesis were extracted from the ovary, and were fixed and cleared as described previously (E. Chevalier, Loubert-Hudon, & Matton, 2013; Loubert-Hudon & Matton, 2013). Cleared ovules were observed by differential interference contrast (DIC) microscopy using a Zeiss Axio Imager M1 microscope with a Zeiss AxioCamHRc camera (Zeiss, <http://www.zeiss.com/>).

Pollen development analysis

Microspore development was studied by staining squashed anthers from all development stages with the Hoechst 33342 nuclear stain (NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent) from Life Technologies. Developing pollen grains were observed under ultraviolet wavelength (358 nm) using a blue/cyan filter (as well as under bright-field with 1% acetocarmine for pollen viability assessments. All observations were made with a Zeiss AxiocamHRc camera on a Zeiss Axio Imager M1 microscope.

MKKs and MPKs retrieving and RACEs

Pollen- and ovule-expressed MKKs and MPKs were retrieved from an ovule and pollen tube transcriptome from *Solanum chacoense* (Transcriptome Shotgun Assembly, Genbank accession: GDZW00000000, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GDZW00000000>). Amino acids sequences from the kinase domains of the *A. thaliana* 10 MKKs and 20 MPKs were used to screen against the *Solanum chacoense* transcriptome. The BLAST (tblastn) algorithm was used to compare the *Arabidopsis thaliana* sequences against the *Solanum chacoense* database. The matching transcripts were then compared with the NCBI database to ensure their correspondance to true MKKs or MPKs. Since most of the transcripts lacked a complete 5' or 3' fragment, full length RNA were obtained using ligase-mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RLM-RACEs) (GeneRacer Kit, Life Technologies).

Directed Yeast-two hybrid assays

The ScFRK3 and ScMPKs baits were cloned into the pGBKT7 vector while the MKKs preys were cloned into pGADT7 vector. Individual baits and preys were respectively cloned in the Y2H Gold and Y187 yeast strains. Baits and preys were respectively grown in SD (-)Trp and SD (-)Leu media, mixed in 2X YPAD and incubated for 16 hours at 30°C with slow shaking. One to two microliters (µL) from each mating was then deposited on selective media ([SD (-)Leu (-)Trp]; [SD (-)Leu (-)Trp (-)His (-)Ade (+)Aureobasidin A]; [SD (-)Leu (-)Trp (-)His (-)Ade (+)Aureobasidin A (+)50mM 3AT]) and incubated at 30°C for 3 to 6 days.

Subcellular localization and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays

For subcellular localization, ScFRK3, ScMCK3 and ScMPK4 ORFs were fused to the N-terminus of green fluorescent protein (GFP) using the GATEWAY® technology and

pMDC83 as the destination vector (Curtis & Grossniklaus, 2003). For BiFC, pUC-SPYNE and pUC-SPYCE destination vectors were used to fuse the N (pUC-SPYNE) part of the yellow fluorescent protein (YFP) or the C (pUC-SPYCE) part of the YFP to the C-terminus end of one of the proteins of interest (Walter et al., 2004). Tagged proteins were transiently expressed in onion epidermal cells through DNA-coated microparticle bombardment using the Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad). Onion epidermal cells (~1 cm²) were bombarded with 1.0 µm gold particles from a distance of 9 cm and at a pressure of 1,100 psi.

3.2.5. Results

ScFRK3, a MEKK related to the Arabidopsis MAPKKK19, 20 and 21

From the combined *Solanum chacoense* ovule and pollen tube transcriptome, 21 different MEKKs were isolated with six of them (*ScFRK1-6*) belonging to the FRK class. Among these, ScFRK3 and 4 are the closest orthologs of the *Arabidopsis thaliana* MAPKKK19, 20 and 21 ([Figure 22A](#)), sharing between 43% and 75% amino acid pairwise identity with those from *Arabidopsis thaliana*. The FRK class kinases have been recently shown to have largely expanded in solanaceous species (Daigle & Matton, 2015). In fully characterized solanaceous genomes like *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*, their total number (15 and 17 FRKs, respectively) account for more than 40% of the whole MEKKs subfamily. As for other members of the FRK class, ScFRK3 is a small MEKK, its 352 amino acids sequence (39 kD) consisting mainly in a kinase domain and a short C-terminal domain of 92 amino acids.

Unlike ScFRK1 (Lafleur et al., 2015) and some other members of the FRK class, which are predicted as nuclear proteins, ScFRK3 does not harbor a mono- or bipartite nuclear localization signal. To ascertain the localization of ScFRK3 within the cell, a ScFRK3::GFP construct under the control of the under the CaMV 35S promoter was bombarded in onion cells. As shown in [Figure 22B](#), ScFRK3 can be found both in the cytoplasm and the nucleus, even when linked to the GFP fluorescent marker. Interestingly, although no nuclear localization

signal (NLS) was found in ScFRK3, the WoLF PSORT protein subcellular localization tool predicted a nuclear or cyto-nuclear localization, as observed in figure 22B.

A. Phylogenetic tree of the ScFRKs (ScFRK1-6) and AtMAPKKK19-21. ScFRK3 and ScFRK4 are the closest orthologs of the *Arabidopsis* MAPKKK19-21. The tree was made by the

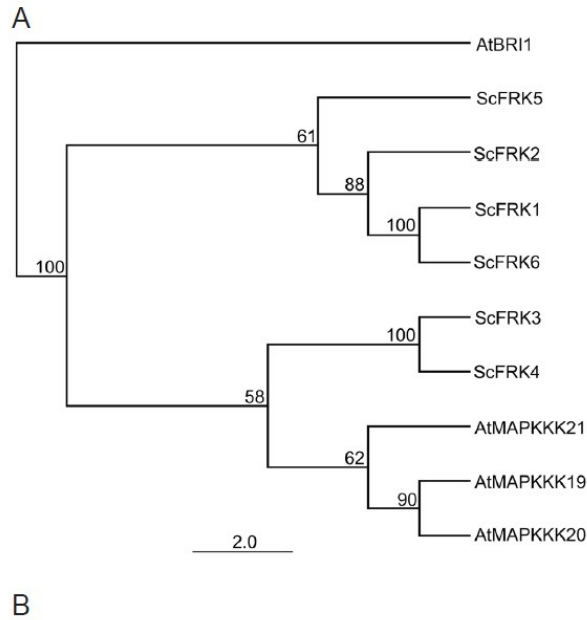


Figure 22 : Phylogenic positioning of ScFRK3 inside the FRK class and cellular localization.

Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the kinase domain of AtBRI1.

B. Transient expression of ScFRK3-GFP in onion cells through microparticle bombardment showing the subcellular localization of ScFRK3 in the cytoplasm and nucleus (i). Nuclear localization confirmation with the Hoechst 33342 DNA stain (ii). DIC image of i and ii (iii).

Scale bars: 50 μm .

ScFRK3 expression pattern suggests a role in reproductive development

It has been already known that *ScFRK3* is expressed in somatic tissues such as leaves, stem and roots, but it is also expressed in flower buds (Daigle & Matton, 2015), and might have a role in reproductive development, similarly to the two previously described FRK class members, *ScFRK1* and *ScFRK2* (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015; O'Brien et al., 2007). To precisely determine in which tissue and developmental stages *ScFRK3* is expressed, semi-quantitative RT-PCRs were performed on flower buds ranging from 3 to 8 mm length, on flowers at anthesis, and on fruits from one to three days after pollination (DAP). As shown in [figure 23A](#), *ScFRK3* is expressed in reproductive tissues of very young buds (3 mm length). While *ScFRK3* expression in ovary remains almost unchanged at all stages, stilar expression steeply increases in 7-8 mm buds (corresponding to 1 DBA). Stamen mRNA expression is the strongest overall with a steep increase in 5-6 mm buds that stays stable until the day before anthesis. At anthesis stage, stamen expression decreases sharply while stilar expression remains high. *ScFRK3* mRNA was also detected in young fruits, from 1 DAP to 3 DAP.

To finely define the *ScFRK3* expression pattern, *in situ* hybridizations were performed on developing flower buds. As shown in [figure 23B](#), *ScFRK3* is expressed in whole young flower buds, especially in the ovules, pollen and tapetum. *ScFRK3* mRNAs are detected in young pollen, particularly in tetrads ([figure 23D](#) and [E](#)) and young microspores before PMI ([figure 23G](#)). Inside the ovary, *ScFRK3* is highly expressed in the ovule compared to the placenta and pericarp ([figure 23I](#)), although expression is still lower than in pollen, confirming the RT-PCR results. *ScFRK3* ovular expression is mainly observed in the integument as well as in the young embryo sac. As shown in [figure 23K](#) and [L](#), *ScFRK3* mRNAs are detected in the ovule before the FG stage ([K](#)) as well as during the first mitosis of the FG ([L](#)). Taken together, these expression profiles strongly suggest a role of *ScFRK3* in gametophytes development, especially at young developmental stages.

A. Semi-quantitative RT-PCRs on reproductive tissue using *ScFRK3* specific primers. B-M. *In*

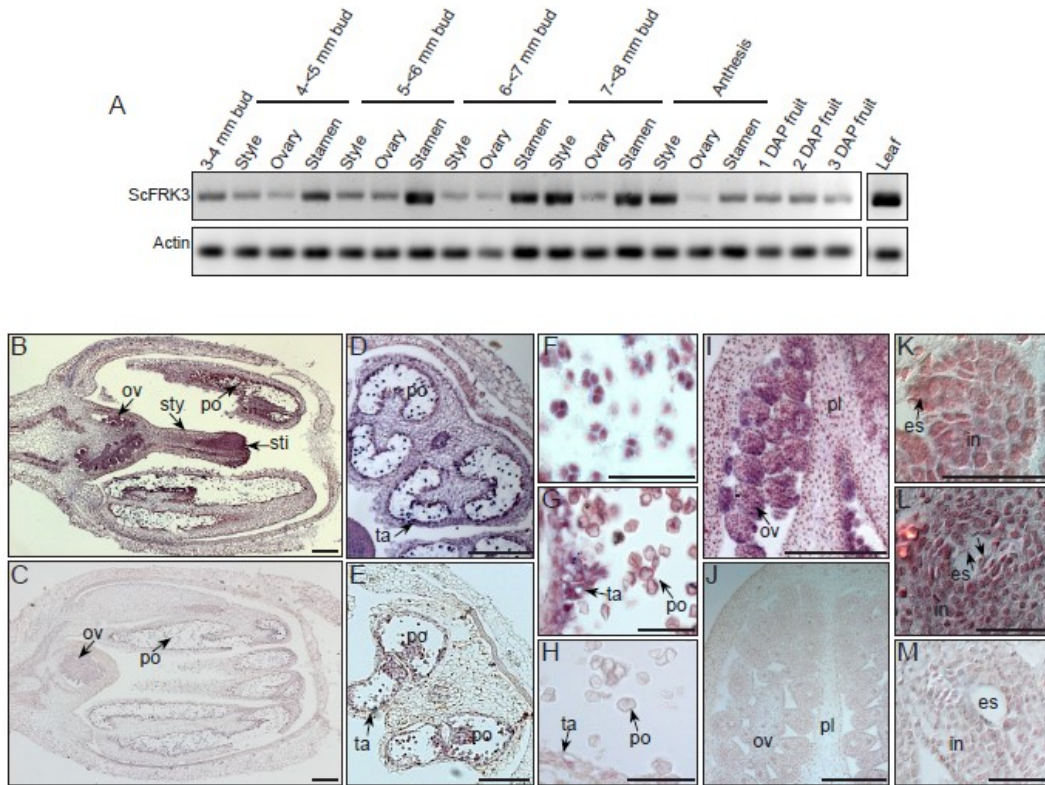


Figure 23: *ScFRK3* expression pattern in reproductive development.

situ localization of *ScFRK3* transcripts using 50 ng of antisense probe in young flower bud (B), young stamen (D), pollen at tetrad stage (F) and young microspore stage (G), inside the ovary (I), in ovule before FG stage (K) and in ovule after the first mitosis (L). *In situ* hybridizations using 50 ng of sense probe in young flower bud (C), young stamen (E), young microspore (H), inside the ovary (J) and an ovule after the first mitosis (M). Scale bars: 200 μ m (B-E, I and J) and 50 μ m (F-H, K-M). Abbreviations: es, embryo sac; in, integument; ov, ovule; pl, placenta; po, pollen; sti, stigma; sty, style; ta, tapetum; arrowheads, nuclei of after mitosis I.

ScFRK3 RNAi plants show reproductive defects

In order to elucidate the function of the *ScFRK3* gene, RNAi mutant plants were generated where the *ScFRK3* ORF was inserted in both sense and anti-sense orientations, downstream of the CaMV35S promoter. Plants resistant to the antibiotic kanamycin were selected for further analyses. To ascertain the downregulation of *ScFRK3* mRNA expression levels in those mutants, RT-PCRs ([figure 24A](#)) were performed. As shown in [figure 24A](#), three different lines showed significant decrease in *ScFRK3* mRNA levels and were kept for further investigation. These plants were then cross-pollinated with a compatible *Solanum chacoense* accession for fruit size and seed number analyses. From These three lines, *iFRK3-10*, *iFRK3-20* and *iFRK3-22* showed severely reduced fruit size ([figure 24B](#)). Seed set in these three interference lines also showed severely reduced seed set, ranging from 18 to 56% of the seeds produced in WT ([Table III](#)) or in transgenic empty vector lines (data not shown).

Since pairwise nucleotide sequence identity between *ScFRK3* and its five closest relatives isolated from the *Solanum chacoense* transcriptome ranged from 40% to 69%, semi-quantitative RT-PCR analyses were performed using specific primers designed for *ScFRK1* to *6* to determine whether expression of the other five *ScFRK* members may be affected by the *ScFRK3* RNAi construct. As shown in [figure 24A](#), RNA expression levels from the five other *ScFRKs* remained unchanged in all three *ScFRK3* RNAi mutants tested, indicating that the reproductive phenotype observed in *ScFRK3* RNAi lines is linked to the down-regulation of the *ScFRK3* genes.

Table III: Number of seeds per fruit in *ScFRK3* RNAi mutants

Mutant line	Mean (seeds/fruit)	Std dev.	n
WT	155	19	5
<i>iFRK3-10</i>	87*	4	5
<i>iFRK3-20</i>	44**	4	5
<i>iFRK3-22</i>	28**	2	5

*Student test $p < 0.02$

**Student test $p < 0.001$

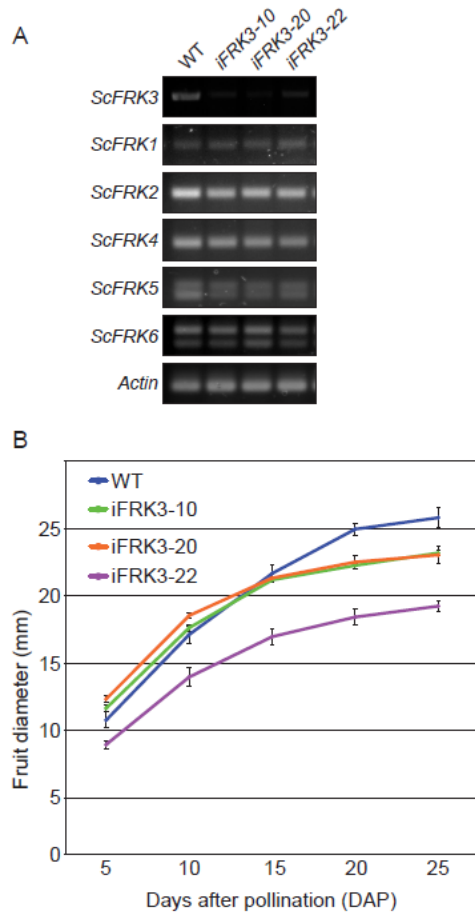


Figure 24: *iFRK3* mutants produce smaller fruits.

A. RT-PCR analysis of *ScFRK1-6* transcripts in leaves of WT and *iFRK3* mutant plants. B. Time course of the WT and *iFRK3* mutant fruits diameter from 5 DAP to 25 DAP (to maturity).

Ovule development is affected in ScFRK3 RNAi mutants

Since *ScFRK3* expression is detected early on during reproductive development (Figure 24) and seed set is clearly affected in RNAi *ScFRK3* mutant lines (Table III), *ScFRK3* could be involved in gametophyte and/or in zygote and seed development. To determine if the observed phenotype stemmed from an early gametophyte developmental defect, microscopic analyses of cleared ovules were performed (Loubert-Hudon & Matton, 2013). As for other solanaceous species, *Solanum chacoense* has a Polygonum-type ES. To determine at which stages the ovule is mostly affected in RNAi mutant lines, ovules from WT and mutant flower buds (from 3 to 8 mm length) were analyzed. The results are summarized in [table IV](#). Microscopic analyses on WT ovules showed that the MMC, at 3 mm bud length, undergoes meiosis to reach the FG1 stage (functional megaspore) in ~4-5 mm buds. After the three mitosis, an eight nuclei ES (FG5-FG6) is observed in ~6-7 mm buds. Central cell karyogamy, cellularization and antipodal cells degeneration are the final steps of ES maturation (FG7), occurring generally in ~7-8 mm buds, approximately one day prior anthesis. These three steps are grouped together and represented by Mat (for maturation) in [table IV](#). Ovules from the three *iFRK3* mutants started to develop normally but, unlike in WT, most of ES did not progress further than the functional megaspore stage (FG1) (represented in bold, [table IV](#)). A small proportion of the ES, however, displayed a delayed development, and could progress through one, two or the three mitosis. [Figure 25A](#) shows the proportion of normal ES (blue), degenerated ES (green) and ES that were stopped during one of the mitosis stages (pink) in *iFRK3* mutant and WT flowers at anthesis. In mature flowers, 93% of WT ES were normal while only 52%, 46% and 22% of *iFRK3-10*, *iFRK3-20* and *iFRK3-22* ES were normal, respectively. In contrast, only 6% of WT ES were completely degenerated, compared to 43%, 45% and 69% in *iFRK3-10*, *iFRK3-20* and *iFRK3-22*, respectively. In mutant plants, lesser than 10% of the ovules were able to progress beyond the functional megaspore stage (FG1). Typical phenotypes presented in *iFRK3* mutants are shown in [figure 25B-I](#). Figure 4 shows that the FG development is not affected in *iFRK3* mutants ([figure 25B](#) and [C](#)), unlike the first mitosis step ([figure 25D](#) and [E](#)), leading to the degeneration of the female gametophyte in mature flowers ([figure 25F-I](#)). These results strongly suggest that *ScFRK3* is involved in the female gametophyte mitosis steps.

Table IV: Correlation between ovule development stages and bud size in WT and *iFRK3* mutants.

Genotype	Bud size (mm)	P	MMC	D	T	FG	MI	MII	MIII	Mat	ES	Dg	Tot
WT	3-4	13	52	18	10	5	2						100
	4-5				3	43	43	8	2			1	100
	5-6				1	29	39	23	5	3		1	101
	6-7					7	16	23	23	28		3	100
	7-8						3	2	10	37	41	7	100
<i>iFRK3-10</i>	3-4		73	17	8								98
	4-5			1	21	58	7					12	99
	5-6				3	52	17	6				25	103
	6-7				3	26	17	14	4	8		26	98
	7-8					19	18	7	1	32	10	22	109
<i>iFRK3-20</i>	3-4	2	68	17	9	4							100
	4-5				29	55	4					12	100
	5-6				3	62	25					9	99
	6-7				1	42	30	9	1			16	99
	7-8				2	30	5	15	6	13	8	22	101
<i>iFRK3-22</i>	3-4		68	21	6	3							98
	4-5				26	55	19						100
	5-6				9	49	12	1				28	99
	6-7				1	30	19	7		3		39	99
	7-8					20	18	6	6	4	3	42	99

Legend: D, Diad; Dg, Degenerated embryo sac; ES, Embryo sac (normal); FG, Functional megaspore stage (FG1); MI, Mitose I; MII, Mitose II; MIII, Mitose III; Mat, Embryo sac maturation; MMC, Megaspore mother cell; P, Primordium; T, Tetrad stage; Tot, Total number of ovules observed.

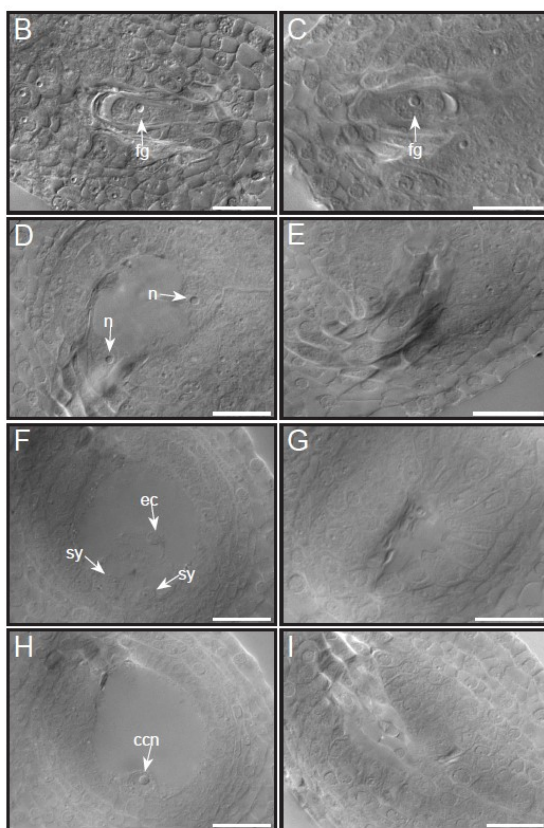
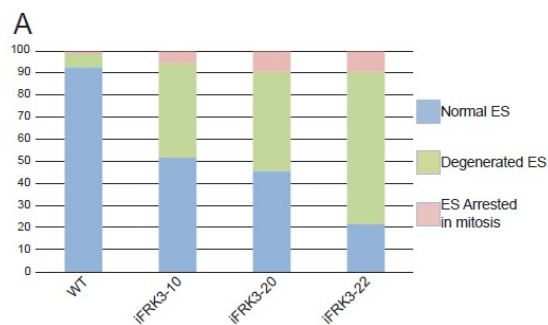


Figure 25: Ovule phenotyping in *iFRK3* mutants.

A. Percentage of normal embryo sacs (blue), degenerated ES (green) and ES arrested during mitosis stages (pink) from anthesis flower in WT and *iFRK3* mutants. B-I. DIC images of developing ovules in WT and *iFRK3-22* mutant plants. Ovule at the FG1 stage in WT (B) and *iFRK3-22* mutant flowers (C). Ovule at first mitosis stage in WT (D) and degenerating in *iFRK3-22* mutant plants (E). Mature ovule in WT (F and H) and in *iFRK3-22* mutant flowers (G and I). F and H are a Z-stack of the same ovule. Scale bars: 20 μ m. Abbreviations: ccn, central cell nucleus; ec, egg cell; fg, functional megaspore; n, nuclei; sy, synergids.

Pollen development is also affected in ScFRK3 RNAi lines

Since *ScFRK3* mRNAs were detected in stamen, pollen viability was also analyzed in *iFRK3* mutants. Pollen from WT, *iFRK3-10*, *iFRK3-20* and *iFRK3-22* mature flowers was then stained with 1% acetocarmine solution, and viable as well as non-viable pollen grains were counted. As displayed in [figure 26A](#), more than 96% of WT pollen grains were viable, compared to 55%, 60%, and 13% in *iFRK3-10*, *iFRK3-20*, and *iFRK3-22*, respectively. With the acetocarmine staining method, viable pollen grains are round and evenly stained in pink ([figure 26A](#)), while dead pollen grains are smaller, translucent and mostly deformed. As in ovule development, the pollen viability phenotype was more severe in the *iFRK3-22* line.

To determine when exactly pollen development is affected in *ScFRK3* disrupted plants, pollen viability assays and DNA staining were performed on WT and mutant developing pollen. A comparison between WT and *iFRK3-22* plants is shown in [figure 26B](#). At the PMC stage, pollen mother cells from WT and *iFRK3-22* plants were fully viable, as observed by acetocarmine staining ([figure 26B, i-iv](#)). Next, at the microspore tetrad stage, pollen from both WT and *iFRK3-22* plants had fully underwent meiosis ([figure 26B, v-viii](#)), including microspore release ([figure 26B, ix-xii](#)). As the microspores grow, PMI occurred normally in the WT and produced a two-celled pollen grain, the vegetative and the germ cells ([figure 26B, xiii](#) and [xiv](#)). In contrast to WT pollen, PMI did not occur in most pollen grains from *iFRK3-22* mutant, already starting to collapse and die ([figure 26B, xv-xvi](#)). WT mature pollen grains ([figure 26B, xvii](#) and [xviii](#)) were fully viable as observed with by acetocarmine staining, while pollen grains from *iFRK3-22* mutant were mostly dead ([figure 26A, iv](#) and [26B, xix](#) and [xx](#)). The few remaining pollen grains that were able to go through PMI grew successfully to maturity, as for WT pollen. These results suggest that *ScFRK3* is involved in mitotic division not only in the female gametophyte, but also on the male side, in pollen development.

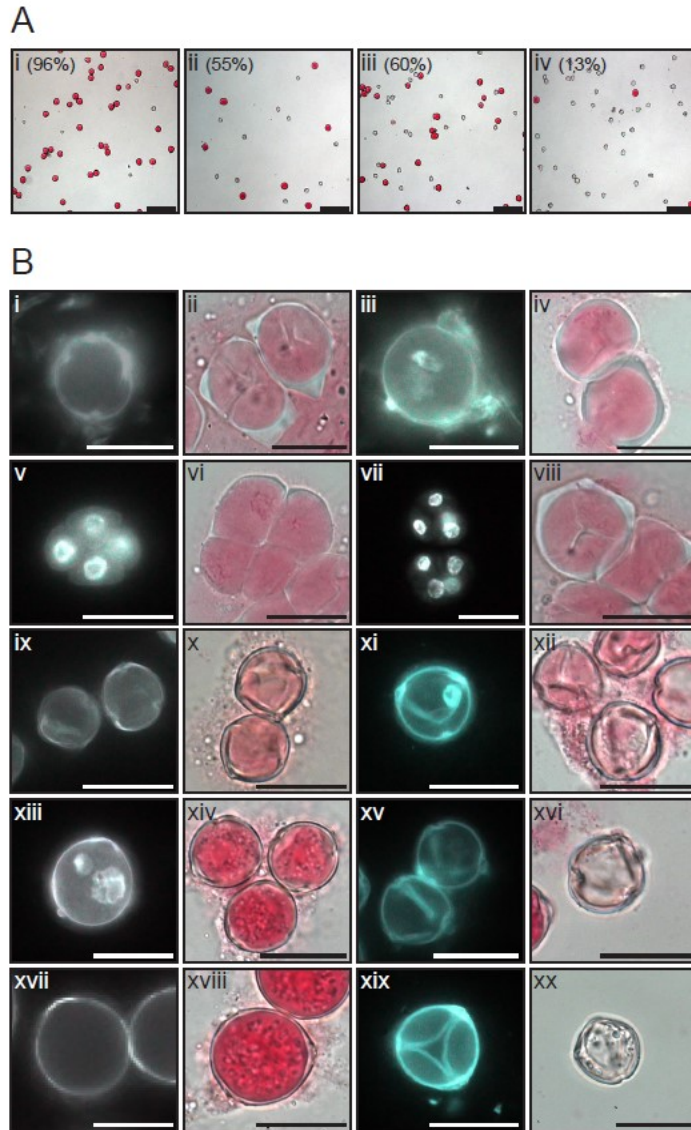


Figure 26: Pollen phenotyping in *iFRK3* mutants.

A. Pollen viability in WT (i), *iFRK3-10* (ii), *iFRK3-20* (iii) and *iFRK3-22* (iv) mutant plants using acetocarmine solution. B. Pollen development phenotyping using Hoechst 33342 DNA stain (i, iii, v, vii, ix, xi, xiii, xv, xvii and xix) and acetocarmine staining (ii, iv, vi, viii, x, xii, xiv, xvi, xviii and xx) in WT (i, ii, v, vi, ix, x, xiii, xiv, xvii and xviii) and *iFRK3-22* mutant (iii, iv, vii, viii, xi, xii, xv, xvi, xix and xx) plants. PMC stage (i-iv). Tetrad stage (v-viii). Released microspores (ix-xii). Microspores after PMI (xiii-xvi). Mature pollen (xvii-xx). Scale bars: 100 μm in A and 20 μm in B.

ScFRK3 directly interacts with ScMKK3

In the MAPKKK family, ScFRK3 is classified as a MEKK subfamily kinase, thus its involvement in a canonical MAPK signaling pathway is expected. In order to reconstitute a three-tier kinase module with ScFRK3 acting as the upstream kinase, yeast-two hybrid (Y2H) assays were performed with the ScMKKs and ScMPKs found in the *Solanum chacoense* combined ovule and pollen transcriptome. Using the 10 MKKs and the 20 MPKs from *Arabidopsis thaliana* to screen the *Solanum chacoense* transcriptome, five ScMKKs and 16 ScMPKs were retrieved (See [supplementary table VI](#)). A phylogenetic analysis for both *S. chacoense* MKKs ([supplementary figure 6](#)) and MPKs ([supplementary figure 7](#)) was performed in order to assign their closest ortholog (s) in *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* (see also [Supplementary table VI](#)). For three ScMPKs (isotigs 27038, 27937 and 36598), it was unclear which AtMPK was the closest ortholog; in the phylogenetic tree, no AtMPK was close enough to be classified as a potential ortholog, but in all cases, a *Solanum lycopersicum* ortholog was found.

Directed Y2H assays were then performed using ScFRK3 as bait and all ScMKKs as preys. Since the full version of ScFRK3 was interacting with all preys, including the negative control (pGADT7, empty vector, not shown), three different versions of the ScFRK3-pGBKT7 constructs were made, as shown in [figure 27A](#). The N-terminal construct (ScFRK3-Npart), comprises amino acids 1 to 224, the middle part (ScFRK3-Mpart) comprises amino acids 84 to 250, while the ScFRK3-Cpart comprises amino acids 142 to 352. While none of the separate ScFRK3 constructs interacted with the empty vector (pGADT7), the ScFRK3-Cpart interacted only with isotig15708, which was renamed ScMKK3, being the closest ortholog of the *Arabidopsis* MKK3. This interaction was exclusive since only the ScFRK3-Cpart interacted with isotig15708 (ScMKK3), while the ScFRK3-mid and Cpart did not interact with any ScMKKs ([figure 27B](#)). The ScFRK3-ScMKK3 interaction was also confirmed *in vivo* in onion epidermal cells using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays ([figure 27C](#)). When ScFRK3-NYFP (tagged with the N-terminal of the Yellow Fluorescent Protein) and ScMKK3-CYFP (tagged with the C-terminal of the Yellow Fluorescent Protein) were co-expressed in onion cells, fluorescence was strongly observed inside the nucleus and, to a lesser extent, in the cytoplasm. The nuclear localization was confirmed by co-localization with the

Hoechst 33342 nuclear stain. Moreover, the expression pattern of *ScMKK3* was verified by semi-quantitative RT-PCR using specific primers and was found to be expressed in somatic as well as reproductive tissues (style, ovary, stamen and buds) ([supplementary figure 8A](#)), overlapping the *ScFRK3* expression pattern. As for *ScFRK3*, *ScMKK3*-GFP alone is also localized inside the nucleus and the cytoplasm ([supplementary figure 8B](#)). Taken together, these results suggest that *ScFRK3* interacts strongly with *ScMKK3* in both the nucleus and cytoplasm.

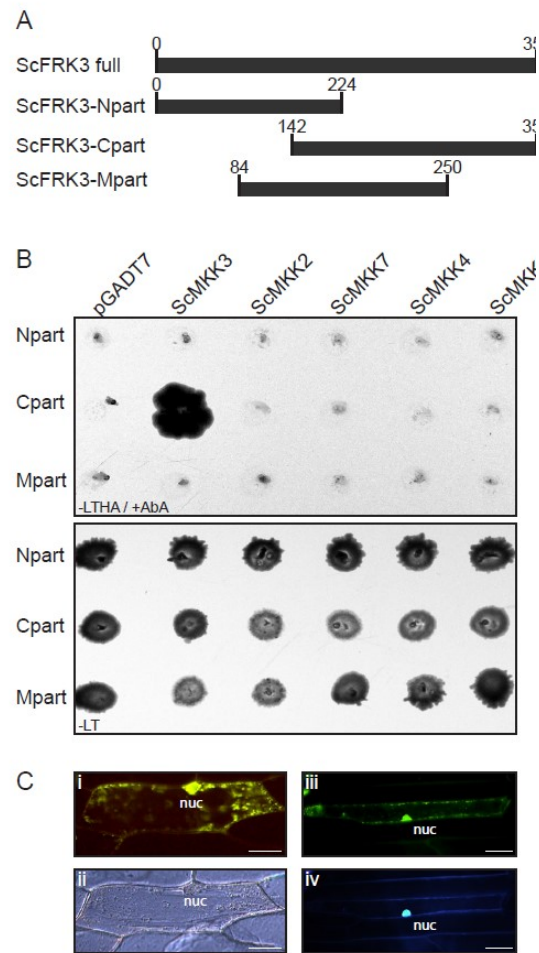


Figure 27: ScFRK3 interacts with ScMKK3

A. Diagram showing the three different constructs made in pGBKT7 with ScFRK3 as the insert. B. Directed Y2H assays between the three ScFRK3-pBKT7 constructs and the five ScMKKs found in the *Solanum chacoense* transcriptome. The only positive interaction is shown between ScFRK3-Cpart and ScMKK3. C. The interaction between ScFRK3 and ScMKK3 is confirmed by BiFC in onion cells (I and iii). DIC image of i (ii). Nuclear localization confirmation with the Hoechst 33342 DNA stain (iv). Scale bars: 50 μ m.

ScMKK3 physically interacts with ScMPK4

In order to identify a possible signaling cascade downstream of ScFRK3, directed Y2H assays were performed using ScMKK3 as bait, and all ScMPKs found in the combined pollen and ovule transcriptome as preys. Since the full version of ScMKK3 was interacting with all ScMPKs preys as well as the negative control vector (pGADT7, empty vector, not shown), three new versions of *ScMKK3* were produced. The *ScMKK3* constructs are shown in [figure 28A](#). The ScMKK3-Npart comprises the N-terminal part from amino acids 1 to 258; the ScMKK3-Cpart comprises the C-terminal part from amino acids 259 to 515; and the ScMKK3-Mpart comprises amino acids 130 to 386. As shown in [figure 28B](#), a single interaction was uncovered between the ScMKK3-Mpart and isotig37333, while no yeast was found growing using the negative control or any of the other 15 ScMPKs (not shown). Isotig37333, as seen in [supplementary figure 7](#), is close to AtMPK13 and SIMPK4. Isotig37333 is 100% identical to the *Solanum lycopersicum* (Sl) MPK4 (Solyc11g072630) and 99% identical to the *Solanum tuberosum* (St) MPK13 (PGSC0003DMG400025366). The interaction between the ScMKK3 and the isotig37333 MPK was confirmed by *in vivo* complementation using BiFC in onion epidermal cells ([figure 28C](#)). Yellow fluorescence was observed in the nucleus and cytoplasm of cells co-expressing ScMKK3-CYFP and ScMPK4-NYFP. Nuclear localization was also confirmed using the Hoechst 33342 nuclear staining ([figure 28ii](#)). According to RT-PCR analyzes, *ScMPK4* is also expressed in buds, and to a lesser extent in other reproductive tissue ([supplementary figure 8A](#)), overlapping the *ScFRK3* and *ScMKK3* expression patterns. Like most MPKs, ScMPK4-GFP is localized mainly in the nucleus and slightly in the cytoplasm ([supplementary figure 8D](#)). The abovementioned results strongly suggest that ScMKK3 and ScMPK4 interact together in a potential signaling cascade downstream ScFRK3.

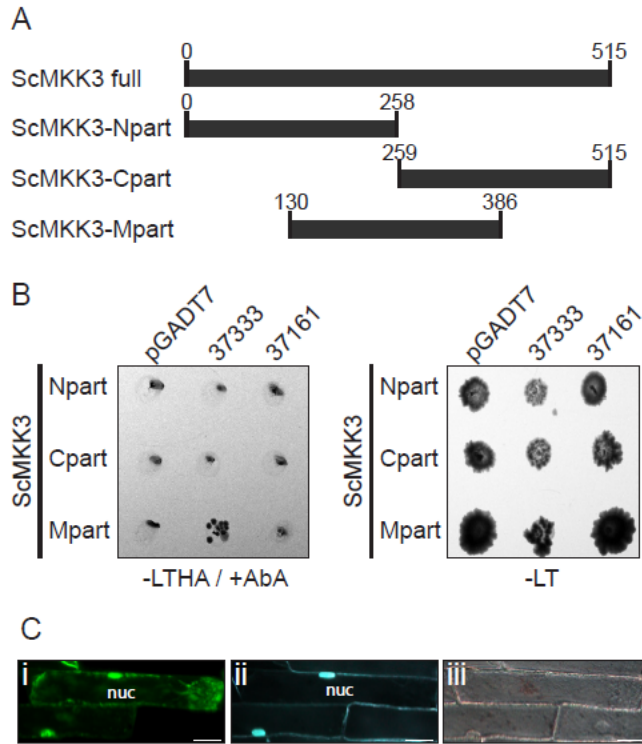


Figure 28: ScMKK3 interacts with ScMPK4

A. Diagram showing the three different constructs made in pGBKT7 with ScMKK3 as the insert. B. Directed Y2H between the three constructions of ScMKK3-pBKT7 and two ScMPKs. The only positive interaction is shown between ScMKK3-midpart and ScMPK4. C. The interaction between ScMKK3 and ScMPK4 is confirmed by BiFC in onion cells (i). Nuclear localization confirmation with the Hoechst 33342 DNA stain (ii). DIC image of i and ii (iii). Scale bars: 50 μm .

3.2.6. Discussion

Plant genomes harbor the largest MAPK family within the eukaryotes, suggesting major roles and a wide involvement in various biological processes. Here, we introduced *ScFRK3*, a *Solanum chacoense* MAPKKK within the MEKK family. *ScFRK3* is part of the FRK class (Fertilization-related kinases) of which two other members have been previously characterized (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015; O'Brien et al., 2007). The FRK class is a monophyletic group inside the MEKK subfamily that appeared within the *Angiospermae* and has largely expanded within the *Solanaceae* family (Daigle & Matton, 2015). Compared to *Arabidopsis thaliana* and *Gossypium raimondii*, that respectively have three and two FRK class kinases, *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum* possess 15 and 17 members, respectively. The highly specific tissue expression for the first two FRKs characterized and the phenotypes observed in *ScFRK2* overexpression plant lines (Gray-Mitsumune et al., 2006; O'Brien et al., 2007) and RNAi down-regulated *ScFRK1* lines (Lafleur et al., 2015), showed that these kinases play important roles in reproductive tissues, suggesting that other members of the FRK class might also play role in reproductive development. The current analysis of the *ScFRK3* gene supports this hypothesis. As for *ScFRK1* and 2, *ScFRK3* is expressed in developing ovules and stamens, which is consistent with the developmental defects observed in both male and female gametophytes in *ScFRK3* down-regulated mutants. But, contrary to *ScFRK1* and *ScFRK2*, *ScFRK3* is also expressed in leaves to similar levels than in reproductive tissues, while no obvious leaf phenotype could be observed in RNAi lines that showed severe reproductive defects. Since no single mutants could be rescued by the other FRKs, members of the same MEKK class, *ScFRK1*, 2 and 3 are clearly not genetically redundant. Considering that the amino acid pairwise identity between *ScFRK1* to 3 ranges from 32 to 42% (42 to 57% nucleotide identity on the ORF), it is not surprising that no RNA interference between *ScFRK1*, 2 and 3 was observed, as shown in [figure 24](#). Furthermore, although *ScFRK1* to 3 are expressed in both male and female reproductive tissues, their respective expression does not follow the same pattern. *ScFRK1* mRNA expression is detected very early on during ovule and pollen development, in the integument and megaspore mother cell (MMC) and in pollen mother cells (PMC), respectively. Before anthesis, *ScFRK1* mRNA levels increase in ovaries to reach a maximum around anthesis, were strong accumulation of *ScFRK1* mRNAs can be observed in the integument, the synergids and egg cell. In the absence of pollination, *ScFRK1* mRNA levels

slowly decrease, being still high 72 h after anthesis. Pollination and fertilization have drastic effects on *ScFRK1* mRNA accumulation with a steep decrease already 12 h after pollination, and an almost complete absence of *ScFRK1* mRNAs at fertilization (Lafleur et al., 2015). On the contrary, *ScFRK2* mRNA levels are very weak in all tissues tested and almost undetectable in mature ovaries, where they increase dramatically after fertilization (Gray-Mitsumune et al., 2006). *ScFRK3* mRNAs, however, are more abundant in developing stamens than in developing ovules. Their level is slightly higher in ovules of 5-6 mm buds, and it decreases to reach undetectable expression (in RT-PCR) at anthesis, while expression is still detected in stamens. Weak expression is still detectable after pollination and in developing fruits. *In situ* hybridization confirmed the RT-PCR results, showing that *ScFRK3* is expressed strongly in developing pollen (tetrads and microspores) as well as the tapetum, and it is also expressed in young ovules, but to lower levels.

Unlike the two other FRKs characterized previously, ScFRK3 is found both in the cytoplasm and the nucleus, where it possibly initiates its signaling cascade. Yeast two hybrid screens revealed that only ScFRK3 ([figure 27](#)), not ScFRK1 nor ScFRK2 (data not shown), was able to interact strongly with ScMKK3. Of the 16 ScMPKs retrieved from the *Solanum chacoense* pollen and ovule transcriptome, only one, isotig37333 renamed ScMPK4, interacted with ScMKK3 ([figure 28](#)). Both *ScMKK3* and *ScMPK4* genes are also co-expressed in the same tissues as *ScFRK3*. Furthermore, BiFC assays showed that ScFRK3 co-localized with ScMKK3 ([figure 27](#)), and ScMKK3 with ScMPK4 ([figure 28](#)), both in the cytoplasm and the nucleus. All this tends to confirm the hypothesis of a unique signaling cascade specific to ScFRK3, involving ScMKK3 and ScMPK4.

An addition to signaling during gametophyte development

In *Arabidopsis thaliana*, several mutants were identified for their defects in gametophyte development, especially in both male and female mitosis steps. Some of them are TFs, like AGL23 in the female gametophyte (Colombo et al., 2008), or DUO 1 and DUO 3 on the male side (PMII) , some of them are mitochondrial proteins, like ANK6 (Borg et al., 2011; Brownfield, Hafidh, Durbarry, et al., 2009; Yu et al., 2010) or plasma membrane proteins, like GEX1 (Alandete-Saez et al., 2011), but most of them, for pollen development at last, are proteins associated with microtubules and cytokinesis, like TUBG1, TUBG2 (Pastuglia et al., 2006),

HINKEL, TETRASPORE (S.-A. Oh et al., 2008), GEM1 (S.K. Park et al., 1998) and TIO (S. Oh et al., 2014; S. A. Oh et al., 2005). In pollen development again, there is one potential signaling cascade involved in PMI, which starts with HINKEL and TETRASPORE acting as receptor/sensor for a signal, then transmitting it to the MAPK cascade (ANP1-3 – MKK6 – MPK4) to phosphorylate MAP65 and other MAPs involved in microtubule organization (Y. Takahashi et al., 2010). On the female side, despite all the mutants blocked in the FG1 stage, no potential signaling cascade has ever been uncovered. For example, AtKin-1 is a kinesin that has a role in long-distance transport of organelles, vesicles and chromosomes and also in microtubule dynamics, it is involved in FG mitosis, but no interacting partner has been found yet (Haiqing Wang et al., 2014). There is one cascade involved in ES maturation that has been uncovered, with genetics, but it is not known how the proteins are connected together. Indeed, genetics has proven that CKII, a histidine kinase protein which is involved in ES maturation (Deng et al., 2010), acts upstream MYB119 TF, which is also involved in ES maturation (Rabiger & Drews, 2013). Moreover, MYB119 expression level is lower in *cki* mutants.

Here, we provided a new potential signaling cascade involved in gametophyte development. ScFRK3 is a MAPKKK that is clearly acting in both male and female gametophytes development, probably during the mitosis steps, and is strongly interacting with ScMKK3. Our results strongly suggest that the ScFRK3-ScMKK3-ScMPK4 could be a *bona fide* cascade involved in plant sexual reproduction. Further genetic analysis of the two downstream kinases from *ScFRK3* should reveal the full role of this cascade.

3.2.7. Acknowledgements

We thank Audrey Loubert-Hudon for her help with microscopy and *in situ* hybridizations. We also thank Nancy Robert for taking care of the plants in the greenhouse. This work was supported by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to D.P.M. C.D. is a recipient of PhD fellowships from NSERC and from Le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT).

3.2.8. Supplementary data

Supplementary Tables

Supplementary Table V: List of primers

Supplementary Table VI: All MKKs and MPKs found in *Solanum chacoense* ovule and pollen transcriptome and their orthologs (if clearly identifiable in a phylogenetic tree) in *Arabidopsis thaliana*.

Supplementary Table V: List of primers

Name of the primer	Sequence	Size of amplicon
FRK3 RT-PCR F	5'-GTCCATTTGATTTCCCAGATTG-3'	343
FRK3 RT-PCR R	5'-GTGGCAACCAATGTTATGTAC-3'	
FRK4 RT-PCR F	5'-GCAACAGTGGCAGCCCTTCAAC-3'	338
FRK4 RT-PCR R	5'-TGGCCTAGCCTAATCACTAAATTG-3'	
FRK5 RT-PCR F	5'-GAAATCGCCTCTTCGTTTGCTG-3'	227
FRK5 RT-PCR R	5'-CTACAGAGAGTGTAGCCAAATAAG-3'	
FRK6 RT-PCR F	5'-GCAATTGCTAGATCCGAAGC-3'	288
FRK6 RT-PCR R	5'-GGATCAAACCCATACATACTTC-3'	
FRK3 ORF F	5'-ATGGATTGGGTTCGTGGTG-3'	1059
FRK3 ORF R	5'-TCACCTAACAGTAACCCAG-3'	
FRK3 in situ T3 F	5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGGGCAAAGAGAGTTGATGATG-3'	603
FRK3 in situ T7 R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCACCTAACAGTAACCCAG-3'	
15708 RT-PCR F	5'-GAGGGTCTGCCAAACTTGAAAG-3'	198
15708 RT-PCR R	5'-CCATTTACAGGAACACACACAAC-3'	
37333 RT-PCR F	5'-GTTGAGGATGCATTGAACCATCC-3'	232
37333 RT-PCR R	5'-GCTAACCTGCCACAACCAAATC-3'	

Supplementary Table VI: All MKKs and MPKs found in *S. chacoense* ovule and pollen transcriptome and their orthologs (if clearly identifiable in a phylogenetic tree) in *A. thaliana*.

	<i>S. chacoense</i> transcript	Closest <i>A. thaliana</i> ortholog	Closest <i>S. lycopersicum</i> ortholog	Group
MKKs	isotig13756	AtMKK2	SIMKK1	A
	isotig15708	AtMKK3	SIMKK5	B
	isotig25857	AtMKK7; AtMKK8; AtMKK9	SIMKK4	D
	isotig37602	AtMKK4; AtMKK5	SIMKK2	C
	isotig38529	AtMKK6	SIMKK3	A
MPKs	isotig07712	AtMPK18; AtMPK19	SIMPK10	D
	isotig10718	AtMPK9	SIMPK16	D
	isotig16044	AtMPK4; AtMPK11; AtMPK12	SIMPK6	B
	isotig17837	AtMPK16	SIMPK13	D
	isotig27038	Unclear	SIMPK14; SIMPK15	D
	isotig27937	Unclear	SIMPK8	C
	isotig34221	AtMPK20	SIMPK12	D
	isotig34270	AtMPK18; AtMPK19	SIMPK11	D
	isotig34923	AtMPK9	SIMPK16	D
	isotig35805	AtMPK1; AtMPK2	SIMPK9	C
	isotig36077	AtMPK4; AtMPK11; AtMPK12	SIMPK5	B
	isotig36598	Unclear	SIMPK7	B
	isotig37161	AtMPK6	SIMPK1	A
	isotig37197	AtMPK3	SIMPK3	A
	isotig37281	AtMPK6	SIMPK2	A
	isotig37333	AtMPK13	SIMPK4	B

Supplementary Figures

Figure S6: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMKKs, the SIMKKs and the ScMKKs found in the *S. chacoense* transcriptome. The MKKs are classified in four groups: group A in blue, group B in pink, group C in gold and group D in green. The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the kinase domain of AtBRI1.

Figure S7: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMPKs, StMPKs and the ScMPKs found in the *S. chacoense* transcriptome. The MPKs are classified in four groups: group A in blue, group B in pink, group C in gold and group D in green. The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the kinase domain of AtBRI1.

Figure S8: *ScMKK3* and *ScMPK4* expressions and localizations.

A. Expression profiling on different tissue of *ScMKK3* and *ScMPK4* using semi-quantitative RT-PCRs. B and C. *ScMKK3*-GFP localization in onion cell (B) and DIC image of B (C). D and E. *ScMPK4*-GFP localization in onion cell (D) and DIC image of D (E). Scale bars: 50 μm .

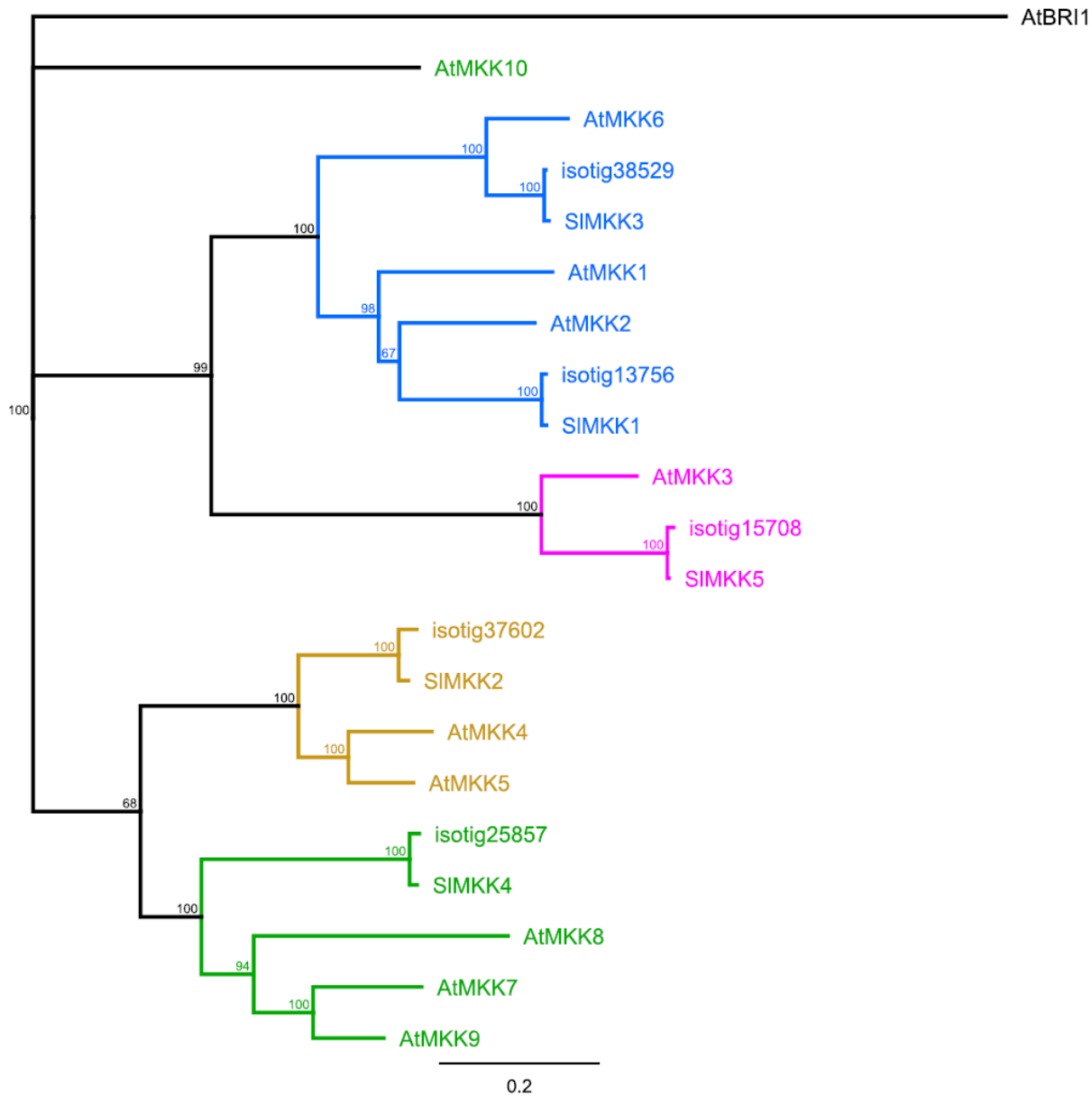


Figure S6: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMKKs, the SIMKKs and the ScMKKs found in the *S. chacoense* transcriptome. The MKKs are classified in four groups: group A in blue, group B in pink, group C in gold and group D in green. The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the kinase domain of AtBRI1.

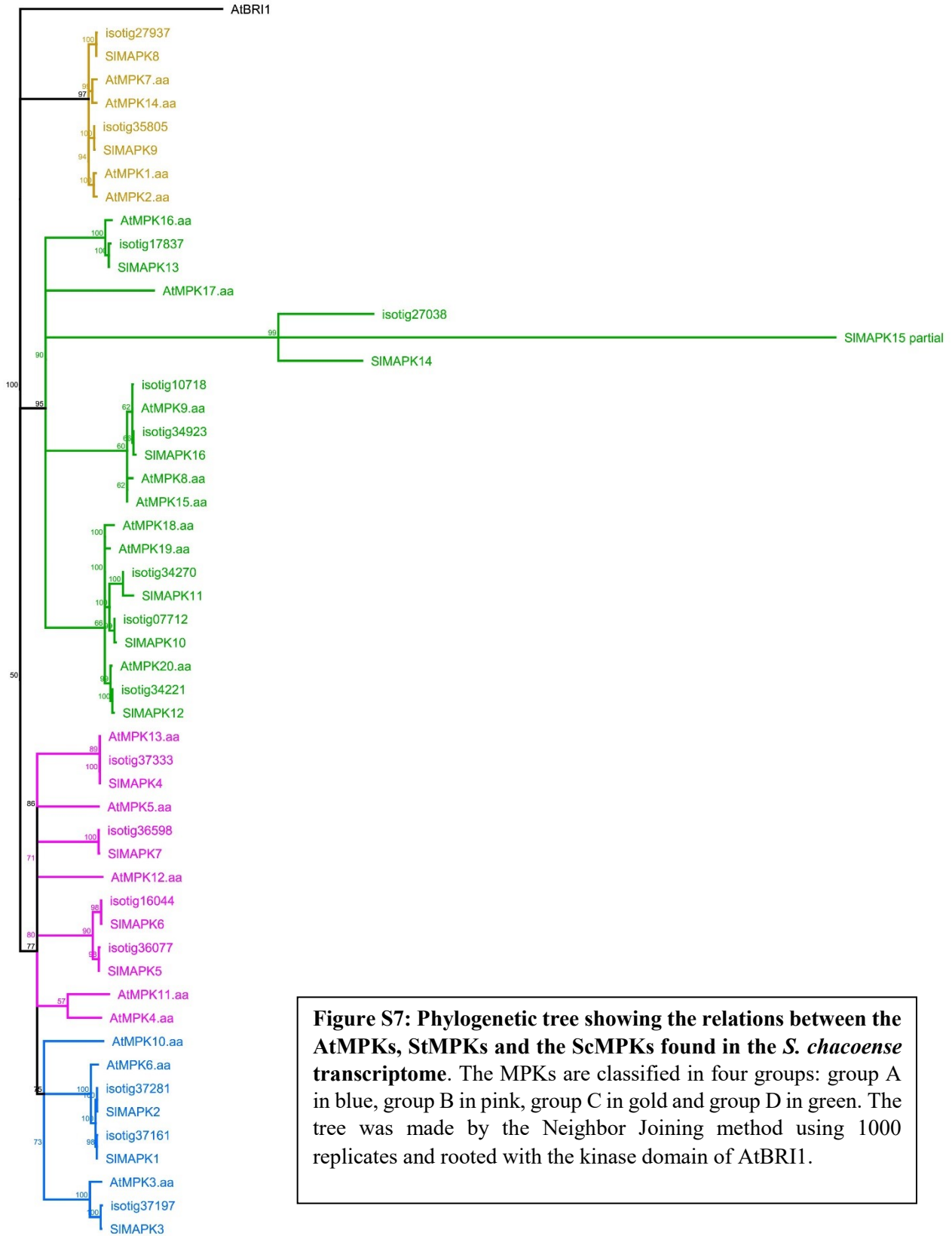


Figure S7: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMPKs, StMPKs and the ScMPKs found in the *S. chacoense* transcriptome. The MPKs are classified in four groups: group A in blue, group B in pink, group C in gold and group D in green. The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the kinase domain of AtBRI1.

2.0

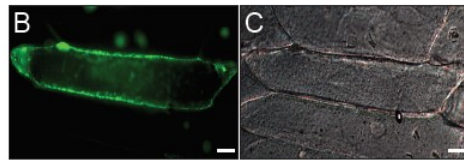
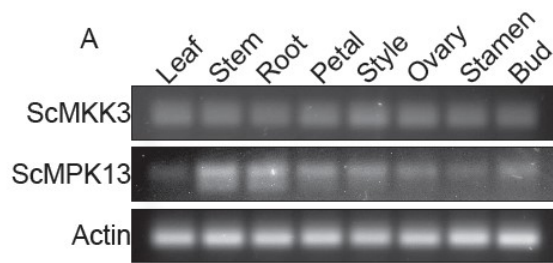


Figure S8: *ScMKK3* and *ScMPK4* expressions and localizations.

A. Expression profiling on different tissue of *ScMKK3* and *ScMPK4* using semi-quantitative RT-PCRs. B and C. *ScMKK3*-GFP localization in onion cell (B) and DIC image of B (C). D and E. *ScMPK4*-GFP localization in onion cell (D) and DIC image of D (E). Scale bars: 50 μ m.

4. Discussion générale et perspectives futures

4.1. Étudier les FRKs comme projet de doctorat

Le but de la présente thèse était d'étudier, de caractériser et d'augmenter notre niveau de compréhension du rôle de cette classe particulière de MAPKKs présente en grand nombre chez les Solanacées. Pour ce faire, les génomes de 15 espèces végétales différentes allant des algues jusqu'aux angiospermes ont été analysés pour retrouver tous les membres de la famille des MEKKs, puis des études phylogénétiques ont permis de les caractériser selon les différents groupes formés. Alors que les gènes orthologues à AtMAPKKK1-12 sont présents chez la majorité des espèces, ceux qui sont orthologues à AtMAPKKK13-21 sont beaucoup plus spécifiques aux espèces végétales supérieures, principalement chez les angiospermes. La classe des FRKs en particulier, c'est-à-dire les gènes orthologues à AtMAPKKK19-21, n'est présente que chez les angiospermes dicotylédones, un seul membre est présent chez l'angiosperme basal *Amborella trichopoda* alors qu'aucun membre n'a été retrouvé chez les monocotylédones. De plus, la classe des FRKs a pris une étonnante expansion chez les espèces étudiées de la famille des *Solanacées* (*Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* et *Nicotiana benthamiana*), comparée à toutes les espèces du clade des *Rosidaeae* étudiées (*Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium raimondii* et *Populus trichocarpa*) (Daigle & Matton, 2015). Ce qui nous a amenés à nous poser la question : pourquoi ? Pourquoi une telle expansion dans une famille et pas ailleurs ? Quels sont les rôles qui rendent les FRKs si importantes chez les Solanacées plus qu'ailleurs ? Une piste qui a été étudiée pour répondre à ces questions est leur rôle au niveau du développement reproductif chez *Solanum chacoense*. En effet, il est possible d'émettre l'hypothèse du rôle de la classe des FRKs dans le développement reproductif pour toutes sortes de raisons. D'abord, il est déjà connu que *ScFRK1* et *ScFRK2* ont des rôles dans le développement des gamétophytes mâle et femelle (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur et al., 2015; O'Brien et al., 2007), puis *AtMAPKKK19-21*, qui sont exprimées uniquement dans le pollen, semblent avoir un effet sur ce dernier. De plus, plusieurs membres de la classe des FRKs sont exprimés dans les organes reproducteurs ou ont une expression qui est spécifique aux organes reproducteurs (Daigle & Matton, 2015). L'arrivée de la classe des FRKs, à la base des angiospermes coïncide avec l'apparition dans l'évolution de l'ovule entouré d'un ovaire et du sac embryonnaire tel que présenté dans l'introduction de cette thèse, avec quelques différences

selon les espèces. Ce qui renforce l'hypothèse du rôle de cette classe dans le développement reproductif.

Dans un second temps, nous avons caractérisé *ScFRK3*, un troisième membre de la classe des FRKs chez *Solanum chacoense* afin d'accroître nos connaissances plus précises sur cette classe de MAPKKKs. Tout comme ses deux gènes frères *ScFRK1* et *ScFRK2*, *ScFRK3* est exprimé de façon différentielle dans les organes reproducteurs tout au long de leur développement. En effet, *ScFRK1* étant plus exprimé dans l'ovaire peu avant l'anthèse et à l'anthèse ainsi que dans les cellules-mères du pollen (PMC) (Lafleur et al., 2015), *ScFRK2*, lui, est plus exprimé dans l'ovaire après pollinisation et fécondation ainsi que dans le pollen immature (Gray-Mitsumune et al., 2006; O'Brien et al., 2007). Quant à *ScFRK3*, il est aussi exprimé dans les ovaires en développement, mais plus tôt que *ScFRK1*, et son expression est très faible lorsque la fleur est à l'anthèse. Un peu d'expression est détectée lorsque le fruit se développe, principalement au niveau du péricarpe. Les phénotypes des mutants dont l'expression de *ScFRK1* ou *ScFRK3* est perturbée sont semblables : des sacs embryonnaires dont le développement s'est arrêté à l'étape de la mégaspore fonctionnelle et des grains de pollen qui ne passent pas l'étape de la mitose I (Lafleur et al., 2015). Du côté de *ScFRK2*, ce sont les mutants dont l'expression est augmentée qui ont un phénotype au niveau des gamétophytes. En effet, le développement des sacs embryonnaire s'arrête aussi à l'étape de la mégaspore fonctionnelle et les grains de pollen ne sont pas viables (O'Brien et al., 2007). De plus, on observe une transformation homéotique des téguments de l'ovule en en une sorte de structure en forme de stigmate (Gray-Mitsumune et al., 2006).

Bien que les phénotypes des trois mutants suggèrent des rôles similaires pour les trois gènes, leurs patrons d'expression différents ainsi que le fait que les phénotypes présentés proviennent de mutants simples nous permettent d'affirmer que les trois gènes ont des rôles distincts au niveau du développement des gamétophytes. De plus, *ScFRK3* interagit avec *ScMKK3* dans une voie de signalisation potentielle, alors que *ScFRK1* et *ScFRK2* n'interagissent pas avec *ScMKK3*. Ceci constitue une autre preuve de la différence entre les rôles de ces trois MAPKKKs.

Ainsi, au terme des deux chapitres de la présente thèse, il a été possible de caractériser la classe des FRKs au sein de la famille des MEKKs, son expansion et même son origine possible. Nous avons aussi augmenté notre niveau de compréhension au sujet de cette classe spéciale en caractérisant *ScFRK3* et son rôle dans le développement des gamétophytes mâle et femelle. Le but de ce projet de doctorat a donc été atteint.

4.2. La signalisation par voies MAPK et leurs implications dans la reproduction

Chez *Solanum chacoense*, trois des six membres connus de la classe des FRKs sont impliqués au niveau de la reproduction, plusieurs membres de la classe des FRKs chez les différentes espèces étudiées sont exprimés et possiblement impliqués dans la reproduction. Ces FRKs sont toutes des MAPKKKs de la famille des MEKKs, et peuvent potentiellement initier des cascades de signalisation en interagissant avec des MKKs, des MPKs ou même des facteurs de transcription. Toujours chez *Solanum chacoense*, cinq MKKs et 16 MPKs ont été répertoriées dans le transcriptome de l'ovule et du pollen, confirmant la possibilité de plusieurs cascades de signalisation impliquées dans la reproduction, que ce soit avec les FRKs ou avec d'autres MEKKs.

Chez *Arabidopsis thaliana*, mis à part la voie impliquant YODA (YODA → MKK4/5 → MPK3/6) qui est impliquée dans le développement du jeune embryon, aucune autre voie de signalisation complète n'a été identifiée au niveau de la reproduction. Cependant, parmi les 21 MEKKs, les 10 MKK et les 20 MPKs répertoriées dans son génome, quelques-unes sont connues pour leur rôle soit dans le développement du pollen, celui de l'ovule ou celui de l'embryon. Les MEKKs *MAP3Kε1* (*MAPKKK7*) et *MAP3Kε2* (*MAPKKK6*) sont impliquées dans le développement du pollen, plus particulièrement au niveau de la formation de la membrane plasmique dans les microspores suite à la PMI (Chaiwongsar et al., 2006). De plus, ces deux MEKKs sont aussi impliquées dans le développement de l'embryon lors des stades globulaire et cœur (Chaiwongsar et al., 2012). Quelques mutants de MPKs ont révélé leurs rôles au niveau de la reproduction, comme *MPK3* et *MPK6* dans le développement tardif des téguments de l'ovule (Huachun Wang et al., 2008) ainsi que dans le guidage funiculaire du tube pollinique (Guan, Lu, et al., 2014) et *MPK4* au niveau de la méiose lors du développement du pollen (Zeng et al., 2011). Considérant la grande capacité de communication entre les cellules lors des nombreuses étapes du développement des gamétophytes et de l'embryon, en plus du

nombre élevé de combinaisons possibles entre les MAPKs pour former des voies de signalisation, il est indiscutable qu'il existe encore de nombreuses autres voies à découvrir. La forte redondance entre les différentes MAPKs de même que la subtilité des phénotypes de certains mutants rendent complexe la tâche d'élucider le mystère. Avec l'avènement des nouvelles technologies de séquençage, il est désormais plus facile et surtout plus rapide d'obtenir les génomes et les transcriptomes de n'importe quelle espèce, de n'importe quel tissu, de n'importe quel stade de développement ou condition environnementale. Le séquençage des transcriptomes, qui nous permet de connaître l'expression différentielle de tous les gènes selon les tissus ou même les stades de développement d'un tissu particulier, nous aidera à identifier des candidats potentiels pour leur implication dans la reproduction. C'était d'ailleurs le but du second chapitre de cette thèse. Suite à leur identification, des mutants pourront être créés, des analyses plus poussées des patrons d'expression et même des tests d'interaction (par exemple, le double-hybride ciblé) pourront être faits.

4.3. Perspectives futures pour ce projet

La caractérisation des membres de la classe des FRKs n'en est qu'à ses premiers balbutiements, puisque seulement trois des six FRKs présents chez *Solanum chacoense* ont été caractérisés jusqu'à maintenant et aucun autre membre n'a été étudié chez une autre espèce, mis à part *Arabidopsis thaliana* (*AtMAPKKK19-21*) et *Brassica napus* (*BnMAPKKK19-21*). En continuité avec le projet, il serait donc intéressant d'approfondir nos connaissances de cette classe en examinant les rôles des autres FRKs chez *Solanum chacoense* (*ScFRK4-6*), par exemple en comparant leurs patrons d'expression avec ceux obtenus chez *ScFRK1-3*. Des mutants dont l'expression des trois différents gènes est perturbée pourraient être analysés, puis, encore une fois, comparés aux phénotypes obtenus avec les mutants déjà étudiés. De plus, l'hypothèse d'un rôle plus spécifique des FRKs aux Solanacées ayant été émise, il serait donc essentiel d'examiner leurs rôles chez d'autres espèces, autant des Solanacées (*Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, par exemple) que chez des espèces provenant d'autres familles (*Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*), ainsi que chez *Amborella trichopoda*, l'angiosperme basal connu pour ne posséder qu'une seule FRK (la FRK primitive). Des patrons d'expression peuvent être analysés et, dans certains cas, il pourrait même être possible de créer des mutants. Puisque de plus en plus de génomes et de transcriptomes sont

désormais disponibles, il serait intéressant de refaire l'analyse phylogénétique avec un plus grand nombre d'espèces. Cela faciliterait et apporterait des précisions importantes sur l'évolution de la classe des FRKs (confirmation de son origine chez les angiospermes ainsi que de sa perte chez les monocotylédones) ainsi que sur la sous-famille des MEKKs.

Le travail à propos de la caractérisation de *ScFRK3* pourrait aussi être plus approfondi. Des double-hybrides et des BiFC ont confirmé l'interaction entre *ScFRK3* et *ScMKK3*, mais afin de prouver leur interaction dans le cadre d'une cascade de signalisation par voie MAPK, il faudrait aussi prouver le transfert d'un groupement phosphate de la MEKK vers la MKK. Pour ce faire, un essai kinase *in vitro* en utilisant des versions purifiées des protéines *ScFRK3* et *ScMKK3*, à l'aide de [γ - 32 P] dATP, pourrait constituer une excellente expérience. D'ailleurs, les trois protéines formant la voie potentielle, *ScFRK3*, *ScMKK3* et *ScMPK4*, ainsi que chacune de leur version *kinase-dead*, dont le domaine kinase a été modifié pour rendre la protéine inactive, ont été clonées dans des vecteurs pour expression bactérienne (His-tag), puis elles ont été purifiées sur colonne. *ScMKK3* et *ScMPK4* ont été exprimées et purifiées avec succès, mais bien que *ScFRK3* était suffisamment exprimée, nous n'avons pas été en mesure de purifier la protéine. En effet, cette dernière n'étant soluble qu'en conditions dénaturantes (8M urée), il a été impossible de réduire la concentration d'urée sans qu'elle forme un précipité, malgré plusieurs tentatives (différentes conditions utilisées pour effectuer la dialyse, par exemple). Une solution envisageable pour tenter de résoudre le problème serait d'utiliser une autre étiquette pour purifier *ScFRK3*, GST, par exemple (GST-tag ou His-GST-tag). La GST étant une plus grosse étiquette comparée à His, les chances de bons repliements de la protéine exprimée sont plus grandes, ce qui éviterait la précipitation de cette dernière.

Si la voie de signalisation proposée dans cette thèse (*ScFRK3* → *ScMKK3* → *ScMPK4*) s'avère confirmée par les essais kinases, il deviendrait alors intéressant d'investiguer plus en profondeur sur les causes de cette voie (en amont) et ses conséquences (en aval). Par exemple, afin de découvrir les facteurs de transcription, ou tout autre protéine située en aval de la voie, un criblage en double-hybride chez la levure pourrait être envisagé en utilisant *ScMPK4* comme appât. Une autre façon de faire pourrait être d'incuber *ScMPK4* activée avec de l'ATP et un extrait de protéines provenant d'ovaires et d'étamines, puis de faire séquencer la fraction enrichie en protéines phosphorylées. En comparant avec le contrôle négatif, par exemple un

extrait incubé avec une version *kinase-dead* de ScMPK4, il serait simple de cibler les protéines qui agissent possiblement en aval de la voie. Pour ce qui est de découvrir ce qui se passe en amont de la voie, cela restera plus difficile. En effet, partir à la recherche des récepteurs ou des ligands peut s'avérer une tâche particulièrement ardue. Il est possible de trouver des récepteurs en optant pour un criblage en double-hybride en utilisant ScFRK3 comme appât, par exemple, mais puisque selon notre hypothèse de voie de signalisation classique, le récepteur serait transmembranaire, il y a des possibilités de ne pas le retrouver dans les candidats positifs du criblage. De plus, en ce moment, rien ne nous confirme la présence de cette voie de signalisation classique ; ScFRK3 pourrait être activée par autre chose qu'un récepteur transmembranaire de type kinase. Un autre fait à considérer est qu'il est impossible de produire des mutants pour en faire le criblage, *Solanum chacoense* étant une espèce d'une assez grande taille au développement plutôt lent comparé à *Arabidopsis thaliana*, il est donc impensable d'opter pour cette option.

5. Conclusion

Ce projet, qui avait pour but ultime de permettre l'avancée des connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire de la reproduction végétale a atteint l'ensemble des objectifs énumérés dans cette thèse. En plus de l'amélioration de notre compréhension globale sur le sujet, ce projet a permis à d'autres hypothèses encore plus larges de prendre forme, notamment au niveau de la fonction de certains gènes apparus au cours de l'évolution des plantes à fleurs. En somme, cela me permet de qualifier ce projet de réussite.

La science étant un mouvement continu, je souhaite et j'espère que ce projet ouvrira le chemin vers de nombreux autres projets. Comme mentionné dans cet ouvrage, le développement des gamétophytes, principalement le sac embryonnaire, demeure un mystère malgré les nombreux mutants qui ont été caractérisés au fil des années. Arriverons-nous un jour à percer le mystère ? J'en doute, mais qui suis-je pour savoir ce qui se passera au cours des prochaines décennies...

6. Références

- Alandete-Saez, M., Ron, M., Leiboff, S., & McCormick, S. (2011). Arabidopsis thaliana GEX1 has dual functions in gametophyte development and early embryogenesis. *The Plant Journal*, 68(4), 620-632. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04713.x
- Andreasson, E., & Ellis, B. (2010). Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends in Plant Science*, 15(2), 106-113. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.001>
- Arabidopsis Genome, I. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408(6814), 796-815. doi:10.1038/35048692
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., . . . Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977-983.
- Bayer, M., Nawy, T., Giglione, C., Galli, M., Meinel, T., & Lukowitz, W. (2009). Paternal Control of Embryonic Patterning in Arabidopsis thaliana. *Science*, 323(5920), 1485-1488. doi:10.1126/science.1167784
- Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell*, 4(8), 879-887. doi:10.1105/tpc.4.8.879
- Bemer, M., Heijmans, K., Airoidi, C., Davies, B., & Angenent, G. C. (2010). An Atlas of Type I MADS Box Gene Expression during Female Gametophyte and Seed Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(1), 287-300. doi:10.1104/pp.110.160770
- Berger, F. (2009). Reproductive Biology: Receptor-Like Kinases Orchestrate Love Songs in Plants. *Current Biology*, 19(15), R647-R649. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.018>
- Biol, I., Raymond, A., Jackman, S. D., Pleasance, S., Coope, R., Taylor, G. A., . . . Jones, S. J. M. (2013). Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics*, 29(12), 1492-1497. doi:10.1093/bioinformatics/btt178
- Boavida, L. C., Becker, J. D., & Feijo, J. A. (2005). The making of gametes in higher plants. *Int J Dev Biol*, 49(5-6), 595-614. doi:10.1387/ijdb.052019lb
- Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M. A., Jaciubek, M., Schroeder, J. I., & Grossniklaus, U. (2009). Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. *Development*, 136(19), 3279-3288. doi:10.1242/dev.040071
- Borg, M., Brownfield, L., Khatab, H., Sidorova, A., Lingaya, M., & Twell, D. (2011). The R2R3 MYB Transcription Factor DUO1 Activates a Male Germline-Specific Regulon Essential for Sperm Cell Differentiation in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 23(2), 534-549. doi:10.1105/tpc.110.081059
- Borg, M., Brownfield, L., & Twell, D. (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of Experimental Botany*, 60(5), 1465-1478. doi:10.1093/jxb/ern355
- Borg, M., & Twell, D. (2010). Life after meiosis: patterning the angiosperm male gametophyte. *Biochemical Society Transactions*, 38(2), 577-582. doi:10.1042/bst0380577
- Bowman, J. L., & Floyd, S. K. (2008). Patterning and Polarity in Seed Plant Shoots. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 67-88. doi:doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356
- Brewbaker, J. L., & Kwack, B. H. (1963). The Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *American Journal of Botany*, 50(9), 859-865. doi:10.2307/2439772
- Brownfield, L., Hafidh, S., Borg, M., Sidorova, A., Mori, T., & Twell, D. (2009). A Plant Germline-Specific Integrator of Sperm Specification and Cell Cycle Progression. *PLoS Genetics*, 5(3), e1000430. doi:10.1371/journal.pgen.1000430
- Brownfield, L., Hafidh, S., Durbarry, A., Khatab, H., Sidorova, A., Doerner, P., & Twell, D. (2009). Arabidopsis DUO POLLEN3 Is a Key Regulator of Male Germline Development and Embryogenesis. *The Plant Cell*, 21(7), 1940-1956. doi:10.1105/tpc.109.066373

- Brownfield, L., & Twell, D. (2009). A dynamic DUO of regulatory proteins coordinates gamete specification and germ cell mitosis in the angiosperm male germline. *Plant Signaling & Behavior*, 4(12), 1159-1162.
- Bulankova, P., Riehs-Kearnan, N., Nowack, M. K., Schnittger, A., & Riha, K. (2010). Meiotic Progression in Arabidopsis Is Governed by Complex Regulatory Interactions between SMG7, TDM1, and the Meiosis I-Specific Cyclin TAM. *The Plant Cell*, 22(11), 3791-3803. doi:10.1105/tpc.110.078378
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G.-E., Amundsen, S. S., Mandal, A., & Aalen, R. B. (2003). INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION Controls Floral Organ Abscission in Arabidopsis and Identifies a Novel Family of Putative Ligands in Plants. *The Plant Cell*, 15(10), 2296-2307. doi:10.1105/tpc.014365
- Capron, A., Gourgues, M., Neiva, L. S., Faure, J.-E., Berger, F., Pagnussat, G., . . . Sundaresan, V. (2008). Maternal Control of Male-Gamete Delivery in Arabidopsis Involves a Putative GPI-Anchored Protein Encoded by the LORELEI Gene. *The Plant Cell*, 20(11), 3038-3049. doi:10.1105/tpc.108.061713
- Chae, K., & Lord, E. M. (2011). Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. *Annals of Botany*, 108(4), 627-636. doi:10.1093/aob/mcr015
- Chaiwongsar, S., Otegui, M. S., Jester, P. J., Monson, S. S., & Krysan, P. J. (2006). The protein kinase genes MAP3K ϵ 1 and MAP3K ϵ 2 are required for pollen viability in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 48(2), 193-205. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02863.x
- Chaiwongsar, S., Strohm, A., Su, S.-H., & Krysan, P. J. (2012). Genetic analysis of the Arabidopsis protein kinases MAP3K ϵ 1 and MAP3K ϵ 2 indicates roles in cell expansion and embryo development. *Frontiers in Plant Science*, 3. doi:10.3389/fpls.2012.00228
- Chen, G.-H., Sun, J.-Y., Liu, M., Liu, J., & Yang, W.-C. (2014). SPOROCTELESS Is a Novel Embryophyte-Specific Transcription Repressor that Interacts with TPL and TCP Proteins in Arabidopsis. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(12), 617-625. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2014.08.009>
- Chen, L., Hu, W., Tan, S., Wang, M., Ma, Z., Zhou, S., . . . He, G. (2012). Genome-Wide Identification and Analysis of MAPK and MAPKK Gene Families in *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE*, 7(10), e46744. doi:10.1371/journal.pone.0046744
- Chen, Z., Tan, J. L. H., Ingouff, M., Sundaresan, V., & Berger, F. (2008). Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in Arabidopsis thaliana. *Development*, 135(1), 65-73. doi:10.1242/dev.010108
- Chevalier, E., Loubert-Hudon, A., & Matton, D. P. (2013). ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell-cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. *The Plant Journal*, 73(6), 1019-1033. doi:10.1111/tpj.12096
- Chevalier, É., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E. L., & Matton, D. P. (2011). Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization. *New Phytologist*, 192(1), 13-28. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03836.x
- Cho, S. K., Larue, C. T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.-L., Zhang, S., & Walker, J. C. (2008). Regulation of floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15629-15634. doi:10.1073/pnas.0805539105
- Christensen, C. A., Gorsich, S. W., Brown, R. H., Jones, L. G., Brown, J., Shaw, J. M., & Drews, G. N. (2002). Mitochondrial GFA2 Is Required for Synergid Cell Death in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(9), 2215-2232. doi:10.1105/tpc.002170
- Cohen, D., Bogeat-Triboulot, M.-B., Tisserant, E., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.-L., Lelandais, G., . . . Hummel, I. (2010). Comparative transcriptomics of drought responses in Populus: a meta-

- analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics*, *11*(1), 1-21. doi:10.1186/1471-2164-11-630
- Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M. M., & Colombo, L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *54*(6), 1037-1048. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03485.x
- Consortium, T. G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, *485*(7400), 635-641. doi:<http://www.nature.com/nature/journal/v485/n7400/abs/nature11119.html#supplementary-information>
- Consortium, T. P. G. S. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, *475*(7355), 189-195. doi:<http://www.nature.com/nature/journal/v475/n7355/abs/nature10158-f1.2.html#supplementary-information>
- CristinaRodriguez, M., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *61*(1), 621-649. doi:doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112252
- Cui, X., Lv, Y., Chen, M., Nikoloski, Z., Twell, D., & Zhang, D. (2015). Young Genes out of the Male: An Insight from Evolutionary Age Analysis of the Pollen Transcriptome. *Mol Plant*, *8*(6), 935-945. doi:10.1016/j.molp.2014.12.008
- Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*, *133*(2), 462-469. doi:10.1104/pp.103.027979
- Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., . . . Li, J. (2006). Increased Expression of MAP KINASE KINASE7 Causes Deficiency in Polar Auxin Transport and Leads to Plant Architectural Abnormality in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *18*(2), 308-320. doi:10.1105/tpc.105.037846
- Daigle, C., & Matton, D. P. (2015). Genome-wide analysis of MAPKKs shows expansion and evolution of a new MEKK class involved in solanaceous species sexual reproduction. *BMC Genomics*, *16*(1), 1-15. doi:10.1186/s12864-015-2228-3
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Boudsocq, M., Neubauer, J., Frei Dit Frey, N., Leonhardt, N., . . . Colcombet, J. (2015). Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, *82*(2), 232-244. doi:10.1111/tpj.12808
- del Pozo, O., Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2004). MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *The EMBO Journal*, *23*(15), 3072-3082. doi:10.1038/sj.emboj.7600283
- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., . . . Zuo, J. (2010). Arabidopsis Histidine Kinase CK11 Acts Upstream of HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS to Regulate Female Gametophyte Development and Vegetative Growth. *The Plant Cell*, *22*(4), 1232-1248. doi:10.1105/tpc.108.065128
- Deribe, Y. L., Pawson, T., & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol*, *17*(6), 666-672. doi:10.1038/nsmb.1842
- Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2011). The age of protein kinases. *Methods Mol Biol*, *779*, 7-52. doi:10.1007/978-1-61779-264-9_2
- Drews, G. N., & Koltunow, A. M. G. (2011). The Female Gametophyte. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *9*, e0155. doi:10.1199/tab.0155
- Dumas, C., & Rogowsky, P. (2008). Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies*, *331*(10), 715-725. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.013>

- Durbarry, A., Vizir, I., & Twell, D. (2005). Male Germ Line Development in Arabidopsis. duo pollen Mutants Reveal Gametophytic Regulators of Generative Cell Cycle Progression. *Plant Physiology*, 137(1), 297-307. doi:10.1104/pp.104.053165
- Escobar-Restrepo, J.-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C., & Grossniklaus, U. (2007). The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception. *Science*, 317(5838), 656-660. doi:10.1126/science.1143562
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Döring, P., & Hirt, H. (2013). Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1, e59. doi:10.7717/peerj.59
- Forde, B. G., Cutler, S. R., Zaman, N., & Krysan, P. J. (2013). Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in Arabidopsis root architecture. *The Plant Journal*, 75(1), 1-10. doi:10.1111/tbj.12201
- Forsthoefel, N., Dao, T., & Vernon, D. (2010). PIRL1 and PIRL9, encoding members of a novel plant-specific family of leucine-rich repeat proteins, are essential for differentiation of microspores into pollen. *Planta*, 232(5), 1101-1114. doi:10.1007/s00425-010-1242-6
- Friedman, W. E., & Ryerson, K. C. (2009). Reconstructing the ancestral female gametophyte of angiosperms: Insights from Amborella and other ancient lineages of flowering plants. *American Journal of Botany*, 96(1), 129-143. doi:10.3732/ajb.0800311
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., & Zhang, Y. (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res*, 18(12), 1190-1198.
- García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Nombela, C., & Arroyo, J. (2009). The High Osmotic Response and Cell Wall Integrity Pathways Cooperate to Regulate Transcriptional Responses to Zymolyase-induced Cell Wall Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10901-10911. doi:10.1074/jbc.M808693200
- Germain, H., Chevalier, É., Caron, S., & Matton, D. (2005). Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. *Planta*, 220(3), 447-454. doi:10.1007/s00425-004-1352-0
- Germain, H., Rudd, S., Zotti, C., Caron, S., O'Brien, M., & Chantha, S. C. (2005). A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt, and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant Mol Biol*, 59. doi:10.1007/s11103-005-0536-8
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80265-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80265-8)
- Gray-Mitsumune, M., O'Brien, M., Bertrand, C., Tebbji, F., Nantel, A., & Matton, D. P. (2006). Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4171-4187. doi:10.1093/jxb/erl194
- Grimi, P. E., Thorstensen, T., Alm, V., Vizcay-Barrena, G., Windju, S. S., Jørstad, T. S., . . . Aalen, R. B. (2009). The ASH1 HOMOLOG 2 (ASHH2) Histone H3 Methyltransferase Is Required for Ovule and Anther Development in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 4(11), e7817. doi:10.1371/journal.pone.0007817
- Group, M., Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., . . . Walker, J. C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7), 301-308. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02302-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02302-6)

- Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., & Zhang, S. (2014). Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(2), 528-533. doi:10.1104/pp.113.231274
- Guan, Y., Meng, X., Khanna, R., LaMontagne, E., Liu, Y., & Zhang, S. (2014). Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by MAPKs Is Required for Pollen Development and Function in Arabidopsis. *PLoS Genet*, 10(5), e1004384. doi:10.1371/journal.pgen.1004384
- Gusti, A., Baumberger, N., Nowack, M., Pusch, S., Eisler, H., Potuschak, T., . . . Genschik, P. (2009). The Arabidopsis thaliana F-Box Protein FBL17 Is Essential for Progression through the Second Mitosis during Pollen Development. *PLoS ONE*, 4(3), e4780. doi:10.1371/journal.pone.0004780
- Hafidh, S., Fila, J., & Honys, D. (2016). Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction*, 1-21. doi:10.1007/s00497-015-0272-4
- Hamamura, Y., Nagahara, S., & Higashiyama, T. (2012). Double fertilization on the move. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(1), 70-77. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.11.001>
- Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., Sritubtim, S., Morency, M.-J., Ellis, M., Ehltng, J., . . . Ellis, B. E. (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science*, 11(4), 192-198. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.007>
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M. E., He, K., Li, J., . . . Rathjen, J. P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12217-12222. doi:10.1073/pnas.0705306104
- Hiscock, S. J., & Allen, A. M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist*, 179(2), 286-317. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02457.x
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., & Shinozaki, K. (1998). Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2), 532-543.
- Iwakawa, H., Shinmyo, A., & Sekine, M. (2006). Arabidopsis CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *The Plant Journal*, 45(5), 819-831. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02643.x
- Jalmi, S. K., & Sinha, A. K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi:10.3389/fpls.2015.00769
- Jenik, P. D., Gillmor, C. S., & Lukowitz, W. (2007). Embryonic Patterning in Arabidopsis thaliana. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 207-236. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.011105.102609
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., & Hirt, H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 5(5), 415-424.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kägi, C., Baumann, N., Nielsen, N., Stierhof, Y.-D., & Groß-Hardt, R. (2010). The gametic central cell of Arabidopsis determines the lifespan of adjacent accessory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22350-22355. doi:10.1073/pnas.1012795108
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193-195. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)

- Khoury, G. A., Baliban, R. C., & Floudas, C. A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep*, *1*. doi:10.1038/srep00090
- Kim, H. J., Oh, S. A., Brownfield, L., Hong, S. H., Ryu, H., Hwang, I., . . . Nam, H. G. (2008). Control of plant germline proliferation by SCFFBL17 degradation of cell cycle inhibitors. *Nature*, *455*(7216), 1134-1137. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v455/n7216/supinfo/nature07289_S1.html
- Kim, J.-M., Woo, D.-H., Kim, S.-H., Lee, S.-Y., Park, H.-Y., Seok, H.-Y., . . . Moon, Y.-H. (2012). Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Reports*, *31*(1), 217-224. doi:10.1007/s00299-011-1157-0
- Kong, F., Wang, J., Cheng, L., Liu, S., Wu, J., Peng, Z., & Lu, G. (2012). Genome-wide analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in *Solanum lycopersicum*. *Gene*, *499*(1), 108-120. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.048>
- Kong, Q., Qu, N., Gao, M., Zhang, Z., Ding, X., Yang, F., . . . Zhang, Y. (2012). The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 Kinase Cascade Negatively Regulates Immunity Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, *24*(5), 2225-2236. doi:10.1105/tpc.112.097253
- Kong, X., Lv, W., Zhang, D., Jiang, S., Zhang, S., & Li, D. (2013). Genome-Wide Identification and Analysis of Expression Profiles of Maize Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase. *PLoS ONE*, *8*(2), e57714. doi:10.1371/journal.pone.0057714
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., . . . Machida, Y. (2010). The MAP Kinase MPK4 Is Required for Cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, *22*(11), 3778-3790. doi:10.1105/tpc.110.077164
- Krysan, P. J., Jester, P. J., Gottwald, J. R., & Sussman, M. R. (2002). An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell*, *14*(5), 1109-1120.
- Lachowiec, J., Lemus, T., Borenstein, E., & Queitsch, C. (2015). Hsp90 promotes kinase evolution. *Mol Biol Evol*, *32*. doi:10.1093/molbev/msu270
- Lafleur, E., Kapfer, C., Joly, V., Liu, Y., Tebbji, F., Daigle, C., . . . Matton, D. P. (2015). The FRK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) from *Solanum chacoense* is involved in embryo sac and pollen development. *Journal of Experimental Botany*, *66*(7), 1833-1843. doi:10.1093/jxb/eru524
- Lampard, G. R., Lukowitz, W., Ellis, B. E., & Bergmann, D. C. (2009). Novel and Expanded Roles for MAPK Signaling in Arabidopsis Stomatal Cell Fate Revealed by Cell Type-Specific Manipulations. *The Plant Cell Online*, *21*(11), 3506-3517. doi:10.1105/tpc.109.070110
- Lampard, G. R., MacAlister, C. A., & Bergmann, D. C. (2008). Arabidopsis Stomatal Initiation Is Controlled by MAPK-Mediated Regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science*, *322*(5904), 1113-1116. doi:10.1126/science.1162263
- Lantin, S., O'Brien, M., & Matton, D. P. (1999). Pollination, wounding and jasmonate treatments induce the expression of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Plant Molecular Biology*, *41*(3), 371-386. doi:10.1023/a:1006375522626
- Lau, S., Ehrismann, J. S., Schlereth, A., Takada, S., Mayer, U., & Jürgens, G. (2010). Cell-cell communication in Arabidopsis early embryogenesis. *European Journal of Cell Biology*, *89*(2-3), 225-230. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.010>
- Laux, T., Würschum, T., & Breuninger, H. (2004). Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. *The Plant Cell*, *16*(suppl 1), S190-S202. doi:10.1105/tpc.016014

- Lee, B. N., & Elion, E. A. (1999). The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12679-12684. doi:10.1073/pnas.96.22.12679
- Lee, J. S., Huh, K. W., Bhargava, A., & Ellis, B. E. (2008). Comprehensive analysis of protein-protein interactions between Arabidopsis MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signaling & Behavior*, 3(12), 1037-1041.
- León, G., Holuigue, L., & Jordana, X. (2007). Mitochondrial Complex II Is Essential for Gametophyte Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(4), 1534-1546. doi:10.1104/pp.106.095158
- Liu, M., Shi, S., Zhang, S., Xu, P., Lai, J., Liu, Y., . . . Yang, C. (2014). SUMO E3 ligase AtMMS21 is required for normal meiosis and gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1), 153.
- Liu, Y. (2012). Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Reports*, 31(1), 1-12. doi:10.1007/s00299-011-1130-y
- Livanos, P., Apostolakos, P., & Galatis, B. (2012). Plant cell division. *Plant Signaling & Behavior*, 7(7), 771-778. doi:10.4161/psb.20530
- Loubert-Hudon, A., & Matton, D. P. (2013). Ovule Clearing Method for Solanaceous Species. *Bio-protocol*, 3(21), e951.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D., & Somerville, C. (2004). A MAPKK Kinase Gene Regulates Extra-Embryonic Cell Fate in Arabidopsis. *Cell*, 116(1), 109-119. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01067-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01067-5)
- Makkena, S., Lee, E., Sack, F. D., & Lamb, R. S. (2012). The R2R3 MYB Transcription Factors FOUR LIPS and MYB88 Regulate Female Reproductive Development. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5545-5558. doi:10.1093/jxb/ers209
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., & Bembien, L. A. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437.
- Martin, M. V., Distéfano, A. M., Bellido, A., Córdoba, J. P., Soto, D., Pagnussat, G. C., & Zabaleta, E. (2014). Role of mitochondria during female gametophyte development and fertilization in *A. thaliana*. *Mitochondrion*, 19, Part B, 350-356. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.01.005>
- Martín, M. V., Distefano, A. M., Zabaleta, E. J., & Pagnussat, G. C. (2013). New insights into the functional roles of reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10), e25714. doi:10.4161/psb.25714
- Martin, M. V., Fiol, D. F., Sundaresan, V., Zabaleta, E. J., & Pagnussat, G. C. (2013). oiwa, a Female Gametophytic Mutant Impaired in a Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase, Reveals Crucial Roles for Reactive Oxygen Species during Embryo Sac Development and Fertilization in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(5), 1573-1591. doi:10.1105/tpc.113.109306
- Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., & Cappadocia, M. (1997). Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition. *The Plant Cell*, 9(10), 1757-1766. doi:10.1105/tpc.9.10.1757
- Mazliak, P. (2009). *L'évolution chez les végétaux : des bactéries aux arbres et aux plantes à fleurs*. Paris: Vuibert Paris: ADAPT-SNES.
- McCue, A. D., Cresti, M., Feijó, J. A., & Slotkin, R. K. (2011). Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1621-1631. doi:10.1093/jxb/err032
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 245-266. doi:doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102314

- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., . . . Grossman, A. R. (2007). The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, *318*(5848), 245-250. doi:10.1126/science.1143609
- Mishra, N. S., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *452*(1), 55-68. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2006.05.001>
- Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., & Hasebe, M. (2009). ANXUR1 and 2, Sister Genes to FERONIA/SIRENE, Are Male Factors for Coordinated Fertilization. *Current Biology*, *19*(15), 1327-1331. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.064>
- Mohanta, T. K., Arora, P. K., Mohanta, N., Parida, P., & Bae, H. (2015). Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants. *BMC Genomics*, *16*, 58. doi:10.1186/s12864-015-1244-7
- Moustafa, K., AbuQamar, S., Jarrar, M., Al-Rajab, A., & Trémouillaux-Guiller, J. (2014). MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, *33*(8), 1217-1225. doi:10.1007/s00299-014-1629-0
- Musielak, Thomas J., & Bayer, M. (2014). YODA signalling in the early Arabidopsis embryo. *Biochemical Society Transactions*, *42*(2), 408-412. doi:10.1042/bst20130230
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1237-1247. doi:10.1093/jexbot/53.372.1237
- Neupane, A., Nepal, M. P., Benson, B. V., MacArthur, K. J., & Piya, S. (2013). Evolutionary history of mitogen-activated protein kinase (MAPK) genes in Lotus, Medicago and Phaseolus. *Plant Signal Behav*, *8*. doi:10.4161/psb.27189
- Neupane, A., Nepal, M. P., Piya, S., Subramanian, S., Rohila, J. S., Reese, R. N., . . . Benson, B. V. (2013). Identification, Nomenclature, and Evolutionary Relationships of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Genes in Soybean. *Evolutionary Bioinformatics*, *9*(Supplementary Files 12526), 363-386. doi:10.4137/EBO.S12526
- Nishihama, R., Ishikawa, M., Araki, S., Soyano, T., Asada, T., & Machida, Y. (2001). The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes & Development*, *15*(3), 352-363. doi:10.1101/gad.863701
- Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., . . . Machida, Y. (2002). Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell*, *109*(1), 87-99.
- Nystedt, B., Street, N. R., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.-C., Scofield, D. G., . . . Jansson, S. (2013). The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, *497*(7451), 579-584. doi:10.1038/nature12211
- <http://www.nature.com/nature/journal/v497/n7451/abs/nature12211.html#supplementary-information>
- O'Brien, M., Gray-Mitsumune, M., Kapfer, C., Bertrand, C., & Matton, D. (2007). The ScFRK2 MAP kinase kinase kinase from Solanum chacoense affects pollen development and viability. *Planta*, *225*(5), 1221-1231. doi:10.1007/s00425-006-0432-8
- Oh, S.-A., Bourdon, V., Das Pal, M., Dickinson, H., & Twell, D. (2008). Arabidopsis Kinesins HINKEL and TETRASPORE Act Redundantly to Control Cell Plate Expansion during Cytokinesis in the Male Gametophyte. *Molecular Plant*, *1*(5), 794-799. doi:<http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssn042>

- Oh, S., Bourdon, V., Dickinson, H., Twell, D., & Park, S. (2014). Arabidopsis Fused kinase TWO-IN-ONE dominantly inhibits male meiotic cytokinesis. *Plant Reproduction*, *27*(1), 7-17. doi:10.1007/s00497-013-0235-6
- Oh, S. A., Allen, T., Kim, G. J., Sidorova, A., Borg, M., Park, S. K., & Twell, D. (2012). Arabidopsis Fused kinase and the Kinesin-12 subfamily constitute a signalling module required for phragmoplast expansion. *The Plant Journal*, *72*(2), 308-319. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05077.x
- Oh, S. A., Johnson, A., Smertenko, A., Rahman, D., Park, S. K., Hussey, P. J., & Twell, D. (2005). A Divergent Cellular Role for the FUSED Kinase Family in the Plant-Specific Cytokinetic Phragmoplast. *Current Biology*, *15*(23), 2107-2111. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.044>
- Oh, S. A., Park, K. S., Twell, D., & Park, S. K. (2010). The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. *The Plant Journal*, *64*(5), 839-850. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04374.x
- Oh, S. A., Twell, D., & Park, S. K. (2011). SIDECAR POLLEN suggests a plant-specific regulatory network underlying asymmetric microspore division in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(3), 416-419. doi:10.4161/psb.6.3.14385
- Okuda, S., & Higashiyama, T. (2010). Pollen Tube Guidance by Attractant Molecules: LUREs. *Cell Structure and Function*, *35*(1), 45-52. doi:10.1247/csf.10003
- Ouyang, S., Zhu, W., Hamilton, J., Lin, H., Campbell, M., Childs, K., . . . Buell, C. R. (2007). The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl 1), D883-D887. doi:10.1093/nar/gkl976
- Park, G. T., Frost, J. M., Park, J.-S., Kim, T. H., Lee, J. S., Oh, S. A., . . . Choi, Y. (2014). Nucleoporin MOS7/Nup88 is required for mitosis in gametogenesis and seed development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(51), 18393-18398. doi:10.1073/pnas.1421911112
- Park, S. K., Howden, R., & Twell, D. (1998). The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development*, *125*(19), 3789-3799.
- Park, S. K., Rahman, D., Oh, S. A., & Twell, D. (2004). gemini pollen 2, a male and female gametophytic cytokinesis defective mutation. *Sexual Plant Reproduction*, *17*(2), 63-70. doi:10.1007/s00497-004-0216-x
- Pastuglia, M., Azimzadeh, J., Goussot, M., Camilleri, C., Belcram, K., Evrard, J.-L., . . . Bouchez, D. (2006). γ -Tubulin Is Essential for Microtubule Organization and Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *18*(6), 1412-1425. doi:10.1105/tpc.105.039644
- Pekárová, B., Klumpler, T., Tříšková, O., Horák, J., Jansen, S., Dopitová, R., . . . Janda, L. (2011). Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *67*(5), 827-839. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04637.x
- Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2012). Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 591-614. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105451
- Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., & Hirt, H. (2009). A Major Role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 Pathway in ROS Signalling. *Molecular Plant*, *2*(1), 120-137. doi:<http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssn079>
- Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Seay, M., Gerstein, M., . . . Dinesh-Kumar, S. P. (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(11), 4730-4735. doi:10.1073/pnas.0611615104

- Portereiko, M. F., Sandaklie-Nikolova, L., Lloyd, A., Dever, C. A., Otsuga, D., & Drews, G. N. (2006). NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 Encodes the Arabidopsis RPL21M Protein and Is Required for Karyogamy during Female Gametophyte Development and Fertilization. *Plant Physiology*, *141*(3), 957-965. doi:10.1104/pp.106.079319
- Posas, F., & Saito, H. (1998). *Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator* (Vol. 17).
- Qiu, J. L., Zhou, L., Yun, B. W., Nielsen, H. B., Fiil, B. K., Petersen, K., . . . Morris, P. C. (2008). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol*, *148*(1), 212-222. doi:10.1104/pp.108.120006
- Rabiger, D. S., & Drews, G. N. (2013). *MYB64* and *MYB119* Are Required for Cellularization and Differentiation during Female Gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, *9*(9), e1003783. doi:10.1371/journal.pgen.1003783
- Rao, K. P., Richa, T., Kumar, K., Raghuram, B., & Sinha, A. K. (2010). In Silico Analysis Reveals 75 Members of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family in Rice. *DNA Research*, *17*(3), 139-153. doi:10.1093/dnares/dsq011
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K. Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., & Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(14), 5638-5643. doi:10.1073/pnas.0711301105
- Rigault, P., Boyle, B., Lepage, P., Cooke, J. E. K., Bousquet, J., & MacKay, J. J. (2011). A White Spruce Gene Catalog for Conifer Genome Analyses. *Plant Physiology*, *157*(1), 14-28. doi:10.1104/pp.111.179663
- Rotman, N., Durbarry, A., Wardle, A., Yang, W. C., Chaboud, A., Faure, J.-E., . . . Twell, D. (2005). A Novel Class of MYB Factors Controls Sperm-Cell Formation in Plants. *Current Biology*, *15*(3), 244-248. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.013>
- Salam, M. A., Jammes, F., Hossain, M. A., Ye, W., Nakamura, Y., Mori, I. C., . . . Murata, Y. (2013). Two guard cell-preferential MAPKs, MPK9 and MPK12, regulate YEL signalling in Arabidopsis guard cells. *Plant Biology*, *15*(3), 436-442. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00671.x
- Šamajová, O., Komis, G., & Šamaj, J. (2013). Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science*, *18*(3), 140-148. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.11.004>
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T. J., . . . Machida, Y. (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes & Development*, *20*(8), 1004-1014. doi:10.1101/gad.1408106
- Shi, J., Cui, M., Yang, L., Kim, Y.-J., & Zhang, D. (2015). Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 741-753. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.010>
- Singh, R., & Jwa, N.-S. (2013). The rice MAPKK–MAPK interactome: the biological significance of MAPK components in hormone signal transduction. *Plant Cell Reports*, *32*(6), 923-931. doi:10.1007/s00299-013-1437-y
- Singh, R., Lee, M.-O., Lee, J.-E., Choi, J., Park, J. H., Kim, E. H., . . . Jwa, N.-S. (2012). Rice Mitogen-Activated Protein Kinase Interactome Analysis Using the Yeast Two-Hybrid System. *Plant Physiology*, *160*(1), 477-487. doi:10.1104/pp.112.200071
- Smékalová, V., Doskočilová, A., Komis, G., & Šamaj, J. (2014). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 2-11. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>

- Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., & Machida, Y. (2003). NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes & Development*, *17*(8), 1055-1067. doi:10.1101/gad.1071103
- Stenvik, G.-E., Tandstad, N. M., Guo, Y., Shi, C.-L., Kristiansen, W., Holmgren, A., . . . Butenko, M. A. (2008). The EPIP Peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION Is Sufficient to Induce Abscission in Arabidopsis through the Receptor-Like Kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *The Plant Cell*, *20*(7), 1805-1817. doi:10.1105/tpc.108.059139
- Suarez-Rodriguez, M. C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P. J., . . . Krysan, P. J. (2007). MEK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology*, *143*(2), 661-669. doi:10.1104/pp.106.091389
- Sun, Y., Wang, C., Yang, B., Wu, F., Hao, X., Liang, W., . . . Jiang, Y.-Q. (2014). Identification and functional analysis of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes in canola (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany*, *65*(8), 2171-2188. doi:10.1093/jxb/eru092
- Sundaresan, V., & Alandete-Saez, M. (2010). Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development*, *137*(2), 179-189. doi:10.1242/dev.030346
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., & Shinozaki, K. (2011). Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in Arabidopsis. *Molecular Cell*, *41*(6), 649-660. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.029>
- Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., & Machida, Y. (2010). HINKEL kinesin, ANP MAPKKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *51*(10), 1766-1776. doi:10.1093/pcp/pcq135
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., & Saito, H. (2003). *A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway* (Vol. 22).
- Tebbj, F., Nantel, A., & Matton, D. P. (2010). Transcription profiling of fertilization and early seed development events in a solanaceous species using a 7.7 K cDNA microarray from *Solanum chacoense* ovules. *BMC Plant Biol*, *10*, 174. doi:10.1186/1471-2229-10-174
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2009). Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS Genet*, *5*(12), e1000772. doi:10.1371/journal.pgen.1000772
- Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., . . . Rokhsar, D. (2006). The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, *313*(5793), 1596-1604. doi:10.1126/science.1128691
- Twell, D. (2011). Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction*, *24*(2), 149-160. doi:10.1007/s00497-010-0157-5
- Ueda, M., Zhang, Z., & Laux, T. (2011). Transcriptional Activation of Arabidopsis Axis Patterning Genes WOX8/9 Links Zygote Polarity to Embryo Development. *Developmental Cell*, *20*(2), 264-270. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.009>
- Vale, R. D. (2003). The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell*, *112*(4), 467-480. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00111-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00111-9)
- Walia, A., Lee, J. S., Wasteneys, G., & Ellis, B. (2009). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *The Plant Journal*, *59*(4), 565-575. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03895.x
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., . . . Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, *40*(3), 428-438. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x

- Wang, H., Liu, R., Wang, J., Wang, P., Shen, Y., & Liu, G. (2014). The Arabidopsis kinesin gene AtKin-1 plays a role in the nuclear division process during megagametogenesis. *Plant Cell Reports*, 33(5), 819-828. doi:10.1007/s00299-014-1594-7
- Wang, H., Liu, Y., Bruffett, K., Lee, J., Hause, G., Walker, J. C., & Zhang, S. (2008). Haplo-Insufficiency of MPK3 in MPK6 Mutant Background Uncovers a Novel Function of These Two MAPKs in Arabidopsis Ovule Development. *The Plant Cell*, 20(3), 602-613. doi:10.1105/tpc.108.058032
- Wang, K., Wang, Z., Li, F., Ye, W., Wang, J., Song, G., . . . Yu, S. (2012). The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *Nat Genet*, 44(10), 1098-1103. doi:<http://www.nature.com/ng/journal/v44/n10/abs/ng.2371.html#supplementary-information>
- Wang, T., Liang, L., Xue, Y., Jia, P.-F., Chen, W., Zhang, M.-X., . . . Yang, W.-C. (2016). A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature*, 531(7593), 241-244. doi:10.1038/nature16975
- <http://www.nature.com/nature/journal/v531/n7593/abs/nature16975.html#supplementary-information>
- Wei, B., Zhang, J., Pang, C., Yu, H., Guo, D., Jiang, H., . . . Qin, G. (2015). The molecular mechanism of SPOROCTELESS/NOZZLE in controlling Arabidopsis ovule development. *Cell Res*, 25(1), 121-134. doi:10.1038/cr.2014.145
- Wei, F., Coe, E., Nelson, W., Bharti, A. K., Engler, F., & Butler, E. (2007). Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genet*, 3. doi:10.1371/journal.pgen.0030123
- Williams, C. G. (2009). *Conifer Reproductive Biology*.
- Wolters, H., Anders, N., Geldner, N., Gavidia, R., & Jürgens, G. (2011). Coordination of apical and basal embryo development revealed by tissue-specific GNOM functions. *Development*, 138(1), 117-126. doi:10.1242/dev.059147
- Wu, F., & Tanksley, S. (2010). Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics*, 11(1), 182.
- Wu, J., Wang, J., Pan, C., Guan, X., Wang, Y., Liu, S., . . . Lu, G. (2014). Genome-Wide Identification of MAPKK and MAPKKK Gene Families in Tomato and Transcriptional Profiling Analysis during Development and Stress Response. *PLoS ONE*, 9(7), e103032. doi:10.1371/journal.pone.0103032
- Xu, J., & Zhang, S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 20(1), 56-64. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.001>
- Yadegari, R., & Drews, G. N. (2004). Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S133-S141. doi:10.1105/tpc.018192
- Yang, Z. (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 24. doi:10.1093/molbev/msm088
- Yin, Z., Wang, J., Wang, D., Fan, W., Wang, S., & Ye, W. (2013). The MAPKKK Gene Family in *Gossypium raimondii*: Genome-Wide Identification, Classification and Expression Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18740-18757.
- Yu, F., Shi, J., Zhou, J., Gu, J., Chen, Q., Li, J., . . . Luan, S. (2010). ANK6, a mitochondrial ankyrin repeat protein, is required for male-female gamete recognition in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22332-22337. doi:10.1073/pnas.1015911107
- Zeng, Q., Chen, J.-G., & Ellis, B. E. (2011). AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 67(5), 895-906. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04642.x

- Zhang, S., Xu, R., Luo, X., Jiang, Z., & Shu, H. (2013). Genome-wide identification and expression analysis of MAPK and MAPKK gene family in *Malus domestica*. *Gene*, *531*(2), 377-387. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.107>
- Zheng, C. F., & Guan, K. L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J*, *13*(5), 1123-1131.
- Zsögön, A., Szakonyi, D., Shi, X., & Byrne, M. E. (2014). Ribosomal Protein RPL27a Promotes Female Gametophyte Development in a Dose-Dependent Manner. *Plant Physiology*, *165*(3), 1133-1143. doi:10.1104/pp.114.241778