

IDENTIFICATION DES NOUVEAUX RÉGULATEURS DE LA LONGÉVITÉ DES GRAINES DES LÉGUMINEUSES

IDENTIFICATION OF GENES REGULATING SEED LONGEVITY IN GRAIN LEGUMES

par Julia ZINSMEISTER¹

Résumé

La production de semences de haute qualité germinative représente un enjeu majeur pour les semenciers car elle constitue un levier clé pour augmenter les rendements agricoles. La perte de la qualité germinative pendant le stockage des lots est déterminée par la longévité des graines, dont la régulation est mal comprise. Dans cette étude, le facteur de transcription ABSCISIC ACID5 (ABI5) a été identifié comme régulateur de la longévité chez les légumineuses (Figure 1). ABI5 induit la synthèse de molécules protectrices contre la dessiccation (Figure 2) et réprime l'expression de gènes nucléaires associés à la photosynthèse (Figure 3). ABI5 semble également être impliqué dans la dégradation de la chlorophylle. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives en établissant un lien entre la régulation de composés anti nutritionnels et la qualité germinative chez les légumineuses.

Abstract

*The production of seeds with highly vigorous germination and seedling establishment represents a major stake for seed producers because it is a key lever to maintain and increase crop yield. The loss of germinative performance during storage is determined by the longevity of the seeds. Longevity is progressively acquired during seed development but the regulatory mechanisms controlling this acquisition remain poorly understood. A seed specific transcription factor network previously identified ABSCISIC ACID5 (ABI5) as a candidate gene in regulating seed longevity in *Medicago truncatula*, a legume model species. The objective of this study was to characterize the role of ABI5 in seed longevity in *M. truncatula* and pea (*Pisum sativum*). In both species, seeds of *abi5* mutants showed a decreased longevity (Figure 1). ABI5 induces the synthesis of protective molecules against desiccation, namely a panel of LATE EMBRYOGENESIS (LEA) proteins and raffinose family oligosaccharides (RFO) (Figure 2) and represses the expression of nuclear genes associated*

¹ Thèse réalisée à Agrocampus Ouest, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, (UMR 1345 INRA, Université d'Angers, Agrocampus Ouest) SFR 4207 QUASAV, 49071 Beaucouzé, France. 42 Rue George Morel, 49071 Beaucouzé. julia.zinsmeister@laposte.net.

with photosynthesis (PHANGs, Figure 3). Additionally, our results suggest that ABI5 is involved in the degradation of seed chlorophyll and carotenoids, as mutant seeds exhibit a weak “green seed phenotype”. These results establish a link between chloroplast dismantling and seed longevity regulation. This work opens new perspectives by establishing a link between the regulation of anti-nutritional compounds and seed vigour in grain legumes.

Introduction

La longévité des graines est définie comme étant l’aptitude d’un lot à la conservation à l’état sec sans perdre de sa viabilité. Elle est une composante majeure de la vigueur germinative dont on sait qu’elle impacte directement le rendement des cultures. Elle est aussi à la base de la conservation des ressources génétiques *ex situ* et au maintien des banques de semences dans le sol. En fonction des espèces, il est estimé que la longévité des graines conservées dans les banques de semences varie entre une dizaine d’années à plusieurs siècles (Walters *et al.*, 2005). Les graines du palmier *Phoenix dactylifera L.* retrouvées dans la forteresse de Massada surplombant la mère morte constituent un exemple emblématique de longévité (Sallon *et al.*, 2008). Ainsi, parmi les quelques graines dont la datation au carbone 14 estime leur longévité à plus de 2000 ans, une a germé et établi une jeune plante.

Les mécanismes de protection contre la dessiccation et les méthodes de conservation ont été largement étudiés (Sano *et al.*, 2015). L’humidité de l’air, les températures élevées et la présence d’oxygène sont des facteurs néfastes à la préservation de la viabilité des graines (Ellis *et al.*, 1991). Parmi les mécanismes de protection ont été identifiés l’accumulation de protéines de stress LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA), de protéines de choc thermique (HSP) et des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) (Chatelain *et al.*, 2011 ; Rosnoblet *et al.*, 2007, Prieto-Dapena *et al.*, 2006). Par ailleurs, plusieurs mécanismes prévenant l’oxydation des molécules ont été également associés à la longévité des graines, tels que la présence d’antioxydants liposolubles comme la vitamine E (ou tocophérol ; Sattler *et al.*, 2004) et de tannins dans les enveloppes (Debeaujon *et al.*, 2000). Un autre facteur contribuant à la longévité des graines est la formation d’un état vitreux au sein de la cellule, c’est à dire un état amorphe métastable dont la viscosité extrêmement élevée ralentit considérablement les réactions chimiques délétères et piège les molécules d’eau résiduelles (Buitink et Leprince., 2008). Cependant, les régulateurs de la longévité des graines restent encore méconnus.

En 2016, les légumineuses ont été au centre de l’attention de la FAO, mettant en lumière les enjeux agronomiques et environnementaux portés par les espèces de cette famille. La légumineuse autogame *M. truncatula* (luzerne tronquée) constitue un modèle génétique bien adapté car très proche de la plupart des légumineuses cultivées en Europe comme le pois protéagineux, la féverole, la luzerne ou les trèfles. En particulier, l’ordre des gènes sur les chromosomes est conservé parmi ces espèces. Le génome de *M. truncatula* est séquencé et de nombreux outils moléculaires et génomique sont mis à disposition, permettant des approches physiologiques, biochimiques et génétiques en laboratoire et le transfert des connaissances obtenues vers les espèces cultivées (Choi *et al.*, 2004). Par ailleurs, les graines de *M. truncatula* s’avèrent également être un modèle idéal pour la compréhension du développement de la graine au vu de la durée très longue de la phase tardive de la maturation, après remplissage de la graine (Chatelain *et al.*, 2012). Celle-ci dure en effet entre 18 et 21 jours selon les génotypes contre 24-48 heures chez *A. thaliana*. Cette caractéristique a permis une caractérisation physiologique et moléculaire très détaillée des processus qui amènent la

graine à l'état sec et quiescent (Chatelain *et al.*, 2012 ; Verdier *et al.*, 2013). Ainsi, la longévité est progressivement acquise au cours du développement de la graine sur la plante mère, après la phase de remplissage et l'installation de la capacité germinative. La construction d'un réseau de gènes co-exprimés pendant la maturation des graines de *M. truncatula* a mis en évidence une panoplie de facteurs de transcription qui seraient impliqués dans le contrôle de la maturation des graines et la synthèse de ces molécules protectrices de type LEA et HSP, dont le facteur de transcription ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) (Verdier *et al.*, 2013).

Outre la dessiccation et l'acquisition de la longévité, la fin de la maturation de la plupart des graines se caractérise par la dégradation de la chlorophylle au moyen de processus cataboliques encore très mal compris. Ainsi, la persistance de la chlorophylle est utilisée comme un marqueur de maturité des graines (Jalink *et al.*, 1998). Récemment, une corrélation négative entre la persistance de la chlorophylle dans les graines à maturité et la qualité germinative chez *A. thaliana* a été mise en évidence (Nakajima *et al.*, 2012). De plus, la persistance de la chlorophylle et des teneurs élevées en RFO des graines diminuent leur qualité nutritionnelle, la première conduisant au phénomène de « graines vertes » nuisible au rendement de l'huile de soja et du colza (Teixeria *et al.*, 2016 ; Nakajima *et al.*, 2012), tandis que les RFO, peu métabolisés par les animaux monogastriques, causent des troubles digestifs.

L'objectif de ce travail était de comprendre le rôle du facteur de transcription ABI5 dans la régulation de la longévité des graines des légumineuses, *M. truncatula* et le pois (Verdier *et al.*, 2013 ; Finkelstein *et al.*, 1994 ; Fujita *et al.*, 2011). Pour cela, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques, biochimiques et physiologiques sur les graines de mutants d'insertions *Tnt1 Mt-abi5* comparé au type sauvage. Ensuite, nous avons transféré notre étude sur les mutants EMS de pois protéagineux *Ps-abi5*.

A. ABI5 est un régulateur de la longévité des graines des légumineuses

Trois lignées d'insertion *Tnt1* différentes *Mt-abi5* dans le fond génétique R108 ont été obtenues auprès de la Noble Foundation et criblés par PCR. Afin de réaliser la comparaison avec le pois, trois lignées homozygotes *Ps-abi5* EMS de pois ont été obtenues après criblage par TILLING d'une collection de mutants EMS en collaboration avec la plateforme de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale. Pour chaque expérience, les cultures des porte-graines de type sauvage et de mutants ont été réalisées en même temps.

La longévité a été mesurée en réalisant des tests de vieillissement en conditions pénalisantes en plaçant les lots de graines matures à 35 °C et 75% d'humidité relative. Au cours du temps, une partie du lot a été prélevée pour mesurer le pourcentage de germination. Ces mesures permettent la construction de « courbes de survie » et la détermination de la P₅₀, soit le temps nécessaire pour obtenir 50% de la germination du lot. Nos résultats montrent que la longévité des graines des mutants *Mt-abi5* est nettement affectée par rapport aux témoins (Figure 1-B). La P₅₀ est 18 jours pour les mutants *Mt-abi5* et de 24 jours chez le type sauvage. Nos résultats montrent qu'ABI5 régule également la longévité des graines chez le pois cultivé, avec une P₅₀ de 6 jours pour les mutants *Ps-abi5* contre 16 jours pour le type sauvage (Figure 1-D). Vu que les stress oxydants sont un des moteurs de la perte de longévité des graines, nous avons voulu savoir si les graines *Mt-abi5* étaient plus sensibles au stress oxydant. Nous avons ainsi stocké des graines en anaérobiose pendant 14 jours en présence d'azote. Le stockage des graines sous azote restaure le phénotype sauvage chez les graines mutantes, suggérant que les graines mutantes sont effectivement plus sensibles à l'oxydation.

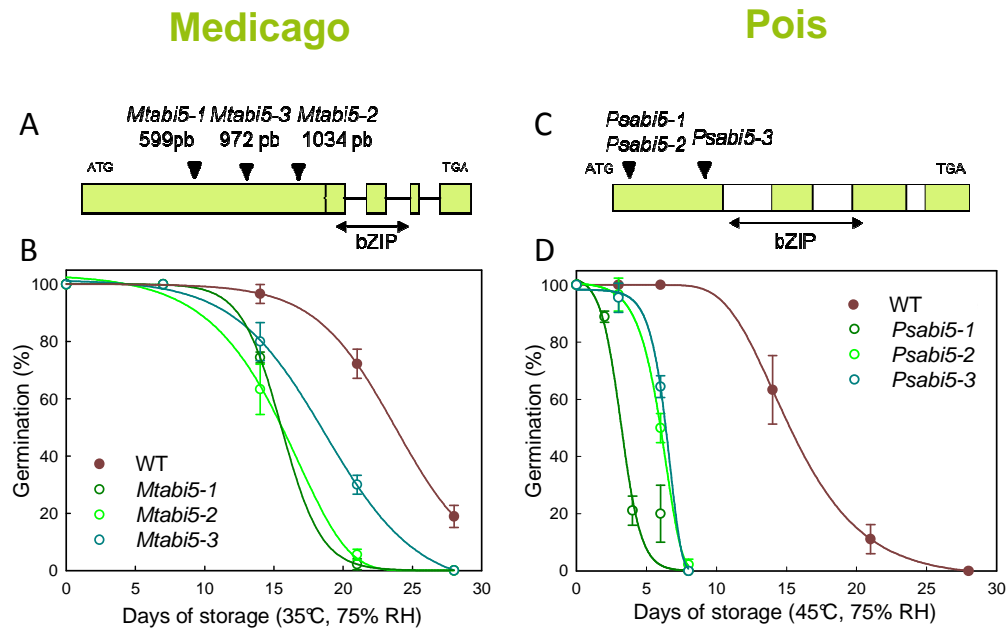


Figure 1: ABI5 est un régulateur des graines de légumineuses.

A, présentation des mutants d'insertion *Tnt1* *M. truncatula* étudiés. B, courbes de survie des graines matures de mutants *Mt-abi5* comparées au type sauvage. C, présentation des mutants EMS confirmés par TILLING chez le pois cultivé. D, courbes de survie des graines matures de mutants *Ps-abi5* comparées au type sauvage. Les courbes de survie ont été réalisées en plaçant 3 répliquats de 30 graines dans des conditions délétères de stockage pendant différents temps puis en évaluant le pourcentage final de germination du lot.

Figure 1: ABI5 is a regulator of legume seed longevity.

A, characterization of *Tnt1* insertions in *Mt-abi5* mutants. B, Survival curves (percentage of germination) of mature seeds during storage at 35°C, 75% RH. C, Gene structure of *Ps-ABI5* and confirmed *Ps-abi5* EMS mutants detected by TILLING screening. D, Survival curves of mature seeds during storage at 45°C, 75% RH. Data are the means (\pm SE) of 3 replicates of 30 seeds.

B. ABI5 régule l'accumulation de molécules à rôle protecteur

Chez *M. truncatula*, l'acquisition de la longévité des graines est corrélée à l'accumulation de protéines protectrices LEA et aux sucres de la famille du RFO (Chatelain *et al.*, 2012; Rosnoblet *et al.*, 2007). Afin d'identifier si ABI5 régule l'accumulation de ces composés en lien avec la longévité, nous avons réalisé des analyses biochimiques et protéomiques sur les graines matures des mutants *Mt-abi5* et *Ps-abi5*. Les ratios RFO/saccharose sont respectivement 4 et 2 fois plus élevés dans les graines matures de type sauvage de *M. truncatula* et de pois comparé aux mutants *Mt-abi5* et *Ps-abi5* (Figure 2). L'analyse protéomique réalisée sur les graines matures de type sauvage et de mutants *Mt-abi5* montre que l'accumulation de protéines LEA EM6 et EM est réduite de 10 à 3 fois environ (Figure 2-C). Chez le pois, des résultats similaires ont été obtenus avec une accumulation de protéine SBP65 réduite de 5 fois dans les graines matures de mutants *Ps-abi5* comparé au type sauvage (Figure 2-D). Nos résultats suggèrent que MtABI5 contrôle

l'acquisition de la longévité en intervenant dans la régulation de l'accumulation de sucres de la famille du RFO et de protéines LEA chez les légumineuses.

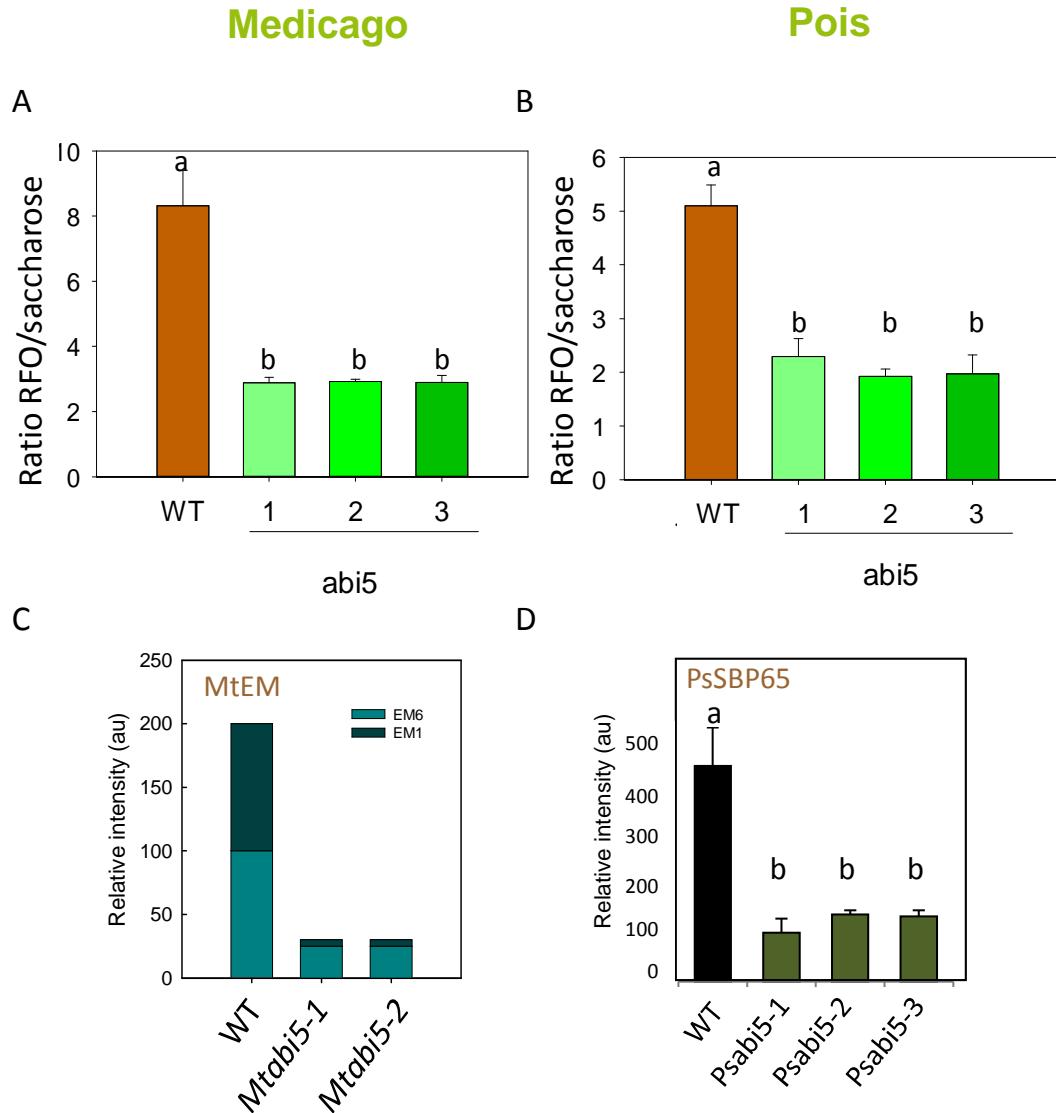


Figure 2: ABI5 régule la synthèse de molécules protectrices.

A, B, Ratio des teneurs en sucres de la famille du raffinose (raffinose+verbascose+stachyose) et du saccharose dans les graines matures de type sauvage et de mutants *abi5* chez *M. truncatula* (A) et le pois cultivé (B). Les données représentent la moyenne (\pm SE) de 4 réplicats de 10 graines. C, D, Abondance relative des polypeptides MtEM et PsSBP65 chez *M. truncatula* (C) et *P. sativum* (D). Les différentes lettres indiquent une différence significative (ANOVA, $p < 0,05$) selon un test de Student-Newman-Keuls.

Figure 2: MtABI5 regulates protective molecules synthesis.

A, B, non reducing sugar accumulation in legumes. Ratio of RFO (raffinose+verbascose+stachyose) contents on sucrose. Data are the average (\pm SE) of 4 replicates of 10 seeds each. C, D, Polypeptide abundance of MtEM and PsSBP65 in *M. truncatula* (C) and *P. sativum* (D). Significantly different values (assessed by ANOVA, $P < 0.05$) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

C. ABI5 régule l'inhibition des gènes nucléaires associés à la photosynthèse (PHANGs) et la perte de la chlorophylle des graines de légumineuses

Les graines matures des mutants *Mt-abi5* et *Ps-abi5* restent vertes à maturité contrairement au type sauvage, pour lequel les graines sont dépourvues de chlorophylle à maturité (Figure 3-A). Afin de préciser si l'ensemble des pigments photosynthétiques sont affectés chez les mutants, nous avons réalisé des analyses HPLC des teneurs en chlorophylles (Figure 3-B, C) et en caroténoïdes sur les graines matures entières.

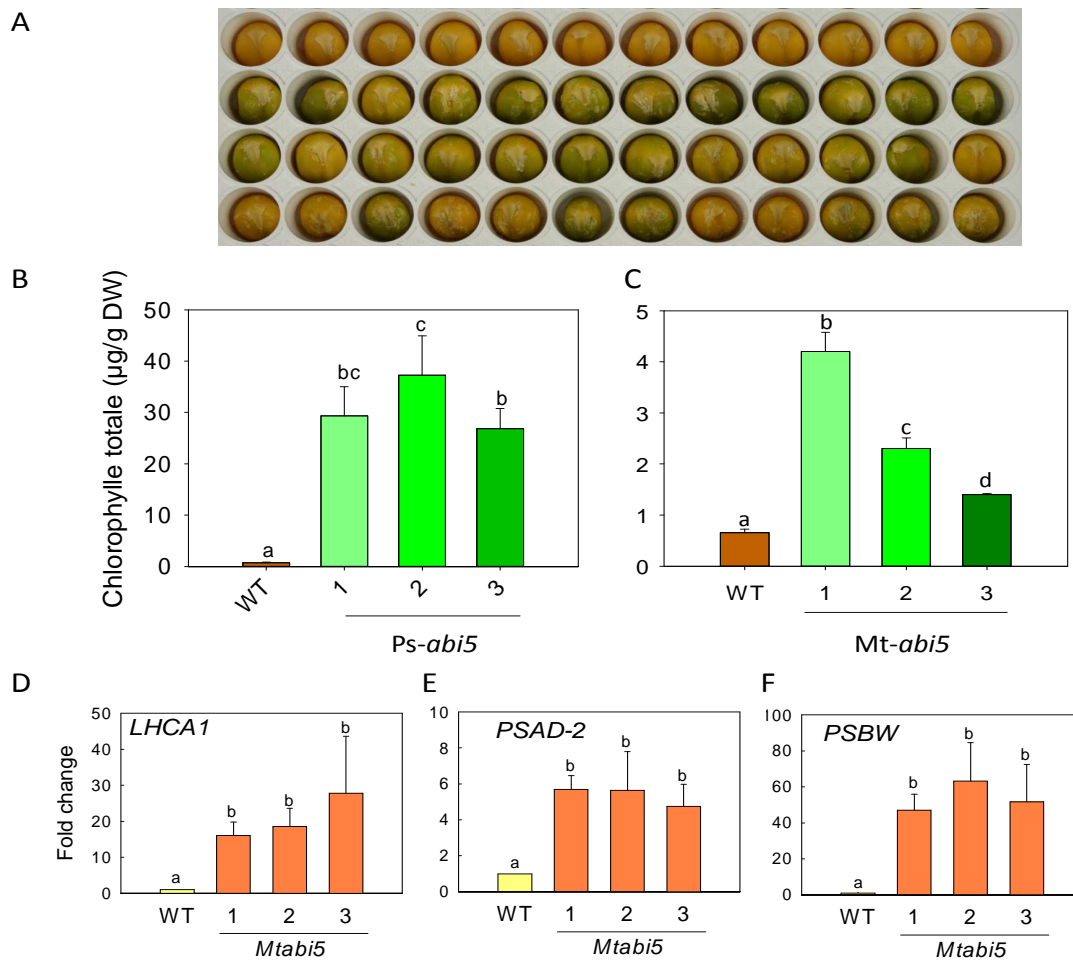


Figure 3: ABI5 régule l'inhibition de l'expression des gènes associés à la photosynthèse (PHANGs) chez les légumineuses.

A, photographies de graines matures disséquées de leurs téguments de type sauvage et de mutants *Ps-abi5*. B,C, dosages par HPLC des teneurs en chlorophylle totale des graines matures de type sauvage et de mutant *abi5* chez le pois (A) et *M. truncatula* (C). D, E, F Expression relative des gènes codant pour les protéines associées à la photosynthèse dans les graines matures des mutants *Mt-abi5* comparées au type sauvage. Les analyses de RT-QPCR ont été réalisées sur 3 réplicats de 30 graines. Les expressions ont été normalisées selon les gènes de référence *MSC27* et *ACTINE11*. Les différentes lettres indiquent une différence significative (ANOVA, $p < 0,05$) selon un test de Student-Newman-Keuls.

Figure 3: MtABI5 regulates photosynthesis associated genes (PHANGs) in legumes.

A, pictures of wild type and *Ps-abi5* mature seeds without seedcoat. B, C total chlorophyll contents of mature *Ps-abi5* (B) and *Mt-abi5* seeds (C). D, E, F level of expression of PSII and PSI genes in mature wild-type and *Mt-abi5* seeds. Data were normalized using expression values of wild-type seeds. *MSC27* and *ACTIN11* were used as reference genes. Data are the means (\pm SE) of three independent biological replicates.

Les analyses biochimiques confirment le phénotype de graine verte à maturité des mutants *abi5* de légumineuses, avec des teneurs en chlorophylle respectivement 30 à 5 fois plus importantes en moyenne chez les mutants comparé au type sauvage. Chez *M. truncatula*, les teneurs en β -carotène et lutéines sont 2 à 5 fois plus élevées. Au vu de ces résultats, nous avons examiné au cours de la maturation des graines *Mt-abi5*, le profil d'expression des gènes codant pour les différentes sous-unités des photosystèmes I et II et les enzymes impliqués dans le métabolisme de la chlorophylle. Ainsi ces analyses transcriptomiques, validées par RT-QPCR, montrent que l'accumulation des transcrits codant pour des protéines associées à la photosynthèse est dérégulée dans les graines matures des mutants (Figure 3-D-F), les quantités de transcrits de ces gènes n'étant pas réduites en fin de développement chez les mutants *Mt-abi5*. Les différences sont les plus nettes pour les gènes du PSII avec une expression différentielle de plus de 600 fois. Il est également intéressant de noter que l'ensemble des gènes d'origine nucléaire sont affectés chez les mutants *abi5* alors que les gènes chloroplastiques ne le sont pas. En revanche, nous n'avons pas trouvé de preuves qu'ABI5 régule la dégradation de la chlorophylle. Sachant que la dégradation de la chlorophylle permet la synthèse de tocophérol et que les graines des mutant *Mt-abi5* sont plus sensibles à l'oxygène lors du stockage, nous avons voulu savoir si les teneurs en tocophérols étaient affectées dans les graines *Mt-abi5*. Contrairement à nos attentes, la teneur en α -tocophérols, qui sont particulièrement abondant dans les chloroplastes, était plus élevée dans les mutants que chez le type sauvage. Ces résultats suggèrent un rôle d'ABI5 dans le démantèlement des chloroplastes pendant la fin de la maturation, qui ne se produirait plus chez le mutant, contribuant indirectement au phénotype de graine verte.

Conclusions et perspectives

Nos résultats identifient ABI5 comme un nouveau régulateur de la maturation, de la longévité et du démantèlement des chloroplastes des graines chez les légumineuses. ABI5 joue un rôle pléiotropique en lien avec l'accumulation de protéines LEA, des sucres de la famille du raffinose et de la régulation des gènes nucléaires associés à la photosynthèse. Il permet d'établir l'importance de la dégradation de la chlorophylle et du démantèlement des chloroplastes en fin de maturation dans la qualité germinative des graines des légumineuses. Il reste encore à comprendre pourquoi la rétention de la chlorophylle et probablement des photosystèmes contribuent à la diminution de la longévité des graines. A terme, ce travail ouvre de nouvelles perspectives en établissant un lien entre la régulation de composés anti nutritionnels et la qualité germinative chez les légumineuses.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BUITINK J., LEPRINCE O., 2008. — Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes rendus biologies* **331**(10): 788-795.
- (2) CHATELAIN E., HUNDERTMARK M., LEPRINCE O., GALL S. L., SATOUR P., DELIGNY-PENNINCK S., BUITINK J. 2012. – Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant, cell & environment*, **35**(8): 1440-1455.

- (3) CHOI H. K., KIM D., UHM T., LIMPENS E., LIM H., MUN J. H., ROE, B. A., 2004. — A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**(3): 1463-1502.
- (4) DEBEAUJON I., LÉON-KLOOSTERZIEL K. M., KOORNNEEF M., 2000. — Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **122**(2): 403-414.
- (5) ELLIS R. H., HONG T. D., ROBERTS E. H., 1991. — Seed moisture content, storage, viability and vigour. *Seed Science Research* **1**(04): 275-279.
- (6) FINKELSTEIN R. R., 1994. — Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* **5**(6): 765–771.
- (7) FUJITA Y., FUJITA M., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., 2011. — ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* **124**(4): 509–525.
- (8) JALINK H., VAN DER SCHOOR R., FRANDAS A., VAN PIJLEN, J. G., BINO R. J., 1998. — Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. *Seed Science Research*, **8**(04): 437-443.
- (9) NAKAJIMA S., ITO H., TANAKA R., TANAKA A., 2012. — Chlorophyll b Reductase Plays an Essential Role in Maturation and Storability of *Arabidopsis* Seeds. *Plant Physiology* **160**(1): 261–273.
- (10) PRIETO-DAPENA, P., CASTAÑO R., ALMOGUERA C., JORDANO, J., 2006. — Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant physiology*, **142**(3):1102-1112.
- (11) ROSNOBLET C., AUBRY C., LEPRINCE O., VU B. L., ROGNIAUX H., BUITINK J., 2007. — The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non fermenting related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal*, **51** (1) : 47-59.
- (12) SALLON S., SOLOWEY E., COHEN Y., KORCHINSKY R., EGLI M., WOODHATCH I., SIMCHONI O., KISLEV M., 2008. — Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science*, **320**(5882): 1464-1464.
- (13) SANO N., RAJJOU L., NORTH H. M., DEBEAUJON I., MARION-POLL A., SEO M., 2015. — Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant and Cell Physiology*: **57**(4): 660-664.
- (14) TEIXEIRA R. N., LIGTERINK W., FRANÇA-NETO J. DE B., HILHORST H. W. M., DA SILVA E. A. A., 2016. — Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. *BMC Plant Biology* **16**(1) :37.
- (15) VERDIER J., LALANNE D., PELLETIER S., TORRES-JEREZ I., RIGHETTI K., BANDYOPADHYAY K., LEPRINCE O., CHATELAIN E., VU B. L., GOUZY J., GAMAS P., UDVARDI M. K., BUITINK J., 2013. — A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds. *Plant Physiology* **163**(2): 757–774.
- (16) SATTLER S. E., GILLILAND L. U., MAGALLANES-LUNDBACK M., POLLARD M., DELLAPENNA D., 2004. — Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The plant cell*, **16**(6): 1419-1432.
- (17) WALTERS C., WHEELER L. M., GROTENHUIS J. M., 2005. — Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics." *Seed Science Research* **15**(1): 1-20.