



HAL
open science

Mise au point de la transparence racinaire pour l'imagerie 3D de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

Mathilde Hériché

► To cite this version:

Mathilde Hériché. Mise au point de la transparence racinaire pour l'imagerie 3D de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK103 . tel-04632965

HAL Id: tel-04632965

<https://theses.hal.science/tel-04632965v1>

Submitted on 3 Jul 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR L'AGRICULTURE,
L'ALIMENTATION ET L'ENVIRONNEMENT

Ecole doctorale n°554 : Environnement - Santé
Doctorat de Biologie Cellulaire

**MISE AU POINT DE LA TRANSPARISATION RACINAIRE
POUR L'IMAGERIE 3D DE LA
SYMBIOSE MYCORHIZIENNE A ARBUSCULES**

Par Mme Hériché Mathilde



Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 09 décembre 2022

Composition du Jury

Pr. WENDEHENNE David
Pr. ROUX Christophe
Pr. PALAUQUI Jean-Christophe
Pr. PLASSARD Claude
Dr. AVOSCAN Laure
Dr. AFFATICATI Pierre
Dr. COURTY Pierre-Emmanuel

Professeur à l'Université de Bourgogne
Professeur à l'Université Toulouse3
Chargé de recherche à INRAE IJPB
Directrice de recherche à INRAE Occitanie
Ingénieure de recherche à INRAE BFC
Ingénieur de recherche au CNRS, Paris-Saclay
Directeur de recherche à INRAE BFC

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse

Titre : Mise au point de la transparisation racinaire pour l'imagerie 3D de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

Mots clés : Transparisation, Transport, Phosphate, Microscopie, Vigne, Mycorhize

Résumé : La vigne, comme la majorité des espèces de plantes d'intérêt agronomique, forme une symbiose mutualiste avec les Champignons Mycorhiziens à Arbuscules (CMA). En contrepartie de produits issus de la photosynthèse, les CMA soutiennent leur(s) plante(s) hôte(s) dans l'acquisition de nutriments et la lutte contre leur(s) pathogène(s). En tant que biofertilisants, ces symbiotes obligatoires représentent une alternative de choix à l'égard des pratiques agricoles conventionnelles pour le développement d'une viticulture durable. Les échanges entre les deux partenaires sont permis par la mise en place de structures fongiques spécialisées appelées arbuscules. La membrane plasmique végétale, en contact étroit avec l'arbuscule, appelée membrane périarbusculaire, présente des transporteurs de nutriments spécifiquement régulés. Le phosphore (P) est un élément clé pour la croissance des plantes, mais la majeure partie du P du sol n'est pas disponible. Les plantes ne peuvent prélever que le phosphate inorganique (Pi) du sol à proximité de leurs racines et sont donc rapidement confrontées à son épuisement. En agriculture conventionnelle, cet épuisement est compensé par l'application d'engrais de synthèse. Cependant, les plantes mycorhiziennes peuvent prélever du Pi du sol soit par la voie directe (transporteurs exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules épidermiques des poils absorbants) soit par la voie mycorhizienne. La voie mycorhizienne peut améliorer la nutrition phosphatée des plantes en étendant l'exploration des sols, grâce aux hyphes du CMA, au-delà de la zone de déplétion en Pi. Les arbuscules du CMA sont impliqués dans la translocation du Pi vers la cellule végétale à travers la membrane périarbusculaire. Afin de comprendre le rôle du P dans l'établissement et le maintien des échanges entre les partenaires symbiotiques, ma thèse se divise en deux axes. Mon premier objectif est de déterminer la répartition tri-dimensionnelle sur

racine entière des transporteurs de P sur-exprimés lors de la mycorhization. Pour cela, il est nécessaire de rendre l'échantillon transparent par dépigmentation et homogénéisation des indices de réfraction à travers le tissu. Cette technique, appelée transparisation, permet l'acquisition d'un signal fluorescent en profondeur sans coupe histologique. J'ai donc mis au point un protocole de transpiration sur tissu racinaire. L'imagerie racinaire en microscopie confocale à balayage laser, jusqu'à lors limitée à une profondeur de 40µm sur racine non pigmentée, à cause de l'opacité du tissu, est dorénavant repoussée à 250µm d'épaisseur grâce à la transparisation, y compris sur racines pigmentées. Dans un second temps, j'ai réalisé un immunomarquage de transporteurs de phosphate sur-exprimés lors de la mycorhization. Cet immunomarquage fonctionne sur racine entière non pigmentée (*Medicago truncatula*, transporteur MtPT4) et pigmentée (*Vitis* sp., VvPT4). Le second objectif de ma thèse est de déterminer l'influence du P sur l'échange et le stockage de carbone entre les deux partenaires. En tant que symbiote obligatoire, le CMA a besoin d'un support et d'un approvisionnement en carbone. Le sucre (sous forme de glucose) est la principale source de carbone pour le CMA. Cependant, les CMA sont incapables de produire des acides gras (Ag) et ont besoin de la plante pour cette synthèse. Lorsque la concentration en P dans le milieu de culture est élevée, les arbuscules ont tendance à se rétracter et à former des gouttelettes lipidiques visibles en microscopies photonique et électronique. Par des analyses spectrales innovantes sur tissus racinaires mycorhizés (infrarouge, visible et spectrométrie de masse), je cherche à trouver une approche permettant de déterminer la composition en AG des gouttelettes lipidiques, pour *in fine*, en comprendre la provenance (végétale ou fongique) et confirmer ou infirmer la présence d'une voie passive de transport d'AG lors de la mycorhization.

Title: Development of root clearing for 3D imaging of arbuscular mycorrhizal symbiosis

Keywords: Clearing, Grapevine, Mycorrhiza, Transport, Microscopy, Phosphate

Abstract: Grapevine, like most plant species of agronomic interest, forms a mutualistic symbiosis with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF). In return for products of photosynthesis, the AMF support their host plant(s) in acquiring nutrients and fighting their pathogen(s). As biofertilisers, these obligate symbionts represent a choice alternative to conventional agricultural practices for the development of agriculture, and in particular sustainable viticulture. Exchanges between the two partners are made possible by the establishment of specialised fungal structures called arbuscules. The plant plasma membrane, in close contact with the arbuscules, called the periarbuscular membrane, has nutrient transporters that are specifically regulated in this symbiosis. Phosphorus (P) is a key element for plant growth, but most of the P in the soil is not available to the roots. Plants can only take up inorganic phosphate (Pi) from the soil near their roots and are therefore quickly faced with its depletion. In conventional agriculture, this depletion is compensated by the application of synthetic fertilisers. However, mycorrhizal plants can take up Pi from the soil either by the direct way (transporters expressed in the plasma membrane of the epidermal cells of the absorbing hairs) or thanks to the AMF. The mycorrhizal pathway can improve plant phosphate nutrition by extending soil exploration, through the hyphae of the AMF, beyond the Pi depletion zone. Furthermore, AMF arbuscules are involved in the translocation of Pi to the plant cell through the periarbuscular membrane. In order to understand the role of P in the establishment and maintenance of exchanges between symbiotic partners, my thesis is divided into two main axes. My first objective is to determine the three-dimensional distribution of P transporters over-expressed or induced during mycorrhization. In order to acquire fluorescent signal over the entire root thickness, it is necessary to make

the samples transparent by depigmenting and homogenising the different refractive indices within the tissue, via chemical treatments. This technique, called clearing, allows a three-dimensional analysis of the fluorescently labelled structures of interest on thick samples without histological sectioning. I first developed a root tissue clearing protocol. Root imaging using confocal laser scanning microscopy, which was previously limited to a depth of 40µm on non-pigmented roots due to the opacity of the tissue, is now extended to 250µm in thickness thanks to clearing process, including on pigmented roots. In a second step, I performed an immunolabelling of phosphate transporters overexpressed during mycorrhization. This immunolabelling is suitable with clearing of non-pigmented roots (*Medicago truncatula*, MtPT4 transporter) and on pigmented roots (*Vitis* sp., VvPT4 transporter). The second objective of my thesis is to determine the influence of P on the exchange and storage of carbon between the two partners. Indeed, as an obligate symbiont, the CMA needs a plant support and a carbon supply. According to the literature, sugar (glucose) is the main source of carbon for the AMF. However, AMFs are unable to produce fatty acids (FAs) and require plant for this synthesis. Studies have suggested the presence of an active FA transport pathway at the symbiotic interface. However, when the concentration of P in the culture medium is high, the arbuscules tend to shrink and form lipid droplets visible under photon and electron microscopy. These observations suggest a passive voice allowing the transport of FA from the plant to the AMF via these droplets. Using innovative spectral analyses on mycorrhizal root tissues (infrared, visible and mass spectrometry), I am looking for an approach to determine the FA composition of the lipid droplets, in order to ultimately understand their origin (plant or fungal) and confirm or deny the presence of a passive FA transport pathway during mycorrhization.

Sommaire

Abréviations.....	1
Table des figures	2
Introduction générale.....	5
1. La symbiose mycorhizienne à arbuscules.....	5
2. La vigne.....	7
3. Visualisation et quantification de la SMA.....	11
Objectifs de la thèse	15
Chapitre I : La transpiration racinaire	17
I.1. Observation d'organes entiers à l'échelle microscopique	17
I.2. Principe physico-chimique de la transpiration	17
I.3. Les protocoles de transpiration végétale	20
I.4. La transpiration racinaire.....	23
I.4.1 Protocole de transpiration de racine blanche mycorhizée.....	23
I.4.2. Protocole de transpiration de racines tanniques mycorhizées	27
I.5. Perspectives.....	32
Chapitre II : Transporteurs de phosphate en ligne de mire	33
II.1. Introduction : le phosphate dans la symbiose mycorhizienne.....	33
II.2. Approche biomoléculaire des transporteurs de phosphate (Pht) de vigne.....	36
II.2.1. Identification des transporteurs de phosphate et analyse phylogénétique.....	36
II.2.2. Etude ciblée de séquençage ARN.....	40
II.3. Immunomarquage.....	43
II.3.1. Caractérisation des anticorps.....	43
II.3.2. Immunomarquage de MtPT4	44
II.3.3. Immunomarquage de VvPT8.....	47
II.3.4. Immunomarquage de VvPT4.....	52
II.3.5. Impact de la condition P sur l'expression de VvPT4.....	72
II.4. Microscopie électronique à transmission	77
II.4.1. Micromorphologie sur racine de Riparia en condition P	77
II.4.2. Prémices d'immunomarquages.....	79
II.5 Perspectives.....	81
Chapitre III : Approches microspectrométriques des lipides symbiotiques.....	83
III.1. Introduction : le carbone dans la symbiose mycorhizienne.....	83
II.1.1. Les sucres.....	83
II.1.2. Les lipides	86

II.1.3. L'interconnexion entre le P et le C	88
III.2. Lipides en microscopie	88
III.2.1. Microscopie optique.....	88
III.2.2. Microscopie électronique à transmission	94
III.3. Microspectrométrie infra rouge.....	96
III.3.1. Intérêt de la méthode	96
III.3.2. Préparation des échantillons.....	96
III.3.3. Résultats préliminaires	97
III.4. Spectrométrie de masse.....	98
III.4.1. Intérêt de la méthode	98
III.4.2. Préparation des échantillons.....	98
III.4.3. Résultats préliminaires	99
III.5. Microspectrométrie visible	103
III.5.1. Intérêt de la méthode	103
III.5.2. Préparation des échantillons.....	103
III.5.3. Résultats préliminaires	105
III.6. Perspectives.....	108
Conclusion générale	109
Remerciements	114
Bibliographie.....	116
Contributions scientifiques	127
1. Valorisations scientifiques.....	127
2. Articles de vulgarisation	129

Abréviations

Ac	Anticorps	n	Indice de réfraction
Ag	Acide gras	NM	Non Mycorhizé
AIA	Alcool IsoAmylique	OCT	Optimal Cutting Temperature compound
ASB	Albumine de Sérum Bovin	P	Phosphore
AT	Agent de Transparisation	PBS	Phosphate Buffer Saline
CMA	Champignon Mycorhizien à Arbuscules	PBST	Phosphate Buffer Saline Tween20
CMC	Carboxy Methyl Cellulose	Pht	Transporteur de Phosphate inorganique
CTR	Clearing Tannic Root protocol	Pi	Phosphate inorganique
DAB	Di Amino Benzidine	PT	Protocole de Transparisation
DBE	DiBenzylEther	R.	<i>Rhizophagus</i>
DPH	DiPhénylHéxatriène	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
EDTA	éthylènediaminetétraacétique	SMA	Symbiose mycorhizienne à Arbuscules
EGTA	acide egtazique	T°C ambiante	Température ambiante
EPA	Espace PériArbusculaire	TBS	Tris Buffer Saline
ha	hectare	TBST	Tris Buffer Saline Tween20
I^{aire}	primaire	TDE	2,2'-thiodiethanol
iCTR	Immunostaining of Cleared Tannic Root	TOF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
II^{aire}	secondaire	V.	<i>Vitis</i>
IP	Iodure de Propidium	WGA	Wheat Germ Agglutinin
IR	InfraRouge	βMAG	β-MonoAcylGlycérol
ITO	Indium Tin Oxide	λ_{em}	longueur d'onde d'émission
M	Mycorhizé	λ_{ex}	longueur d'onde d'excitation
M.	<i>Medicago</i>	RIM	Résistance Induite par la Mycorhize
MAP	voie Mycorrhizienne d'Absorption du Phosphate		
MeOH	Méthanol		
MF	Marqueur Fluorescent		
MPA	Membrane PériArbusculaire		

Table des figures

Figure 1.....	5
Figure 2.....	8
Démarche expérimentale (i).....	15
Démarche expérimentale (ii).....	15
Figure 3.....	18
Figure 4.....	19
Figure 5.....	22
Figure 6.....	25
Figure 7.....	25
Figure 8.....	26
Figure 9.....	27
Figure 10.....	28
Figure 11.....	29
Figure 12.....	30
Figure 13.....	31
Figure 14.....	31
Figure 15.....	34
Tableau 1.....	37
Figure 16.....	39
Figure 17.....	42
Figure 18.....	46
Figure 19.....	47
Figure 20.....	49
Figure 21.....	51
Figure 22.....	53
Figure 23.....	54
Figure 24.....	55
Figure 25.....	56
Figure 26.....	57
Figure 27.....	59
Figure 28.....	60
Figure 29.....	61
Figure 30.....	62
Figure 31.....	64
Figure 32.....	65
Figure 33.....	66
Figure 34.....	68
Figure 35.....	69
Figure 36.....	71
Figure 37.....	73
Figure 38.....	74
Figure 39.....	76
Figure 40.....	76
Figure 41.....	78

Figure 42..... 80
Figure 43..... 85
Figure 44..... 89
Figure 45..... 90
Figure 46..... 91
Figure 47..... 92
Figure 48..... 94
Figure 49..... 97
Figure 50..... 99
Figure 51..... 100
Figure 52..... 101
Figure 53..... 105
Figure 54..... 106
Figure 55..... 107

Introduction générale

1. La symbiose mycorhizienne à arbuscules

La grande majorité des plantes terrestres (>95 %) mettent à contribution des champignons pour leur nutrition, à travers une symbiose mutualiste appelée « mycorhize » (Trappe, 2005). Le mot mycorhize a pour origine les termes grecs anciens « mukês » pour champignon et « rhiza » pour racine (Frank, 1885). Il existe plusieurs types de symbioses mycorhiziennes, dont 2 principaux se distinguent par la morphologie de l'interaction entre les deux partenaires : l'ectomycorhize (dite externe) et l'endomycorhize (dite interne). Pour la première, l'hyphe du champignon forme un manteau autour d'une radicelle et s'insinue entre les cellules corticales, générant une structure d'échange appelée réseau de Hartig. Dans le cas de l'endomycorhize, l'hyphe extra-racinaire du champignon (10µm de diamètre) pénètre entre les cellules du rhizoderme, puis se développe entre les cellules racinaires et colonise une cellule corticale en se ramifiant (1µm de diamètre). La structure fongique, appelée arbuscule, se met en place entre la paroi végétale et la membrane plasmique modifiée, alors appelée membrane périarbusculaire (MPA, [Figure 1a et 1b](#)) (Briat and Job, 2017, chap12).

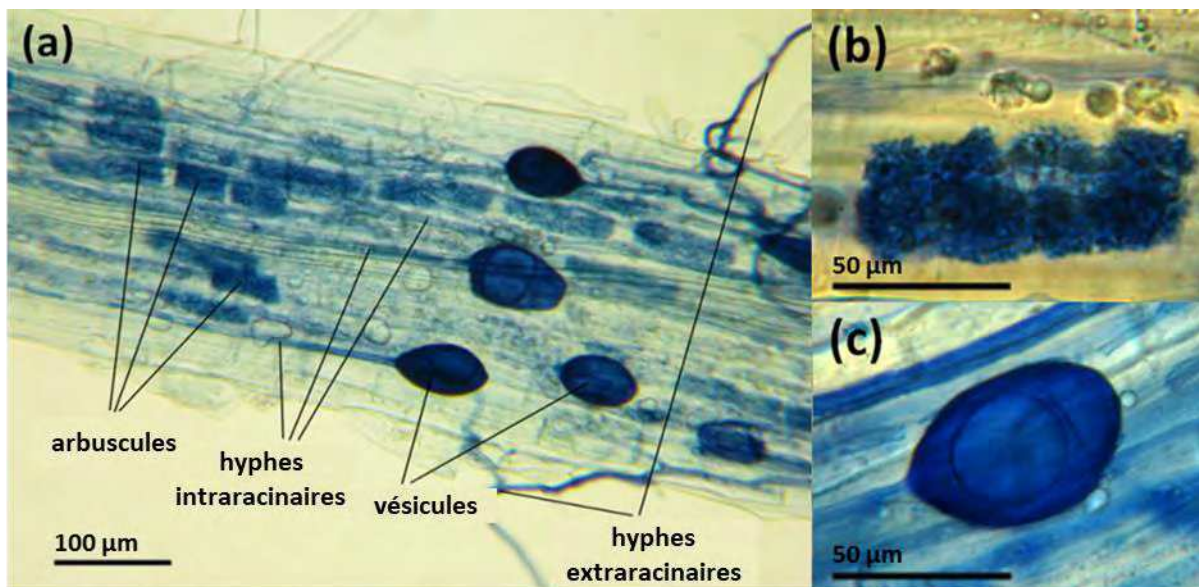


Figure 1 : Fragment de racine (a) de *Hieracium pilosella*, colonisé par *Rhizophagus irregularis*, contenant arbuscules (b) et vésicules (c). Coloration au bleu Trypan et observation au microscope optique (Photo I. Höpfner, Université de Bielefeld).

Cette structure particulière constituée de nombreuses ramifications fongiques enveloppées par la membrane périarbusculaire génère une très grande surface d'échanges au service des différents transferts qui caractérisent cette symbiose. De manière générale, les nutriments minéraux (ex. azote, phosphore, potassium) et l'eau passent du champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) à la plante. Réciproquement, le carbone (ex. sucres et lipides) est acheminé de la plante vers le champignon (Smith et Read 2008). Parfois, on peut également voir des structures appelées vésicules, spécialisées dans la mise en réserve de composés lipidiques (Figure 1a et 1c ; Gavériaux, 2012).

La symbiose mycorhizienne à arbuscules (SMA) est le plus ancien type d'endomycorhize et le plus répandu sur terre. Cette association aurait joué un rôle prépondérant dans la sortie de l'eau des végétaux chlorophylliens et la colonisation des terres émergées par ceux-ci (Malloch et al., 1980). Cette hypothèse a été appuyée par la découverte à Rhynie, en Ecosse, d'arbuscules chez une plante primitive *Aglaophyton major* (Remy et al., 1994). D'autres fossiles trouvés dans le Wisconsin, suggèrent que la SMA est apparue il y a 400 à 450 millions d'années (Redecker, 2000).

Un seul embranchement du règne des champignons forme la SMA, celui des Glomeromycota, qui compte à ce jour 327 espèces (International culture collection of Glomeromycota (CICG) <https://sites.google.com/view/cicg-furb-english/taxonomy/nomenclature>). Les CMA sont des biotrophes obligatoires : ils sont dans l'incapacité de croître en absence de la plante hôte qui leur fournit les substrats carbonés nécessaires à leur développement. Leurs hyphes, non septés de 6 à 20µm de diamètre, ont une très grande capacité d'exploration du sol, supérieure à celle de la plante dont les racines fines ont un diamètre de l'ordre de 300µm. La SMA permet donc à cette dernière d'étendre indirectement son système racinaire (d'au moins 40 fois, (Giovannetti et al., 2001)) et d'améliorer sa capacité d'absorption de l'eau et des minéraux. Malgré leur apparente incapacité à se reproduire de manière sexuée, les Glomeromycota peuvent se propager asexuellement de différentes manières : (i) par la formation de mitosporés multinucléés, allant de 20 à 2000µm de diamètre, qui en conditions favorables germent et colonisent une racine (Bécard et Pfeffer, 1993); (ii) par un hyphe colonisant une racine à proximité, qu'il soit sous forme d'un fragment isolé ou d'une extension provenant d'un champignon déjà associé à une plante.

Malgré une diversité de partenaires fongiques restreinte, plus de 200 000 espèces de plantes (soit plus de 80% des plantes terrestres), dont la grande majorité des plantes cultivées, peuvent former au niveau de leurs racines une SMA (Gavériaux, 2012). Les familles des *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Caryophyllaceae* et *Polygonaceae* ne forment pas de mycorhize. Toutes les autres plantes cultivées telles que les graminées (ex. blé et riz), les légumineuses (ex. soja et pois) ou encore des cultures

légumières (ex. tomate et oignon), horticoles (ex. géranium et rosier) et fruitières (ex. pommier et vigne), sont des plantes formant une SMA.

Ces caractéristiques propres à la SMA en font une symbiose d'intérêt agronomique majeure. Elle offre l'opportunité de soutenir les rendements de culture tout en réduisant l'utilisation d'intrants, en agissant sur des leviers tels que l'apport en eau, la nutrition minérale et la protection contre les stress biotiques et abiotiques (Gianinazzi et al., 2010). Elle permet également d'améliorer la qualité de production agronomique d'intérêt, seule ou en association avec des bactéries du sol (Noceto et al., 2021).

2. La vigne

La vigne est une plante pérenne au feuillage caduc qui appartient à la famille des *Vitaceae* et du genre *Vitis* (*V.*). Elle est formée d'un cep qui se ramifie en plusieurs sarments faisant l'objet de tailles selon le stade de développement et la conduite culturale choisie. Les conduites se distinguent selon les choix du vigneron concernant la densité de plantation et la hauteur du tronc, la taille, le palissage et l'enherbement. L'utilisation de porte-greffes dérivés d'espèces de *Vitis* nord-américaines a sauvé la vigne en Europe de l'extinction due à l'introduction, par du matériel de plantation contaminé, d'un insecte, le phylloxéra, à la fin du XIXe siècle. Le porte greffe doit être adapté au sol du vignoble et être compatible avec le cépage greffé (variété de vigne) afin de lui apporter toute la vigueur nécessaire à son bon développement sans influencer ses caractéristiques spécifiques. Les porte-greffes couramment utilisés sont soit des espèces individuelles de *Vitis*, soit des croisements de deux ou plusieurs espèces (Keller, 2015). La majorité des porte-greffes utilisés aujourd'hui sont des hybrides de trois espèces : *V. riparia*, *V. rupestris*, et *V. berlandieri* (Galet, 1998). Le catalogue national dénombre trente variétés de porte greffes ; en Bourgogne, 95% du vignoble est couvert par seulement cinq porte-greffes différents (**41B** = *V. vinifera* x *V. berlandieri*, **SO4** = *V. berlandieri* x *V. riparia*, **3309C** = *V. riparia* x *V. rupestris*, **161-49C** = *V. berlandieri* x *V. riparia* et **Fercal** = *V. berlandieri* x *V. vinifera* x *V. longii*).

Les cépages sont sélectionnés selon la localisation géographique du vignoble et le devenir du raisin produit. La très grande majorité des cépages cultivés aujourd'hui sont de l'espèce européenne *V. vinifera*. En Bourgogne notamment, le chardonnay et le pinot noir sont les deux cépages les plus cultivés, représentant 86,6% des récoltes (BIVB, 2012). Dans le monde, 7,5 millions d'hectares (ha) sont consacrés à la viticulture selon l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIVV, 2016). En France, 95 % du vignoble est consacré à la production de raisin de cuve, engendrant 16 milliards d'euros de chiffres d'affaires en aval de la filière (HCCA, 2017). La viticulture représente un secteur économique prospère mais un secteur agricole encore très dépendant des intrants et pesticides de synthèse. Approximativement, les apports en éléments minéraux principaux (azote (N), phosphore (P),

potassium (K) et calcium (Ca) confondus) vont de 120 à 290kg par an et par hectare. Avec 14 ravageurs et 6 champignons pathogènes référencés (Bergeron, 2013), 20% des pesticides totaux utilisés en France sont destinés à la protection des vignobles qui ne représentent que 3,7% de la surface agricole utile française (HCCA, 2017). Par ailleurs, comparée aux autres plantes cultivées, la vigne développe un système racinaire de faible densité avec des racines relativement épaisses et des racines fines qui subérisent avec le temps. Ces caractéristiques la rendent fortement dépendante de la SMA pour sa croissance et son développement (Schreiner, 2005). Sur la Figure 2 ci-dessous, on peut observer l'étendu des services écosystémiques qu'apporte la SMA à la vigne.

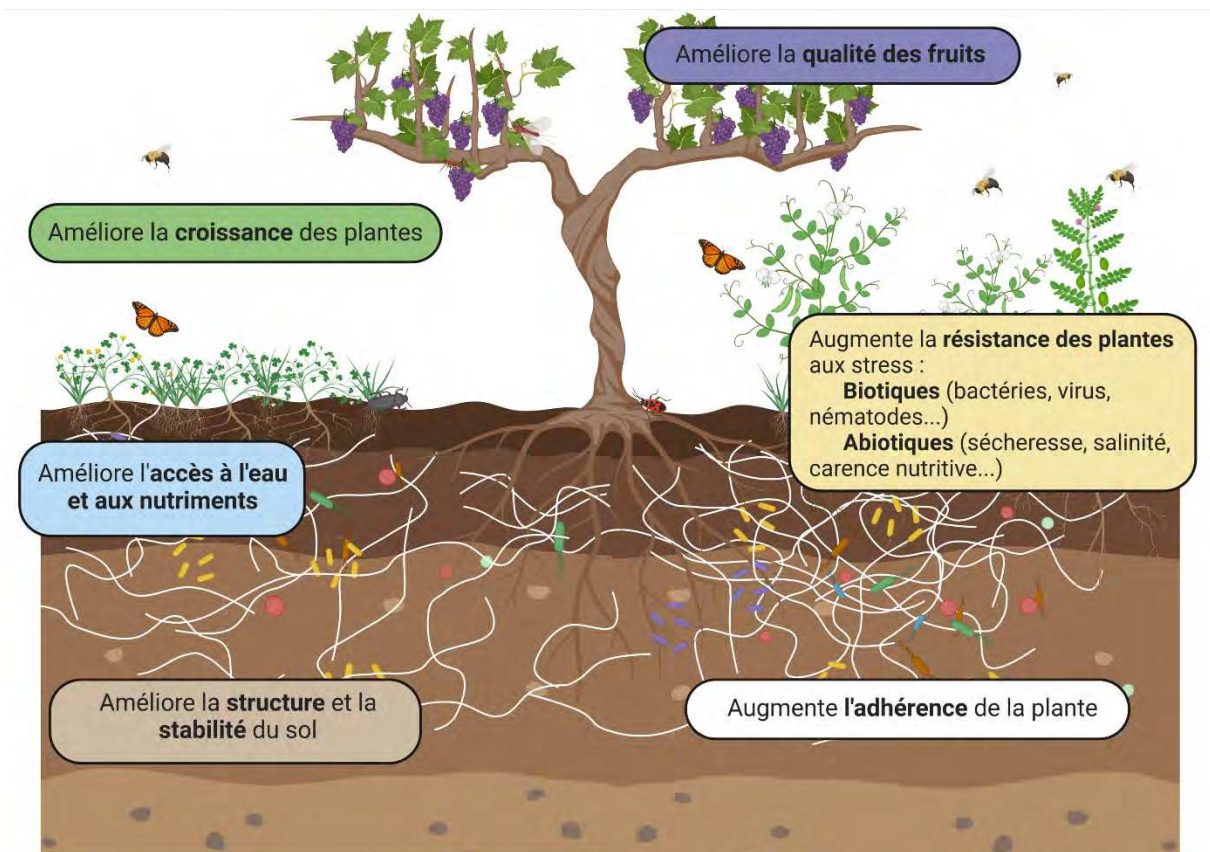


Figure 2 : Services écosystémiques rendus par la mycorhize à arbuscules (adaptée de Sportes et al., 2021b, Noceto et al., 2020).

L'amélioration de la tolérance de la vigne aux stress abiotiques est un service écosystémique primordial rendu par les CMA. Le stress abiotique qui influence le plus le développement des grappes de raisin et leur qualité est le déficit hydrique. La SMA permet d'augmenter l'eau prélevée par la plante. Lorsque des événements de sécheresse ont lieu, la vigne a tendance à réduire sa production de racines fines. Cette perte est compensée par une augmentation du nombre d'arbuscules au sein des racines déjà colonisées (Schreiner et al., 2007). D'autres travaux ont montré que les vignes soumises à un fort déficit hydrique utilisent de manière plus efficace l'eau à leur disposition lorsqu'elles sont mycorhizées (Trouvelot et al., 2015).

La SMA permet d'augmenter l'absorption des trois nutriments, N, K et P, dont la carence a un impact important sur la santé et la croissance de la vigne, ainsi que sur la qualité de la baie. Chez la vigne, comme chez les autres plantes pouvant établir une SMA, cette interaction plante-CMA est privilégiée lorsque les quantités en nutriments (notamment N et P) pour la plante sont faibles (Schreiner, 2005; Smith et Read, 2008). L'interaction se manifeste à l'échelle moléculaire par des modifications d'expression de certains gènes de la vigne pouvant être liés directement ou indirectement à la présence du CMA, comme par exemple des transporteurs de nutriments (Balestrini et al., 2017; Valat et al., 2018). Concernant le P, il est exclusivement absorbé sous forme de phosphate inorganique (Pi) par la plante et le CMA ; l'avantage de la SMA réside donc dans l'important volume de sol exploré par les hyphes. Il en est de même concernant l'N, préférentiellement assimilé sous forme d'ammonium (NH_4^+) par des transporteurs spécialisés de la plante, une déplétion se crée donc rapidement dans la rhizosphère (Garcia et al., 2016). Dans les sols fertilisés, l'N est majoritairement disponible sous forme de nitrate (NO_3^- ; Jämtgård et al., 2010), que les plantes peuvent assimiler via des transporteurs spécialisés (Wipf et al., 2019). Cependant, la réduction de NO_3^- en NH_4^+ est coûteuse en énergie. Le CMA peut incorporer l'azote sous forme inorganique (ex. NO_3^- et NH_4^+) et organique (ex. acides aminés et peptides). La diversité des sources d'azote est donc étendue par la symbiose, qui fournit jusqu'à un tiers de l'azote nécessaire aux protéines racinaires (Govindarajulu et al., 2005). La mycorhization permet également une meilleure absorption d'autres nutriments essentiels tels que le potassium, le magnésium, le zinc et le bore (Trouvelot et al., 2015). La gestion de la SMA est un levier pertinent pour lutter contre les carences minérales de la vigne dans les sols pauvres, et diminuer l'utilisation d'engrais dans les sols agricoles via une meilleure accessibilité des nutriments médiée par la symbiose.

La mycorhize permet également à la vigne de mieux tolérer le stress salin qui peut avoir un impact conséquent sur sa croissance et sur le raisin produit (Giri et al., 2007; Hasegawa et al., 2000). La mycorhize permet aussi de mieux tolérer le stress dû aux métaux dans le sol (ex. le cuivre); les CMA pouvant les piéger ou les immobiliser via différents mécanismes (Lanfranco et al., 2002).

La présence des CMA permet d'augmenter la stabilité des sols par la grande quantité d'hyphes (30m pour 1g de sol) qui agglomèrent les particules de sol et permet une meilleure infiltration de l'eau lors de fortes pluies (Wilson et al., 2009). De plus, les CMA produisent des molécules de type glycoprotéines (les glomalines) qui permettent de lier les particules fines de sol. Ces caractéristiques concourent à limiter l'érosion et le ravinement qui sont des problèmes répandus dans les régions septentrionales où les vignobles sont implantés sur des pentes plus ou moins accentuées afin d'optimiser l'ensoleillement (Bedini et al., 2009). Les CMA jouent donc un rôle important non seulement pour le cep mais aussi pour l'intégrité du vignoble dans son ensemble. Ces mêmes CMA peuvent également interagir avec les autres plantes formant une SMA et présentes sur la parcelle, générant un réseau mycélien commun et partagé. Ainsi, la présence d'un couvert végétal peut être un levier considérable dans l'optique d'étendre et de gérer durablement le réseau mycélien du vignoble en question (Noceto et al., 2020).

Enfin, la mycorhize accroît la résistance de la vigne aux stress biotiques induits par de nombreux pathogènes. De nos jours, la lutte contre ces agresseurs est essentiellement menée via l'utilisation de fongicides, insecticides et parasitocides comme le révèlent les statistiques présentées au début de cette section. Or, ces pratiques culturales sont délétères pour la santé humaine mais aussi pour l'environnement. Dans ce contexte, le plan gouvernemental Ecophyto II a pour objectif la diminution de 50% de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques d'ici 2025 grâce à des solutions agroécologiques. Cette nouvelle politique qui a commencé par le plan Ecophyto I en 2008, a notamment permis de retirer du marché des substances actives fongicides telles que la procymidone, la fenarimol ou encore la tolyfluanide (Ecophyto 2019). Outre leurs effets sur la santé humaine, de tels fongicides peuvent limiter ou inhiber le développement des CMA, voire impacter leur survie, et donc entraîner la perte des services écosystémiques associés (Cheng et Baumgartner, 2004; Zaller et al., 2018). La pertinence de la préservation des CMA réside dans leur rôle crucial dans les phénomènes de résistance et de tolérance de la vigne vis-à-vis de ses différents agresseurs.

Au niveau racinaire, la colonisation des racines par le CMA génère des modifications morphologiques limitant l'invasion des racines par le pathogène (Dalpé, 2005). Au niveau systémique, la SMA intervient de manière complexe sur les voies de signalisation de défense propre à la plante. Ce phénomène appelé « résistance induite par la mycorhize » (RIM) implique CMA, bactérie et plante dans des événements symbiotiques cadencés par des signaux hormonaux caractéristiques de voies de défense de la plante tels que l'acide salicylique, abscissique et jasmonique (Cameron et al., 2013). La RIM engendrant une protection notoire de la plante contre un large spectre d'agresseurs, la gestion de la mycorhization au sein du vignoble s'avère cruciale pour une viticulture durable.

Les services rendus par la SMA dépendent de nombreux paramètres pédoclimatiques (ex. sol, climat et hygrométrie), techniques (ex. variété de vigne, porte-greffe, densité de peuplement, caractéristiques des différents couverts et passage des engins) et biotiques (ex. pathogènes, auxiliaires et microbiote). Avant la construction d'un itinéraire de culture basé sur une gestion appropriée de tous ces paramètres et sur l'anticipation de leurs interactions, il est nécessaire d'acquérir des connaissances structurales et fonctionnelles fines de la SMA.

3. Visualisation et quantification de la SMA

En présence d'acteurs invisibles à l'œil nu, tel que le CMA, l'observation microscopique est une étape incontournable d'une étude. Au cours de ces deux derniers siècles, les avancées dans la compréhension de la structure et de l'organisation des différents champignons mycorhiziens ont été intimement liés aux avancés de la microscopie optique et de la préparation des échantillons. Pour cause, les racines présentent de nombreux métabolites secondaires actifs à la lumière (ex. phénols, pigments, tanins) pouvant rendre le tissu complètement opaque et impossible à observer. Ce sont aussi des tissus généralement denses et imperméables, ce qui peut contraindre drastiquement la coloration. Afin de dépasser ces limites et de pouvoir observer l'interaction plante champignon au niveau cellulaire, des méthodes permettant de rendre le tissu moins opaque, si ce n'est transparent, ont été développées. C'est ainsi que commence l'histoire de la transparisation racinaire (voir Chapitre I), à la fin du XIX^{ème} siècle (Janse, 1897). On notera que l'agent de transparisation (AT) le plus populaire dans la première moitié du XX^{ème} siècle est l'hydroxyde de potassium (KOH), qui a largement été utilisé pour l'observation de la SMA (Janse, 1897; Peyronel, 1940, Bevege, 1968; Phillips et Hayman, 1970). Cependant le tissu racinaire, comparativement aux autres organes végétaux, est un tissu difficile à transparer (Bersier et Bocquet, 1960; Peterson, 1973).

En plus de cette étape d'éclaircissement, la quantification et la description fine du CMA à l'intérieur de la racine ont été permises par l'utilisation d'une grande diversité de colorants. Le choix d'un colorant en particulier peut dépendre de nombreux facteurs comme la taille de la racine, le type de plante, la préparation d'échantillon, la toxicité, le but de l'observation ou encore les microscopes à disposition (Vierheilig et al., 2005).

Si l'une des contraintes expérimentales est de garder le système racinaire vivant, l'observation du CMA restera, si ce n'est superficielle, tout du moins peu résolutive. Dans ce contexte, la transparisation est proscrite, l'observation ne pourra donc se faire que sur racine non pigmentées ce qui limite le nombre d'espèces végétales observables. En microscopie à lumière transmise, il est possible de marquer l'espace périarbusculaire (EPA) au rouge neutre, de par l'acidité de ce compartiment. Cependant, plusieurs paramètres notoires peuvent rendre cette coloration approximative : (i) un

stress mécanique de la racine durant la récolte, (ii) les blessures du tissu dues au sectionnement, (iii) la mauvaise pénétration du colorant sur racines non sectionnées et (iv) le marquage indésirable de tout autre compartiment acide au sein du tissu (Vierheilig et al., 2005). En microscopie à fluorescence il est possible de détecter le CMA grâce à son autofluorescence. Cependant ce type d'imagerie est peu résolutive et est très sensible au stade de développement des arbuscules (Vierheilig et al., 2005). En combinant la fluorescence et le sectionnement optique via l'utilisation d'un microscope confocal à balayage laser il est toutefois possible de détecter le signal de fluorochromes au sein de la racine vivante. C'est ce qui a été démontré en 2001 par Vierheilig et ses collaborateurs sur des plants de tabac. Pour cela, du 5(6)-carboxyfluorescein (CF, longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) 492nm; longueur d'onde d'émission (λ_{em}) 514nm) ou du 5(6)-carboxy-seminaphthorhodafluor (5(6)-FAM SE, FLUOS, λ_{ex} 492nm; λ_{em} 517nm) est déposé sur des feuilles volontairement blessées, afin de rejoindre le système racinaire via la circulation de la plante.

Pour la détection et la quantification globale de la colonisation racinaire, le tissu est transparisé, coloré et observé au microscope photonique en lumière visible. Afin de quantifier la colonisation plusieurs approches ont été recensées (Sportes et al., 2021, *cf* contribution scientifiques page 112), mais on retiendra la dernière mise au point de la méthode des intersections (Hu et al., 2020) qui a été utilisée pour cette thèse. Parmi les colorants, on trouve le bleu Trypan (Phillips et Hayman, 1970), qui est le plus répandu encore aujourd'hui (Kobae et Ohtomo, 2016) pour la quantification. Il ne pénètre que dans les cellules mortes, marque également avec une faible intensité les cellules végétales et une forte intensité les structures fongiques dû à la grande quantité de membranes. Sa faible spécificité, le rend incompatible avec des observations à but morphologique à gros grossissement, ce qui est également le cas pour la coloration à l'encre noire. Le bleu coton et le Sudan IV (Nicolson, 1959) ont une affinité pour la chitine, mais présentent une intensité relativement faible, notamment lorsque les structures fongiques sont incluses dans du tissu racinaire. En revanche, le noir de chlorazol E (Brundrett et al., 1984) a une grande affinité pour la cellulose et la chitine, ce qui permet de distinguer clairement les structures fongiques intracellulaire et d'offrir un meilleur contraste que le bleu Trypan à fort grossissement. Enfin la fuchsine acide, un colorant rose plasmatique, offre peu de contraste en lumière visible et est préféré en microscope à fluorescence (λ_{ex} 540nm, λ_{em} 630nm), en tant que contre marquage.

Pour une approche morphologique détaillée du CMA à l'intérieur de la racine, le tissu est généralement fixé, sectionné et/ou transparisé, marqué et observé en microscopie à fluorescence. Il sera préféré en coloration principale des marqueurs plus spécifiques au tissu fongique que ne l'est la fuchsine. C'est le cas pour l'Uvitex2B (λ_{ex} 350nm, λ_{em} 435nm), un fluorochrome possédant une affinité pour les polysaccharides présents dans la chitine et la cellulose (Diagne et al., 2011). Bien que ce

marquage donne des résultats positifs en microscopie confocale, on notera que le marquage de la cellulose peut induire un bruit de fond et que ce fluorochrome nécessite d'avoir à disposition un microscope équipé d'un laser UV. L'agglutinine de germe de blé (Wheat Germ Agglutinin, WGA), quant à lui présente une très grande affinité pour la chitine. Le WGA peut être couplé à une large gamme de fluorochromes (FITC, AlexaFluor -350, -488, -555, -594, -633, -647, -680, ThermofisherScientific) ce qui le rend particulièrement populaire, puisque compatible avec une grande diversité de lasers. Cependant, ces marqueurs sont relativement coûteux.

Une des premières approches fonctionnelles via l'imagerie photonique consiste à faire la différence entre les arbuscules métaboliquement actifs (c'est-à-dire ramifiés, ou mature) et inactifs (collapsés). Le diaminobenzidine (DAB) est un réactif de la peroxydase, qui sous l'action de cette enzyme et en présence d' H_2O_2 génère une coloration brune. Empiriquement, la coloration au DAB ne marque que les arbuscules collapsés. Or, lors de la fin de vie de l'arbuscule, un mécanisme de défense contre l'invasion est mis en place par le tissu racinaire via la production d' H_2O_2 ce qui corrobore l'observation empirique (Vierheilig et al., 2001). Toutefois, ce résultat est à nuancer. Pour cause, la sensibilité de la coloration au DAB est telle, qu'elle est plus à même de révéler la production d' H_2O_2 dans le tissu fongique métaboliquement actif et lors du « burst oxydatif » entraînant le collapse arbusculaire (Lanfranco et al., 2005). La coloration DAB a ensuite été optimisée en couplant la peroxydase avec le WGA (WGA-conjugated horseradish peroxidase (HRP) ; Kobae et Ohtomo, 2016). Dans ce cas, c'est la chitine du champignon qui est révélée par la réaction enzymatique et donc toutes les structures fongiques, sans distinction concernant la viabilité du tissu (Kobae et al., 2019; Kobae et Ohtomo, 2016).

La détection d'activité enzymatique fongique peut être en elle-même un marqueur de viabilité. Pour ce faire, la racine est tout d'abord marquée, puis sectionnée ou transparisée, pour ensuite être observée en microscopie optique. Le produit de la réduction du nitro bleu de tétrazolium par la succinate déshydrogénase (enzyme mitochondriale) est le formazan, un composé peu soluble et pourpre. Cette technique permet de marquer toutes les structures fongiques viables (Macdonald et Lewis 1978 ; Kough et al., 1987), tandis que les structures non actives ne sont pas marquées. La phosphatase alcaline quant à elle, est active dans les vacuoles fongiques. Selon le substrat utilisé (CPPCQ vs sel de Fast Blue RR), le produit déphosphorylé peut être respectivement fluorescent (λ_{ex} 360nm; λ_{em} 540nm, Aarle et al., 2001) ou coloré (Tisserant et al., 1993).

Une autre approche fonctionnelle, consiste à localiser des molécules d'intérêt dans la relation plante-CMA. Ce processus long impose tout d'abord la production d'un anticorps primaire (Ac^{l'aire}) dirigé contre la protéine d'intérêt. Ce dernier devra lui-même être révélé par un second anticorps

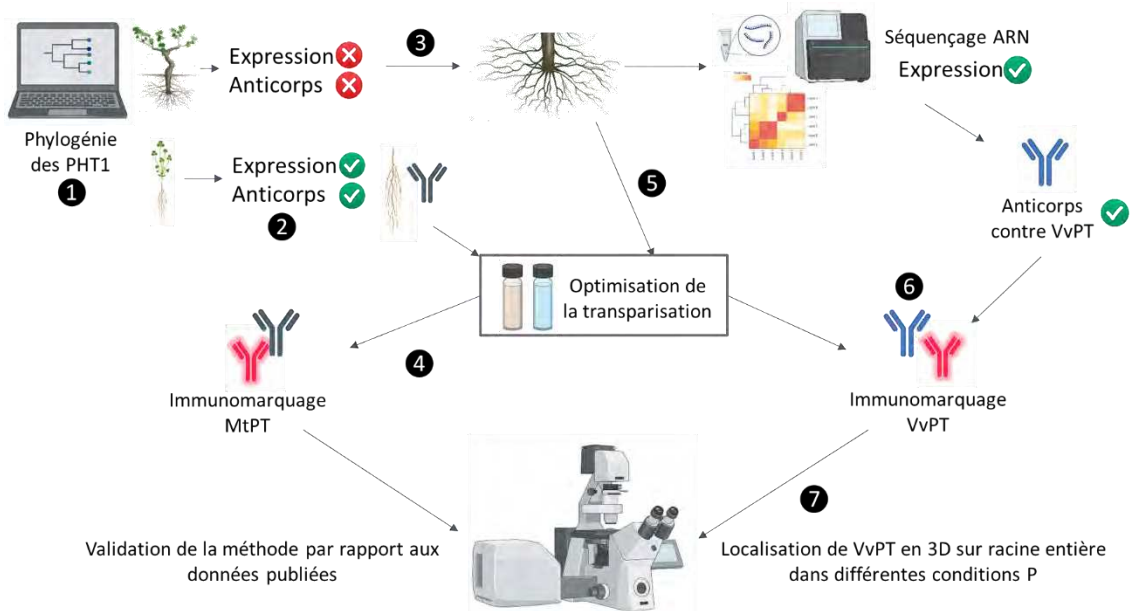
couplé à un fluorochrome, une enzyme ou encore une bille d'or pour la microscopie électronique. Pour ce marquage, les racines sont fixées, sectionnées puis immunomarquées avant d'être observées. Basé sur ce principe, un transporteur de phosphate induit par la SMA chez *Medicago truncatula* (*M. truncatula*, MtPT4) a été mis en évidence par immunomarquage grâce à un Ac II^{aire} couplé AlexaFluor488. Les tissus ont été contre-marqués au WGA–Texas red et le transporteur a pu être localisé en contact étroit avec la membrane périarbusculaire, montrant un signal fluorescent plus important sur les arbuscules les plus développées, et absent au niveau des arbuscules collapsées (Harrison 2002). Chez le peuplier (PtPT10) a été marqué et révélé par le même Ac II^{aire} que précédemment. La proximité de ce transporteur avec les structures fongiques a été précisée par un contre-marquage au WGA-Alexa633 (Loth-Pereda et al., 2011). Chez la tomate, un transporteur de saccharose (SISUT) a été immunomarké et révélé par un Ac II^{aire} couplé au FITC (Bitterlich et al., 2014). La calréticuline, protéine cargo affine pour le Ca²⁺, initialement présente dans le réticulum endoplasmique, a été immunomarkée et révélée par Ac II^{aire} couplé au FITC pour une observation au microscope à fluorescence et un autre couplé à une bille d'or (10nm) pour une observation en microscopie électronique. Ces expériences leur ont permis de démontrer la localisation tissulaire de la calréticuline en condition mycorhizé, non mycorhizé et lors d'un stress à l'aluminium. Par extension, le rôle de calréticuline dans la mobilisation du Ca²⁺ en condition mycorhizienne standard ou avec un stress chez *M. truncatula* (Sujkowska-Rybkowska et Znojek, 2018) a aussi été montré grâce à cette approche de microscopie corrélative.

Il est important de noter que pour toute approche fonctionnelle, la microscopie aussi résolutive qu'elle puisse être, doit être accompagnée par des études biomoléculaire et biochimique. Pour cause, dans une symbiose active le développement et la dégénérescence arbusculaire se produisent de manière continue dans le cortex racinaire. En effet, les arbuscules fonctionnels (dit matures) ont une durée de vie courte de 4 à 8 jours. De ce fait, il est possible d'observer des arbuscules à tous les stades de développement, quelque-soit le temps post-inoculation. Dans cette thèse on en discriminera 4 : immature, mature, dégénérescent et collapsé.

Bien que des structures fongiques en contact étroit avec la racine eussent été décrites dès le début du XIX^{ème} siècle, la notion de symbiose mycorhizienne a été sujette à de très nombreuses controverses avant d'être acceptée (Sportes et al., 2021). De nos jours, la caractérisation fine de cette interaction symbiotique est encore en cours, sous le feu des lasers des microscopes à haute et très résolution.

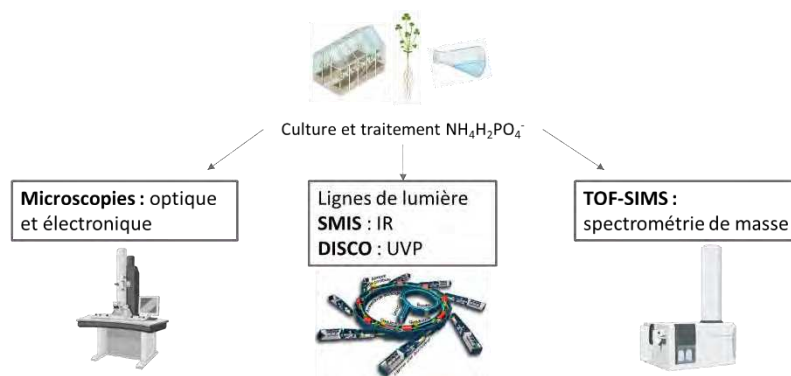
Objectifs de la thèse

- i. **Imager la distribution tridimensionnelle des transporteurs de phosphate membranaires (Pht1), à l'échelle de la cellule et de l'organe entier dans des racines de plantes mycorhizées.**



Démarche expérimentale (i) : 1) identification des PHT1 putatifs surexprimés en condition de mycorhization chez la vigne ; 2) bibliographie des MtPT déjà caractérisés ; 3) étude de l'expression des PHT1 putatifs de vigne par séquençage ARN ; 4) Mise au point de la transpiration racinaire combinée à l'immunomarquage sur racines de *Medicago truncatula* ; 5) Mise au point de la transpiration racinaire sur racines de Vigne ; 6) Mise au point de l'immunomarquage sur racines de Vigne transpirées ; 7) Etude de l'impact de la nutrition phosphatée sur l'expression d'un VvPT.

- ii. **Mettre au point des approches de micro-spectrométries pour l'analyse des transferts de lipides entre les partenaires symbiotiques lors de la mycorhization dans différentes conditions de nutrition phosphatée.**



Démarche expérimentale (ii) : analyses du contenu lipidique à différentes échelles via différentes méthodes de micro-spectrométries innovantes sur racines mycorhizées de *Medicago truncatula*. Synchrotron Soleil : Infrarouge (IR) et ultraviolet profond (UVP)

Chapitre I : La transparisation racinaire

I.1. Observation d'organes entiers à l'échelle microscopique

Depuis les premières observations de Hooke de coupes de lièges au milieu du 17^{ème} siècle, la recherche en phytologie est restée étroitement liée aux progrès de la microscopie optique. Plus précisément, l'utilisation des marqueurs fluorescents et du sectionnement optique a considérablement amélioré notre compréhension de la micromorphologie tissulaire (Wei et al., 2020), du développement cellulaire (Prunet, 2017), de la localisation des protéines et des interactions plantes-microorganismes (Harrison et al., 2002). Cependant, ces approches de microscopie sont limitées à une profondeur de ~50 μm en raison de l'opacité et de l'autofluorescence des tissus végétaux.

L'opacité d'un tissu est due à l'absorption et à la diffusion de la lumière par les composants cellulaires (Figure 3). Ces composés peuvent réagir à l'excitation laser pendant l'observation et entraîner une autofluorescence importante, bruitant le signal d'intérêt, et la superposition de tissus peut empêcher le passage de la lumière et donc l'analyse. L'approche conventionnelle permettant de s'affranchir de ces limitations est le sectionnement histologique en série. Ce type de préparation des échantillons permet d'imager à très haute résolution des coupes d'un organe disséqué. Toutefois, en l'absence d'un contexte spatial, il n'est pas aisé d'interpréter les images issues d'une coupe fine d'un tissu complexe à l'échelle de l'organe entier. De plus, la reconstruction tridimensionnelle de l'information acquise sur des coupes sériées est très laborieuse, voir approximative, et peut entraîner une perte de matériel (ex. contenu cellulaire) et donc d'information (Atkinson et Wells, 2017).

En rendant les tissus optiquement transparents grâce à des traitements chimiques, la transparisation permet de dépasser les limites des microscopes à sectionnement optique et ainsi de combiner imagerie à haute résolution et de gros volume.

I.2. Principe physico-chimique de la transparisation

Les tissus végétaux présentent une grande diversité de types cellulaires (ex. cellules parenchymateuses, épidermiques), d'organites (ex. chloroplastes, amyloplast) et de composés (ex. des cires, des pigments). Chacun possède ses propres propriétés optiques et peut modifier le chemin de la lumière à travers les couches de tissus. Deux phénomènes optiques majeurs interviennent : l'absorption et la diffusion.

L'absorption lumineuse représente une perte de photons : leur énergie est absorbée par les molécules. Les pigments absorbent dans le spectre visible et sont plus représentés dans le règne végétal que dans tout autre règne. De plus, certaines de ces molécules peuvent absorber la lumière et la réémettre sous forme de fluorescence. Cette autofluorescence peut considérablement gêner l'acquisition, voir la rendre impossible. Un processus clé dans la transparisation des tissus végétaux consiste à réduire l'absorption en éliminant les pigments (Figure 3).

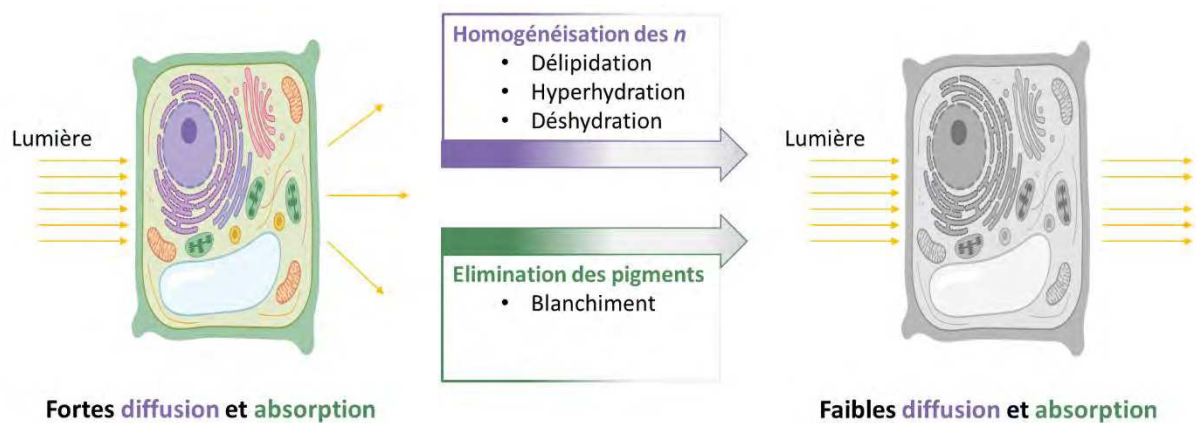


Figure 3 : Le processus de transparisation (adapté de Hériché et al., 2022).

La diffusion de la lumière représente la déviation des photons de leur trajectoire rectiligne lorsqu'ils rencontrent un milieu d'indice de réfraction (n) différent. Cet indice est une valeur sans dimension, qui est défini par la vitesse de la lumière dans le vide (c) divisée par la vitesse de la lumière dans le matériau d'intérêt (v) : $n = c/v$. C'est un paramètre très important en microscopie optique, décrit par les lois de Snell-Descartes. Ainsi, si un photon est trop dévié, il ne peut pas être détecté par le système optique et le signal est perdu. Dans les tissus végétaux, les valeurs des n varient de 1,00 (cavités d'air) à 1,61 (lignine) (Li et al., 2016). Aussi, plus l'échantillon est épais, plus la lumière incidente rencontre des composés de n différents, et plus la diffusion est élevée. En profondeur, l'observation est limitée à 50 μm dans le tissu foliaire (Kurihara et al., 2015). L'objectif majeur du protocole de transparisation (PT) est d'homogénéiser la valeur de n dans toute l'épaisseur du tissu grâce à l'utilisation d'un agent de transparisation (AT) de n élevé (Figure 4).

Parce que les propriétés optiques d'un tissu dépendent de sa composition, les PT doivent être optimisés non seulement en fonction de l'espèce (ex. mousse, arbre) mais aussi en fonction du tissu (ex. feuille, racine) et du type de microscopie utilisée (Hériché et al., 2022).

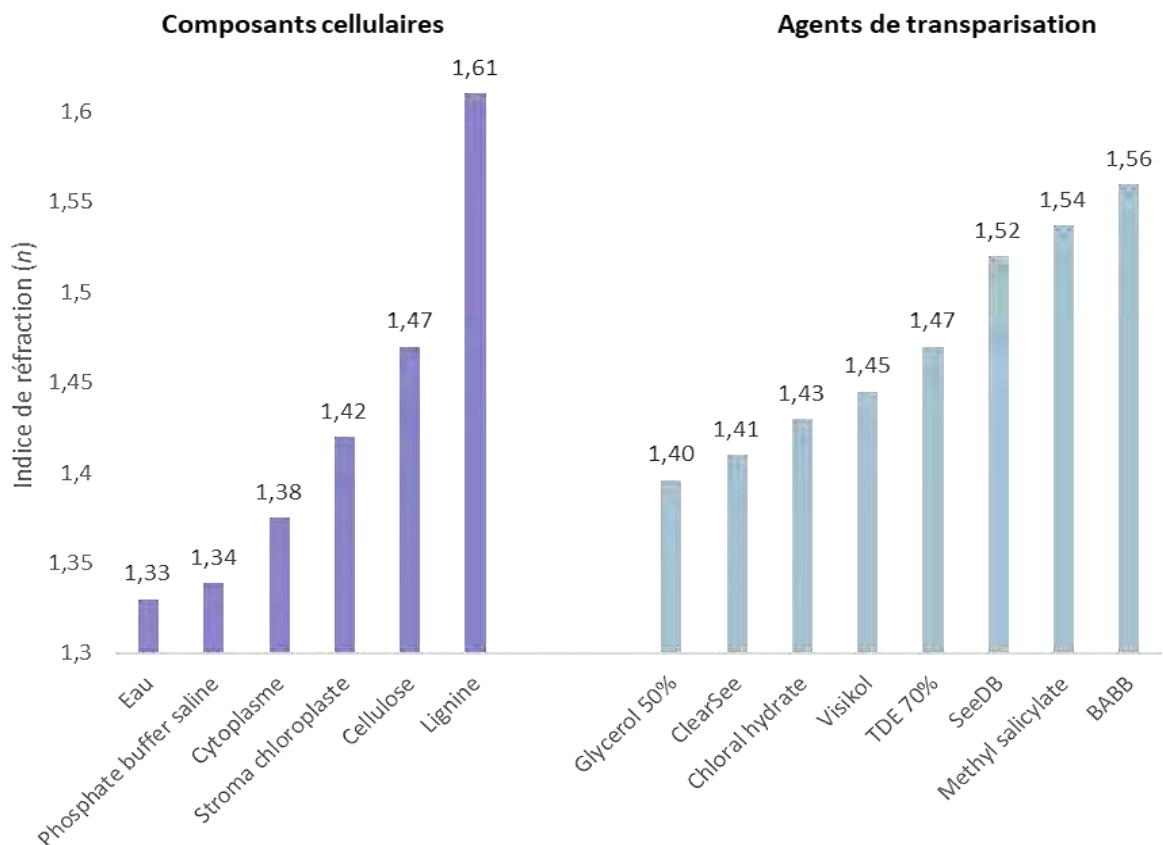


Figure 4 : Valeurs clés d'indice de réfraction. Les composants des cellules végétales (gauche) couvrent une large gamme d'indice réfraction (n), ce qui rend les tissus végétaux très denses à la lumière et difficiles à imager en microscopie photonique. Afin d'homogénéiser le n dans les tissus végétaux, divers AT ont été utilisés (partie droite). TDE : 2,2'-thiodiethanol, SeeDB : See Deep Brain, BABB : Benzyl Benzoate/Benzyl Alcohol. (Adapté de Hériché et al., 2022).

I.3. Les protocoles de transparisation végétale

Les neurosciences ont joué un rôle majeur dans le développement des PT, il en existe aujourd'hui plus d'une quarantaine, développés sur divers organes, *ex-vivo* ou *in-vivo*, y compris des os et des corps entiers (Matryba et al., 2019). Dans la littérature, de nombreuses revues en font l'objet, certaines focalisées sur les PT dans un domaine d'étude (ex. les neurosciences (Ueda et al., 2020), la biologie du développement (Vieites-Prado et Renier, 2021) ou encore basée sur la chimie entre composants cellulaires et AT (Yu et al., 2021)).

Sur plante, l'hydroxyde de potassium (KOH), une base forte, a été utilisée dès la fin du XIX^{ème} siècle (Janse, 1897). Son pouvoir de transparisation réside dans sa capacité de dégradation des composants cellulaires permettant l'élimination des pigments et la perméabilisation du tissu favorisant le marquage ainsi que la pénétration du milieu de montage à haut indice de réfraction (Stebbins, 1938) (ex. Balsam : $n = 1.52 - 1.54$, proche de celui du verre (Ravikumar et al., 2014)). Toutefois, l'oxydation par le KOH de certains polyphénols présents dans les tissus végétaux peut entraîner une importante coloration brune (Gardner, 1975). Dans certains cas, cette coloration peut être utilisée comme indicateur (ex. marquage de la paroi végétale de certaines mousses (Glime et Wagner, n.d.) mais peut également rendre le tissu encore plus opaque et limiter l'observation. Une fois les polyphénols oxydés, un traitement au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est nécessaire pour les dégrader. De plus la température et le temps d'incubation dans le KOH (préconisé à 10%) sont à déterminer avec précaution car ce traitement peut rapidement détériorer l'intégrité tissulaire (Gardner, 1975; Stebbins, 1938 et observations personnelles).

L'acide lactique (Simpson, 1929) et l'hydrate de chloral (McBryde, 1936; Shobe et Lersten, 1967), initialement utilisés comme milieu de montage et de conservation dans la solution de Hoyer (Anderson, 1954), étaient deux agents de transparisation couramment utilisés au début du siècle dernier. Leur capacité à rendre transparent les tissus repose sur leur n de 1,43 qui est très proche de celui de la paroi cellulaire végétale (1,42). Cependant, selon Bersier et Bocquet, 1960 : « *L'acide lactique a tendance à gonfler les tissus; aussi préférons-nous le chloral-lactophénol qui agit selon le même principe* ». Le chloral-lactophénol est un mélange de phénol, hydrate de chloral et d'acide lactique (respectivement 1:2:4 (m:m:m)), de $n = 1,49$. L'hydrate de chloral est ainsi utilisé en mélange ou pure, dans de nombreux PT sur une grande variété de plantes, en particulier *Arabidopsis thaliana*, pour transparer divers organes (ex. le phloème (Truernit et al., 2008), les feuilles (Wuyts et al., 2010), les organes floraux et les siliques (Hedhly et al., 2018)) et a été associée à diverses techniques de fixation et de coloration (ex. fuchsine acide (McBryde, 1936), bleu d'aniline (Bougourd et al., 2000), β -glucuronidase/ GUS (Truernit et al., 2008)). Pour la microscopie à fluorescence, l'hydrate de chloral a été combiné avec des réactifs pseudo-Schiff (PS) combiné à l'iodure de propidium (mPS-PI) pour

visualiser la paroi cellulaire (Wuyts et al., 2010). Néanmoins, l'hydrate de chloral est toxique (Sing et al., 1996) et entraîne une extinction de la fluorescence endogène, ce qui l'a rendu impopulaire (Kurihara et al., 2015).

La nécessité d'observer les tissus végétaux en profondeur a conduit au développement indépendant de nombreux PT dont les particularités dépendent de l'échantillon (par exemple, les organes reproducteurs (Stebbins, 1938), la structure d'intérêt (ex. la lignine (Li et al., 2016)), et du temps à disposition pour l'expérimentation (ex. la transparation en une étape (Herr, 1971)). En résumé, les différentes étapes d'un PT selon Gardner (1975) sont généralement : la fixation, la dissolution alcaline, le traitement post-alcali (dépigmentation, l'élimination des cristaux), les solutions à n élevé et le marquage. Jusque-là, les microscopes utilisés pour de telles observations n'avaient pas atteint une résolution de niveau subcellulaire. Les progrès de la microscopie à sectionnement optique (confocale, bi-photons, microscopie à feuille de lumière), ainsi que l'augmentation du contraste et de la résolution ont ouvert la voie à de nombreux PT compatibles avec la fluorescence.

Les récents PT sur tissus animaux sont généralement classés en deux catégories principales basées sur les propriétés physico-chimiques des AT : (i) les solvants organiques et (ii) les solutions aqueuses.

Les PT par solvant organique sont basés sur une déshydratation, suivie d'une délipidation et enfin une immersion dans une solution de n élevé (Richardson et Lichtman, 2015). Plusieurs protocoles récents, compatibles avec la fluorescence, ont été décrits en recherche animale, en particulier pour le tissu cérébral (Becker et al., 2020), mais la littérature sur les PT végétaux est pauvre (Hériché et al., 2022). A cause de l'étape de déshydratation, les tissus mous transparisés peuvent se rétracter et perdre du volume (Matryba et al., 2019). Dans la littérature, ce phénomène n'a été signalé que sur des apex de racines fines d'*Arabidopsis thaliana* (He et al., 2021). Cela peut s'expliquer par la présence des parois cellulaires dans les tissus végétaux, qui les rend moins sujet aux déformations que les tissus mous animaux.

Les PT aqueux peuvent être classés en trois catégories : l'immersion passive, l'hyperhydratation des protéines et l'incorporation dans un hydrogel ([Figure 5](#)). Une large gamme de protocoles aqueux développés sur des tissus animaux ont été adaptés aux plantes. Ces PT sont compatibles avec l'imagerie par fluorescence mais sont relativement chronophages par rapport aux PT à base de solvants organiques (Matryba et al., 2019). En immersion passive, la teneur en lipides de l'échantillon est préservée. Ce type de PT consiste à faire correspondre le n du tissu lipidique (qui est $> 1,45$ chez l'animal) en utilisant des solutions aqueuses à n élevé. Une autre approche consiste à réduire puis à homogénéiser le n d'un échantillon en deux étapes : (i) délipidation et (ii) hyperhydratation des protéines. Pour maintenir un environnement aqueux et conservé la fluorescence des marqueurs, la

délipidation est effectuée à l'aide d'un détergent. Cette étape prend plus de temps que la délipidation à l'aide d'un solvant organique (semaines à mois vs heures) (Richardson et Lichtman, 2015). Pour éviter l'élimination potentielle des protéines d'intérêt par des solvants et des détergents concentrés, (Chung et al., 2013) propose un autre type de PT aqueux dans lequel l'échantillon est fixé et inclus dans un gel de polyacrylamide. Associé à une solution de dodécylsulfate de sodium à faible concentration (8% SDS) et l'électrophorèse, la méthode CLARITY élimine les lipides et autres composés photoactifs tout en limitant les effets délétères de traitement chimique drastique. Ce protocole a été adapté chez les plantes avec une étape de digestion enzymatique supplémentaire (PEA-CLARITY, Palmer et al., 2015)

Les PT aqueux sont reconnus pour induire le gonflement des échantillons mous. Bien que, sur organe animal, cette expansion peut être utilisée pour améliorer la résolution (Murakami et al., 2018), son utilisation dans les organes végétaux n'a pas été signalée, probablement encore une fois à cause de la paroi cellulaire de la plante. Les PT aqueux ont été principalement développés pour modifier et éluer des composants cellulaires participant à l'opacité et l'imperméabilité du tissu (ex : les sucres complexes, les protéines et les lipides). Ainsi, selon la force du traitement, un tissu peut perdre son intégrité et s'affaiblir (Palmer et al., 2018).

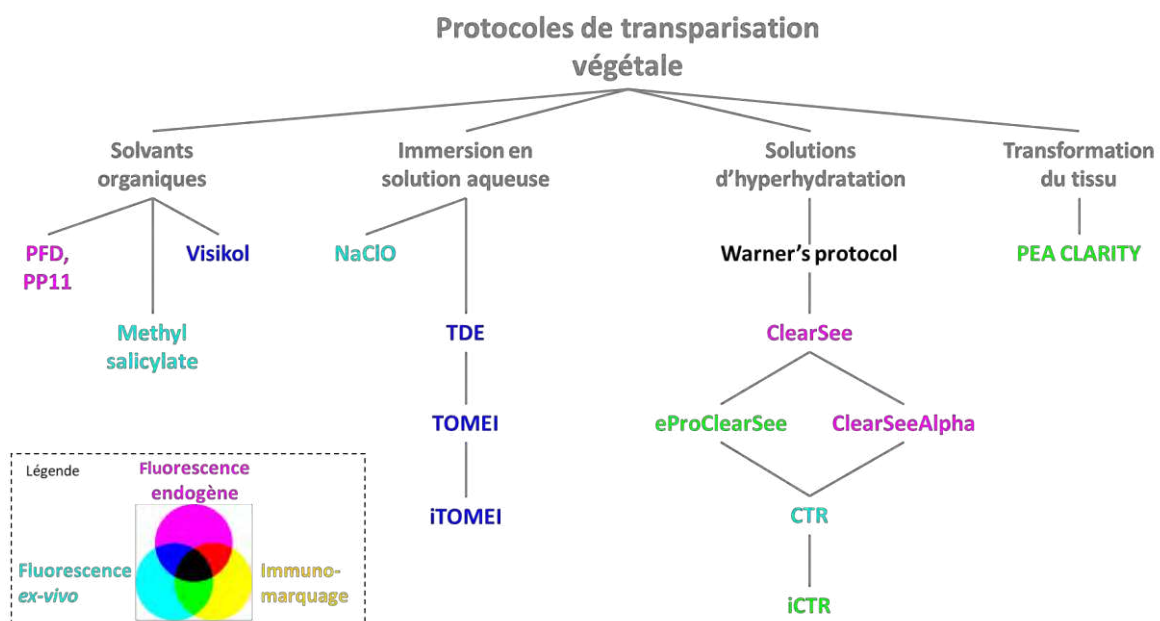


Figure 5 : Classification des protocoles de transpiration appliqués sur tissus végétaux, selon la classification en vigueur pour les protocoles de transpiration pour animaux (Silvestri, 2016 ; Matryba et al., 2019), implémentée des techniques de marquages fluorescents testés et validés. *BABB* : Benzyl Benzoate/Benzyl Alcohol, *TDE* : 2,2'-thiodiethanol, *SeeDB* : See Deep Brain, *PeaCLARITY* : CLARITY assisté par enzymes végétales, *eProClearsee* : enzymes 2-Propanol ClearSee, *CTR* : Clearing Tannic Root (Adapté de Hériché et al., 2022), *iCTR* : immunostaining of cleared tannic root (non publié, ce document).

I.4. La transparisation racinaire

Jusqu'ici, les PT permettant l'acquisition d'un signal fluorescent et appliqués sur racines de plantes ne concernaient que des racines très fines et non pigmentées. De plus, ils étaient transposés aux racines alors que développés sur organes chlorophylliens. Il était donc pertinent de développer un PT racinaire afin d'approfondir les connaissances concernant la répartition tridimensionnelle du CMA à l'intérieur de la racine mycorhizée. Dans un premier temps, l'optimisation a été réalisée sur racine blanche de *M. truncatula*, puis le protocole a été adapté sur racines ligneuse et tanniques de vigne.

I.4.1 Protocole de transparisation de racine blanche mycorhizée

- **Culture plante modèle : *M. truncatula***

Après un bain de javel à 3,5% pendant 8 min, les graines de *M. truncatula* J39 sont rincées à l'eau froide, scarifiées et mises 3 jours à l'obscurité à 26°C sur un filtre Whatman mouillé. Après germination, les semis ont été plantés dans un sachet en nylon rempli de substrat inorganique (sable/zéolithe v/v 1:1) et mis dans un pot contenant le même substrat et un poireau mycorhizé âgé de 3 semaines. Ensuite, les plantes ont été inoculées par une solution contenant 200spores/mL de *Rhizophagus irregularis* (*R. irregularis*) DAOM197198. Ils ont poussé en chambre climatique pendant 3 à 4 semaines. Chaque semaine, 10mL de solution nutritive (Hoagland modifiée : H₃BO₃ (45,3μM), MnSO₄.H₂O (14,1μM), CuSO₄.5H₂O (0,4μM), ZnSO₄.7H₂O (0,77μM), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,08μM), H₂SO₄ 0,0005%, Na₂EDTA.2H₂O (0,1mM), FeSO₄.7H₂O (0,1mM), Ca(NO₃)₂.4H₂O (3,8mM), MgSO₄.7H₂O₂ (2,03mM), KNO₃ (6,53mM), **NH₄H₂PO₄ (0,1mM)**) est appliquée par plante jusqu'à la récolte. Après 2 semaines de croissance, les plantes sont réinoculées comme précédemment.

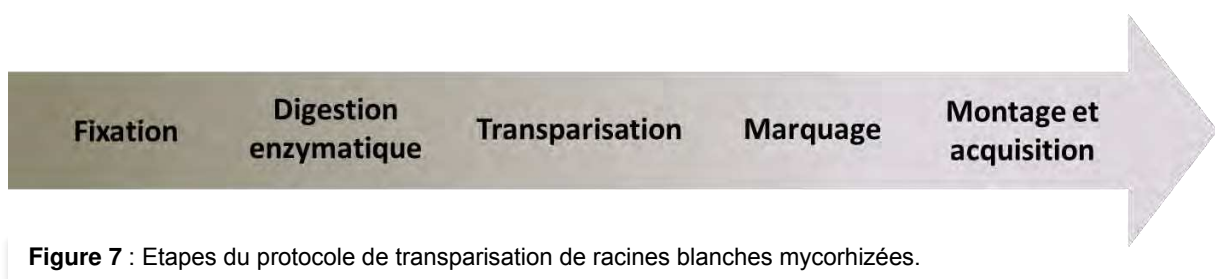
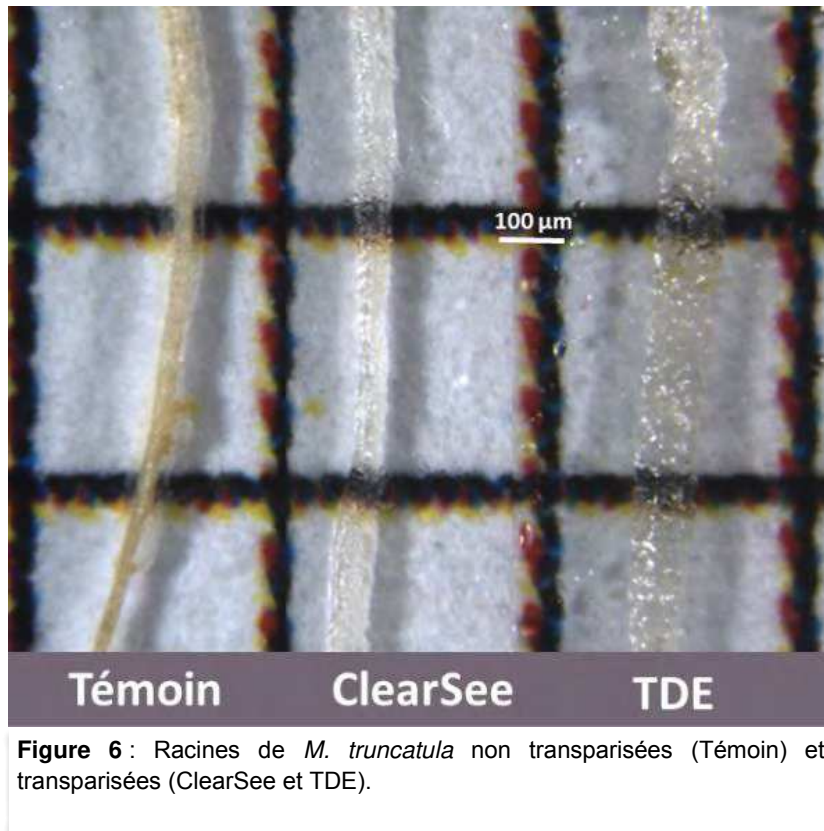
- **Protocole de transparisation de racine blanche de *M. truncatula***

Après 2 mois de culture en chambre climatique le système racinaire des plants de *M. truncatula* est récolté. Les racines sont soigneusement nettoyées et coupées à la lame de rasoir en tronçons entre 1 et 1,5cm de long. Ces tronçons de racines sont ensuite immergés dans une solution de fixation (Paraformaldéhyde 4%, DMSO 5%, dans du tampon PME (50mM Pipes, 5mM MgSO₄, 10mM acide egtazique (EGTA), pH 6,9)), passés sous vide 5 min et incubés 1 nuit sous agitation (70rpm) à 4°C. Le lendemain les échantillons sont lavés 3 fois avec du tampon PME, puis incubés 30 min avec agitation dans une solution de 50 mM NH₄Cl dans du PME après un passage sous vide à température ambiante (T°C ambiante) afin de bloquer les fonctions aldéhydes libres du fixateur et limiter l'autofluorescence lors de l'observation.

La digestion enzymatique des racines (Nagaki et al., 2017) permet de perméabiliser les tissus et de rendre accessible les composés cellulaires pour les marqueurs fluorescents. De ce fait, les échantillons sont ensuite rincés 3 fois dans des bains successifs de PME, 2 bains successifs de Pipes 0,1M pH 5,5 et

incubés dans ce dernier tampon 1 h à T°C ambiante avec agitation (70rpm). Puis, les échantillons sont incubés dans une solution de 1% cellulase RS (Duchefa Biochimie), 0,1% pectolyase Y23 (Duchefa Biochimie) à 37°C dans du tampon Pipes 0,1M pH 5,5 pendant 1 h. Ils sont lavés 1 fois dans un bain de Pipes puis 3 fois par du PBS pH 7,2 à T°C ambiante et laissé sur la nuit dans du PBS à 4°C. Il est important de noter que selon le substrat utilisé lors de la culture des plantes le temps de digestion enzymatique varie. Pour cause, si le substrat est moins compact que du sable/zéolithe, comme par exemple un mélange de billes d'argile/attapulgite, les racines seront moins résistantes et demanderons un temps de digestion plus cours afin d'éviter une perte d'intégrité de la structure racinaire (observations personnelles).

Pour l'étape de la transparisation *sensu stricto*, nos critères étaient (i) la compatibilité de l'AT avec un marquage fluorescent, (ii) sa non toxicité (AT aqueux) et (iii) son efficacité sur des organes végétaux autres que les racines. Ainsi, nous avons sélectionné deux AT : le TDE (Hasegawa et al., 2016) et le ClearSee (xylitol 10% (m/v); sodium deoxycholate 15% (w/v) et urée à 25% (m/v) dissouts dans de l'eau ultrapure (Kurihara et al., 2015)). Bien que la TDE 70% est à première vue ([Figure 6](#)) plus efficace pour transparer les racines de *M. truncatula*, ceci n'est pas vérifié lors de l'observation au microscope confocal. En effet, au fil des expérimentations, nous n'avons pas noté de différence significative entre ces deux AT. Toutefois, on remarque que le TDE est plus facile à préparer (simple dilution) et à conserver (le ClearSee cristallise et autofluoresce au contact de l'air ce qui peut limiter les contenants d'immersion et le temps d'acquisition). Les racines sont donc lavées 1 fois par une solution de TDE et incubées dans un gros volume de cette même solution pendant 3 semaines. Ensuite, les échantillons sont lavés pendant 2 heures dans du PBS, avec un changement de solution toutes les heures avant d'être marqués par du WGA-Alexa 0,1mg/mL dans du PBS à T°C ambiante pendant 1 h avec agitation. Après 3 rinçages PBS successifs, les échantillons sont remis à incuber dans du TDE après un passage sous vide, pendant 24 h. Résumé des étapes de ce PT en [Figure 7](#).



Deux fluorochromes différents, couplés au WGA, ont été testés pour le même marquage afin d'être en mesure d'adapter l'excitation et l'émission du fluorochrome associé au marquage de la chitine en fonction des autres marqueurs fluorescents et éviter ainsi les chevauchements de spectres. Les deux marqueurs fluorescents fonctionnent (Figure 8). Toutefois, on préférera l'AlexaFluor488 en tant que contre marquage car son émission correspond à l'autofluorescence des tissus dans le vert (Figure 9).

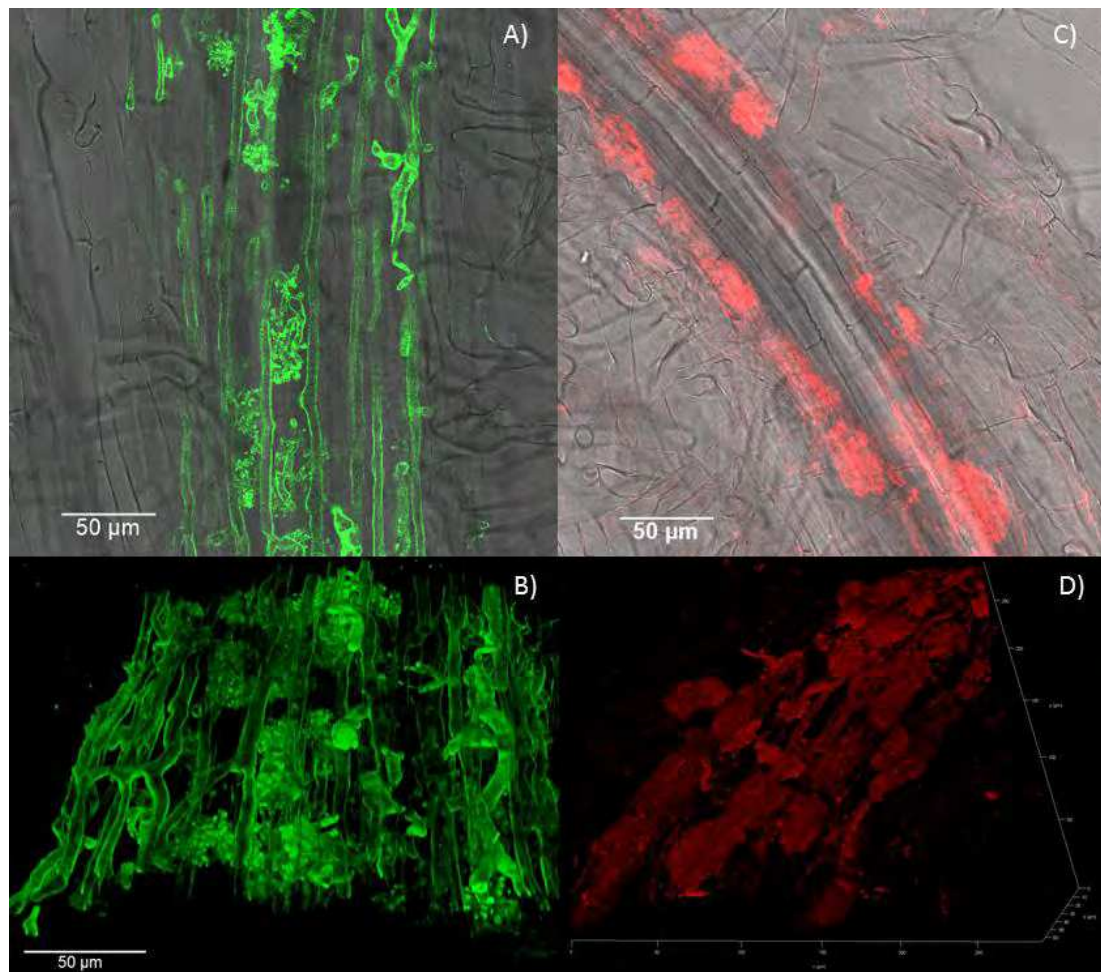


Figure 8 : Racines de *Medicago truncatula* mycorhizées (*Rhizophagus irregularis*), transparaissées en ClearSee, imagées au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x20). Marquage **WGA-Alexa488** (A, B ; λ_{ex} 488nm, λ_{em} 500nm-560nm) et **WGA-Alexa633** (C, D ; λ_{ex} 638nm, λ_{em} 600nm-700nm). Superposition fluorescence et lumière transmise (A, C), reconstitution 3D du signal fluorescent (B, D).

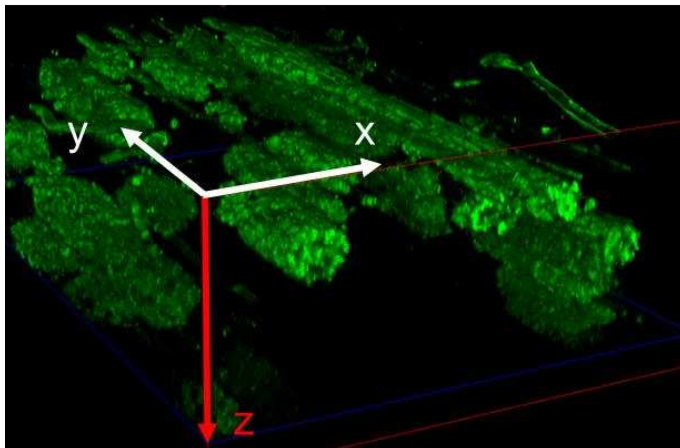


Figure 9 : Racine de *Medicago truncatula* mycorhizée, transparisée en TDE, imagée au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x20). Marquage **WGA-Alexa488** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 500nm-560nm). Acquisition d'image xyz, reconstitution 3D via LasX. Z = 70 μ m.

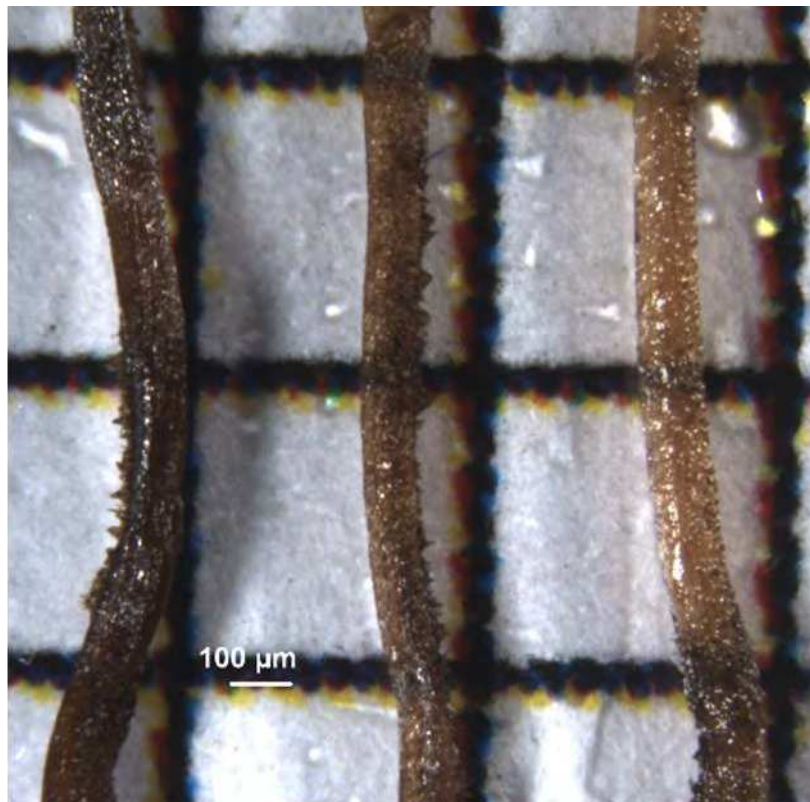
1.4.2. Protocole de transparisation de racines tanniques mycorhizées

- **Culture de la plante d'intérêt : porte greffe**

Trois porte-greffes de vigne (SO4, Riparia et Berlandieri) issus de culture *in vitro* (5 semaines en milieu Cown, préparés par Valérie Monfort-Pimet) sont acclimatés pendant un mois en pots individuels dans du substrat inorganique (sable/zéolithe 1:1). Ensuite, un poireau mycorhizé âgé de 3 semaines (fournit par Nouredine El-Mjiyad) est ajouté et chaque plant est inoculé par 1mL d'une solution contenant 200 spores/mL de *R. irregularis* DAOM197198. Les plantes sont cultivées en serre, chaque semaine elles reçoivent 10mL de solution nutritive (Hoagland modifiée : $[\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4] = 0,1\text{mM}$) jusqu'à la récolte.

- **Protocole de transparisation de racine pigmentée de vigne**

Dans un premier temps, le PT développé sur *M. truncatula* a directement été appliqué sur racines de vigne. Bien que, là encore, le TDE semble plus efficace que le ClearSee (Figure 10), la transparisation est insuffisante pour permettre une acquisition en microscopie à fluorescence. Aussi, une étape de dépigmentation est nécessaire.



Témoin

ClearSee

TDE

Figure 10 : Racines de vigne non transparisées (témoin) et transparisées selon le protocole de transparisation sur racine blanche mycorhizée (ClearSee et TDE).

Dans un premier temps, le Quadrol (N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylenediamine) a été testé car décrit dans la littérature comme agent décolorant sur les tissus animaux et notamment les os (Greenbaum et al., 2017; Tainaka et al., 2014). Mais, même supplémenté en ammoniacque (NH₄OH 5%), les racines restent pigmentées après plusieurs heures d'incubation. L'H₂O₂ a déjà été appliqué sur racines pigmentées pour la microscopie photonique classique (Gardner, 1975), et c'est sur poisson zébre (*Danio rerio*) qu'il a été utilisé en imagerie 3D (Affaticati et al., 2018). Nous avons basé sur ce dernier protocole la dépigmentation des racines de vigne. Après fixation et blocage au NH₄Cl comme précédemment, les racines sont lavées 1 nuit dans une solution de PBST (PBS pH 7,3, 0,1% Tween®20) puis incubées 1h dans une solution de 0,5 x SSC (150mM NaCl, 15mM citrate de sodium, pH 7.2) 0,1% Tween®20. Ensuite, elles sont placées dans la solution de dépigmentation (5% formamide, 0,5x SSC, 3% H₂O₂) à T°C ambiante, avec agitation et lumière, jusqu'à complète dépigmentation. Ici, le temps de dépigmentation pour les trois porte-greffes est d'environ 1h30. Il est possible d'augmenter la concentration d'H₂O₂ pour accélérer le processus. Les échantillons sont ensuite lavés pendant 2 h dans des bains successifs de PBST puis pendant 1 nuit dans du PBS. Les étapes suivantes de digestion enzymatique et de transparisation, appliquées sur *M. truncatula* sont conservées (Figure 11). Bien que la transparence de ces racines soit bien meilleure que précédemment, le niveau de transparence n'est pas encore celui atteint sur les racines de *M. truncatula*.

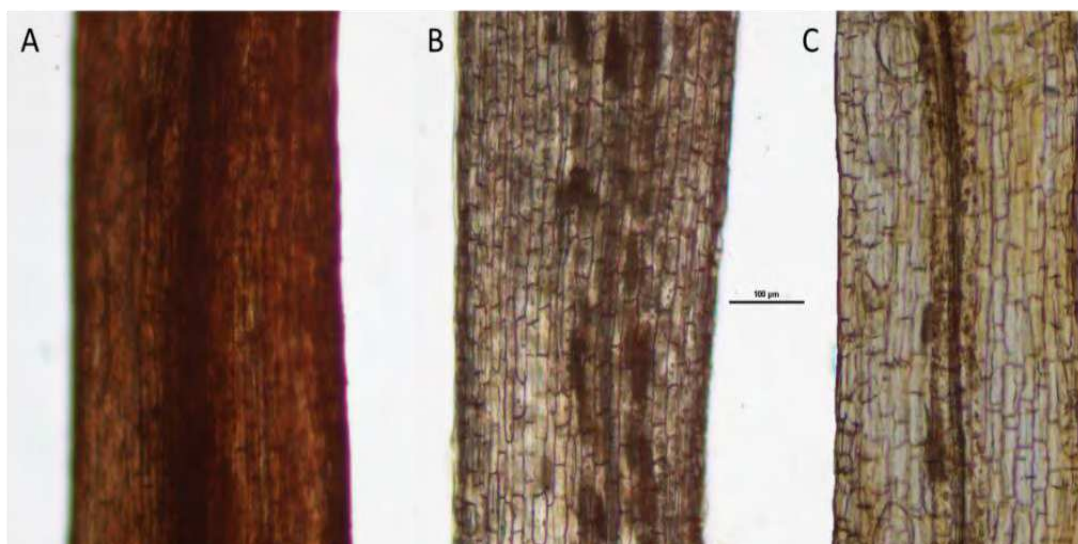
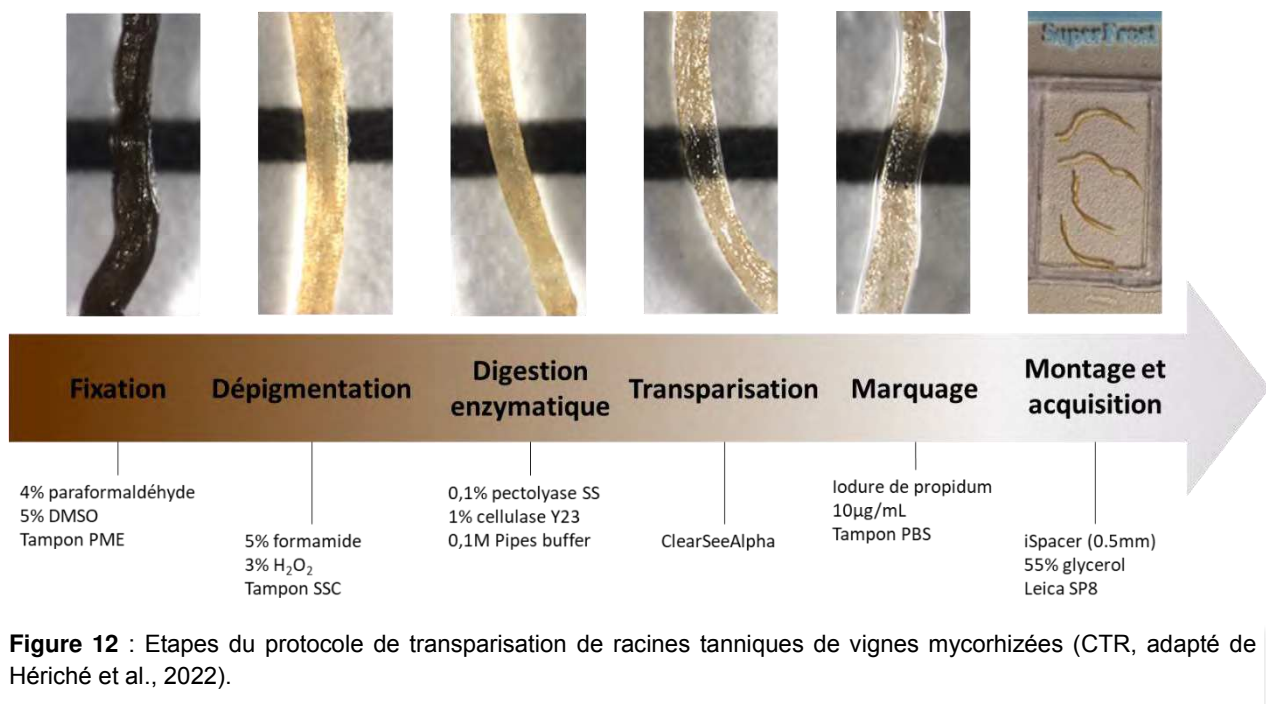


Figure 11 : Racines de vigne après fixation (A), après dépigmentation (B) et après transparisation TDE (C). Barre d'échelle = 100µm.

Quelques temps plus tard, Kurihara et ses collaborateurs (2021) publient une optimisation de leur AT : le ClearSeeAlpha. Dans cette mise à jour, un réducteur (sulfite de sodium 50mM) est ajouté à l'initial ClearSee pour éviter la pigmentation brune due à l'oxydation des polyphénols ce qui m'a permis d'atteindre un meilleur niveau de transparence sur les racines de vigne qu'avec les précédents AT (Figure 12). Dans un premier temps, pour valider ce PT avec marqueurs fluorescents, j'ai utilisé de l'iodure de propidium (IP, 10µg/mL dans du PBS 45min avec agitation 70rpm à T°C ambiante) pour colorer les noyaux des racines (Figure 13). Dans un second temps, j'ai marqué la chitine du champignon au WGA-Alexa488 (0,1mg/ml dans du PBS, 1h30 avec agitation 70rpm à T°C ambiante, (Figure 14). Dans les deux cas, après marquage les échantillons sont rincés pendant minimum 2h dans des bains successifs de PBS, puis ils sont remis à incubés dans du ClearSeeAlpha après un passage sous vide, entre 12 et 24 h. Le jour de l'acquisition les échantillons sont montés entre lame et lamelle avec un espaceur (iSpacer Sunjilab 0,5mm) avec du ClearSeeAlpha comme milieu de montage. Pour l'immersion, une solution de Glycérol 55% est utilisée afin de faire correspondre au mieux les indices de réfraction le long du chemin optique (Figure 12).



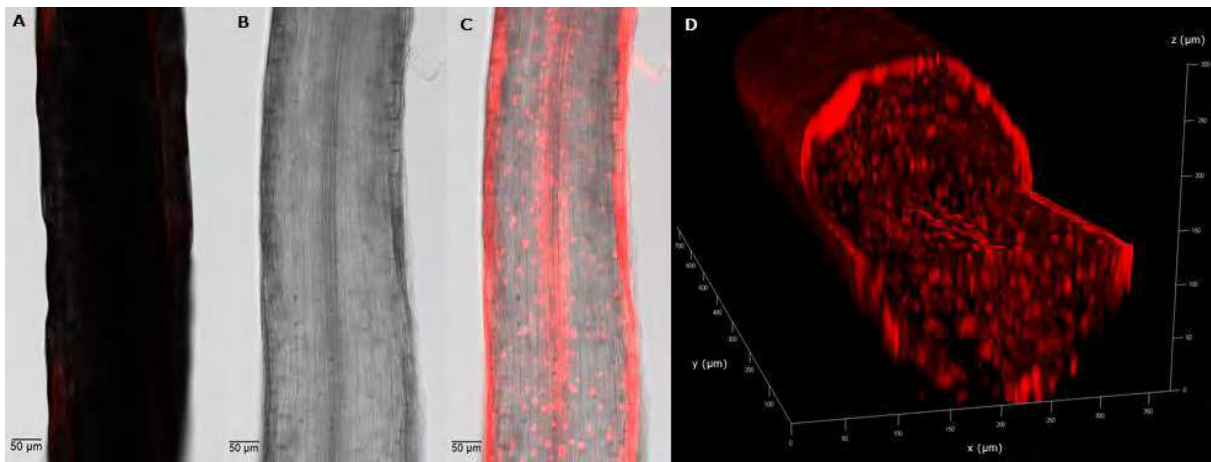


Figure 13 : Racines de SO4, marquées à l'**iodure de propidium (IP)**, imagées au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16 à immersion glycérol 55%, λ_{ex} 552nm, λ_{em} 589nm - 653nm). Superposition de la lumière transmise et du signal IP d'une racine non transpirée (A), de la lumière transmise d'une racine transpirée (B), et avec superposition du signal IP (C) à une profondeur de 130 μ m (axe z). La reconstruction 3D du signal IP (D) correspond à l'image C (LasX). Le marquage à l'IP est clairement enregistré sur toute l'épaisseur de la racine (250 μ m).

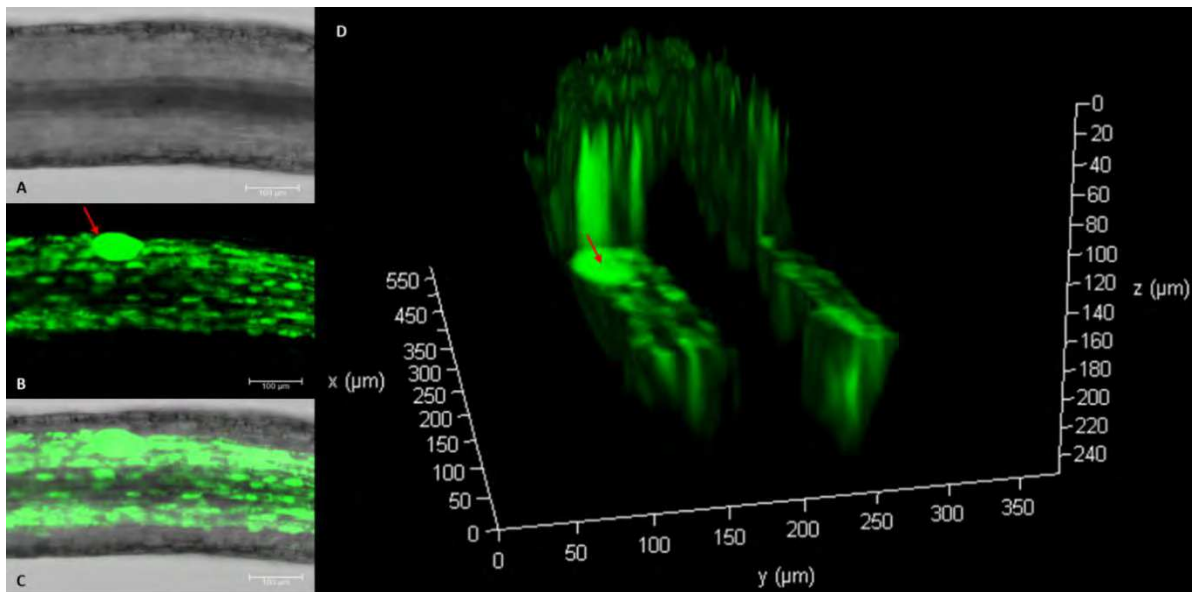


Figure 14 : Racine de Riparia, marquée au **WGA-Alexa488**, imagée au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x16, objectif à immersion glycérol 55%, longueur d'onde λ_{ex} 488nm, λ_{em} 501nm - 543nm). Lumière transmise (A), signal WGA Alexa488 (B) et superposition des deux (C) à une profondeur de 90 μ m (axe z). La reconstruction 3D du signal WGA Alexa488 (D) correspond à l'image B. Le marquage WGA Alexa488 est clairement enregistré sur toute l'épaisseur de la racine (240 μ m). Vésicule indiquée par la flèche rouge.

I.5. Perspectives

Ce protocole de transparense innovant sur racine pigmentée permet l'acquisition en 3D d'un marqueur fluorescent sans destruction mécanique du tissu et a fait l'objet d'une publication en 2021 (Hériché et al., 2021). Par ailleurs, bien que ce PT n'emploie pas de solvant organique, les traitements chimiques modifient la composition du tissu (ex. digestion enzymatique des parois cellulaires, utilisation de détergent qui peuvent impacter le contenu lipidique du tissu). Par ailleurs, dans la littérature, les pertes engendrées par ce type de procédés, surtout sur tissus végétaux ne sont pas assez documentés. De ce fait, des analyses de micromorphologie sur échantillons transparentés en microscopie électronique à transmission sont prévues.

Par ailleurs ce PT pourrait s'avérer particulièrement utile pour l'imagerie d'autre symbiose mycorhizienne, comme l'ectomycorhize, qui concerne en majorité des plantes pérennes aux racines pigmentées. Aussi il pourrait être utilisé dans des études comparatives afin de déterminer (i) si un même champignon mycorhizien présente la même morphologie dans une racine de plante annuelle, que dans une racine de plante pérenne, (ii) l'impact des cycles végétatifs des plantes pérennes sur le champignon mycorhizien, et (iii) l'évolution morphologique de la colonisation racinaire dans le cadre d'un réseau mycélien restreint (ex. deux plantes en microcosmes connectées par un même champignon et subissant des stress différents). Ces perspectives pourraient mettre en lumière des mécanismes encore inconnus aujourd'hui.

Chapitre II : Transporteurs de phosphate en ligne de mire

II.1. Introduction : le phosphate dans la symbiose mycorhizienne

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance des plantes, mais la majeure partie du P du sol n'est pas disponible pour les racines des plantes car lié sous forme de molécules organiques ou minérales. Les plantes ne peuvent absorber que du phosphate inorganique (P_i , $H_2PO_4^-$), dans le sol à proximité de leurs racines. Cette absorption du P_i par les poils absorbants des racines est permise par des transporteurs de phosphate (Phosphate transporter, Pht) exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules du rhizoderme (voir la voie directe, [Figure 15](#)). Bien que le P soit abondant dans la plupart des sols, il est souvent limitant pour la croissance de la vigne à cause de sa faible disponibilité. Pour cause, le P a une grande affinité pour les cations du sol (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Al^{3+}) avec lesquels il forme des complexes minéraux insolubles et est également transformés en forme organique par les micro-organismes du sol, ce qui entrave considérablement sa mobilité. De ce fait, les racines sont rapidement confrontées à son épuisement. Pour pallier à cette déplétion, les plantes ont acquis, au cours de l'évolution, différentes stratégies telles que l'augmentation du nombre de racines fines, de la taille des poils absorbants ou encore la sécrétion d'acide organique et de phosphatase dans le but de solubiliser le P présent dans le sol. Toutefois, ces stratégies restent limitées. En agriculture conventionnelle, cet épuisement est compensé par l'apport d'engrais chimiques. Cependant, les plantes mycorhizées peuvent prélever le P_i du sol par la voie directe, citée précédemment, mais également par la voie mycorhizienne d'absorption du phosphate (MAP, Wipf et al., 2019). La voie MAP peut améliorer la nutrition en P des plantes en étendant considérablement le volume de sol exploré grâce aux hyphes fongiques, qui, plus longs que les racines de la plante hôte, permettent le prélèvement du P_i au-delà de la zone de déplétion (Ferrol et al., 2019; Giovannetti et al., 2001). De plus, les hyphes extra-radicaux des CMA sont impliqués dans la mobilisation des formes de P organiques, augmentant la ressource en P pour la plante hôte. Après translocation du P, sous forme de polyphosphate, des hyphes extraradicaux à l'arbuscule via les vacuoles (Hijikata et al., 2010), le P_i est transféré vers l'interface symbiotique, ou espace périarbusculaire. Ensuite ce P_i est transféré à travers la membrane périarbusculaire grâce à des Pht spécifiques pour la translocation du P_i de l'espace périarbusculaire vers le cytoplasme de la cellule végétale (Ferrol et al., 2019; Harrison, 2012) ([Figure 15](#)).

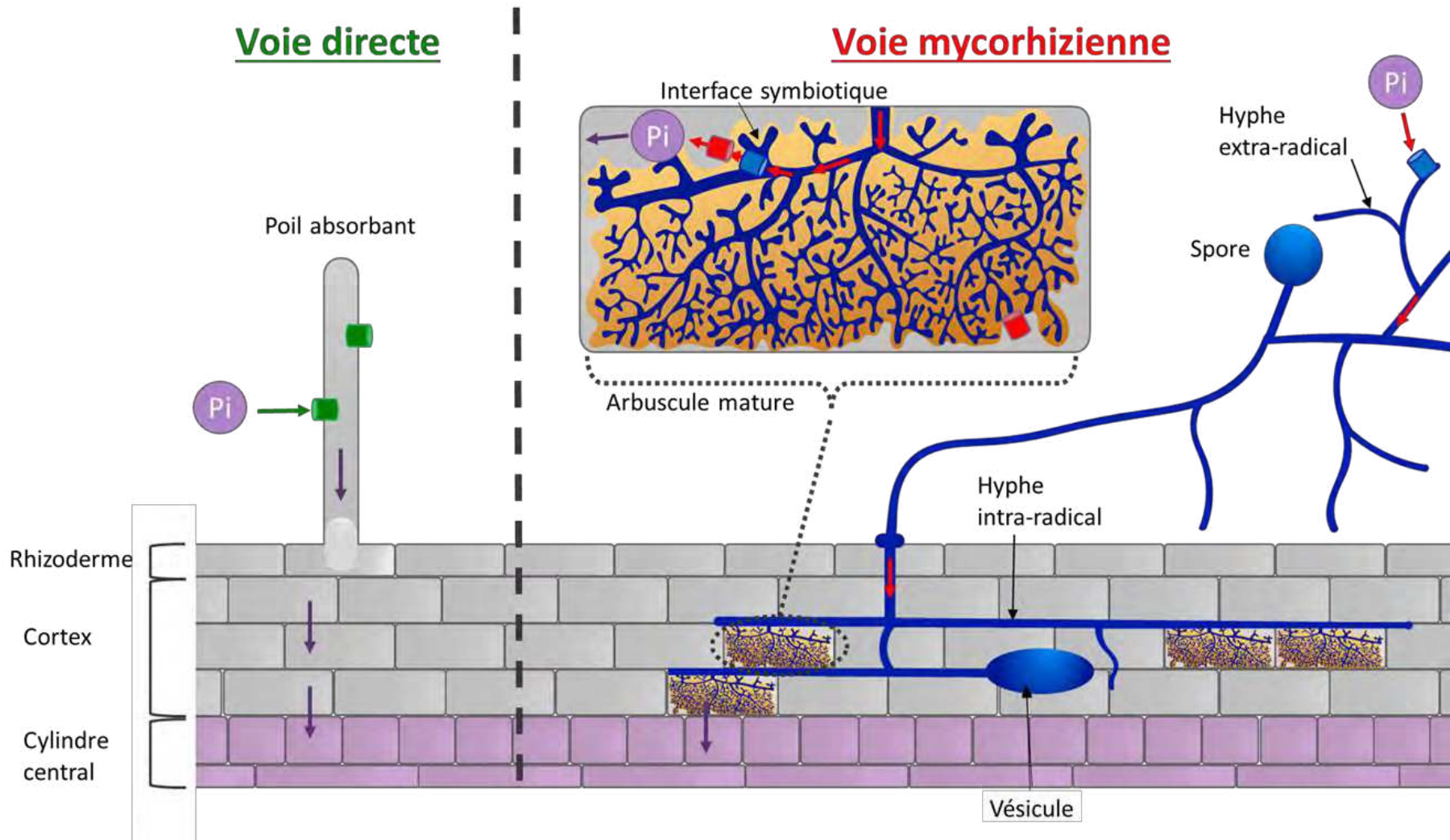


Figure 15 : Voies d'absorption du phosphate inorganique (Pi) dans une racine de plante supérieure colonisée par un CMA. Les cylindres sont une représentation schématique des transporteurs de phosphate membranaires, en rouge les transporteurs de Pi exprimés au niveau de la membrane périarbusculaire de la plante hôte. Les flèches représentent le déplacement du Pi.

Les transporteurs de phosphates de la plante sont classés en 5 sous familles. Les transporteurs de la sous famille des PHT1 sont pour la grande majorité exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires et impliqués dans le transport du Pi à partir de la rhizosphère. Les transporteurs des autres sous familles, de PHT2 à PHT5, sont impliqués dans la distribution du P dans la plante, c'est-à-dire dans la translocation du P entre organes et entre compartiments cellulaires (Wang et al., 2017). La sous famille des PHT1 regroupe les Pht de la voie directe et de la voie mycorhizienne. Lors de la SMA plusieurs gènes de cette sous famille sont transcriptionnellement induits (Harrison et al., 2010; Karandashov et Bucher, 2005; Yang et Paszkowski, 2011) et les autres membres de cette famille ont des rôles importants dans les mécanismes de la SMA (Javot et al., 2007; Xie et al., 2013; Yang et al., 2012). L'analyse phylogénétique de ces gènes a permis de mettre en évidence un sous-groupe de gènes (le sous-groupe 2) impliqués dans la voie mycorhizienne. Ainsi, les premiers Pht inductibles par la SMA ont été identifiés chez la pomme de terre (StPT4, (Rausch et al., 2001)), le riz (OsPT11, (Paszkowski et al., 2002)) et *M. truncatula* (MtPT4, (Harrison et al., 2002)). Ces Pht, et leurs orthologues découverts par la suite sont des transporteurs de faible affinité. Dans cette sous famille, on trouve également des Pht de haute affinité dont l'expression, bien que constitutive, est significativement augmentée dans les racines mycorhizées (Nagy et al., 2005). Ces transporteurs sont donc des marqueurs intéressants pour étudier le fonctionnement des SMA.

L'un des marqueurs fonctionnels de la SMA le plus étudié dans la littérature est le transporteur MtPT4. D'abord décrit comme inductible par la SMA et localisé à la membrane périarbusculaire (Harrison et al., 2002), il s'est révélé être exprimé également au niveau des apex racinaires de racines non mycorhizées (Volpe et al., 2013). Aussi, la perte de ce transporteur n'empêche pas la colonisation par le CMA, mais entraîne une dégénérescence arbusculaire précoce (au bout de 48h après l'entrée du CMA dans la racine) (Javot et al., 2007). Ce qui souligne, l'importance de ce transporteur, non dans la mise en place de la symbiose, mais dans son maintien et dans la morphogenèse arbusculaire (Javot et al., 2011). Par ailleurs, cette régulation s'avère en lien étroit avec le transport de N (Volpe et al., 2016). Deux orthologues de MtPT4 ont été identifiés chez la vigne VvPht1-1 et VvPht1-2, sur le même chromosome et avec une grande homologie de séquence, laissant suggérer une duplication en tandem. Ces deux transporteurs semblent surexprimés en condition mycorhizée (Valat et al., 2018).

Un autre marqueur fonctionnel de la SMA chez *M. truncatula*, dans le même sous-groupe que MtPT4, est MtPT8. Ce transporteur, également exprimé à la membrane périarbusculaire, est strictement induit lors de la mycorhization et contrairement à MPT4, n'est pas nécessaire à son maintien. Toutefois, la présence d'orthologues de MtPT8 chez les dicotylédones suggèrent que la fonction de ce gène a été conservée au cours de l'évolution, et que cette duplication est relativement récente, puisque non présent chez les monocotylédones (Breuillin-Sessoms et al., 2015).

Bien qu'un grand nombre de Pht1 induits par la SMA ait été identifié et caractérisé aujourd'hui, très peu ont été étudiés dans des plantes ligneuses (eucalyptus (Che et al., 2022), peuplier (Chen et al., 2017; Loth-Pereda et al., 2011)). Dans ce contexte, nous avons entrepris une analyse phylogénétique et d'expression des Pht1 de la vigne, afin de (i) mettre en évidence les Pht1 induits par la SMA, (ii) étudier leur régulation dans différentes conditions biotiques (par exemple, différentes concentrations de Pi), et (iii) analyser leur distribution spatiale dans les arbuscules en utilisant l'imagerie confocale de fluorescence.

II.2. Approche biomoléculaire des transporteurs de phosphate (Pht) de vigne

II.2.1. Identification des transporteurs de phosphate et analyse phylogénétique

Une analyse bio-informatique, par homologie de séquence, a été réalisée afin d'identifier l'ensemble des Pht présents dans les génomes de *Vitis riparia* et *Vitis vinifera*. Nous avons recherché ces transporteurs sur les bases de données de Phytozome et KEGG par TBlastN en utilisant les Pht de *M. truncatula* comme référence. La base de données KEGG (version 2.1 du génome de *V. vinifera*, version 1.1 de *V. riparia*), plus précise, nous a permis d'isoler 8 séquences de Pht1 dans le génome de *V. vinifera* et 7 dans le génome de *V. riparia*. Au vu des similitudes entre les transporteurs identifiés et le recul de la communauté concernant le génome de *V. vinifera*, nous avons poursuivi l'étude sur les séquences issues de ce dernier (Tableau 1).

Nom putatif	ID gène	Taille séquence (nt)	Position chromosomique	ID NCBI protéine	ID uniprot	Taille protéine (aa)
VvPT1	100263056	1617	chr5: 7922261..7924726 forward	XP_010650086	F6H8P7	538
VrPht1.1	117913984	1617	chr5: 7630117..7632317 forward	XP_034685021	/	538
VvPT2	100245922	1614	chr5: 7929418..7933380 forward	XP_002281264	/	537
VvPT3	100257925	1611	chr5: 7949447..7952985 forward	XP_019075709 XP_002285153	A0A438HQS5 F6H8P9	536
VrPht1.3	117914724	1611	chr5: 7660966..7664488 forward	XP_034686069 XP_034686070	A0A438HQS5 F6H8P9	536
VvPT4	100253597	1554	chr16: 19309225..19310778 forward	XP_002267369	F6H6G5	517
VrPht1.4	117934202	1554	chr16: 20114825..20116538 forward	XP_034711736	/	517
VvPT5	100258742	1563	chr16: 19301911..19303473 forward	XP_002267327	A0A438DP02	520
VrPht1.5	117933392	1560	chr16: 20107547..20109344 forward	XP_034710648	/	519
VvPT6	100232948	1578	chr7: 6141468..6144515 forward	XP_002279070 XP_019076446	F6HZJ6	525
VrPHT1.6	117917873	1578	chr7: 24391572..24394586 reverse	XP_034690217	/	525
VvPT7	100251317	1623	chr18: 578825..582049 forward	XP_002274930	/	540
VrPht1.7	117906913	1623	chr18: 579615..582840 forward	XP_034690217	/	540
VvPT8	100255410	1608	chr13: 1809251..1810948 reverse	XP_002275526	A0A438J2K1 A5AL57	535
VrPht1.8	117928494	1608	chr13: 27579909..27581584 forward	XP_034704262	/	535
VvPT2.1	100247658	1725	/	XP_002271876	F6GZ13	574
VrPT2.1	117927548	1725	chr1: 7525064..7528726 forward	XP_034703363	/	1725

Tableau 1 : Identification des PHT1 chez *V. vinifera* et *V. riparia*. Numéros d'accension des gènes correspondant à la base de données KEGG et NCBI. Identifiant (ID), nucléotides (nt), acides aminés (aa). Noms basés sur la phylogénie suivante, les lignes en fond vert correspondent aux séquences protéiques de vigne présent dans l'arbre (Figure 16).

Un arbre phylogénétique a été construit pour les transporteurs de type Pht1 à partir de 157 séquences protéiques alignées (523 acides aminés). Pour l'analyse phylogénétique, les séquences d'acides aminés de Pht1 ont été alignées avec Clustal ω en utilisant les paramètres d'alignement multiple suivants : pénalité d'ouverture d'espace, 15 ; pénalité d'extension d'espace, 0,3 ; retard des séquences divergentes fixé à 25% ; la série de Gonnet a été choisie comme matrice de poids des protéines. Les branches de l'arbre ont été déterminées selon la méthode du Neighbor joining, en utilisant la matrice de taux de substitution Jones-Taylor-Thornton (JTT) pour le calcul de la distance dans MegaX (Kumar et al., 2018). Une analyse Bootstrap a été réalisée avec 500 répliques. Les longueurs des branches (dessinées dans la dimension horizontale uniquement) sont proportionnelles aux distances phylogénétiques. Les transporteurs Pht2 chloroplastiques servent de groupe d'ancrage (clade vert). La [Figure 16](#) est le résultat le plus probable de cette analyse informatique.

Trois Pht1 de *V. vinifera* sont regroupés dans le clade (rouge) comprenant tous les Pht1 induits ou très fortement surexprimés en condition de mycorhization. L'analyse plus poussée des séquences codantes pour les 3 transporteurs de vigne présents dans ce groupe révèle une très forte similarité entre les séquences 100253597 et 100258742 (nommée respectivement VvPT4 et VvPT5) et une certaine proximité sur le chromosome 16 laissant supposer un évènement de duplication génique (Valat et al., 2018). La séquence 100255410 a quant à elle été nommée VvPT8 en raison de sa proximité dans l'arbre avec MtPT8.

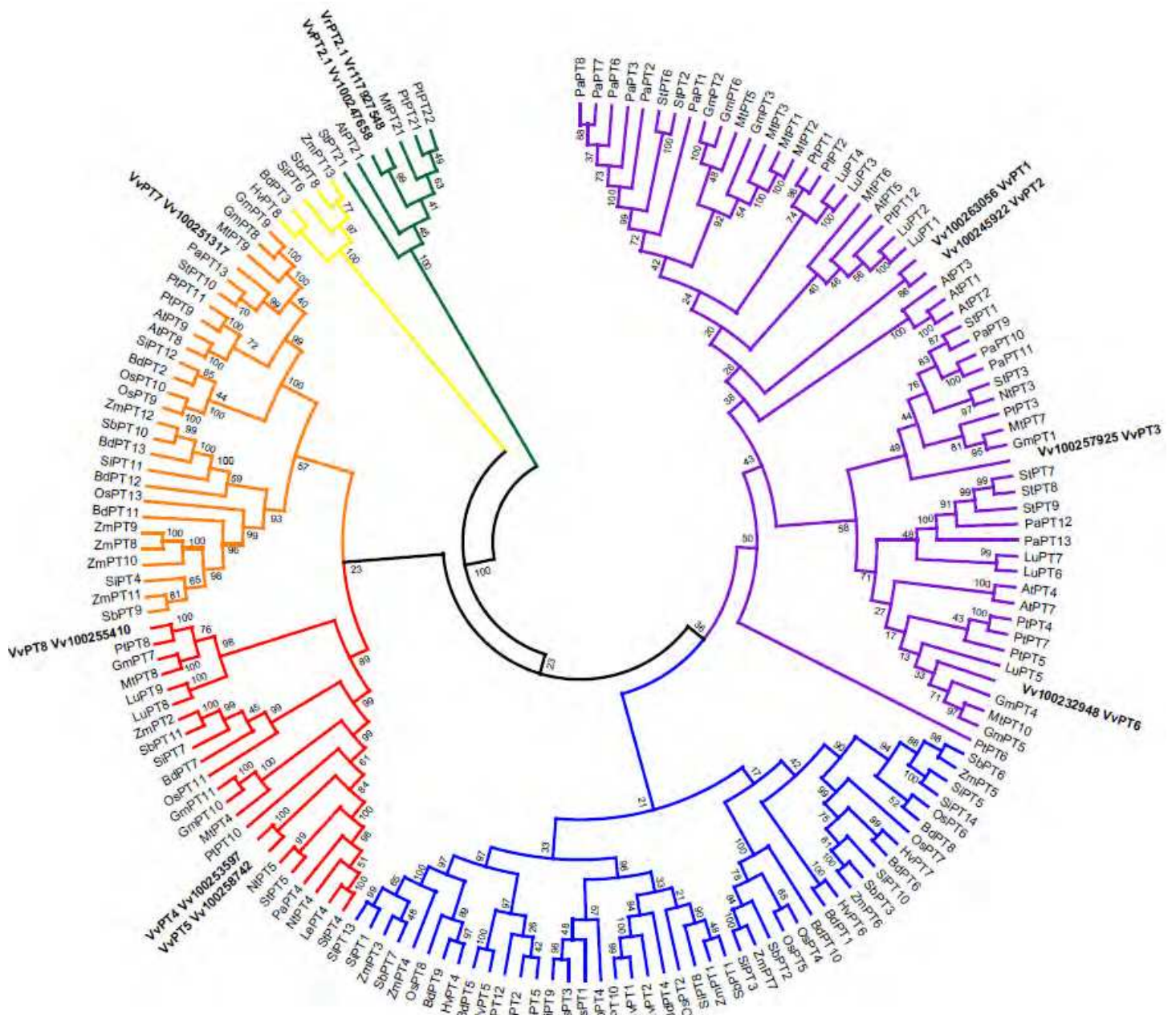


Figure 16 : Arbre phylogénétique des Pht1. Le clade rouge correspond au sous-groupe des PHT1 induits et fortement surexprimé en condition de SMA chez les monocotylédones et les dicotylédones. Le clade orange correspond au sous-groupe des PHT1 partiellement régulés par la SMA chez les monocotylédones et les dicotylédones. Le clade jaune correspond au sous-groupe des PHT1 partiellement régulés par la SMA chez les monocotylédones. Le clade bleu correspond au sous-groupe des PHT1 non inductibles par la SMA chez les monocotylédones. Le clade violet correspond au sous-groupe des PHT1 non inductibles par la SMA chez les dicotylédones. Les 10 transporteurs Pht1 de la vigne sont mis en évidence en noir gras. Les noms des séquences comprennent le code de l'espèce (première lettre du genre et première lettre du nom de l'espèce) et le nom du gène : *Arabidopsis thaliana* (At), *Brachypodium distachyon* (Bd), *Glycine max* (Gm), *Hordeum vulgare* (Hv), *Linum usitatissimum* (Lu), *Medicago truncatula* (Mt), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Oryza sativa* (Os), *Petunia axillaris* (Pa), *Populus trichocarpa* (Pt), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Setaria italica* (Si), *Sorghum bicolor* (Sb), *Solanum tuberosum* (St), *Vitis vinifera* (Vv), *Vitis riparia* (Vr).

II.2.2. Etude ciblée de séquençage ARN

- **Culture des plants de *Riparia***

Des plants de *Riparia* issus de culture *in vitro* (6 semaines en milieu Cown, préparés par Valérie Monfort-Pimet), sont acclimatés pendant un mois en pots individuels de 1L dans du substrat inorganique (sable/zéolithe 1:1). Les plantules ont été inoculées 3 fois (*R. irregularis* DAOM197198, 200spores/mL, 1mL) à deux semaines d'intervalle et « assistés » par des jeunes poireaux mycorhizés (fournit par Nouredine El-Mjiyad) pendant 2 semaines après la dernière inoculation (condition mycorhizée, M). Les contrôles non-mycorhizés (NM) ont été inoculés de la même manière mais avec de l'eau distillée. Pendant les 3 mois de culture, les plantes ont reçu 25mL de solution de Hoagland modifiée ($[\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4] = 0,1\text{mM}$) deux fois par semaine. Après 5 jours de rinçage intense à l'eau distillée, les plantes ont reçu 3 solutions nutritives Hoagland différentes (modifiées à **0,01mM**, **0,1mM** et **2mM** de **$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$** respectivement) 25mL deux fois par semaine, pendant 7 semaines. Afin d'appliquer la même concentration d'azote pour tous les traitements P, du NH_4Cl a été ajouté aux deux premières solutions afin d'atteindre la concentration de 2mM de NH_4 pour toutes.

- **Extraction d'ARN (réalisée par Antoine Sportes)**

L'extraction d'ARN totaux s'appuie sur le protocole de Reid et al. (2006) légèrement modifié. Les échantillons de racines de vignes mycorhizées et non-mycorhizées, récoltés et immédiatement congelés -80°C , sont ensuite lyophilisés et broyés. Le tampon d'extraction (Tris HCl (300mM), acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 25mM), NaCl (2M), polyvinylpolypyrrolidone (2% m/v), bromure de cetyltriméthylammonium (2% m/v), Spermidine trihydrochloride (0,05% m/v), β -mercaptoéthanol (2% m/v), acide aurintricarboxylique (1mM), terre de diatomée (1%)) préchauffé à 65°C est ajouté à raison de 2mL pour 100mg de poudre. Le mélange est homogénéisé au vortex puis incubé 12 à 15min à 65°C en vortexant régulièrement. Un volume de chloroforme/alcool isoamylique (AIA) (24:1 v/v) est ajouté. Puis, le tout est secoué vigoureusement pendant environ 30s. La solution est centrifugée à 3300g pendant 15min à 4°C . Une fois la phase aqueuse isolée, un volume de chloroforme/AIA (24:1 v/v) est ajouté. Les étapes d'agitation et de centrifugation sont répétées dans les mêmes conditions. De nouveau la phase la plus dense est jetée et à la phase aqueuse est ajouté 0,3 volume d'acétate de sodium (3M) froid et 0,6 volume d'isopropanol froid. Le mélange est stocké à -20°C pendant 1 à 2 h. Les acides nucléiques précipités sont centrifugés (20000g, 20min, 4°C), puis le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 300 μL de Tris EDTA chaud (les tubes toujours sur glace). Un volume de Chloroforme/ alcool isoamylique (24:1) est ajouté et les tubes sont vortexés et inversés vigoureusement pendant 30 secondes avant d'être centrifugés (11000g, 10min à 4°C). Le surnageant est récupéré et un volume de Chloroforme/ alcool isoamylique (24:1) y est ajouté. Puis l'étape de vortexage et de centrifugation précédente est répétée. Enfin, le surnageant est récupéré, 0,3 volume

de LiCl 8M froid est ajouté puis les échantillons sont stockés une nuit à 4°C. Le lendemain, la solution est centrifugée à 20000g pendant 30min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'éthanol 70% froid (-20°C). Après une centrifugation (20000g, 30min, 4°C), l'éthanol est jeté et le culot conservé sur glace est séché à l'air libre. Enfin ce culot est repris dans 25µL d'eau milliQ stérile et la suspension dosée au spectromètre Nanodrop 2000 (Thermo-Scientific).

- **Séquençage Illumina et analyse de données (réalisée par Antoine Sportes)**

Les échantillons d'ARN ont été séquencés par la plateforme GENEWIZ (Leipzig, Allemagne). Les transcrits bruts ont été rognés pour en vérifier la qualité et alignés sur les transcrits de référence de *Vitis vinifera* (Vvinifera_457_v2.1 transcrits primaires) de Phytozome v13 (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Vvinifera_2_1) en utilisant CLC Genomics Workbench v7. Pour la cartographie, le coût de Mésappariement/Insertion/Délétion était respectivement de 2/3/3, la fraction de longueur minimale était de 0,8, la fraction de similarité minimale de 0,8 et le nombre maximal de résultats pour une lecture était fixé à 10. Le nombre unique et total de transcrits mappés pour chaque transcrit de référence a été déterminé, puis normalisé en fonction du nombre total de transcrits. Les paires intactes ont été comptées comme deux ; les paires brisées comme une. Le fichier de comparaison original comprenait 55 665 transcrits annotées (source : Phytozome v13). Les gènes sont considérés comme étant biologiquement surexprimés si leur expression différentielle est supérieure à 2 comparée à la condition contrôle (fold change>2), avec une valeur p < 0,05, corrigée par FDR. Réciproquement, les gènes sont considérés sous-exprimés si leur expression différentielle est inférieure à 2 comparée à la condition contrôle (fold change<-2), selon les mêmes contraintes statistiques.

- **Données de séquençage ARN**

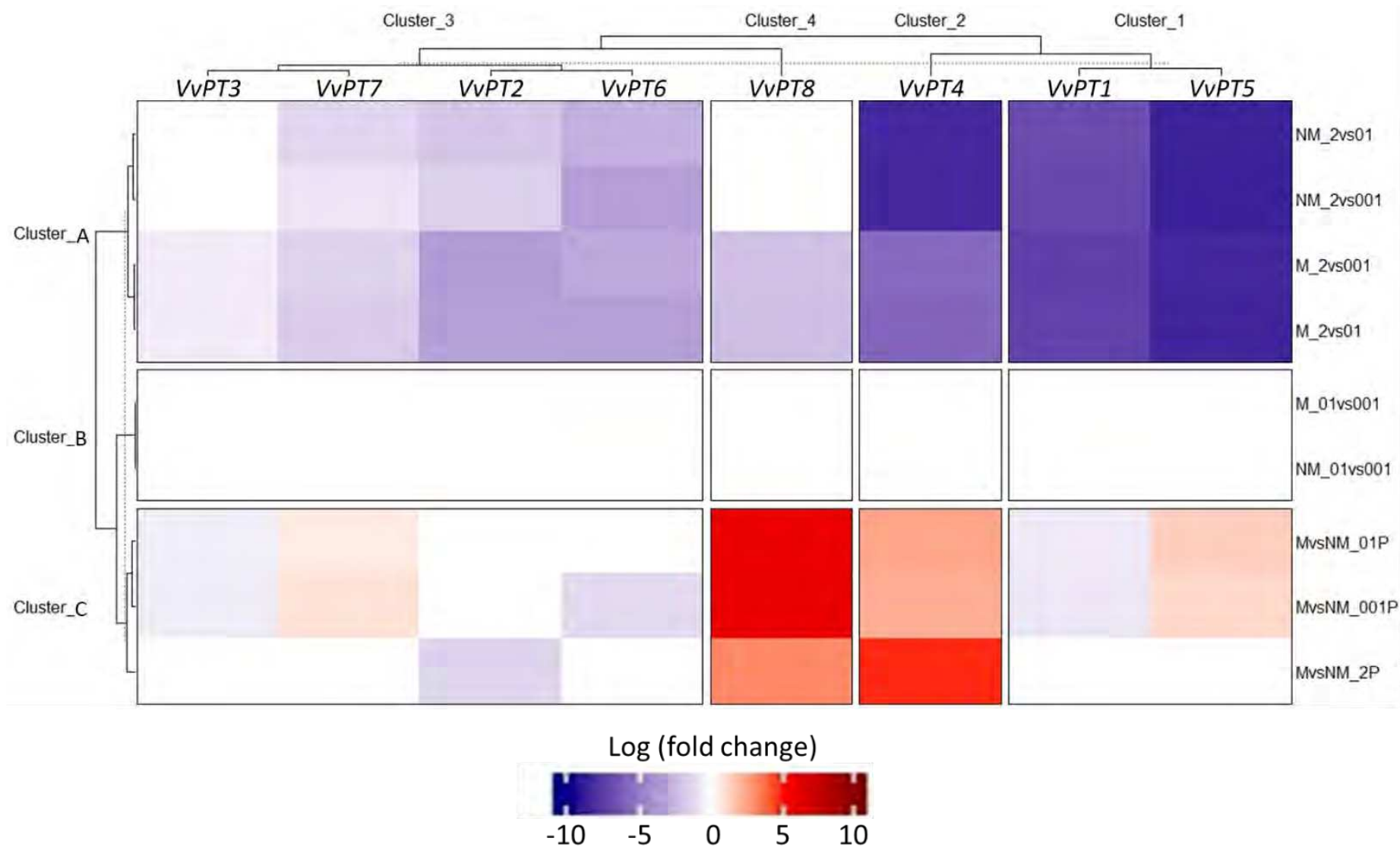


Figure 17 : Carte thermique des expressions différentielles des transporteurs de phosphate *Pht1* de la vigne en fonction de (i) la condition de mycorhization (Non mycorhizée, NM ; mycorhizée, M) et (ii) du traitement P (0,01mM, 0,1mM et 2mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Nuancier correspondant au logarithme de la variation d'expression (Log (fold change)).

Selon la [Figure 17](#), on constate au premier abord que les transcrits des gènes correspondant aux séquences protéiques des transporteurs supposés surexprimés en condition de mycorhization selon l'analyse phylogénique précédente (VvPT4, VvPT5 et VvPT8) présentent (i) des profils différents par rapport aux autres *Pht1* de vigne, avec des variations d'expression plus importante ; et (ii) des profils différents entre eux. Ce qui laisse présager une régulation spécifique des gènes de ces transporteurs, comme c'est le cas pour leurs homologues chez *M. truncatula* (*MtPT4* et *MtPT8*).

Que ce soit en condition M ou NM, la conditions 0,1mM de P ne fait pas varier significativement l'expression des *Pht1* de la vigne ([Figure 17](#), cluster B) par rapport à la condition 10 fois moins concentrée. En revanche, quelle que soit la concentration en P, *VvPT4* et *VvPT8* sont très nettement surexprimés en condition M par rapport à la condition NM ([Figure 17](#), cluster C). On remarque également que la condition 2mM P semble augmenter l'expression différentielle de *VvPT4* et que les faibles concentrations (0,01 et 0,1mM P) semble augmenter l'expression différentielle de *VvPT8*.

De manière générale, la forte concentration en P, (comparée aux expressions en faibles concentrations de P) fait diminuer l'expression des *Pht1* indépendamment de la condition de mycorhization ([Figure 17](#), cluster A). Dans ce cas l'expression de *VvPT4* est plus fortement diminuée en condition NM qu'en condition M, alors que c'est l'inverse pour *VvPT8* dont l'expression est plus diminuée en condition M et ne semble pas variée en NM (voir [Figure 17](#)).

Pour conclure, on peut en déduire que l'expression de *VvPT4* est régulée à la fois par la condition de mycorhization et par la condition P. Tandis que *VvPT8* est exprimé uniquement en condition mycorhizée, comme son homologue *MtPT8*, et son expression semble régulée par la concentration en P. Au vu de ces profils d'expression nous avons choisi de faire synthétiser un anticorps dirigé contre *VvPT8* afin d'optimiser l'immunomarquage sur racine de vigne transparasée.

II.3. Immunomarquage

II.3.1. Caractérisation des anticorps

Basés sur les données bibliographiques et sur les données biomoléculaires précédentes nous avons fait synthétiser (Eurogentec), dans un premier temps, des anticorps de lapin dirigés contre *MtPT4* (peptide : 5'-DRAPGIRQDSRTEKM-3') et *VvPT8* (peptide : a : 5'-NGGDGEGGVKTDEKV-3' ; b : 5'-VIGFLYDDLRLGDKKK-3'), et dans un second temps *VvPT4* (peptide : 5'-CDGGINETEMASRPS-3').

Les plants de *M. truncatula* ont été cultivés comme précédemment décrit (§ I.4.1_culture de la plante modèle) et les plants du porte greffe *Riparia* comme décrit dans la section précédente (§ II.2.2).

Nota bene_ les Ac I^{aire} ont été mis au point sur les séquences protéiques de V. vinifera. Bien qu'ils soient testés sur plusieurs porte-greffe différents, dont Riparia (V. riparia), et que par alignement de

séquence cette portion protéique est identique entre les deux espèces, les protéines ciblées seront toujours nommées VvPT et non VrPT, par soucis d'homogénéité et en référence aux données de biomoléculaire précédentes.

- **Extraction de protéines membranaires et Western Blot**

Plusieurs extractions de protéines totales suivant des protocoles basés sur une extraction au phénol ont été réalisés tout au long de cette thèse (Jellouli et al., 2010). Les deux Ac anti-VvPT8 ne fonctionnent pas sur extraction de protéine totale, aucun accrochage, même aspécifique n'est constaté, y compris sur la fraction totale. L'Ac anti-VvPT4 montre un accrochage aspécifique sur la fraction totale. Nous avons donc essayé un protocole d'extraction de protéines membranaires (fourni par Adilah Mamode-Cassim, données non publiées). Ce protocole est concluant sur racine de *M. truncatula*, tout comme le Western Blot avec l'Ac anti-MtPT4. Toutefois, il n'en est pas de même sur vigne, avec des concentrations finales très faibles, et des Western non concluant. Des optimisations sont encore en cours concernant l'extraction de protéines membranaires de vigne.

II.3.2. Immunomarquage de MtPT4

- **Immunomarquage sur racines transparasées**

Les racines de *M. truncatula* transparasées (§ I.4.1_PT de racine blanche mycorhizée) sont rincées 2 fois à l'eau ultrapure, et 2 fois dans du PBS. Elles sont ensuite incubées 30min dans une solution de 0,1% TritonX100 dans du PBS (ou une solution de PBS seul) à T°C ambiante avec agitation (70rpm) et lavées (2 x PBS, 1 x PBST). Elles sont incubées en PBST - glycine 50mM 30min à T°C ambiante, lavées 3 fois par une solution de PBST - albumine de sérum bovin (ASB) 1% et incubées dans cette même solution pendant 30min. Elles sont ensuite incubées 48h à 4°C avec agitation (70rpm) dans une solution d'Ac I^{aire} anti-MtPT4 dilué à 1/100, 1/500 ou 1/1000 dans PBST – ASB 1%. Elles sont repassées à T°C ambiante pour 3 lavages PBST - ASB 1% et ensuite incubées pendant 30h dans une solution d'Ac II^{aire} (chèvre anti-lapin couplé WGA Alexa633, Invitrogen) dilué à 1/800 dans PBST - ASB 1%. Elles sont ensuite lavées 2 fois 30min en PSBT, et deux fois 30min en PBS. Après marquage les échantillons sont rincés pendant minimum 2h dans des bains successifs de PBS, puis ils sont remis à incubés dans du TDE 70% après un passage sous vide, pendant minimum 24h. Le jour de l'acquisition les échantillons sont montés entre lame et lamelle avec un espaceur (iSpacer Sunjilab 0,25mm) dans du TDE 70% comme milieu de montage. Pour l'immersion, une solution de Glycérol 55% est utilisée afin de faire correspondre au mieux les indices de réfraction le long du chemin optique.

En raison du temps nécessaire à l'immunomarquage, le contre marquage au WGAAlexa488 (0,1mg/mL dans du PBS à T°C ambiante pendant 1h avec agitation (70rpm)) a été réalisé avant

l'incubation dans l'AT, afin de limiter la période durant laquelle l'échantillon est hors AT. Par ailleurs, des racines ont été incubées sans Ac I^{aire}, et marqué au I^{aire} comme précédemment. Ces contrôles n'ont révélé aucun marquage aspécifique (images non montrées).

Concernant l'immunomarquage de MtPT4, la dilution d'Ac I^{aire} au 1/100 révèle beaucoup d'aspécificité et des agglutinations de marquage ; tandis que la dilution 1/1000 présente un marquage très faible et non homogène. La dilution 1/500 quant à elle présente une réponse similaire à celle décrite par (Harrison et al., 2002) ([Figure 18](#)). En effet, l'immunomarquage est présent au niveau de la membrane périarbusculaire en périphérie des branches fines de l'arbuscule et est absent des arbuscules collapsés. Le traitement au détergent TritonX100 ne semble avoir apporté aucune amélioration. De plus, les contrôles NM n'ont montré aucune réponse pour l'immunomarquage. En revanche, on remarquera que l'étape d'incubation dans l'AT a affaibli la fluorescence du contre marquage de la chitine.

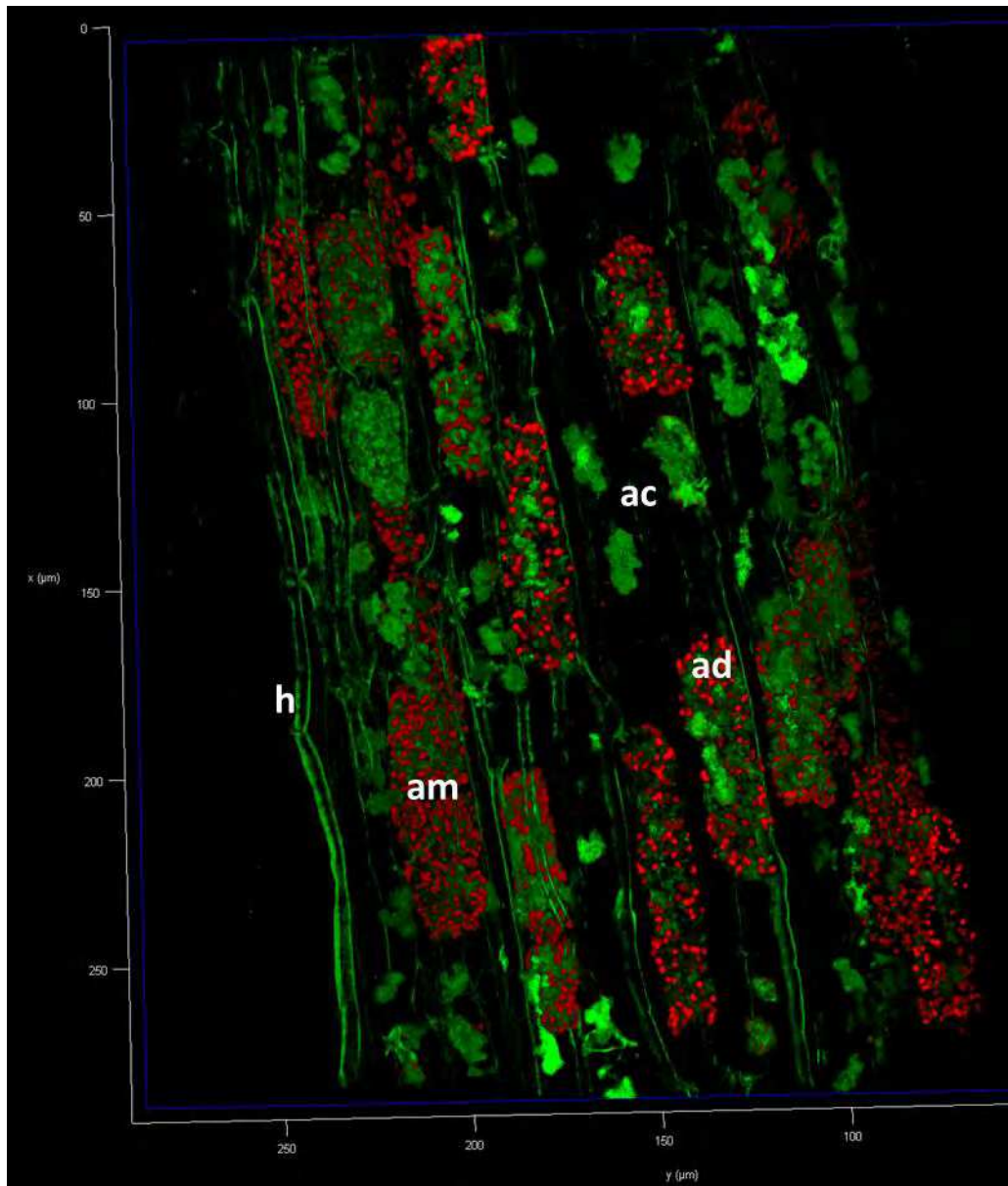


Figure 18 : Racine mycorhizée de *M. truncatula* immunomarkée (Ac primaire lapin anti-MtPT4 1/500, Ac secondaire de chèvre anti-lapin couplé AlexaFluor633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 640nm-680nm) avec contre marquage WGA-Alexa488 (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 500nm-550nm). Pas de traitement TritonX100. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x40, immersion à huile), reconstitution 3D, traitement d'image : filtre gaussien (LasX, sigma 0,8). arbuscule mature (am), arbuscule dégénérescent (ad), arbuscule collapsé (ac).

II.3.3. Immunomarquage de VvPT8

- **Immunomarquage sur racines transparisées**

Des racines de vigne transparisées (§I.4.2_culture de la plante d'intérêt) sont immunomarquées selon le même protocole que les racines transparisées de *M. truncatula* (§II.3.2). Elles sont donc traitées ou non au détergent (TritonX100), Ac I^{aire} 1/500 dans PBST-ASB1% pendant 48h et incubé avec l'Ac II^{aire} dilué au 1/800 dans PBST-ASB 1% pendant 30h.

Chacun des deux anticorps à disposition, dirigés contre différents épitopes de VvPT8, ont été testés indépendamment, ou les deux en même temps. Dans ces conditions, le signal rouge correspondant à l'immunomarquage ne se superpose pas au signal de contre-coloration en vert et il n'y a pas de différence importante ni pour les conditions de détergent ni pour les différents Ac I^{aires}. De plus, le signal rouge semble être condensé sur le bord extérieur de la racine et semble ne pénétrer qu'aux endroits où le tissu est déchiré (Figure 19).

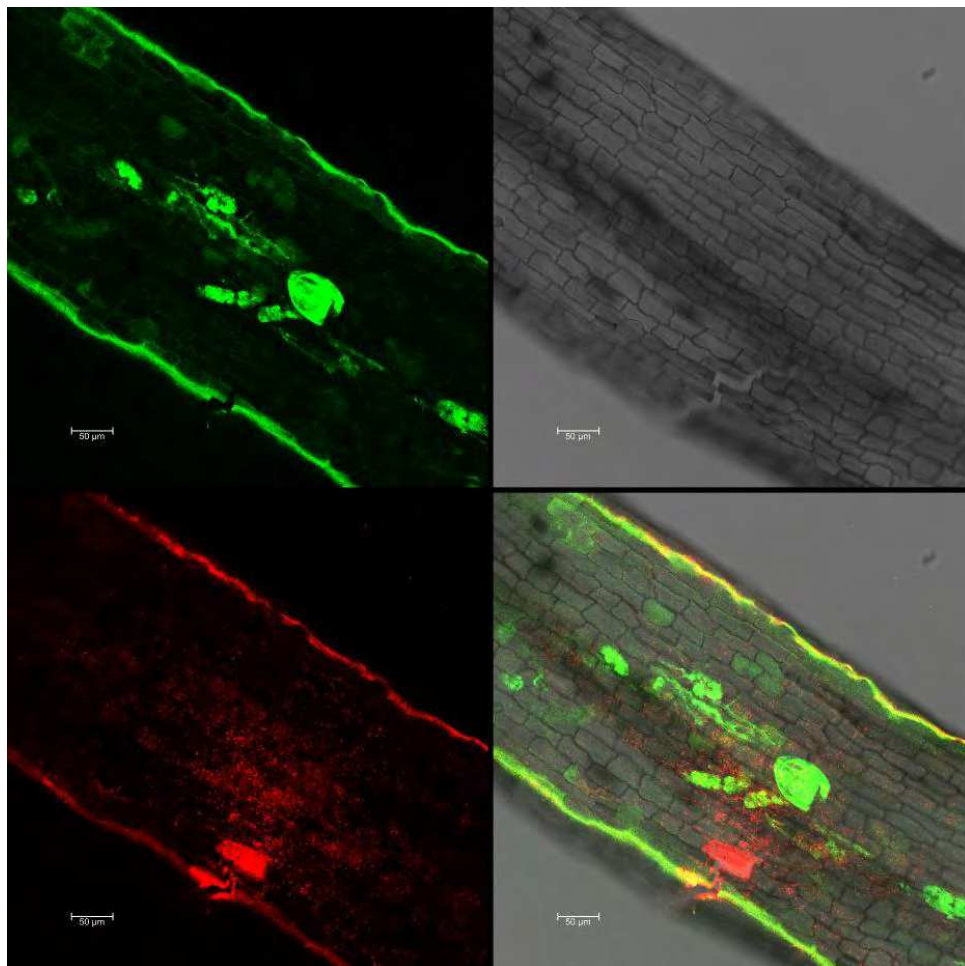


Figure 19 : Racine mycorhizée de vigne **immunomarquée** (Ac primaire lapin anti-VvPT8 1/500, Ac secondaire chèvre antilapin couplé AlexaFluor633 $\lambda_{ex} = 638\text{nm}$, $\lambda_{em} = 640\text{nm} - 680\text{nm}$) avec contre marquage **WGA-Alexa488** ($\lambda_{ex} = 488\text{nm}$, $\lambda_{em} = 500\text{nm} - 550\text{nm}$). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x20).

Au vu de ces résultats, il est probable que les concentrations d'anticorps ne soient pas adaptées. En effet, la diffusion de ces derniers au sein du tissu peut être limitée si la concentration est trop faible, mais également lorsque celle-ci est trop élevée. En effet, un excès d'Ac en solution peut induire un encombrement stérique en surface et ainsi empêcher la diffusion dans le tissu. Les concentrations d'Ac I^{aire} 1/500 et Ac II^{aire} 1/800 ayant précédemment été testées, les dilutions 1/100, 1/500, 1/800 et 1/1000 pour l'Ac I^{aire}, et 1/100, 1/500 pour l'Ac II^{aire} ont fait l'objet de l'expérimentation suivante (Figure 20).

On constate un bruit de fond très important du signal pour la condition Ac I^{aire} 1/100 non traité TritonX100, qui semble amoindri avec le détergent. En condition Ac I^{aire} 1/500 le bruit est clairement diminué, des points aspécifiques apparaissent en Ac II^{aire} 1/500 de manière homogène dans l'image, ce qui révèle une mauvaise qualité de marquage ou une pénétration de l'Ac très hétérogène. En Ac I^{aire} 1/800 on retrouve le même profil qu'en 1/100 c'est-à-dire beaucoup de bruit sans détergent et peu avec détergent. En I^{aire} 1/1000 le marquage semble très variable et aspécifique. Le contre marquage au WGA-Alexa n'est pas homogène, indépendamment de la condition détergent, il est donc nécessaire de remettre cette étape en fin de protocole, après incubation dans l'AT et immunomarquage.

Dans toutes les conditions testées, l'immunomarquage n'est pas fiable, le traitement détergent semble inefficace, l'anticorps primaire est sûrement défectueux. Pour vérifier cela en s'épargnant tous les biais pouvant être induits par la transparisation et le marquage de tissus volumineux, un immunomarquage sur des coupes de racines de vigne mycorhizées non transparisées a été effectué.

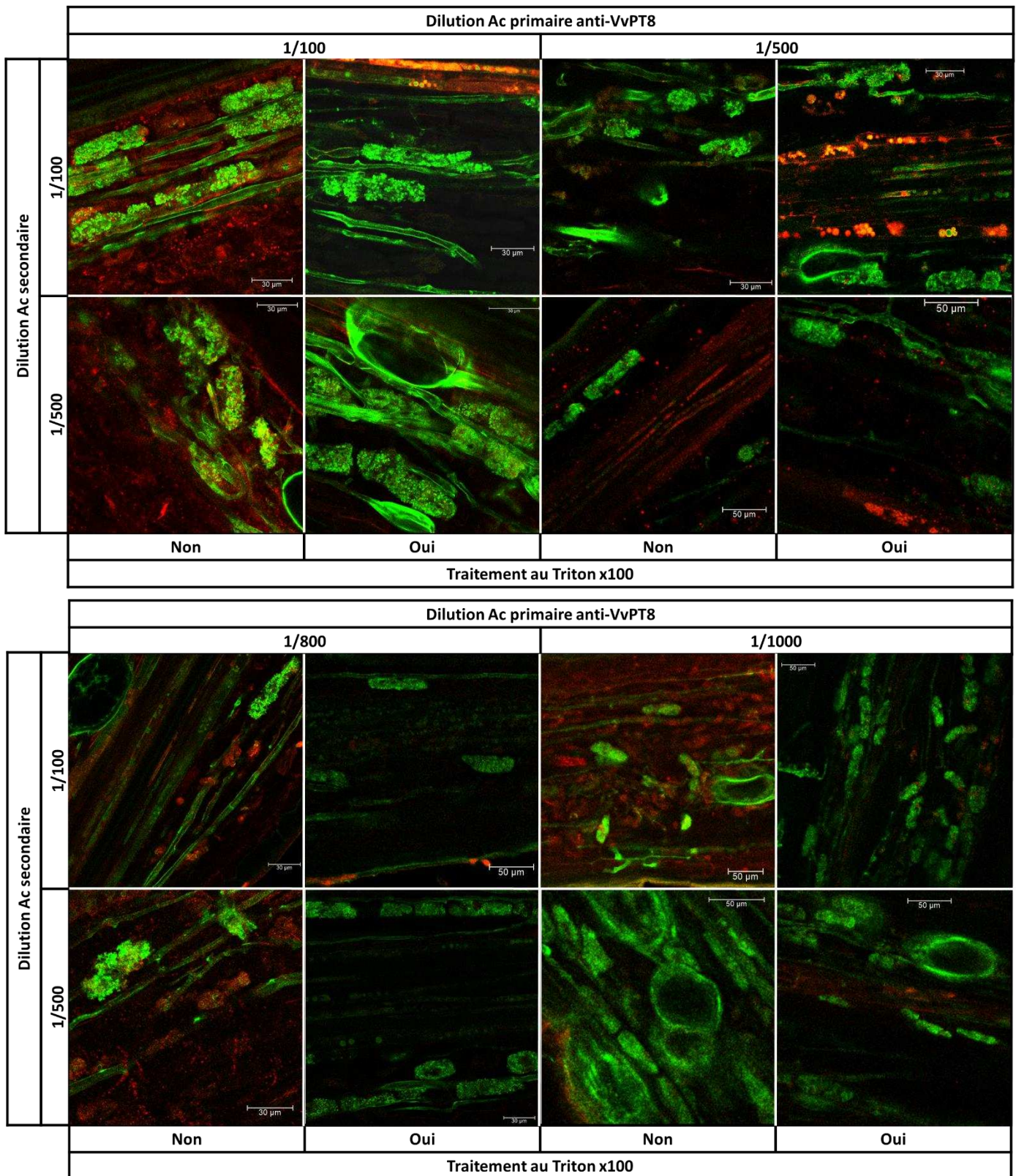


Figure 20 : Racines mycorhizées et transparisées de vigne immunomarquées (Ac primaire lapin anti-VvPT8, Ac secondaire chèvre anti-lapin couplé AlexaFluor633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 640nm - 680nm) avec contre marquage WGA Alexa488 (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 500nm - 550nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x20).

- **Immunomarquage de VvPT8 sur coupes de racines**

Après prélèvement, les racines de vigne (porte-greffes SO4, Riparia et Berlandieri, conditions de culture §1.4.2, mycorhizées et non mycorhizées) sont soigneusement nettoyées et coupées à la lame de rasoir en tronçons de 0,8cm à 1cm de long. Ces tronçons de racines sont ensuite immergés dans une solution de fixation (Paraformaldéhyde 4%, DMSO 5%, dans du tampon PME (50mM Pipes, 5mM MgSO₄, 10mM EGTA, pH 6,9)), pendant 1 nuit sous agitation (70rpm) à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont lavés 2 fois avec du tampon PME et 2 fois dans de l'eau. Deux par deux, les fragments sont brièvement essuyés sur du papier absorbant, déposés dans un moule rectangulaire longitudinalement puis recouvert par de l'agarose low melting point 6% (Invitrogen) préalablement chauffé. Les blocs sont séchés sur paillasse pendant 30min. Ensuite, ils sont démoulés et coupés au vibratome (VT 1200S, Leica) pour obtenir des sections de 100µm d'épaisseur. Les coupes sont placées dans une solution de PBS pH 7,3.

Pour l'immunomarquage, les coupes sont plongées 30min dans une solution de PBST – glycine 50mM à T°C ambiante. Elles sont lavées 3 fois par une solution de PBST – ASB 1% et incubées dans cette même solution pendant 30min. Elles sont ensuite incubées une nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaire (lapin, anti-VvPT8a et b) dilués dans PBST – ASB 1% (3 concentrations testées 1/100 uniquement sur Riparia, 1/500 et 1/1000). Le lendemain, elles sont repassées à T°C ambiante pour 3 lavages PBST - ASB 1% et incubées pendant 1h dans une solution d'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin couplé WGA-Alexa633, Invitrogen) dilution 1/1000 dans PBST - ASB 1%. Puis lavées deux fois 30min en PSBT, et deux fois 30min en PBS. Elles sont ensuite contre-marquées au WGA Alexa488 0,01mg/mL dans du PBS à T°C ambiante pendant 30min avec agitation (70rpm) et enfin lavées pendant 2h dans du PBS. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans du glycérol 100% pour observation au microscope confocal.

Quelques soient les concentrations d'Ac^l^{aire} testées, les résultats ne sont pas concluants. En 1/100 sur Riparia il y a beaucoup de bruit (non montré), en 1/500 et 1/1000 ([Figure 21](#)) aucun marquage spécifique. Au vu des résultats de biologie moléculaire, il est probable que VvPT8, induit en condition de mycorhization, ne soit que faiblement traduit et qu'il soit particulièrement difficile de le repérer en microscopie optique. Toutefois il est aussi très probable que nos anticorps soient défectueux. C'est pour cela que nous avons fait synthétiser un autre anticorps, dirigé cette fois contre VvPT4.

Ac lapin
anti-VvPT8

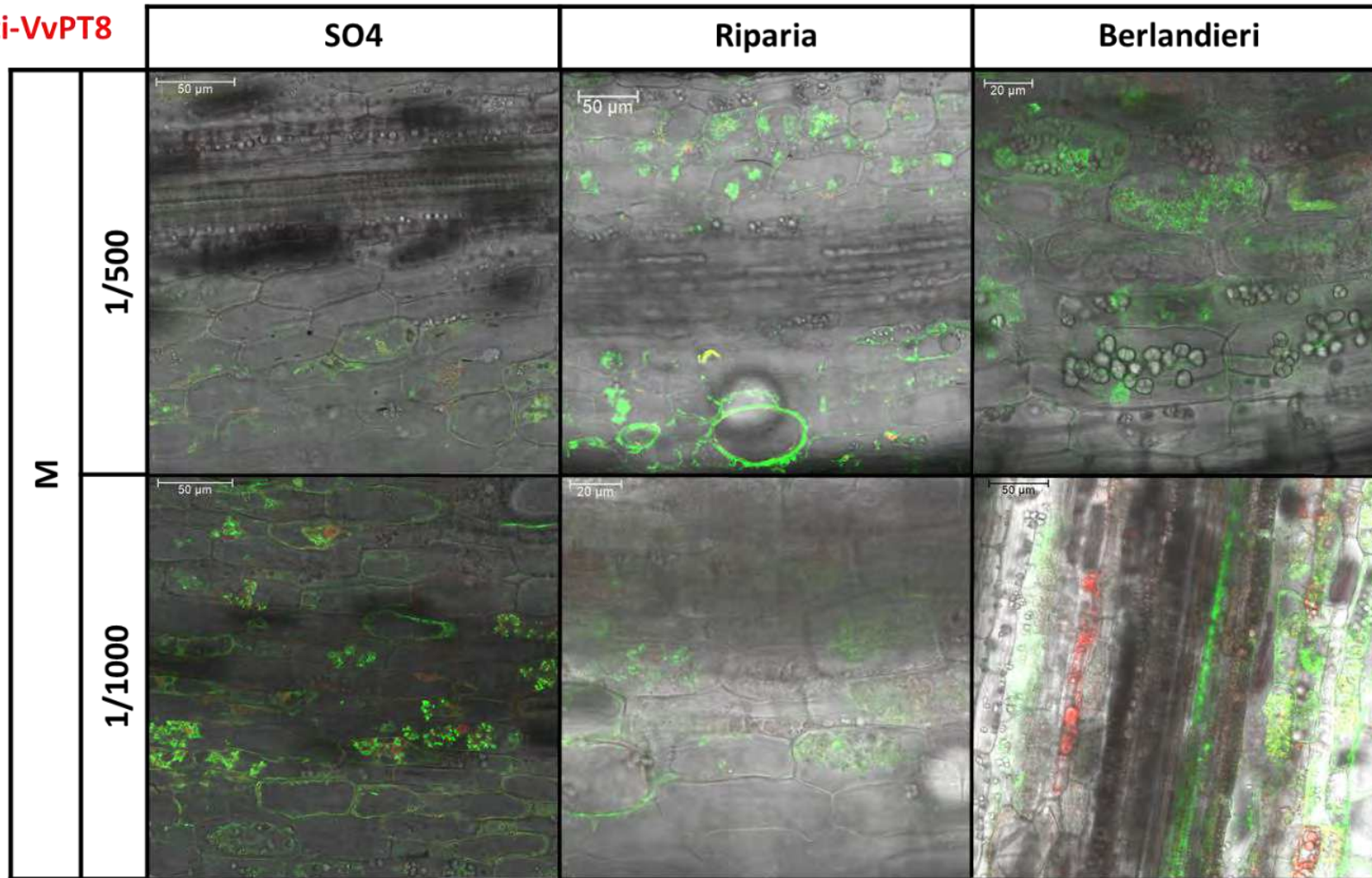


Figure 21 : Coupes de racines mycorhizées de vigne (SO4, Riparia, Berlandieri, 100μm d'épaisseur) **immunomarquées** avec un Ac primaire lapin anti-VvPT8, Ac secondaire chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa633 (lex 638nm, lem 643nm - 674nm). Structures fongiques contre-colorées au **WGA-Alexa488** (lex 488nm, lem 509nm - 557nm) imagées au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x20, et x40 immersion à huile, images non traitées). Superposition des signaux fluorescents et de la lumière transmise.

II.3.4. Immunomarquage de VvPT4

- **Immunomarquage sur coupes de racines**

Après réception de l'Ac anti-VvPT4 de lapin, il a d'abord été testé sur coupe. Suivant le même protocole que VvPT8 (§ précédent), soit Ac I^{aire} : 1/100 (uniquement sur Riparia), 1/500 et 1/1000 ; Ac II^{aire} chèvre anti-lapin couplé WGA-Alexa633 (Invitrogen) dilution 1/1000. Pour VvPT4 la concentration de 1/100 d'Ac I^{aire} sur Riparia génère, comme pour VvPT8, beaucoup de signal aspécifique. A la concentration Ac I^{aire} 1/1000 le signal est assez faible et semble variable selon le porte-greffe. La concentration d'Ac I^{aire} 1/500 semble être la plus pertinente (Figure 22).

Dans ces conditions, l'immunomarquage de VvPT4 des racines mycorhizées semble toujours correspondre au contre marquage de la chitine (Figure 22 : couleur jaune-orangée par superposition des deux marquages fluorescents, et Figure 23), indiquant une proximité spatiale entre les arbuscules et le lieu d'expression de ce transporteur, laissant suggérer une expression au niveau de la membrane périarbusculaire. De plus, on remarque que l'immunomarquage est absent au niveau des arbuscules collapsés (Figure 23, SO4 M Ac I^{aire} 1/500).

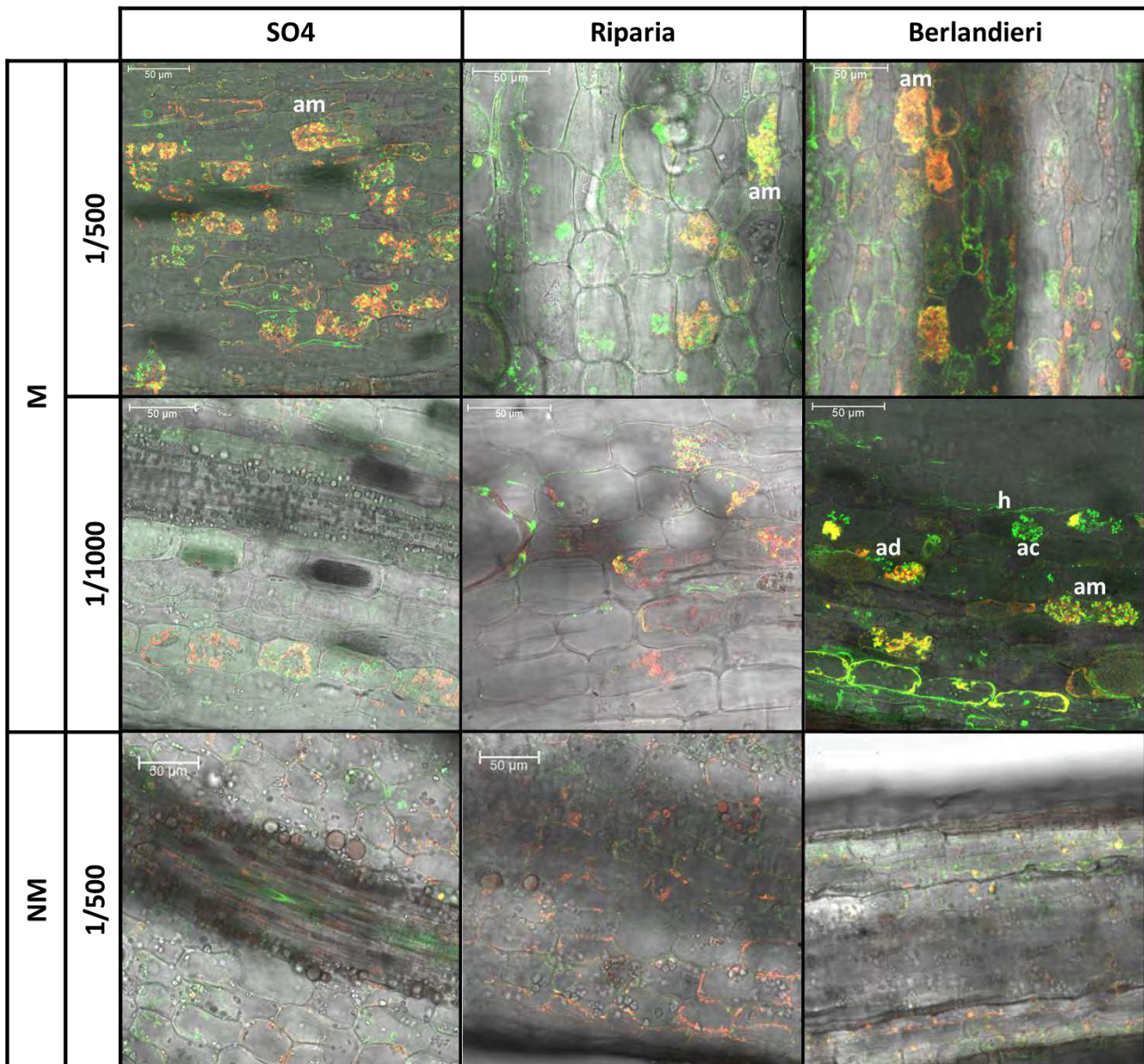


Figure 22 : Coupes de racines mycorhizées de vigne (SO4, Riparia, Berlandieri, 100μm d'épaisseur) **immunomarquées** avec un Ac primaire lapin anti-VvPT4, Ac secondaire chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa633 (lex 638nm, lem 643nm - 674nm). Structures fongiques contre-colorées au **WGA-Alexa488** (lex 488nm, lem 509nm - 557nm) imagées au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x20, et x40 immersion à huile, images non traitées). Superposition des signaux fluorescents et de la lumière transmise. *arbuscule mature (am)*, *arbuscule dégénérescent (ad)*, *arbuscule collapsé (ac)*, *hyphe (h)*.

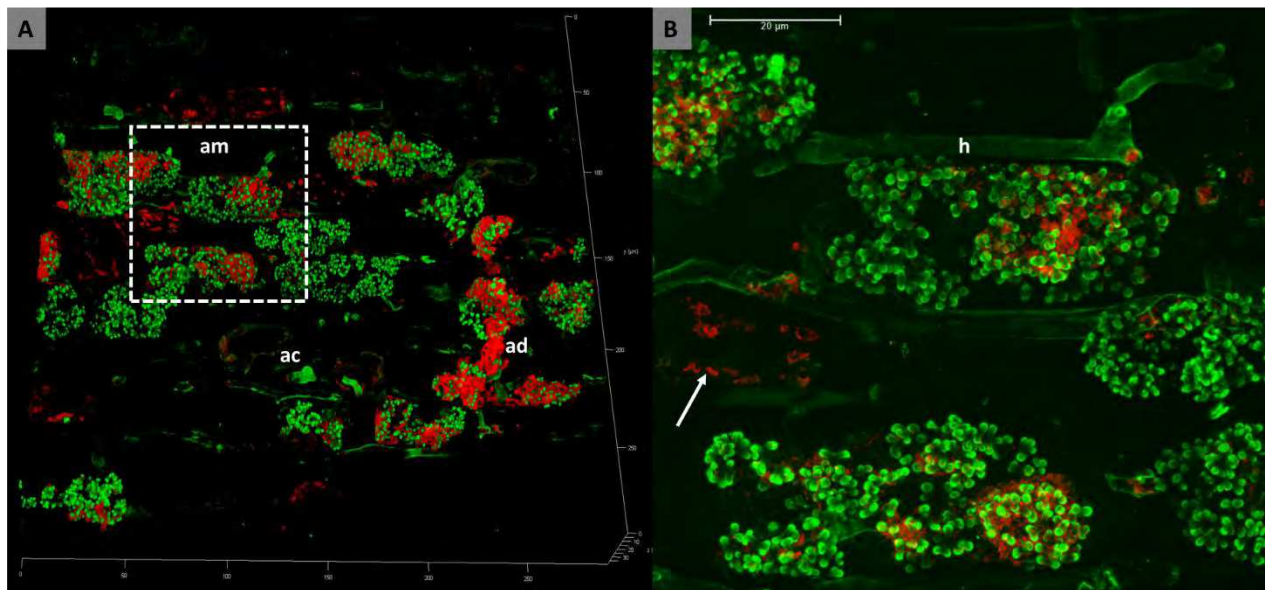


Figure 23 : Arbuscules dans une racine de vigne (SO4 ; coupe de 100µm), **immunomarcu ** avec l'Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm - 674nm). Structures fongiques contre-colorées au **WGA-Alexa488** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 509nm - 557nm) imagées par un microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectifs x40 (A), x63 (B), immersion à l'huile), reconstruction 3D des signaux fluorescents, images traitées par un filtre gaussien (LasX, sigma 0,8). *arbuscule mature (am)*, *arbuscule dégénérescent (ad)*, *arbuscule collapsé (ac)*, *flèche blanche : cellule non arbuscul e*.

Bien que l'immunomarcuage semble bien correspondre à la membrane périarbusculaire, il apparait plus diffus et moins spécifique aux branches fines pour VvPT4 (Figure 22) que pour MtPT4 (Figure 18, page 46). Toutefois, cette comparaison est à prendre avec précaution car (i) l'immunomarcuage de MtPT4 est réalisé sur racine transparisée et (ii) la morphologie de la membrane périarbusculaire varie en fonction de la maturité des arbuscules. Par ailleurs, VvPT4 semble également présent à la membrane plasmique de cellules non-arbusculées (Figure 23, B, flèche blanche). Ce marcuage est confirmé sur racines NM, au niveau des membranes plasmiques végétales mais laisse suggérer des réponses légèrement différentes selon les porte-greffes (Figure 22 et 24).

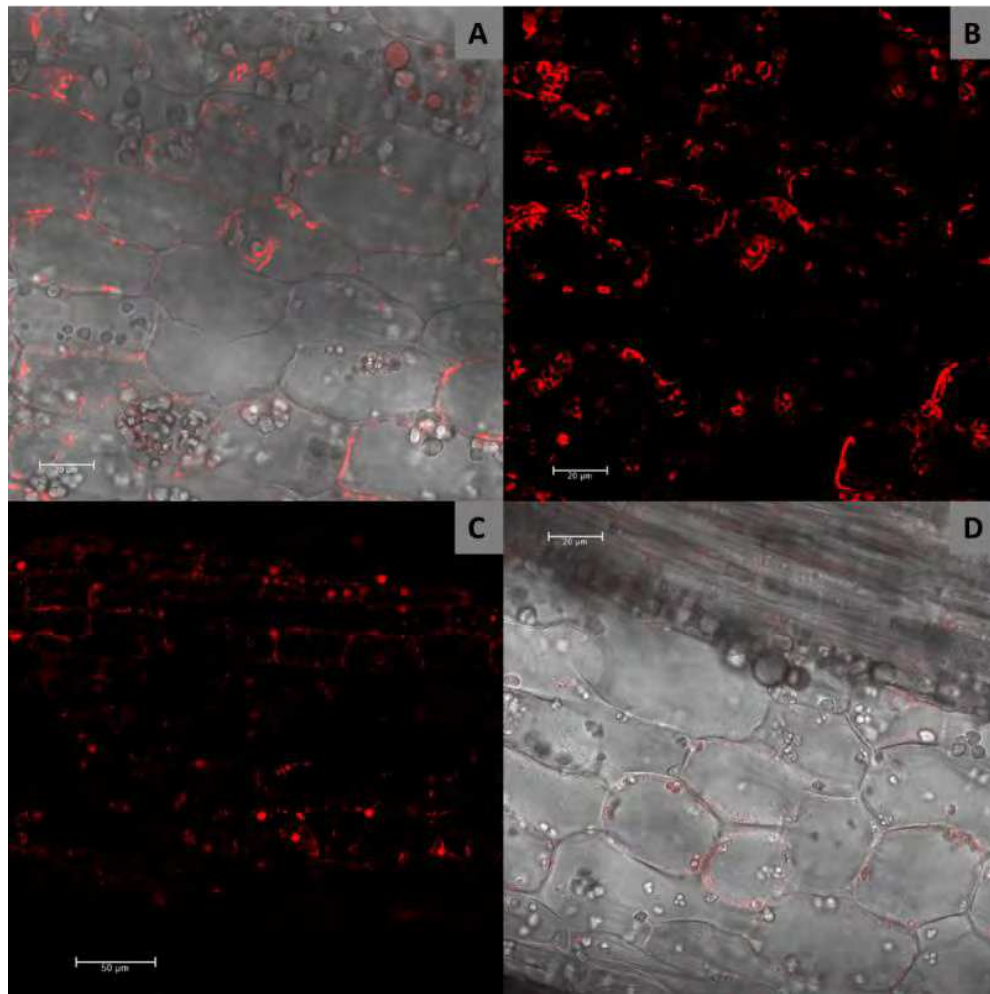


Figure 24 : Coupes de racines non-mycorhizées de vigne (Riparia, A et B ; Berlandieri, C ; et SO4, D ; 100µm d'épaisseur), **immunomarkée** avec l'Ac primaire anti-VvPT4, et l'Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm - 674nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectifs x20 et x40 _ immersion à huile), images non traitées.

Ces résultats corroborent les résultats de biologie moléculaire. En effet, *VvPT4* est surexprimé en condition mycorhizée (§ II.2.2_Données de séquençage ARN, [Figure 17](#)). Aussi l'immunofluorescence de la membrane plasmique en condition NM peut être expliquée par l'expression basale de *VvPT4*, et le marquage autour des arbuscules à sa surexpression au niveau de la large surface d'échange que représente la membrane périarbusculaire comme c'est le cas pour *MtPT4*.

Afin de préparer l'immunomarquage de VvPT4 dans le PT des racines tanniques, des coupes de racines ont été immunomarquées après et avant deux étapes clés du PT. Tout d'abord, des sections (100µm) de racines mycorhizées ont été immunomarquées, puis traitées pendant 2 semaines dans la solution ClearSeeAlpha (Figure 25, A). Le traitement endommage sévèrement les signaux d'immunofluorescence et de contre-fluorescence. Lorsque l'étape d'immunomarquage a lieu après deux semaines de traitement en ClearSeeAlpha, la fluorescence est conservée (Figure 25, B). Une autre étape drastique du processus de transparençation qui peut potentiellement endommager les protéines est la dépigmentation. Par conséquent la dépigmentation a été réalisée directement sur coupe (Figure 25, C) ou sur des segments entiers de racines avant sectionnement (Figure 25, D), puis les deux types de sections ont été immunomarquées.

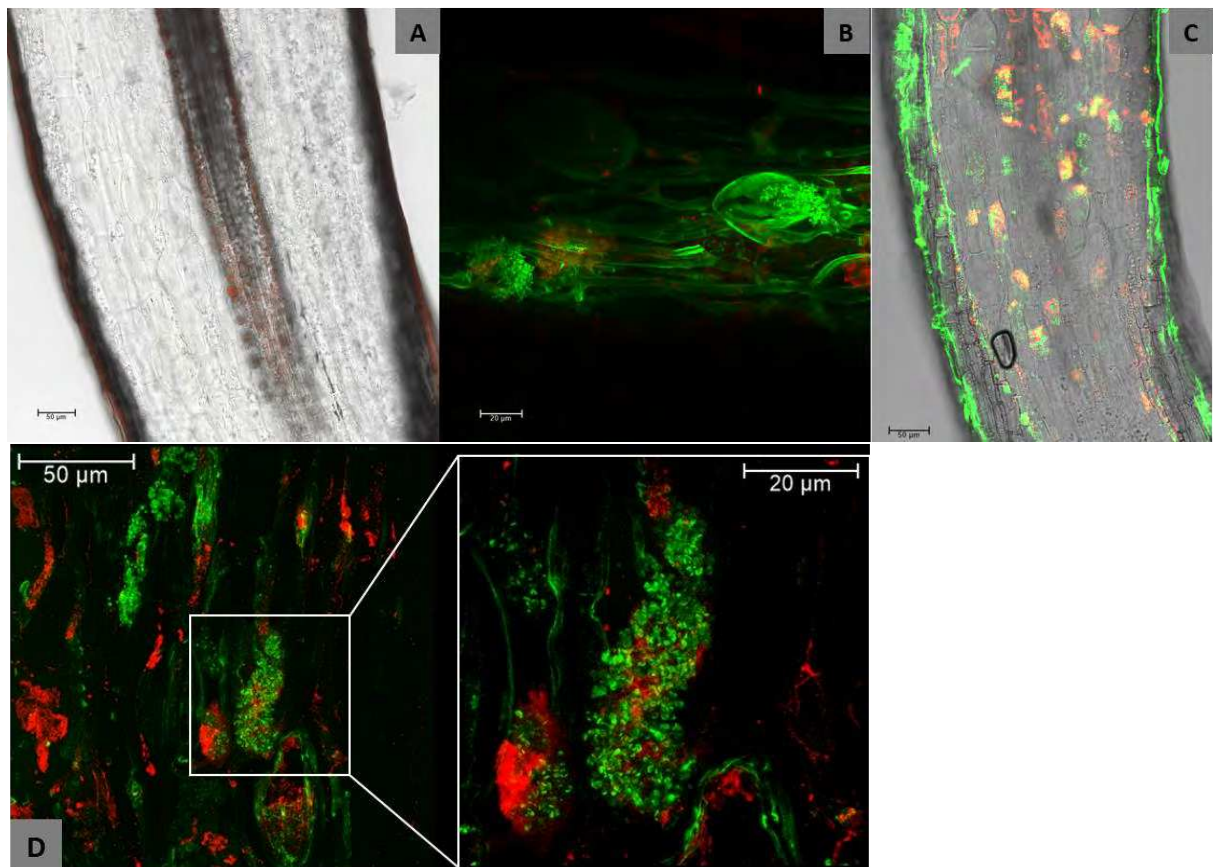


Figure 25 : Coupes de racines mycorhizées de vigne immunomarquées avec un Ac primaire contre VvPT4, Ac secondaire couplé à Alexa633 (lex 638nm, lem 643nm - 674nm). Structures fongiques contre-marquées au WGA-Alexa488 (lex 488nm, lem 509nm - 557nm). Tissu immunomarqué puis transparençé pendant 2 semaines (A), transparençé pendant 2 semaines puis immunomarqué (B_vue en projection maximale), dépigmenté puis immunomarqué (C), dépigmenté avant sectionnement puis immunomarqué (D_vue 3D). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectifs à immersion x20, x40 immersion à huile).

Selon certain PT, l'étape d'immunomarquage peut être placée avant l'étape de transpiration, c'est le cas notamment pour le protocole d'immunomarquage sur poisson zèbre à partir duquel a été adapté la dépigmentation sur vigne. Cependant de nombreux PT sur plante place l'immunomarquage après la transpiration (Nagaki et al., 2017b; Palmer et al., 2015; Warner et al., 2014). Au vu de nos résultats sur coupes de racine de vigne et sur racines transpirées de *M. truncatula*, il est impératif de garder cette étape d'immunomarquage en fin de protocole de transpiration. De plus, l'étape de dépigmentation peut être gardée en début de protocole et dans les mêmes conditions au vu de sa compatibilité avec le marquage sur coupes.

- **Immunomarquage sur racines transpirées**

Des racines de vigne transpirées (conditions de culture §1.4.2, *V. berlandieri* et *V. riparia*) sont immunomarcuées selon le même protocole que les racines transpirées de *M. truncatula* (§11.3.2). Elles sont non traitées au détergent (TritonX100) au vu des résultats sur racines transpirées de l'immunomarquage de MtPT4. Elles sont incubées dans l'anticorps primaire dilué dans PBST-ASB1% (1/500 et 1/1000) pendant 70h et dans la solution d'anticorps secondaire 1/800 dilué dans PBST-ASB1% pendant 30h (Figure 26).

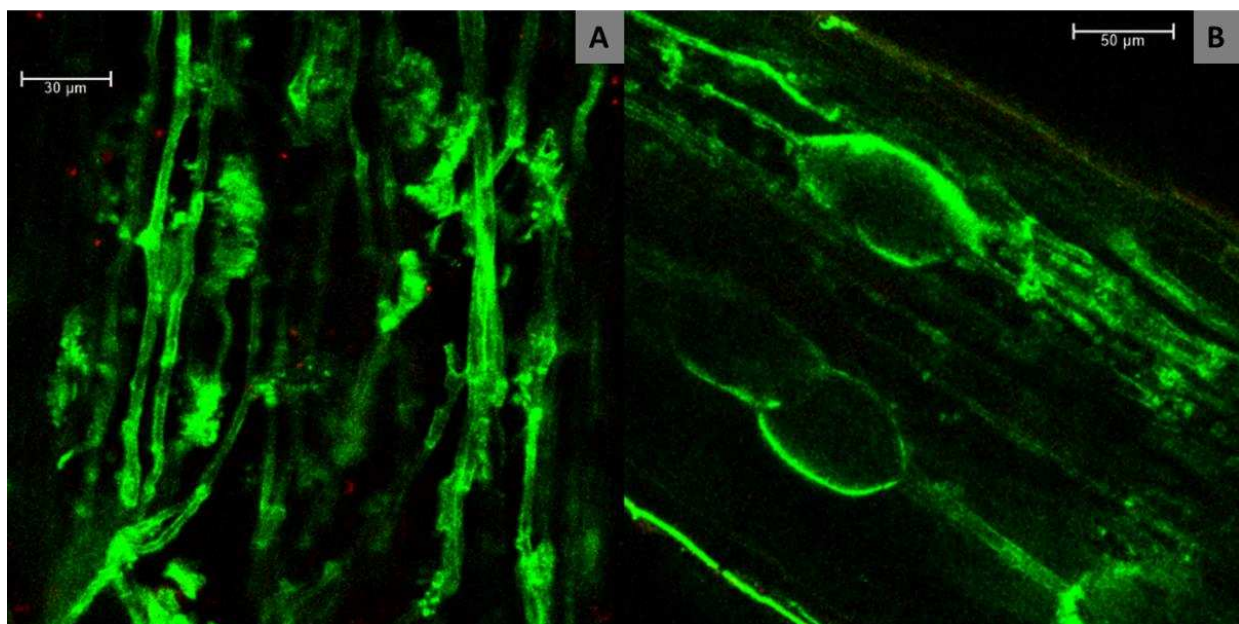


Figure 26 : Racines mycorhizées de vigne, transpirées et **immunomarcuées** avec un Ac primaire anti-VvPT4, dilution 1/500 (A, *Berlandieri*) et 1/1000 (B, *Riparia*), Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm - 674nm). Structures fongiques contre-marquées au **WGA-Alexa488** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 509nm - 557nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif à immersion x16, immersion glycérol 55%).

Là encore, l'immunomarquage ne semble pas fonctionner sur racines transparisées malgré un temps d'incubation Ac I^{aire} anti-VvPT4 allongé. Nous supposons ici que les anticorps ne pénètrent pas à l'intérieur du tissu.

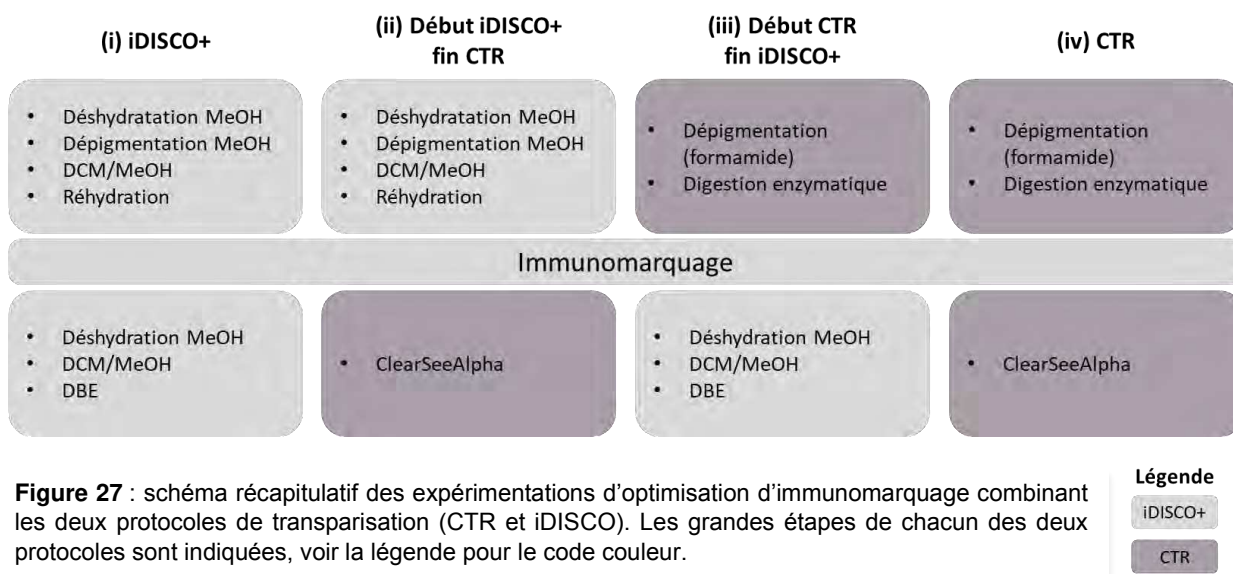
J'ai pu exposer ce problème lors des ateliers du congrès MiFoBio2021 auquel j'ai participé. On m'a suggéré d'essayer le protocole d'immunomarquage iDISCO+, largement utilisé sur organoïdes.

Dans un premier temps, j'ai appliqué strictement le protocole iDISCO+ (i) fourni par Chloé Dominici (Renier et al., 2016). Après prélèvement et fixation des racines de vigne (*Riparia*, *Berlandieri*), elles sont lavées par 3 bains de 30min successifs de PBS. Les racines sont ensuite déshydratées avec des bains successifs de solutions de méthanol (MeOH) à 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100% (diluées dans du PBS) pendant une durée moyenne d'une heure et demi chacun, avec agitation. Les échantillons sont ensuite dépigmentés sur la nuit dans une solution à 5% H₂O₂ dilué dans du MeOH à 4°C sans agitation, à l'abri de la lumière. Le lendemain, ils sont rincés au MeOH 100% sur la journée avant d'être incubés dans une solution de 2/3 dichlorométhane (DCM) 1/3 MeOH à T°C ambiante, sous agitation, sur la nuit. Les échantillons sont ensuite réhydratés par des bains successifs de solutions de MeOH à 100%, 80%, 60%, 40%, 20% (diluées dans du PBS), PBS 1X pendant une durée minimum d'une heure à chaque fois.

Pour l'immunomarquage, après un lavage PBS, les échantillons sont incubés dans une solution de PBSGT 0,5% (0,2% gélatine, 0,5% Triton dans PBS 1X) 2 jours à 37°C. Les échantillons sont incubés dans une solution d'Ac I^{aire} dilués dans une solution de PBSGT 0,5% à 37°C, sous agitation, pendant 7 jours. Les racines sont lavées 4-5 fois sous agitation avec une solution PBSGT 0,5% sur la journée à T°C ambiante avant d'être incubées dans une solution d'Ac II^{aire} dilués en PBSGT 0,5% à 37°C, sous agitation, pendant 4 jours. Les fragments racinaires sont de nouveau lavés 4-5 fois sous agitation avec une solution PBSGT 0,5% sur la journée à T°C ambiante.

Pour la transparisation, les racines sont repassées dans du PBS sur la nuit et de nouveau déshydratées dans du MeOH comme précédemment décrit puis incubées sur la nuit dans une solution de 2/3 dichlorométhane (DCM) 1/3 MeOH sous agitation à T°C ambiante. Le lendemain matin, les racines sont incubées 30min dans du DCM 100% sous agitation puis rincées une fois dans du dibenzyl ether (DBE) et incubées dans du DBE. Après minimum 2h d'incubation les échantillons sont montées entre lame et lamelle avec espaceur (0,5mm, iSpacer Sunjilab) dans du DBE et observés au microscope confocal ([Figure 28](#), A). Ensuite j'ai réalisé de expérimentations hybrides en combinant ce protocole iDISCO+ avec le PT de racines tanniques, en conservant systématiquement l'étape d'immunomarquage comme décrit ci-dessus dans le protocole iDISCO+ ([Figure 27](#)). J'ai donc combiné (ii) le début du protocole iDISCO+ (déshydratation, dépigmentation, réhydratation, immunomarquage) avec un retour en ClearSeeAlpha (fin protocole CTR) ([Figure 28](#), B), un début de protocole CTR (dépigmentation,

digestion enzymatique), toujours immunomarquage iDISCO+, avec les deux transparisations : (iii) fin iDISCO+ (Figure 28, C) et (iv) fin CTR (Figure 28, D).



Tout d'abord, on peut constater que l'étape de transparisation à proprement parler du PT iDISCO+ (PT par solvant organique) semble améliorer la transparence du tissu, notamment au niveau du cylindre central (Figure 28, A et C). Ensuite, on observe que dans toutes les conditions l'étape d'immunomarquage du PT iDISCO+ est un succès, on remarque très distinctement l'immunomarquage (rouge) en périphérie des arbuscules, semblable à l'immunomarquage précédemment réalisé sur coupe. Cependant, il reste cantonner aux extrémités ou au niveau des déchirures du tissu racinaire. Ce qui laisse suggérer que l'Ac primaire ou le secondaire, ou les deux, ne pénètrent toujours pas à l'intérieur du tissu.

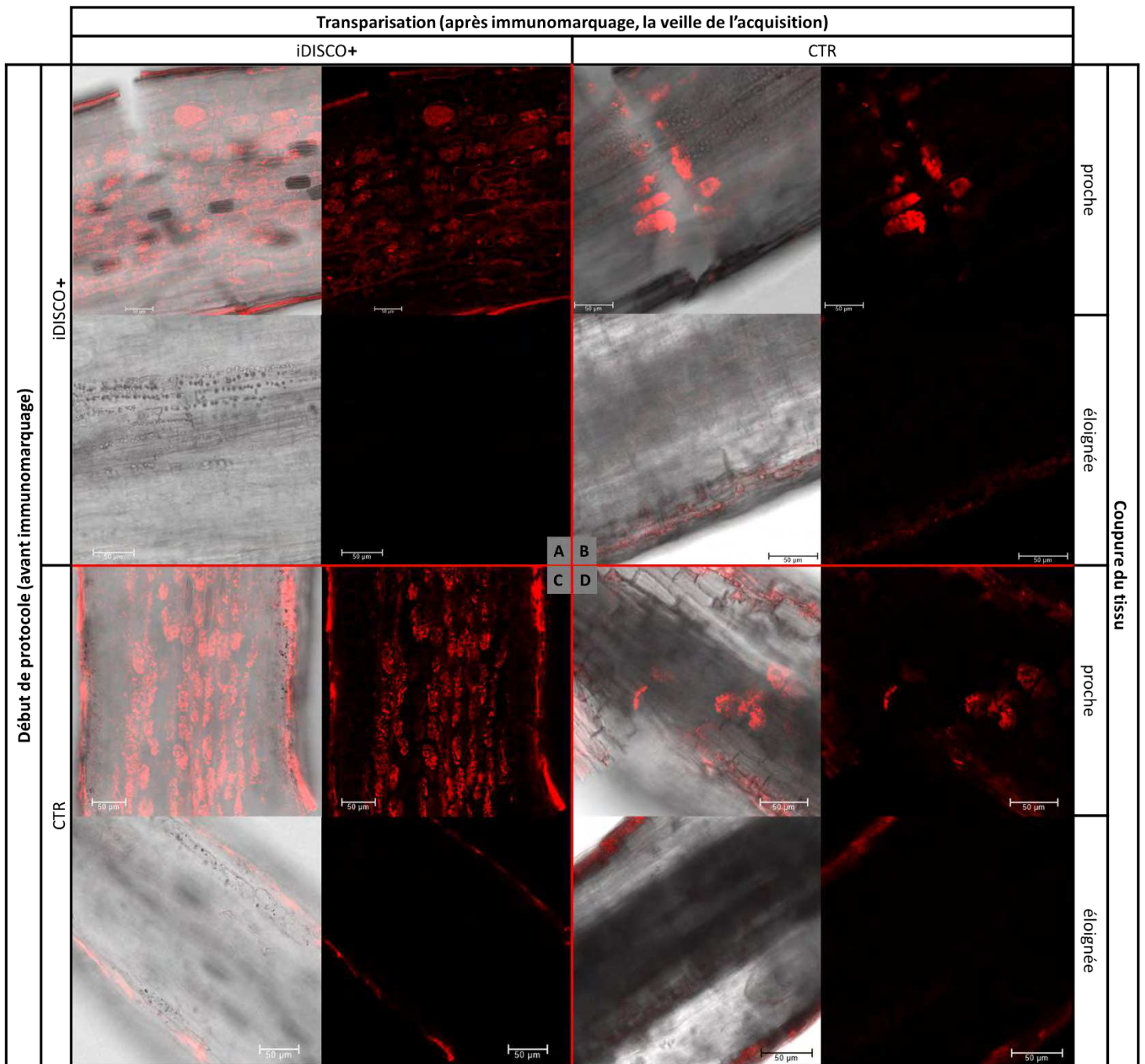


Figure 28 : Racines mycorhizées de *Riparia* et *Berlandieri* transparisées selon les protocoles iDISCO+ (A), CTR (D), des hybrides de ces deux protocoles iDisco -CTR (B), CTR - iDisco (C). **Immunomarquées** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} : 638nm, λ_{em} : 643nm – 669nm) selon protocole iDISCO+. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16 immersion au glycérol 100% (A et C), glycérol 55% (B et D)), images non traitées.

Toutefois, il est important de noter une différence entre les conditions quant à la profondeur de pénétration des Ac dans le cortex à partir de ces déchirures. Aussi, lorsque la transparisation finale est en ClearSeeAlpha (AT du PT CTR, [Figure 28](#), B et D), l'immunomarquage n'est observé qu'au niveau des tissus en contact directe avec les solutions. En revanche, la transparisation du PT iDISCO+ (déshydratation, puis solvant organique) permet d'observer la fluorescence plusieurs centaines de μm à l'intérieur du cortex racinaire ([Figure 28](#), A et C). Pour déterminer quel est le meilleur début de PT combiné avec cette fin de transparisation iDISCO+, j'ai effectué plusieurs mesures. Sur la [Figure 29](#) on remarque en A une extrémité de racine, qui a subi un début de PT iDISCO+ et dont l'immunomarquage a pu être relevé jusqu'à environ $300\mu\text{m}$ à l'intérieur de la racine. En B un fragment de racine avec des déchirures aux deux extrémités ayant subi un début de PT CTR. Dans ce cas, les déchirures sont espacées de plus de $700\mu\text{m}$, et l'immunomarquage a très bien fonctionné. On peut donc en déduire qu'il est pertinent de combiner les deux PT en commençant par la dépigmentation, la digestion enzymatique du PT CTR et ensuite d'immunomarquer et de transpariser selon le PT iDISCO+.

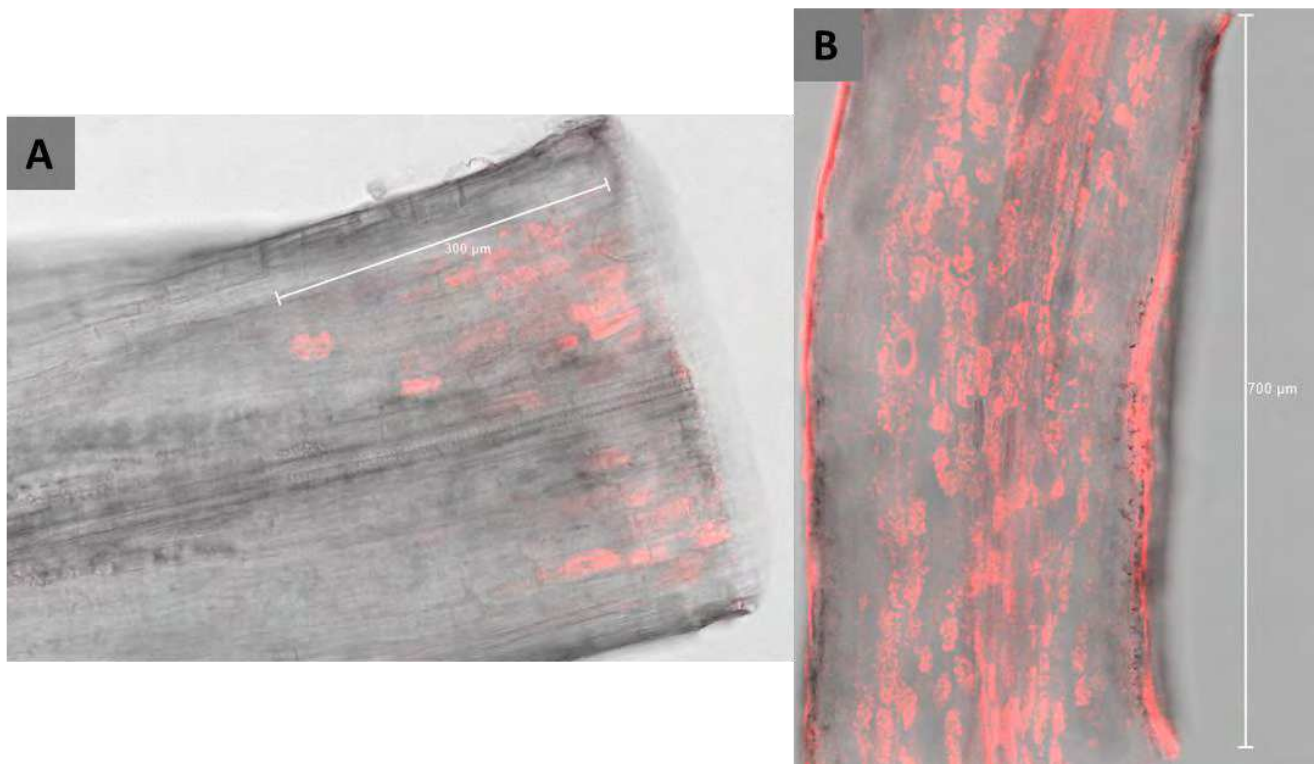


Figure 29 : Racines mycorhizées de Riparia transparisées selon les protocoles iDISCO+ (A) ou hybride début CTR – fin iDISCO (B). **Immunomarquées** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) selon protocole iDISCO+. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16 immersion au glycérol 100%), images non traitées.

J'ai également essayé d'améliorer la perméabilité du tissu en ajoutant (i) une enzyme qui dégrade la lignine (laccase) à l'étape de digestion CTR et (ii) un traitement à l'isopropanol (50% dans PBS 2h à 4°C avec agitation ou 100%, 30min) juste après cette étape de digestion enzymatique. Ces traitements n'ont pas permis d'imager l'immunomarquage loin des coupures du tissu (images non montrées) et ont faiblement amélioré la profondeur de pénétration des anticorps via les déchirures (Figure 30). On gardera tout de même ces traitements, soit la laccase en plus de la pectolyase et de la cellulase, et le traitement isopropanol 50% pour la suite des expérimentations.

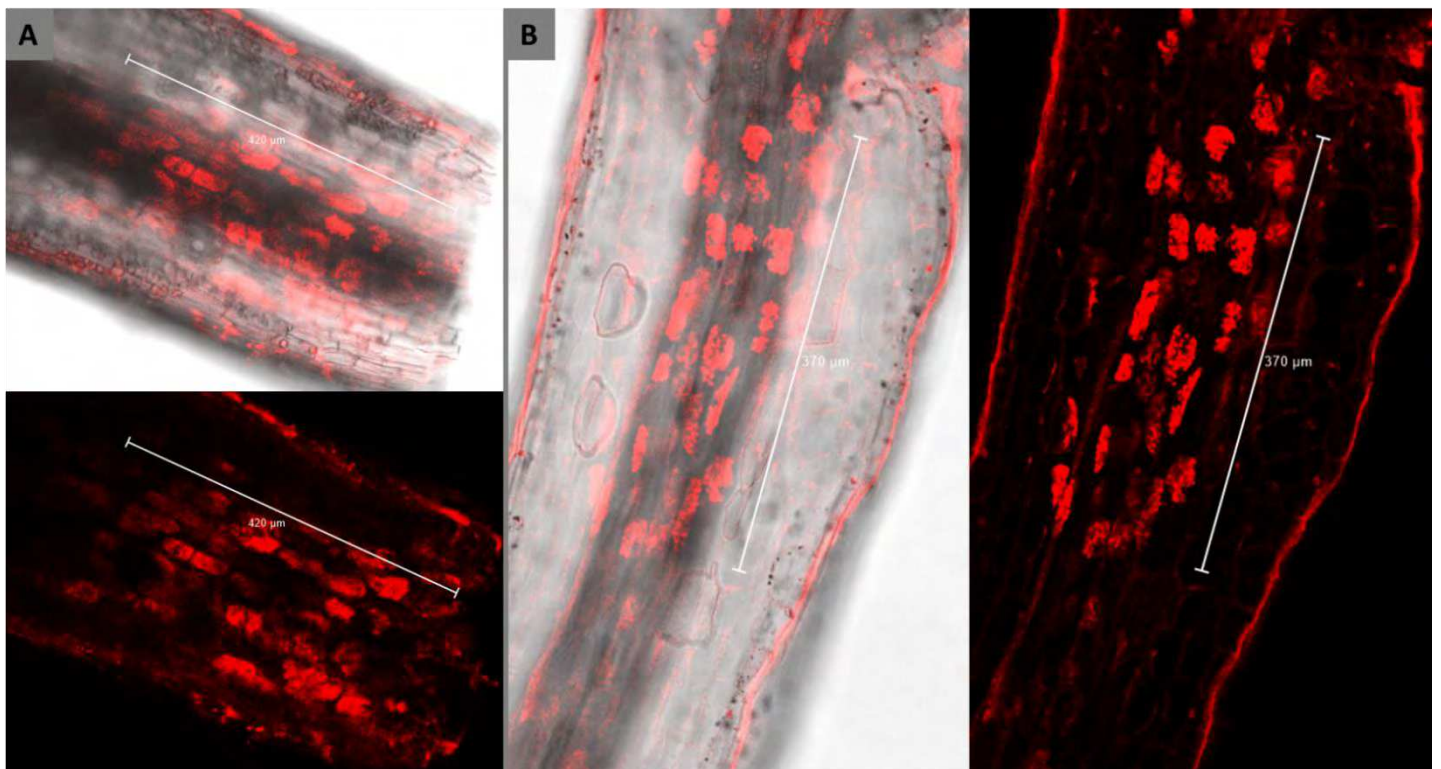


Figure 30 : Racines mycorhizées de *Riparia* transparentes selon les protocoles CTR + traitement laccase et isopropanol 100% (A) et hybride début CTR – fin iDISCO + traitement laccase et isopropanol 50% (B). **Immunomarquées** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} : 638nm, λ_{em} : 643nm – 669nm) selon protocole iDISCO+. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16 immersion au glycérol 100), images non traitées.

Afin de toujours améliorer l'immunomarquage j'ai également testé un protocole CTR complet (dépigmentation, digestion, transparisation ClearSeeAlpha) avec une fin de iDISCO+ (immunomarquage et transparisation) ou une fin CTR ([Figure 31](#)). Dans les deux cas, la profondeur d'immunomarquage à partir du bord du fragment racinaire est largement augmentée, dépassant le champ d'observation (>900µm en longueur dans la racine). Toutefois à quelques mm de distance de la déchirures le signal est fortement affaiblit en fin de PT iDISCO+, voir absent lorsque la fin de PT est en CTR. Je décide donc de conserver ce nouveau protocole combinées CTR complet (laccase et isopropranol), immunomarquage et transparisation iDISCO+ pour la suite des expérimentations (Schéma de synthèse [Figure 35](#), page 67).

Une optimisation du temps de digestion enzymatique avec ce cocktail de 3 enzymes a été réalisé, sans en changer les concentrations. Lors d'une incubation de 3 heures, un prélèvement des racines toutes les 15min a été effectué, puis la dernière incubation a été poussée jusqu'à 5h. Tout d'abord concernant la structure de la racine, les tissus s'affaissent à partir de 135min, l'intégrité tissulaire est donc perdue ([Figure 32](#)). Concernant l'immunomarquage, quel que soit le temps de digestion, même s'il est poussé au-delà de ce que la structure racinaire peut supporter, le marquage reste à proximité des coupures. Néanmoins, nous confirmons ici que cette nouvelle combinaison de transparisation permet d'acquérir le signal immunofluorescent en dessous du cylindre central ([Figure 32, A](#)), malgré la densité optique de ces structures remarquable en lumière transmise ([Figure 31](#)) et par l'ombre créée sur le signal d'autofluorescence ([Figure 32](#)). Par ailleurs, plus les fragments sont digérés longtemps, moins ils supportent l'étape de déshydratation pour la transparisation iDISCO+ et plus l'autofluorescence du tissu semble importante ([Figure 32, B](#)). Le temps d'incubation initial d'une heure est donc conservé.

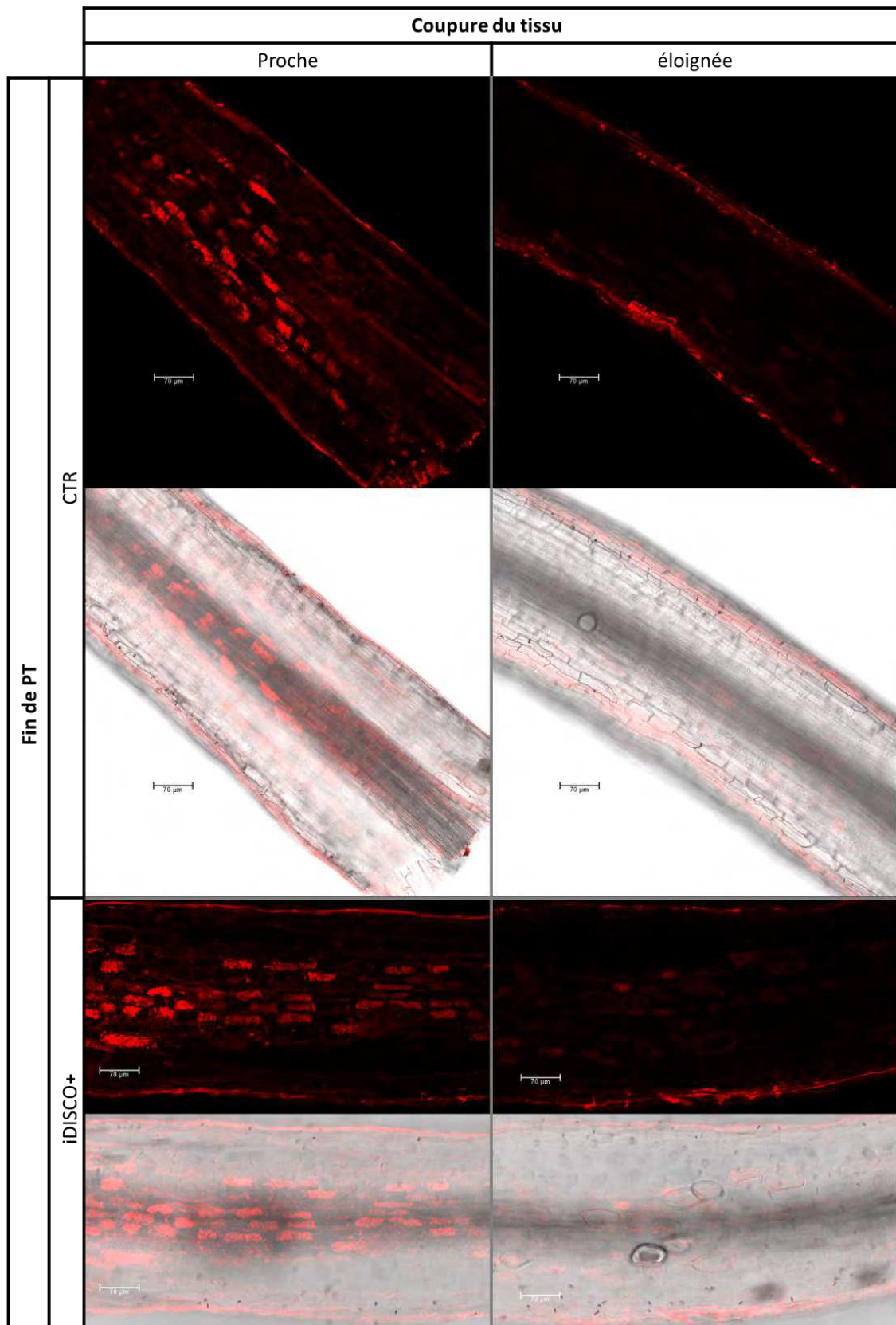


Figure 31 : Racines mycorhizées de *Riparia* transparisées selon un PT CTR complet combiné à (i) une fin CTR et (ii) une fin iDISCO+. **Immunomarquées** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) selon protocole iDISCO+. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16 immersion au glycérol 100%), images non traitées.

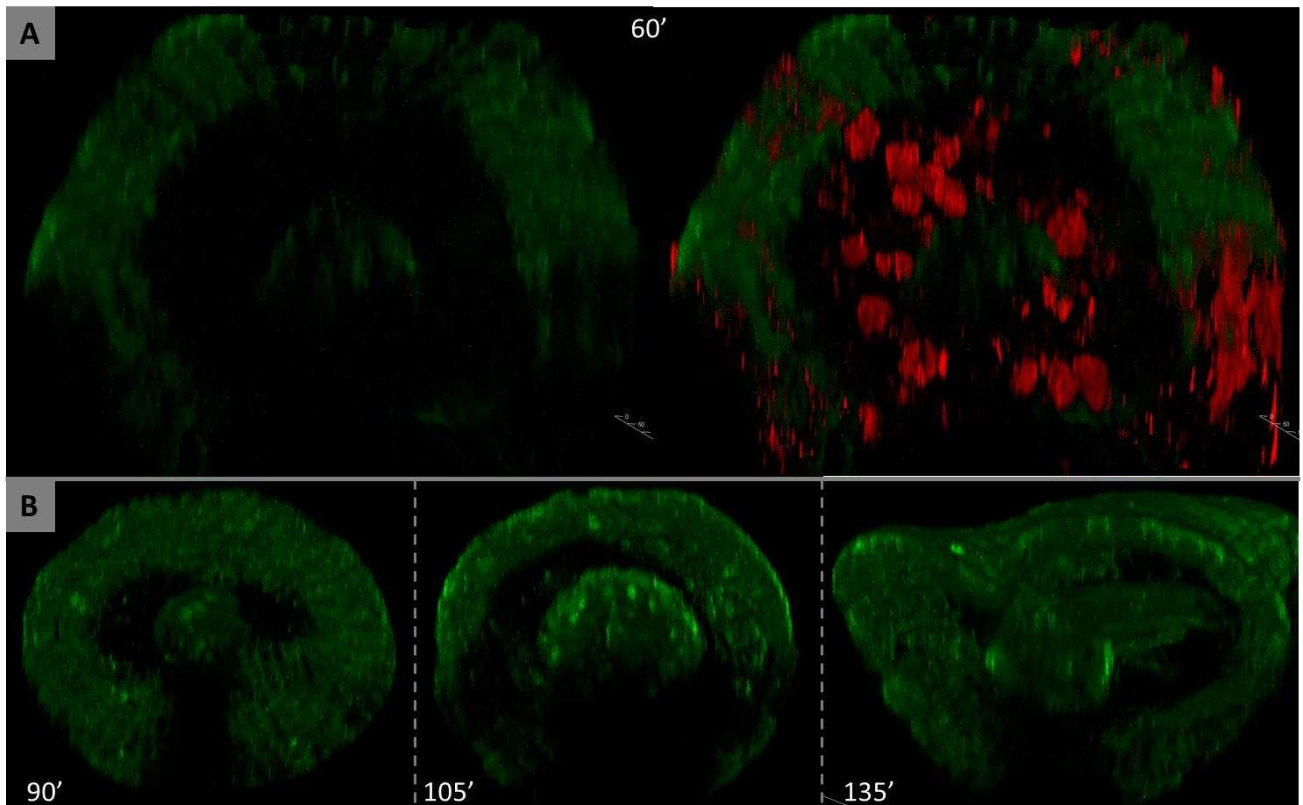


Figure 32 : Racines de mycorhizées de Riparia et SO4 transparisées selon un PT CTR complet combiné à une fin iDISCO+. **Immunomarquées** avec un Ac primaire dirigé contre VvPT4, Ac secondaire couplé à Alexa633 (λ_{ex} : 638nm, λ_{em} : 643nm – 674nm) selon protocole iDISCO+, **Autofluorescence** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 502nm - 550nm). Différents temps de digestion avec les 3 enzymes : 60min (A), 90min_105min_135min (B). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16 immersion au glycérol 100%, compensation de l'excitation laser en z). Reconstitution 3D images non traitées.

Bien que déjà décrit dans la littérature pour la décoloration des racines pigmentées en microscopie optique conventionnelle, l'emploi du KOH dans ce protocole de transparisation à jusque-là été évité afin de prévenir l'oxydation des polyphénols (et la coloration brune qui en résulte), ainsi que la dégradation du tissu (au vu des caractéristiques corrosives de la potasse caustique). Toutefois, au vu de ces résultats il s'avérerait pertinent d'employer le KOH afin d'augmenter la perméabilité du tissu racinaire.

Dans un premier temps, et afin d'éviter de fragiliser le tissu en passant le traitement KOH avant les étapes de perméabilisation déjà optimisées (digestion enzymatique et isopropanol), le traitement à 10% KOH à T°C ambiante a été réalisé après ces étapes et avant le bain de plusieurs semaines dans l'AT. Deux temps d'incubation ont été testés 30min et 1h. La coloration brune due à l'oxydation du tissu a été observée dès 30min. Bien que cette coloration soit affaiblie par l'étape de transparation dans le ClearSeeAlpha, ce traitement a considérablement dégradé la transparence du tissu (Figure 33).



Figure 33 : Racines mycorhizées de Riparia et transparisées (CTR complet + fin iDISCO+) avec étape d'incubation au KOH avant la première incubation dans ClearSeeAlpha. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16, immersion 100% glycérol). Lumière transmise.

Dans un second temps, le traitement au KOH a été placé en tout début de protocole, après fixation et blocage. La coloration brune a également eu lieu, mais elle a été complètement supprimée par l'étape de dépigmentation qui lui a succédé. Là encore, l'incubation a été testée pendant 30min et 1h, avec 2 temps de digestion enzymatique de 30min et 1h. La formule la plus drastique (1h KOH et 1h digestion enzymatique, [Figure 34](#)) a donné les meilleurs résultats aussi bien pour la qualité de transparisation (notamment par rapport au cylindre central, flèches noires [Figure 34](#), colonne A), que pour la pénétration des Ac dans le tissu puisque le marquage est présent au-delà de 2 μ m à partir de la section transversale de la racine ([Figure 34](#), B). Aucun écrasement n'a été observé, l'intégrité tissulaire est donc conservée ([Figure 35](#), A).

Le PT avec immunomarquage ainsi mis au point est résumé par la [Figure 35](#), B et C, et est nommé iCTR (immunolabelling of Cleared Tannic Roots).

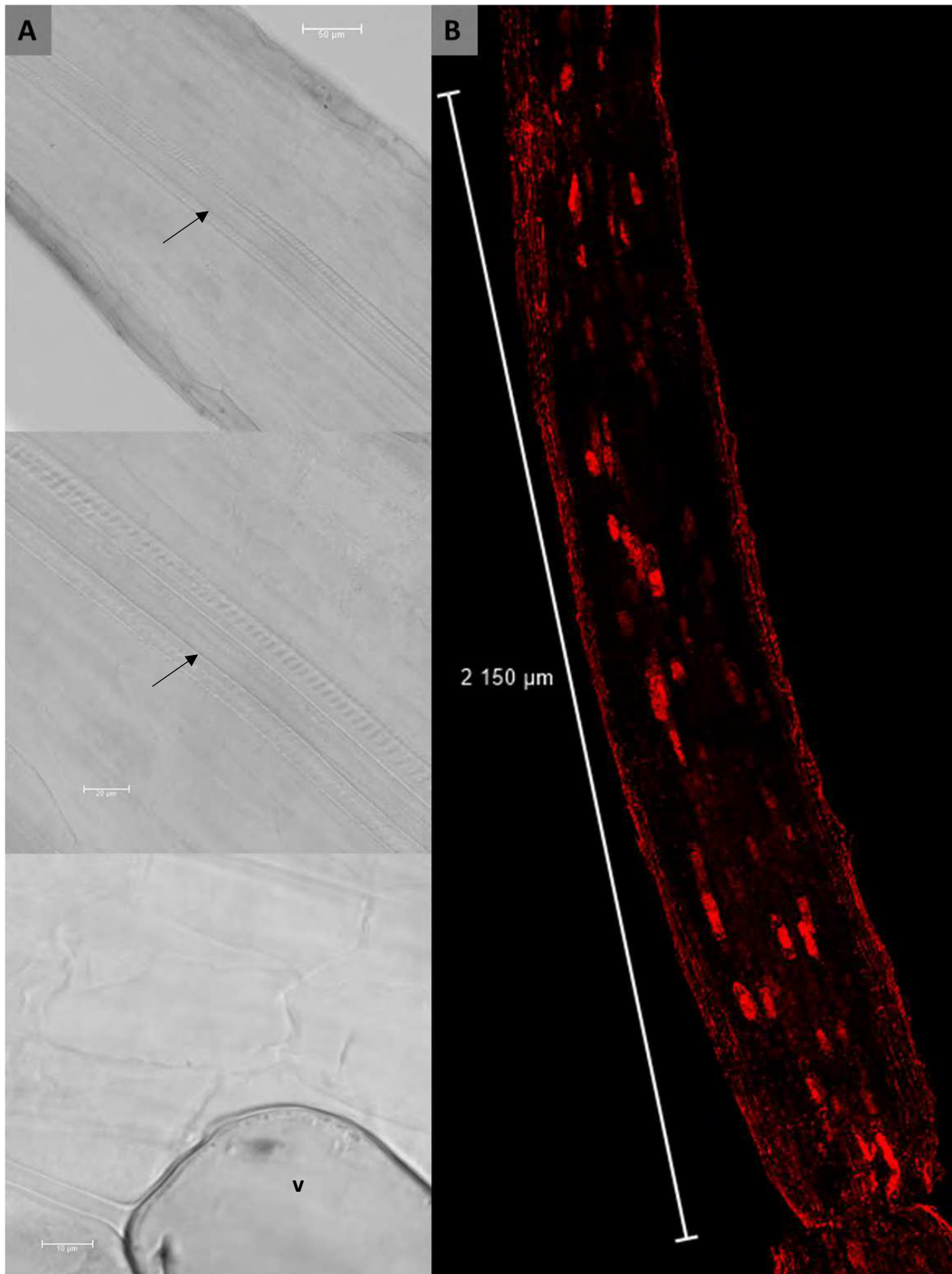


Figure 34 : Racines mycorhizées de *Riparia* et transparisées (CTR complet + fin iDISCO+) avec étape d'incubation au KOH avant dépigmentation. Lumière transmise (A), **immunomarquage** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) en projection maximale (B). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif x16, immersion 100% glycérol, compensation de l'excitation laser en z). *vésicule (v)*, *flèche indiquant le cylindre central*.

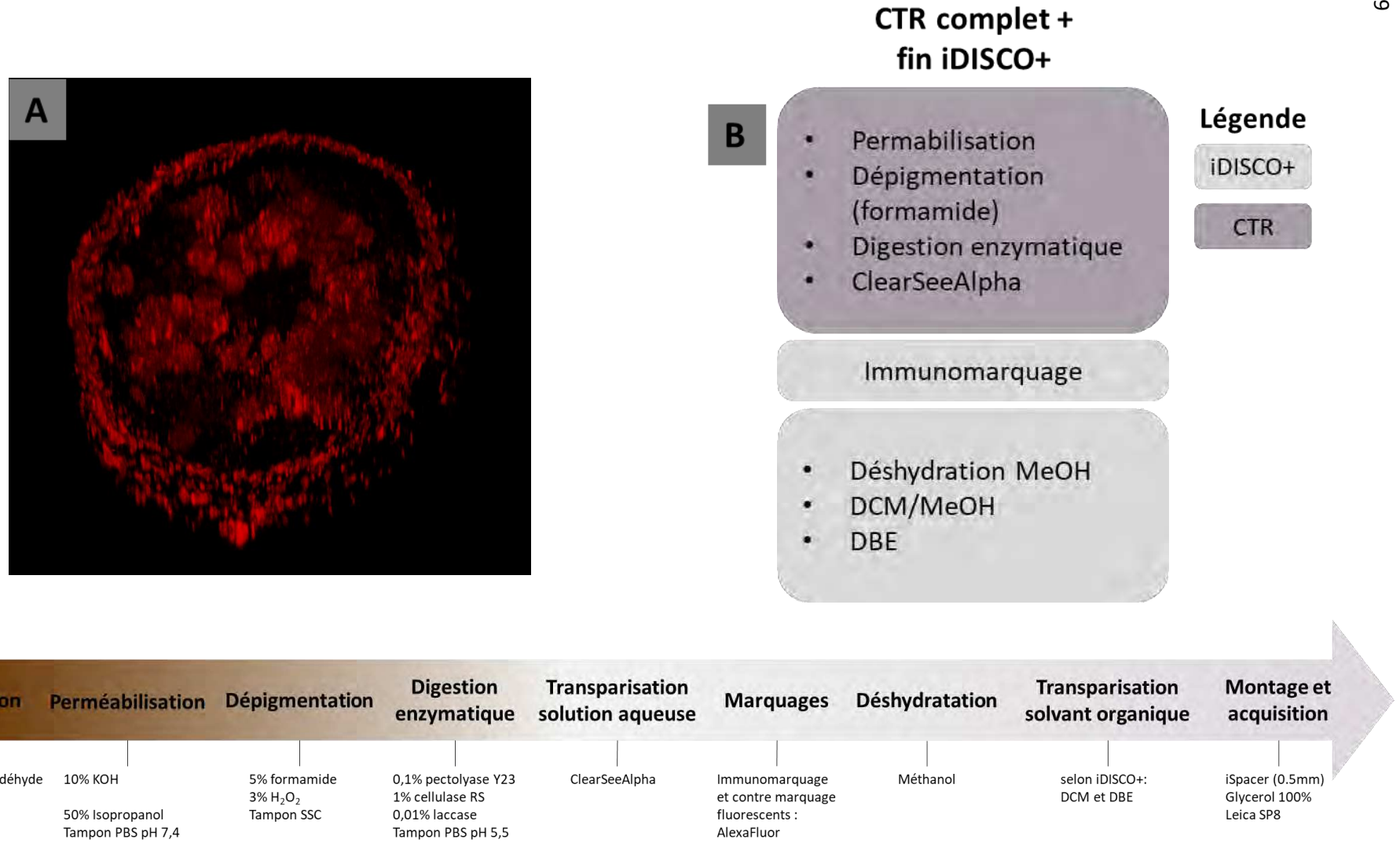


Figure 35 : Vue x,z de tronçon racinaire (A), immunomarquage à proximité des arbuscules visible sur toute l'épaisseur de la racine (z= 300µm). Schéma de synthèse de l'optimisation du protocole (B), frise des étapes détaillées du protocole de transparisation de racines tanniques compatible avec l'immunomarquage (iCTR) (C).

On notera plusieurs limites à ce PT qu'il sera nécessaire de corriger par la suite. Pour cause, on constate des inhomogénéités de marquage WGA sur la longueur de la racine, auparavant prises pour une absence de structure fongique en raison du manque de transparence (Figure 36, A, B et C). Etant donné que cette observation ne concerne pas l'immunomarquage (Figure 36, A), il sera conseillé d'augmenter le temps de marquage au WGA-Alexa488 afin d'en assurer la bonne pénétration au sein du tissu. De plus, l'observation doit être réalisée très rapidement après le passage en DBE (le protocole iDISCO initial préconise un temps d'incubation de 2h), car on constate une perte de transparence sûrement liée à dégradation, ou tout du moins à l'oxydation du tissu (bruit très semblable à celui observé en Figure 33, page 66, dû au premier traitement KOH), plus particulièrement localisé au niveau de l'épiderme du tissu racinaire (Figure 36, D).

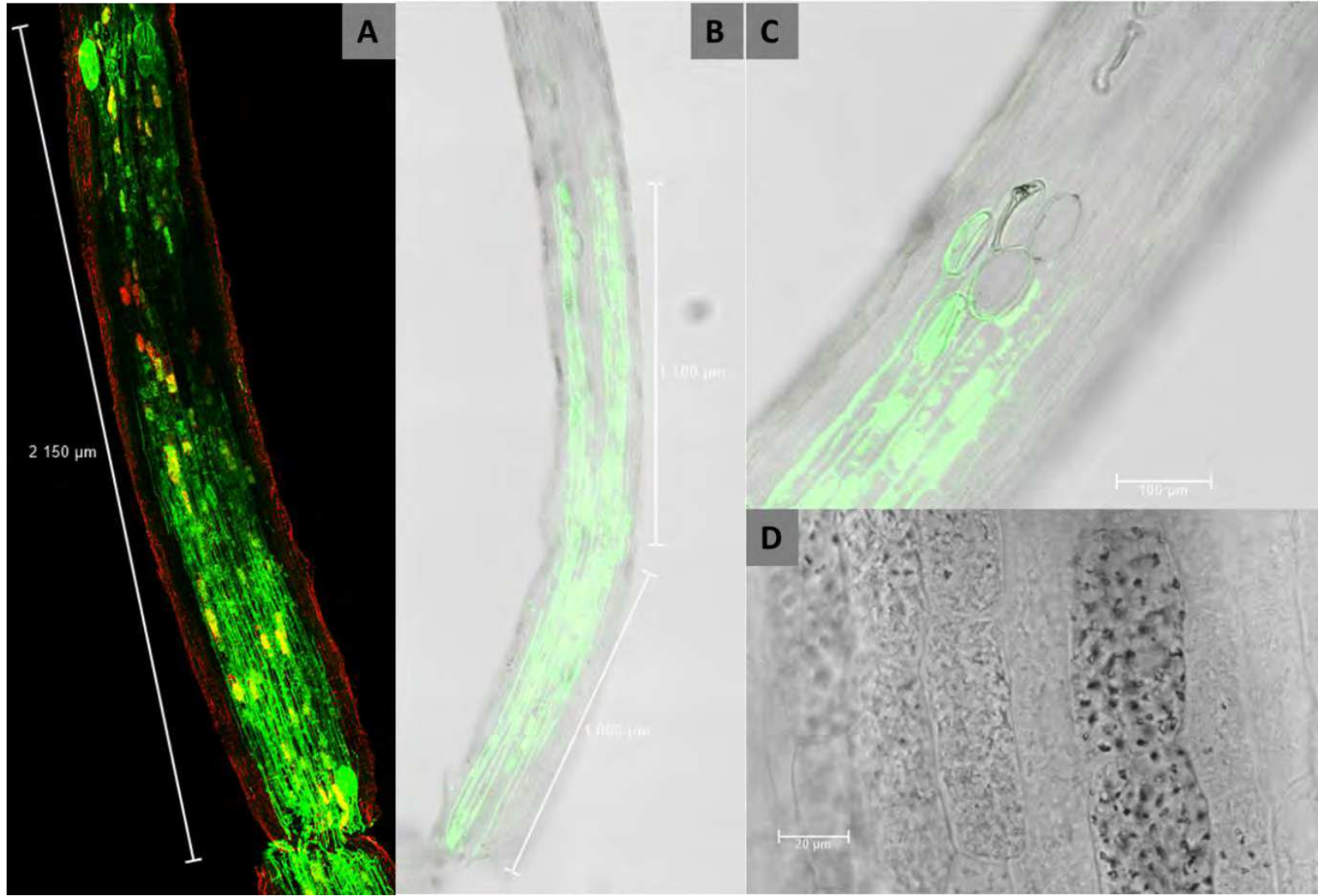


Figure 36 : Racines mycorhizées de *Riparia* transgénérées (iCTR).
Immunomarquage avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{exc} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) selon protocole iDISCO+ et structures fongiques contre-marquées au **WGA-Alexa488** (λ_{exc} 488nm, λ_{em} 509nm – 557nm). Signaux fluorescents en projection maximale, acquisition en mode séquentiel (A). Observation le lendemain de la dernière étape de transgénération (J+1 : A, B et C) et à J+3 (D). Acquisition au

II.3.5. Impact de la condition P sur l'expression de VvPT4

Afin d'appréhender l'effet du P sur la localisation tissulaire de VvPT4 en condition mycorhizés, des racines de *Riparia* soumises à différentes concentrations en $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (§II.2.2_ culture des plantes) ont été immunomarquées sur coupes (Figure 37) et également après transpiration (Figure 38).

La condition 0,01mM de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ appliquée dans la solution nutritive Hoagland (§II.2.2) correspond à une concentration 10 fois inférieure à notre condition basale de culture sans traitement particulier ($[\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4] = 0,1\text{mM}$) lors de la mise au point de l'immunomarquage sur racine de vigne (§II.3.4). Dans cette condition P, on retrouve l'immunomarquage au niveau de membrane plasmique des cellules NM et en périphérie des arbuscules matures, au niveau de la membrane périarbusculaire (Figure 36). Dans la condition 2mM de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, soit 20 fois supérieure à la condition basale, on ne note pas de différence concernant le marquage membranaire des racines NM, mais le marquage semble nettement impacté en condition M. L'élévation forte de la concentration en P induit une dégénérescence arbusculaire plus importante (Smith et al., 2011) qui concerne la grande majorité des arbuscules dans notre condition 2mM, allant jusqu'à rendre très difficile l'observation d'arbuscule mature. Lorsque la dégénérescence arbusculaire est avancée et que l'arbuscule est totalement effondré (ac) le contre-marquage de la chitine est très affaibli, et l'immunomarquage est complètement absent. Lorsque l'arbuscule entame sa dégénérescence, l'immunomarquage n'est plus homogène, il semble cloisonné laissant suggérer une relocalisation et/ou recyclage du transporteur concerné de la membrane périarbusculaire au cours de ce processus. De plus, les rares arbuscules matures observés dans cette condition ne semblent pas remplir le volume de la cellule et bien que le marquage de la chitine soit bien présent, l'immunomarquage quant à lui en est totalement absent. De plus on notera qu'aucune différence de structure ni de marquage n'a été relevé au niveau des vésicules du champignon et que la quantité de granules d'amidon semble bien moindre en condition 2mM P, comparée à la condition 0,01mM autant pour les NM que pour les M.

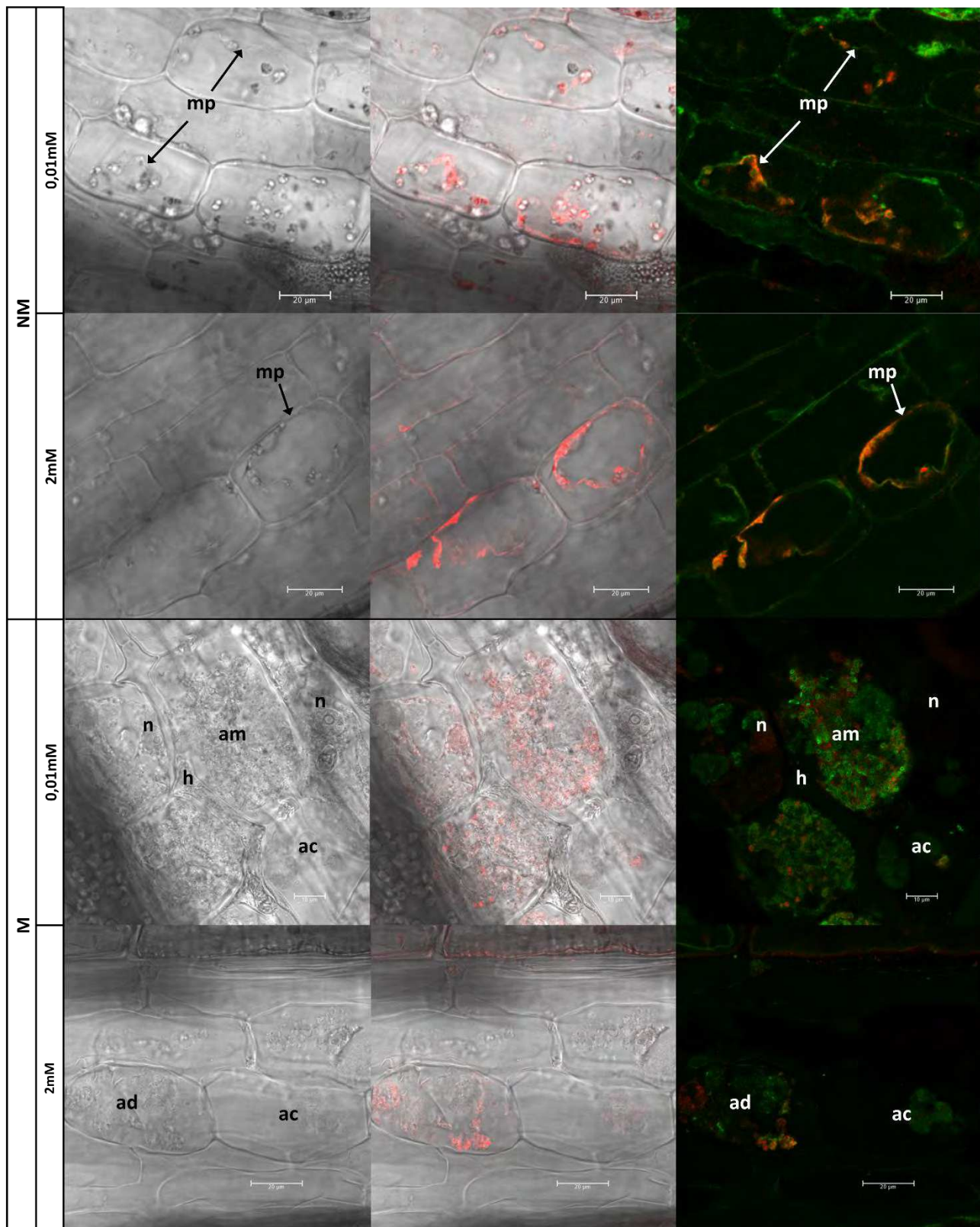


Figure 37 : Coupes longitudinales de racines mycorhizées de *Riparia* (100 μ m), cultivées dans différentes conditions phosphatées. **Immunomarquage** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) et structures fongiques contre-marquées au **WGA-Alexa488** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 509nm - 557nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, condition NM objectif x20, M 0,01mMP objectif x63 immersion à huile, M 2mMP objectif x40 immersion à huile), en mode séquentiel, images non traitées. *arbuscule mature (am)*, *arbuscule dégénéré (ad)*, *arbuscule collapsé (ac)*, *membrane plasmique (mp)*, *hyphe (h)*, *noyau (n)*.

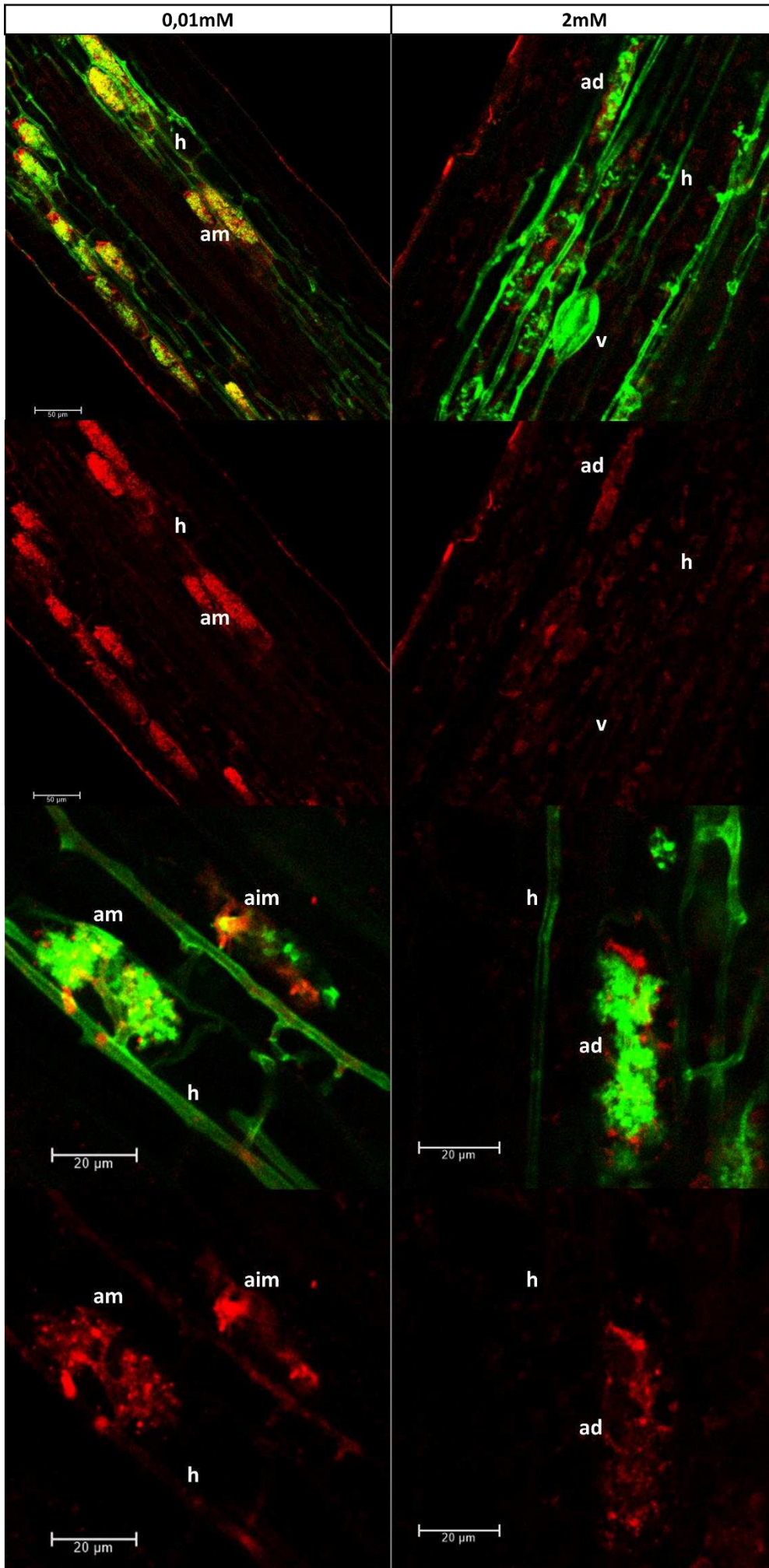


Figure 38 : racines mycorhizées de *Riparia* et transparasées (iCTR), cultivées dans différentes conditions phosphatées (0,01mM et 2mM P). **Immunomarquage** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{em} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) et structures fongiques contre-marquées au **WGA-Alexa488** (λ_{em} 488nm, λ_{em} 509nm - 557nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x16 à immersion glycérol 100%), acquisition en mode séquentiel, images non traitées. Superposition des deux signaux fluorescents. *arbuscule mature* (*am*), *arbuscule dégénéscent* (*ad*), *arbuscule immature* (*aim*), *hyphe* (*h*).

Sur racines transparisées, les arbuscules collapsés précédemment décrits sur coupes de racines de vigne ne sont pas visibles. Cela peut être dû au fait que la transparisation en ClearSeeAlpha éteint les signaux fluorescents faibles (d'autofluorescence et de WGA aspécifique). Néanmoins les structures fongiques viables sont très bien marquées et on peut voir des différences notables concernant l'immunomarquage dans les différentes conditions de traitement P. Comme vue sur coupes, pour la condition 0,01mM, l'immunomarquage est homogène au niveau de la membrane périarbusculaire des branches fines de l'arbuscule mature et de manière encore lâche en contact avec l'arbuscule immature (aim, [Figure 38](#), colonne gauche). Pour la condition 2mM, les branches des arbuscules semblent moins fines et moins bien définies en WGA, l'immunomarquage n'est pas homogène, il ne correspond plus à des branches fines d'arbuscules mature mais correspondrait aux arbuscules dégénérés observés sur coupes. Sur racines transparisées NM ([Figure 39](#)), le même marquage de VvPT4 que sur coupe, au niveau de la membrane plasmique, est présent. Il est moins bien défini, en raison d'un moins grand grossissement (limité par la distance de travail des objectifs), et par l'acquisition en profondeur dans le tissu. On notera tout de même une bonne qualité d'image puisque celles-ci ne sont pas traitées. Par ailleurs, la transparisation a considérablement diminué l'autofluorescence dans le vert et l'aspécificité du WGA Alexa488 constaté sur coupe. Des racines contrôles de chaque conditions ont été marquées sans Ac I^{aire} ([Figure 40](#)), et dans ce cas aucune aspécificité de l'Ac II^{aire} n'est relevée.

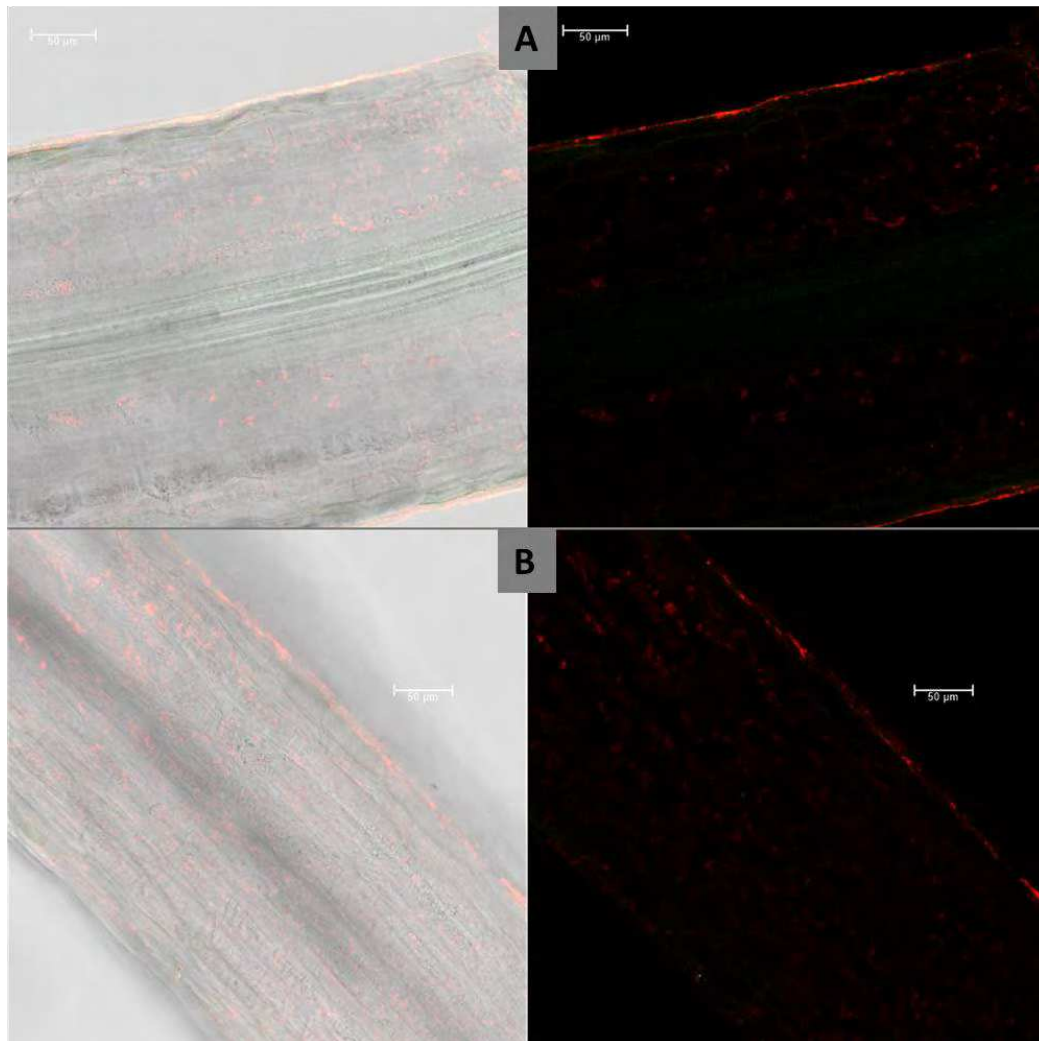


Figure 39 : Racines de *Riparia* non - mycorhizées et transparentées (iCTR), cultivées dans différentes conditions phosphatées. NM 0,01P (A), NM 2P (B). **Immunomarquage** avec un Ac primaire anti-VvPT4, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) et structures fongiques contre-marquées au **WGA-Alexa488** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 509nm - 557nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x16 à immersion glycérol 100%), acquisition en mode séquentiel, images non traitées. Superposition des deux signaux fluorescents.



Figure 40 : Racines mycorhizées de *Riparia* puis transparentées (iCTR). **Immunomarquage** sans Ac primaire, Ac secondaire couplé à l'Alexa633 (λ_{ex} 638nm, λ_{em} 643nm – 669nm) et structures fongiques contre-marquées au **WGA-Alexa488** (λ_{ex} 488nm, λ_{em} 509nm - 557nm). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x16 à immersion glycérol 100%), en mode séquentiel, images non traitées. Superposition des deux signaux fluorescents.

II.4. Microscopie électronique à transmission

II.4.1. Micromorphologie sur racine de Riparia en condition P

Afin de préparer l'immunomarquage, des observations en microstructures (imprégnation en résine hydrophobes) sont réalisées. En effet, dans ce type de préparation l'ensemble des composants tissulaires, et notamment les membranes, sont mieux conservés que par les résines hydrophiles utilisées pour l'immunomarquage. Il était donc pertinent d'observer l'ultrastructure dans nos différentes conditions afin de pouvoir mieux identifier la localisation exacte de l'immunomarquage par la suite.

- **Préparation des échantillons**

Les plants de Riparia ont été cultivés comme précédemment décrit (§II.2.2.), c'est-à-dire en différentes conditions de concentrations P. Comme pour la section II.3. dans son intégralité, les 4 conditions imagées sont M, NM, 0,01mM et 2mM [NH₄H₂PO₄]. Seules quelques micrographes sont présentés ici, les NM ne sont pas montrés.

Les fragments racinaires de 1 à 3mm fraîchement récoltés sont tout d'abord fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2,5%, paraformaldéhyde 4% dans tampon phosphate 0,1M, pH 7,2 (tampon P), 1h à 4°C puis la solution est changée et l'incubation se poursuit sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont rincés 3 fois à 4°C avec du tampon P et incubés 2h dans une solution d'oxyde d'osmium (OsO₄) à 1% dilué dans du tampon PO₄⁻ à 4°C. Ensuite les échantillons sont rincés 5x5min à l'eau ultrapure puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol (30%, 50%, 70%), puis placés dans un automate micro-ondes pour la suite du protocole (AMW, Leica). Ici, la déshydratation à l'éthanol se poursuit (3x95%, 3x100%) et l'imprégnation en résine Epon est réalisée (3x acétone 100% ; successivement 1/3, 1/1 et 3/1 Epon/acetone ; puis 3x100% Epon). La résine est ensuite polymérisée à 60°C. (Etape réalisée par Laure Avoscan)

Les coupes de 90nm ont été réalisées à l'ultramicrotome (Leica), puis contrastées à T°C ambiante : Uranyless (Delta microscopies) 5min, rinçage 3x 3min à l'eau ultrapure, Acétate de plomb (Delta microscopies) 1min et rincées de la même manière. (Etape réalisée par Joël Michel).

- **Résultats**

Grâce à cette technique de fixation et d'imprégnation, nous pouvons distinctement discerner les différentes structures au sein de la cellule végétale. Bien que toutes les grilles n'ont pu être encore observées, on retrouve ici les tendances observées en transpiration : il y a très peu d'arbuscules matures (am) dans la condition 2mM P (Figure 41, B), alors qu'ils sont bien présents en 0,01mM (Figure 41, A). De plus, sur arbuscules matures, la membrane périarbusculaire (mpa) est à proximité des branches fines de l'arbuscule et est très bien organisée, délimitant nettement l'espace périarbusculaire (epa). Alors qu'elle apparaît un peu désorganisée au niveau de l'arbuscule dégénéré (ad) et très éloignée, avec très peu de replis, et ainsi plus semblable à une membrane plasmique classique lorsque l'arbuscule est totalement collapsé (ac). Ces similitudes suggèrent que VvPT4, immunomarcqué par fluorescence, est sûrement un transporteur membranaire. Pour le confirmer, nous avons initié l'optimisation du l'immunomarquage avec un Ac II^{aire} couplé à l'or.

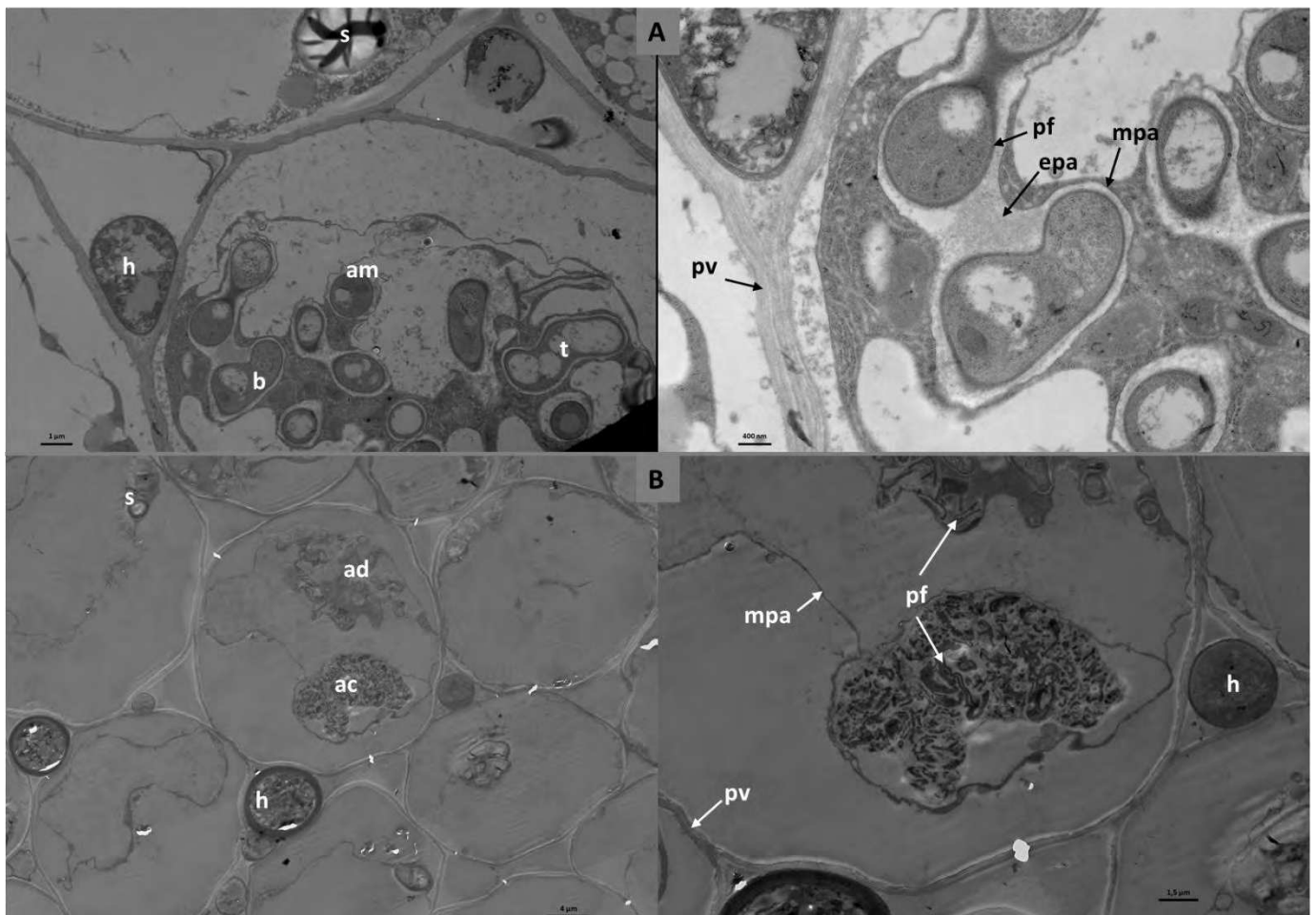


Figure 41 : Micrographes de racine de *Riparia* mycorhizée en condition P 0,01mM (A) et 2mM (B). Acquisition au microscope électronique à transmission (HT7800, Hitachi). arbuscule mature (am), uniquement visible dans cette condition P 0,01mM. branche (b), amidon (starch, s), hyphe intercellulaire (h), tronc (t), arbuscule dégénéré (ad), arbuscule collapsé (ac), paroi végétale (pv), paroi fongique (pf), espace périarbusculaire (epa), membrane périarbusculaire (mpa).

II.4.2. Prémices d'immunomarquages

- **Préparation des échantillons**

Les plants de *Riparia* ont été cultivés comme précédemment décrit (II.2.2), c'est-à-dire en différente condition de P. Comme pour la section II.3. dans son intégralité, les 4 conditions imagées sont M, NM, 0,01mM et 2mM [NH₄H₂PO₄].

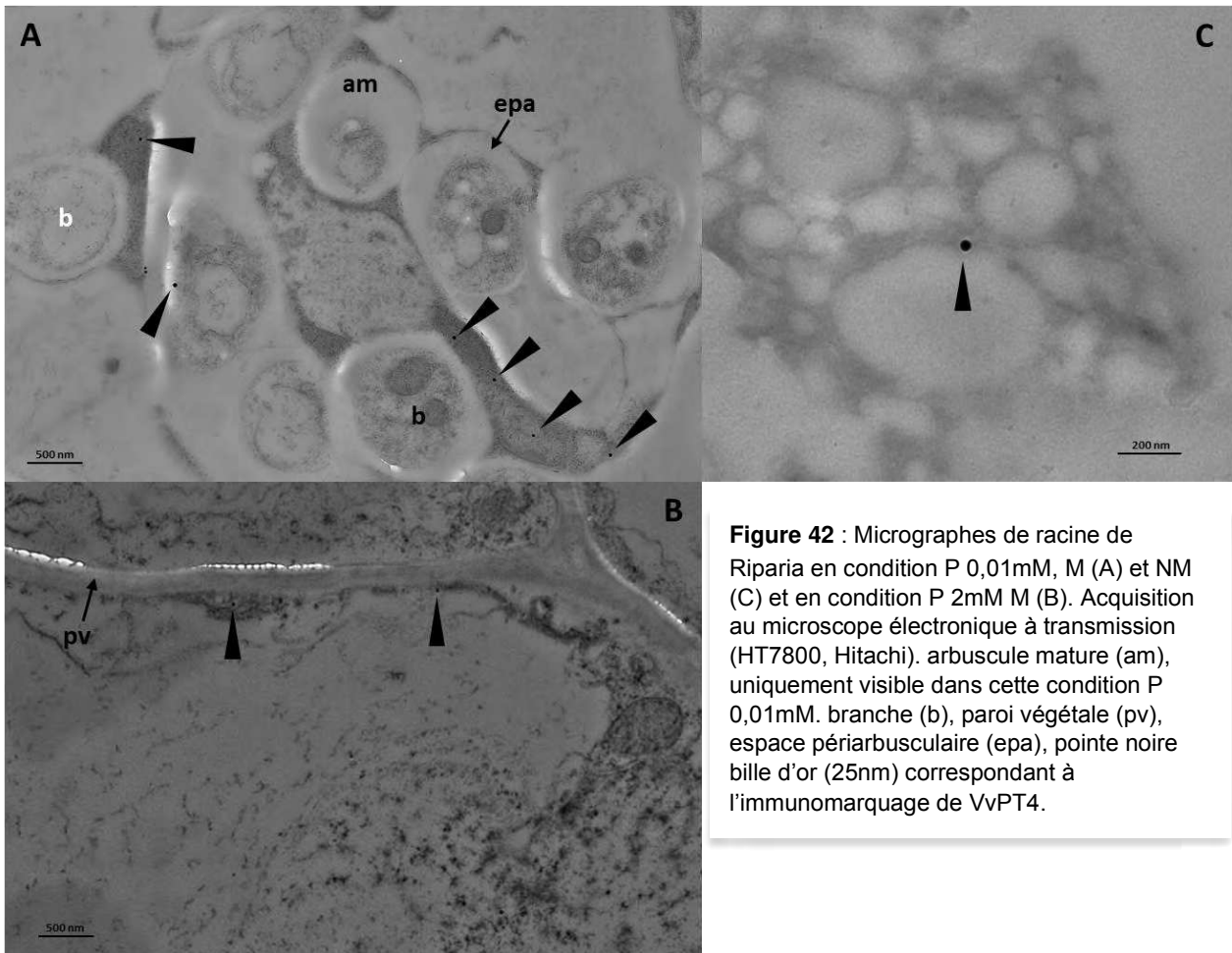
Des fragments de racines de moins de 3mm sont prélevés du système racine, cryoprotégés par de l'hexadecène et tout de suite cryofixés par congélation à haute pression (High Pressure Freezing, HPF, Leica HPM100) _ *Nota bene* : Cette technique de fixation n'a pas encore été testée sur racine de vigne et semble prometteuse (McDonald et Auer, 2006). Les échantillons sont ensuite placés dans un automate de cryosubstitution (Leica EM AFS2) pour être tout d'abord incubés dans une solution d'uranil acétate 0,2% dans de l'acétone anhydre à -90°C pendant 96h. La température est remontée à -80°C de manière progressive en 2h. De la même manière, le lendemain, la T°C est remontée jusqu'à -50°C en 6h et maintenue à -50°C pendant 24h. Ensuite les échantillons sont rincés pendant 24h dans de l'acétone pure, puis graduellement imprégnés par des dilutions de Lowicryl HM20 dans de l'acétone (10%, 25%, 50%, 75%, 90%, et 4x 100%) sur 3 jours. La polymérisation est réalisée à la lumière du jour à T°C ambiante. (Etape supervisée par Laure Avoscan).

Les coupes de 90nm sont réalisées à l'ultramicrotome (Leica). Une fois déposées sur grilles de Nickel, pourvues d'un film collodion, elles sont hydratées en PBS pendant 30min et bloquées en PBST-glycine 50mM 30min. Après trois rinçages de 5min et une incubation de 30min, elles sont incubées dans une solution d'Ac I^{aire} anti-VvPT4 (différentes dilutions en PBST-ASB 1% testées). Le lendemain, elles sont rincées 5x 5min en PBST-ASB1% et incubé dans l'Ac II^{aire} (chèvre anti-lapin couplé à une bille d'or de 25nm) dilué à 1/25 dans du PBST-ASB 1% pendant 1h à T°C ambiante. Les étapes de rinçages de 5min sont réitérées en PBST-ASB 1% et en eau ultrapure successivement, puis séchées à l'air libre. Les grilles sont ensuite contrastées par un bain d'Uranylex (Delta microscopies) 5min, rincées 3x 3min à l'eau ultrapure et séchées avant observation.

- **Résultats**

Comme annoncé, on peut voir sur les micrographes de la [Figure 42](#) que les membranes sont moins bien conservées que précédemment. L'immunomarquage semble convenir pour une dilution d'Ac I^{aire} 1/500 mais la HPF ne semble pas convenir comme méthode de fixation pour ces racines (observation confirmée par une expérimentation d'imprégnation en résine Spurr (pour obtenir l'ultrastructure) de racines préalablement fixées en HPF qui n'a pas fonctionné). En effet, contrairement à des racines fines d'*Arabidopsis thaliana* qui sont compatibles avec cette approche, l'intégrité du tissu racinaire de

vigne est compromise (ex. échantillons écrasés dans les blocs de résine, tissu qui présente de nombreux trous à la coupe). Pour dépasser cette limite, nous prévoyons une fixation conventionnelle (c'est-à-dire chimique) et une imprégnation LR white, déjà décrites dans la littérature sur vigne (Wang et al., 2016).



II.5 Perspectives

Le développement de l'immunomarquage sur racine mycorhizée de vigne transparisée ouvre beaucoup de perspectives, puisqu'elle vient compléter des approches 2D résolutive (microscopie photonique à haute résolution) ou très résolutive (ME), en apportant une approche résolutive en trois dimensions. Aussi, dans le contexte particulier de la SMA, on peut constater que les tissus tanniques sont très souvent un obstacle à l'observation en microscopie optique et que même les approches de ME peuvent être très laborieuses au regard de la résistance aux traitements (ex. fixation, imprégnation) du tissu racinaire de plantes d'intérêt agronomique comme la vigne.

Par ailleurs, la transparisation permettrait d'étudier un aspect non encore décrit dans la littérature, qui concerne l'impact des cycles végétatifs sur la répartition et l'activité du CMA. De plus, au vu de la pléthore de protéines impliquées et/ou régulées dans la SMA, cette approche permet d'observer des tendances générales selon les conditions, avant de cibler des organes, des tissus ou encore des types cellulaires particuliers lors d'approche à très haute résolution. Cependant, il est important de noter que les racines analysées ici, sont relativement jeunes (quelques mois) et qu'il sera nécessaire de poursuivre l'optimisation sur des racines issues de vignoble.

Une fois validé, cet immunomarquage fera l'objet d'un développement en corrélatif entre le microscope confocal et le MET. Cette approche pourrait nous permettre de localiser très précisément VvPT4 au niveau subcellulaire et ainsi d'en parfaire la description. Il reste néanmoins primordial, dans l'objectif d'une publication, que nous ayons optimisé l'extraction des protéines membranaires sur racines de vigne, afin de confirmer en Western Blot à la fois la présence de VvPT4 dans nos tissus et la spécificité de notre Ac. Par ailleurs, en couplant cet immunomarquage à notre projet d'analyser en microscopie électronique à transmission (MET) les racines transparisées, nous pourrions très certainement évaluer l'impact de la transparisation sur notre immunomarquage de protéines membranaires, et ainsi nous permettre d'anticiper au mieux les futures expérimentations avec d'autres Ac ^{aire} non encore caractérisés.

Chapitre III : Approches microspectrométriques des lipides symbiotiques

III.1. Introduction : le carbone dans la symbiose mycorhizienne

A l'échelle de la planète, les transferts de carbone (C) des plantes au CM, s'élèverait jusqu'à 5 milliards de tonnes de C par an (Bago et al., 2000). Par ailleurs il a été montré que les plantes mycorhiziennes alloues plus de C au CMA lorsque la concentration en P disponible est faible (Andrino et al., 2021). Ces études plutôt générales, révèlent la relation étroite entre les mécanismes d'échange de P et de C lors de la symbiose mycorhizienne à arbuscules.

II.1.1. Les sucres

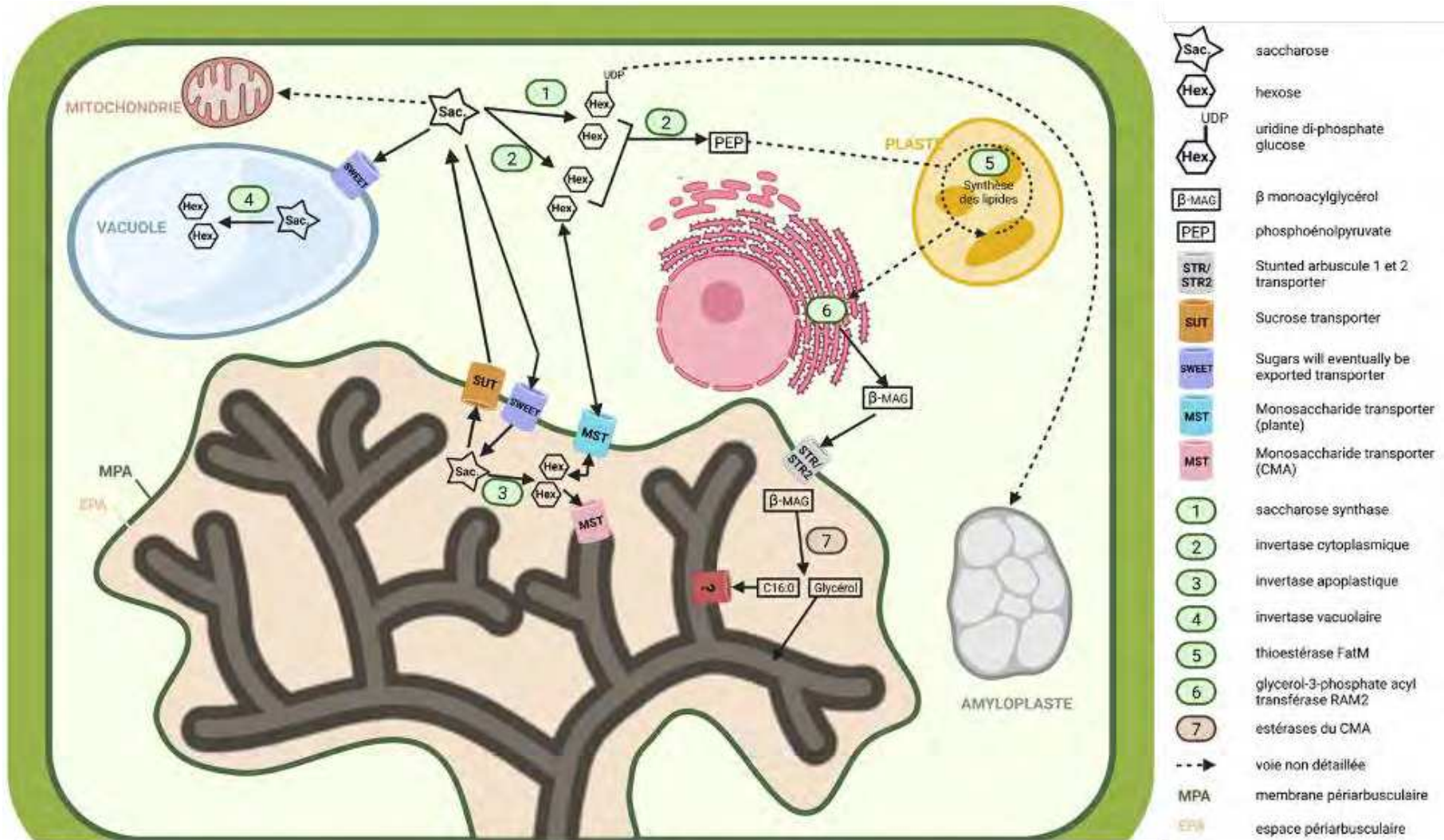
Les sucres ont longtemps été considérés comme la principale forme de transport de carbone vers les champignons mycorhiziens. De manière générale, les plantes transportent le C fixé via la photosynthèse sous la forme de saccharose par le phloème jusqu'au système racinaire où il y est déchargé avant d'être transporté dans les tissus. Au niveau des organes puits, le saccharose est clivé en hexoses par les invertases des plantes (Wipf et al., 2019).

En condition de mycorhization, les plantes redirigent entre 4 et 20% des photosynthétats produits vers les racines pour les CMA, ce qui représente un puit majeur pour la plante (Tomè et al., 2016). Par ailleurs, aucun gène codant pour des enzymes de clivage du saccharose n'a encore été identifié dans les génomes des CMA. Ceci implique que le saccharose alloué doit être hydrolysé en hexoses par la plante. Aussi, plusieurs gènes codant pour des invertases (apoplastiques, vacuolaires et cytoplasmiques) sont régulés à la hausse en conditions de mycorhization (Salmeron-Santiago et al., 2021). De même, l'expression des transporteurs de sucres est régulée en condition mycorhizée ; on peut par exemple citer certains SUT (SUCrose Transporters, impliqués dans le transport à longue distance du saccharose dans la plante), MST (MonoSaccharide Transporter, mobilisé dans les organes puits) ou encore certains SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter (Kryukov et al., 2021)). Ces transporteurs SWEET pourraient être à l'origine de l'efflux de sucre au niveau de la membrane périarbusculaire et de sa régulation, et pourrait donc avoir un rôle clé dans le maintien de la colonisation racinaire (Salmeron-Santiago et al., 2021).

Pour résumer, et de manière générale ([Figure 42](#)), en amont de la membrane périarbusculaire, les SUT et les SWEET permettent l'allocation de saccharose jusqu'aux cellules corticales arbusculées. Dans le cytoplasme, le saccharose peut (i) être dégradée en hexoses (par les saccharose synthases, invertases cytoplasmiques et vacuolaires) qui seront transportés dans l'espace périarbusculaire par les

MST ou les SWEET de la MPA ; ou (ii) être transporté à l'espace périarbusculaire via les SWEET de la MPA. Un fois dans l'espace périarbusculaire le saccharose peut (i) être hydrolysé (par les invertases apoplastiques), générant des hexoses disponibles pour le CMA, ou (ii) être réimporté via des SUT de la MPA vers le cytoplasme de la cellule végétale (Figure 42). Cette réimportation peut également concerner les hexoses via les MST, suggérant un contrôle particulier de l'allocation du C au CMA par la plante. On notera ici le rôle clé de la concentration de saccharose des différents compartiments dans la régulation passive de l'efflux de C au champignon de par les caractéristiques même des transporteurs SWEETs (uniport passif, Kryukov et al., 2021). Bien que le transportome précis impliqué dans l'efflux symbiotique des cellules hôtes vers l'apoplaste mycorhizien reste inconnu (Salmeron-Santiago et al., 2021; Wipf et al., 2019), les données de RNAseq suggèrent que la plante contrôle drastiquement l'allocation des sucres au CMA (Calabrese et al., 2019) et le maintien de la symbiose par ce biais (Salmeron-Santiago et al., 2021).

Du côté du CMA, plusieurs transporteurs de glucides ont été identifiés (Ait Lahmidi et al., 2016; Calabrese et al., 2019; Helber et al., 2011). Parmi eux, RiMST2 est un transporteur de monosaccharides exprimé au niveau de l'arbuscule et des hyphes intraradicaux, induit en condition de mycorhization. Il est le candidat idéal dans le rôle du transporteur d'hexose au travers de la membrane plasmique fongique, bien que l'identification et la caractérisation des transporteurs MST des CMA est toujours en cours aujourd'hui.



II.1.2. Les lipides

En plus des sucres, la plante hôte fournit également du C au CMA sous forme d'acides gras (Ag). Chez les plantes, la biosynthèse des Ag de novo a lieu dans les plastes et nécessite l'activité d'un complexe d'acides gras synthétase (FAS 1). Les génomes des CMA caractérisés jusqu'à présents ne possèdent pas les gènes codant pour FAS 1 (*R. irregularis* (Wewer et al., 2014), *Gigaspora rosea* (Tang et al., 2016), *R. clarus* (Kobayashi et al., 2018)) (Keymer et Gutjahr, 2018), alors que très conservés chez les eucaryotes, aussi bien chez les champignons que chez les animaux pour la synthèse des Ag en C16:0 et en C18:0 (Salmeron-Santiago et al., 2021). Il a été montré que *R. irregularis* ne peut pas synthétiser les Ag de novo à partir de sucres (Jiang et al., 2017) et que les Ag transférés au CMA sont de type C16:0 (Keymer et al., 2017). De plus, les CMAs possèdent les gènes codants pour les protéines nécessaires à la modification des Ag (dégradation et élongation ; Wewer, 2014), et la présence des produits de ces réactions a été confirmé (Kameoka et Gutjahr, 2022). Les CMA sont donc dépendants de la plante pour la synthèse d'Ag, ce qui représente la raison la plus probable à la biotrophie obligatoire de ces organismes. Pour cause, les CMA sont très dépendants des Ag puisqu'ils stockent entre 40 et 60% du C sous forme de triacylglycérols (TAG), formant des gouttelettes lipidiques dans les hyphes, les vésicules et les spores (Bago et al., 2000; Wewer et al., 2014). Par ailleurs, les besoins en lipides lors de l'établissement de la symbiose, notamment au niveau de cellules arbusculées, pour les deux partenaires, sont très importants. En effet, les lipides sont nécessaires aussi bien pour générer la MPA (par exocytose, (Harrison et Ivanov, 2017)), que pour générer la membrane fongique qui se développe pour former l'arbuscule. Les surfaces d'échange sont considérablement grandes au vu des très nombreuses ramifications observées en MET (Ivanov et al., 2019; Roth et al., 2019), et la composition lipidique de la MPA semble varier en fonction des stades de développement arbusculaire (Ivanov et al., 2019).

La mise en place, au cours de l'évolution, d'une voie de biosynthèse des lipides spécifiques aux plantes mycorhiziennes a été appuyée par le fait que 12 gènes liés à la biosynthèse lipidique sont exclusivement présents dans les génomes des plantes mycorhiziennes (Bravo et al., 2016). Parmi ces gènes, on trouve celui codant pour la thioestérase FatM, dont le rôle est de libérer les Ag en C16:0 de la voie d'élongation des Ag. Une fois en dehors du plaste l'Ag 16:0 est couplé au coenzymeA (CoA) et est transformé sous l'action de la glycerol-3-phosphate acyl transférase RAM2 (localisée dans le réticulum endoplasmique (MacLean et al., 2017; Rich et al., 2017)) en β monoacylglycérol (β MAG) 16:0. Ce composé peut être exporté à travers la membrane périarbusculaire par les transporteurs semi-ABC STR et STR2 (Figure 42). Chez les bryophytes, les homologues de STR2 et RAM2 sont présents et a priori fonctionnels (Rich et al., 2021), démontrant ainsi que la voie de biosynthèse d'Ag chez les plantes mycorhiziennes est contrôlée par des mécanismes communs au travers des divergences évolutives.

Chez les mutants *fatm* et *ram2*, pour lesquels la biosynthèse des C16:0 n'est pas aboutie, les arbuscules ne se forment pas correctement, la colonisation racinaire est réduite, le CMA ne forme plus de vésicules et finit par mourir (pour revue voir Kameoka et Gutjahr, 2022). Ces résultats confirment l'auxotrophie des CMA vis à vis des Ag. Lorsque les gènes codant pour STR et STR2 sont mutés, le développement arbusculaire est là aussi très négativement impacté, le transfert de lipides au CMA est inhibé et du β MAG est accumulé au niveau des cellules arbusculées. Toutefois, dans ces mutants *str* et *str2*, le champignon survit et l'activité de transport, ainsi que la spécificité du substrat de STR et STR2 n'ont pas encore été démontrés, laissant suggérer que d'autres transporteurs, d'autres précurseurs lipidiques ou encore d'autre mode de transfert de lipides sont impliqués dans l'allocation du C au CMA. Pour cause, de manière générale, des études au niveau génétique et biochimique ont suggérées que chez les plantes, les composés hydrophobes sont sécrétés par des vésicules exocytées ou via des transporteurs ABCG (sous classe des transporteur de la famille ABC, dont font partie les STR) et que les deux voies pourraient s'établir de manière coordonnées (Ichino et Yazaki, 2022).

Par ailleurs, de nombreuses vésicules, ainsi que des protrusions de la MPA ont été observées dans l'espace périarbusculaire en MET classique et en tomographie (Ivanov et al., 2019; Roth et al., 2019). Il n'est pas impossible que ces vésicules extracellulaires soient impliquées dans la sécrétion et le transport de lipides, puisque des vésicules très similaires morphologiquement ont été décrites comme impliquées dans les mécanismes de subérisation du cadre de Caspari (De Bellis et al., 2022). Aussi, les protrusions membranaires interconnectées de la MPA pourraient correspondre à des bourgeonnements de vésicules (Rilla, 2021) ou participer à l'organisation spatiale des nombreuses protéines de transport au niveau de la MPA (Roth et al., 2019). Mais ces dernières hypothèses restent à confirmer, et les rôles des protéines STR dans ce caractère phénotypique à étudier.

Les mécanismes d'import de lipides du CMA, depuis l'EPA au travers de sa membrane plasmique sont inconnus. Il a été confirmé par marquage isotopique que les deux produits de l'hydrolyse du β MAG (le glycérol et l'Ag en C12, C16 C14) peuvent être importer à l'intérieur du CMA (Luginbuehl et al., 2021). Toutefois, les mécanismes en jeu dans ce transport, ainsi que l'import ou non du β MAG lui-même ne sont pas déterminés. Des gènes ont été identifiés dans le génome de *R. irregularis* comme des homologues de transporteurs d'Ag (en C14, C16 et C18 exogènes) membranaires décrits chez la levure. *RiFAT1* et 2 sont surexprimés dans le mycélium intra racinaire et leur expression hétérologue en levure augmente l'import d'Ag en C14, C16 et de β MAG. Bien que ces résultats en fassent des candidats prometteurs pour le transport de lipide dans le CMA, l'activité de ces transporteurs reste à caractériser (Brands et Dörmann, 2022).

II.1.3. L'interconnexion entre le P et le C

Le statut P de la plante pourrait avoir un rôle important dans l'allocation de sucres au CMA de part (i) la dépendance au P de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse du saccharose, (ii) l'expression variable de certains SUT selon la condition en P, (iii) l'amélioration de la colonisation racinaire lors de la surexpression d'un transporteur *SUT* (*SUT1*) par transformation génique en condition de P élevée. Ces résultats suggèrent que l'approvisionnement en C sous forme de sucres au CMA, finement régulée par la plante, varie en fonction de la concentration en P du milieu. Mais des recherches supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider le rôle exact du P dans ces transferts de C (pour revue voir Salmeron-Santiago et al., 2021).

L'influence de la disponibilité du P_i sur les protéines végétales qui dirigent les flux de lipides dans les arbuscules n'a pas encore été étudiée. Néanmoins, une étude montre que l'expression de *STR* et *STR2*, a été réprimée par des concentrations élevées de P_i chez le pétunia (Nouri et al., 2021), mais pas chez le peuplier (Calabrese et al., 2019). Ces résultats suggèrent que selon l'approvisionnement en P_i , le symbiote peut être rationné en lipides, tout du moins chez les végétaux annuels. De plus, chez le lotier, *LjPT4* et *RAM2* sont sous le contrôle du même promoteur (*CBX1*), tout comme *MtPT4* et *STR* (*WR15*). Ces données suggèrent que la voie de biosynthèse des lipides des plantes mycorhizienne et la voie mycorhizienne d'absorption du phosphate sont intimement liées. Par ailleurs, il a été prouvé que l'expression de *RiMST2* n'était pas dépendante de la concentration en P_i (Calabrese et al., 2019).

III.2. Lipides en microscopie

En microscopie à fluorescence le marqueur lipophile le plus communément utilisé est le rouge de Nile, qui a une affinité pour les lipides. Il a notamment été utilisé sur racine mycorhizée d'*Oriza sativa* (Kobae et al., 2014), *Solanum lycopersicum* (Feng et al., 2020), *Marchantia paleacea* (Rich et al., 2021), *M. truncatula* (Luginbuehl et al., 2021), mais les données sont pour l'instant manquantes sur vigne mycorhizée.

III.2.1. Microscopie optique

Les racines de *M. truncatula* mycorhizées (§I.4.1_ culture de la plante modèle) et de *Riparia* (§II.2.2_ culture des plantes) sont fixées, enrobées en Agarose comme précédemment (§II.3.3_ immunomarquage sur coupes) et coupées au vibratome à 40 μ m d'épaisseur. Les coupes sont ensuite marquées au Rouge Nile dilué dans l'eau à 1 μ g/mL (stock à 5mg/mL DMSO) pendant 30min à T°C ambiante avec agitation (50rpm). Les échantillons sont ensuite abondamment rincés à l'eau, montés en glycérol 100% entre lame et lamelle puis observés au microscope confocal.

En condition NM, le marquage se localise à proximité immédiate de la MP au niveau d'inclusions cytoplasmiques et autour du noyau (Figure 44). On notera la présence de grosses gouttelettes dense aux photons dans certaines cellules corticales, qui ne répondent pas au marquage au Rouge de Nile (Figure 44, B (g)).

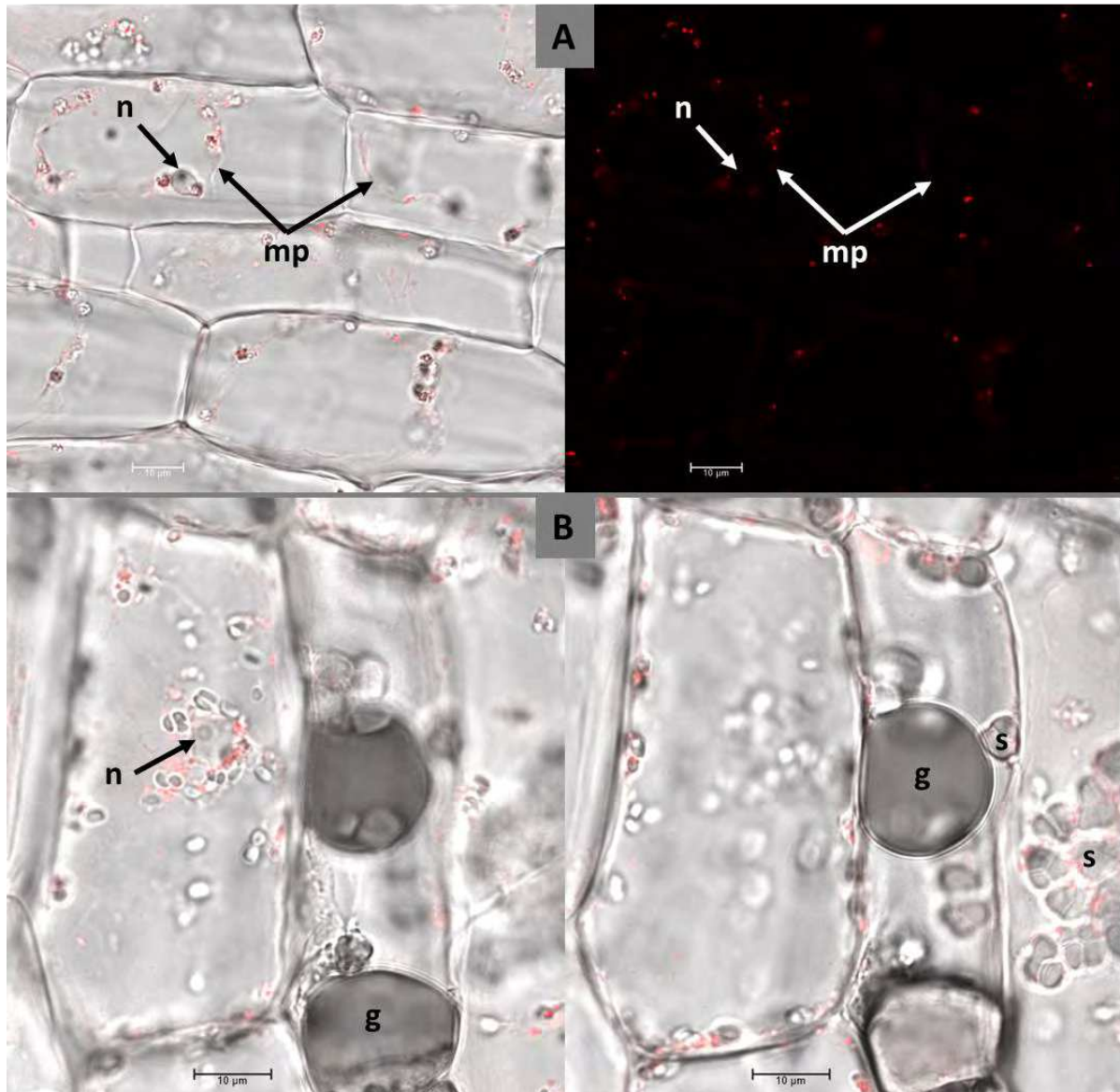


Figure 44 : Coupe de racine non-mycorhizée de Riparia (40µm) marquée **au rouge de Nile** (λ_{ex} 552nm, λ_{em} 570nm - 623nm A et B). *noyau (n)*, *gouttelette (g)*, *amidon (starch, s)*, *membrane plasmique (mp)*. Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x63 à immersion huile), images non traitées.

En condition M, quelque soit la condition P (0,01mM [Figure 45](#), 2mM [Figure 46](#)), on remarque très peu de gouttelette lipidique autour des arbuscules matures (am) ([Figures 45 et 46, A](#)), aucune lorsque l'arbuscule est totalement collapsé (ac) ([Figure 45, B](#)), et de nombreuses gouttelettes lorsque l'arbuscule est dégénéré (ad) ([Figures 45, B et C, Figure 46, A](#)).

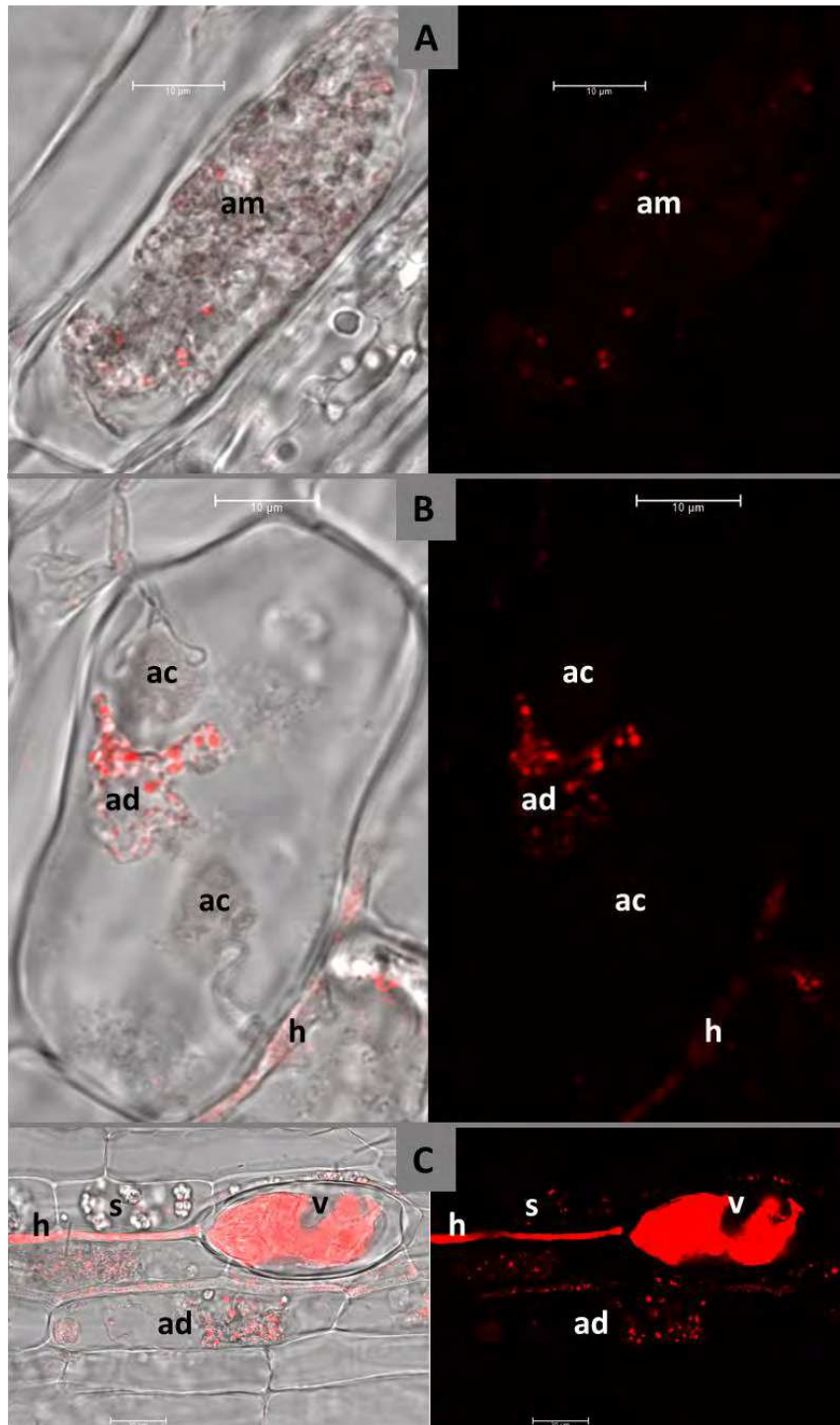


Figure 45 : Coupes de racine mycorhizées de *Riparia* (40µm), condition 0,01mM P, marquées **au rouge de Nile** (λ_{ex} 552nm, λ_{em} 570nm - 623nm A et B). amidon (starch, s), arbuscule mature (am), arbuscule collapsé (ac), arbuscule dégénéré (ad), vésicule (v), hyphe (h). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x63 à immersion huile), images non traitées.

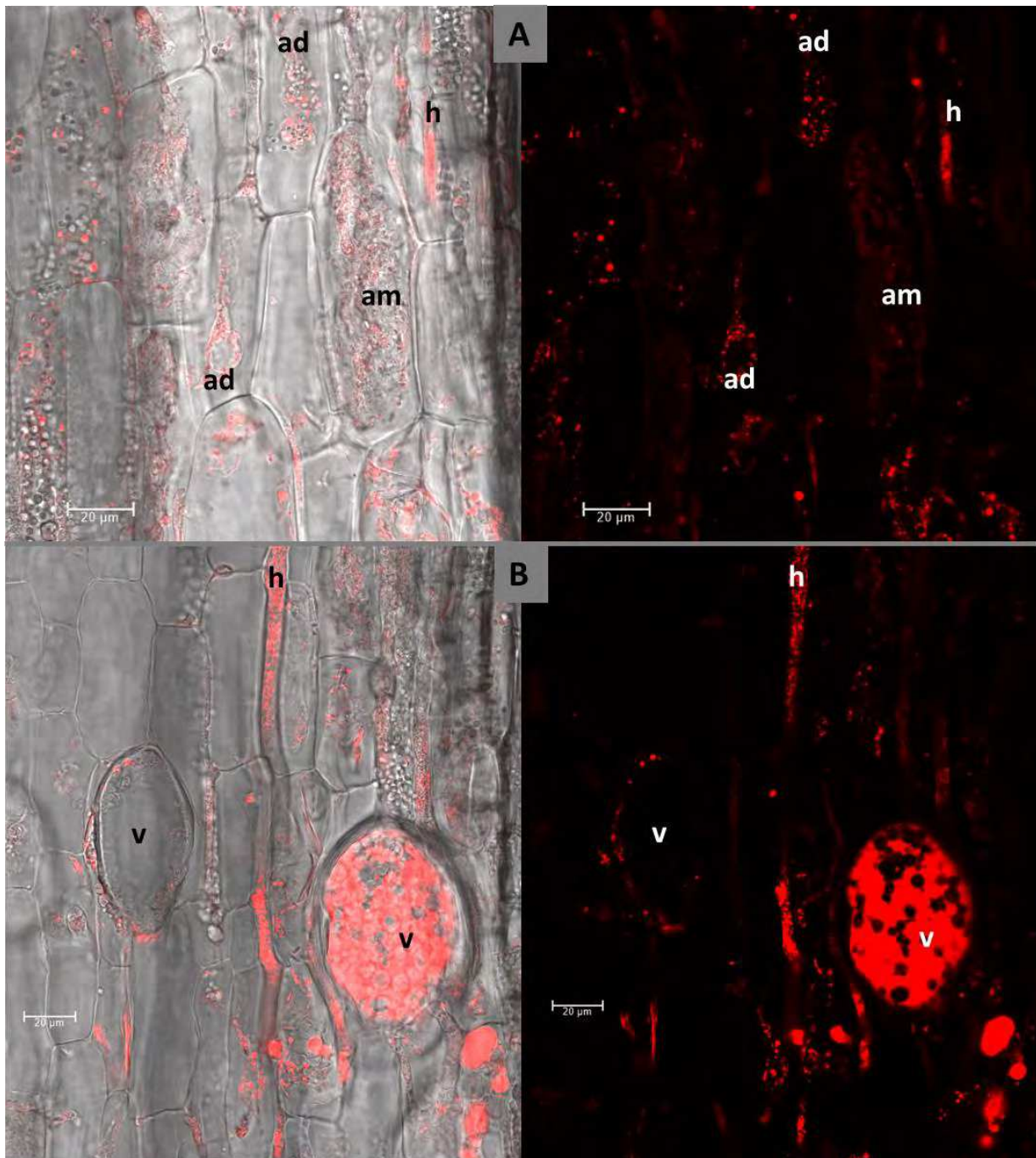


Figure 46 : Coupes de racine mycorhizées de *Riparia* (40µm), condition 2mM P, marquées **au rouge de Nile** (λ_{ex} 552nm, λ_{em} 570nm - 623nm A et B). *amidon* (starch, s), *arbuscule mature* (am), *arbuscule dégénéré* (ad), *vésicule* (v), *hyphe* (h). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x63 à immersion huile), images non traitées.

En ce qui concerne les hyphes, ils répondent très fortement au marquage et les vésicules semblent plus ou moins marquées selon leur morphologie. Ces résultats sont cohérents avec la littérature citée précédemment et les observations réalisées plante contrôle *M. truncatula* (Figure 47). On notera tout de même des gouttelettes à proximité des granules d'amidon (Figure 45 C, et Figure 46, A). De plus, on peut faire l'hypothèse d'une différence concernant les différents traitements P. En effet, les branches d'arbuscules matures ont l'air d'être plus sensibles au marquage au rouge de Nile (branches distinguables mais pas de gouttelettes visibles) en condition 2mM P (Figure 45, A) qu'en 0,01mM (Figure 46, A). Mais cela reste à vérifier.

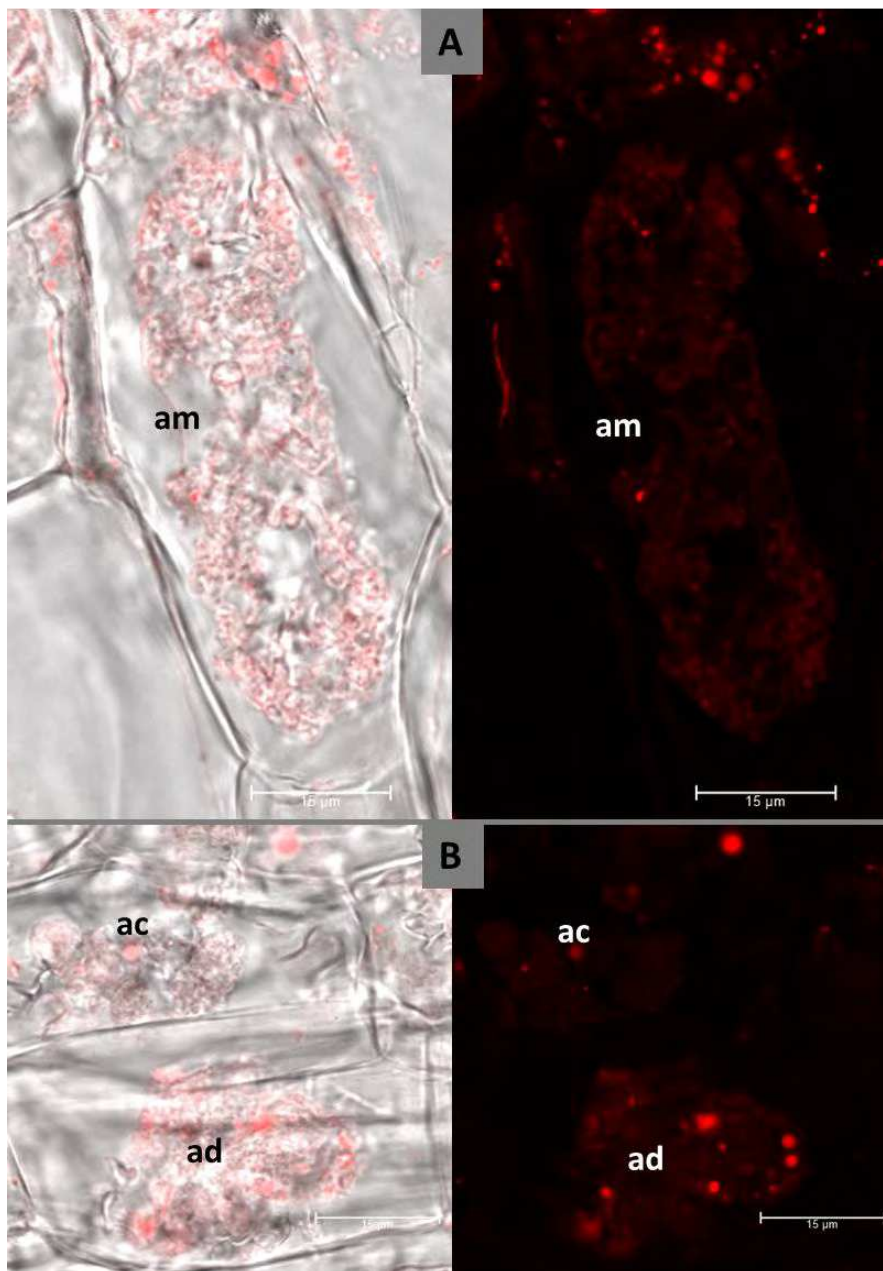


Figure 47 : Coupes de racines mycorhizées de *M. truncatula* (40μm), marquées **au rouge de Nile** (λ_{ex} 552nm, λ_{em} 570nm - 623nm A et B). arbuscule mature (am), arbuscule dégénérescent (ad), arbuscule collapsé (ac), vésicule (v), hyphes (h). Acquisition au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, x63 à immersion huile), images non traitées.

Le rouge de Nile peut être utilisé en spectrofluorimétrie, afin de doser les lipides polaires (λ_{ex} 549nm, λ_{em} 628nm) et les lipides neutres (λ_{ex} 480nm, λ_{em} 575nm)(Alonzo et Mayzaud, 1999). Dans cette étude (λ_{em} 570nm - 623nm), nous avons ciblé les lipides polaires (λ_{ex} 552nm) afin de ne pas être saturé en signal par les triglycérides (lipides neutres) constituants des membranes plasmiques, en quantité très importante dans ce type de structure (§III.1.2_lipides). Les longueurs d'onde maximales pour ce marqueur sont référencées à λ_{ex} 515nm et λ_{em} 583nm. Nous avons donc fait le compromis de rester proche de son maximum d'émission. Bien que dans la littérature ces différentes longueurs d'onde excitation/émission référencée en spectrofluorimétrie n'aient pas été utilisés en microscopie à fluorescence, il serait intéressant, maintenant que le protocole est validé sur vigne, d'imager au microscope confocal avec les lasers 488nm et 552nm respectivement, afin d'observer la répartition différente des lipides neutres par rapport aux lipides polaires observés précédemment. On notera également que le marqueur AC201 (Avicor, λ_{ex} 405nm, λ_{em} 410nm - 510 nm) a été récemment utilisé sur racines mycorhizées de différentes plantes (Montero et Paszkowski, 2022) et que d'autres marqueurs fluorescents du même fournisseur ont été testés sur algue et semblent prometteurs (Harchouni et al., 2018).

Par ailleurs, ce type de gouttelette a déjà été observé sur racine de *Marchantia paleacea* en MET (observation fournis par Christophe Roux). Nous avons donc validé nos observations par cette méthode.

III.2.2. Microscopie électronique à transmission

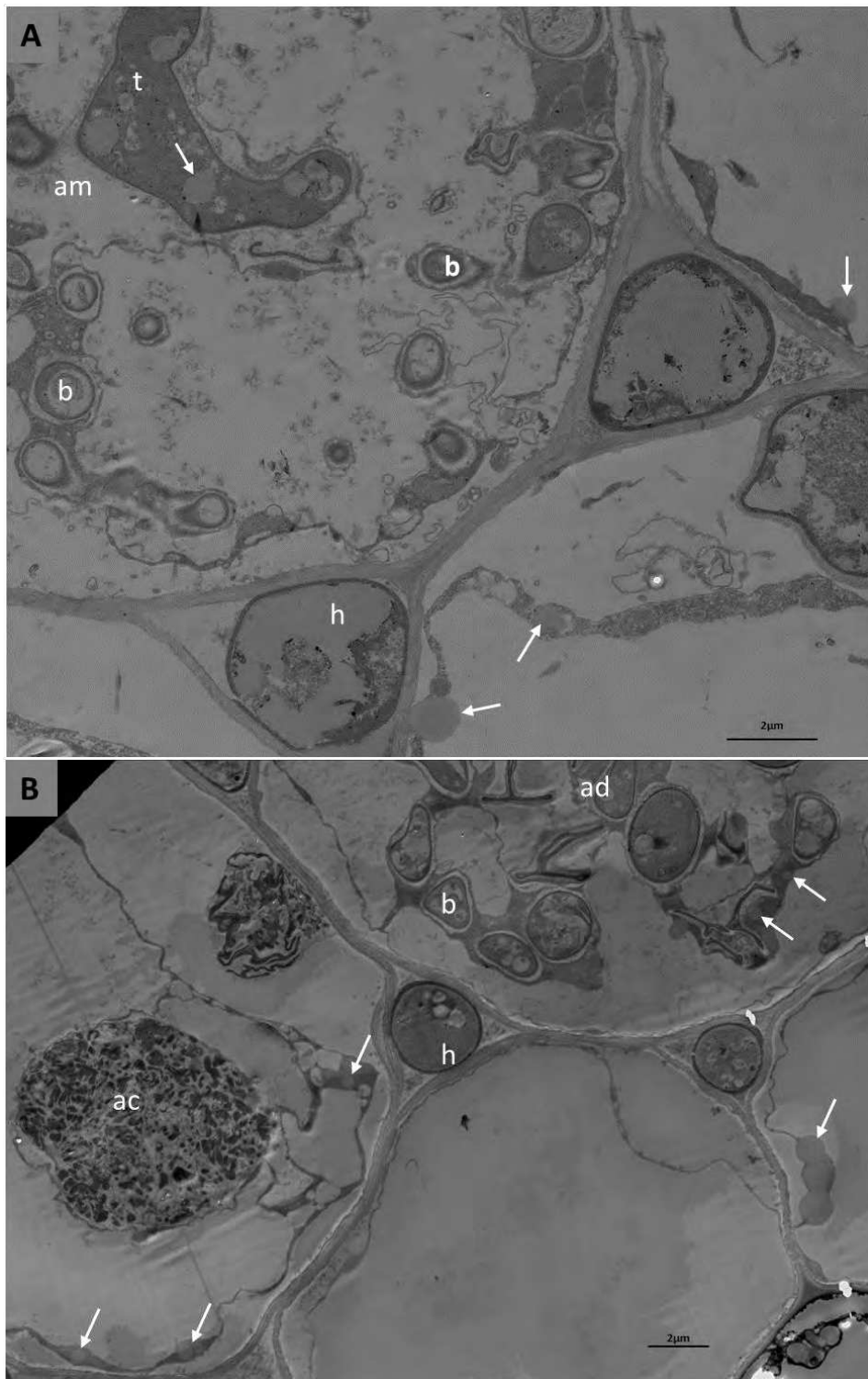


Figure 48 : Micrographes de racine mycorhizée de *Riparia* en condition P 0,01mM (A) et 2mM (B). Acquisition au microscope électronique à transmission (HT7800, Hitachi). *arbuscule mature (am)*, uniquement visible dans cette condition P 0,01mM. *branche (b)*, *amidon (starch, s)*, *hyphe intercellulaire (h)*, *tronc (t)*, *arbuscule dégénéré (ad)*, *arbuscule effondré (ac)*, *paroi végétale (pv)*, *paroi fongique (pf)*, *espace périarbusculaire (epa)*, *membrane périarbusculaire (mpa)*. Les flèches indiquent les gouttelettes lipidiques.

Les coupes observées en [Figure 48](#) sont issues de la même expérimentation de micromorphologie au MET décrite dans le §II.4.1.

Ces acquisitions confirment les précédentes observations au rouge de Nile. Soit (i) que les gouttelettes lipidiques ne se retrouvent que très rarement au niveau des branches des arbuscules matures, (ii) qu'il n'y a pas de gouttelettes autour ni à l'intérieur des arbuscules collapsés mais au niveau de la membrane qui est, tout du moins on le suppose, entre l'état de membrane plasmique et l'état de membrane périarbusculaire, (iii) que des gouttelettes se trouvent en périphérie, coté cytoplasme de la plante, des branches arbusculaires en cours de dégénérescence ; (iv) que les vésicules du CMA (non montrées) ne sont pas toutes identiques, que certaines sont remplies de grosses gouttelettes plutôt dense aux électrons, suggérant une concentration très importante de lipides, et d'autres moins denses, présentent une activité métabolique (ex. noyaux, réticulum, mitochondries ; comme déjà décrit dans la littérature) et (v) que des gouttelettes lipidiques sont également présentes en périphérie du noyau (images non montrées).

A partir de l'état de l'art (§III.1.), et des observations en microscopie ([Figures](#) précédentes), il paraît évident que les données sont manquantes concernant l'allocation des lipides aux CMA, aussi bien en terme de diversité, qu'en terme de transport et de régulation. Afin d'apporter des nouvelles pistes de recherche dans ce domaine d'étude nous avons sélectionné des méthodes de micro-spectrométries innovantes sur tissu mycorhizé, pouvant approcher à la fois la composition et la distribution des lipides dans ce tissu (CMA et/ou plante hôte). Pour cause, une approche combinée de microspectrométrie infra-rouge (IR), de microspectrométrie de masse et d'imagerie en ultraviolet (UV) profond a déjà été utilisée pour étudier la dynamique de dégradation de la paroi cellulaire de tige de *Zea mays* (Leroy et al., 2022). Comme la voie de biosynthèse des lipides des plantes mycorhiziennes est conservée au travers des différents clades ([Figure 43](#), *Marchantia paleacea*, *M. truncatula*, *V. riparia*), nous avons choisis la plante modèle *M. truncatula* pour ces expérimentations préliminaires.

III.3. Microspectrométrie infra rouge

III.3.1. Intérêt de la méthode

La microspectrométrie (ou microspectroscopie) IR par transformation de Fourier (Fourier-Transform InfraRed (FTIR)) permet d'analyser l'absorption du rayonnement infrarouge par les liaisons chimiques de l'échantillon, et par extension d'approcher la composition moléculaire de l'échantillon (Delfino et al., 2021). Le fait de coupler cette technique de microspectrométrie à la source de rayonnement d'un synchrotron permet d'imager à la limite de diffraction et ainsi d'augmenter considérablement la résolution comparée à des sources de rayonnement IR classiques (Jamme et al., 2013). Très peu de publications ont fait l'objet de l'application de cette technique sur tissu végétal différenciés. Cependant, concernant la paroi de tige de *Zea Mays*, cette technique a été utilisée pour montrer une différence de composition chimique entre des tissus ayant subi deux traitements différents (Leroy et al., 2022).

III.3.2. Préparation des échantillons

Les racines mycorhizées de *M. truncatula* sont coupées et fixées (paraformaldéhyde 4% dans un tampon PO₄) à température ambiante pendant 15min. Après lavage avec du tampon PO₄, les fragments de racines sont placés sur un composé de température de coupe optimale (OCT) à -20°C, sectionnés à une épaisseur de 30µm et placés sur des lames spéciales (CaCl₂) transparentes aux rayons IR. L'OCT résiduel est lavé à l'eau distillée et les lames sont séchées à l'air avant d'être utilisées sur la ligne de faisceau SMIS du synchrotron SOLEIL, au microscope Continuum XL (Thermo Scientific) couplé à un spectromètre FTIR (Nicolet 5700, Thermo Scientific), sous la supervision de Christophe Sand.

III.3.3. Résultats préliminaires

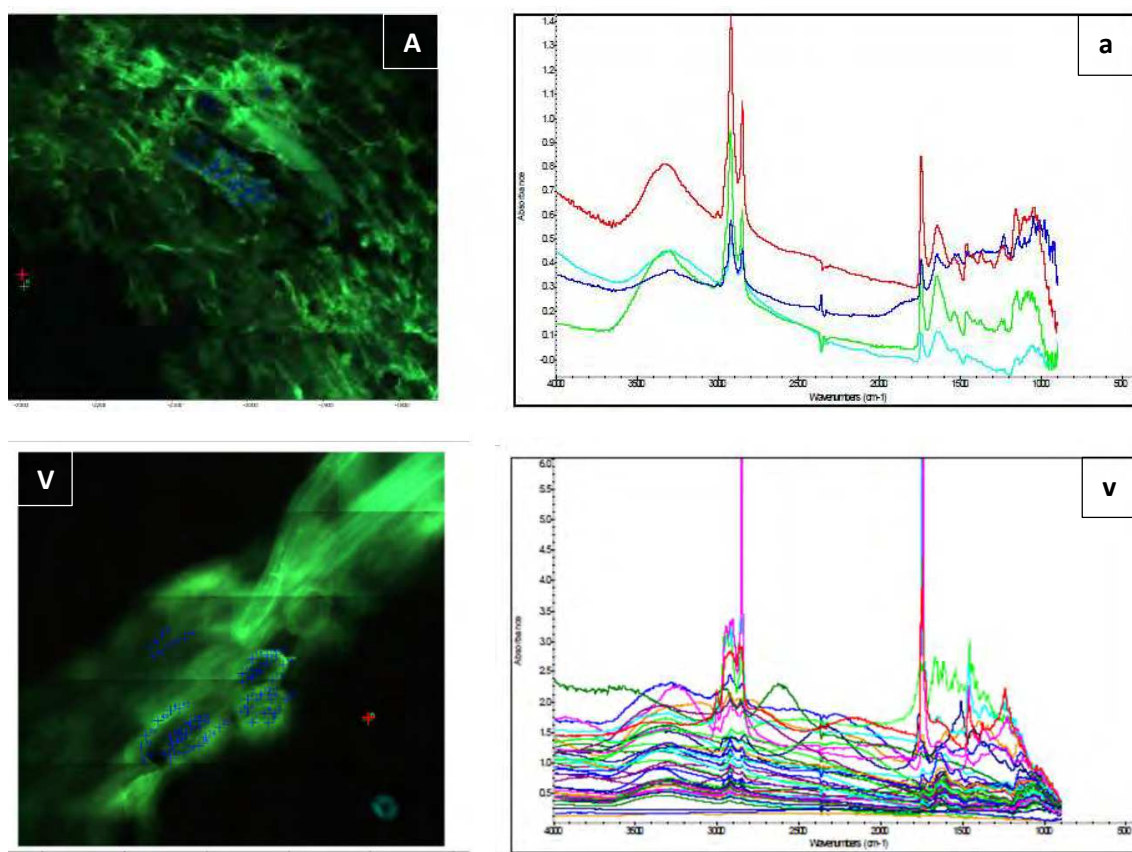


Figure 49 : Coupe de racines mycorhizées de *M. truncatula*. Acquisition infrarouge au continuum XL (ligne SMIS synchrotron Soleil). Visualisation de l'autofluorescence des tissus racinaires mycorhizés (A et V, excitation 488nm) avant acquisition des spectres IR sur arbuscule (a) délimité par des croix bleues (A). Acquisition des spectres IR sur vésicule (v) délimitée par des croix bleues (V).

Les acquisitions en microscopie IR sur le synchrotron nous ont montré la richesse des structures fongiques en lipide, avec des profils différents entre les structures arbusculaires et vésiculaires (Figure 49). Toutefois, il n'y avait pas de différence visible entre les conditions P et les témoins. De plus, la résolution spatiale était sur cet appareil limitée à 4 μ m, ce qui constitue la principale limite de cette expérimentation, car incompatible avec la proximité spatiale des partenaires symbiotiques dans notre modèle d'étude.

Toutefois, une analyse statistique multivariée est prévue afin de pouvoir décrire un profil spectral pour chaque structure (cellule arbusculée, vésicule et cellule hôte non colonisée). Par la suite, ces données pourraient servir d'outil de comparaison (sur des tissus mycorhizés provenant de plante et/ou CMA différents), d'outil d'identification (afin de discriminer les structures mycorhiziennes, du tissu non colonisé pour cibler ou au contraire écarter les spectres IR correspondant) ou encore d'outil de caractérisation (afin d'évaluer les variations de ces données spectrales dans différentes conditions).

III.4. Spectrométrie de masse

III.4.1. Intérêt de la méthode

Les progrès réalisés à la fin du 20^{ème} siècle ont placé la technique de spectrométrie de masse par temps de vol des ions secondaires (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) " la seule technique d'imagerie par spectrométrie de masse capable de caractériser la distribution latérale des lipides à un niveau cellulaire et subcellulaire " (traduit de Passarelli et Winograd, 2011). En effet, cette méthode a prouvé ses capacités analytiques sur les lipides à la fois à l'échelle macro et micro, grâce à un faisceau d'ions défocalisé et focalisé. Aussi, la résolution en TOF-SIMS est considérablement augmentée par rapport à l'IR (entre 400nm et 2µm selon les caractéristiques de l'échantillon ; Horn et Chapman, 2014) et permet de déterminer la composition fine des composés tissulaires et particulièrement des lipides (Bich et al., 2013). Sur *M. truncatula* mycorhizé, cette approche a été utilisée non pas en microscopie, mais en spectrométrie conventionnelle pour un étude de métabolomique (Laparre et al., 2014).

III.4.2. Préparation des échantillons

Les plantes de *M. truncatula* mycorhizées et non-mycorhizées ont été traitées avec 15mL de KH_2PO_4 1,043mM, ou avec de l'eau distillée (condition contrôle), pendant une semaine avant l'échantillonnage. Puis les racines des quatre conditions ont été coupées et enrobées successivement pendant 2 heures dans de la carboxyméthylcellulose (CMC) à 0,5%, 1% et 1,5% puis à 2% pendant une nuit. Les racines sont moulées dans de la CMC à 2%. Pour durcir les blocs, les moules sont placés 5 min dans un bain d'isopentane à -74°C avec un Snapfrost (Leica). Ensuite, les blocs de CMC contenant des fragments de racines sont conservés dans de la carboglace. Des sections de 20µm sont réalisées avec un cryostat à -22°C. Les sections sont placées sur des lames de verre recouvertes d'oxyde d'indium - étain (indium tin oxyde, ITO). Sans lamelle, les lames sont conservées dans la carboglace et sont déshydratées sous vide juste avant l'acquisition.

Les analyses TOF-SIMS ont été réalisées sur un TOF-SIMS IV (IONTOF GmbH) au laboratoire d'archéologie moléculaire et structurale (LAMS, CNRS-Université de la Sorbonne, Paris, France). Les analyses ont été réalisées en utilisant le mode de focalisation « courant élevé groupé » (high current bunched, HCBU), dans lequel les ions primaires sont regroupés en impulsions de moins de 1ns. Il permet une haute résolution en masse, et un diamètre de faisceau de 2-3µm, limitant la résolution spatiale, mais avec un courant d'ions primaires élevé de 0,4picoAmpère. Le mode de focalisation dit "alignement en rafale avec extraction retardée" (burst alignment with delayed extraction, BA + DE) offre une meilleure résolution spatiale que le HCBU (la taille du faisceau est de 400nm) et les longues impulsions des ions primaires (~100ns) sont compensées par une extraction retardée (DE) des ions

secondaires afin de ne pas perdre la résolution en masse. Toutefois, en plus d'être indisponible lors de nos acquisitions, ce mode à une intensité d'ion primaire 5 fois plus faible (0,08 picoAmpère) qu'en HCBU ce qui nécessite que les échantillons soient validés auparavant (Bouvier et al., 2021).

III.4.3. Résultats préliminaires

Lors de la première acquisition TOF-SIMS à Gif sur Yvette sous la supervision d'Alain Brunelle, nous avons rencontrés des difficultés pour reconnaître les structures fongiques sur des sections séchées et sous un angle d'observation très restreint imposé par l'instrument ([Figure 50](#)). Pour la seconde acquisition, lors de la réalisation des coupes en série, une sur deux a été déposée sur lame de verre classique et colorée au bleu Trypan. De cette façon, les structures fongiques ont pu être identifiées et localisées en microscopie optique classique avant de faire l'acquisition au TOF SIMS ([Figure 51](#)).



Figure 50 : Photographie de la zone d'acquisition du TOF-SIMS. On peut voir la platine, au-dessus de laquelle s'avance les différents accessoires nécessaires à l'acquisition. Le colonne permettant le vol et la détection des ions (flèche blanche) occupe tout l'espace à la perpendiculaire de l'échantillon, la caméra est obligatoirement inclinée ce qui peut complexifier l'acquisition.

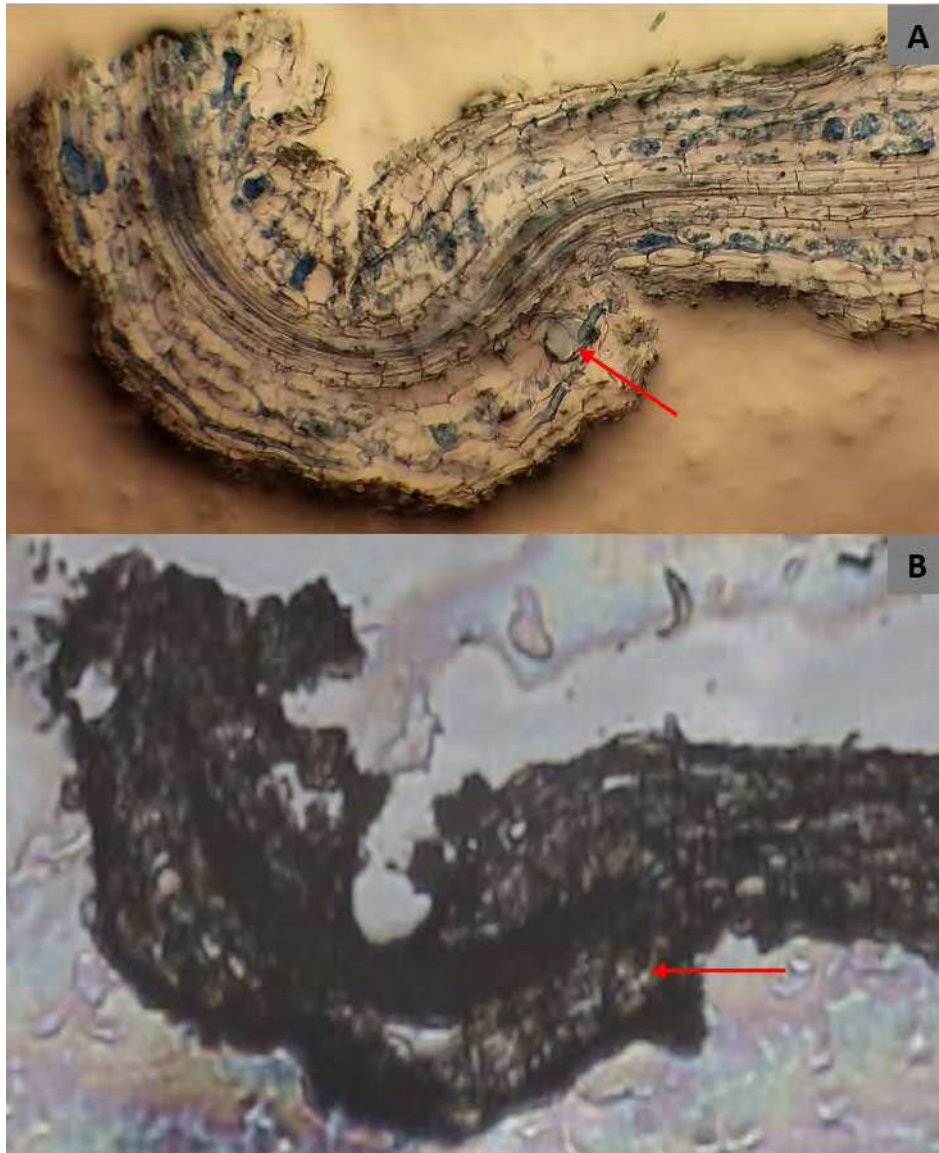


Figure 51 : Deux coupes successives de 20µm de la même racine mycorhizée de *M. truncatula*. Section colorée par du bleu Trypan observée au microscope photonique, révélant les structures fongiques d'intérêt (x10, A). Section séchée observée par la caméra de l'instrument TOF-SIMS (B). Flèches rouges montrant une vésicule d'intérêt.

Le courant ionique élevé permet des analyses rapides de la composition des structures fongiques dans la racine. Les triglycérides semblent être plus représentés dans les arbuscules que dans les vésicules. Alors que les vésicules semblent être remplies de monoacylglycérol, de diacylglycérol et de carboxylate d'Ag (Figure 52).

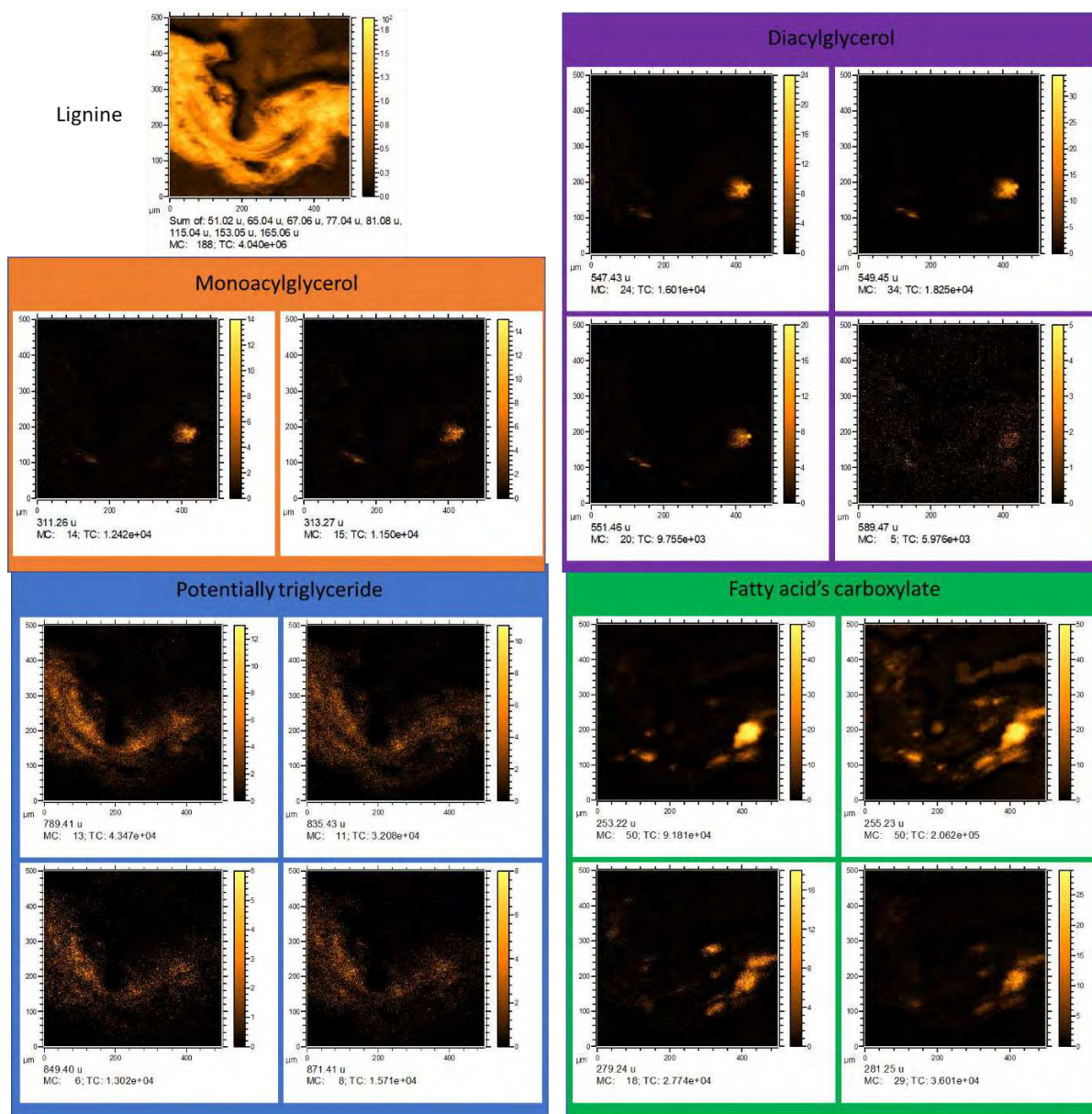


Figure 52 : Micrographes ioniques d'une coupe de racine mycorhizée de *M. truncatula*. Résolution spatiale 2 μm , zones analysées 500 μm x 500 μm (256 x 256 pixels). u : rapport m/z spécifique à l'ion, MC : comptes maximaux dans un pixel ; TC : comptes totaux dans l'image.

L'analyse comparative des micrographes ioniques des quatre conditions va être réalisée prochainement. Une fois ces données analysées, nous prévoyons une nouvelle acquisition avec le mode de focalisation BA + DE. Pour cause, les micrographes ioniques obtenues lors de notre première acquisition, n'étaient pas assez brillants pour être traitées. A la seconde acquisition, même si la qualité de la mycorhization et des sections de racines était meilleure, ce mode d'acquisition était hors service.

III.5. Microspectrométrie visible

III.5.1. Intérêt de la méthode

L'imagerie par UV profond (Deep Ultraviolet, DUV) a été développée pour l'analyse par fluorescence sans marquage. Elle a été utilisée avec succès pour identifier l'organisation des tissus, préalablement fixés, chez les animaux (fibres musculaires, (Chagnot et al., 2015)) et chez les plantes (vaisseaux conducteurs (Jamme et al., 2013); paroi cellulaire (Beaugrand et al., 2022)) avec une résolution de l'ordre du μm . De plus cette technique peut être utilisée sur tissu vivant, notamment pour visualiser des gouttelettes lipidiques, et cette fois-ci la résolution est de 110nm (Jamme et al., 2020).

III.5.2. Préparation des échantillons

Les racines mycorhizées et non mycorhizées de *M. truncatula* ont été fixés (PFA 4%, DMSO 5% avec ou sans glutaraldéhyde 1% dans un tampon PBS pH 7,4), traités au NH_4Cl 50mM dans du PBS pendant 1h à T°C ambiante puis imprégnées afin de pouvoir être coupées en sections de 20 μm et 10 μm d'épaisseur. Pour l'imprégnation en cire Steedman (polyéthylène glycol distéarate /hexadécanol, m/m, 9:1) les racines sont d'abord déshydratées dans des bains successifs d'1h30 d'éthanol dilué en PBS (30%, 50%, 70%, 90% et 100%). Ensuite elles sont incubées 1h dans une solution de 50/50 v/v cire Steedman/ethanol à 37°C, puis placées dans 2 bains d'1h successifs de cire Steedman à 37°C. Les blocs comprenant 3 racines sont moulés à chaud, et sont pris à T°C ambiante. Les blocs sont ensuite démoulés pour être coupés dans le sens longitudinal au cryostat à 0°C. Pour l'imprégnation en agarose, les racines sont moulées à chaud dans de l'Agarose low melting 6% (Sigma) et les blocs sont pris à T°C ambiante. Après avoir été démoulés les blocs sont copieusement hydratés et coupés au vibratome.

Les coupes sont ensuite marquées au Diphénylhexatriène (DPH), qui est un marqueur fluorescent des lipides neutres (maximum d'excitation 340nm, et d'émission 452nm, (Jamme et al., 2020)) à 0,2mM dans de l'eau (car y est plus stable qu'en PBS; stock à 2mM en DMSO). Puis les coupes sont rincées abondamment et montées entre deux lamelles de quartz dans de l'eau.

On remarquera ici, que l'enrobage et le sectionnement en Steedman, bien qu'ayant permis de faire des coupes de 20 μm et 10 μm régulières, ne sont pas retenus. Pour cause, la cire entraîne des agrégats autofluorescents qui rendent impossible l'observation. En enrobant sans imprégner, les racines s'arrachent et ne peuvent plus être coupées. Même en désenrobant (bain successif d'éthanol 5x 100%, 5x 50% dans de l'eau, puis 2 derniers bains d'eau), il reste toujours de la cire sur les coupes. L'enrobage en agarose quant à lui, ne permet pas de faire des coupes de 10 μm , les 20 μm sont irrégulières et les 30 μm seront préférées bien que l'épaisseur du tissu puisse rendre l'observation spectroscopique plus approximative. L'agarose n'autofluoresce pas et les morceaux excédentaires provenant de la coupe du

bloc peuvent être relativement facilement retiré au pinceau. Les données suivantes sont donc issues de coupes de 30µm réalisées en agarose.

La microscopie DUV a été réalisée sur la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France) sur 2 microscopes tout deux couplés alternativement à la source du synchrotron. TELEMOS est un microscope plein champs qui permet de faire de l'imagerie multispectrale (Axio Observer Z1 Carl Zeiss GmbH, (Jamme et al., 2013)). La longueur d'onde dans l'UV était fixée à 275nm, et au vu de l'épaisseur de nos coupes nous sommes restés à l'objectif x40. Pour l'émission trois filtres ont été utilisés : 327nm-353nm afin de détecter les protéines (plus précisément les cycles de la tyrosine et du tryptophane), 420nm-460nm pour le DPH, 480nm-550nm pour la lignine. Reconstitution des images à l'aide du logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012).

POLYPHEME est un microscope inversé qui permet de réaliser une microspectrométrie de fluorescence à balayage (Olympus IX71 modifié, (Jamme et al., 2010)). La longueur d'onde dans l'UV été fixée à 280nm, et avec l'objectif x40. Après acquisition, les spectres ont été traités à l'aide du logiciel LabSpec 6 (Horiba Scientific) afin de supprimer les pics dû aux artefacts d'acquisition.

III.5.3. Résultats préliminaires

- **TELEMOS**

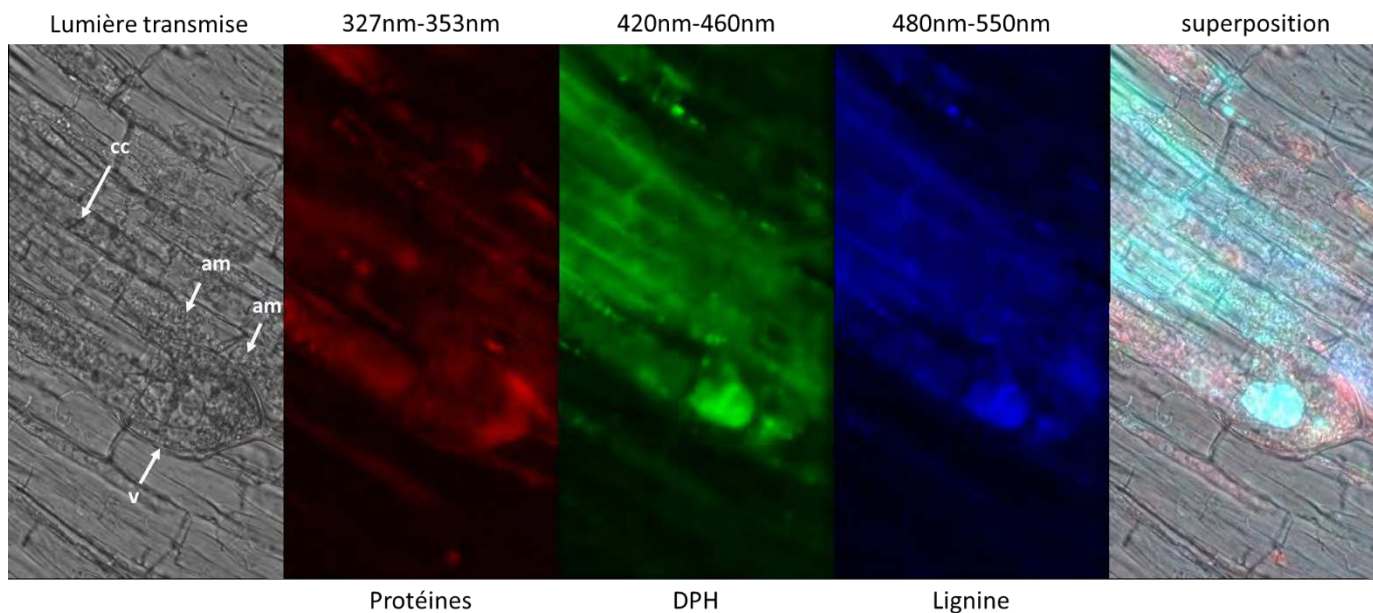


Figure 53 : Coupe de racine de *M. truncatula* (20 μ m), marquée au DPH. Acquisition au microscope TELEMOS, ligne DISCO synchrotron SOLEIL, objectif 40, λ_{ex} 275nm. 3 filtres d'émission utilisés selon la cible moléculaire : 327nm-353nm pour la fluorescence des cycles de la tyrosine et du tryptophane (protéines), 420nm-460nm pour la fluorescence du DPH et 480nm-550nm pour celle de la lignine. *Cylindre central (cc)*, *arbuscule mature (am)*, *vésicule (v)*.

A la suite de ces acquisitions ([Figure 53](#)), on peut s'apercevoir que le signal correspondant au DPH se superpose à celui de la lignine et qu'il n'est pas possible de faire la distinction entre les deux, notamment au niveau arbusculaire. De plus, étant donné l'épaisseur des coupes, il n'était pas possible d'augmenter le grossissement et d'utiliser l'objectif x100. Toutefois, on remarque que dans la vésicule, deux compartiments se distinguent : un en périphérie qui représente le signal des protéines et un plus interne, ressemblant à une grosse gouttelette, correspond au signal DPH et au signal lignine également. Nous décidons donc d'étudier les spectres afin d'avoir plus d'information concernant les profils d'émission en question, bien que la résolution sur POLYPHEME soit inférieure à celle de TELEMOS.

• POLYPHEME

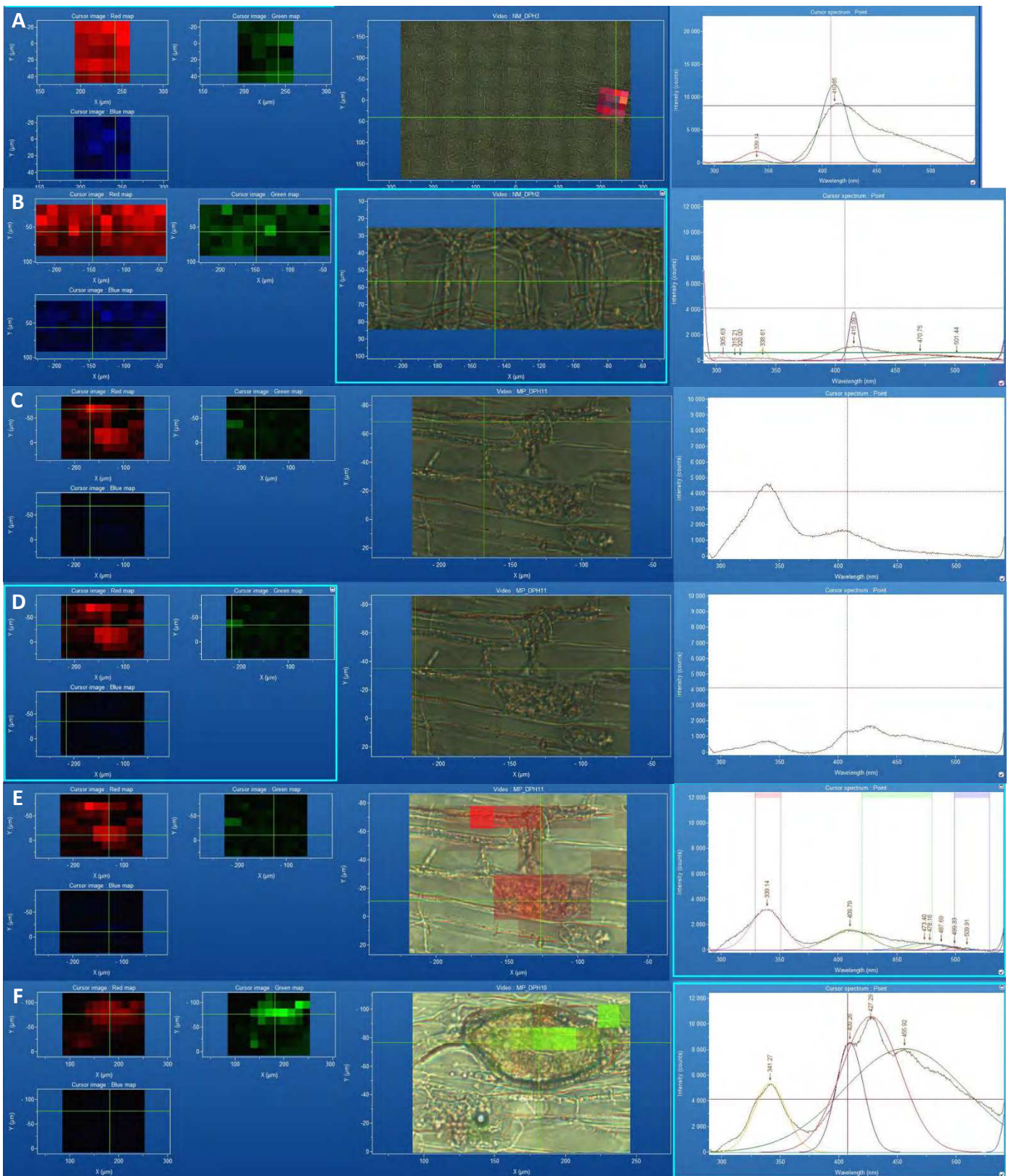


Figure 54 : Coupe de racine de *M. truncatula* (20 μ m), marquée au DPH. Acquisition au microspectromètre POLYPHEME, ligne DISCO synchrotron SOLEIL, objectif 40, λ_{ex} 280nm. 3 filtres d'émission utilisés selon la cible moléculaire : 327nm-353nm pour la fluorescence des cycles de la tyrosine et du tryptophane (protéines), 420nm-460nm pour la fluorescence du DPH et 480nm-550nm pour celle de la lignine. NM (A et B), M (C, D, E, F).

Etant donné que les traitements statistiques n'ont pas encore été réalisés, sont présentées en [Figure 54](#) les données du logiciel Labspec6. La 1^{ère} colonne correspond aux cartes du tissu. Le rouge correspond à la fluorescence entre 329nm-351nm (fluorescence des protéines), le vert entre 420nm-480nm (DPH) et le bleu entre 499nm-529nm (lignine). Un carré représente l'acquisition d'un spectre, et l'intensité de couleur est attribuée relativement entre le carré le plus haut et le plus faible (en noir). La seconde colonne correspond à l'acquisition vidéo en lumière transmise et la dernière colonne au spectre correspondant au point (ou carré) indiqué par le curseur.

Les lignes A et B concernent les témoins NM. Dans ce cas, on observe très clairement une forte autofluorescence du cylindre central, confirmant les précédentes observations sur TELEMOS. En condition M (ligne C, D, E et F), la fluorescence des protéines se manifeste de manière beaucoup plus intense au niveau des structures symbiotiques par rapport aux cellules non colonisées. De plus, sur les lignes C et D, les spectres de deux hyphes différents de la même racine ont été relevés. On peut très clairement noter une différence de réponse au DPH, suggérant une variabilité du contenu lipidique à l'intérieur des hyphes. De plus, dans les deux cas le signal pour la lignine est très bas. Toutefois, des analyses statistiques sont nécessaires pour conclure sur ce point. Concernant l'arbuscule en ligne E, le signal du DPH tout comme celui de la lignine sont très faibles. En revanche, pour la vésicule de la ligne F, le signal DPH est très fort, et on retrouve même le profil d'émission du marqueur fluorescent avec ses 2 pics caractéristiques ([Figure 55](#)).

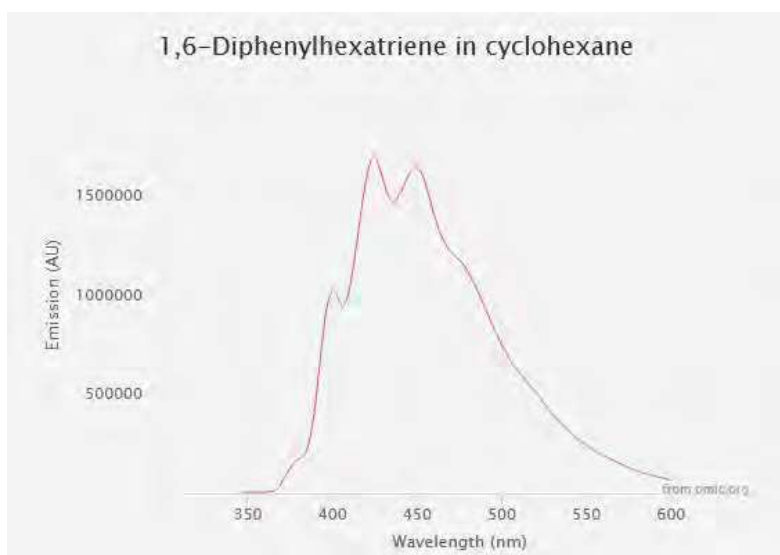


Figure 55 : Spectre d'émission de fluorescence DPH en cyclohexane

<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/024.html>

III.6. Perspectives

Ces différentes approches de microspectrométries permettent d'aborder les lipides symbiotiques de manière innovantes et ces premiers résultats semblent prometteurs. Des optimisations sont encore à envisager pour avoir des coupes de tissus encore plus fines et bien conservées. De plus, les données spectrales devront faire l'objet d'analyses statistiques poussées, parfois complexes au vu de l'étroite proximité des tissus des deux partenaires symbiotiques.

L'éventail des techniques de microspectrométries décrites ici, ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de la SMA, sur des sujets tels que (i) les mécanismes d'allocation du carbone entre les deux partenaires, (ii) les stades de développements et le contenu des structures de réserve, (iii) pourrait permettre d'élucider la tendance, de manière relative, de l'allocation du carbone préférentiellement sous forme de sucres ou de lipides.

Conclusion générale

- **L'immunomarquage en transparisation**

L'immunomarquage est une technique centrale dans de nombreux domaines de recherche biologique, permettant de révéler une composition moléculaire spécifique du tissu, et ainsi d'en approcher, ou appuyer, une fonction respectivement inconnue ou caractérisée (ex. les transporteurs de phosphate de la membrane périartériolaire). Cependant, son application a été principalement limitée à des coupes de tissu ou à de petits échantillons en raison de la difficulté à marquer et à observer les structures profondes dans des spécimens intacts. Or l'imagerie 3D est particulièrement précieuse pour l'analyse de structures complexes qui ne sont pas contenues dans des plans 2D, comme les trajets axonaux, des systèmes vasculaires ou encore des micro-organismes (ex. CMA). De plus, les ensembles de données volumiques offrent plus de flexibilité d'analyse que les coupes tissulaires pour les études quantitatives du nombre de cellules ou les mesures de distance relative.

Il est reconnu depuis plus d'un siècle que les spécimens peuvent être rendus optiquement transparents par des traitements chimiques (tissu végétal : Janse, 1887 ; tissu animal : Spalteholz, 1914). Depuis l'avènement des microscopes à sectionnement optique et le développement de l'imagerie volumique, on a constaté un regain d'intérêt pour les techniques de transparisation. Ces méthodes ont été principalement développées dans le but de préserver la fluorescence tout d'abord exogène (marqueurs fluorescents), puis endogène de protéines exprimées par des transgènes (ex. GFP, l'YFP et mCherry). Toutefois, ces optimisations ne garantissent pas la compatibilité du PT en question avec l'immunomarquage. Pour cause, une majorité opte pour une transparisation aqueuses dans le but de préserver la fluorescence mais l'utilisation d'agents dénaturants (ex. urée, SDS) peut dégrader les épitopes reconnus par les anticorps d'intérêt conduisant à une absence totale de marquage ou un marquage trop faible pour être imagé en volume, en plus d'un temps très long de transparisation. Ces désagréments ne concernent pas les immunomarquages réalisés avec une transparisation en solvant organique (ex. tissu animal : FluoClearBABB (Schwarz et al., 2015), iDISCO+ (Renier et al., 2016), FLASH (Messal et al., 2021)). Toutefois, des PT aqueux ont tout de même été combinés à un immunomarquage avec succès (ex. tissu animal : SeeDB (Ke et al., 2013), SHIELD (Park et al., 2019), et la grande famille des CLARITY (pour revue voir Matryba et al., 2019).

Sur tissus végétaux, aucun immunomarquage avec transparisation organique n'a été référencé, mais on notera que des infiltrations xylène/éthanol sont couramment utilisées lors d'expérimentations d'hybridation *in situ* fluorescente afin de rendre le tissu plus clair. Par ailleurs, on dénombre deux PT

aqueux, PEA-CLARITY (Palmer et al., 2015) et ePRO ClearSee (Nagaki et al., 2017a), appliqués sur organes aériens ou sur racines blanches (*Nicotiana tabacum*, *A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Oriza sativa* et *Allium sativum*) et compatibles avec un immunomarquage.

Ainsi, l'optimisation de l'immunomarquage sur racine tannique transparisée réalisée dans cette étude est un grand pas dans le développement de l'imagerie volumique du tissu racinaire en (i) donnant accès à l'intimité de racines de plantes pérennes, jusque-là protégée des objectifs des microscopes optiques par des composés phénoliques en tout genre, et (ii) représentant une approche prometteuse pour élucider les complexités anatomiques et physiologiques des interactions entre les plantes et les micro-organismes.

- **Caractérisation de l'impact du iCTR sur le tissu**

Les traitements chimiques utilisés dans les PT peuvent impacter le contenu cellulaire du tissu traité et sa morphologie. Ce paramètre s'avère crucial lors de marquages spécifiques étroitement liés aux caractéristiques fonctionnelles du tissu (ex. immunomarquage de transporteur membranaire). Ce pourquoi, cet aspect est particulièrement documenté et pris en compte dans la littérature concernant la transparisation animale, via le prisme de la chimie impliquée dans les traitements (Yu et al., 2021). Bien que ce type de documentation puisse être pertinent au vu de la composition organique partagée entre tissus animaux et végétaux, l'impact des PT sur les tissus végétaux et notamment sur leurs composés spécifiques (ex. cire, paroi) n'est que très peu référencé dans la littérature.

Afin de (i) évaluer l'impact du iCTR sur le tissu racinaire, et (ii) proposer une méthode pour l'évaluation générale des pertes tissulaires induites par les PT, nous allons réaliser une approche de microscopie corrélative combinant l'imagerie confocale sur échantillons transparisés et la microscopie électronique à transmission. Avec ces données, et pour évaluer cette fois-ci l'impact du iCTR sur la composition chimique du tissu, nous prévoyons également de procéder à des analyses comparatives en microspectrométries compatibles avec des échantillons fixés (IR et DUV).

- **La corrélative en perspective**

La microscopie corrélative permet d'imager un même échantillon à la fois en microscopie optique et en microscopie électronique (Correlative light electron microscopy, CLEM). La plupart des expérimentations en CLEM visent à exploiter la spécificité de la microscopie à fluorescence pour localiser les objets d'intérêt, et la haute résolution de la ME pour visualiser leurs propriétés cellulaires

ou organiques sous-jacentes. La CLEM peut donc être utilisée pour identifier sans ambiguïté des compartiments subcellulaires, cibler des événements rares et transitoires, augmenter le débit d'acquisition de données de microscopie électronique ou encore déterminer la localisation relative de complexes protéiques. Cependant, le nombre de combinaisons possibles entre les différentes techniques d'optique et d'électronique est très important, aussi le choix de la méthode peut être un défi majeur car il faut prendre en compte les limites de chaque technique (ex. l'opacité du tissu en microscopie optique).

La CLEM regroupe plusieurs approches. La plus simple est l'utilisation, sur tissu fixé, d'un marqueur qui est à la fois fluorescent et dense aux électrons afin d'étudier la même section avec les deux types de microscopie. Il est également possible d'immunomarquer l'échantillon avec un marqueur fluorescent, de faire l'acquisition en microscopie optique puis de préparer les échantillons pour la microscopie électronique et de les immunomarquer avec un Ac II^{aire} couplé à une bille d'or. L'utilisation d'une fixation HPF au lieu d'une fixation chimique conventionnelle, permet de faire de la CLEM sur des échantillons vivants, mais nécessite une rapidité certaine entre l'acquisition au microscope optique et la HPF.

Par ailleurs la CLEM n'a jamais été utilisée sur échantillon transparisé, ce à quoi nous allons essayer de remédier avec le iCTR grâce sa compatibilité avec l'immunomarquage.

- **VvPT4 et VvPT8**

La mise en place de la SMA induit une forte réponse transcriptionnelle chez la plante hôte, qui est par la suite régulée par de nombreux paramètres, comme la nutrition azotée et phosphatée. Concernant cette dernière, cette réponse concerne notamment l'expression des transporteurs de P localisés à la membrane plasmique, les Pht1. Dans cette sous famille, un sous-groupe de gènes codant pour des transporteurs induits ou surexprimés en condition mycorhizée se distingue. Aussi, l'absorption symbiotique de Pi est médiée par des symports H⁺/Pi localisés à la membrane périarbusculaire. Par ailleurs, l'expression de ces transporteurs fait l'objet d'une régulation fine lors de la SMA.

En effet, certains d'entre eux ne sont strictement exprimés qu'en présence du CMA, sans participer systématiquement à l'import du P à l'interface symbiotique (P symbiotique) ; certains, bien que surexprimés en condition M, sont également exprimés en NM ; certains sont réprimés dans les cellules arbusculées ; d'autres encore sont surexprimés en condition de carence phosphatée indépendamment

de la condition de mycorhization. Par ailleurs, on constate généralement la diminution de l'expression des autres Pht1, en condition mycorhizée (pour revue voir Madrid-Delgado et al., 2021).

L'analyse phylogénétique des Pht1 dans cette étude concorde avec les données bibliographiques et nous permet de distinguer trois transporteurs de vigne dans le sous-groupe de transporteurs de P induits ou surexprimés en condition de mycorhization. Parmi eux, VvPT4 et VvPT5 ont déjà été décrits comme appartenant à ce groupe (Valat et al., 2018), et l'expression de VvPT4 comme étant augmentée en condition de mycorhization (Goddard et al., 2021; Valat et al., 2018). VvPT4 est un homologue de MtPT4 qui a largement été décrit dans la littérature, considéré inductible par la SMA jusqu'à ce qu'il soit montré comme également exprimé dans des apex de racines fines non-mycorhizées. Localisée à la membrane périarbusculaire, il est essentiel à l'établissement fonctionnel et au maintien de la SMA. De plus, en condition mycorhizée, il est plus exprimé en condition de faible concentration en P. Ainsi, nos résultats de séquençage ARN viennent appuyer l'hypothèse de l'homologie entre MtPT4 et VvPT4.

De plus, cette étude révèle un troisième transporteur, VvPT8, non cité dans la littérature. Son homologue MtPT8, surexprimé en condition de mycorhization, n'est pas déterminant dans le maintien de la symbiose, et son implication dans le transport de Pi symbiotique reste à déterminer (Breuillin-Sessoms et al., 2015).

Aussi, la caractérisation de ces transporteurs chez la vigne reste à réaliser. Des études d'expression hétérologues en levure peuvent être envisagées afin de confirmer la spécificité et l'affinité de substrat de ces deux transporteurs. Afin de caractériser plus finement leur rôle dans le transport de P symbiotique et la régulation de la SMA, la construction de mutant *vvpt4* et *vvpt8* de vigne seraient des outils de choix. Toutefois, les méthodes de transformation génique sont difficiles à mettre en place sur des plantes pérennes à la croissance lente. Cependant, les récentes avancées dans l'utilisation du CRISPR-Cas9 sur vigne ouvre des perspectives encourageantes.

De plus, il serait intéressant de connaître leurs régulations lors des modifications des disponibilités en azote, dans le cycle de l'azote et du phosphore, ainsi que le rapport N:P. Pour cause, la disponibilité de ces éléments dans les sols et dans la plante peut influencer la régulation des transporteurs et notamment la translocation des éléments de la partie racinaire vers la partie aérienne. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'interactome auquel appartient ces Pht. Par des expériences de split-ubiquitine, comme celles réalisées chez *Arabidopsis thaliana* (Wipf et al., 2021), il serait intéressant de connaître les autres protéines avec lesquelles ces Pht peuvent interagir et déterminer si certaines d'entre elles appartiennent au transportome de la plante ou à d'autres groupes fonctionnels (ex. régulateurs).

- **Approche transversale : microspectrométrie et transparence**

Il serait intéressant d'intégrer les approches de microspectrométries et de transparence comme une approche transversale permettant de soutenir les approches de génétique quantitative. Dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules, les contributions génétiques relatives aux fonctions de nutrition des deux partenaires sont loin d'être complètement connues. Pour les plantes, il pourrait s'agir de la résistance à la sécheresse ou de l'utilisation du phosphore et pour les CMA, il peut s'agir de comprendre (i) quel est l'origine des lipides, (ii) comment s'opère la balance sucre vs lipide dans la mise en place et le fonctionnement de la symbiose. Pour cela, il sera nécessaire d'utiliser des mutants et surtout de réussir à produire des mutants stables pour les CMA, ce qui pour le moment ne se fait pas en routine.

- **Vers des modèles d'études plus complexe**

Les racines d'une plante formant la SMA sont colonisées non par une souche de CMA mais par plusieurs souches voire par plusieurs espèces dont la cinétique temporelle est encore mal connue. De plus, leur distribution spatiale au sein du système racinaire est une inconnue. La transparence et la reconstruction 3D permettrait de lever le voile sur cette inconnue. De plus, certaines plantes telles que les légumineuses forment deux types de symbiose au niveau racinaire ; la symbiose mycorhizienne à arbuscules et la symbiose rhizobienne. Cependant, il n'y a actuellement pas d'étude sur le rôle de chacune des deux symbioses et tout particulièrement sur comment s'organise le CMA au niveau d'un nodule : y a-t-il coopération spatiale ou antagonisme spatial entre les deux symbioses ? Enfin, les CMA ne sont pas les seuls organismes telluriques pouvant être classés comme endophytes racinaires. Des bactéries, telles que les bactéries favorisant la croissance des plantes, peuvent être également des endophytes. Leur rôle dans la croissance des plantes ainsi que leurs effets synergiques avec les CMA ont déjà été observés plusieurs fois. Cependant, seuls les effets sont observés et les mécanismes sous-jacents sont eux, par contre, inconnus. Il serait donc intéressant, via la transparence, de connaître comment une racine et l'ensemble de ses endophytes, qu'ils soient fongiques ou bactériens, s'organisent d'un point de vue spatial et fonctionnel au sein d'un fragment racinaire.

Remerciements

“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”

[Marie Curie]

Qu'étions-nous, si ce n'est une bande de gamins émotionnellement affectés par le moindre de leur résultat, blêmes devant la quantité de taux de myc à faire ; ravies de pouvoir refiler ça à un stagiaire, sans dessus dessous à l'idée de publier en première auteur. Et tous confrontés un moment ou à un autre au syndrome de l'imposteur. L'aventure des 4 As se terminent, avec un brin de nostalgie tout de même. Les anciens doctorants maintenant docteurs, moi et mon cœur de pierre vous remercions.

Mes respects particuliers à toi, Antoine, pour avoir eu la bravoure et la patience de partager un bureau avec moi... Durant ces années nous avons, je crois, brillamment exercer les deux piliers de la science qui sont la curiosité et le scepticisme. Et peut-être même que nous avons fini par les incarner. Nos débats, qu'ils soient scientifiques ou sociétaux, bien que ponctuels, ont toujours été significatifs (MH-corrected p-value < 0,05). Merci à toi camarade !

“Anatomy is to physiology as geography is to history; it describes the theatre of events.”

[Jean-François Fernel]

Une découverte, que dis-je une épiphanie ... la microscopie ! La rigueur pleine de bonne humeur, tout pour me plaire. Bien qu'à plusieurs reprises j'ai pu te mettre dans l'inconfort à cause de mes horaires de travail peu conventionnels, toujours tu étais là, patiente et sereine, jamais tu n'as perdu confiance en moi. Christine, sans toi cette thèse n'aurait jamais été ce qu'elle est ! Les mots seront toujours insuffisants pour te témoigner ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de microscopie, qui m'a accompagnée dans la deuxième moitié de cette thèse. Notamment Laure, pour ta bienveillance et l'accueil que tu as réservé à mes nombreuses idées « originales » et ton investissement.

“Blind respect for authority is the greatest enemy of truth.”
[Albert Einstein]

Ô Capitaine ! Mon capitaine !

Je n’aurais pas pu imaginer meilleur directeur de thèse. Ta patience répondant à mes emportements, ton optimisme facétieux face à mon pessimisme légendaire, l’accueil plein d’humilité que tu faisais à mes « Et si... » un peu farfelus de jeune scientifique, et pour ton soutien infaillible, partie émergée de ton immense humanité.

Merci à toi également, Daniel, d’avoir composé cette partition. Dommage que les chefs d’orchestre ne puissent pas imposer la valeur des notes. Heureuse d’avoir pu partager ces moments avec vous.

**“An experiment is a question which science poses to Nature and
a measurement is the recording of Nature’s answer.”**
[Max Planck]

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury, pour l’examen de ce manuscrit et les discussions pertinentes au cours de ma soutenance. Ainsi que toutes les personnes qui ont contribué à ce travail de thèse durant sa réalisation.

Ainsi que toute ma reconnaissance à ceux que j’appelle les orfèvres _ Noureddine, Valérie, Joel. Pour avoir pris soin de mes plantes, m’avoir permis d’utiliser du matériel biologique de qualité et transmis une part de votre savoir-faire.

Bibliographie

- Aarle, I.M. van, Olsson, P.A., Söderström, B., 2001. Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia* 93, 17–24. <https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12061275>
- Affaticati, P., Le Mével, S., Jenett, A., Rivière, L., Machado, E., Mughal, B.B., Fini, J.-B., 2018. X-FaCT: Xenopus-Fast Clearing Technique, in: Vleminckx, K. (Ed.), *Xenopus*. Springer New York, New York, NY, pp. 233–241. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8784-9_16
- Ait Lahmidi, N., Courty, P.-E., Brulé, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Doidy, J., Berta, G., Lingua, G., Wipf, D., Bonneau, L., 2016. Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel Rhizophagus irregularis monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiology and Biochemistry* 107, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.023>
- Alonzo, F., Mayzaud, P., 1999. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Marine Chemistry* 67, 289–301. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00075-4)
- Anderson, L.E., 1954. Hoyer's Solution as a Rapid Permanent Mounting Medium for Bryophytes. *The Bryologist* 57, 242. <https://doi.org/10.2307/3240091>
- Andrino, A., Guggenberger, G., Sauheitl, L., Burkart, S., Boy, J., 2021. Carbon investment into mobilization of mineral and organic phosphorus by arbuscular mycorrhiza. *Biol Fertil Soils* 57, 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01505-5>
- Atkinson, J.A., Wells, D.M., 2017. An Updated Protocol for High Throughput Plant Tissue Sectioning. *Front. Plant Sci.* 8, 1721. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01721>
- Bago, B., Pfeffer, P.E., Shachar-Hill, Y., 2000. Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology* 124, 949–958. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.949>
- Balestrini, R., Salvioli, A., Dal Molin, A., Novero, M., Gabelli, G., Paparelli, E., Marroni, F., Bonfante, P., 2017. Impact of an arbuscular mycorrhizal fungus versus a mixed microbial inoculum on the transcriptome reprogramming of grapevine roots. *Mycorrhiza* 27, 417–430. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0754-8>
- Beaugrand, J., Goudenhoft, C., Alvarado, C., Devaux, M.-F., Rivard, C., Durand, S., Chauvet, H., Réfrégiers, M., Jamme, F., Guillon, F., Baley, C., Bourmaud, A., 2022. Evolution of the flax cell wall composition during development and after gravitropism by synchrotron fluorescence imaging. *Industrial Crops and Products* 175, 114256. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114256>
- Bécard, G., Pfeffer, P.E., 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174, 62–68. <https://doi.org/10.1007/BF01404043>
- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., Giovannetti, M., 2009. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1491–1496. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.005>
- Bergeron, K., 2013. LE GROUPE D'EXPERTS EN PROTECTION DE LA VIGNE 7.
- Bersier, J.-D., Bocquet, G., 1960. Les méthodes d'éclaircissement en vascularisation et en morphogénie végétales comparées. <https://doi.org/10.5169/SEALS-738525>
- Bevege, D.I., 1968. A rapid technique for clearing tannins and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone* spp., and some records of infection in Australasian plants. *Transactions of the British Mycological Society* 51, 808-IN16. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(68\)80106-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(68)80106-8)
- Bich, C., Touboul, D., Brunelle, A., 2013. Study of experimental variability in TOF-SIMS mass spectrometry imaging of biological samples. *International Journal of Mass Spectrometry* 337, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2012.12.010>

- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., Kühn, C., 2014. The sucrose transporter SI SUT 2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J* 78, 877–889. <https://doi.org/10.1111/tpj.12515>
- BIVB, 2012. Conférence de Presse –Hospices de Beaune communiqué Millésime 2012 - Vins de Bourgogne. https://www.vins-bourgogne.fr/presse/gallery_files/site/289/1910/37672.pdf
- Bougourd, S., Marrison, J., Haseloff, J., 2000. An aniline blue staining procedure for confocal microscopy and 3D imaging of normal and perturbed cellular phenotypes in mature *Arabidopsis* embryos. *The Plant Journal* 8.
- Bouvier, C., Glanville, H., de Viguerie, L., Merucci, C., Walter, P., Brunelle, A., 2021. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging of Cross Sections from the Bacchanals Paintings of Nicolas Poussin. *Anal. Chem.* 93, 4463–4471. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04471>
- Brands, M., Dörmann, P., 2022. Two AMP-Binding Domain Proteins from *Rhizophagus irregularis* Involved in Import of Exogenous Fatty Acids. *MPMI* 35, 464–476. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-22-0026-R>
- Bravo, A., York, T., Pumplin, N., Mueller, L.A., Harrison, M.J., 2016. Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nature Plants* 2, 15208. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.208>
- Breuillin-Sessoms, F., Floss, D.S., Gomez, S.K., Pumplin, N., Ding, Y., Levesque-Tremblay, V., Noar, R.D., Daniels, D.A., Bravo, A., Eaglesham, J.B., Benedito, V.A., Udvardi, M.K., Harrison, M.J., 2015. Suppression of Arbuscule Degeneration in *Medicago truncatula phosphate transporter4* Mutants Is Dependent on the Ammonium Transporter 2 Family Protein AMT2;3. *The Plant Cell* 27, 1352–1366. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131144>
- Briat, J.-F., Job, D., 2017. Les sols et la vie souterraine: Des enjeux majeurs en agroécologie. *Quae*.
- Brundrett, M.C., Piché, Y., Peterson, R.L., 1984. A new method for observing the morphology of vesicular–arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.* 62, 2128–2134. <https://doi.org/10.1139/b84-290>
- Calabrese, S., Cusant, L., Sarazin, A., Niehl, A., Erban, A., Brulé, D., Recorbet, G., Wipf, D., Roux, C., Kopka, J., Boller, T., Courty, P.-E., 2019. Imbalanced Regulation of Fungal Nutrient Transports According to Phosphate Availability in a Symbiocosm Formed by Poplar, Sorghum, and *Rhizophagus irregularis*. *Front. Plant Sci.* 10, 1617. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01617>
- Cameron, D.D., Neal, A.L., Wees, S.C.M. van, Ton, J., 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science* 18, 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.004>
- Chagnot, C., Vénien, A., Peyrin, F., Jamme, F., Réfrégiers, M., Desvaux, M., Astruc, T., 2015. Deep UV excited muscle cell autofluorescence varies with the fibre type. *Analyst* 140, 4189–4196. <https://doi.org/10.1039/C5AN00172B>
- Che, X., Lai, W., Wang, S., Wang, X., Hu, W., Chen, H., Xie, X., Tang, M., 2022. Multiple PHT1 family phosphate transporters are recruited for mycorrhizal symbiosis in *Eucalyptus grandis* and conserved PHT1;4 is a requirement for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Tree Physiology* tpac050. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpac050>
- Chen, W., Li, J., Zhu, H., Xu, P., Chen, J., Yao, Q., 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungus Enhances Lateral Root Formation in *Poncirus trifoliata* (L.) as Revealed by RNA-Seq Analysis. *Front. Plant Sci.* 8, 2039. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02039>
- Cheng, X., Baumgartner, K., 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biology and Fertility of Soils* 40, 406–412. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0797-4>
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S.-Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., Pak, S., Bernstein, H., Ramakrishnan, C., Grosenick, L., Gradinaru, V., Deisseroth, K., 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337. <https://doi.org/10.1038/nature12107>

- Dalpe, Y., 2005. Les mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection* 86, 53. <https://doi.org/10.7202/011715ar>
- De Bellis, D., Kalmbach, L., Marhavy, P., Daraspe, J., Geldner, N., Barberon, M., 2022. Extracellular vesiculo-tubular structures associated with suberin deposition in plant cell walls. *Nat Commun* 13, 1489. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29110-0>
- Delfino, I., Ricciardi, V., Lepore, M., 2021. Synchrotron FTIR Microspectroscopy Investigations on Biochemical Changes Occurring in Human Cells Exposed to Proton Beams. *Applied Sciences* 12, 336. <https://doi.org/10.3390/app12010336>
- Feng, Z., Liu, X., Feng, G., Zhu, H., Yao, Q., 2020. Linking lipid transfer with reduced arbuscule formation in tomato roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungus under low pH stress. *Environ Microbiol* 22, 1036–1051. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14810>
- Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., Pérez-Tienda, J., 2019. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science* 280, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>
- France, C. d'agriculture, 2019. Plan Ecophyto 2 [WWW Document]. URL <https://chambres-agriculture.fr/agriculteur-et-politiques/ecophyto/plan-ecophyto-2/> (accessed 5.14.19).
- Frank A., 1885. Über Die Auf Wurzelsymbiose Beruhende Ernährung Gewisser Bäume Durch Unterirdische Pilze 3:128–145
- Galet, P., 1998. Grape Varieties and Rootstock Varieties (J. Smith, Trans.). Oenoplurimedia, Chaintré, France.
- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S.D., Wipf, D., Courty, P.-E., 2016. Take a Trip Through the Plant and Fungal Transportome of Mycorrhiza. *Trends in Plant Science* 21, 937–950. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.010>
- Gardner, R.O., 1975. An overview of botanical clearing technique. *Stain Technol* 50, 99–105. <https://doi.org/10.3109/10520297509117042>
- Gavériaux, J.-P., n.d. - Mycorhizes VAM et Geosiphon pyriformis (Kützing) Wettstein - 17.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.-N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D., 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20, 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernes, A.S., Morini, S., Nuti, M.P., 2001. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151, 717–724. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00216.x>
- Giri, B., Kapoor, R., Mukerji, K.G., 2007. Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by Arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microb. Ecol.* 54, 753–760. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9239-9>
- Glime, J.M., Wagner, D.H., n.d. CHAPTER 2-2a LABORATORY TECHNIQUES: SLIDE PREPARATION AND STAINS 46.
- Goddard, M.-L., Belval, L., Martin, I.R., Roth, L., Laloue, H., Deglène-Benbrahim, L., Valat, L., Bertsch, C., Chong, J., 2021. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Triggers Major Changes in Primary Metabolism Together With Modification of Defense Responses and Signaling in Both Roots and Leaves of *Vitis vinifera*. *Front. Plant Sci.* 12, 721614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721614>
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bücking, H., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y., 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435, 819. <https://doi.org/10.1038/nature03610>
- Greenbaum, A., Chan, K.Y., Dobрева, T., Brown, D., Balani, D.H., Boyce, R., Kronenberg, H.M., McBride, H.J., Gradinaru, V., 2017. Bone CLARITY: Clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. *Sci. Transl. Med.* 9, eaah6518. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6518>

- Harchouni, S., Field, B., Menand, B., 2018. AC-202, a highly effective fluorophore for the visualization of lipid droplets in green algae and diatoms. *Biotechnol Biofuels* 11, 120. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1117-9>
- Harrison, M.J., 2012. Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 691–698. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.08.010>
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J., 2002. A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell* 14, 2413–2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Harrison, M.J., Ivanov, S., 2017. Exocytosis for endosymbiosis: membrane trafficking pathways for development of symbiotic membrane compartments. *Current Opinion in Plant Biology* 38, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.019>
- Harrison, M.J., Pumplin, N., Breuillin, F.J., Noar, R.D., Park, H.-J., 2010. Phosphate Transporters in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis, in: Koltai, H., Kapulnik, Y. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 117–135. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9489-6_6
- Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S., Matsunaga, S., 2016. Three-Dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. *Plant Cell Physiol* 57, 462–472. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw027>
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J., 2000. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 463–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- HCCA, 2017. Section économique - Rapport filière viticole 2017 (141217) V8.pdf.
- He, Y., Yan, Q., Yang, D., Li, M., Xiao, Y., 2021. An Optical Clearing Technique to Visualize Internal Root Structure (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-753274/v1>
- Hedhly, A., Vogler, H., Eichenberger, C., Grossniklaus, U., 2018. Whole-mount Clearing and Staining of *Arabidopsis* Flower Organs and Siliques. *JoVE* 56441. <https://doi.org/10.3791/56441>
- Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., Requena, N., 2011. A Versatile Monosaccharide Transporter That Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* sp Is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *The Plant Cell* 23, 3812–3823. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089813>
- Hériché, M., Arnould, C., Wipf, D., Courty, P.-E., 2022. Imaging plant tissues: advances and promising clearing practices. *Trends in Plant Science* S1360138521003496. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.12.006>
- Hériché, M., Arnould, C., Wipf, D., Pierre-Emmanuel, C., 2021. New clearing protocol for tannic roots optical imaging. *Trends in Plant Science* S1360138521002466. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.015>
- Herr, J.M., 1971. A New Clearing-Squash Technique for the Study of Ovule Development in Angiosperms. *American Journal of Botany* 58, 785–790. <https://doi.org/10.2307/2441475>
- Hijikata, N., Murase, M., Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M., Ezawa, T., 2010. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 186, 285–289. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03168.x>
- Horn, P.J., Chapman, K.D., 2014. Lipidomics in situ: insights into plant lipid metabolism from high resolution spatial maps of metabolites. *Prog. Lipid Res.* 54, 32–52. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.01.003>
- Hu, W., Pan, L., Chen, H., Tang, M., 2020. VBA–AMF: A VBA Program Based on the Magnified Intersections Method for Quantitative Recording of Root Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Indian J Microbiol* 60, 374–378. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00866-7>
- Ichino, T., Yazaki, K., 2022. Modes of secretion of plant lipophilic metabolites via ABCG transporter-dependent transport and vesicle-mediated trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 66, 102184. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102184>

- Ivanov, S., Austin, J., Berg, R.H., Harrison, M.J., 2019. Extensive membrane systems at the host–arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nature Plants* 5, 194–203. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>
- Jamme, F., Cinquin, B., Gohon, Y., Pereiro, E., Réfrégiers, M., Froissard, M., 2020. Synchrotron multimodal imaging in a whole cell reveals lipid droplet core organization. *Journal of Synchrotron Radiation* 27, 772–778. <https://doi.org/10.1107/S1600577520003847>
- Jamme, Frédéric, Kascakova, S., Villette, S., Allouche, F., Pallu, S., Rouam, V., Réfrégiers, M., 2013. Deep UV autofluorescence microscopy for cell biology and tissue histology. *Biology of the Cell* 105, 277–288. <https://doi.org/10.1111/boc.201200075>
- Jamme, F., Lagarde, B., Giuliani, A., Garcia, G.A., Mercury, L., 2013. Synchrotron infrared confocal microscope: Application to infrared 3D spectral imaging. *J. Phys.: Conf. Ser.* 425, 142002. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/425/14/142002>
- Jamme, F., Villette, S., Giuliani, A., Rouam, V., Wien, F., Lagarde, B., Réfrégiers, M., 2010. Synchrotron UV Fluorescence Microscopy Uncovers New Probes in Cells and Tissues. *Microscopy and Microanalysis* 16, 507–514. <https://doi.org/10.1017/S1431927610093852>
- Jämtgård, S., Näsholm, T., Huss-Danell, K., 2010. Nitrogen compounds in soil solutions of agricultural land. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2325–2330. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.011>
- Janse J., 1897. Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. *Ann Jard Bot Buitenzorg* 14:53–201
- Javot, H., Penmetsa, R.V., Breuillin, F., Bhattarai, K.K., Noar, R.D., Gomez, S.K., Zhang, Q., Cook, D.R., Harrison, M.J., 2011. Medicago truncatula mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis: N status and arbuscule degeneration in mtpt4 mutants. *The Plant Journal* 68, 954–965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04746.x>
- Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., Harrison, M.J., 2007. A Medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS* 104, 1720–1725. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608136104>
- Jellouli, N., Salem, A.B., Ghorbel, A., Jouira, H.B., 2010. Evaluation of Protein Extraction Methods for Vitis vinifera Leaf and Root Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 933–940. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00973.x>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., Wang, E., 2017. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science* 356, 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Kameoka, H., Gutjahr, C., 2022. Functions of Lipids in Development and Reproduction of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant and Cell Physiology* pcac113. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac113>
- Karandashov, V., Bucher, M., 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science* 10, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.003>
- Ke, M.-T., Fujimoto, S., Imai, T., 2013. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 16, 1154–1161. <https://doi.org/10.1038/nn.3447>
- Keller, M., 2015. *The science of grapevines: anatomy and physiology*, Second edition. ed. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.
- Keymer, A., Gutjahr, C., 2018. Cross-kingdom lipid transfer in arbuscular mycorrhiza symbiosis and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 44, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.005>
- Keymer, A., Pimprikar, P., Wewer, V., Huber, C., Brands, M., Bucerius, S.L., Delaux, P.-M., Klingl, V., Röpenack-Lahaye, E. von, Wang, T.L., Eisenreich, W., Dörmann, P., Parniske, M., Gutjahr, C., 2017. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *eLife* 6, e29107. <https://doi.org/10.7554/eLife.29107>

- Kobae, Y., Gutjahr, C., Paszkowski, U., Kojima, T., Fujiwara, T., Hata, S., 2014. Lipid Droplets of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Emerge in Concert with Arbuscule Collapse. *Plant and Cell Physiology* 55, 1945–1953. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu123>
- Kobae, Y., Ohtomo, R., 2016. An improved method for bright-field imaging of arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 62, 27–30. <https://doi.org/10.1080/00380768.2015.1106923>
- Kobae, Y., Ohtomo, R., Morimoto, S., Sato, D., Nakagawa, T., Oka, N., Sato, S., 2019. Isolation of Native Arbuscular Mycorrhizal Fungi within Young Thalli of the Liverwort *Marchantia paleacea*. *Plants* 8, 142. <https://doi.org/10.3390/plants8060142>
- Kobayashi, Y., Maeda, T., Yamaguchi, K., Kameoka, H., Tanaka, S., Ezawa, T., Shigenobu, S., Kawaguchi, M., 2018. The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Genomics* 19, 465. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4853-0>
- Kough J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., 1987. Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytol* 106:707–715
- Kryukov, A.A., Gorbunova, A.O., Kudriashova, T.R., Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Malikov, U.M., Shishova, M.F., Kozhemyakov, A.P., Yurkov, A.P., 2021. Sugar transporters of the SWEET family and their role in arbuscular mycorrhiza. *Vestn. VOGIS* 25, 754–760. <https://doi.org/10.18699/VJ21.086>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kurihara, D., Mizuta, Y., Nagahara, S., Higashiyama, T., 2021. ClearSeeAlpha: Advanced Optical Clearing for Whole-Plant Imaging. *Plant and Cell Physiology* pcab033. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab033>
- Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y., Higashiyama, T., 2015. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142, 4168–4179. <https://doi.org/10.1242/dev.127613>
- Lanfranco, L., Bolchi, A., Ros, E.C., Ottonello, S., Bonfante, P., 2002. Differential Expression of a Metallothionein Gene during the Presymbiotic versus the Symbiotic Phase of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Plant Physiology* 130, 58–67. <https://doi.org/10.1104/pp.003525>
- Lanfranco, L., Novero, M., Bonfante, P., 2005. The Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita* Possesses a CuZn Superoxide Dismutase That Is Up-Regulated during Symbiosis with Legume Hosts. *Plant Physiology* 137, 1319–1330. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050435>
- Laparré, J., Malbreil, M., Letisse, F., Portais, J.C., Roux, C., Bécard, G., Puech-Pagès, V., 2014. Combining Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveals that Propionyl- and Butyryl-Carnitines Are Involved in Late Stages of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant* 7, 554–566. <https://doi.org/10.1093/mp/sst136>
- Leroy, A., Devaux, M.-F., Fanuel, M., Chauvet, H., Durand, S., Alvarado, C., Habrant, A., Sandt, C., Rogniaux, H., Paës, G., Guillon, F., 2022. Real-time imaging of enzymatic degradation of pretreated maize internodes reveals different cell types have different profiles. *Bioresource Technology* 353, 127140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127140>
- Li, Y., Fu, Q., Yu, S., Yan, M., Berglund, L., 2016. Optically Transparent Wood from a Nanoporous Cellulosic Template: Combining Functional and Structural Performance. *Biomacromolecules* 17, 1358–1364. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00145>
- Loth-Pereda, V., Orsini, E., Courty, P.-E., Lota, F., Kohler, A., Diss, L., Blaudez, D., Chalot, M., Nehls, U., Bucher, M., Martin, F., 2011. Structure and Expression Profile of the Phosphate Pht1 Transporter Gene Family in Mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology* 156, 2141–2154. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180646>

- Luginbuehl, L.H., van Erp, H., Cheeld, H., Mysore, K.S., Wen, J., Oldroyd, G.E., Eastmond, P.J., 2021. Plants export 2-monopalmitin and supply both fatty acyl and glyceryl moieties to arbuscular mycorrhizal fungi (preprint). *Plant Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.19.427311>
- MacLean, A.M., Bravo, A., Harrison, M.J., 2017. Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Cell* 29, 2319–2335. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00555>
- Madrid-Delgado, G., Orozco-Miranda, M., Cruz-Osorio, M., Adriana Hernández-Rodríguez, O., Rodríguez-Heredia, R., Roa-Huerta, M., Dolores Avila-Quezada, G., 2021. Pathways of Phosphorus Absorption and Early Signaling between the Mycorrhizal Fungi and Plants. *Phyton* 90, 1321–1338. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.016174>
- Malloch, D.W., Pirozynski, K.A., Raven, P.H., 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2113–2118.
- Matryba, P., Kaczmarek, L., Gołąb, J., 2019. Advances in Ex Situ Tissue Optical Clearing. *Laser & Photonics Reviews* 13, 1800292. <https://doi.org/10.1002/lpor.201800292>
- McBryde, M.C., 1936. A METHOD OF DEMONSTRATING RUST HYPHAE AND HAUSTORIA IN UNSECTIONED LEAF TISSUE. *American Journal of Botany* 23, 686–688. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1936.tb09048.x>
- McDonald, K.L., Auer, M., 2006. High-Pressure Freezing, Cellular Tomography, and Structural Cell Biology. *BioTechniques* 41, 137–143. <https://doi.org/10.2144/000112226>
- Macdonald R., Lewis M., 1978. The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol* 80:135–141
- Messal, H.A., Almagro, J., Zaw Thin, M., Tedeschi, A., Ciccarelli, A., Blackie, L., Anderson, K.I., Miguel-Aliaga, I., van Rheenen, J., Behrens, A., 2021. Antigen retrieval and clearing for whole-organ immunofluorescence by FLASH. *Nat Protoc* 16, 239–262. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00414-z>
- Montero, H., Paszkowski, U., 2022. A simple and versatile fluorochrome-based procedure for imaging of lipids in arbuscule-containing cells. *The Plant Journal* 112, 294–301. <https://doi.org/10.1111/tpj.15934>
- Murakami, T.C., Mano, T., Saikawa, S., Horiguchi, S.A., Shigeta, D., Baba, K., Sekiya, H., Shimizu, Y., Tanaka, K.F., Kiyonari, H., Iino, M., Mochizuki, H., Tainaka, K., Ueda, H.R., 2018. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat Neurosci* 21, 625–637. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0109-1>
- Nagaki, K., Yamaji, N., Murata, M., 2017. ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples. *Scientific Reports* 7, 42203. <https://doi.org/10.1038/srep42203>
- Nagy, R., Karandashov, V., Chague, V., Kalinkevich, K., Tamasloukht, M., Xu, G., Jakobsen, I., Levy, A.A., Amrhein, N., Bucher, M., 2005. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *The Plant Journal* 42, 236–250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02364.x>
- Nicolson T., 1959. Mycorrhizae in the Graminae. I. Vesicular arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Trans Br Mycol Soc* 42:421–438
- Noceto, P.-A., Bettenfeld, P., Bousageon, R., Hériché, M., Sportes, A., van Tuinen, D., Courty, P.-E., Wipf, D., 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the development of quality traits in crop production, alone or combined with plant growth-promoting bacteria. *Mycorrhiza* 31, 655–669. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01054-1>
- Noceto, P.A., Hériché, M., Gontier, L., Wipf, D., Bazerolle, B., Cahurel, J.Y., Courty, P.E., 2020. Les couverts végétaux : une pratique agroécologique au service de la vigne. *Revue des Œnologues*, 178, 24–26
- Nouri, E., Surve, R., Bapaume, L., Stumpe, M., Chen, M., Zhang, Y., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H., Glauser, G., Bruissson, S., Reinhardt, D., 2021. Phosphate Suppression of Arbuscular

- Mycorrhizal Symbiosis Involves Gibberellic Acid Signaling. *Plant and Cell Physiology* 62, 959–970. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab063>
- OIVV, 2016. elements de conjecture mondiale. <http://www.oiv.int/public/medias/4567/oiv-noteconjmars2016-fr.pdf>
- Palmer, W.M., Flynn, J.R., Martin, A.P., Reed, S.L., Grof, C.P.L., White, R.G., Furbank, R.T., 2018. 3D Clearing and Molecular Labeling in Plant Tissues, in: Covshoff, S. (Ed.), *Photosynthesis*. Springer New York, New York, NY, pp. 285–304. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7786-4_17
- Palmer, W.M., Martin, A.P., Flynn, J.R., Reed, S.L., White, R.G., Furbank, R.T., Grof, C.P.L., 2015. PEA-CLARITY: 3D molecular imaging of whole plant organs. *Sci Rep* 5, 13492. <https://doi.org/10.1038/srep13492>
- Park, Y.-G., Sohn, C.H., Chen, R., McCue, M., Yun, D.H., Drummond, G.T., Ku, T., Evans, N.B., Oak, H.C., Trieu, W., Choi, H., Jin, X., Lilascharoen, V., Wang, J., Truttman, M.C., Qi, H.W., Ploegh, H.L., Golub, T.R., Chen, S.-C., Frosch, M.P., Kulik, H.J., Lim, B.K., Chung, K., 2019. Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nat Biotechnol* 37, 73–83. <https://doi.org/10.1038/nbt.4281>
- Passarelli M.K., Winograd N., 2011. Lipid Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS). *Biochim Biophys Acta* 1811: 976–990
- Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C., Briggs, S.P., 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS* 99, 13324–13329. <https://doi.org/10.1073/pnas.202474599>
- Becker, K. et al., 2020. Chemical clearing of brains. In *Handbook of Neurophotonics* (Pavone, F.S. and Shoham, S., eds), pp. 191–220, CRC Press
- Peterson, C., and FLETCHER, R., 1973. Lactic acid clearing and fluorescent staining for demonstration of sieve tubes. *Stain Technol.* 48: 23-27.
- Peyronel B., 1940. Prime osservazioni sui rapporti traluce e simbiosi micorrizica. *Annuaire Lab* 4:3–19
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158-IN18. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Prunet, N., 2017. Live Confocal Imaging of Developing Arabidopsis Flowers. *JoVE* 55156. <https://doi.org/10.3791/55156>
- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N., Bucher, M., 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414, 462–465. <https://doi.org/10.1038/35106601>
- Ravikumar, S., Surekha, R., Thavarajah, R., 2014. Mounting media: An overview. *J NTR Univ Health Sci* 3, 1. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.128479>
- Redecker, D., 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289, 1920–1921. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920>
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-27>
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H., 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11841–11843.
- Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., Wang, V.X., Tang, C.Y., Olsen, O., Dulac, C., Osten, P., Tessier-Lavigne, M., 2016. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* 165, 1789–1802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.007>
- Rich, M.K., Nouri, E., Courty, P.-E., Reinhardt, D., 2017. Diet of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Bread and Butter? *Trends in Plant Science* 22, 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.008>

- Rich, M.K., Vigneron, N., Libourel, C., Keller, J., Xue, L., Hajheidari, M., Radhakrishnan, G.V., Le Ru, A., Diop, S.I., Potente, G., Conti, E., Duijsings, D., Batut, A., Le Faouder, P., Kodama, K., Kyojuka, J., Sallet, E., Bécard, G., Rodriguez-Franco, M., Ott, T., Bertrand-Michel, J., Oldroyd, G.E.D., Szövényi, P., Bucher, M., Delaux, P.-M., 2021. Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science* 372, 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.abg0929>
- Richardson, D.S., Lichtman, J.W., 2015. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 162, 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>
- Rilla, K., 2021. Diverse plasma membrane protrusions act as platforms for extracellular vesicle shedding. *Journal of Extracellular Vesicles* 10. <https://doi.org/10.1002/jev2.12148>
- Roth, R., Hillmer, S., Funaya, C., Chiapello, M., Schumacher, K., Lo Presti, L., Kahmann, R., Paszkowski, U., 2019. Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules. *Nature Plants* 5, 204–211. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0365-4>
- Salmeron-Santiago, I.A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J.J., Pedraza-Santos, M.E., Santoyo, G., Pozo, M.J., Chávez-Bárceñas, A.T., 2021. An Updated Review on the Modulation of Carbon Partitioning and Allocation in Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Microorganisms* 10, 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. *et al.*, 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schreiner, R.P., 2005. Spatial and Temporal Variation of Roots, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, and Plant and Soil Nutrients in a Mature Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) Vineyard in Oregon, USA. *Plant Soil* 276, 219–234. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4895-0>
- Schreiner, R.P., Tarara, J.M., Smithyman, R.P., 2007. Deficit irrigation promotes arbuscular colonization of fine roots by mycorrhizal fungi in grapevines (*Vitis vinifera* L.) in an arid climate. *Mycorrhiza* 17, 551–562. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0128-3>
- Schwarz, M.K., Scherbarth, A., Sprengel, R., Engelhardt, J., Theer, P., Giese, G., 2015. Fluorescent-Protein Stabilization and High-Resolution Imaging of Cleared, Intact Mouse Brains. *PLoS ONE* 10, e0124650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124650>
- Shobe, W.R., Lersten, N.R., 1967. A Technique for Clearing and Staining Gymnosperm Leaves. *Botanical Gazette* 128, 150–152. <https://doi.org/10.1086/336391>
- Simpson, J.L.S., 1929. A Short Method of Clearing Plant Tissues for Anatomical Studies. *Journal of the Royal Microscopical Society* 4, 131–132. <https://doi.org/10.3109/10520292909115543>
- Sing, K., Erickson, T., Amitai, Y., Hryhorczuk, D., 1996. Chloral Hydrate Toxicity from Oral and Intravenous Administration. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 34, 101–106. <https://doi.org/10.3109/15563659609020242>
- Smith, S., Read, D., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis - 3rd Edition* [WWW Document]. URL <https://www.elsevier.com/books/mycorrhizal-symbiosis/smith/978-0-12-370526-6> (accessed 6.10.19).
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M., Smith, F.A., 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology* 156, 1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
- Spalteholz, W., 1914. Ueber das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Praeparaten und seine theoretischen Bedingungen. S. Hirzel.
- Sportes, A., Hériché, M., Bousageon, R., Noceto, P.-A., van Tuinen, D., Wipf, D., Courty, P.E., 2021. A historical perspective on mycorrhizal mutualism emphasizing arbuscular mycorrhizas and their emerging challenges. *Mycorrhiza* 31, 637–653. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01053-2>
- Sportes, A., Durney, C., Courty, P. E., Trouvelot, S., Wipf, D., 2021b. Enquête sur l’utilisation et la

- valorisation de la mycorhize en pépinières. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques*, 178, 15-02.
- Stebbins, G.L., 1938. A Bleaching and Clearing Method for Plant Tissues. *Science* 87, 21–22. <https://doi.org/10.1126/science.87.2245.21>
- Sujkowska-Rybkowska, M., Znojek, E., 2018. Localization of calreticulin and calcium ions in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* in response to aluminum stress. *Journal of Plant Physiology* 229, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.014>
- Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., Ueda, H.R., 2014. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159, 911–924. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.034>
- Tang, N., San Clemente, H., Roy, S., Bécard, G., Zhao, B., Roux, C., 2016. A Survey of the Gene Repertoire of *Gigaspora rosea* Unravels Conserved Features among Glomeromycota for Obligate Biotrophy. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00233>
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Gollotte, A., 1993. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* 97, 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80248-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80248-7)
- Tomè, E., Ventura, M., Folegot, S., Zanotelli, D., Montagnani, L., Mimmo, T., Tonon, G., Tagliavini, M., Scandellari, F., 2016. Mycorrhizal contribution to soil respiration in an apple orchard. *Applied Soil Ecology* 101, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.01.016>
- Trappe J., 2005. A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15:277–281
- Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D., van Tuinen, D., Adrian, M., Wipf, D., 2015. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 1449–1467. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0329-7>
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., Palauqui, J.-C., 2008. High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 1494–1503. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056069>
- Ueda, H.R., Ertürk, A., Chung, K., Gradinaru, V., Chédotal, A., Tomancak, P., Keller, P.J., 2020. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 21, 61–79. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1>
- Valat, L., Deglène-Benbrahim, L., Kendel, M., Hussenet, R., Le Jeune, C., Schellenbaum, P., Maillot, P., 2018. Transcriptional induction of two phosphate transporter 1 genes and enhanced root branching in grape plants inoculated with *Funneliformis mosseae*. *Mycorrhiza* 28, 179–185. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0809-5>
- Vieites-Prado, A., Renier, N., 2021. Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development* 148, dev199369. <https://doi.org/10.1242/dev.199369>
- Vierheilig, H., Alt-Hug, M., Wiemken, A., Boller, T., 2001. Hyphal in vitro growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* is affected by chitinase but not by β -1,3-glucanase. *Mycorrhiza* 11, 279–282. <https://doi.org/10.1007/s005720100132>
- Vierheilig, H., Schweiger, P., Brundrett, M., 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots+. *Physiol Plant* 0, 051021083431001-??? <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00564.x>
- Volpe, V., Dell'Aglio, E., Giovannetti, M., Ruberti, C., Costa, A., Genre, A., Guether, M. and Bonfante, P., 2013. An AM-induced, *MYB*-family gene of *Lotus japonicus* (*LjMAMI*) affects root growth in an AM-independent manner. *Plant J*, 73: 442-455. <https://doi.org/10.1111/tpj.12045>
- Volpe, V., Giovannetti, M., Sun, X.-G., Fiorilli, V., Bonfante, P., 2016. The phosphate transporters *LjPT4* and *MtPT4* mediate early root responses to phosphate status in non mycorrhizal roots: Characterization of AM-induced Pi transporters. *Plant, Cell & Environment* 39, 660–671. <https://doi.org/10.1111/pce.12659>

- Wang, H., Wang, W., Zhan, J., Yan, A., Sun, L., Zhang, G., Wang, X., Ren, J., Huang, W., Xu, H., 2016. The accumulation and localization of chalcone synthase in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 106, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.042>
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., Wang, E., 2017. Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant* 10, 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- Warner, C.A., Biedrzycki, M.L., Jacobs, S.S., Wisser, R.J., Caplan, J.L., Sherrier, D.J., 2014. An Optical Clearing Technique for Plant Tissues Allowing Deep Imaging and Compatible with Fluorescence Microscopy. *Plant Physiology* 166, 1684–1687. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244673>
- Wei, J., Qi, Y., Li, M., Li, R., Yan, M., Shen, H., Tian, L., Liu, Y., Tian, S., Liu, L., Zhang, Y., Sun, H., Bai, Z., Zhang, K., Li, C., 2020. Low-cost and efficient confocal imaging method for arabidopsis flower. *Developmental Biology* 466, 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.07.012>
- Wewer, V., Brands, M., Dörmann, P., 2014. Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. *Plant J* 79, 398–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.12566>
- Wilson, G.W.T., Rice, C.W., Rillig, M.C., Springer, A., Hartnett, D.C., 2009. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecology Letters* 12, 452–461. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01303.x>
- Wipf, D., Krajinski, F., Tuinen, D. van, Recorbet, G., Courty, P.-E., 2019. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist* 223, 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>
- Wipf, D., Pfister, C., Mounier, A., Leborgne-Castel, N., Frommer, W.B., Courty, P.-E., 2021. Identification of Putative Interactors of Arabidopsis Sugar Transporters. *Trends in Plant Science* 26, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.009>
- Wuyts, N., Palauqui, J.-C., Conéjéro, G., Verdeil, J.-L., Granier, C., Massonnet, C., 2010. High-contrast three-dimensional imaging of the Arabidopsis leaf enables the analysis of cell dimensions in the epidermis and mesophyll. *Plant methods* 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-17>
- Xie, X., Huang, W., Liu, F., Tang, N., Liu, Y., Lin, H., Zhao, B., 2013. Functional analysis of the novel mycorrhiza-specific phosphate transporter AsPT1 and PHT1 family from *Astragalus sinicus* during the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 198, 836–852. <https://doi.org/10.1111/nph.12188>
- Yang, S.-Y., Grønlund, M., Jakobsen, I., Grottemeyer, M.S., Rentsch, D., Miyao, A., Hirochika, H., Kumar, C.S., Sundaresan, V., Salamin, N., Catausan, S., Mattes, N., Heuer, S., Paszkowski, U., 2012. Nonredundant Regulation of Rice Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis by Two Members of the *PHOSPHATE TRANSPORTER1* Gene Family. *Plant Cell* 24, 4236–4251. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104901>
- Yang, S.-Y., Paszkowski, U., 2011. Phosphate Import at the Arbuscule: Just a Nutrient? *MPMI* 24, 1296–1299. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0151>
- Yu, T., Zhu, J., Li, D., Zhu, D., 2021. Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. *iScience* 24, 102178. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102178>
- Zaller, J.G., Cantelmo, C., Santos, G.D., Muther, S., Gruber, E., Pallua, P., Mandl, K., Friedrich, B., Hofstetter, I., Schmuckenschlager, B., Faber, F., 2018. Herbicides in vineyards reduce grapevine root mycorrhization and alter soil microorganisms and the nutrient composition in grapevine roots, leaves, xylem sap and grape juice. *Environ Sci Pollut Res Int* 25, 23215–23226. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2422-3>

Contributions scientifiques

1. Valorisations scientifiques

1.1 L'imagerie tridimensionnelle d'échantillons volumineux est limitée par les phénomènes de réfraction et d'absorption de la lumière par les composants tissulaires (lipides, pigments..). Afin de limiter ses phénomènes et permettre l'acquisition d'image sur toute l'épaisseur d'une racine mycorhizée, il est nécessaire de rendre transparent les échantillons. Cela est possible en dépigmentant et en homogénéisant les différents indices de réfraction au sein du tissu, via des traitements chimiques. Cette technique, appelée transparisation, permet une analyse tridimensionnelle sur échantillon entier des structures d'intérêt marquées par fluorescence. Nous passons en revue (**Hériché et al., 2022**) tous les protocoles de transparisation qui ont été appliqués et adaptés à partir d'observations sur les animaux ou développés spécifiquement pour les tissus végétaux afin d'acquérir de nouvelles connaissances sur la physiologie végétale et de développer des perspectives dans le domaine. Outre l'aspect de classification, notre objectif était de fournir des conseils utiles aux scientifiques afin qu'ils puissent choisir le protocole de transparisation le plus approprié parmi ceux qui existent, ou développer leur propre approche, en fonction du tissu végétal et de la question scientifique.

Hériché, M., Arnould, C., Wipf, D., Courty, P. E. (**2022**). Imaging plant tissues: advances and promising clearing practices. Trends in Plant Science 27, 601-615.

1.2 Au sein de ces protocoles de transparisation, seules quelques méthodes récemment développées sont compatibles avec un marquage fluorescent, notamment TOMEI « Transparent Plant Organ Method for Imaging », utilisant le 2,2'-thiodiethanol (TDE) comme agent de transparisation ; ou encore le Clearsee, solution à base d'urée. Le point commun entre ces solutions est leur efficacité concernant la transparisation d'organes chlorophylliens (feuilles et tiges d'*Arabidopsis thaliana*). Toutefois, les données sont manquantes concernant l'éclaircissement des racines c'est pourquoi nous avons mis au point un protocole de transparisation racinaire sur la plante modèle *Medicago truncatula* et sur racines pigmentées de vigne. Après avoir obtenu un niveau de transparence satisfaisant, nous avons marqué le champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis* présent à l'intérieur de ces racines (**Hériché et al., 2021**). J'ai également présenté ces protocoles lors de MiFoBio, une école pluridisciplinaire portant sur les avancées biologiques et technologiques en imagerie du vivant. Elle regroupe une large communauté constituée de biologistes, physiciens, instrumentalistes, chimistes, mathématiciens (**Hériché et al., 2021b**). Enfin, j'ai pu discuter de ces résultats lors des Journées Francophones Mycorhizes, qui regroupe une large communauté de scientifiques, principalement sur

la symbiose mycorhizienne à arbuscule, l'ectomycorhize et la mycorhize orchidoïde (**Hériché et al., 2022b**).

Hériché, M., Arnould, C., Wipf, D., Courty, P.E. (**2022b**) Approche tridimensionnelle de la répartition spatiale du champignon mycorhizien à arbuscule sur racines transparisées. "6èmes Journées Francophones Mycorhizes, Jun 2022, Dijon, France"

Hériché, M., Arnould, C., Wipf, D., Courty, P.E. (**2021**) New clearing protocol for tannic roots optical imaging. Trends in Plant Science 27, 616-617.

Hériché, M., Arnould, C., Wipf, D., Courty, P.E. (**2021b**) A clearing protocol for pigmented roots : make symbiotic micro-organisms visible in 3D. "Functionnal Microscopy for Biology MiFoBio, Nov 2021, Giens, France"

1.3 Depuis que Frank a introduit le mot "mycorhize" il y a 136 ans, la symbiose mycorhizienne est devenue une discipline à part entière : la communauté scientifique s'efforce d'en élucider les caractéristiques et les implications tant pour les partenaires végétaux et fongiques que pour d'autres micro-organismes tels que les bactéries. Le concept de symbiose bénéfique n'a cependant pas toujours été aussi bien accepté qu'aujourd'hui, et il a fallu de nombreuses années d'expérimentation et de controverses pour atteindre notre niveau de compréhension actuel. Dans ce contexte, j'ai participé à un article de revue qui visait à retracer l'Histoire de la mycorhize à arbuscules, en partant des racines de l'histoire de la mycorhize, ainsi que la découverte de différents types de mycorhize tels que l'ectomycorhize (Sportes et al., 2021). J'ai participé à l'écriture de certains paragraphes, à la lecture et la relecture du document, mais surtout à l'illustration de cette revue en imageant en microscopie confocale les différents types d'endomycorhizes tel que *Paris*, *Arum* et *Hepatic*.

Sportes, A., **Hériché, M.**, Bousageon, R., Noceto, P. A., van Tuinen, D., Wipf, D., Courty, P.E. (2021). A historical perspective on mycorrhizal mutualism emphasizing arbuscular mycorrhizas and their emerging challenges. Mycorrhiza 31, 637-653.

1.4 Dans le sol, certains microorganismes tels que les champignons mycorhiziens à arbuscules et certaines peuvent fournir des services écosystémiques liés aux paramètres de croissance, de nutrition et de qualité des plantes. J'ai participé à l'écriture d'une revue qui est une mise à jour de la recherche actuelle sur l'utilisation simple et combinée (co-inoculation) des champignons mycorhiziens à arbuscules et des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes dans la production végétale, en

mettant l'accent sur leurs impacts positifs sur les caractéristiques de qualité des cultures (Noceto et al., 2021). J'ai participé à l'écriture de certains paragraphes, à la lecture et la relecture du document.

Noceto, P. A., Bettenfeld, P., Bousageon, R., **Hériché, M.**, Sportes, A., van Tuinen, D., Courty, P.E., Wipf, D. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the development of quality traits in crop production, alone or combined with plant growth-promoting bacteria. *Mycorrhiza* 31, 655-669.

2. Articles de vulgarisation

Mon travail de doctorat portait sur l'utilisation de matériels biologiques (Vigne, *Medicago truncatula*) produits *in vitro* ou en conditions contrôlées. Les autres doctorants de l'équipe travaillant également sur la vigne, ont une approche plus appliquée. Ils abordent notamment le rôle des plantes de couverts et leur impact sur le fonctionnement de la vigne et de la symbiose mycorrhizienne à arbuscules. C'est dans ce contexte que j'ai participé à l'écriture de ces articles.

Noceto, P.A., **Hériché, M.**, Fromentin, J., Rossi, V., Saša, Š., Ranca, A. Kehrlí, P., Armengol, P., Trouvelot, S., van Tuinen, D., Courty, P.E., Wipf, D. (2020). Les couverts végétaux dans le vignoble : un atout pour augmenter les services écosystémiques et réduire les intrants de synthèse. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture* 52, 232-235.

Noceto, P.A., **Hériché, M.**, Gontier, L., Wipf, D., Bazerolle, B., Cahurel, J.Y., Courty, P.E. (2020). Les couverts végétaux : une pratique agroécologique au service de la vigne. *Revue des Œnologues*, 178, 24-26.

Noceto, P.A., **Hériché, M.**, Fromentin, J., Rossi, V., Saša, Š., Ranca, A. Kehrlí, P., Armengol, P., Trouvelot, S., van Tuinen, D., Courty, P.E., Wipf, D. (2020). Les couverts végétaux. Un atout majeur pour réduire les intrants de synthèse et augmenter les services écosystémiques au vignoble. *Revue des oenologues*, 175, 14-17

Gontier, L., **Hériché, M.**, Noceto, P.A., Wipf, D., Courty, P.E., Cahurel, J.Y., Bazerolle, B. (2020). Les couverts végétaux : engrais verts en viticulture. *Revue des Œnologues*, 179.

Review

Imaging plant tissues: advances and promising clearing practices

Mathilde Hériché ¹, Christine Arnould,¹ Daniel Wipf ¹ and Pierre-Emmanuel Courty ^{1,*}

The study of the organ structure of plants and understanding their physiological complexity requires 3D imaging with subcellular resolution. Most plant organs are highly opaque to light, and their study under optical sectioning microscopes is therefore difficult. In animals, many protocols have been developed to make organs transparent to light using clearing protocols (CPs). By contrast, clearing plant tissues is challenging because of the presence of fibers and pigments. We describe progress in the development of plant CPs over the past 20 years through a modified taxonomy of CPs based on their physical and optical parameters that affect tissue properties. We also discuss successful approaches that combine CPs with new microscopy methods and their future applications in plant science research.

Highlights

Clearing protocols (CPs) have drastically changed the 3D optical microscopy of bulk samples.

Over the past 20 years, a wide range of CPs (>40) have been developed that are compatible with different labeling and optical microscopy techniques.

Advances mainly concern insects, fish, mammals, and especially human organs, but only a few CPs have been designed and/or adapted for plant cell imaging.

Observing plant tissues in depth

Since Hooke's first observation and description of cork cuts in the middle of the 17th century, plant science research has remained closely related to advances in optical microscopy. More specifically, the use of fluorescence labeling and optical sectioning has drastically improved our understanding of tissue micromorphology [1], cell development [2], protein localization, and plant–microbe interactions [3]. However, these microscopy approaches are limited to a depth of ~50 μm because of the opacity and autofluorescence of plant tissues. Opacity is mainly due to (i) light absorption by pigments and (ii) light scattering by the wide range of **refractive indices (RIs, see Glossary)** of cell components (Figure 1). Moreover, plants contain many light-sensitive pigments and aromatic compounds that animal tissues do not have. These compounds can react to laser excitation during microscopy and generate significant noise that impairs the fluorescent signal of interest. Two approaches are available to overcome limitations related to depth and chemical composition. The usual approach consists of mechanical sectioning. This type of sample preparation is time-consuming, section borders can be damaged (causing loss of cell contents), and 3D reconstruction can be approximate, leading to loss of information [4]. Another approach consists of clearing the sample by chemical treatments. CPs make the sample transparent to light by (i) removing light-active compounds and (ii) homogenizing the RI inside the plant tissue (Box 1). This allows the acquisition of a fluorescent signal through a thick sample. Over the past 20 years, many CPs have been developed for animal tissues (e.g., zebra fish, mouse), mainly in neuroscience for the study of brain tissues, followed by their application to other organs, including bones, up to the whole-body level [5].

We review here all CPs that have been applied and adapted from animal-based observation or specifically developed for plant tissues to gain new insights into plant physiology. We first apply the standard CP classification based on organic solvents and aqueous solutions with passive immersion, protein hyperhydration, and hydrogel embedding. We next briefly discuss the chemical and physical impacts of CPs on tissue properties. Finally, we present successful CPs that have been applied to animal tissues and that have been combined

¹Agroécologie, AgroSup Dijon, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Bourgogne, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation, et l'Environnement (INRAE), Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

*Correspondence:
pierre-emmanuel.courty@inrae.fr
(P.-E. Courty).



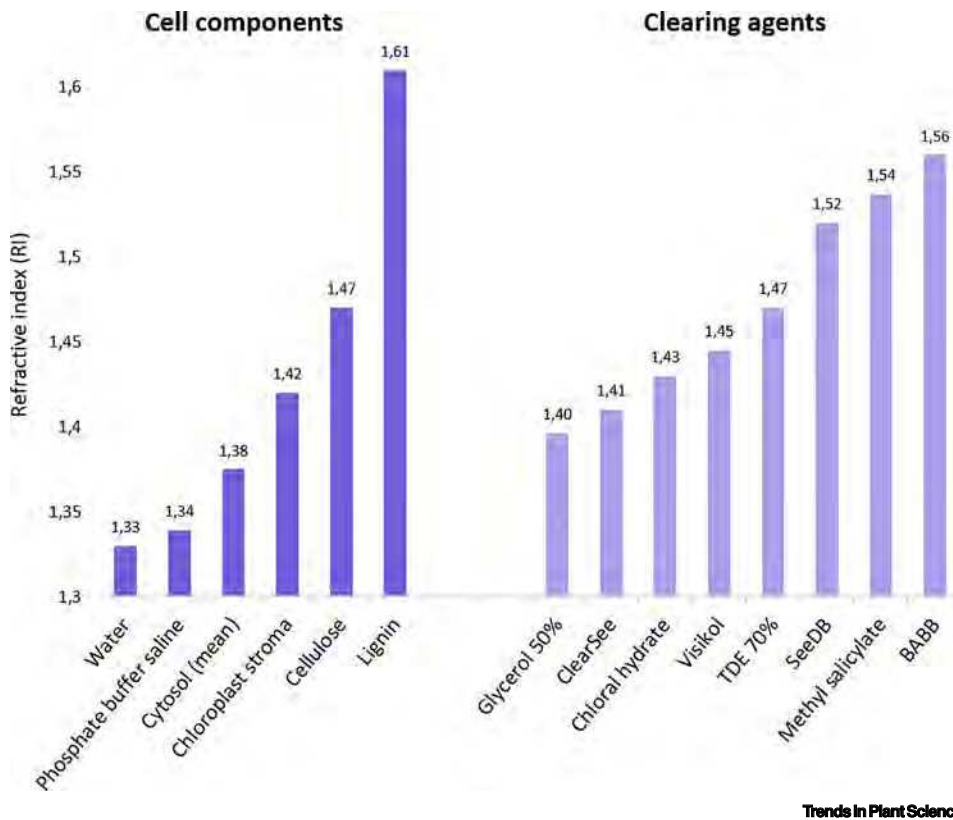


Figure 1. Key values of refractive indices (RIs). Plant cell components (left) cover a wide range of RI (dimensionless) values, and plant tissues therefore lead to light scattering, making imaging using photonic microscopy challenging. To homogenize the RI in plant tissues, diverse clearing agents have been used (right). Abbreviations: BABB, benzyl benzoate/benzyl alcohol; SeeDB, See Deep Brain; TDE, 2,2'-thiodiethanol.

with recently developed microscopy techniques for application to plant organs. We aim to provide guidance to scientists to help them to select the most appropriate CP or to develop their own clearing approach, depending on the plant tissue and the scientific issue under investigation.

A glimpse of the historical record of clearing reagents

Spalteholz in 1911 [6] was one of the first to have used clearing agents on human organs. In plant research, lactic acid [7] and chloral hydrate [8,9], that were initially used as a mounting and preserving medium in Hoyer's solution [10], were two commonly used clearing agents. Their ability to clear tissues relies on their RI of 1.43 that is very close to plant cell wall RI (1.42). Chloral hydrate has been used in many CPs for a wide range of plants, especially *Arabidopsis thaliana*, to clear various organs (e.g., phloem [11], leaves [12], and flower organs and siliques [13]) and has been combined with diverse fixation techniques and staining agents (e.g., acid fuchsin [8], aniline blue [14], β -glucuronidase/GUS [11]). For fluorescence-based microscopy, chloral hydrate has been combined with modified **pseudo-Schiff (PS) reagent**—propidium iodide (mPS-PI) fluorescence to visualize the plant cell wall [12]. Nevertheless, chloral hydrate treatment leads to endogenous fluorescence quenching, that has made it unpopular [15] in addition to its anesthetic effect.

Glossary

Benzyl benzoate/benzyl alcohol (BABB): this mixture is the precursor of all organic solvent-based protocols for animal tissues [5,88].

CLARITY: a protocol designed to render a tissue optically transparent and permeable to macromolecules while keeping its shape through the use of hydrogel embedding [60].

CMF3: a commercial mounting medium with a high RI (1.518) that is used as clearing agent and is suitable for fluorescent immunolabeling [83].

Fluorescent probe (FP): refers to all fluorescent markers (exogenous and endogenous). In this review, 'endogenous FP' specifically refers to encoded fluorescent proteins.

Pseudo-Schiff (PS) reagents: Schiff reagents are histochemical reagents that are used to detect aldehyde groups in a tissue after a reaction with a dye containing an amine group. In PS reactions, imine and amine groups of chemical dyes react with aldehydes of the tissue, inducing a color change. Five classes of chemical dyes were defined according to the chemical reaction [89]; these are generally non-fluorescent, with the exception of propidium iodide (modified PS—propidium iodide, mPS-PI).

Point spread function (PSF): mathematically describes the image of a point through an optical system as the result of light diffraction and interference. The PSF is represented by a 3D interference pattern. The PSF size is defined by its intensity maximum: $\frac{0.61\lambda}{NA}$ in the lateral direction (x,y plane) and $\frac{2\lambda}{(NA)^2}$ in the axial direction (x,z plane), where NA is the numerical aperture of the objective, λ is the wavelength, and n is the RI of the objective lens. According to the Rayleigh criterion, these values determine the distance by which two points must be separated before they can be resolved. Because the PSF is larger in the axial direction than in the lateral direction (where it respects an Airy diffraction pattern), the lateral resolution of an optical system is better than its axial resolution.

Refractive index (RI): a dimensionless value, often written n , that indicates the deviation of light on encountering a material; n is defined as the speed of light in vacuum (c) divided by the speed of light in the transparent material (v), $n = \frac{c}{v}$.

Stimulated Raman scattering (SRS): together with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) SRS is a form

Box 1. The clearing process

Plant tissues present a wide diversity of cell types (e.g., parenchymal and epidermal cells), organelles (e.g., chloroplasts and amyloplasts), and components (e.g., waxes and pigments). Each has its own optical properties and can impede the path of light through the tissue layers. Two major optical phenomena are involved: absorption and scattering.

Light absorption represents loss of photons: their energy is absorbed by molecules. Pigments absorb in the visible spectrum and are more represented in plant kingdom than in any other kingdom. A key process in clearing plant tissue consists of reducing absorption by eliminating pigments (Figure 1).

Light scattering is the deviation of photons from their straight trajectory when they encounter a medium with a different refractive index (RI). This is a very important parameter in optical fluorescence microscopy, and it is described by the law of refraction. Thus, if a photon deviates too much, it cannot be detected and the signal is lost. In plant tissues, RI values range from 1.00 (air cavities) to 1.61 (lignin [17]). Consequently, the thicker the sample, the higher the scattering. Hence, in-depth observation is limited to 50 μm in leaf tissue [15]. The major objective of the CP is to homogenize the RI throughout the entire tissue (Figure 1).

Because the optical properties of a tissue depend on its specific composition, CPs must be optimized not only according to the species (e.g., moss \neq tree) but also according to the tissue (e.g., leaf \neq root) and the microscopy technique (Box 2).

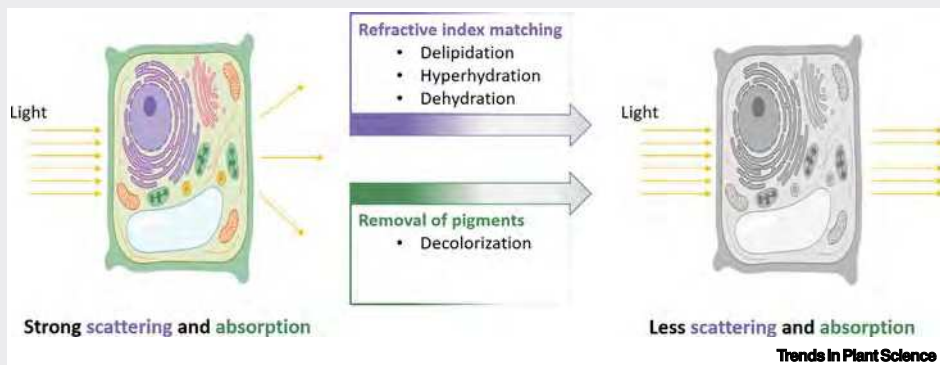


Figure 1. Fundamental principles of optical clearing.

of coherent Raman scattering (CRS) microscopy. A sample is simultaneously excited with two laser beams; when the difference in frequency between the two beams corresponds to the frequency of a chemical bond vibration, there is an amplification of the Raman signal (fourfold) that can be detected [90]. SRS leads to label-free imaging of molecules and can also be combined with Raman tags (e.g., deuterated molecules) [73].

The need to observe plant tissues in depth has led to the independent development of many CPs whose details depend on the sample (e.g., reproductive organs [16]), the structure of interest (e.g., lignin [17]), and the timescale (e.g., one-step clearing [18]). The different CP steps including fixation, alkali dissolution, post-alkali treatment, depigmentation, crystal removal, high-RI solutions, and staining were summarized by Gardner [19]. Until then, microscopes used for such observations had not reached subcellular-level resolution. Advances in optical sectioning microscopy (confocal, two-photon, light-sheet microscopy) and increasing contrast and resolution paved the way for many CPs that allowed **fluorescent probe (FP)** imaging.

CPs for plant tissues

Recent animal CPs are usually classified into two main categories based on physicochemical properties of clearing agents: (i) organic solvents and (ii) aqueous solutions [20]. Plant CPs for FP imaging are discussed in the following text.

Solvent-based clearing

The pioneering CP [6] followed a procedure that was standardized and described in animals: dehydration, lipid solvation, and incubation in a high-RI solution [21]. A few recent methods have been described in animal research, especially for brain tissue [22], but the CP literature for plant research is poorly documented.

Littlejohn *et al.* used perfluorocarbons as a mounting medium to observe *A. thaliana* leaves by confocal microscopy. Although the authors did not use the term 'clearing' in the development of this protocol over the years [23,24], their approach relied on the homogenization of the sample RI (Box 1). The RI of perfluoroperhydrophenanthrene (PP11, 1.334) is very close to the RI of the cytoplasm (1.35–1.39), but far from the RI of air (1.00). Littlejohn *et al.* were studying the spongy mesophyll of *A. thaliana* leaves, meaning that they needed an agent that could replace air in leaf cavities and that had an RI close to that of the cytoplasm so as to ensure the passage of light through leaf tissue. Using this reagent, they successfully cleared non-fixed leaves in 10 min and succeeded in observing a GFP signal at a depth of 75 μm [24]. This low-RI solution, however, has not been applied to any other plant organ [25].

The story of VisikoTM started in 2013 when Villani and colleagues [26] published the efficiency of this new clearing agent formulation (RI = 1.445) that was designed to replace chloral hydrate and successfully tested this on small plant samples (fresh or dried). The clearing step consisted of heating (60–80°C) sample in VisikoTM on a slide for less than 1 min. VisikoTM was compared to chloral hydrate and potassium hydroxide using different mounting media under confocal and Airyscan microscopes [27]. They treated leaves for 3–24 h with VisikoTM at 40°C to observe PI-stained cuticle. VisikoTM won the game because of its nontoxicity and affordability. Later on, *A. thaliana* root tips were cleared using VisikoTM and successfully stained by GUS histochemical labeling (cyclin B1;1-GUS [28]).

The **benzyl benzoate/benzyl alcohol (BABB)** mixture (1:2 v/v; RI = 1.559) – a widely used clearing agent in animal CPs – has been little used in plant CPs. BABB was initially used to image *A. thaliana* under optical projection tomography (OPT) [29] before the authors improved their instrument to perform a macro-OPT (M-OPT) to image *A. thaliana* veins by GUS staining in 3D in an entire plant [30]. Plants were fixed in acetone for 20 min, GUS-stained, dehydrated (methanol, 1 week), cleared, and mounted in BABB. Cabrera and colleagues studied galls caused by nematodes on *A. thaliana* roots [31]. They performed glutaraldehyde fixation (overnight), ethanol dehydration (overnight), clearing, and mounting in BABB to visualize a complete gall structure with a nematode in 3D by recording the autofluorescence signal on a laser scanning confocal microscope. In fact, both protocols induced severe fluorescence quenching and BABB potentially induced rapid peroxide contamination that damaged the FP [22]. In the latest version of the protocol – FluoClearBABB – the dehydration step is modified (*tert*-butanol, 7 days) and a basic pH (9.5) is maintained [32]. This CP allowed the authors to record enhanced green fluorescent protein (eGFP) signals in an entire mice brain under a homebuilt light-sheet fluorescent microscope. Unfortunately, this CP is not yet referenced in the plant tissue literature.

Methyl salicylate, another widely used clearing agent (RI = 1.53) [6,33], has recently been combined with FP imaging. On *Zea mays* ovules, Kalinowska and colleagues performed fixation with formalin/acetic acid/alcohol (FAA, various concentrations and time depending on the organ) and used Feulgen staining (hours). They then performed gradual ethanol dehydration (hours) before clearing in methyl salicylate (hours) [34]. They observed on a confocal microscope a good level of transparency on these very dense organs at different stages of development, but no acquisition in *z* was reported. González-Gutiérrez and colleagues fixed Crassinucellate ovules [formaldehyde (FA)], permeabilized membranes and cuticles (acetone), stained tissues by rhodamine–phalloidin (F-actin marker) and Hoechst (nuclei marker), dehydrated (isopropanol), and cleared (methyl salicylate) the tissues. In their study, authors specify that this CP can be performed in 48 h [35]. Using a confocal microscope, they successfully imaged the actin network of the entire ovule but, once again, no acquisition in *z* was reported. This year, He and colleagues [36] developed a new CP for crop roots based on methyl salicylate. They used a fixation step (15.5 h) with paraformaldehyde

(PFA) and dimethylsulfoxide (DMSO), RNase treatment (12 h), PI staining (overnight), and a dehydration step in ethanol (4 h), followed by clearing by methyl salicylate immersion (overnight). Using a confocal microscope, they successfully imaged the PI fluorescent signal on the entire thickness of rice root tips, but the endogenous GFP signal was lost.

Because of the dehydration step, solvent-based CPs induce shrinkage of soft tissues [5]. In the literature cited in the preceding text, this phenomenon was not reported except for thin root tips of *A. thaliana* [36]. This can be explained by the presence of cell walls in plant tissue, but more studies to confirm the absence of shrinkage during clearing of whole organs will be needed.

Aqueous-based clearing

Hydrophilic CPs involve three techniques: passive immersion, protein hyperhydration, and hydrogel embedding. A wide range of aqueous-based protocols developed on animal tissue have been adapted to plants. Aqueous CPs are compatible with FPs but are relatively time-consuming compared to solvent-based CPs [5].

In simple immersion, the lipid content of the sample is preserved. This CP consists of matching the RI of the lipid tissue (that is >1.45 in animals) by using aqueous solutions with a high RI [21].

See Deep Brain (SeeDB) is a mixture of fructose (80.2% w/w) and 0.5% α -thioglycerol and is an efficient clearing agent for brain tissue [37]. It was tested on various plant leaves, including tree leaves [38]. Leaf discs 1 cm in diameter were drop fixed in FAA, cleared in SeeDB by immersion (1–3 days), and stained with PI and Calcofluor white. SeeDB was not as efficient as other tested chemical reagents such as 1% sodium hypochlorite (NaClO) for leaves. This publication is open to criticism because (i) the chemical reaction of NaClO with the tissue is not detailed, and (ii) even if NaClO is not recorded as a clearing agent in animals, it has already been applied to plant leaves [39].

2,2'-Thiodiethanol (TDE) was first used as a mounting medium [40]. Its high RI is proportional to its concentration (1.374 at 20%; 1.515 at 97%), and this makes it an effective and user-friendly clearing agent that is suitable for various microscopy systems and samples [41,42]. In plant tissues, TDE was used in a CP termed transparent plant organ method for imaging (TOMEI) to clear *A. thaliana* and *Oryza sativa* organs [43]. Without sectioning and with a fixation step based on acetic acid:ethanol (1:3, 1–2 h, TOMEI-I) or PFA (4%, 1 h, TOMEI-II), they analyzed cell structures at a depth of 200 μm in a few hours. In *A. thaliana*, fixation with 4% PFA turned out to be a necessary step before using TDE to avoid tissue disruption and FP quenching [44]. Irrespective of the fixation step, a high concentration of TDE (95–100%) can weaken the fluorescence signal of some endogenous FPs (e.g., Venus-YFP and eGFP are more sensitive to quenching than mCherry and Citrine-YFP) and lead to loss of tissue integrity. These authors also determined that a 50–70% TDE solution was necessary and sufficient to clear challenging plant tissues while preserving their structure and the fluorescent signal. Nevertheless, later comparative studies revealed that TOMEI does not remove all pigments and can decrease FP intensity [45]. To overcome these limitations, an update of this CP, called improved TOMEI (iTOMEI), was published in 2022 [45]. Following large screening of chemical treatments for each CP step based on (i) preservation of the GFP signal, (ii) enhancement of the GFP signal, and (iii) clearing efficiency, they proposed a fixation step with 1% FA in PBS buffer, a decolorization step with 20% caprylyl sulfobetaine (a detergent) in sodium phosphate buffer at pH 8.0, and a clearing step with 70.4% iohexol instead of TDE. They successfully imaged entire *A. thaliana* seedlings and organs of *O. sativa* and *Marchantia polymorpha* at depths of 80 μm and 200 μm , respectively, by confocal or two-photon microscopy. The RIs of the solutions were not provided, but iohexol solution

seems to be prepared in the same buffer and at the same concentration as in SeeDB2 CP (an upgrade of SeeDB CP) [46]. In iTOMEI, detergent is used to improve chlorophyll elution, and iTOMEI is therefore not merely a 'simple immersion' CP as TOMEI is. Nonetheless, because SeeDB2 requires saponin as a detergent and remains in the 'simple immersion' category in animal CP classification [5], we chose to retain iTOMEI in this category (Figure 2). Concerning caprylyl sulfobetaine, it is referenced as a zwitterionic detergent that solvates oleosins. Hence, the question can be asked whether iTOMEI impacts the protein and lipid content of a cleared sample.

Another approach consists of reducing and then homogenizing the RI of a sample in two steps: (i) removal of lipid content (delipidation) and (ii) hyperhydration of proteins. To maintain an aqueous-based environment to support FP activity, delipidation is performed using a detergent. This step takes longer than delipidation using an organic solvent (weeks to months vs. hours) [21]. Following delipidation using Triton X and hyperhydration with urea, the Scale technique decreased the RI of mouse brain tissue to 1.38 [47]. For plants, delipidation using Triton X in glycerol was combined with urea for use on leaves (*Zea mays*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana benthamiana*, *Pisum sativum*) and nodules of leguminous plants (*P. sativum*) [48]. Fixation was achieved using PFA or glutaraldehyde. The staining step was adapted according to the plant tissue (Table 1). Warner and colleagues [48] succeeded in imaging a fluorescent signal at a depth of more than 350 μm in intact nodules and immunolabeled sections of cleared nodules (by adding an enzymatic digestion step to the CP). This CP has recently been used to clear *Lotus japonicus* roots and nodules to visualize auxin and cytokine dynamics and cell division patterns at cellular resolution during nodulation through the use of markers optimized for fluorescent and bright-field microscopy [49]. Following Warner's pattern of combining polyhydric alcohol, detergent, and urea. Kurihara *et al.* [15] carried out a large chemical screening based on (i) the clearing efficiency of different compounds in the literature (especially those that efficiently remove chlorophyll autofluorescence), (ii) the compatibility of each compound with recombinant Venus fluorescence, and (iii) the clearing efficiency of mixtures containing selected compounds and detergents. They

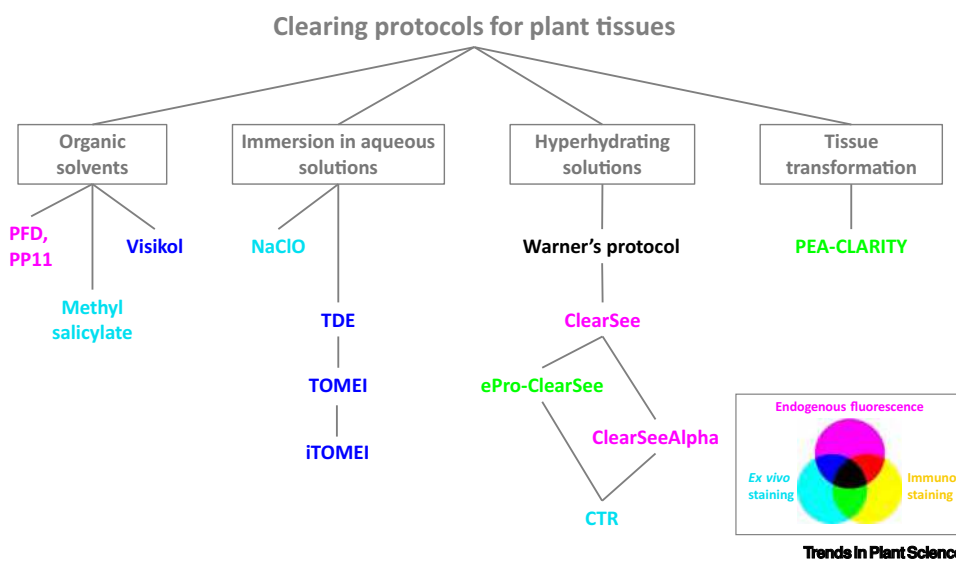


Figure 2. Taxonomy of clearing protocols (CPs) for plant tissues. Adapted from the most recent update of CP taxonomy in the animal research literature [5], organized according to the fluorescent staining method used. Each CP is described in the main text. Abbreviations: BABB, benzyl benzoate/benzyl alcohol; CTR: clearing tannic roots; ePro-ClearSee, enzymes 2-propanol ClearSee; iTOMEI: improved TOMEI; PEA CLARITY, plant-enzyme-assisted CLARITY; PFD, perfluorodecalin; PP11, perfluoroperhydrophenanthrene; SeeDB, See Deep Brain; TDE: 2,2'-thiodiethanol; TOMEI, transparent plant organ method for imaging.

Table 1. Comparison of optical clearing methods for plant tissues^{a,b}

Protocol name: clearing agent	Plant species	Organ	RI of clearing solution	Protocol duration	Chemical treatment	Enzyme treatment
Organic solvents						
Chloral hydrate, chloroform	<i>A. thaliana</i>	Leaves, seedlings	1.47–1.48	Days	Fix. ethanol acetic acid Perm. NaOH/SDS	Amylase
PFD, PP11	<i>A. thaliana</i>	Leaves	1.31	Minutes	No	No
Visikol : confidential	Various	Leaves, roots	1.44	Minutes/hours	No	No
BABB : benzyl alcohol/benzyl benzoate (or Murray's clear)	<i>A. thaliana</i> , various, with or without insect	Seedlings, leaves, flowers, fruits	1.56	Days/weeks (months for insects)	Fix. acetone Deh. methanol	No
	<i>A. thaliana</i> , <i>Medicago truncatula</i>	Galls, syncytia, nodules, cysts, egg masses		Hours/days	Fix. 3% glutaraldehyde Deh. ethanol	
FluclearBABB : BABB	Mouse	Brain	1.56	Hours/days	Fix. 4% PFA Deh. propanol or <i>tert</i> -butanol, basic pH	No
Methyl salicylate	<i>Zea mays</i>	Ovaries, developing seeds	1.538	Days	Fix. FAA (various concentrations) Deh. ethanol	No
	Crassinucellate	Flower buds, mature flowers, immature fruits		1 Day	Fix. FA Perm. acetone Deh. isopropanol	No
	Various crop species	Root		Days	Fix. 4% PFA, 5% DMSO Deh. ethanol	RNase
Simple immersion in aqueous solutions						
SeeDB : fructose, α -thioglycerol NaOH NaClO	<i>Acer truncatum</i> , <i>Platanus occidentalis</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>A. thaliana</i>	Leaves	1.52	Days	Fix. FAA (38% FA) Deh. ethanol	No
			Unknown			
			Unknown			
TDE	<i>A. thaliana</i>	Various	1.42–1.52	Hours	Fix. 4% PFA	No
TOMEI : TDE	<i>A. thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i>	Various	1.515	Hours	Fix. (TOMEI-I) acetic acid: ethanol (TOMEI-II) 4% PFA	No
iTOMEI : iohexol, caprylyl sulfobetaine	<i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> , <i>Marchantia polymorpha</i>	Seedlings, leaves, shoot apical meristem, gemma, gemma cup	1.518	1 Day	Fix. 1% FA	No
Protein hyperhydration						
ScaleP and Warner's protocol : urea, Triton X-100	Various	Various	Unknown	Days/weeks	Fix. 4% PFA, glutaraldehyde	Cellulase, pectolyase (for immunolabeling only)
ClearSee : urea, sodium deoxycholate, xylitol	<i>A. thaliana</i> , <i>Physcomitrella patens</i>	Seedlings, leaves, pistils, gametophores	1.41	Days/weeks	Fix. 4% PFA	No
ePro-ClearSee : idem ClearSee	Various	Leaves, roots			Fix. 3% PFA; Delipidation 0.3% Triton X-100	Cellulase, pectolyase
ClearSeeAlpha : idem ClearSee + sodium sulfite	Various	Leaves			Unknown	Fix. 4% PFA
CTR : idem ClearSeeApha	<i>Vitis vinifera</i>	Roots		Weeks	Fix. 4% PFA, 5% DMSO	Cellulase, pectolyase
Tissue transformation						
Pea-CLARITY : SDS, boric acid, NaOH	<i>A. thaliana</i> , <i>Nicotiana tabacum</i>	Leaves	Unknown	Weeks/months	Fix. 4% PFA; hydrogel embedding	Cellulase, xylanase, arabinofuranosidase, pectatolyase, α -amylase

Table 1 (continued).

Protocol name: clearing agent	Staining	Immunostaining	Microscope	Software	Refs	Refs for animals	Advantages and disadvantages
Organic solvents							
Chloral hydrate, chloroform	mPS-PI	No	CLSM, multiphoton	ImageJ, MedINRIA ImageViewer	[12]	[91]	Microscope comparison reported; reagent toxicity, the staining step could eliminate protein and nucleic acid
PFD, PP11	SEYFP	No	CLSM + Airyscan, two-photon, second harmonic generation, SRS	Zeiss 510	[24]	Not known	Fast protocol, suitable for many types of microscopy; has not been reused in literature
Visikol: confidential	GUS staining, periodic acid, Schiff's reagent, PI, cyclin B1;1-GUS, FM4-64, GFP, brefeldin A	No	Fluorescent microscope, CLSM, CLSM + Airyscan	SP7, Zeiss ZEN, ImageJ	[26–28]	[92]	Easy to use; not referenced for volumetric imaging
BABB: benzyl alcohol/benzyl benzoate (or Murray's clear)	GUS staining, autofluorescence	No	M-OPT	Matlab, NRecon, VolViewer, Drishti	[30]	[6,93]	Very large samples (in the order of centimeters); no FP imaging reported
	No (glutaraldehyde autofluorescence)		CLSM	LCS	[31]		Efficiently clears dense tissues; no FP imaging reported
FluoclearBABB: BABB	eGFP	No	LSFM, CLSM	Fiji	Unknown	[32]	FP imaging with BABB; not yet applied to plant tissues
Methyl salicylate	Feulgen staining (acriflavine)	No	CLSM	Unknown	[34]	[6,33]	Fast protocol; unsuitable for use with endogenous FPs
	Rhodamine-phalloidin, Hoechst	No	CLSM	LAS-X	[35]		
	PI, GFP	No	Stereomicroscope, CLSM	LAS-X	[36]		
Simple immersion in aqueous solutions							
SeeDB: fructose, α -thioglycerol	PI, Calcofluor white	No	CLSM	Bitplanes, Imaris	[38]	[37]	No clearing effect reported
NaOH						[94]	Tiny effect; no transparency
NaClO						Not known	Efficient for depigmentation; no information concerning tissue content impact

Notes to Table 1:

^aAbbreviations: BABB, benzyl benzoate/benzyl alcohol; CLSM, confocal laser scanning microscope; CTR, clearing tannic roots; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Deh., dehydration; DMSO, dimethylsulfoxide; FA, formaldehyde; FAA, formalin/acetic acid/alcohol; Fix., fixation; FM 4-64, *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide; LAS, Leica Application Suite; LCS, Leica Confocal Software; LSFM, light-sheet fluorescence microscopy; M-OPT, macro optical projection tomography; mPS-PI, modified pseudo-Schiff-PI; NIS, Nikon Imaging System; Perm., permeabilization; PFA, paraformaldehyde; PFD, perfluorodecalin; PI, propidium iodide; TDE, 2,2'-thiodiethanol; TOMEI, transparent plant organ method for imaging; ZEN, Zeiss Efficient Navigation.

^bBolded terms indicate the protocol name.

A one-page version of the table can be found in the online supplemental information.

Table 1 (continued).

TDE	GFP–tdTomato	No	CLSM, two-photon	Fiji	[44]	[40,42]	RI linearly proportional to TDE; inefficient removal of pigments
TOMEI: TDE	DAPI, SYBR green I, GFP	No	CLSM + spinning disk, two-photon	ImageJ, FluoRender, FluoView, MorphoGraphX, MetaMorph	[43]		
iTOMEI: iohexol, caprylyl sulfobetaine	Various endogenous FPs, SR2200, Calcofluor white M2R, Evans blue	No	Fluorescence stereomicroscope, CLSM, two-photon	ImageJ, LAS-X, Imaris	[45]	[46]	
Protein hyperhydration							
ScaleP and Warner's protocol: urea, Triton X-100	Alexa Fluor 594, Calcofluor white, SYTO 13, Citrine–GFP	Yes: anti- β -1, 3-glucan (nodules)	Multiphoton, CLSM	Amira 3D, Huygen's	[48]	[47]	Based on a systematic chemical compound screening, suitable for a wide range of plant species and organs; extended clearance time
ClearSee: urea, sodium deoxycholate, xylitol	Various endogenous fluorescent proteins	No	CLSM, two-photon	NIS-Elements AR software 4.10 (Nikon), ZEN 2010 software	[15]		
ePro-ClearSee: idem ClearSee	DAPI	Yes: various antibodies	CLSM + Airyscan	ZEN 2' software	[55]		
ClearSeeAlpha: idem ClearSee + sodium sulfite	mClover	No	Multiphoton, CLSM	NIS-Elements	[56]		
CTR: idem ClearSeeAlpha	PI	No	CLSM	LAS-X	[58]		
Tissue transformation							
Pea-CLARITY: SDS, boric acid, NaOH	PI, Calcofluor white	Yes: anti-Rubisco	CLSM	Leica (LAS-AF) software	[60,61]	[59]	Tissue permeabilization and stability; extended clearance time

concluded that ClearSee (xylitol/sodium deoxycholate/urea) has good clearing efficacy and is suitable for a large range of endogenous FPs (e.g., mTFP1, sGFP, mClover, Venus, mCitrine, tdTomato, mApple), numerous organs (leaves, roots, seedlings, pistils, stems, and protonemata), and plant species (*A. thaliana*, *Physcomitrella patens*). ClearSee has since then been applied to a wide range of plant species and organs [50–54]. Nagaki and colleagues [55] optimized the initial ClearSee method for immunohistochemistry (namely, ePro-ClearSee). They added an enzymatic digestion step with cellulase and pectolyase and a 2-propanol treatment step (permeabilization) before clearing (timescale: 10 days to 3 weeks). Using a confocal microscope with or without an Airyscan detector, they acquired a fluorescent signal from modified immunolabeled histones in leaves and roots of various plant species. In the latest update of this protocol, named ClearSeeAlpha, a reductant (sodium sulfite 50 mM) is added to avoid brown pigmentation caused by polyphenol oxidation [56]. These authors successfully cleared brown pigmentation-susceptible leaves and floral organs of various plant species. Moreover, using a multiphoton confocal microscope, they demonstrated the suitability of this protocol for use with endogenous FPs. By combining a depigmentation step previously developed for *Xenopus* [57] with an enzymatic digestion based on ePro-ClearSee and a clearing step using ClearSeeAlpha, the clearing tannic roots (CTR) protocol enabled acquisition of a PI signal from the entire thickness of *Vitis vinifera* roots (250 μ m in the z dimension) under a confocal microscope [58]. Authors noted that the time required depends on the age of the root: the older the tissue, the longer each step takes.

To avoid potential removal of key structural proteins by solvents and concentrated detergents, Chung and colleagues [59] introduced another aqueous CP in which the sample is fixed and embedded in a polyacrylamide hydrogel. Combined with a low-concentration sodium dodecyl sulfate solution (8% SDS) and electrophoresis, the **CLARITY** method removed lipids and other light-active compounds. In plant tissues, Palmer and colleagues [60] added an enzymatic degradation step to the passive CLARITY protocol to clear *Nicotiana tabacum* leaves. They called their method plant enzyme-assisted CLARITY (PEA-CLARITY). The enzyme cocktail (cellulase, xylanase, arabinofuranosidase, pectate lyase, and α -amylase) is directed against cell wall components to enhance its permeability to fluorescent dyes, especially antibodies, for better immunolabeling efficiency. The hydrogel embedding medium prevents tissue collapse by providing a supportive network. Finally, RI homogenization is carried out by immersion in a high-RI solution such as TDE [61] and can record the fluorescent immunolabeled signal of an entire tobacco leaf (200 μm depth) (Table 1).

Aqueous CPs are well known to induce swelling of soft samples. Although the expansion phenomenon is used in cleared animal organs to improve resolution [62], its use in plant organs has not been reported, probably because of the plant cell wall. Aqueous CPs were principally developed to modify and elute cell components (e.g., complex sugars, proteins, and lipids), and thus, depending on the treatment strength, a tissue can lose its integrity and become weaker [61].

Optical clearing methods for optical sectioning techniques

Until the middle of the 20th century, in-depth observation of tissues was limited by the efficiency of fluorescence microscopes. When observing a thick sample on a standard fluorescence microscope, only the surface could be imaged. At a depth within the sample, the in-focus signal was blurred by the out-of-focus fluorescent signal from the rest of the sample. The challenge for optical sectioning was to remove this out-of-focus background. The development of computer-aided optical sectioning microscopy paved the way for 3D microscopy and promoted the development of clearing agent applications [22].

Optical sectioning consists of selecting a specific (x,y) plane and acquiring this plane at multiple depths. The acquired images are termed z-stacks; the lower the interval between z-stacks, the higher the z resolution. Optical sectioning developed together with confocal microscopy. This technique is based on wide-field illumination; because of the pinhole, only photons emitted from the focal plane are collected, leading to removal of the out-of-focus background. Photon dispersion, however, increases with depth of acquisition [63]. This is one of the reasons why confocal microscopy of thick samples is highly dependent on the CP. Another way to remove the out-of-focus background is to avoid generating it through the use of specific illumination. Two-photon and light-sheet illumination were designed to answer this question. Compared to confocal microscopy, such imaging is faster and less phototoxic [64,65]. Combined with different clearing agents, light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) has many applications and has hence been given different names across publications (Box 2). Silvestri and colleagues [20] present a complete overview of CPs adapted for each of the three types of microscopy techniques (confocal, two-photon, and LSFM) according to their physical principles.

Spherical aberration is another factor that impacts on depth imaging [66]. This type of aberration is determined by the **point spread function (PSF)** that describes the image of a single point through an optical system, termed convolution. This function determines the resolution of an optical system (each type of microscopy has its own shape type of PSF), and the PSF depends on the RI of the entire imaging system. Although CPs aim to homogenize the RI between the tissue and the embedding medium, a mismatch between the RI of the objective medium lens and the clearing solution generates aberrations that lead to an extended PSF and decreased spatial

Box 2. Focus on light-sheet fluorescence microscopy (LSFM)

The development of LSFM was a breakthrough innovation in optical sectioning [95]. In LSFM, the specimen is illuminated by a sheet of light perpendicular to the detection system, and the center of the light sheet matches the focal plane. The main advantage is that fluorophores outside this plane are not illuminated, and noise and phototoxicity are correspondingly lower. Nevertheless, the system is highly sensitive to scattering and absorption because photons emitted in the focal plane must travel through the rest of the tissue before reaching the objective. Moreover, a specific mounting system is required regarding the angle of illumination and mostly involves fixing a piece or an entire specimen onto a support.

The combination of planar illumination with fluorescence imaging was first developed under the name orthogonal plane fluorescence optical sectioning (OPFOS) [96]. Faced with the opacity of bones, the first guinea pig cochlea observed under a light-sheet microscope was cleared using Spalteholz clearing agent. This first LSFM was developed with a CP, thus presaging the concerted development of microscopy and sample preparation techniques. A device combining perpendicular illumination and point scanning confocal microscopy was developed and gave better axial resolution than ordinary confocal microscopy [97]. In 2004 Huisken and colleagues [98] optimized their instrument by using wide-field detection instead of confocal detection: selective plane illumination microscopy (SPIM) was born, and modern LSFM is in its wake. The increasing popularity of LSFM and further developments of the technique by scientists and instrument manufacturers led to LSFM being recognized as 'method of the year' by the journal *Nature* in 2014.

LSFM implementations have concerned illumination and detection optics (e.g., two-side illumination, two detection paths, upright or inverted, four paths used at detection and illumination, multidirectional illumination). Moreover, standard Gaussian beam light-sheet microscopy has been modified to enhance LSFM performance (e.g., digitally scanned laser light-sheet, light coherence controlled; coupled with two-photon or multiphoton illumination; replaced by self-reconstructing beams, lattice light sheet, IR light sheet) [99]. These enhancements lead to homogenization of illumination; correction of the shadow effect and stripe artifacts; and increased imaging speed, resolution, and depth of penetration. In 2020, Masters [100] published an insightful book about super-resolution microscopy in which advances in LSFM are well described and discussed. Moreover, there are several post-processing treatments that can improve image quality [99]. Of all the LSFM setups that are currently available, it is very important to select the one that suits the biological cleared sample and the experiment of interest [101].

Concerning plant research, a review by Ovečka and colleagues [102] presents and discusses the imaging of plant development by LSFM. Most publications on plant tissue imaging by LSFM concern *in vivo* acquisition. Although some publications are now dedicated to LSFM on cleared samples [103], none has yet addressed cleared plant tissues.

resolution [66]. To deal with this problem, microscope manufacturers could propose either objectives with a correction RI collar or specific objectives that match the RI of the clearing solution [67]. Moreover, two numerical criteria can be calculated that predict the loss of image quality and the best objective to use according to the clearing agent [68]. A post-computational treatment, termed deconvolution, can also be applied to reduce aberrations. This operation reassigns the aberrated light to its original source by reference to the theoretical PSF of the optical system (e.g., Huygens software). Although LSFM is the most widely used microscopy technique, cleared tissue can be imaged using a wide range of microscopes.

OPT is an adaptation of X-ray imaging tomography to optical systems [69]. In this system, the entire sample is placed in a cylinder and rotated during acquisition. Light transmission images – termed projections or tomographic sections – are collected in different directions. 3D reconstruction based on each projection is then performed using an algorithm [70]. The technique is compatible with fluorescence, and the system is known as emission OPT [71]. OPT systems are highly sensitive to tissue scattering, and their optimization is therefore closely related to the development of appropriate clearing agents. Lee and colleagues [29] first observed various BABB-cleared *A. thaliana* organs under an OPT system but could not go beyond 15 mm depth. They subsequently reported an M-OPT system in 2016 [30] that allowed 3D imaging of very large specimens (up to 60 mm tall and 45 mm deep) and that could be used with any clearing agent (resolution range = 6.5–62.5 $\mu\text{m}/\text{voxel}$). The use of M-OPT to image FP signals in cleared plant tissues has not been reported. However, because OPT is suitable for use with fluorescent imaging, new user-friendly hardware and software are available [72], M-OPT holds great promise for deep-

volume imaging in cleared plant tissue. Other devices have been used with clearing agents, but have still not yet been applied to plant tissues.

Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy (micro-SRS) is a recent technique based on the combination of optical microscopy and Raman spectroscopy. This instrument can map chemical bonds in 3D at subcellular resolution, but laser emission is sensitive to scattering, and depth imaging is limited to 100 μm [73]. To solve this problem, CPs suitable for Raman spectroscopy were designed to achieve lipid and protein mapping of brain tissue at a depth of 1 mm [73] and to image collagen and hydroxyapatite during the skull clearing process [74]. Micro-SRS was first used on *A. thaliana* leaves [75], and then to study the chemical composition of cuticular waxes and cell walls, as well as to investigate agrochemicals in maize and cotton leaves [76]. The authors, however, did not mention any acquisition deep into the tissue, and micro-SRS has not yet been applied to cleared plant samples.

Hyperspectral dark-field microscopy images nanoparticles based on their refractive spectral signatures. In this way, it is possible to label many biological structures of interest (e.g., mRNAs, membrane proteins) with plasmonic nanoparticles (metals). Although contrast in dark-field microscopy is generated by tissue scattering, the plasmonic signal is impaired by this background [77]. By clearing human cells (*in vitro* lines), the signal-to-noise ratio of gold nanoparticles is five- to sixfold greater, such that monomeric and oligomeric forms of transmembrane receptors can be distinguished and mRNA can be detected at single-copy resolution [77]. At tissue-scale, clearing human skin samples allowed 2D and 3D mapping of plasmonic nanoparticle signals and improved the signal-to-noise ratio [78]. Many studies have traced metal particles in animal tissues using this microscopy technique, but clearing processes are not routinely applied [79]. Concerning plant tissues, *A. thaliana* roots and various legume leaves have been analyzed under a hyperspectral dark-field microscope to image gold and iron particles, respectively, following exposure during germination [80,81]. Once again, no CP has been reported for these tissues.

Stimulated emission depletion (STED) is a super-resolution microscopy technique based on the destruction of the fluorescence emission signal around the initial point of laser excitation. Many parameters can be modulated on a STED microscope, including implantation with other optical techniques, to overcome the specific constraints imposed by different types of samples and thus image them in 3D [82]. Like all optical fluorescence microscopes, however, STED is highly sensitive to light scattering and spherical aberrations, but can be easily combined with a CP when using fixed tissue. By adapting the SeeDB-based protocol to super-resolution microscopy (SeeDB2), FP signals could be acquired through a commercial STED microscope (chemical fluorophores and fluorescent proteins) in mouse brain down to a depth of 100 μm , with 50-nm lateral resolution [46]. Angibaud and colleagues [83] cleared mouse brain using **CFM3** (RI = 1.518) and imaged it by STED immunofluorescence at a depth of 40 μm . As Komis and colleagues mentioned [84] in their review, imaging of plant tissues by STED techniques is very challenging. One of their outstanding questions – how to overcome the light-scattering properties of bulk plant samples whose RIs vary widely in the axial direction – could probably be answered by an adapted CP [85].

Concluding remarks

CPs have already provided new insights into plant tissues and chlorophyllous organs. However, no single plant CP can suit all imaging projects because of the diversity of plant tissues and organs. Further CP optimization for organs that contain specific light-active compounds (e.g., phenols) is needed [60]. Therefore, future CPs will require systematic chemical screening because all organs vary in their lipid, protein, and sugar compositions. Moreover, comparative studies of various CPs applied to the same organ will be necessary to identify the most

Outstanding questions

What are the greatest challenges in applying CPs to plant cell biology? Systemic studies comparing the chemical effects of the CP according to the chemical composition of the sample will be necessary to establish a basic protocol per tissue according to the species and the scientific issue being addressed. Moreover, some CPs led to loss of content (lipids, pigments) and then weakened the tissue. Even if CPs are less likely to distort (swelling or shrinkage) plant versus animal tissues, the size variation is too often neglected and detailed characterization would be of added value in future studies.

How to design the most relevant clearing approach for the scientific issue under investigation? We recommend that CP selection should take into account the experimental (i) needs (e.g., volume of the specimen, image resolution, and acquisition time), (ii) conditions (e.g., the presence of optical active compounds, use of FPs), and (iii) constraints (e.g., safety devices for chemical products, fluorescent microscope availability, budget), as well as (iv) the literature (e.g., existing CPs for different organs and species).

Why develop adapted CPs for plant research? They will allow scientists to overcome the limitations caused by light scattering and open the field of super-resolution microscopy of bulky plant samples. Moreover, super-resolution imaging of specific dyes (e.g., immunolabeling) should allow organelle integrity to be evaluated following a clearing process.

Why would a wide range of available CPs be of added value to plant research? A plant is associated with other organisms (e.g., other plants, insects, fungi) that together constitute a supraorganism or holobiont. These organisms can colonize or even invade plant tissues. To dissect holobiont functioning, an anatomical description and physiological understanding of these interactions could be provided by the use of an adequate CP in conjunction with 3D imaging.

suitable CP, with an emphasis on CPs that are compatible with specific fluorescent dyes (e.g., immunofluorescence [86]). Compared to publications on animal tissues [87], the field of CPs on plant tissue is still in its early stages, but represents a promising approach for unraveling the anatomical and physiological complexities of plant–microbe interactions (see [Outstanding questions](#)). CPs need to be seen in the context of studying plant physiology at different scales, from the entire plant down to the organ level and from the cell to the protein network.

Acknowledgments

The authors thank the Burgundy Franche Comté Regional Council for support. M.H. is the recipient of a doctoral contract accredited by the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation. The authors also thank Antoine Sportes for discussions.

Declaration of interests

The authors declare no conflicts of interest.

Supplemental Information

Supplemental information associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.12.006>.

References

- Wei, J. *et al.* (2020) Low-cost and efficient confocal imaging method for *Arabidopsis* flower. *Dev. Biol.* 466, 73–76
- Prunet, N. (2017) Live confocal imaging of developing *Arabidopsis* flowers. *J. Vis. Exp.* 122, 55156
- Harrison, M.J. *et al.* (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14, 2413–2429
- Atkinson, J.A. and Wells, D.M. (2017) An updated protocol for high throughput plant tissue sectioning. *Front. Plant Sci.* 8, 1721
- Matryba, P. *et al.* (2019) Advances in ex situ tissue optical clearing. *Laser Photonics Rev.* 13, 1800292
- Spalteholz, W. (1911) *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen*, S. Hirtzel
- Simpson, J.L.S. (1929) A short method of clearing plant tissues for anatomical studies. *Stain. Technol.* 4, 131–132
- McBryde, M.C. (1936) A method of demonstrating rust hyphae and haustoria in unsectioned leaf tissue. *Am. J. Bot.* 23, 686–688
- Lersten, N.R. (1967) An annotated bibliography of botanical clearing methods. *Iowa State J. Sci.* 41, 481–486
- Anderson, L.E. (1954) Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryophytes. *Bryologist* 57, 242
- Truernit, E. *et al.* (2008) High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 1494–1503
- Wuyts, N. *et al.* (2010) High-contrast three-dimensional imaging of the *Arabidopsis* leaf enables the analysis of cell dimensions in the epidermis and mesophyll. *Plant Methods* 6, 17
- Hedthly, A. *et al.* (2018) Whole-mount clearing and staining of *Arabidopsis* flower organs and siliques. *J. Vis. Exp.* 134, 56441
- Bougourd, S. *et al.* (2000) An aniline blue staining procedure for confocal microscopy and 3D imaging of normal and perturbed cellular phenotypes in mature *Arabidopsis* embryos. *Plant J.* 24, 543–550
- Kurihara, D. *et al.* (2015) ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142, 4168–4179
- Stebbins, G.L. (1938) A bleaching and clearing method for plant tissues. *Science* 87, 21–22
- Li, Y. *et al.* (2016) Optically transparent wood from a nanoporous cellulose template: combining functional and structural performance. *Biomacromolecules* 17, 1358–1364
- Herr, J.M. (1971) A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Am. J. Bot.* 58, 785–790
- Gardner, R.O. (1975) An overview of botanical clearing technique. *Stain. Technol.* 50, 99–105
- Silvestri, L. *et al.* (2016) Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *J. Biomed. Opt.* 21, 081205
- Richardson, D.S. and Lichtman, J.W. (2015) Clarifying tissue clearing. *Cell* 162, 246–257
- Becker, K. *et al.* (2020) Chemical clearing of brains. In *Handbook of Neurophotonics* (Pavone, F.S. and Shoham, S., eds), pp. 191–220, CRC Press
- Littlejohn, G.R. and Love, J. (2012) A simple method for imaging *Arabidopsis* leaves using perfluorodecalin as an infiltrative imaging medium. *J. Vis. Exp.* 59, 3394
- Littlejohn, G.R. *et al.* (2014) An update: improvements in imaging perfluorocarbon-mounted plant leaves with implications for studies of plant pathology, physiology, development and cell biology. *Front. Plant Sci.* 5, 140
- Timmers, A.C.J. (2016) Light microscopy of whole plant organs: light microscopy of whole plant organs. *J. Microsc.* 263, 165–170
- Villani, T.S. *et al.* (2013) An improved clearing and mounting solution to replace chloral hydrate in microscopic applications. *Appl. Plant Sci.* 1, 1300016
- Urban, M.A. *et al.* (2018) Cuticle and subsurface ornamentation of intact plant leaf epidermis under confocal and superresolution microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 81, 129–140
- Ashraf, M.A. and Rahman, A. (2019) Cold stress response in *Arabidopsis thaliana* is mediated by GNOM ARF-GEF. *Plant J.* 97, 500–516
- Lee, K. *et al.* (2006) Visualizing plant development and gene expression in three dimensions using optical projection tomography. *Plant Cell* 18, 2145–2156
- Lee, K.J.I. *et al.* (2016) Macro optical projection tomography for large scale 3D imaging of plant structures and gene activity. *J. Exp. Bot.* 68, 527–538
- Cabrera, J. *et al.* (2018) A phenotyping method of giant cells from root-knot nematode feeding sites by confocal microscopy highlights a role for CHITINASE-LIKE 1 in *Arabidopsis*. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 429
- Schwarz, M.K. *et al.* (2015) Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains. *PLoS ONE* 10, e0124650
- Gilleron, J. *et al.* (2020) Exploring adipose tissue structure by methylsalicylate clearing and 3D imaging. *J. Vis. Exp.* 162, 61640
- Kalinowska, K. *et al.* (2020) Imaging of embryo sac and early seed development in maize after feulgen staining. In *Plant Embryogenesis: Methods and Protocols* (Bayer, M., ed.), pp. 191–203, Springer, USA

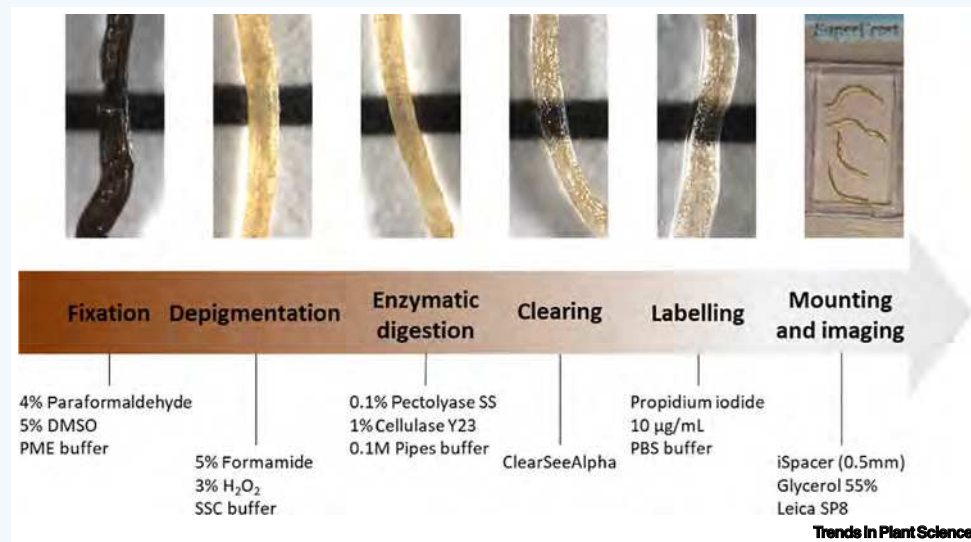
35. González-Gutiérrez, A.G. *et al.* (2020) Simple whole-mount staining protocol of F-actin for studies of the female gametophyte in agavaceae and other crassinucellate ovules. *Front. Plant Sci.* 11, 384
36. He, Y. *et al.* (2021) An optical clearing technique to visualize internal root structure. *ResearchSquare* Published online August 17, 2021. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-753274/v1>
37. Ke, M.-T. *et al.* (2013) SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 16, 1154–1161
38. Lu, L. *et al.* (2020) A rapid and effective optical-clearing technique for deep tissue fluorescence imaging in trees. *Trees* 34, 783–790
39. Benatti, M.N. (2011) A simple clearing technique to aid in the recognition of cilia and rhizinae structure in the Parmeliaceae. *Opuscula Philolichenum* 9, 21–25
40. Staudt, T. *et al.* (2007) 2,2'-Thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 70, 1–9
41. Aoyagi, Y. *et al.* (2015) A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain. *PLoS One* 10, e0116280
42. Costantini, I. *et al.* (2015) A versatile clearing agent for multimodal brain imaging. *Sci. Rep.* 5, 9808
43. Hasegawa, J. *et al.* (2016) Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. *Plant Cell Physiol.* 57, 462–472
44. Musielak, T.J. *et al.* (2016) A versatile optical clearing protocol for deep tissue imaging of fluorescent proteins in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 11, e0161107
45. Sakamoto, Y. *et al.* (2022) Improved clearing method contributes to deep imaging of plant organs *Commun. Biol.* 5, 12
46. Ke, M.-T. *et al.* (2016) Super-resolution mapping of neuronal circuitry with an index-optimized clearing agent. *Cell Rep.* 14, 2718–2732
47. Hama, H. *et al.* (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1481–1488
48. Warner, C.A. *et al.* (2014) An optical clearing technique for plant tissues allowing deep imaging and compatible with fluorescence microscopy. *Plant Physiol.* 166, 1684–1687
49. Nadzieja, M. *et al.* (2019) A toolkit for high resolution imaging of cell division and phytohormone signaling in legume roots and root nodules. *Front. Plant Sci.* 10, 1000
50. Duman, Z. *et al.* (2020) Short de-etiolation increases the rooting of VC801 avocado rootstock. *Plants* 9, 1481
51. Ho, W.W.H. *et al.* (2020) Integrative multi-omics analyses of barley rootzones under salinity stress reveal two distinctive salt tolerance mechanisms. *Plant Commun.* 1, 100031
52. Chen, M. *et al.* (2021) VAPYRIN attenuates defence by repressing PR gene induction and localized lignin accumulation during arbuscular mycorrhizal symbiosis of *Petunia hybrida*. *New Phytol.* 229, 3481–3496
53. Elyahu, A. *et al.* (2020) Vegetative propagation of elite *Eucalyptus* clones as food source for honeybees (*Apis mellifera*); adventitious roots versus callus formation. *Israel J. Plant Sci.* 67, 83–97
54. Kinoshita, A. *et al.* (2020) Expression profiles of ANGUSTIFOLIA3 and SHOOT MERISTEMLESS, key genes for meristematic activity in a one-leaf plant monophyllaea glabra, revealed by whole-mount in situ hybridization. *Front. Plant Sci.* 11, 1160
55. Nagaki, K. *et al.* (2017) ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples. *Sci. Rep.* 7, 42203
56. Kurihara, D. *et al.* (2021) ClearSeeAlpha: advanced optical clearing for whole-plant imaging. *Plant Cell Physiol.* 62, 1302–1310
57. Affaticati, P. *et al.* (2018) X-FaCT: *Xenopus*-fast clearing technique. In *Xenopus: Methods and Protocols* (Vlemingck, K., ed.), pp. 233–241, Humana Press
58. Hériche, M. *et al.* (2022) New clearing protocol for tannic roots optical imaging. *Trends Plant Sci.* 27, 616–617
59. Chung, K. *et al.* (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337
60. Palmer, W.M. *et al.* (2015) PEA-CLARITY: 3D molecular imaging of whole plant organs. *Sci. Rep.* 5, 13492
61. Palmer, W.M. *et al.* (2018) 3D clearing and molecular labeling in plant tissues. In *Photosynthesis: Methods and Protocols* (Covshoff, S., ed.), pp. 285–304, Humana Press
62. Murakami, T.C. *et al.* (2018) A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat. Neurosci.* 21, 625–637
63. Conchello, J.-A. and Lichtman, J.W. (2005) Optical sectioning microscopy. *Nat. Methods* 2, 920–931
64. Helmchen, F. and Denk, W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2, 932–940
65. Mertz, J. (2011) Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat. Methods* 8, 811–819
66. Silvestri, L. *et al.* (2014) Correcting spherical aberrations in confocal light sheet microscopy: a theoretical study: aberrations in light sheet microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 77, 483–491
67. Marx, V. (2014) Microscopy: seeing through tissue. *Nat. Methods* 11, 1209–1214
68. Asterili, S. *et al.* (2020) Two simple criteria to estimate an objective's performance when imaging in non design tissue clearing solutions. *J. Neurosci. Methods* 332, 108564
69. Sharpe, J. (2002) Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science* 296, 541–545
70. Haisch, C. (2012) Optical tomography. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5, 57–77
71. Walls, J.R. *et al.* (2007) Resolution improvement in emission optical projection tomography. *Phys. Med. Biol.* 52, 2775–2790
72. Vallejo Ramirez, P.P. *et al.* (2019) OptiJ: open-source optical projection tomography of large organ samples. *Sci. Rep.* 9, 15693
73. Wei, M. *et al.* (2019) Volumetric chemical imaging by clearing-enhanced stimulated Raman scattering microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 6608–6617
74. Chen, Y. *et al.* (2019) Coherent Raman scattering unravelling mechanisms underlying skull optical clearing for through-skull brain imaging. *Anal. Chem.* 91, 9371–9375
75. Littlejohn, G.R. *et al.* (2015) In vivo chemical and structural analysis of plant cuticular waxes using stimulated Raman scattering microscopy. *Plant Physiol.* 168, 18–28
76. Mansfield, J.C. *et al.* (2013) Label-free chemically specific imaging in planta with stimulated raman scattering microscopy. *Anal. Chem.* 85, 5055–5063
77. Cui, Y. *et al.* (2016) Optical clearing delivers ultrasensitive hyperspectral dark-field imaging for single-cell evaluation. *ACS Nano* 10, 3132–3143
78. Touloumes, G.J. *et al.* (2020) Mapping 2D- and 3D-distributions of metal/metal oxide nanoparticles within cleared human ex vivo skin tissues. *NanoImpact* 17, 100208
79. Mehta, N. *et al.* (2021) Dark-field hyperspectral imaging for label free detection of nano-bio-materials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 13, e1661
80. Avellan, A. *et al.* (2017) Nanoparticle uptake in plants: gold nanomaterial localized in roots of *Arabidopsis thaliana* by X-ray computed nanotomography and hyperspectral imaging. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8682–8691
81. Boutchuen, A. *et al.* (2019) Increased plant growth with hematite nanoparticle fertilizer drop and determining nanoparticle uptake in plants using multimodal approach. *J. Nanomater.* 2019, 6890572
82. Vicidomini, G. *et al.* (2018) STED super-resolved microscopy. *Nat. Methods* 15, 173–182
83. Angibaud, J. *et al.* (2020) A simple tissue clearing method for increasing the depth penetration of STED microscopy of fixed brain slices. *J. Phys. D Appl. Phys.* 53, 184001
84. Komis, G. *et al.* (2015) Super-resolution microscopy in plant cell imaging. *Trends Plant Sci.* 20, 834–843
85. Rae, A.E. *et al.* (2020) Super-resolution fluorescence imaging of arabidopsis thaliana transfer cell wall ingrowths using pseudo-schiff labelling adapted for the use of different dyes. *Plant Cell Physiol* 61, 1775–1787

86. Messal, H.A. *et al.* (2021) Antigen retrieval and clearing for whole-organ immunofluorescence by FLASH. *Nat. Protoc.* 16, 239–262
87. Avilov, S.V. (2021) Navigating across multi-dimensional space of tissue clearing parameters. *Methods Appl. Fluoresc.* 9, 022001
88. Vieites-Prado, A. and Renier, N. (2021) Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development* 148, dev199369
89. Dapson, R.W. (2016) Schiff and pseudo-Schiff reagents: the reactions and reagents of Hugo Schiff, including a classification of various kinds of histochemical reagents used to detect aldehydes. *Biotech. Histochem.* 91, 522–531
90. Freudiger, C.W. *et al.* (2008) Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated raman scattering microscopy. *Science* 322, 1857–1860
91. Neuhaus, B. *et al.* (2017) Collection management and study of microscope slides: storage, profiling, deterioration, restoration procedures, and general recommendations. *Zootaxa* 4322, 1–173
92. Gusachenko, I. *et al.* (2017) Multimode fibre based imaging for optically cleared samples. *Biomed. Opt. Express* 8, 5179
93. Dent, J.A. *et al.* (1989) A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development* 105, 61–74
94. Morley, T. (1968) Accelerated clearing of plant leaves by NaOH in association with oxygen. *Stain. Technol.* 43, 315–319
95. Reynaud, E.G. *et al.* (2015) Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists. *Nat. Methods* 12, 30–34
96. Voie, A.H. *et al.* (1993) Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J. Microsc.* 170, 229–236
97. Stelzer, E.H.K. and Lindk, S. (1994) Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Opt. Commun.* 111, 536–547
98. Huisken, J. (2004) Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305, 1007–1009
99. Ricci, P. *et al.* (2022) Removing striping artifacts in light-sheet fluorescence microscopy: a review. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 168, 52–65
100. Masters, B.R. (2020) Superresolution Optical Microscopy: The Quest for Enhanced Resolution and Contrast. Springer
101. Kromm, D. *et al.* (2016) An eye on light-sheet microscopy. *Methods Cell Biol.* 133, 105–123
102. Ovečka, M. *et al.* (2018) Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nat. Plants* 4, 639–650
103. Chakraborty, T. *et al.* (2019) Light-sheet microscopy of cleared tissues with isotropic, subcellular resolution. *Nat. Methods* 16, 1109–1113

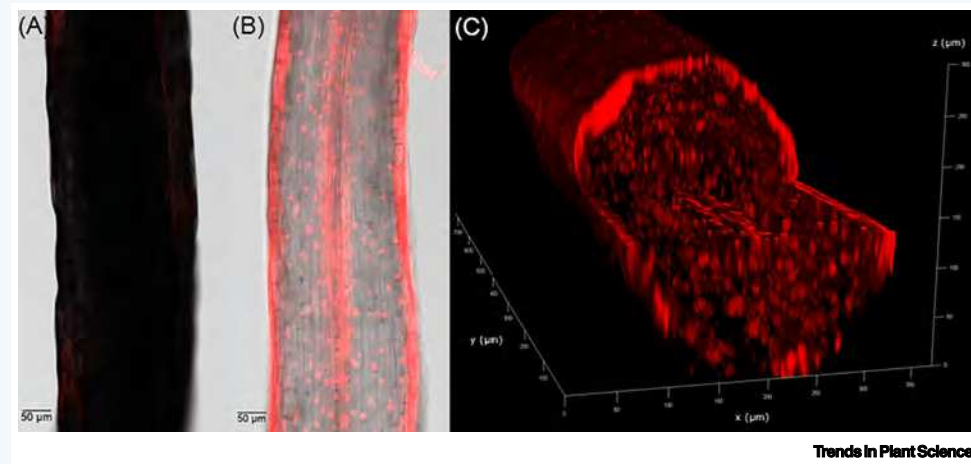
New clearing protocol for tannic roots optical imaging

Mathilde Hériché ¹, Christine Arnould, ¹ Daniel Wipf, ¹ and Pierre-Emmanuel Courty ^{1,*}

¹Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, Univ. Bourgogne, INRAE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France



The understanding of plant physiological complexity requires 3D imaging of the entire organ with subcellular resolution. However, most plant organs are highly opaque to light and their study under optical sectioning microscopes is difficult. By gathering the latest developments in the field of optical clearing of pigmented plant tissues, it was found that the clearing tannic roots (CTR) protocol drastically reduces light absorption by a depigmentation step and light scattering by the homogenisation of refractive indices through entire grapevine roots.



Grapevine roots, labelled with propidium iodide (PI), imaged through a confocal laser fluorescent microscope (Leica SP8, ×16, immersion objective glycerol 55%, wavelength excitation: 552 nm, emission: 589–653 nm). Overlay of brightfield and PI signal of an unprocessed root (A); cleared root (B) at a depth of 130 µm in z axis. 3D reconstruction of PI signal (C) corresponds to root (B). The nuclear staining by PI is clearly recorded on the entire root thickness (250 µm).

Declaration of interests

No interests are declared.

Acknowledgements

The authors thank the Burgundy Franche Comté Regional Council. M.H. receives a doctoral contract accredited by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. This work has benefited from the facilities of the Centre de Microscopie INRAE Dijon/Université de Bourgogne, Plateforme DImaCell (INRAE, Agroécologie, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRAE/Université de Bourgogne, Dijon, France).

ADVANTAGES:

CTR provides access to 3D anatomical features of perennial plant tissues without physical sectioning.

CTR is efficient on lignified roots, larger than 250 µm, of two different rootstocks (Riparia and SO4).

The ClearSeeAlpha clearing process preserves fluorescence signal and is suitable for use with endogenous probes (e.g., mClover).

CTR can be applied to roots colonised by bacteria and/or fungi. Promising new anatomical and physiological insights concerning parasitism and symbiosis mechanisms at the organ and entire plant scale can be obtained.

CHALLENGES:

The sample preparation is time-consuming (2 weeks minimum are needed). Each step has to be adapted according to the age of the sample and growing conditions (e.g., substrates). This method must be tested on older tissues, species, and field samples.

Chemical and enzymatic treatments can lead to a loss of tissue component (e.g., lipids and oligosaccharide, respectively).

Imaging in depth requires a specific mounting procedure (spacers between glass and coverslip) and requires specific equipment (long working distance and immersion objectives).

With regard to depth imaging, using CTR and a high performance microscope rather than a confocal microscope, should overcome the 250 µm thickness limitation (e.g., light sheet fluorescent microscope).

*Correspondence:

pierre-emmanuel.courty@inrae.fr
(P.-E. Courty).



Literature

1. Affaticati, P. *et al.* (2018) X-FaCT: *Xenopus*-fast clearing technique. In *Xenopus 1865* (Vleminckx, K., ed.), pp. 233–241, Springer
2. Nagaki, K. *et al.* (2017) ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples. *Sci. Rep.* 7, 42203
3. Kurihara, D. *et al.* (2021) ClearSeeAlpha: advanced optical clearing for whole-plant imaging. *Plant Cell Physiol.*, pcab033
4. Warner, C.A. *et al.* (2014) An optical clearing technique for plant tissues allowing deep imaging and compatible with fluorescence microscopy1[W][OPEN]. *Plant Physiol.* 166, 1684–1687
5. Kurihara, D. *et al.* (2015) ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142, 4168–4179
6. Imoto, A. *et al.* (2021) A ClearSee-based clearing protocol for 3D visualization of *Arabidopsis thaliana* embryos. *Plants* 10, 190
7. Li, Y. *et al.* (2016) Optically transparent wood from a nanoporous cellulosic template: combining functional and structural performance. *Biomacromolecules* 17, 1358–1364
8. Rae, A.E. *et al.* (2021) New methods for confocal imaging of infection threads in crop and model legumes. *Plant Methods* 17, 24
9. Moukarzel, R. *et al.* (2020) An improved clearing and staining protocol for evaluation of arbuscular mycorrhizal colonisation in darkly pigmented woody roots. *NZPP* 73, 33–39
10. Yu, T. *et al.* (2021) Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. *iScience* 24, 102178



A historical perspective on mycorrhizal mutualism emphasizing arbuscular mycorrhizas and their emerging challenges

Antoine Sportes¹ · Mathilde Hériché¹ · Raphaël Boussageon¹ · Pierre-Antoine Noceto¹ · Diederik van Tuinen¹ · Daniel Wipf¹ · Pierre Emmanuel Courty¹

Received: 24 June 2021 / Accepted: 15 September 2021 / Published online: 16 October 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021, corrected publication 2022

Abstract

Arbuscular mycorrhiza, one of the oldest interactions on earth (~450 million years old) and a first-class partner for plants to colonize emerged land, is considered one of the most pervasive ecological relationships on the globe. Despite how important and old this interaction is, its discovery was very recent compared to the long story of land plant evolution. The story of the arbuscular mycorrhiza cannot be addressed apart from the history, controversies, and speculations about mycorrhiza in its broad sense. The chronicle of mycorrhizal research is marked by multiple key milestones such as the initial description of a “persistent epiderm and pellicular wall structure” by Hartig; the introduction of the “Symbiotismus” and “Mycorrhiza” concepts by Frank; the description of diverse root-fungal morphologies; the first description of arbuscules by Gallaud; Mosse’s pivotal statement of the beneficial nature of the arbuscular mycorrhizal symbiosis; the impact of molecular tools on the taxonomy of mycorrhizal fungi as well as the development of *in vitro* root organ cultures for producing axenic arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). An appreciation of the story – full of twists and turns – of the arbuscular mycorrhiza, going from the roots of mycorrhiza history, along with the discovery of different mycorrhiza types such as ectomycorrhiza, can improve research to help face our days’ challenge of developing sustainable agriculture that integrates the arbuscular mycorrhiza and its ecosystem services.

Keywords Mycorrhiza · History · Functional analysis · Field management

Introduction

Agriculture started some 10,000 years ago in the area now called the Fertile Crescent. Humans empirically developed many skills to shape soils for plant cultivation. The modern agricultural concept has turned the additional focus to soil microorganisms as they can modify nutrient cycles, promote plant growth, and enhance stress resistance. The impact of microorganisms on plant development and health can be illustrated by mycorrhiza, a symbiosis between most land plants and soil-borne fungi. Since Frank introduced the word “mycorrhiza” 136 years ago (Frank 1885), mycorrhizal symbiosis has grown into a dedicated discipline: the scientific community aims at elucidating its features and implications for both plant and fungal partners as well as for other microorganisms such as bacteria. The concept of beneficial symbiosis, however, was not always as accepted as it is today, and it took many years of experimentation and controversy to reach our current level of understanding.

✉ Pierre Emmanuel Courty
pierre-emmanuel.courty@inrae.fr

Antoine Sportes
antoine.sportes@inrae.fr

Mathilde Hériché
mathilde.heriche@inrae.fr

Raphaël Boussageon
raphael.boussageon@inrae.fr

Pierre-Antoine Noceto
pierre-antoine.noceto@inrae.fr

Diederik van Tuinen
diederik.van-tuinen@inrae.fr

Daniel Wipf
daniel.wipf@inrae.fr

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, Université de Bourgogne, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

Present challenges and concepts regarding arbuscular mycorrhizal symbiosis cannot be appreciated without knowledge (sometimes unknown to mycorrhizologists) of the history, controversies, and speculations on plant root associations with soil-borne fungi. Indeed, even if arbuscular mycorrhiza is the oldest form of mycorrhiza on earth, it was not the first form of mycorrhiza to be discovered and studied. The story started in temperate areas, in forests where early investigators discovered and worked on the predominant type of mycorrhiza, namely the ectomycorrhiza. That is why, if one wants to understand and tell the story of arbuscular mycorrhiza, one must understand the story of mycorrhiza in its broad sense, which took root with the ectomycorrhiza.

The nineteenth century: the "roots" of mycorrhiza

The story of mycorrhiza starts with *Monotropa*, a non-photosynthetic plant whose parasitic nature was controversial (Curtis and Hooker 1828). In 1832, Elias Fries initially recognized fungal structures on the outer surface of *Monotropa* roots and named the fungus *Tuburcinia monotropa* (Fries 1832; Hatch 1937). Franciszek Kamiensky (1882) and others observed similar structures on trees and reported that “les racines de quelques arbres présentent avec les racines du *Monotropa* la plus grande ressemblance” (Hatch 1937). In 1840, Theodor Hartig drew and characterized structures on pine roots as “a persistent periderm” and a “pellicular wall structure,” as if they were plant structures, not fungal ones. The latter intraradical structures were named “Hartig net” years after Theodor Hartig’s discovery (HacsKaylo 2017). Following T. Hartig’s description, many discussions went on about tree roots, especially about the presence or absence of root hairs (Hartig 1840; Schacht 1853, 1854; Gasparrini 1856; Schwartz 1883; Hatch 1937). For example, while studying tree root hairs, Guglielmo Gasparrini (1856) discovered that fungi were present within tree roots, and he considered them pathogens (Trappe 2005a). Scientists attempted to classify trees based on a supposed link between root hairs, root length and the presence of fungi. In 1893, Georg Frederik Ludvig Sarauw considered this classification as probably wrong because root hairs had been confused with fungal structures in previous publications (Sarauw 1893). After Hellmut Bruchmann (1874) – who was the first to note that the Hartig net was made of fungal mycelium – many publications reported the presence of the Hartig net, but as an indicator of the presence of a plant pathogen (Boudier 1876; Rees 1880; Gibelli 1883). Some, like Wilhelm Pfeffer (1877) and Heinrich Anton de Bary (1879) proposed the idea, controversial at the time, that fungi could be the cause and not the consequence of plant diseases. Giuseppe Gibelli (1883), while working on the ink disease of chestnut trees, observed

the same fungal mantle on both healthy and diseased roots. He hypothesized that the roots of other trees may have such a fungal mantle. By comparing roots of different species, he observed roots with and without a mantle. He concluded that to quote Gibelli, the “ilnemico implacabile” (the implacable enemy, reference to mycorrhizal fungi) infection did not jeopardize tree growth and was tolerated because no injury was recorded. Gibelli also mentioned a controlled inoculation experiment as a means to investigate the features of this unusual interaction. This work started a decade-long controversy about the role of fungi (now known as mycorrhizal fungi) in colonized land plants.

The famous German botanist Albert Bernhard Frank is considered to be the long-misunderstood father of mycorrhiza. His non-traditional scientific approach was so far ahead of his time that he was strongly criticized for decades by his contemporaries until his hypotheses were accepted, as reported by Alden Bruce Hatch (1937): “There is probably no incident in the history of mycorrhizal investigations which has been more often related than the storm of criticism which immediately followed the publication of Frank’s first paper.” While on a mission for the King of Prussia—Wilhelm the first—on the development of truffle farming in 1885, Frank published a paper entitled “Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze” translated as “On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi” (Trappe 2005b), introducing the term “Mykorrhiza” to describe the interaction between ectomycorrhizal fungi and tree roots as currently known. Gibelli in Italy and Frank in Germany simultaneously conducted extensive surveys of plants colonized by mycorrhizal fungi (Gibelli 1883; Frank 1885). The high quality and extraordinary details of Frank’s drawings remain unmatched (Trappe 2005a). He ascribed the hypertrophy of outer cortical cells and the decrease in root hairs to a physical consequence of the fungal invasion. Fifty years later, Visvaldis Slankis (1948, 1949) showed that root hairs are suppressed after a biochemical reaction to fungal exudates during root invasion. However, this complex phenomenon, coming from complex interactions, could not be reduced to a unique biochemical event (Bonfante-Fasolo and Scannerini 1992). Frank also explored many features of the mycorrhizal interaction, such as the effect of soil depth and the pattern of root colonization by fungal species during tree development.

Tantalizing as it was, Frank’s mutualistic interaction concept/hypothesis (Frank 1885) was initially rejected by his contemporaries. One of his most fervent opponents was probably Theodor Hartig’s son, Robert Hartig, with his famous criticism of Frank’s work (Hartig 1888). Nevertheless, some said that Robert eventually agreed with Frank’s theory years later (HacsKaylo 2017). The concept of mutualism (but also commensalism and parasitism) was initially

proposed by Pierre-Joseph van Beneden (1875) in animal associations and then followed by Wilhelm Pfeffer (1877) in the context of associations between orchid roots and fungi. Simon Schwendener (1869) compared lichen-forming fungi to “parasites, although with the wisdom of statesmen” and Frank (1877) later proposed the term “Symbiotismus,” i.e., living together, to explain these interactions. In 1879, “Symbiotismus” was extended by De Bary (often wrongly considered the creator of this concept) in a broader sense as “symbiosis, living together of dissimilar organisms.” Frank’s mutualistic interaction included a theory about nutrition, and he described the pathway of mineral nutrient transfer as follows: first, fungi extract and absorb mineral nutrients from humus, then they transform mineral nutrients for transport through the mycelium, and finally, they transfer those mineral nutrients to the host plant through intraradical fungal structures. Forty-two years later, A.B. Hatch (1937) was one of the first to corroborate Frank’s mineral nutrient pathway. Close to seventy years after Frank’s statement, Melin and Nilsson (1950, 1957) experimentally confirmed these soil mineral nutrient pathways, showing phosphorus (^{32}P) delivery by ectomycorrhizal fungi to plants, and carbon (^{14}C) transfer from plants to fungi. HacsKaylo’s memoir (HacsKaylo 2017) gave an emotional and outstanding overview of Elias Melin’s research career in the mid-twentieth century.

In 1887, Frank initially reported two different types of mycorrhiza (Frank 1887), “ectotrophic” ones and “endotrophic” ones; the “endotrophic” first concerned ericaceous and orchid mycorrhizas, with arbuscular mycorrhiza, only included subsequently. One of his students (Albert Schlitz) established a thorough list of mycorrhizal plants and concluded that mycorrhizal interactions are found in “poor nutrient” soils and

specifically in plant species with “thick fleshy roots, few root hairs, and reduced root systems” (Schlicht 1889).

It is noteworthy that in 1842, 40 years before Frank, Carlo Vittadini hypothesized that plants could absorb nutrients by extracting them from fungi as if the plant intended to attack the fungus; he wrote “...it is our decided opinion that beyond all doubt the higher plants absorb nutrients from the fungus by their feeder rootlets.” However, he did not mention that the fungus was taking carbon from the plants (Trappe 2005a). In 1894, Frank wrote that fungi transfer mineral nutrients to plants and hypothesized that plants provided carbon from photosynthesis to the fungi, supporting the idea of a mutualistic interaction (Frank 1894). Frank also suggested that mycorrhizal fungi could digest forest humus to extract and deliver proteins to plants. It took over 90 years to confirm that (i) some ectomycorrhizal fungi are capable of decomposing organic sources of nutrients (Read 1987), (ii) some of them have hemicellulose degradation activity (Durall et al. 1994), and (iii) some plants cannot extract organic nitrogen from humus without the help of those specific fungi (Trappe 2005b). Frank’s article (1894) has a wealth of information for mycorrhizologists. Frank showed for the first time, empirical evidence of a nutritional role of mycorrhizal symbiosis with an experiment comparing sterilized and non-sterilized soils (Fig. 1).

In 1896, the Frenchman Pierre Dangeard described endotrophic mycorrhiza – now known as arbuscular mycorrhiza (AM) – in poplar roots (Dangeard 1896) and consequently named the fungus *Rhizophagus populinus*, “poplar root eater” (Dangeard 1900). Jacobus Marinus Janse (1897), while working on coffee trees in Java, first reported mycorrhiza in the tropics. He also initially described fungal



Fig. 1 Frank showed for the first time the empirical evidence of the nutritional role of mycorrhizal symbiosis (Frank 1885, 1894). Photograph of Frank’s first assay on mycorrhization. Frank conducted a 3-year experiment on spruce grown in pots containing either Spruce forest natural soil (Unsterilisirt) and the same heat-sterilized soil without (Sterilisirt) or with developing ectomycorrhizas (Sterilisirt, spontan inficirt). Spruce trees grown in unsterilized soil had

many needle ramifications (they were “with strong health and wild” and bright green), whereas those grown in sterilized soil were small, unhealthy, and yellowish. According to Frank, spruces in the leftmost pots were recently colonized by mycorrhizal fungi (presence of a mantle only on the young roots) probably originated from the unsterilized pots

microstructures, such as “intramatricial spores,” “vesicles,” “sporangioles,” and “undefined structures” in plant roots.

Many pioneering research works on mycorrhiza emerged in the nineteenth century. As the worldwide access to other scientific work was not yet as developed as it is nowadays, it is noteworthy that most researchers knew little about the studies of others at the time. Although Frank’s work attempted to characterize the mycorrhizal interaction as beneficial, most scientists considered it parasitic.

Early twentieth century research: the mycorrhiza, from parasitism to mutualism

Research in the early 1900s did not establish a clear status for the mycorrhizal association, mainly due to difficulties in detecting and growing fungi.

Despite the two World Wars, major advances occurred during the twentieth century. In 1904, Ernest Isidore Gallaud (1904) initially described fungal structures within plant roots, such as arbuscules (Fig. 2), previously named “undefined structures” by Janse (1897). Arbuscules are fungal extensions that penetrate the plant cell wall and push back the plasma membrane, expanding the plant-fungal interaction zone. Gallaud’s microscopic observations revealed that the “sporangioles” reported by Janse (1897) have degenerated arbuscules. Gallaud writes in his manuscript that the degenerated arbuscules have a granular aspect as if they were digested. In his thesis, written in French, the translation of some concluding sentences about his observations is “...taking all previous results into account, we might suggest a role of endophytes. They are internal saprophytes, which, by their very differentiated haustoria-like structures, borrow non-living nutritive elements from cells of the cortical parenchyma of the roots they face. These cells react very quickly to the fungus by killing, digesting, and absorbing the intracellular haustoria-like structure, before returning to their normal lifestyle after a temporary shift. We cannot say that there is a harmonious symbiosis between the two plants, but a struggle between the invading fungus, but relatively harmless, and the cells defending through their digestive power. There is no doubt that the fungus takes advantage of the plant and elements necessary to continue its way ahead. However, by digesting the arbuscules, the plant only takes back a small part of the elements taken by the fungus” (Gallaud 1904).

In the early twentieth century, many scientists tried to establish the prevalence of the mycorrhizal interaction in different ecosystems such as Henrik Hesselman (1900) in arctic regions, Elias Melin (1917 to 1927, correlation of mycorrhizal abundance with the humus layer) in Sweden (Melin 1917, 1923, 1924, 1925, 1927), and Koki Masui (1927) and Tōichi Asai (1934) in Japan (Asai 1934; Hatch 1937). The list of researchers

who performed similar works is long, but we should mention J.M. Janse (1897), W.B. McDougall (1922), R. Paulson (1924), G. Samuel (1926), S.L. Kessel (1927), M.L. Lohman (1927), L.J. Pessin (1928), A.P. Kelley (1932), and R.E. McArdle (1932).

Despite numerous articles in the first half of the twentieth century showing the great abundance of mycorrhiza in natural environments as well as communications and articles challenging the community, mycorrhizal fungi still had a “pathogenic reputation” (Jones 1924; O’Brien and McNaughton 1928; Koch 1935; Bruges 1936; Hildebrand and Koch 1936). At the same time, Fred Revel Jones (1924) had a mitigated statement; while still considering mycorrhizal fungi as pathogens, he conceded that “...conspicuous vigor in these plants in any locality can hardly be ascribed to the absence of this fungus” (Jones 1924; Koide and Mosse 2004). Furthermore, Jones confirmed Schlicht’s assumption (1889) that fungal infection was lower in rich soils (Schlicht 1889). Based on color intensity (optical density), Jones hypothesized that hyphae outside roots and between cells were empty, whereas hyphae forming arbuscular structures were full. Beniamino Peyronel worked on the description of mycorrhizal interactions from 1920 to the end of his career. He classified fungi by following the mycelium from the root to the spore as *Endogone fuegiana*, *Endogone vesiculifera*, and *Endogone* sp (Peyronnel 1923, 1924, 1937).

Mycorrhizal research remained active during the Second World War. Although mostly unknown to the scientific community, Tōichi Asai’s work during that period should be remembered. In 1942, he published a paper summarizing his discoveries in fifteen major points. Among those, we should notice his experiment with sterilized and inoculated soils (similar to Frank’s in 1894); plants did not form mycorrhiza in sterilized soils, but inoculation of a mix of sterilized soil and garden soil improved plant development (Asai 1942). Some of his contemporaries attributed the positive impact of soil inoculation to microbial detoxification of heat-treated soil, as reported by Koide and Mosse (2004). Asai also reported that plant development depended on the speed and intensity of fungal root colonization. He showed that nutrient solutions could inhibit mycorrhizal fungal development, meaning that fungal growth depended on the soil nutrient content and he hypothesized that fungi could act as a nutrient mediator for plants. It took over 20 years to confirm that soil fertilization, and especially nitrate (Richards 1965) and phosphate (Daft and Nicolson 1966), act on mycorrhizal fungal growth. Asai also mentioned that molecules he isolated (probably hormones) were provided by the fungus to the plant and regulated plant root development and architecture. Subsequently, Jane Ulrich (1960) demonstrated that ectomycorrhizal fungi produced auxin. Lastly, Asai concluded that very few plant species could not form this symbiosis.

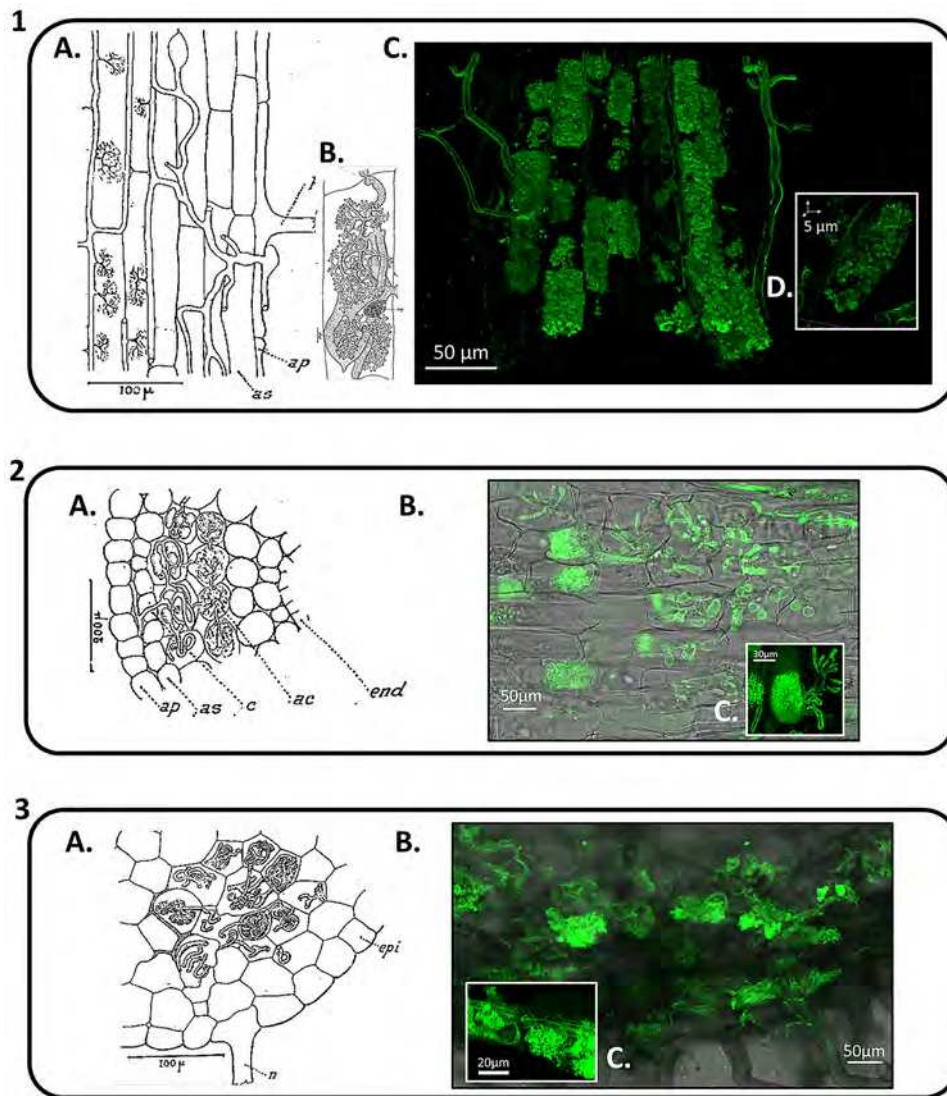


Fig. 2 Gallaud's (1904) drawings of different endomycorrhiza types and recent corresponding photomicrographs (2021). (1) The *Arum maculatum* type, produced by most land plants, was defined as the most ordered degree of fungal root colonization. Fungal hyphae penetrate roots through the apoplast pathways to eventually enter a cell and form a unique arbuscular structure. Drawings of (A) a longitudinal section of *Arum maculatum* root and (B) a young arbuscule; (C) Photomicrograph of a longitudinal section of a *Medicago truncatula* root and (D) a single arbuscule. (2) The *Paris Quadrifolia* type is mainly observed in trees and forest herbs. In this specific type, mycorrhizal hyphae pass

from cell to cell (cortical layer) while forming structures such as arbuscules in the traversed cells. A Drawings of a transverse section of *Paris quadrifolia*; B photomicrograph of a longitudinal section of a *Paris quadrifolia* root and C a single arbuscule. (3) The *Hepatic* type is highly similar to the *Paris*-type mycorrhiza, but without a layered organization. Nowadays, it is no longer accepted as distinct (Dickson et al. 2007) A Drawings of transverse section of a *Pellia epiphylla* thallus; B photomicrograph of a transverse section of a *Pellia epiphylla* thallus. *Noy*, nucleus root hair; *ap*, pillar seat; *as*, corky seat; *c*, passage cell; *end*, endoderm; *epi*, epiderm; *r*, rhizoid; *d*, collapsed arbuscule

From mid-twentieth century to nowadays: the arbuscular mycorrhiza, toward validation and characterization of a mutualistic association

From the 1950s, the concept of arbuscular mycorrhizal symbiosis considering the fungus as a mutualistic partner was definitively accepted, together with the creation of centers

specifically dedicated to the study of mycorrhiza, e.g., the “Centro di Studio sulla Micologia del Terreno” “Center of soil mycology study” in Torino by Peyronnel (Peyronnel 1950; Bonfante 1991). First international meetings dedicated to mycorrhiza appeared such as the first European conference (held in 1960 in Weimar, in the former German Democratic Republic), the North American Conference on Mycorrhiza (NACOM, first conference held in 1969) or the International

Conference on Mycorrhizae (ICOM, first held in 1996). In addition, this period was marked by major advances on which current arbuscular mycorrhiza research is based.

Complex assays were designed once AMF were successfully isolated and grown. In 1953, Barbara Mosse initially inoculated a single species of mycorrhizal fungus (later named after her, *Endogone mosseae*; Nicolson and Gerdemann 1968) on strawberry (Mosse 1953). She also demonstrated the wide range of hosts of this fungus (Mosse 1956) and eventually the beneficial consequences of its inoculation on apple seedlings (Mosse 1957). Over the same period, the group of Lilian Hawker published an article questioning the quality of Mosse's results and precisely the fungal type used in her experiments. On one side, Mosse argued that the inoculated fungus belonged to *Endogone*, and on the other side; Hawker considered that only *Pythium* species were responsible for vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. She even believed at the end that Mosse's experiments were simply contaminated by *Pythium* species (Hawker 1957a). The result was a continuing dispute between the two groups until Mosse's conclusions were proved to be correct. Although other studies had suggested or even shown the beneficial effect of mycorrhizal symbiosis (e.g., works by Frank and Asai), Mosse undoubtedly demonstrated this positive effect, both in sterile and non-sterile conditions. Concepts of nutrient assimilation and transfer, especially for phosphorus, were developed. Baylis (1959) initially observed a higher phosphorus (P) concentration in mycorrhizal *Griselinia littoralis* plants than in non-mycorrhizal ones. The effects of plant inoculation with mycorrhizal fungi on P nutrition were studied when growing plants on P-limited soils (Holevas 1966) or after P supply (Mosse and Hayman 1971). Daft and Nicolson (1966, 1969) published many studies on P transfer by the mycelium network, and Nicolson (1968) reported diminished fungal growth on P-rich soils. Regarding mycelium spreading into the soil, Sanders and Tinker (1971) hypothesized a central role of the external mycelium in the mobilization and uptake of P from insoluble structures. Poly-P granules, found in hyphae (Cox 1975) and hypothesized to be P transport molecules (Koide and Mosse 2004), were degraded into available P for plants by alkaline phosphatase within roots (Gianinazzi 1979). Finally, Ritz and Newman (1985) suggested that mycorrhizal networks could transfer P from a dying plant to a viable one, and Jakobsen (1992) suggested that mycorrhizal fungi could be responsible for the whole P content within plants (this was later demonstrated by Smith et al. (2004) for several plant species). Many authors further reviewed the relationship between P and/or other elements and arbuscular mycorrhizal symbiosis (e.g., copper: Ross and Harper 1970; zinc: Gilmore et al. 1971). Many reviews and books (Harley and Smith 1983; Smith and Read 1997, 2008) present the history of fungal mineral nutrient transfer to plants.

The active role of fungal structures such as arbuscules has often been questioned over the years. After Gallaud (1904), and until the late sixties, “digestion” of arbuscular structures was thought to be responsible for nutrient transfer. Bowen and Rovira (1968) initially suggested that functional arbuscules could transfer nutrients to host plants. During a Leeds symposium in 1974 (proceedings published in “Endomycorrhizas, F. E. Sanders, B. Mosse, and P. B. Tinker, eds. Academic Press”), Harold Woolhouse (1975) suggested an active transmembrane exchange between mycorrhizal fungi and plants (Sanders et al. 1975; Koide and Mosse 2004). Eventually, Cox and Tinker (1976) settled the matter by demonstrating that intact arbuscules can transfer nutrients, taking arbuscule time viability, arbuscule size, and the P concentration into account. They also suggested that arbuscule degradation could be involved in nutrient transfer, but that this mechanism was not the main process. Nowadays, the concept of “direct” and “indirect” (also called mycorrhizal) nutrient pathways (Smith and Smith 1990) is widely accepted. In the mycorrhizal pathway, mineral nutrients are taken up from the soil and then released from the fungi inside the root cortex through specific mineral nutrient transporters (i.e., Rausch et al. 2001; Harrison et al. 2002; Garcia et al. 2016) (Fig. 3).

AMF are obligate biotrophs, the production and the growth of branched hyphae exploring and foraging throughout the soil require carbon (C). The C cost for the plant, when colonized by AMF, was first estimated to be 20% which likely is the upper limit with the average below 10% of the plant C budget (Jakobsen and Rosendahl 1990). Hexose sugars were initially demonstrated as the main C source for AMF (Shachar-Hill et al. 1995) and an AMF hexose transporter, with a high affinity for glucose, was shown as essential for arbuscule development and required for AMF growth (Helber et al. 2011). It was also demonstrated that sugars are precursors for lipid biosynthesis (Pfeffer et al. 1999) and lipids are pivotal in AMF physiology as they are an important form of C transport (Bago et al. 2002; 2003) and storage (Trépanier et al. 2005) within hyphae. The role and importance of lipids, however, both for arbuscule development and in C transfer came afterward due to experimental limitations, the lack of whole-genome sequences of AMF (i.e., Tisserant et al. 2013; Salvioli et al. 2016), and appropriate plant mutants (Wang et al. 2012; Bravo et al. 2017).

C transfer (in the form of sugars and fatty acids) and the mycorrhizal pathway were two of the most spectacular discoveries of the last decade. However, the C cost of AMF symbiosis is still an ongoing debate regarding plant growth, benefits, and fitness. These C costs are usually not limiting to plant growth, but could potentially flip to negative effects if environmental conditions are not conducive, e.g., upon shading (Olsson et al. 2010; Konvalinková et al. 2015; Konvalinková and Jansa 2016). The mycorrhizal

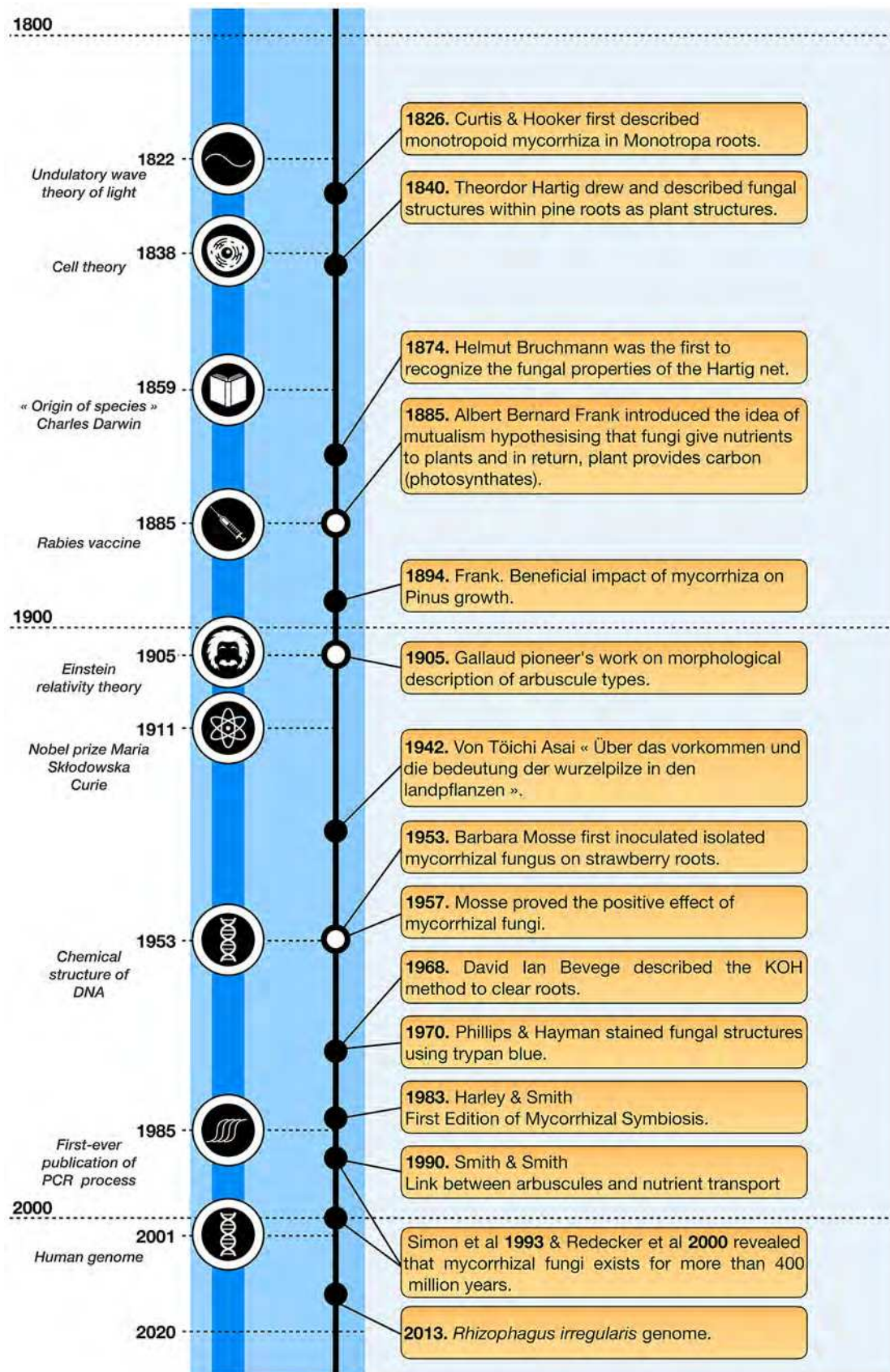


Fig. 3 Chronology, with key dates of the history of arbuscular mycorrhizal symbiosis

phenotype could effectively depend on the cooperative and/or selfish traits of both partners, leading to a wide range of responses. There are different opinions and perspectives on the C cost of mycorrhizal functioning: (i) Johnson et al. (1997) considered a continuum of responses, from mutualism to parasitism, (ii) Kiers et al. (2011) considered reciprocal rewards necessary to stabilize cooperation, and (iii) Smith and Smith (2013) assumed resource trade as a key determinant of costs and benefits of the symbiosis for both partners. The C cost of AMF symbiosis should not be considered only for a single plant but among many plants in common mycorrhizal networks (CMN), which relate to so far somewhat unspecific interactions among different AMF and plant species. Once again, an ongoing controversy whether CMN enables the plant to plant transfer of C (and other nutrients) (Simard and Durall 2004) or whether AMF work rather as a one-way valve, transferring resources taken up from the soil to the plants and differentially distributing those resources among different plant partners (Leake et al. 2004; Walder et al. 2015).

From mid-twentieth century to nowadays: from detection toward function, essential historical milestones

Visual detection of arbuscular mycorrhiza

Detection and visualization of mycorrhiza have evolved greatly since Curtis and Hooker (1828). To better visualize AMF structures, clearing agents often coupled with a heating step were used to remove most cytoplasmic components. While many clearing procedures were commonly used such as the ones found in Stebbins (1938), Gerdemann (1955), Janes (1962), or Herr (1971, 1974), potassium hydroxide is the oldest and most commonly used (Janse 1897; Peyronel 1940; Bevege 1968; Phillips and Hayman 1970). The most widely used method over the last 50 years is based on David Ian Bevege's protocols (1968).

The staining that follows clearing is based on the use of many specific dyes to visualize and detect fungal structures, and to quantify root colonization (Vierheilig et al. 2005). Three groups of staining protocols can be distinguished depending on the purpose of the observation: (i) overall quantification of fungal root colonization with chemical agents such as acid fuchsin (O'Brien and McNaughton 1928), Sudan IV (Nicolson 1959), trypan blue (Phillips and Hayman 1970), chlorazol black E (Brundrett 1984), and even ink (Vierheilig 1998); (ii) detailed visualization of fungal structures with compounds such as wheat germ agglutinin coupled with gold particles or fluorophore (Horisberger 1980; Bonfante-Fasolo et al. 1990) and Uvitex 2B (Diagne et al. 2011)

and finally (iii) enzymatic detection of active fungal structures based on succinate dehydrogenase (Nitro Blue tetrazolium; Macdonald and Lewis 1978; Kough et al. 1987) and alkaline phosphatase with either nonfluorescent (Tisserant et al. 1993) or fluorescent methods (Van arle et al. 2001). See Vierheilig et al. (2005) review for more detailed information on AMF detection and observation in roots.

Estimation of mycorrhizal colonization

Several methods were developed to estimate mycorrhizal root colonization after staining: counting of infected roots or segments (Johnston 1949; Daft and Nicolson 1966; Mosse and Hayman 1971), calculation of the ratio between arbuscules and hyphae (Johnston 1949), identification of entry points per length of infected roots (Mosse 1959), and recording the extent of colonization (Hayman 1974). In 1966, Newman determined total root length based on a gridline intersection method (Newman 1966) and Sparling and Tinker (1975) applied this method to mycorrhizal roots. According to Giovannetti and Mosse (1980), the gridline intersects method was the most valuable and reproducible method if at least 100 root fragments were analyzed. In France, Trouvelot et al. (1986) developed a method to assess the mycorrhizal colonization rate. However, this method was lengthy and it introduced a subjective factor. Recently, Hu et al. (2020) modified the intersect method, making it faster than any previous methods by removing all subjectivity.

Additionally, a website developed by Mark Brundett in partnership with the Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR) has gathered many techniques for staining as well as mycorrhizal fungi colonization estimation: <https://www.mycorrhizas.info/>.

History of taxonomy: from morpho-anatomical to molecular characterization of AMF

Many researchers like the Tulasne brothers (Tulasne and Tulasne 1844), Fries (1849), Dangeard (1900), Thaxter (1922), and Butler (1939) tried to establish a taxonomic group for “endomycorrhizal fungi,” their groupings may not have been phylogenetically accurate, but they successfully organized disorder. The early taxonomy of AMF was mostly based on spore morphology characterization, but differences in spore morphology that were not recognized led to errors in early species descriptions, generating ambiguities in species delimitation (Stürmer et al. 2021). Subsequent progress was made through the adoption of the wall terminology proposed by Walker (1983). The use of cladistic methods by Morton (1990) was a new step that notably resulted in a change of name from “vesicular–arbuscular mycorrhiza” to “arbuscular mycorrhiza” as he grouped all species of AMF

into a monophyletic clade while noting that not all AMF form vesicles.

In parallel, attempts to culture a single AMF species were unsuccessful for many decades (Janse 1897; Gallaud 1904; Peyronel 1924–1926; Jones 1924; Magrou 1946) before supposed AMF cultures were reported by the group of Lilian Hawker during the 1950s and 1960s (Nicholls 1952; Harrison 1955; Hawker et al. 1957b). Unfortunately, later the fungal strain they had isolated was identified as *Pythium ultimum* (Koide and Mosse 2004). In 1987, Mugnier and Mosse were successful in using Ri-plasmid transformed root cultures to establish arbuscular mycorrhiza in vitro in so-called root organ cultures (ROC) (Mugnier and Mosse 1987). This was a key step for massive and clean production of AMF-propagules, partially overcoming the technological lock imposed by the obligate biotrophy of AMF.

AMF identification through microscopic characterization of hyphae or spores remains limited because it is time-consuming, requires training, and may lead to taxonomy errors and misestimation of mycorrhizal diversity. Consequently, the use of molecular methods has had a major impact in this field. With the advent of the polymerase chain reaction (PCR) technique (Mullis et al. 1986), the gene encoding for the small ribosomal subunit (SSU) was chosen by many for molecular taxonomy, as a large corresponding database was available (Stackebrandt et al. 1981a, b). The first primer specific for arbuscular mycorrhiza – VANS1 (Simon et al. 1993a; 1993b) was based on the SSU-encoding gene. Of interest, the use of SSU-encoding gene was an important step to estimate the origin of endomycorrhizal fungi; Simon et al. (1993a) was the first to estimate the origin of mycorrhizal fungi between 353 and 464 million years ago, and Redecker (2000a) determined the origin of endomycorrhizal fungi at about 460 million years ago using on fossilized fungal hyphae and spores. Unfortunately, these primers were found not to be as specific as originally claimed (Clapp et al. 1999; Schüßler et al. 2001a, b) and not covering the whole Glomeromycota phylum (Clapp et al. 1999; Redecker et al. 2000b).

Multiple primer sets were developed to study AMF; each of them had to combine two opposing characteristics, i.e., a high specificity to Glomeromycota combined with the ability to cover all clades of that phylum. Although SSU-based primers were widely used (Helgason and Fitter 2009; Lee et al. 2008; Öpik et al. 2006), their level of discrimination did not allow for AMF identification at the species level nor the generation of taxon-specific primers. SSU-based specific AMF primers also displayed a high rate of amplification of non-targeted sequences (Alguacil et al. 2011; Kohout et al. 2014; Lumini et al. 2010).

The high variability of the D2 domain of the Glomeromycota LSU was observed across the whole Glomeromycota phylum (van Tuinen et al. 1998a), allowing the development

of taxon-discriminating primers (van Tuinen et al. 1998a) and Glomeromycota-specific primers (FLR3 and FLR4; Gollotte et al. 2004; Trouvelot et al. 1999) amplifying members of all the Glomeromycota families (Brígido et al. 2017; Sánchez-Castro et al. 2017). Taxon-specific primers were successfully designed and used in field experiments (Binet et al. 2017; Farmer et al. 2007; Pivato et al. 2007; van Tuinen et al. 1998a; 1998b). They have been reported to be highly specific for Glomeromycota (Kohout et al. 2014) but amplified some non-Glomeromycota fungi in some highly contaminated soil samples (Sánchez-Castro et al. 2017). New sets of primers were designed to cover the ITS regions as well as the 5' end of the LSU (Krüger et al. 2009). Yet, these primers can generate a high number of chimeric sequences (Kohout et al. 2014) or sequences from the non-Glomeromycota origin (Krüger et al. 2015). A big drawback in using ribosomal encoding genes for the identification of Glomeromycota, is that the Glomeromycota nuclei, harbor several polymorphic copies of the ribosomal operon and that an arbitrary threshold of 3% is used to group ribosomal sequences in a taxa (Öpik et al. 2010). This can lead to conflicting conclusions when diversity experiments are analyzed (Bruns and Taylor 2016; Davison et al. 2015; Öpik et al. 2016).

To overcome these limitations linked to ribosomal polymorphism, other genomic targets have been used to differentiate AMF. Genes encoding the mitochondrial large ribosomal subunit have been shown to be unique in AMF spores (Raab et al. 2005), with a high potential to discriminate among *Rhizophagus irregularis* isolates (Badri et al. 2016) from various geographic regions (Börstler et al. 2008). The large subunit of DNA-dependent RNA polymerase II (RPB1) also was found to be an interesting genomic region for diversity analysis (Stockinger et al. 2014; Tanabe et al. 2002). It has been used to assess AMF communities (Peyret-Guzzon et al. 2016), and to trace a specific AMF inoculum in a desert environment (Thioye et al. 2019).

Numerous scientists have used genomic or mitochondrial ribosomal genes to quantify AMF colonization. Even if genomic ribosomal genes seem to be more often adopted than mitochondrial ones (Voříšková et al. 2017), they do not address the functional activity of mycorrhizal symbiosis. New tools such as amplicon sequencing (Vasar et al. 2017) and digital droplet PCR (Baker et al. 2018) have been used to improve strain identification. Other molecular markers need to be developed to link AMF diversity and functionality. In microbial ecology, the term “functional gene marker” is used as an indicator of a biochemical mechanism (Kowalchuk et al. 2006). Such genes, as markers of specific roles of AMF in ecosystems, encode proteins involved in different metabolic pathways (i.e., photosynthesis, mineral nutrient uptake, and primary metabolism). Detection of their expression through transcriptomics indicates that their functional AMF traits are expressed (Gamper et al. 2010).

Investigating the function of arbuscular mycorrhiza: the mycorrhizologist's "great challenge"

The dawn of DNA-based tools opened the “twenty-first century great challenges” for the mycorrhizologist community, concerning (i) mechanistic – i.e., functional genes for a continuum of interactions through single individual AM fungal clones to community assembly – and (ii) genetic – i.e., asexual, parasexual, or sexual reproductive status of AMF and whether dikaryotic (or even multiple nuclear types within a single thallus are prevalent) – approaches to understanding mycorrhizal associations. The sequencing of the first AMF genome (Tisserant et al. 2013) and the publication of genomic data about *R. irregularis* strains (Ropars et al. 2016) and of gene repertoires of additional AMF species such as *R. clarus* (Sędziewska Toro and Brachmann, 2016), *Gigaspora margarita* (Salvioli et al. 2016), *G. rosea* (Tang et al. 2016), and *Diversispora epigea* (Sun et al. 2019) were major steps toward understanding arbuscular mycorrhiza. The development of powerful methods such as high-resolution microscopy (i.e., arbuscule laser microdissection (Balestrini et al. 2007), volatile organic compound (VOC) analysis (Sun and Tang 2013; Dreher et al. 2019), or metabolic profiling (Bécard et al. 2004; Caser et al. 2019) should allow for in-depth investigations. We also should emphasize the powerful and highly sensitive RNA-Seq profiling technique (Zouari et al. 2014; Mateus et al. 2019) which allows for the analysis of previously unknown genes and offers an endless dynamic range of quantification with low technical variability (Wang et al. 2009). In addition, diminishing costs make RNA-Seq an appealing method for whole-genome expression studies (van Verk et al. 2013).

The future: the arbuscular mycorrhiza as the leader in the myco-rhizosphere?

Place of arbuscular mycorrhiza among plant–microbe association concepts

The development of molecular approaches based on direct DNA extraction has offered unprecedented opportunities to microbiologists, as all pre-molecular-era knowledge of microbial diversity covered less than 1% of the total soil microbiome. DNA-based methods have (i) confirmed previous observations and the low host specificity of AMF, and (ii) opened an unexpectedly wide diversity of AMF that are interacting with plants. AMF diversity in plant roots and soils has been established as one of the key elements of ecosystem functionality; fungal diversity is instrumental in the regulation of plant diversity and in providing many ecosystem services (van der Heijden et al. 1998; Vandenkoornhuysen et al. 2002). Although the presence of DNA in the soil might not reflect the existence

of living AMF at a certain time (because DNA could remain in the soil after an organism's death), it indicates nothing about AMF activity. The possibility of including “relict DNA” in a diversity study could introduce bias when estimating diversity, drawing a network of interactions, and determining hub species with major ecological roles.

Even as the beginning of the twenty-first century witnessed a true cacophony about the place taken by mycorrhizal partners (i.e., a myco-centric versus a phyto-centric view (Fitter et al. 1998)), it was recently demonstrated that mycorrhizal symbiosis is not a stand-alone association. In fact, AMF connects the roots of different plants through CMN (Leake et al. 2004; Wipf et al. 2019), and furthermore, other soil microorganisms play an important role within this symbiotic ecosystem (Garbaye and Bowen 1989, Topical collection of the journal Mycorrhiza <https://link.springer.com/collections/fehfjbjd>). These findings further reinforce the “extended phenotype” concept developed by Dawkins (1978). Dawkins postulated that phenotypes should not always be limited to characteristics of individuals but could be viewed in a group of individuals as “extended phenotypes” or all the effects of a gene on the world. This “extended phenotype” concept has to be linked to the holobiont concept that emerged shortly afterward. The holobiont, a discrete ecological unit, encompasses the host and all associated microorganisms. Although this concept was introduced more than 30 years ago by Lynn Margulis (1991), it remains controversial. Within the holobiont, billions of biochemical and molecular signals are circulated among partners. Some of the signals from microorganisms are known to alter plants in multiple ways.

When one looks at the common symbiotic signaling pathways recently described in plants in which groups of genes/molecules are needed for arbuscular mycorrhizal, rhizobial, and actinobacterial symbiosis, one could argue that AMF are actors randomly recruited just like any others among the diversity of soil microorganisms (Bonfante and Genre 2010; Genre and Russo 2016; Uroz et al. 2019). Nevertheless, that AMF are heterotrophic and can live in symbiosis with about 80% of terrestrial plants suggests that their presence may have a preminent evolutionary role for plant survival and reproduction. In this respect, it is essential to consider that AMF communities associated with plant roots are different in terms of taxonomy and functions, as many factors influence their assembly at small and large-scales. Indeed, only AMF species that are ecologically adapted to their environment and have different niches can coexist in equilibrium communities. Specifically, the coexistence of competing species leads to niche segregation and/or a restricted range of exploited resources (May and MacArthur, 1972; May 1974). However, AMF resource availability may change in space and time depending on ecological gradients (i.e., farming practices, plant physiology) (Collins and Foster 2009; Egerton-Warburton et al. 2007). Knowing that the coexistence of AMF species

implies an ecological cost, a balance between competitiveness and tolerance, generosity outweighed with selfishness, mutualistic behavior enforced with sanctions, makes ecological prediction of the assembly of an AMF community, alone and as part of an holobiont, quite difficult (Werner and Kiers 2015; Chomicki et al. 2020). Thus, in a field, what is the place of the mycorrhizal phenotype when considering a holobiont and its potential extension (i.e., common mycorrhizal networks)? Regardless of the holobiont, the mutualistic properties of mycorrhiza should be analyzed through multilevel selection (Collins and Gibson, 2021) to exploit their benefits, especially when considering the development of sustainable agroecosystems.

Toward successful management of arbuscular mycorrhiza in the field

In the last 50 years, the AMF potential to improve plant growth has led to countless studies in which, using pots with sterile substrates, growth of inoculated versus non-inoculated plants was compared. However, one should also keep in mind that such comparative studies on properties of mycorrhiza may introduce bias when considering some functional traits, e.g., C allocation to AMF differs among species (Grman 2012), and hydraulic properties are different between mycorrhizal and non-mycorrhizal soils (Pauwels et al. 2020). In regard to the current paradigm shift toward maximally sustainable agriculture, microbial inoculum companies have been popping up everywhere (Waltz 2017) and many mycorrhiza-related patents have been registered (Srivasta et al. 2021). As an illustration, in Europe, the number of companies producing AMF inocula increased by 650% from the late 1990s until 2017 (from fewer than 10 companies in 1990 to more than 75 in 2017; Chen et al. 2018; Jack et al. 2020). However, more than 75% of mycorrhizal-based inoculants are based on four dominant species of Glomeraceae: *R. irregularis*, *F. mosseae*, *Claroideoglomus etunicatum*, and *R. clarus* (Basiru et al. 2021). Nevertheless, pursuing the optimization of in vitro culture and inoculum production is necessary for both researchers and mycorrhiza inoculum producers. Nevertheless, it will require overcoming several technological blocks, e.g., (i) currently only very few AMF among the more than 300 identified species are culturable in vitro (Stockinger et al. 2014) and (ii) new techniques increasing quality and decreasing production costs must be developed (Menge 1985; Furlan 1993; Singh and Tilak 2002; Adholeya 2005).

The next essential arising question concerns the impact of AMF inoculation on a mycorrhizal community and by extension on the holobiont. Little is known about the survival of specific AMF inoculum in the soil as well as its impact on an indigenous AMF community (Schlaeppli

et al. 2016; Hart et al. 2017; Islam et al. 2021). While some recent studies such as that by Renaut et al. (2020) report that inoculation with an AMF (namely *Rhizophagus irregularis* DAOM 197,198) does not change the indigenous AMF community composition, others such as that by Islam et al. (2021) report that inoculation resulted in an alteration of the indigenous community after 1 or 3 cropping seasons. Moreover, as most of the demonstrations of a beneficial effect of AMF on plant production have been obtained in pots, expecting consistent increases in crop yield from the introduction of specific AMF species into a pre-established AMF community could be “utterly simplistic” (Rodriguez and Sanders 2015). Moreover, natural and many anthropogenic ecosystems in which crops presently are being cultivated already contain an extraordinary AMF diversity, and most crops (except in highly degraded soils) naturally become colonized by AMF independently from any inoculation. These statements raise the questions of (i) the real efficiency of AMF inoculation (and in particular the spread of the few available strains) in any ecosystem without considering cooperative and selfish traits of both plant and fungal partners, and (ii) the practice of inoculation as an agroecological solution to enhanced AMF communities. Addressing these questions through the understanding of both the ecology and the population biology of AMF, and more widely, microbial ecology is a prerequisite to develop AMF inoculation strategies. Besides the necessary increase of knowledge of AMF inoculation and its consequences, a critical point for integrating ecosystem services provided by AMF is the necessity to develop crop management strategies that optimize those services through mimicking natural processes (Janos 1988; Gianinazzi et al. 2010). Plant breeding strategies affecting responsiveness to mycorrhizas are not yet fully resolved (Sawers 2010). Plant selection under high-nutrient conditions while totally ignoring ecosystem services provided by beneficial microorganisms likely selects plant genotypes poorly receptive or nonreceptive to mycorrhiza (Hetrick et al. 1993; Toth et al. 1990; Zhu et al. 2001; Gianinazzi et al. 2010).

Considered overall, great progress has been made in understanding the arbuscular mycorrhiza since pioneer works, but there still are considerable gaps of knowledge needed for optimizing agroecosystem services associated with AMF. In addition, the costs of routine and adequate AMF management within a farm should be budgeted and should lead, ideally, to improved (but also stabilized) yields, and therefore farmers' profits. Filling these gaps is a major challenge for the present and future generations of mycorrhizologists, to continue this exciting, tumultuous, and controversial story of arbuscular mycorrhiza inherited from our forefathers.

Acknowledgements We are grateful to Professor Sakamoto from the Institute of Plant Science (Okayama University) for providing Asai's articles and to Jean Garbaye, Roger Koide, François Letacon and Randy Molina for helpful discussions and providing old sources. We also are thankful to Christine Arnould and to the "Plateforme DIMaCell" (Dispositif Inter-régional d'Imagerie Cellulaire Bourgogne Franche Comté) for their help with microscopic observations. We also thank Roger Koide and Jean Garbaye for critical reading of the manuscript. We also thank Gilles Bailly from the National Botanical Conservatory of Franche-Comté for his help with *Pellia epiphylla* hunting. We dedicate this paper to all mycorrhizologists whose hard work helped building and assembling pieces of the so exciting mycorrhiza story.

Funding The authors acknowledge the financial support provided by the funding bodies within the H2020 ERA-net project, CORE Organic Cofund, and with cofunds from the European Commission (BIOVINE project), by the Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté (PUMPER project) and by the "Itinéraire Chercheurs Entrepreneurs" grant from Université Bourgogne Franche-Comté/Région Bourgogne Franche-Comté.

References

- Adholeya A, Tiwari P, Singh R (2005) Large-scale inoculum production of arbuscular mycorrhizal fungi on root organs and inoculation strategies. In: Declerck S, Fortin JA, Strullu D-G, eds. *Soil Biology. In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Berlin, Heidelberg: Springer, 315–338
- Alguacil MM, Torrecillas E, Lozano Z, Roldan A (2011) Evidence of differences between the communities of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing galls and roots of *Prunus persica* infected by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Environ Microbiol* 77:8656–8661
- Anton de Bary H (1879) *Die Erscheinung der Symbiose*. Trübner, Strasbourg
- Asai T (1934) Über das Vorkommen und die Bedeutung der Wurzelpilze in den Landpflanzen. *Japanese J Botany* 7:107–150
- Asai T (1942) Die Bedeutung der mycorrhiza für das Pflanzenleben. *Japanese J Botany* 12:359–436
- Badri A, Stefani FOP, Lachance G, Roy-Arcand L, Beaudet D, Vialle A, Hijri M (2016) Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza* 26:721–733
- Bago B, Pfeffer P, Abubaker J, Jun J, Allen J, Brouillette J et al (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol* 131:1496–1507
- Bago B, Zipfel W, Williams R, Jun J, Arreola R, Lammers P et al (2002) Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* 128:108–124
- Baker C, Steel D, Nieukirk S, Klinck H (2018) Environmental DNA (eDNA) from the wake of the whales: droplet digital PCR for detection and species identification. *Front Mar Sci* 5:133
- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Mol. Plant Microbe Interact* 20:1055–1062
- Basiru S, Mwanza H (2021) Hijri M (2021) Analysis of arbuscular mycorrhizal fungal inoculant benchmarks. *Microorganisms* 9:81
- Baylis GTS (1959) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the growth of *Griselinia littoralis* (Cornaceae). *New Phytol* 58:274–280
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C (2004) Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot* 82:1186–1197
- Bevege DI (1968) A rapid technique for clearing tannins and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone* spp., and some records of infection in Australasian plants. *Trans Br Mycol Soc* 51:808–810
- Binet MN, van Tuinen D, Souard F, Sage L, Pérignon S, Gallet C, Legay N, Lavorel S, Mouhamadou B (2017) Responses of above- and below-ground fungal symbionts to cessation of mowing in subalpine grassland. *Fungal Ecol* 25:14–21
- Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 1:48
- Bonfante P (1991) *Biologia delle micorrize nel Centro di Studio sulla Micologia: il passato, il presente e il futuro*. In: *Estratto da Funghi*. CNR, Torino, Google Scholar: *Piante e Suolo. Quarant'anni di ricerche del Centro di Studio sulla Micologia del Terreno nel centenario della nascita del suo fondatore Beniamino Peyronel*. Centro di Studio sulla Micologia del Terreno, 135–156
- Bonfante-Fasolo P, Faccio A, Perotto S, Schubert A (1990) Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol Res* 94:157–165
- Bonfante-Fasolo P, Scannerini S (1992) The cellular basis of plant fungus interchanges in mycorrhizal associations. In: Allen MF (ed) *Mycorrhizal functioning—an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, New York, pp 65–101
- Börstler B, Raab P, Thiéry O, Morton J, Redecker D (2008) Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytol* 180:452–465
- Boudier E (1876) Du parasitisme probable de quelques espèces du genre *Elaphomyces* Et De La Recherche De Ces Tubercés., *Bulletin de la Société Botanique de France*, Tome 23 - Fascicule 1, Compte rendus des séances. 115–119
- Bowen G, Rovira A (1968) The influence of micro-organisms on growth and metabolism on plant roots. In: Wittington WJ (ed) *Root growth*. Butterworth, London, Google Scholar, pp 170–199
- Brígido C, van Tuinen D, Brito I, Alho L, Goss MJ, Carvalho M (2017) Management of the biological diversity of AM fungi by combination of host plant succession and integrity of extraradical mycelium. *Soil Biol Biochem* 112:237–247
- Bruchmann H (1874) Wachstum der Wurzeln von *Lycopodium* und *Isoetes*. *Z Naturwiss* 8:522–580
- Bruges A (1936) On the significance of mycorrhiza. *New Phytol* 35:117–131
- Brundrett M, Piché Y, Peterson R (1984) A new method for observing the morphology of vesicular–arbuscular mycorrhizae. *Can J Bot* 62:2128–2134
- Bruns TD, Taylor JW (2016) Comment on “Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism”. *Science*, 351(6275):826–826
- Butler E (1939) The occurrences and systematic position of the vesicular-arbuscular type of mycorrhizal fungi. *Trans Br Mycol Soc* 22:274–301
- Caser M, Chitarra W, D'Angiolillo F, Perrone I, Demasi S, Lovisolo C, Pistelli L, Pistelli L, Scariot V (2019) Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Ind Crops Prod* 129:85–96
- Chen M, Arato M, Borghi L, Nouri E, Reinhardt D (2018) Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application front. *Plant Sci.*, 9

- Chomicki G, Werner G, West S, Kiers E (2020) Compartmentalization drives the evolution of symbiotic cooperation. *Philos Trans R Soc B* 375(1808):20190602
- Clapp J, Fitter A, Young J (1999) Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Mol Ecol* 8:915–921
- Collins CD, Foster BL (2009) Community-level consequences of mycorrhizae depend on phosphorus availability. *Ecology* 90(9):2567–2576
- Cox G (1975) Ultrastructural evidence relating to host-entophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: Sanders FE, Mosse B, Tinker PB (eds) *Endomycorrhizas*, Proceedings of a Symposium held at the University of Leeds. Academic Press, London.
- Cox G, Tinker P (1976) Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas *New Phytol* 77:371–378
- Curtis W, Hooker W (1828) *Flora Iodinensis* Londo
- Daft M, Nicolson T (1966) Effect of endogone mycorrhiza on plant growth. *New Phytologist* 65:342–350
- Dangeard PA (1896) Une maladie du peuplier dans l'ouest de la France. *Botaniste* 58:38–43
- Dangeard P (1900) Le Rhizophagus Populinus *Botaniste* 7:285–287
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adhoveya A, Ainsaar L, Bâ A et al (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349(6251):970–973
- Dawkins R (1978) Replicator selection and the extended phenotype. *Z Tierpsychol* 47:61–76
- Diagne N, Escoute J, Lartaud M, Verdeil JL, Franche C, Kane A, Bogusz D, Diouf D, Duponnois R, Svistoonoff S (2011) Uvitex2B: a rapid and efficient stain for detection of arbuscular mycorrhizal fungi within plant roots. *Mycorrhiza* 21:315–321
- Dickson S, Smith FA, Smith SE (2007) Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* 17:375–393
- Daft MJ, Nicolson TH (1969) Effect of endogone mycorrhiza on plant growth: II. Influence of soluble phosphate on endophyte and host in maize. *New Phytologist* 68(4):945–952. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01053-2952>
- Dreher D, Baldermann S, Schreiner M, Hause B (2019) An arbuscular mycorrhizal fungus and a root pathogen induce different volatiles emitted by *Medicago truncatula* roots. *J Adv Res* 19:85–90
- Durall D, Todd A, Trappe J (1994) Decomposition of ¹⁴C-labelled substrates by ectomycorrhizal fungi in association with Douglas fir. *New Phytol* 127:725–729
- Egerton-Warburton LM, Johnson NC, Allen EB (2007) Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecol Monogr* 77(4):527–544
- Farmer M, Li X, Feng G, Zhao B, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2007) Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Appl Soil Ecol* 35:599–609
- Fitter A, Graves J, Watkins N, Robinson D, Scrimgeour C (1998) Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Funct Ecol* 12:406–412
- Frank A (1877) Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beiträge Zur Biologie Der Pflanzen* 2:123–200
- Frank A (1885) Über Die Auf Wurzelsymbiose Beruhende Ernährung Gewisser Bäume Durch Unterirdische Pilze 3:128–145
- Frank A (1887) Über Neue Mycorrhiza-Formen 5:395–409
- Frank A (1894) Die Bedeutung der Mykorrhiza für die gemeine Kiefer. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 38:185–190
- Fries E (1832) *Systema mycologicum: sistens fungorum ordines, genera et species, hucusque cognitatas, quas ad normam methodi naturalis determinavit*. Vol. III, Lundae: Ex Officina Berlingiana
- Fries E (1849) *Summa Vegetabilium Scandinaveae* 2:261–572
- Furlan V (1993) Large scale application of endomycorrhizal fungi and technology transfer to the farmer. In: Schelkle M, ed. Peterson L. 9th NACOM, Guelph, Ontario, Canada
- Gallaud I (1904) Etude sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev Gen Bot*, pp 5–500
- Gamper HA, van der Heijden MG, Kowalchuk GA (2010) Molecular trait indicators: moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology *New Phytol* 185 1 67 82
- Garbaye J, Bowen GD (1989) Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytol* 112:383–388
- Garcia K, Doidy J, Zimmermann S, Wipf D, Courty P-E (2016) Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends Plant Sci* 21:937–950
- Gasparrini G (1856) *Ricerche sulla natura dei succiatori la escrezione delle radici*. G. Dura, Napoli
- Genre A, Russo G (2016) Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions?. *Frontiers in Plant science* 7:96
- Gerdemann JW (1955) Relation of a large soil-borne spore to phycomycetous mycorrhizal infections. *Mycol* 7:619–632
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Dexheimer J (1979) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected with *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.). *New Phytol* 82: 127–32
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530
- Gibelli G (1883) *Nuovi studi sulla malattia del Castagno detta dell'inchiostrato*. *Memorie della Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna*
- Gilmore A (1971) Influence of endotrophic mycorrhizae on the growth of peach seedlings. *Amer Soc Hort Sci J* 96:35–38
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84:489–500
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14:111–117
- Grman E (2012) Plant species differ in their ability to reduce allocation to non-beneficial arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 93(4):711–718
- Hacsckaylo E (2017) The Melin school: a personal memoir by Edward Hacsckaylo. *Mycorrhiza* 27:75–80
- Harley J, Smith S (1983) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, New York
- Harrison R (1955) A method of isolating vesicular-arbuscular endophytes from roots. *Nature* 175:432
- Harrison M, Dewbre G, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14:2413–2429
- Hart M, Antunes P, Chaudhary V, Abbott L (2017) Fungal inoculants in the field: is the reward greater than the risk? *Functional Ecology*, 1–10
- Hartig T (1840) *Luft-, Boden- und Pflanzenkunde in ihrer Anwendung auf Forstwirtschaft und Gartenbau: für alle Freunde und Pfleger der wissenschaftlichen Botanik*, Vol. I, 11th edn. Cotta, Stuttgart
- Hartig R (1888) *Die pflanzlichen Wurzelparasiten*. *Allgemeine Forst Und Jagdzeitung Journal* 64:118–123
- Hatch A (1937) The physical basis of mycotrophy in *Pinus*. *The Black Rock Forest* 6:1–168
- Hawker L, Ham A (1957) Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas in Apple Seedlings. *Nature* 180:998–999

- Hawker LE, Harrison RW, Nicholls VO, Ham AM (1957) Studies on vesicular-arbuscular endophytes. I. A strain of *Pythium ultimum* Trow. In roots of *Allium ursinum* L. and other plants. *Trans Br Mycol Soc* 40:375–390
- Hayman D (1974) Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol* 73:71–80
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011) A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23(10):3812–3823
- Helgason T, Fitter AH (2009) Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *J Exp Bot* 60:2465–2480
- Herr JM (1971) A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Am J Bot* 58:785–790
- Herr JM (1974) A clearing squash technique for the study of the ovule and megagametophyte development in angiosperms. In: Radford AE, Dickinson C, Massey JR, Bell CR (eds) *Vascular plant systematics*. Harper and Row, New York, pp 230–235
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS (1993) Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors - a synthesis. *Can J Bot* 71:512–518
- Hesselman H (1900) Om mykorrhizabildningar hos arktiska växter. Bihang till Svenska Vetenskaps Akademiens Handlingar 26:1–46
- Hildebrand AA, Koch LW (1936) A microscopical study of the infection of the roots of strawberry and tobacco seedlings by microorganisms of the soil. *Can J Res* 14:11–26
- Holevas CD (1966) The effect of a vesicular-arbuscular mycorrhiza on the uptake of soil phosphorus by strawberry (*Fragaria* sp. var. Cambridge Favourite). *Hortic Sci* 41:57–64
- Horisberger M, Vonlanthen M (1980) Ultrastructural localization of soybean agglutinin on thin sections of Glycine max (soybean) var. Altona by the Gold Method Histochemistry 65:181–186
- Hu W, Pan L, Chen H, Tang M (2020) VBA-AMF: a VBA program based on the magnified intersections method for quantitative recording of root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Indian Journal of Microbiology* 60:374–378
- Islam M, Germida J, Walley F (2021) Survival of a commercial AM fungal inoculant and its impact on indigenous AM fungal communities in field soils. *Applied Soil Ecology*, 166
- Jack C, Petipas R, Cheeke T, Rowland J, Friesen M (2020) Microbial inoculants: silver bullet or microbial Jurassic Park? *Trends Microbiol* 29:299–308
- Jakobsen I, Rosendahl L (1990) Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol* 115(1):77–83
- Jakobsen I, Abbott L, Robson A (1992) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol* 120:371–380
- Janes B (1962) Leaf-clearing technique to assist fungal spore germination counts. *Nature* 193:1099–1100
- Janse J (1897) Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. *Ann Jard Bot Buitenzorg* 14:53–201
- Janos D (1988) Mycorrhiza applications in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate? Pages 133–188 in F. S. P. Ng, editor. *Trees and Mycorrhiza*, Forest Research Institute, Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Johnston A (1949) Vesicular-arbuscular mycorrhiza in sea island cotton and other tropical plants. *Trop Agric* 26:118–121
- Johnson NC, Gibson KS (2021) Understanding multilevel selection may facilitate management of arbuscular mycorrhizae in sustainable agroecosystems. *Front Plant Sci* 11:627345. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.627345>
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *The New Phytologist* 135(4):575–585
- Jones F (1924) A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *J Agric Res* 29:459–470
- Kamiensky F (1882) Les organes végétatifs du *Monotropa hypopitys* L. *Extrait Des Mémoires De La Société Nationale Des Sciences Naturelles Et Mathématiques De Cherbourg* 24:5–40
- Kelley A (1932) The literature of mycorrhizae. U.S. Dept. Agr. Library, Washington DC pp 1–948
- Kessel SL (1927) Soil Organisms. The dependence of certain pine species on a biological soil factor. *Emp for J* 6:70–74
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E et al (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333:880–882
- Koch LW (1935) Recent investigations on tobacco root rot in Canada. *Can J for Res* 13:174–186
- Kohout P, Sudová R, Janoušková M, Čtvrtlíková M, Hejda M, Pánková H, Slavíková R, Štajerová K, Vosátka M, Sykorová Z (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: is there a universal solution? *Soil Biol Biochem* 68:482–493
- Koide R, Mosse B (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145–163
- Konvalinková T, Püschel D, Janoušková M, Gryndler M, Jansa J (2015) Duration and intensity of shade differentially affects mycorrhizal growth- and phosphorus uptake responses of *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* 6:65
- Konvalinková T, Jansa J (2016) Lights off for arbuscular mycorrhiza: on its symbiotic functioning under light deprivation. *Front Plant Sci* 7:782
- Kowalchuk GA, Drigo B, Yergeau E, van Veen JA (2006) Assessing bacterial and fungal community structure in soil using ribosomal RNA and other structural gene markers. In: Nannipieri P, Smalla K, eds. *Soil biology: nucleic acids and proteins in soil*. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 8: 159–188.
- Kough J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1987) Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytol* 106:707–715
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schübler A (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 183:212–223
- Krüger M, Teste FP, Laliberté E, Lambers H, Coghlan M, Zemunik G, Bunce M (2015) The rise and fall of arbuscular mycorrhizal fungal diversity during ecosystem retrogression. *Mol* 24:4912–4930
- Leake J, Johnson D, Donnelly D, Muckle G, Boddy L, Read D (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can J Bot* 82:1016–1045
- Lee J, Lee S, Young JPW (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecology* 65:339–349
- Lohman M (1927) Occurrence of mycorrhiza in Iowa forest plants. Dissertation, University of Iowa Studies in Natural History
- Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, Bonfante P, Bianciotto V (2010) Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ Microbiology* 12:2165–2179
- Macdonald R, Lewis M (1978) The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol* 80:135–141
- Magrou J (1946) Sur la culture de quelques champignons de mycorrhizes à arbuscules et à vésicules. *Rev Gen Bot* 53:49–77
- Margulis L, Fester R (1991) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT Press

- Masui K (1927) A study of the ectotrophic mycorrhizas of woody plants. Dissertation. University of Kyoto Ser B 3:149–279
- Mateus I, Masclaux F, Aletti C, Rojas E, Savary R, Dupuis C, Sanders I (2019) Dual RNA-seq reveals large-scale non-conserved genotype \times genotype-specific genetic reprogramming and molecular crosstalk in the mycorrhizal symbiosis. *ISME J* 13:1226–1238
- May RM (1974) On the theory of niche overlap. *Theor Popul Biol* 5:297–332
- May RM, MacArthur RH (1972) Niche overlap as a function of environmental variability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69:1109–1113
- McArdle R (1932) The relation of mycorrhizae to conifer seedlings. *J Agric Res* 44:287–316
- McDougall W (1922) Mycorrhizas of Coniferous Trees *J for* 20:255–260
- Melin E (1917) Studier over de Norrlandska Myrmarkernas vegetation: Med Sarskild Hansyn Till Deras skogsvegetation efter torrlaggnig. Uppsala Akademia Avh, Sweden
- Melin E (1923) Experimentelle untersuchungen über die Konstitution and ökologie der Mykorrhizen von Pinus sylvestris und Picea abies. *Mykologia Unterschied Ber Von R Falk* 2:2–331
- Melin E (1924) Über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Virulenz der Wurzelpilze von Kiefer und Fichte. *Botaniska Notiser*, pp 38–48
- Melin E (1925) Untersuchungen über die Bedeutung Der Baummykorrhiza. G. Fischer, Jena, 152 pp
- Melin E (1927) Studier iiver Barrtradsplantans utveckling i rahumus. (Meddel. f. staten-s Skogsförskningsanst 23:433–494, fig. 1–26, tab. 1–5.)
- Melin E, Nilsson H (1950) Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiol Plant* 3:88–92
- Melin E, Nilsson H (1957) Transport of C14-labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. *Sven Bot Tidskr* 51:166–186
- Menge JA (1985) Developing widescale VA mycorrhizal inoculations: is it practical or necessary? In: Molina R, ed. *Proceedings of the 6th North American conference on Mycorrhizae*. Oregon State University, Corvallis, Oregon
- Morton J (1990) Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82:192–207
- Mosse B (1953) Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. *Nature* 171:974–974
- Mosse B (1956) Fructifications of an endogone species causing endotrophic mycorrhiza in fruit plants. *Ann Bot* 20:349–362
- Mosse B (1957) Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. *Nature* 179:922
- Mosse B (1959) Observations on the extramatrical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Trans Br Mycol Soc* 42:439–448
- Mosse B, Hayman D (1971) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol* 70:29–34
- Mugnier J, Mosse B (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77:1045–1050
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51(Pt 1):263–273
- Newman EI (1966) A method of estimating the total length of root in a sample. *The Journal of Applied Ecology* 3:139
- Nicholls VO (1952) Studies on the association between certain soil fungi and the roots of some members of the Liliiflorae. PhD dissertation, Department of Botany, University of Bristol
- Nicolson T (1959) Mycorrhizae in the Graminae. I. Vesicular arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Trans Br Mycol Soc* 42:421–438
- Nicolson T, Gerdemann J (1968) Mycorrhizal endogone species. *Mycologia* 60:313–325
- Olsson PA, Rahm J, Aliasgharzarad N (2010) Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiol Ecol* 72(1):125–131
- O'Brien D, McNaughton E (1928) Endotrophic mycorrhiza of strawberries and its significance. *Research Bulletin - West of Scotland Agricultural College* 1:1–32
- Öpik M, Davison J, Moora M, Pärtel M, Zobel M (2016) Response to comment on “global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism.” *Science* 351:826–826
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *J Ecol* 94:778–790
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM et al (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188(1):223–241
- Paulson R (1924) Tree mycorrhiza. *Trans Br Mycol Soc* 9:213–218
- Pauwels R, Jansa J, Püschel D et al (2020) Root growth and presence of *Rhizophagus irregularis* distinctly alter substrate hydraulic properties in a model system with *Medicago truncatula*. *Plant Soil* 457:131–151
- Pessin LJ (1928) Mycorrhiza of Southern pines. *Ecology* 9:28–33
- Peyret-Guzzon M, Stockinger H, Bouffaud M, Farcy P, Wipf D, Redecker D (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations shift in response to short-term ploughing and fertilisation in a buffer strip. *Mycorrhiza* 26:33–46
- Peyronel B (1923) Fructification de l'endophyte à arbuscules et à vesicules des mycorrhizes endotrophes. *Bulletin De La Société Mycologique De France* 39:119–126
- Peyronel B (1924) Specie di “Endogone” produttrici di micorrize endotrofiche. *Boll Staz Patol Veg Roma* 5:73–75
- Peyronel B (1937) Le “Endogone” quasi produttrici di micorrize endotrofiche nelle Fanerogame alpestri. *Nuovo Giornale Botanico Italiano N S* 44:584–586
- Peyronel B (1940) Prime osservazioni sui rapporti traluce e simbiosi micorrizica. *Annuaire Lab* 4:3–19
- Peyronel B (1950) L'étude des mycorrhizes par l'observation directe. *Proceedings of the Seventh International Botanical Congress, Stockholm* 1950:436–438
- Pfeffer W (1877) Ueber fleischfressende Pflanzen und über die Ernährung durch Aufnahme organischer Stoffe überhaupt. *Landwirtschaftl Jahrbuch* 6:969–998
- Pfeffer P, Douds D Jr, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120:587–598
- Phillips J, Hayman D (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–161
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C, van Tuinen D (2007) *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytol* 176:197–210
- Raab PA, Brennwald A, Redecker D (2005) Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). *Mycol Res* 109:1315–1322
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414:462–470
- Read D (1987) In support of Frank's organic nitrogen theory. *Angew Bot* 61:25–37
- Redecker D (2000a) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10(2):73–80

- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289(5486):1920–1921
- Reess M (1880) Ueber den Parasitismus von *Elaphomyces granulatus*. (Sitz.-ber. d. phys. med. Soc. z. Erlangen. 12 Heft. p. 103–107)
- Renaut S, Daoud R, Masse JV, Hijri AM (2020) Inoculation with *Rhizophagus Irregularis* does not alter arbuscular mycorrhizal fungal community structure within the roots of corn, wheat, and soybean crops. *Microorganisms* 8:83
- Richards B (1965) Mycorrhiza development of loblolly pine seedlings in relation to soil reaction and the supply of nitrate. *Plant Soil* 22:187–199
- Ritz K, Newman E (1985) Evidence for rapid cycling of phosphorus from dying roots to living plants. *Oikos* 45:174–180
- Rodriguez A, Sanders I (2015) The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J* 9:1053–1061
- Ropars J, Toro K, Noel J, Pelin A, Charron P, Farinelli L, Marton T, Krüger M, Fuchs J, Brachmann A et al (2016) Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat Microbiol* 1:16033
- Ross JP, Harper JA (1970) Effect of Endogone mycorrhiza on soybean yields. *Phytopathology* 60:1552–1556
- Salvioli A, Ghignone S, Novero M, Navazio L, Venice F, Bagnaresi P, Bonfante P (2016) Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME J* 10:130–144
- Samuel G (1926) Note on the distribution of mycorrhiza. *Transactions, Proceedings and Reports of the Royal Society of South Australia* 50:245–246
- Sánchez-Castro I, Gianinazzi-Pearson V, Cleyet-Marel JC, Baudoin E, van Tuinen D (2017) Glomeromycota communities survive extreme levels of metal toxicity in an orphan mining site. *Sci Total Environ* 598:121–128
- Sanders F, Mosse B, Tinker PB (1975) Endomycorrhizas. *Proceedings of a symposium held at the University of Leeds, 22–25 July 1974*. Academic Press, London
- Sanders F, Tinker PB (1971) Mechanism of absorption of phosphate from soil by Endogone mycorrhizas. *Nature* 233:278–279
- Sarauw G (1893) Ueber die Mykorrhizen unserer Waldbäume. *Botanisches Centralblatt Kassel* 53:343–345
- Sawers R, Gebreselassie M, Janos D, Paszkowski U (2010) Characterizing variation in mycorrhiza effect among diverse plant varieties. *Theor Appl Genet* 120 1029 1039
- Schacht H (1853) *Der Baum Studien über Bau und Leben der höheren Gewächse Berlin*
- Schacht H (1854) Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Gewächse. IV. Zur Entwicklungsgeschichte der *Monotropa Hypopitys* L., (p. 54–64, fig. 5.) VIII. Über die Fortpflanzung der deutschen Orchideen durch Knospen (p. 115–147, fig. 7–8.)
- Schlaeppi K, Bender SF, Mascher F, Russo G, Patrignani A, Camenzind T, Hempel S, Rillig M, Heijden M (2016) High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 212:780–791
- Schlicht A (1889) Beitrag zur Kenntniss der Verbreitung und Bedeutung der Mycorrhizen. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 18:478–506
- Schüßler A, Gehrig H, Schwarzott D, Walker C (2001a) Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol Res* 105:5–15
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001b) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105:1413–1421
- Schwendener S (1869) Die Flechten als Parasiten der Algen. *Verhandlungen Der Schweizerische Naturforschenden Gesellschaft Basel* 5:527–550
- Sędziewska Toro K, Brachmann A (2016) The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics* 17:101
- Shachar-Hill Y, Pfeffer P, Douds D, Osman S, Doner L, Ratcliffe R (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol* 108:7–15
- Simard SW, Durall DM (2004) Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Can J Bot* 82(8):1140–1165
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993a) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67–69
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M (1993b) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59:4211–4215
- Singh G, Tilak K (2002) Techniques of AM fungus inoculum production. In: Mukerji KG, Manoharachary C, Chamola BP, eds. *Techniques in mycorrhizal studies*. Dordrecht: Springer Netherlands, 273–283
- Slankis V (1948) Einfluss von Exudaten von *Boletus variegatus* auf die dichotomische Verzweigung isolierter Kiefernurzeln. *Physiol Plant* 1:390–400
- Slankis V (1949) Wirkung von fl-Indolylessigsäure auf die dichotomische Verzweigung isolierter Wurzeln von *Pinus sylvestris*. *Sven Bot Tidskr* 43:603
- Smith S, Read D (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press
- Smith S, Read D (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press
- Smith SE, Smith FA (1990) Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol* 114:1–38
- Smith FA, Smith SE (2013) How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant and Soil* 363(1):7–18
- Smith SE, Smith F A, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162(2):511–524
- Sparling GP, Tinker PB (1975) Mycorrhizas in Pennine grassland. In: Sanders FET, Mosse B, Tinker (eds) *PBH Endomycorrhizas*, Academic Press, London, pp 545–560
- Srivastava S, Johny L, Adholeya A (2021) Review of patents for agricultural use of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 1–10
- Stackebrandt E, Ludwig W, Schleifer KH, Gross HJ (1981a) Rapid cataloging of ribonuclease T1 resistant oligonucleotides from ribosomal RNAs for phylogenetic studies. *J Mol Evol* 17:227–236
- Stackebrandt E, Woese CR (1981b) Molecular and cellular aspects of microbial evolution, in: Collins, M.J., Moseley, B.E.B. (Eds.). *Cambridge*, pp. 1–31
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, Bouffaud ML, Redecker D (2014) The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS ONE* 9:e107783–e107811
- Stebbins GL (1938) A bleaching and clearing method for plant tissues. *Science* 87:21–22
- Stürmer S, Bever J, Schultz P et al (2021) Celebrating INVAM: 35 years of the largest living culture collection of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 31:117–126
- Sun X, Chen W, Ivanov S, MacLean AM, Wight H, Ramaraj T, Mudge et al (2019) Genome and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungus *Diversispora epigaea* (formerly *Glomus versiforme*) and its bacterial endosymbionts. *New Phytol* 221:1556–1573
- Sun X-G, Tang M (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on root traits and root volatile organic compound emissions of *Sorghum bicolor*. *S Afr J Bot* 88:373–379
- Tanabe Y, Watanabe MM, Sugiyama J (2002) Are microsporidia really related to fungi?: a reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi. *Mycol Res* 106:1380–1391

- Tang N, San Clemente H, Roy S, Bécard G, Zhao B, Roux C (2016) A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. *Front Microbiol* 7:233
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R et al (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110:20117–20122
- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Gollotte A (1993) In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol Res* 97:245–250
- Thaxter R (1922) A revision of the Endogoneae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 57:292–348
- Thioye B, Redecker D, van Tuinen D, Kane A, de Faria S, Fall D, Sanogo D et al (2019) Tracing *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 in *Ziziphus mauritiana* roots under field conditions. *Mycorrhiza* 29:77–83
- Toth R, Toth D, Starke D, Smith D (1990) Vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization in *Zea mays* affected by breeding for resistance to fungal pathogens. *Can J Bot* 68:1039–1044
- Trappe J (2005a) A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15:277–281
- Trappe J (2005b) On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15:267–275
- Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux JA (2005) Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Appl Environ Microbiol* 71:5341–5347
- Trouvelot A, Kough J, Gianinazzi-Pearson V (1986) Estimation of vesicular arbuscular mycorrhizal infection levels. Research for methods having a functional significance. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 217–222
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8(4):203–206
- Tulasne L, Tulasne C (1844) *Fungi nonnulli hipogaei, novi v. minus cogniti auct.* *G Bot Ital* 2:55–63
- Ulrich J (1960) Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiol Plant* 13:429–443
- Uroz S, Courty PE, Oger P (2019) Plant symbionts are engineers of the plant-associated microbiome. *Trends Plant Sci* 24:905–916
- van Aarle I, Olsson P, Söderström B (2001) Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia* 93:17–24
- van Beneden P (1875) *Les commensaux et les parasites dans le règne animal*. Baillière, Paris
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998a) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7:879–887
- van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V (1998b) PCR in studies of am fungi: from primers to application. *mycorrhiza manual*. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 387–400
- van Verk M, Hickman R, Pieterse C, van Wees S (2013) RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends Plant Sci* 18:175–179
- Vandenkoornhuyse P, Husband R, Daniell TJ, Watson IJ, Duck JM, Fitter AH, Young JPW (2002) Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol Ecol* 11:1555–1564
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piché Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 64:5004–5007
- Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M (2005) An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol Plant* 125:393–404
- Vittadini C (1842) *Monographia Lyperdineorum. Monographia Lycoperdineorum. Augustae Taurinorum, Torino Ser. 2, 5: 145-237*
- Voříšková A, Jansa J, Püschel D, Krüger M, Cajthaml T, Vosátka M, Janoušková M (2017) Real-time PCR quantification of arbuscular mycorrhizal fungi: does the use of nuclear or mitochondrial markers make a difference? *Mycorrhiza* 27:577–589
- Walder F, Brulé D, Koegel S, Wiemken A, Boller T, Courty PE (2015) Plant phosphorus acquisition in a common mycorrhizal network: regulation of phosphate transporter genes of the Pht1 family in sorghum and flax. *New Phytol* 205(4):1632–1645
- Walker C (1983) Taxonomic concepts in the Endogonaceae: Spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 18:443–455
- Waltz E (2017) A new crop of microbe startups raises big bucks, takes on the establishment *Nat. Biotechnol* 35(2017):1120–1122
- Wang E, Schornack S, Marsh JF, Gobbato E, Schwessinger B, Eastmond P et al (2012) A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr Biol* 22(23):2242–2246
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics* 10(1):57–63
- Werner G, Kiers E (2015) Partner selection in the mycorrhizal mutualism. *New Phytol* 205(4):1437–1442
- Wipf D, Krajinski F, van Tuinen D, Recorbet G, Courty P-E (2019) Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytol* 223:1127–1142
- Woolhouse H (1975) Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements and the regulation of endotrophic mycorrhizal associations. In *Endomycorrhizas*. Eds. F E Sanders, B Mosse and P B Tinker. pp 209–240. Academic Press, London
- Zhu Y, Smith S, Barritt A, Smith F (2001) Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant Soil* 237:249–255
- Zouari I, Salvioli A, Chialva M, Novero M, Miozzi L, Tenore GC, Bagnaresi P, Bonfante P (2014) From root to fruit: RNA-Seq analysis shows that arbuscular mycorrhizal symbiosis may affect tomato fruit metabolism. *BMC Genomics* 15:221

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the development of quality traits in crop production, alone or combined with plant growth-promoting bacteria

Pierre-Antoine Noceto¹ · Pauline Bettenfeld^{1,2} · Raphael Bousageon¹ · Mathilde Hériché¹ · Antoine Sportes¹ · Diederik van Tuinen¹ · Pierre-Emmanuel Courty¹ · Daniel Wipf¹

Received: 30 July 2021 / Accepted: 28 September 2021 / Published online: 11 October 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Modern agriculture is currently undergoing rapid changes in the face of the continuing growth of world population and many ensuing environmental challenges. Crop quality is becoming as important as crop yield and can be characterised by several parameters. For fruits and vegetables, quality descriptors can concern production cycle (e.g. conventional or organic farming), organoleptic qualities (e.g. sweet taste, sugar content, acidity) and nutritional qualities (e.g. mineral content, vitamins). For other crops, however, the presence of secondary metabolites such as anthocyanins or certain terpenes in the targeted tissues is of interest as well, especially for their human health properties. All plants are constantly interacting with microorganisms. These microorganisms include arbuscular mycorrhizal fungi as well as certain soil bacteria that provide ecosystem services related to plant growth, nutrition and quality parameters. This review is an update of current research on the single and combined (co-inoculation) use of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria in crop production, with a focus on their positive impacts on crop quality traits (e.g. nutritional value, organoleptic properties). We also highlight the need to dissect mechanisms regulating plant-symbionts and symbiont-symbiont interactions, to develop farming practices and to study a broad range of interactions to optimize the symbiotic potential of root-associated microorganisms.

Keywords Arbuscular mycorrhiza · Plant growth-promoting rhizobacteria · Crop production · Quality traits · Nutritional value · Industrial application

Introduction

Since the Green Revolution in the middle of the twentieth century, agricultural systems have drastically evolved from peasant farming to intensified practices. Over the last few decades, in-depth changes have occurred regarding sanitary and environmental issues in link with growing populations around the world. Conventional farming practices have turned to agroecological practices that better consider biological mechanisms and preserve ecosystem services

(Costanza et al. 1997; Altieri 1999; Holt-Giménez and Altieri 2012; Patel 2013; Wezel et al. 2014). Agroecology noteworthy promotes farming practices that consider soil microorganisms, e.g. arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), and ecosystem services they render. AMF are the most widespread plant root symbiotic fungi and are an essential ecological partner in agroecosystems. They are considered key organisms in ecosystems, providing many services to the soil and to colonised plants (Gianinazzi et al. 2010). The major advantage of mycorrhization for plant hosts in return for carbon transfer to the AMF is improved access to soil nutrients and water through the fungal partner.

Not only are AMF linked to improved nutrition, but AMF inoculation generally results in increased biomass of aerial parts and roots of the host plant (Gianinazzi et al. 2010). Several studies have shown increased crop growth parameters, e.g. in *Sorghum bicolor* (aerial and root biomass, plant size, nutrient content, grain mass) (Nakmee et al. 2016; Wang 2019) and *Olea europaea* (leaf and root dry

✉ Daniel Wipf
daniel.wipf@inrae.fr

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, Université de Bourgogne, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

² Laboratoire Résistance Induite Et Bioprotection Des Plantes EA 4707, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

mass, number, length and diameter of stems) when associated with different AMF species (Porrás-Soriano et al. 2009; Boutaj et al. 2020). This can result in improved yields in agriculture. Hijri (2016) recently demonstrated benefits of mycorrhiza-based inoculation on crop yield, using potato as a case study in a field meta-analysis. Similarly, inoculation of *Solanum lycopersicum* or *Triticum aestivum* with AMF was correlated with a larger fruit size and higher production volume compared to non-mycorrhizal plants (Nzanza et al. 2012; Duan et al. 2021), but not necessarily with earlier fruit maturity (Chiomento et al. 2020). Seed yield of *Heliantus annuus* was improved in P-fertilised non-mycorrhizal plants, but also when plants were inoculated with *Rhizophagus fasciculatum* (syn. *Glomus fasciculatum*) under low P fertilisation (Chandrashekhara et al. 1995). This reinforces the idea that AMF can compensate for plant nutrient deficiency in the field through soil foraging and nutrient mobilisation by the extraradical mycelium (Joner and Jakobsen 1995; Gianinazzi et al. 2010; Sha et al. 2019).

From a physiological point of view, AM symbiosis induces many cellular and metabolic changes over time and throughout the plant (Gianinazzi et al. 2010). In other words, the establishment of arbuscular mycorrhiza impacts plant physiology and results in increased production of certain metabolites linked to crop quality such as compounds with relevant medicinal and nutritional value (Pedone-Bonfim et al. 2015). Based on several previous studies published in the last 10 years (Baum et al. 2015; Bona et al. 2016, Guido Lingua personal communication), the present review provides an update of recent findings on the impacts of arbuscular mycorrhiza (AM) symbiosis on the quality of crop production which has been of primary interest to mycorrhizologists for several years. The influence of co-inoculation of plant-associated microorganisms on crop yield and quality is discussed. Diverse impacts are addressed from the perspective of nutritional value, food organoleptic qualities (e.g. taste, flavour) and secondary metabolites as related to their bioactive effects on human health or their industrial value.

AM symbiosis improves the nutritional value of crops

The nutritional value — or nutritive value — as part of food quality is the measure of essential nutrients (carbohydrates, proteins or amino acids, lipids) and micronutrients in food or diet, relative to the nutritional requirements of consumers. These compounds are essential for proper functioning of the human body, and a well-balanced diet limits deficiency and the occurrence of disease symptoms. Fruits and vegetables are an important source of high nutritional-value components. In view of the major role of AMF in plant physiology as a metabolic “bioregulator”, the promotion and

management of AM symbiosis in agroecosystems can be of importance for high-nutritional-value food production (Fig. 1).

Carbohydrates are a group of chemical compounds that constitute an important part of our diet as a source of energy, but which also participate in reducing the glycaemic index, absorption of sugars and hydrolysis of starch (Goff et al. 2018). These molecules are found in many foods such as cereals, fruits or vegetables in the form of sugars, fibres and starch. AMF inoculation usually results in a significant increase of sugar concentration, as in bigarade orange (Hadian-Deljou et al. 2020) or wheat (Gupta et al. 2021). In contrast, inoculation of apple trees with *Rhizophagus irregularis* (syn. *Glomus irregulare*) did not modify sugar content of apples except under water stress conditions (Huang et al. 2020). These modifications of plant sugar concentrations are not surprising because sugars are traded between the plant and the fungus, and the plant sugar metabolism and sugar storage are modified in turn. Dietary fibres are soluble and insoluble polysaccharides (e.g. cellulose, pectin, β -glucans) constitutive of plant cells, fruit and vegetable peels and seeds and are indigestible by humans. Even if they cannot be completely broken down by human digestive enzymes, they are essential to intestinal transit and overall health of humans as they can improve the functioning of the digestive system by promoting beneficial gut microbiota (Makki et al. 2018). This can prevent the occurrence of diseases such as obesity, diabetes or colorectal cancer (Dahiya et al. 2017). To our knowledge, to date, no study has compared the impact of AMF on quality or quantity of fibres in human food. Mycorrhization already is known to improve the protein fraction in grains and the amount of fibres in forage cereals (triticale and corn) and their digestibility for livestock (Cazzato et al. 2012; Sabia et al. 2015). This allows us to speculate that mycorrhization could positively influence the fibre content of human food.

Amino acids are primordial molecules useful in protein synthesis. Eight of them are termed or vital essential (phenylalanine, valine, threonine, tryptophan, methionine, leucine, isoleucine, lysine and histidine) because they are not synthesized de novo by humans, but are derived from food. Like many metabolic pathways, plant amino acid production is positively influenced by AM symbiosis. For example, AMF root colonisation increased the total free amino acid concentration in maize seeds and oregano leaves (Zhu et al. 2016; Saleh et al. 2020). In one of the most consumed fruits — cherry tomato — AM symbiosis improved the content of some essential amino acids (valine, isoleucine, leucine and lysine) and other metabolites (Carillo et al. 2020).

Fatty acids have structural and metabolic roles in the functioning of organisms (Calder 2015). Like some amino acids, two poly-unsaturated fatty acids are defined as essential, *i.e.* linolenic acid and linoleic acid. In the important oilseed crop

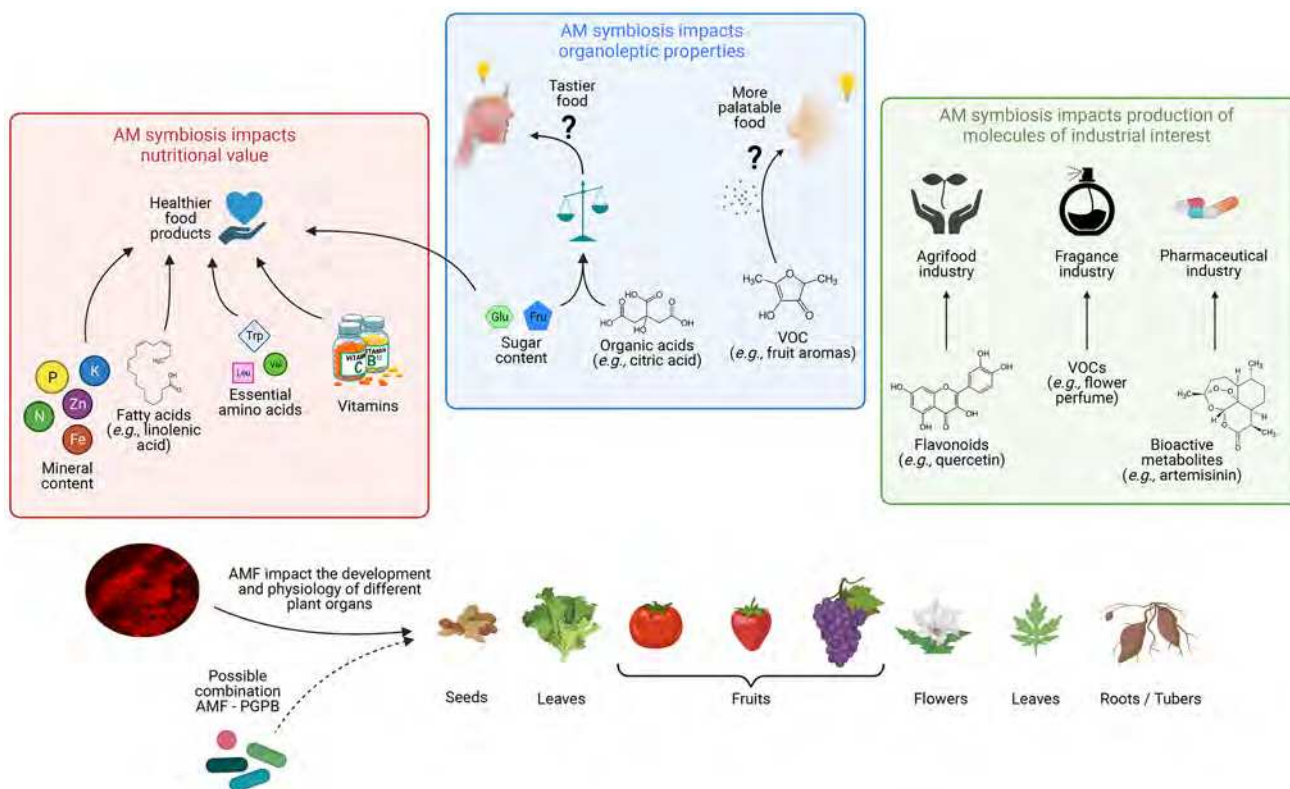


Fig. 1 Diagram summarising the different possible impacts of mycorrhization on quality traits in crop production. Mycorrhization impacts the production of compounds involved in the nutritional value of foodstuffs (i.e. seeds, leaves, vegetables, fruits, roots) such as fatty acids, amino acids or vitamins. Mycorrhization of crops impacts the concentrations of sugars and acids in fruit and thus modifies the sweetness/acidity ratio that may influence the perception of the

taste and palatability of food products. Finally, mycorrhization also increases the production of secondary metabolites in different plant tissues. This increased production of bioactive compounds is of great interest for the agri-food and pharmaceutical industries. The production of secondary metabolites in the form of aromatic compounds also is relevant for the fragrance industry. This diagram was created using the Biorender tool (<https://biorender.com>)

peanut (*Arachis hypogaea*), ten different individual AMF isolates improved the mono- and poly-unsaturated fatty acid percentage in oil (Pawar et al. 2018). Among all AMF species tested in that study, *Funneliformis mosseae* (syn. *Glomus mosseae*) led to the greatest accumulation of most mono- and poly-unsaturated fatty acids. Similar results were observed in other crops and aromatic plants (Gashgari et al. 2020; Gholinezhad and Darvishzadeh 2021).

In human diets, micronutrients essentially comprise vitamins and mineral nutrients that allow the body to function correctly (e.g. cell growth, homeostasis, metabolic and hormonal functions, immunity) (McDowell 2003; Gharibzahedi and Jafari 2017). The AM pathway enables plants to absorb more mineral nutrients. Thus, AMF can improve the mineral content of crops and goods for final consumption (e.g. leaves, fruit, roots). For example, inoculation with *R. irregularis* and *F. mosseae* enhanced the nutritional value of lettuce by increasing the overall mineral (P, K, Mg, Cu, Fe, Ca) and total soluble protein contents of leaves (Baslam et al. 2013b). *R. irregularis* differently enhanced Zn accumulation

in grain of several genotypes of barley and wheat (Coccina et al. 2019). Moreover, tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C) concentrations increased in leaves of mycorrhizal lettuce, with marked variation depending on plant cultivar and AMF isolate (Baslam et al. 2013a). Besides their role in providing mineral nutrients to mycorrhized plants, AMF could lead to the accumulation of human-toxic elements as shown for arsenic (Li et al. 2016) or chromium (Davies et al. 2001). There tends to be a dilution of these elements from roots to flowers, however, and seed and fruit retention is dependent on initial soil concentrations (Kaldorf et al. 1999; Chaturvedi et al. 2018).

In sum, mycorrhization impacts the nutritional value of crops, but an important research field for the next years will be to identify tools and/or markers of the right AMF-crop associations, with special attention to plant identity (i.e. plant species and cultivars) and AMF isolate(s) (i.e. strain identity and isolate or consortium). In addition to this impact on the nutritional value of crops, the level of certain molecules described above participates in the perception and

attractiveness for humans and other animals, and thereby influences food choices and ecological behaviour.

AM symbiosis influences the organoleptic properties of fruit

Tastes and flavours as perceived by our olfactory and gustatory systems affect our preferences for fruit or vegetables (Marty et al. 2018). A wide diversity of chemical molecules from primary and secondary metabolism are produced by plants — often in small quantities — and may guide food choices through non-conscious and automatic processes (Cohen 2008; Jacquier et al. 2012; Sheeran et al. 2013; Papias 2016; Zsoldos et al. 2021). Sweetness and acidity are two main food characteristics essential for consumers to determine their choice (Grunert 2005; Jayasena and Cameron 2008). Thus, sugar and organic acid (e.g. citric, malic and tartaric acid) concentrations and the sugar/acid ratio are commonly used quality indicators of most fruit and vegetable crops.

AMF inoculation repeatedly has been reported to increase the sugar concentration of fruit. This concentration can be measured directly (by fructose or glucose dosage) or using the Degree Brix ($^{\circ}\text{Bx}$). In eggplant and grape berries, $^{\circ}\text{Bx}$ were 3% and 10% higher in AMF-inoculated plants, respectively (Antolín et al. 2020; Sabatino et al. 2020). The nature and concentration of sugar pool(s) in AM plants differed depending on the plant-AMF association. Thus, glucose and fructose concentrations increased in strawberry when the plants were inoculated with *Septoglomus viscosum* (syn. *Viscospora viscosa*) (Todeschini et al. 2018), whereas glucose and sucrose concentrations increased when the plants were inoculated with a commercial inoculum (Mybasol) (Bona et al. 2015), and only the glucose concentration increased in tomato when the plants were inoculated with a commercial inoculum (Mybasol) (Bona et al. 2017).

AMF inoculation also can differentially influence acid production in a strain-dependent manner as shown in an exhaustive study on strawberries (Todeschini et al. 2018); *F. mosseae* greatly influenced total organic acid and citric acid concentrations, whereas *S. viscosum* and *R. irregularis* modified the concentrations of malic, fumaric and ascorbic acids.

To our knowledge, only two studies provided evidence for perception of an improved taste by consumers of mycorrhizal products compared to non-mycorrhizal ones: melon fruits (Copetta et al. 2021) and products derived from wheat (Torri et al. 2013). Thus, further investigation on the effect of mycorrhization on the sensory perception of food still is required. It is worthwhile to note, however, that concentrations of compounds involved in this mechanism are indeed modified by the mycorrhizal status of plants. Through its

impact on fruit sweetness and acidity, AM symbiosis modifies the sugar/acid ratio in fruit, which is a key criterion for sweetness perception (Fig. 1). Glutamate and aspartate involved in umami taste were positively modified in cherry tomatoes (Carillo et al. 2020). No study seems to have ever focused on other tastes such as bitterness, which is specific to some fruits or vegetables. However, a positive influence of AMF inoculation was recently found on the concentration of crocin, picrocrocin and safranal responsible for bitterness and aromatic strength in saffron (Caser et al. 2019). A modification of taste through mycorrhization could affect industrial processes. For example, AMF inoculation of Tempranillo grapevines enhanced the amino acid content of grapes which may affect the aromatic characteristics of wines (Torres 2019).

Flavour is an essential facet of food palatability. Another criterion to be assessed for estimating the possible impact of mycorrhization on human food is its impact on human health. Plants are cultivated for direct consumption, but also to produce some secondary metabolites known for their benefits to human health.

AM symbiosis improves the production of secondary metabolites with positive effects on human health

The use of plants for self-treatment has been widespread since prehistoric times and is not specific to human beings (Rodríguez and Wrangham 1993). Plants produce a wide variety of chemical compounds involved in many physiological and metabolic mechanisms (e.g. germination, reproduction, photosynthesis, signalling and defence). Interestingly, compounds derived from secondary metabolic pathways (i.e. carotenoids, anthocyanins, flavonoids) are also antioxidant molecules known to improve cell resistance against oxidative stress. They impact the efficiency of the human immune system by slowing cellular aging, the development of cardiovascular diseases and different forms of cancer (Seeram 2008). Therefore, interest in plant-derived health-promoting compounds has steadily increased, and plant biotechnologies have been developed to understand and improve natural production of such molecules by AM plants (Verpoorte et al. 2002; Gruda 2008).

Numerous studies have reported the potential pivotal role of AM symbiosis for producing “healthy food” in cereals, fruits and vegetables (see Avio et al. 2018 for a review) (Fig. 1). Many research papers have focused on the effect of mycorrhization on the main horticultural crops (e.g. tomato, strawberry, grapevine). Tomato (*S. lycopersicum*) is one of the most produced horticultural crops and the second most important vegetable crop in

the world after potato. Its fruits are the most consumed fruit and are rich in metabolites that help prevent human diseases. For example, lycopene is a major carotenoid in tomato fruit. Due to its antioxidant properties, a frequent consumption of this fruit contributes to reduce the occurrence of cancer in humans, e.g. prostate cancer (Giovannucci 2002). Inoculation of tomato plants with *R. irregularis* or *F. mosseae* enhanced the concentration of lycopene and other carotenoids in tomato fruit regardless of the cultivar (Giovannetti et al. 2012; Nzanza et al. 2012). Along with tomato, strawberry is another fruit with substantial data available about the production of healthy compounds stimulated by mycorrhization (Table 1). Strawberry consumption is an important source of bioactive compounds with a beneficial impact on human health (e.g. vitamins, amino acids, polyphenols, anthocyanins and other antioxidants). When strawberry plants interact with AMF, the concentrations of coumaric acid and flavonoids like quercetin or kaempferol increase (Castellanos-Morales et al. 2010). Carotenoid production and vitamin production also are positively influenced, as in *Ipomea batata* (Tong et al. 2013). Others metabolites are not affected or diminished in response to mycorrhization, e.g. ferulic acid in strawberries (Castellanos-Morales et al. 2010). The richness of secondary metabolites is plant-family-dependent; the overall content of phenolic compounds does not seem to be affected by AM symbiosis in strawberries, while AMF increases phenolic production by artichoke, which is naturally rich in phenolic compounds (Ceccarelli et al. 2010).

Anthocyanins and flavonoids are important and desired bioactive compounds in grape berries. AMF inoculation resulted in an increased amount of anthocyanins and flavonoids in *Vitis vinifera* berries (Torres et al. 2018; Torres 2019). Carotenoids and derived products including pigments, volatile compounds and regulatory molecules or other molecules with an unknown function to date (Walter et al. 2010) play a key role in the prevention of human diseases and in maintaining good health (Rao and Rao 2007). AMF modify the carotenoid biosynthesis pathways, as demonstrated in *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* and *Medicago truncatula* (Fester et al. 2002).

The food industry is not the only economic sector interested in the strong potential of the plant kingdom and possible contribution of AM symbiosis. As mentioned above, plants produce a wide range of chemical compounds that are beneficial to human health through direct consumption or after chemical extraction of very specific compounds used in pharmacology. An emerging path for the “mycorrhizal industry” is the production of AM plants with increased contents of bioactive substances for extraction and use.

AM symbiosis: a tool for producing compounds of industrial interest

The use of medicinal plants to treat or mitigate illnesses is as old as humanity itself. Over time, natural substances extracted from plants have brought about great advances due to their added value in the preparation of many products, especially in fields of nutraceuticals, pharmaceuticals, cosmetics and perfume (Sharmeen et al. 2021) (Fig. 1). Volatile organic compounds (VOCs) are specific chemical substances synthesized by all living organisms including plants (Dudareva et al. 2006; Dormont et al. 2013; Lemfack et al. 2018). Plant VOCs fulfil several key functions related to the adaptation of plants to their environment. They are notably involved in communication with other organisms through the emission of perfume by flowers and fruit aromas, and in plant attractiveness for pollinators (Forney 2001). Additional roles exist, such as communication between neighbouring plants (Effah et al. 2019; Kigathi et al. 2019) or defence against herbivores (Kessler 2001). Moreover, due to their antimicrobial activities, some of these molecules have been identified for potential therapeutic uses (Hammer et al. 2003; Huang et al. 2012). For example, geraniol, thymol or cinnamaldehyde present in diverse plant essential oils have proved effective against *Escherichia coli* O157:H7 or cancer cell proliferation (Burt and Reinders 2003; Solórzano-Santos and Miranda-Novales 2012; Blowman et al. 2018).

Regarding the role of plant VOCs as signalling compounds in plant interactions with their abiotic and biotic environments, it is obvious that presence of soil microorganisms influences plant VOC production. The use of symbiotic microorganisms such as AMF could be interesting for plant-derived drug production. For example, inoculation of *Artemisia annua* with different AMF isolates increased the concentration of terpenes such as artemisinin, a known anti-malarial compound (Binet et al. 2011; Chaudhary et al. 2008; Kapoor et al. 2017; Mandal et al. 2015 and references therein). Similarly, the production of phenolic acid by *Arnica montana* and sesquiterpenic acid by *Valeriana officinalis* increased in AM plants (Nell et al. 2010; Jurkiewicz et al. 2010). Inoculation of *Ocimum basilicum* with different AMF isolates (*F. mosseae*, *Gigaspora margarita*, *Gigaspora rosea*) greatly increased the production of essential oils enriched in terpenoids such as alpha-terpineol (Copetta et al. 2006). Such metabolic modifications were found in many crops such as sorghum, where *F. mosseae* modified the VOC profiles (Sun and Tang 2013). Inoculation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) with *Acaulospora longula* generated raw material enriched in flavonoids (especially vitexin) of interest as anxiolytic and antidepressant

Table 1 Main effects of arbuscular mycorrhiza on the composition of tomato and strawberry fruits, two of the most consumed fruits, as reported in the literature

References	Cultivars	AMF inoculation	Effect on plant parameters
<i>Fragaria x ananassa</i>			
Castellanos-Morales et al. 2010	Aroma	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Increased cyanidine-3-glucoside, p-coumaric acid, quercetin, kaempferol concentrations Irregular impact on nutrient contents in fruit No effect on fruit acidity, glucose and sucrose concentrations, Brix grade and total phenolic content Decreased fructose concentration
Sinclair et al. 2014	Albion, Charlotte, Seascape	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Glomus caledonium</i>	Increased Brix grade and titratable acidity with AMF at low salinity level (<i>F. mosseae</i> is greater) Mitigation the negative impact of high salinity level on Brix grade and titratable acidity (<i>R. irregularis</i> is greater)
Cecatto et al. 2016	Fortuna, Sabrina, Splendor	Mycogrowth® inoculum: <i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i>	No effect on titratable acidity, ascorbic acid, Brix grade and total phenolic content Total anthocyanins: Increased in cv. Fortuna No effect in cv. Sabrina Decreased in cv. Splendor
Parada et al. 2019	Camarosa	<i>Claroideoglomus claroideum</i>	Increased total anthocyanins Decreased individuals' anthocyanins No effect on ascorbic acid
<i>Solanum lycopersicum</i>			
Subramanian et al. 2006	PKM-1	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Increased P and N content, acidity and ascorbic acid concentration
(Ulrichs et al. 2008)	Vitella F1	<i>Amykor</i> (<i>Glomus</i> sp.)	Increased lycopene, b-carotene concentration No effect on total phenolic content
Copetta et al. 2011	Guadalete	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Glomus caledonium</i> , <i>Glomus viscosum</i> , <i>Glomus coronatum</i>	No effect on sugar and organic acid concentrations, lycopene, b-carotene and lutein content Decreased ascorbic acid concentration
Asensio et al. 2012	ACE 55 VF	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Glomus</i> sp.	Increased isoprenoids production
Giovannetti et al. 2012	Money-Maker	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Increased lycopene concentration No effect on total phenols and ascorbic acid concentration
Salvioli et al. 2012	Micro-Tom	<i>Funneliformis mosseae</i>	Changes in amino acid profile Increased asparagine and glutamine content at green stage Increased alanine, serine, threonine and glutamine content at turning Increased total amino acid content at red stage
Hart et al. 2015	Money-maker	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i>	Increased lycopene and total carotenoids concentration No effect on β -carotene, sugars and organic acids concentrations Modification of volatiles profile

Table 1 (continued)

References	Cultivars	AMF inoculation	Effect on plant parameters
Castañeda et al. 2020	Cerasiforme	Natural diversity composed of <i>Rhizophagus</i> , <i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i> and <i>Archaeospora</i> genera	No effect on Brix grade Increased polyphenol concentrations
Carillo et al. 2020	Giagiù, Lucariello	Aegis Migrogranule® (<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i>)	Increased nutrient concentrations (phosphate, calcium, magnesium, sodium, copper, zinc) Increased ascorbic acid and lycopene concentration Increased Brix grade Decreased sucrose concentration Increased total amino acid content

ingredients in the pharmaceutical industry (Can et al. 2013; de Oliveira et al. 2019). Recently, the volatilome of *Fragaria ananassa* and *Vitis vinifera* was modulated by inoculation with *F. mosseae* (Todeschini et al. 2018; Velásquez et al. 2020).

A cultivar effect was observed following AMF inoculation for most of metabolic changes mentioned above, reinforcing the idea that plant identity has a substantial effect on the outcome of AM symbiosis (Khaosaad et al. 2006). Although mechanisms involved in AM symbiosis which lead to either increased or reduced production of certain compounds are not clearly established, the intimate association of a plant and AMF remains interesting to exploit for bio-engineering, fragrance industry or pharmacology (Dudareva et al. 2013). Besides AMF, plants are in contact with a plethora of other soil microorganisms of which the presence and interactions also affect plant health and yield.

Impact of co-inoculation of AMF and plant-associated microbes on crop yield and fruit quality

AMF and their host plants interact with a wide range of other soil organisms, in roots, rhizosphere and bulk soil. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) affect plant development and health (Hartmann et al. 2009). One of their major roles is improvement of plant nutrition by degrading inorganic or organic sources of nutrients such as insoluble phosphate complexes (e.g. phytate) (Richardson and Simpson 2011) or inorganic nitrogen by fixing atmospheric nitrogen (Shridhar 2012; Agnolucci et al. 2015). PGPB inoculated alone influence plant growth and yield (Bhattacharyya and Jha 2012; Nadeem et al. 2014). Some PGPB strains induce early flowering and fruiting in banana (Mia et al. 2010), while others increase protein and oil content of sunflower seeds (Ekin 2010; Arif et al. 2017) or improve strawberry yield, nutrient concentrations, vitamins and sugars (Esitken

et al. 2010; Todeschini et al. 2018). The combination of several bacterial strains can increase the fitness of *T. aestivum*^o as well as yield and grain quality (Kumar et al. 2014).

Considering specific beneficial effects of AMF and PGPB, their concomitant use is expected to allow for reduced chemical inputs in farming practices (Adesemoye et al. 2009; Gianinazzi et al. 2010). AMF and PGPB can positively affect quality of many crop products (Todeschini et al. 2018). However, research was only recently focused on the effect of their co-inoculation on fruit quality (Table 2, reviewed by Agnolucci et al. 2020). Several studies have shown that co-inoculation of PGPB and AMF was correlated with increased growth of aerial parts and increased root biomass and yield of strawberry plants, suggesting beneficial effects of these microorganisms on mineral nutrients, carbohydrates and secondary metabolite availability (see Table 2, Bona et al. 2015). *S. lycopersicum* and *Pogostemon cablin* growth and mineral nutrient content have been improved in the same way (Singh et al. 2012). Similar conclusions were established after dual inoculation of *Cicer arietinum* (Tavasolee et al. 2011) and *Lens culinaris* (Amirnia et al. 2019) with PGPB and AMF. Furthermore, in legumes growing under P-limited conditions, the establishment of AM symbiosis has been shown to be a necessary precursor to nodulation by rhizobia, thus contributing to an important host plant strategy to maintain symbiotic N₂-fixation with improved nitrogen status and yield compared to P-fertilized plants that only are nodulated (Erman et al. 2011).

The impact of dual inoculation was strongest on plant physiology and metabolite production (Vafadar et al. 2014). Antioxidant and carotenoid concentrations were positively regulated in tomato fruit (Ordookhani and Zare 2011), and so was the starch content in corn (*Z. mays*) (Berta et al. 2014). The application of a mixture of several AMF and PGPB, including *Pseudomonas fluorescens* (strain PF4) or *Pseudomonas sp.*, increased anthocyanin production and quantity in strawberry fruit (Lingua et al. 2013). A modulation of volatile/aromatic compound production in response

Table 2 Effects of co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on the secondary metabolite content of fruits, as reported in the literature. Mybasol s.r.l inoculum contains *Rhizophagus irregularis*, *Glomus aggregatum*, *Septoglomus viscosum*, *Claroideoglomus etunicatum* and *Claroideoglomus claroideum*. Rizotech plus and Myco Apply inocula contain *R. irregularis*, *Funneliformis mosseae*, *G. aggregatum* and *C. etunicatum*

Reference	Cultivars	AMF inoculation	Co-inoculation	Effect on plant parameters
<i>Fragaria × ananassa</i>				
Lingua et al. 2013	Selva	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (5Vm1K; Pf4)	Increased anthocyanins concentrations in + AMF or + AMF/ + bacteria conditions compared to – AMF/ – bacteria conditions
Bona et al. 2015	Selva	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (5Vm1K; Pf4)	AMF Mix inoculation: Increased sucrose and ascorbic acid concentrations No effect on glucose, fructose, total sugar, folic acid concentration and titratable acidity Co-inoculation: Increased sucrose, ascorbic acid, folic acid concentrations and titratable acidity No effect on glucose, fructose and total sugar concentrations
Todeschini et al. 2018	Elyana F1	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Septoglomus viscosum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (19Fv1t; 5Vm1K; Pf4)	Shoot and root biomass, flowers per plant, fruit size are affected by AMF and AMF + bacteria No effect on total sugars pH, titratable acidity and organic acid production are affected by AMF and bacteria Anthocyanidins production is affected by co-inoculation AMF + bacteria Fruit mineral composition and volatiles production: affected by both organisms
<i>Solanum lycopersicum</i>				
Ordookhani et al. 2010	F1 Hybrid, GS-15	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Glomus etunicatum</i>	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azosprillum lipoferum</i>	Increased lycopene concentration, antioxidant activity, potassium content in fruits in AMF and co-inoculation conditions
Nzanza et al. 2012	Nemo-Netta	<i>Funneliformis mosseae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Increased fruit size and yield No effect on fruit P content, flavonoids, vitamins, antioxidant activity
Bona et al. 2017	TC2000	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. C7, <i>Pseudomonas</i> sp. 19Fv1T	Increased yield parameters (fruit size and weight), sugars concentrations No effect on total carotenoids content Decreased ascorbic acid and nitrate concentration

Table 2 (continued)

Reference	Cultivars	AMF inoculation	Co-inoculation	Effect on plant parameters
Bona et al. 2018	CXD 219 FI	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. C7, <i>Pseudomonas</i> sp. 19Fv1T	Increased glucose and fructose, malic, citric and ascorbic acids, b-carotene and lutein concentrations No effect on biomass and water content Decreased in lycopene concentration
Sellitto et al. 2019	Pixel FI	Rizotech plus and Myco Apply inocula	<i>Trichoderma</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i>	Increased fruit yield, total phenols, ascorbic acid concentration, antioxidant activity

to AMF-PGPB inoculation was observed in several other plants of economic interest (Bona et al. 2015; Hart et al. 2015 and references therein). In strawberry, VOCs production was impacted by dual inoculation, suggesting a role of the AMF-PGPB combination in the determination of the sweet-fruity note in taste and flavour (Bona et al. 2015; Todeschini et al. 2018).

Metabolic analyses showed that concentrations of sugars, acids and various secondary metabolites increased upon AMF-PGPB co-inoculation. However, it is important to note that AMF-PGPB combinations do not all produce the same effects, and the combined presence of the two types of microorganisms differentially influences plant metabolism and nutritional quality of fruits (Table 2). The *F. mosseae*-*P. fluorescens* Pf4 association resulted in sweeter fruit, while *R. irregularis*-*P. sp.* 5Vm1K resulted in less acid fruits (Todeschini et al. 2018). The AMF strain (which principally affected the phenological parameters of strawberry plants) and the PGPB strain (which was most relevant for fruit yield and quality) were both important (Todeschini et al. 2018). This led to the idea of the right strain(s) for the right plant (i.e. plant breeding for responsiveness of fruit quality to AMF and PGPB) (Plouznikoff et al. 2019), which will be crucial for integrating beneficial microorganisms in sustainable agriculture (Turrini et al. 2018).

The impact of the simultaneous presence of AMF and PGPB is notable additionally for plant quality in ornamental horticulture. The simultaneous use of two AMF isolates — *F. mosseae* and *Acaulospora laevis* — and a bacterial strain — *P. fluorescens* — improved *Gazania rigens* growth while specifically improving flowering and pigment concentrations which are important parameters for ornamental plants (Saini et al. 2019). In *Dracocephalum moldavica*, improved growth and increased essential oil content have been reported in the presence of *Claroideoglossum etunicatum* (AMF) and *Micrococcus yunnanensis* (PGPB) (Ghanbarzadeh et al. 2019).

A prerequisite to large-scale use of combined AMF-PGPB is the identification of species compatible with one another for suitable host plants, in other words, specification of inoculum property and compatibility fingerprints. The next steps in this direction will be a better understanding of the mechanisms underlying the tripartite interaction (Emmanuel and Babalola 2020), to avoid any detrimental changes from an ecological perspective (Guerrieri et al. 2004).

Concluding remarks and further prospects

Taken together, AMF-crop symbiosis can significantly improve plant fitness and the overall metabolism of plants. Despite an effect of the selected cultivar and the inoculated AMF strain, AM symbiosis positively influences the quantity and quality of crop production, and production of metabolite

valuable for different economic activities (Fig. 1). This interaction often results in increased enzymatic activities of biosynthesis pathways and an elevated production of secondary metabolites in the plant host. However, there still is a significant knowledge gap about the regulation of key metabolic pathways likely to explain responses of different cultivars and effects of AMF. The availability of studies on AMF-plant genome regulation allows the screening of upregulated versus downregulated genes, which might be a direct way of relatively quickly gaining information on effects of AMF on plant metabolic pathways (e.g. Zouari et al. 2014; Vangelisti et al. 2018). For instance, it is generally reported that the phenylpropanoid, terpenoid and apocarotenoid pathways are stimulated by AMF. This leads to increased production of different classes of metabolites, but the detailed influence of AM symbiosis on these metabolic changes remains to be deciphered (Adolfsson et al. 2017; Avio et al. 2018). The role of phytohormones should be considered because these molecules are differentially produced by plants in response to different environmental stresses (Javid et al. 2011) and to plant–microbe interactions, especially during AM symbiosis (Ludwig-Müller 2000; Hause et al. 2007; Egamberdieva et al. 2017). Phytohormones can serve as stress signals throughout the plant to induce secondary metabolite production and a strong physiological response (Jogawat et al. 2021). Thus, physiological changes reported in this review may find an explanation in the control of AMF colonization by plants. All these considerations clearly are a target for future research if we want to optimise the use of AMF in sustainable agriculture (Fig. 1), not only to reduce chemical inputs but also to enhance the quality of production which could offset a quantitative loss.

A previous review (Bona et al. 2017) has recorded studies based on the use of AMF to improve crop quality. In comparison to that review, we did not observe any marked change in species of AMF and plants studied. The majority of studies were performed with the Glomeraceae family, while species of other mycorrhizal families have been poorly studied in this respect. Also, the number of considered plant species was limited (about 45) — although it is true that a relatively small number of plants are the basis for human and livestock nutrition. Nevertheless, it could be of interest to broaden the range of AMF and plant species studied. One perspective could be to have a bottom-up and not a top-down approach, meaning that plant selection initially could be based on responsiveness to AMF isolates and species, and then to organoleptic features.

Despite considerable progress in this area, a lot of research is tending towards precision farming. Its prospects are to optimise multi-trophic interactions such as the use of AMF -PGPB consortia chosen from efficient and functionally complementary associations. Future research should not only accumulate data but also analyse

regulatory mechanisms at different scales and for different plant-microorganisms associations with an “open-minded” approach. It will be essential to disentangle the complex networks of interactions between AMF, PGPB and plants to highlight potential synergistic and complementary effects. It will be necessary to improve knowledge on the management of combined inoculation with several beneficial microorganisms for crop yield and quality. Broadly, we should keep in mind that plants interact not only with one bacterium or one fungus but with diverse communities of microorganisms that are clustered in different plant microbiota (Turrini et al. 2018). Studies highlight a positive role of other endophytes than those discussed here, not only on protective effects but also on plant performance and crop quality (Andrade-Linares et al. 2011; Rho et al. 2020). However, it seems likely that co-inoculation of beneficial organisms will not be the sole option. Different lines of research are being developed to understand plant-microorganism relationships as well as farming practices and their influence on crop quality, so as to optimise these multitrophic interactions. Notwithstanding, AMF are most active and act most beneficially in agricultural systems when farming practices preserve their development and ecosystem services (e.g. reduced fertiliser inputs, suppression of deep tillage, preservation of plant diversity). Significant work is being done to assess the role of farmers in the management of the communities of microbiota naturally present in crops. The objective is to define and promote current and new farming practices that will enhance the ecosystem services rendered by beneficial microorganisms.

Acknowledgements This research was financially supported by H2020 ERA-net project, CORE Organic Cofund and cofunds from the European Commission (BIOVINE project) and the Bourgogne Franche-Comté Regional Council (France).

Author contribution Not applicable.

Funding This research was financially supported by the H2020 ERA-net project, CORE Organic Cofund and cofunds from the European Commission (BIOVINE project) and the Bourgogne Franche-Comté Regional Council (France).

Availability of data and material Not applicable.

Code availability Not applicable.

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interests

Ethics approval Not applicable.

Additional declarations for articles in life science journals that report the results of studies involving humans and/or animals Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

References

- Adesemoye AO, Torbert HA, Klopper JW (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58:921–929. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>
- Adolfsson L, Nziengui H, Abreu IN et al (2017) Enhanced secondary and hormone metabolism in leaves of arbuscular mycorrhizal *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 175:392–411. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01509>
- Agnolucci M, Avio L, Palla M et al (2020) Health-promoting properties of plant products: the role of mycorrhizal fungi and associated bacteria. *Agronomy* 10:1864. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121864>
- Agnolucci M, Battini F, Cristani C, Giovannetti M (2015) Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates. *Biol Fertil Soils* 51:379–389. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0989-5>
- Altieri MA (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agr Ecosyst Environ* 74:19–31. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Amirnia R, Ghiyasi M, Siavash Moghaddam S et al (2019) Nitrogen-fixing soil bacteria plus mycorrhizal fungi improve seed yield and quality traits of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *J Soil Sci Plant Nutr* 19:592–602. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00058-3>
- Andrade-Linares DR, Grosch R, Restrepo S et al (2011) Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza* 21:413–422. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0351-1>
- Antolín MC, Izurdiaga D, Urmeneta L et al (2020) Dissimilar responses of ancient grapevines recovered in Navarra (Spain) to arbuscular mycorrhizal symbiosis in terms of berry quality. *Agronomy* 10:473. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040473>
- Arif MS, Shahzad SM, Riaz M et al (2017) Nitrogen-enriched compost application combined with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improves seed quality and nutrient use efficiency of sunflower. *J Plant Nutr Soil Sci* 180:464–473. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600615>
- Asensio D, Rapparini F, Peñuelas J (2012) AM fungi root colonization increases the production of essential isoprenoids vs. nonessential isoprenoids especially under drought stress conditions or after jasmonic acid application. *Phytochemistry* 77:149–161. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.012>
- Avio L, Turrini A, Giovannetti M, Sbrana C (2018) Designing the ideotype mycorrhizal symbionts for the production of healthy food. *Front Plant Sci* 9:1089. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01089>
- Baslam M, Esteban R, García-Plazaola JI, Goicoechea N (2013a) Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3119–3128. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4526-x>
- Baslam M, Garmendia I, Goicoechea N (2013b) The arbuscular mycorrhizal symbiosis can overcome reductions in yield and nutritional quality in greenhouse-lettuces cultivated at inappropriate growing seasons. *Sci Hortic* 164:145–154. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.021>
- Baum C, El-Tohamy W, Gruda N (2015) Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Sci Hortic* 187:131–141. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.002>
- Berta G, Copetta A, Gamalero E et al (2014) Maize development and grain quality are differentially affected by mycorrhizal fungi and a growth-promoting pseudomonad in the field. *Mycorrhiza* 24:161–170. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0523-x>
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Binet M-N, van Tuinen D, Deprêtre N et al (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Artemisia umbelliformis* Lam, an endangered aromatic species in Southern French Alps, influence plant P and essential oil contents. *Mycorrhiza* 21:523–535. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0354-y>
- Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL et al (2018) Anticancer properties of essential oils and other natural products. *evidence-based complementary and alternative medicine* 2018:1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>
- Bona E, Cantamessa S, Massa N et al (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza* 27:1–11. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0727-y>
- Bona E, Todeschini V, Cantamessa S et al (2018) Combined bacterial and mycorrhizal inocula improve tomato quality at reduced fertilization. *Sci Hortic* 234:160–165. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.026>
- Bona E, Lingua G, Manassero P et al (2015) AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza* 25:181–193. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0599-y>
- Bona E, Lingua G, Todeschini V (2016) Effect of bioinoculants on the quality of crops. In: Arora NK, Mehnaz S, Balestrini R (eds) *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*. Springer India, New Delhi, pp 93–124
- Boutaj H, Meddich A, Chakhchar A et al (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi improve mineral nutrition and tolerance of olive tree to Verticillium wilt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 53:673–689. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1792603>
- Burt SA, Reinders RD (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36:162–167. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x>
- Calder PC (2015) Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 39:18S–32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Can ÖD, Demir Özkay Ü, Üçel Uİ (2013) Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 699:250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.017>
- Carillo P, Kyratzis A, Kyriacou MC et al (2020) Biostimulatory action of arbuscular mycorrhizal fungi enhances productivity, functional and sensory quality in ‘Piennolo del Vesuvio’ Cherry Tomato Landraces. *Agronomy* 10:911. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060911>
- Caser M, Demasi S, Victorino ÍMM et al (2019) Arbuscular mycorrhizal fungi modulate the crop performance and metabolic profile of saffron in soilless cultivation. *Agronomy* 9:232. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050232>
- Castellanos-Morales V, Villegas J, Wendelin S et al (2010) Root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* alters the quality of strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* Duch.) at different nitrogen levels. *J Sci Food Agric* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3998>
- Castañeda W, Toro M, Solorzano A, Zúñiga-Dávila D (2020) Production and nutritional quality of tomatoes (<i>Solanum

- lycopersicum var. Cerasiforme) are improved in the presence of biochar and inoculation with arbuscular mycorrhizae. *AJPS* 11:426–436. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.113031>
- Cazzato E, Laudadio V, Tufarelli V (2012) Effects of harvest period, nitrogen fertilization and mycorrhizal fungus inoculation on triticale (*Triticosecale* Wittmack) forage yield and quality. *Renew Agric Food Syst* 27:278–286. <https://doi.org/10.1017/S1742170511000482>
- Ceccarelli N, Curadi M, Picciarelli P et al (2010) Globe artichoke as a functional food. *Mediterr J Nutr Metab* 3:197–201. <https://doi.org/10.1007/s12349-010-0021-z>
- Cecatto AP, Ruiz FM, Calvete EO et al (2016) Mycorrhizal inoculation affects the phytochemical content in strawberry fruits. *Acta Sci Agron* 38:227. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27932>
- Chandrashekhara CP, Patil VC, Sreenivasa MN (1995) VA-mycorrhiza mediated P effect on growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) at different P levels. *Plant Soil* 176:325–328. <https://doi.org/10.1007/BF00011797>
- Chaturvedi R, Favas P, Pratas J et al (2018) Assessment of edibility and effect of arbuscular mycorrhizal fungi on *Solanum melongena* L. grown under heavy metal(loid) contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 148:318–326. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.048>
- Chaudhary V, Kapoor R, Bhatnagar AK (2008) Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. *Appl Soil Ecol* 40:174–181. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.04.003>
- Chiomento JLT, Filippi D, Zanin E et al (2020) Arbuscular mycorrhiza potentiates the quality of fruits but does not influence the precocity of goldenberry plants. *BJD* 6:79041–79056. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-365>
- Coccina A, Cavagnaro TR, Pellegrino E et al (2019) The mycorrhizal pathway of zinc uptake contributes to zinc accumulation in barley and wheat grain. *BMC Plant Biol* 19:133. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1741-y>
- Cohen DA (2008) Neurophysiological pathways to obesity: below awareness and beyond individual control. *Diabetes* 57:1768–1773. <https://doi.org/10.2337/db08-0163>
- Copetta A, Lingua G, Berta G (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese* Mycorrhiza 16:485–494. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0065-6>
- Copetta A, Bardi L, Bertolone E, Berta G (2011) Fruit production and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) are affected by green compost and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Biosystems - an International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* 145:106–115. <https://doi.org/10.1080/11263504.2010.539781>
- Copetta A, Todeschini V, Massa N et al (2021) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves melon (*Cucumis melo*) fruit quality under field conditions and plant performance in both field and greenhouse. *Plant Biosystems - an International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* 155:1063–1074. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1813831>
- Costanza R, d'Arge R, de Groot R et al (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>
- Dahiya DK, Renuka PM et al (2017) Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. *Front Microbiol* 8:563. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00563>
- Davies FT, Puryear JD, Newton RJ et al (2001) Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J Plant Physiol* 158:777–786. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00311>
- de Oliveira PT, Dos Santos EL, da Silva WA, Ferreira MR, Soares LA, da Silva FA, da Silva FS (2019) Production of biomolecules of interest to the anxiolytic herbal medicine industry in yellow passionfruit leaves (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) promoted by mycorrhizal inoculation. *J Sci Food Agric* 99(7):3716–20. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9598>
- Dormont L, Bessi re J-M, Cohuet A (2013) Human skin volatiles: a review *J Chem Ecol* 39 569 578 <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0286-z>
- Duan H-X, Luo C-L, Li J-Y et al (2021) Improvement of wheat productivity and soil quality by arbuscular mycorrhizal fungi is density- and moisture-dependent *Agron Sustain Dev* 41 3 <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00659-8>
- Dudareva N, Klemptien A, Muhlemann JK, Kaplan I (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol* 198:16–32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 25:417–440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Effah E, Holopainen JK, McCormick AC (2019) Potential roles of volatile organic compounds in plant competition. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 38:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2019.04.003>
- Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA et al (2017) Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol* 8:2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Ekin Z (2010) Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. *African Journal of Biotechnology* 3794–3800
- Emmanuel OC, Babalola OO (2020) Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Microbiol Res* 239:126569. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126569>
- Erman M, Demir S, Ocak E et al (2011) Effects of Rhizobium, arbuscular mycorrhiza and whey applications on some properties in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed conditions 1—Yield, yield components, nodulation and AMF colonization. *Field Crop Res* 122:14–24. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.02.002>
- Esitken A, Yildiz HE, Ercisli S et al (2010) Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Sci Hortic* 124:62–66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>
- Fester T, Schmidt D, Lohse S et al (2002) Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta* 216:148–154. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0917-z>
- Forney CF (2001) Horticultural and other factors affecting aroma volatile composition of small fruit. *horttech* 11:529–538. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.11.4.529>
- Gashgari R, Selim S, Abdel-Mawgoud M et al (2020) Arbuscular mycorrhizae induce a global metabolic change and improve the nutritional and health benefits of pennyroyal and parsley. *Acta Physi Plant* 42:102. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03091-3>
- Ghanbarzadeh Z, Mohsenzadeh S, Rowshan V, Moradshahi A (2019) Evaluation of the growth, essential oil composition and antioxidant activity of *Dracocephalum moldavica* under water deficit stress and symbiosis with *Claroideoglossum etunicatum* and *Micrococcus yunnanensis*. *Sci Hortic* 256:108652. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108652>
- Gharibzadeh SMT, Jafari SM (2017) The importance of minerals in human nutrition: bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends Food Sci Technol* 62:119–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>

- Gholinezhad E, Darvishzadeh R (2021) Influence of arbuscular mycorrhiza fungi and drought stress on fatty acids profile of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Field Crops Research* 262:108035. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.108035>
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M-N et al (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti M, Avio L, Barale R et al (2012) Nutraceutical value and safety of tomato fruits produced by mycorrhizal plants. *Br J Nutr* 107:242–251. <https://doi.org/10.1017/S000711451100290X>
- Giovannucci E (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Cancer Spectrum Knowledge Environment* 94:391–398. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.5.391>
- Goff HD, Repin N, Fabek H et al (2018) Dietary fibre for glycaemia control: towards a mechanistic understanding. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 14:39–53. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.07.005>
- Gruda N (2008) Do soilless culture systems have an influence on product quality of vegetables? <https://doi.org/10.18452/9433>
- Grunert KG (2005) Food quality and safety: consumer perception and demand. *Eur Rev Agric Econ* 32:369–391. <https://doi.org/10.1093/eurag/jbi011>
- Guerrieri E, Lingua G, Digilio MC et al (2004) Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? *Ecol Entomol* 29:753–756. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2004.00644.x>
- Gupta S, Thokchom SD, Kapoor R (2021) Arbuscular mycorrhiza improves photosynthesis and restores alteration in sugar metabolism in *Triticum aestivum* L. grown in arsenic contaminated soil. *Front Plant Sci* 12:640379. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640379>
- Hadian-Deljou M, Esna-Ashari M, Mirzaie-asl A (2020) Alleviation of salt stress and expression of stress-responsive gene through the symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi with sour orange seedlings. *Sci Hortic* 268:109373. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109373>
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 95:853–860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x>
- Hart M, Ehret DL, Krumbein A et al (2015) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves the nutritional value of tomatoes. *Mycorrhiza* 25:359–376. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0617-0>
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.025>
- Hijri M (2016) Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza* 26:209–214. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4>
- Holt-Giménez E, Altieri MA (2012) Agroecology, Food Sovereignty and the New Green Revolution *J Sustain Agric* 120904081412003 <https://doi.org/10.1080/10440046.2012.716388>
- Huang D, Ma M, Wang Q et al (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced drought resistance in apple by regulating genes in the MAPK pathway. *Plant Physiol Biochem* 149:245–255. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.020>
- Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C et al (2012) The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol* 193:997–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04001.x>
- Jacquier C, Bonthoux F, Baciu M, Ruffieux B (2012) Improving the effectiveness of nutritional information policies: assessment of unconscious pleasure mechanisms involved in food-choice decisions. *Nutr Rev* 70:118–131. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00447.x>
- Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F et al (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Aust J Crop Sci* 5:726–734
- Jayasena V, Cameron I (2008) °BRIX/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of crimson seedless table grapes. *J Food Qual* 31:736–750. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00231.x>
- Jogawat A, Yadav B, Chhaya, et al (2021) Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review. *Physiol Plant* 172:1106–1132. <https://doi.org/10.1111/ppl.13328>
- Joner EJ, Jakobsen I (1995) Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biol Biochem* 27:1153–1159. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00047-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00047-1)
- Jurkiewicz A, Ryszcza P, Anielska T et al (2010) Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: effects of mycorrhizal fungi and competing plants. *Mycorrhiza* 20:293–306. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0280-z>
- Kaldorf M, Kuhn AJ, Schröder WH et al (1999) Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J Plant Physiol* 154:718–728. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80250-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80250-8)
- Kapoor R, Anand G, Gupta P, Mandal S (2017) Insight into the mechanisms of enhanced production of valuable terpenoids by arbuscular mycorrhiza. *Phytochem Rev* 16:677–692. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9486-9>
- Kessler A (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141–2144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>
- Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M et al (2006) Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16:443–446. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0062-9>
- Kigathi RN, Weisser WW, Reichelt M et al (2019) Plant volatile emission depends on the species composition of the neighboring plant community. *BMC Plant Biol* 19:58. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1541-9>
- Kumar A, Maurya BR, Raghuwanshi R (2014) Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatal Agric Biotechnol* 3:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.08.003>
- Lemfack MC, Gohlke B-O, Toguem SMT et al (2018) mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 46:D1261–D1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>
- Li H, Chen XW, Wong MH (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi reduced the ratios of inorganic/organic arsenic in rice grains. *Chemosphere* 145:224–230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.067>
- Lingua G, Bona E, Manassero P et al (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization. *IJMS* 14:16207–16225. <https://doi.org/10.3390/ijms140816207>
- Ludwig-Müller J (2000) Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. In: Kapulnik Y, Douds DD (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp 263–285

- Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F (2018) The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe* 23:705–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- Mandal S, Upadhyay S, Wajid S et al (2015) Arbuscular mycorrhiza increase artemisinin accumulation in *Artemisia annua* by higher expression of key biosynthesis genes via enhanced jasmonic acid levels. *Mycorrhiza* 25:345–357. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0614-3>
- Marty L, Chamberon S, Nicklaus S, Monnery-Patris S (2018) Learned pleasure from eating: an opportunity to promote healthy eating in children? *Appetite* 120:265–274. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.09.006>
- McDowell LR (2003) Minerals in animal and human nutrition, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam
- Mia MAB, Shamsuddin ZH, Mahmood M (2010) Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. *Int J Agric Biol* 12:9
- Nadeem SM, Ahmad M, Zahir ZA et al (2014) The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol Adv* 32:429–448. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
- Nakmee PS, Techapinyawat S, Ngamprasit S (2016) Comparative potentials of native arbuscular mycorrhizal fungi to improve nutrient uptake and biomass of *Sorghum bicolor* Linn. *Agriculture and Natural Resources* 50:173–178. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.06.004>
- Nell M, Wawrosch C, Steinkellner S et al (2010) Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentrations in *Valeriana officinalis* L. *Planta Med* 76:393–398. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186180>
- Nzanza B, Marais D, Soundy P (2012) Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. *Sci Hortic* 144:55–59. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.06.005>
- Ordooghani K, Zare M (2011) Effect of *Pseudomonas*, *Azotobacter* and arbuscular mycorrhiza fungi on lycopene, antioxidant activity and total soluble solid in tomato (*Lycopersicon Esculentum* F1 Hybrid, Delba). 6
- Ordooghani K, Khavazi K, Moezzi A, Rejali F (2010) Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. 9
- Parada J, Valenzuela T, Gómez F et al (2019) Effect of fertilization and arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on antioxidant profiles and activities in *Fragaria ananassa* fruit: Effect of fertilization and mycorrhization on antioxidants from strawberry. *J Sci Food Agric* 99:1397–1404. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9316>
- Papies EK (2016) Health goal priming as a situated intervention tool: how to benefit from nonconscious motivational routes to health behaviour. *Health Psychol Rev* 10:408–424. <https://doi.org/10.1080/17437199.2016.1183506>
- Patel R (2013) The Long Green Revolution. *J Peasant Stud* 40:1–63. <https://doi.org/10.1080/03066150.2012.719224>
- Pawar PB, Khadiolkar JP, Kulkarni MV, Melo JS (2018) An approach to enhance nutritive quality of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seed oil through endo mycorrhizal fertigation. *Biocatal Agric Biotechnol* 14:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.012>
- Pedone-Bonfim MVL, da Silva FSB, Maia LC (2015) Production of secondary metabolites by mycorrhizal plants with medicinal or nutritional potential. *Acta Physiol Plant* 37:27. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1781-3>
- Plouznikoff K, Asins MJ, de Boulois HD et al (2019) Genetic analysis of tomato root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Ann Bot*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy240>
- Porrás-Soriano A, Soriano-Martín ML, Porrás-Piedra A, Azcón R (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *J Plant Physiol* 166:1350–1359. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.02.010>
- Rao A, Rao L (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* 55:207–216. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
- Rho H, Van Epps V, Kim S-H, Doty SL (2020) Endophytes increased fruit quality with higher soluble sugar production in honeycrisp apple (*Malus pumila*). *Microorganisms* 8:699. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050699>
- Richardson AE, Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol* 156:989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>
- Rodriguez E, Wrangham R (1993) Zoopharmacognosy: The Use of Medicinal Plants by Animals. In: Downum KR, Romeo JT, Stafford HA (eds) *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Springer, US, Boston, MA, pp 89–105
- Sabatino L, Iapichino G, Consentino BB et al (2020) Rootstock and arbuscular mycorrhiza combinatorial effects on eggplant crop performance and fruit quality under greenhouse conditions. *Agronomy* 10:693. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050693>
- Sabia E, Claps S, Morone G et al (2015) Field inoculation of arbuscular mycorrhiza on maize (*Zea mays* L.) under low inputs: preliminary study on quantitative and qualitative aspects. *Ital J Agronomy* 10:30. <https://doi.org/10.4081/ija.2015.607>
- Saini I, Aggarwal A, Kaushik P (2019) Inoculation with mycorrhizal fungi and other microbes to improve the morpho-physiological and floral traits of *Gazania rigens* (L.) Gaertn. *Agriculture* 9:51. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030051>
- Salvioli A, Zouari I, Chalot M, Bonfante P (2012) The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit. *BMC Plant Biol* 12:44. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-44>
- Saleh AM, Abdel-Mawgoud M, Hassan AR et al (2020) Global metabolic changes induced by arbuscular mycorrhizal fungi in oregano plants grown under ambient and elevated levels of atmospheric CO₂. *Plant Physiol Biochem* 151:255–263. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.026>
- Seeram NP (2008) Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem* 56:627–629. <https://doi.org/10.1021/jf071988k>
- Sha Z, Watanabe T, Chu Q et al (2019) A reduced phosphorus application rate using a mycorrhizal plant as the preceding crop maintains soybean seeds' nutritional quality. *J Agric Food Chem* 67:32–42. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05288>
- Sharmeen JB, Mahomoodally FM, Zengin G, Maggi F (2021) Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules* 26:666. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>
- Sheeran P, Gollwitzer PM, Bargh JA (2013) Nonconscious processes and health. *Health Psychol* 32:460–473. <https://doi.org/10.1037/a0029203>
- Shridhar BS (2012) Review: nitrogen fixing microorganisms. *Int J Microbiol Res* 3:46–52. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103>
- Sellitto VM, Golubkina NA, Pietrantonio L et al (2019) Tomato yield, quality, mineral composition and antioxidants as affected by beneficial microorganisms under soil salinity induced by balanced nutrient solutions. *Agriculture* 9:110. <https://doi.org/10.3390/agriculture9050110>
- Sinclair G, Charest C, Dalpé Y, Khanizadeh S (2014) Influence of colonization by arbuscular mycorrhizal fungi on three strawberry cultivars under salty conditions. *AFSci* 23:146–158. <https://doi.org/10.23986/afsci.9552>
- Singh R, Divya S, Awasthi A, Kalra A (2012) Technology for efficient and successful delivery of vermicompost colonized bioinoculants

- in *Pogostemon cablin* (patchouli) Benth. *World J Microbiol Biotechnol* 28:323–333. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0823-2>
- Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 23:136–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>
- Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P (2006) Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Sci Hortic* 107:245–253. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.07.006>
- Sun X-G, Tang M (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on root traits and root volatile organic compound emissions of *Sorghum bicolor*. *S Afr J Bot* 88:373–379. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.09.007>
- Tavasolee A, Aliasgharzad N, SalehiJouzani G et al (2011) Interactive Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobial Strains on Chickpea Growth and Nutrient Content in Plant 10:7585–7591. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2412>
- Todeschini V, AitLahmidi N, Mazzucco E et al (2018) Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatiles. *Front Plant Sci* 9:1611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01611>
- Tong Y, Gabriel-Neumann E, Ngwene B et al (2013) Effects of single and mixed inoculation with two arbuscular mycorrhizal fungi in two different levels of phosphorus supply on β -carotene concentrations in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) tubers. *Plant Soil* 372:361–374. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1708-y>
- Torres H, Antolín G (2019) Aminoacids and flavonoids profiling in Tempranillo berries can be modulated by the arbuscular mycorrhizal fungi. *Plants* 8:400. <https://doi.org/10.3390/plants8100400>
- Torres N, Antolín MC, Garmendia I, Goicoechea N (2018) Nutritional properties of Tempranillo grapevine leaves are affected by clonal diversity, mycorrhizal symbiosis and air temperature regime. *Plant Physiol Biochem* 130:542–554. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.004>
- Torri L, Migliorini P, Masoero G (2013) Sensory test vs. electronic nose and/or image analysis of whole bread produced with old and modern wheat varieties adjudanted by means of the mycorrhizal factor. *Food Res Int* 54:1400–1408. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.045>
- Turrini A, Avio L, Giovannetti M, Agnolucci M (2018) Functional complementarity of arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota: the challenge of translational research. *Front Plant Sci* 9:1407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>
- Ulrichs C, Fischer G, Büttner C, Mewis I (2008) Comparison of lycopene, β -carotene and phenolic contents of tomato using conventional and ecological horticultural practices, and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Agronomía Colombiana* 26:40–46
- Vafadar F, Amooaghaie R, Otroshy M (2014) Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *J Plant Interact* 9:128–136. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>
- Vangelisti A, Natali L, Bernardi R et al (2018) Transcriptome changes induced by arbuscular mycorrhizal fungi in sunflower (*Helianthus annuus* L.) roots. *Sci Rep* 8:4. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18445-0>
- Velásquez A, Vega-Celedón P, Fiaschi G et al (2020) Responses of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon roots to the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* and the plant growth-promoting rhizobacterium *Ensifer meliloti* include changes in volatile organic compounds. *Mycorrhiza* 30:161–170. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00933-3>
- Verpoorte R, Contín A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1:13–25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
- Walter MH, Floss DS, Strack D (2010) Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* 232:1–17. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1156-3>
- Wang F, Shi Z (2019) Arbuscular mycorrhiza enhances biomass production and salt tolerance of sweet sorghum. *Microorganisms* 7:289. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090289>
- Wezel A, Casagrande M, Celette F et al (2014) Agroecological practices for sustainable agriculture. *A Review Agron Sustain Dev* 34:1–20. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0180-7>
- Zhu X, Song F, Liu F (2016) Altered amino acid profile of arbuscular mycorrhizal maize plants under low temperature stress. *J Plant Nutr Soil Sci* 179:186–189. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400165>
- Zouari I, Salvioli A, Chialva M et al (2014) From root to fruit: RNA-Seq analysis shows that arbuscular mycorrhizal symbiosis may affect tomato fruit metabolism. *BMC Genomics* 15:221. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-221>
- Zsoldos I, Sinding C, Godet A, Chamberon S (2021) Do food odors differently influence cerebral activity depending on weight status? An electroencephalography study of implicit olfactory priming effects on the processing of food pictures. *Neuroscience* 460:130–144. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.01.015>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Les couverts végétaux

Un atout majeur pour réduire les intrants de synthèse et augmenter les services écosystémiques au vignoble

Pierre-Antoine Noceto¹, Mathilde Hériché¹, Jérôme Fromentin¹, Vittorio Rossi², Širca Saša³, Aurora Ranca⁴, Kehrlí Patrik⁵, Josep Armengol⁶, Sophie Trouvelot¹, Diederik van Tuinen¹, Pierre-Emmanuel Courty¹, Daniel Wipf¹

¹ Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Univ. Bourgogne – Univ. Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

² Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza – Italie.

³ Plant Protection Department, Agricultural Institute of Slovenia – Ljubljana – Slovénie.

⁴ S.C.D.V.V. Murfatlar – Murfatlar – Constanta – Roumanie.

⁵ Agroscope – Nyon – Suisse.

⁶ Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM) – Universitat Politècnica de València (UPV) – Valencia – Espagne.

De manière générale, un couvert végétal se définit par une espèce ou une communauté d'espèces végétales recouvrant le sol de manière permanente ou temporaire. L'agriculteur a la possibilité de semer ces couverts, selon un choix raisonné, ou bien de laisser la végétation spontanée se développer. Il existe 3 types de couverts semés avec des objectifs différents pour l'exploitant :

- le couvert hivernal, installé pour faire face au phénomène d'érosion du sol important pendant cette période de repos végétatif ;
- les engrais verts, installés avec l'objectif d'amender naturellement la

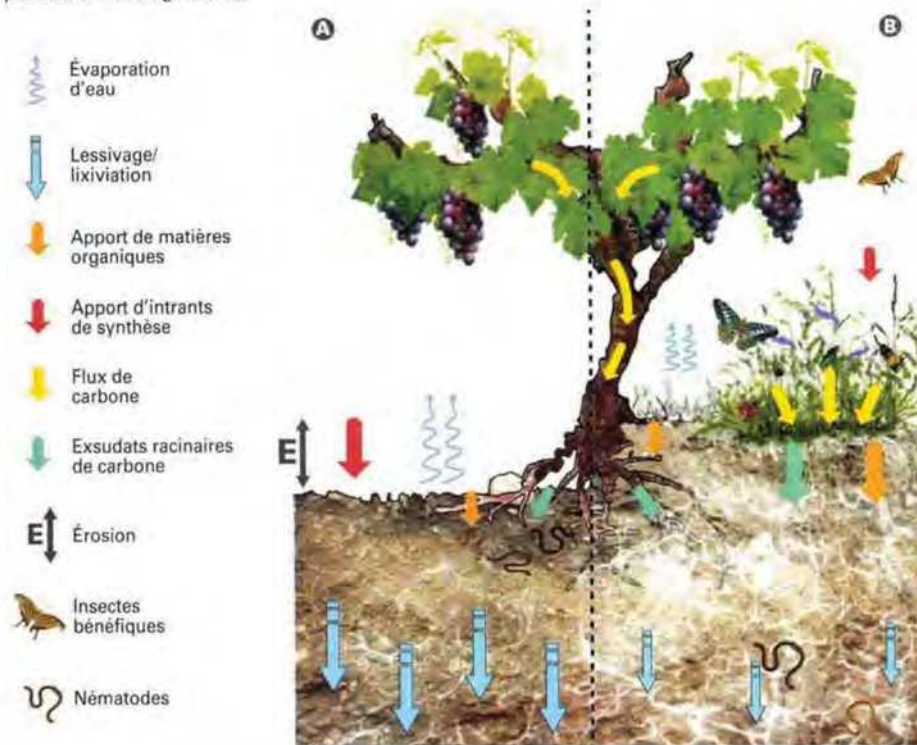
parcelle, en détruisant et en enfouissant les résidus du couvert qui libèrent ainsi de la matière organique plus ou moins rapidement, qui servira à alimenter la plante au cycle suivant, après des étapes de minéralisation ;

- les cultures intermédiaires pièges à nitrate (CIPAN), installées au tout début de l'automne

pour capter dans le sol les nitrates en excès et des quantités d'eau importantes dans le but de limiter la lixiviation et la contamination des eaux souterraines et de surfaces par les nitrates.

Les couverts et leurs intérêts en production végétale

■ Figure 1 : Comparaison du fonctionnement de l'écosystème vignoble en A absence ou B présence d'un couvert. La présence d'un couvert permet : (i) de réduire l'érosion du sol, les lessivages des particules, la lixiviation des nitrates et les pertes d'eau par évaporation ; (ii) de stimuler la croissance des champignons mycorhiziens à arbuscules et du réseau mycélien commun (RMC) (figure 2) ; (iii) de diminuer l'apport d'engrais de synthèse par une meilleure circulation/mobilisation des nutriments via le RMC, et par une augmentation de l'apport de matière organique ; (iiii) de diminuer l'apport de pesticides par l'effet répulsif sur certains parasites de la vigne (par les exsudats du couvert ou via le RMC et les mycorhizes à arbuscules), et l'attraction d'insectes bénéfiques (pollinisateurs, prédateurs de ravageurs, ...).



Les espèces végétales les plus couramment utilisées dans ces couverts font essentiellement partie de trois familles présentant chacune différents avantages quant à leur utilisation. Nous retrouvons :

- les graminées (avoine, seigle, ray grass, brome, fétuque, orge...), avantageuses avec un rapport C/N élevé, produisent une biomasse (figure 1) importante bénéfique lors de la destruction.
- les brassicacées (anciennement « crucifères ») (moutarde, navette fourragère, radis chinois, colza fourragère...) servent couramment de « pompe à azote » mais aussi de biofumigateur (figure 1), ce qui peut avoir un impact négatif sur certains champignons mycorhiziens si la proportion est trop importante. Elles présentent l'avantage de s'implanter rapidement, empêchant le développement important des adventices (appelées également fréquemment mauvaises herbes).
- les légumineuses (vesce, fève-rolle, trèfle, luzerne...) sont de plus en plus utilisées, seules ou en mélange, pour leur capacité à réaliser une symbiose avec des

bactéries du sol, leur permettant ainsi de fixer le diazote atmosphérique. Avec un rapport C/N alors très faible, le relargage de l'azote assimilé et des nutriments se fait très rapidement, et ceux-ci deviennent donc disponibles pour la culture.

Les plantes de couvert sont fortement plébiscitées en polyculture pour couvrir les parcelles lorsqu'elles ne sont pas utilisées par une culture d'intérêt. L'utilisation de ces couverts d'interculture s'est développée notamment pour contrer des phénomènes de battance et d'érosion des sols, qualifiés d'anthropogènes car liés à l'exploitation, parfois intensive, des milieux agricoles et à la destruction de la couverture végétale naturelle.

L'installation d'une couverture végétale apporte d'autres bénéfices à une parcelle (figure 1). En premier lieu, le couvert, par l'action mécanique de ses racines, améliore la structure du sol (figure 1). De plus, par l'agrégation des particules du sol, il permet la rétention de l'eau et des éléments minéraux nécessaires à la croissance de la culture d'intérêt et des plantes du couvert (figure 2).

On observe une augmentation du taux de matière organique par la séquestration du carbone dans le sol et l'apport de biomasse du couvert à sa destruction entraînant une réduction des besoins en engrais de synthèse. La présence d'un couvert et d'une diversité végétale importante crée un meilleur équilibre dans les relations trophiques au sein de l'agroécosystème par l'attraction d'une micro et d'une macrofaune diverses (figure 1) qui influencent directement et indirectement les parasites et ravageurs potentiels des cultures. De ce fait, le couvert joue un rôle prépondérant dans le biocontrôle par l'attraction et la protection d'insectes pollinisateurs ou de prédateurs de ravageurs. La sélection des plantes composant un couvert permet, via des actions répulsives ou promotrices, la gestion

■ **Figure 2: Le réseau mycélien commun (RMC) est formé entre les pieds de vigne et les plantes du couvert, connectés par les hyphes des champignons mycorhiziens à arbuscules associés.** Ce réseau permet l'échange (flèches) de nutriments et de signaux (ex.: composés organiques volatils) entre plantes de même espèce ou d'espèces différentes.



des micro-organismes du sol (bénéfiques et/ou pathogènes). Le couvert participe notamment au développement des champignons mycorhiziens, à la formation et au maintien d'un réseau mycélien commun (RMC) entre les plantes de services et la culture d'intérêt (figure 2).

Quelles stratégies de couverture sont adaptées à la viticulture ?

Dans les vignobles français, la pratique d'un enherbement des parcelles même temporaire, est moins répandue qu'en grandes cultures. Toutefois, en 2010, près de 50 % des surfaces viticoles étaient enherbées (source : Agreste), ce qui révèle l'intérêt grandissant des viticulteurs pour cette pratique. L'Alsace et le Sud-Ouest sont les deux vignobles français où l'enherbement est courant (plus de 80 % des surfaces plantées sont enherbées). En revanche, les vignes de Champagne et du Sud-Est de la France (Provence et Languedoc-Roussillon) sont les moins concernées avec moins de 1/4 des parcelles enherbées. Les vignobles convertis en agriculture biologique prennent une part importante des exploitations utilisant les plantes de couvert. La couverture végétale d'une

parcelle peut être permanente ou temporaire, totale ou partielle (sous le rang uniquement, un interrang sur deux ou bien tous les interrangs). Dans tous les cas, la clé de voûte d'un bon enherbement est sa composition spécifique. Il n'existe pas d'espèce miracle mais plutôt une multitude d'associations d'espèces végétales adaptées aux objectifs des viticulteurs, avec des avantages et des inconvénients. Pour cause, les services écosystémiques rendus par le couvert à la vigne sont directement dépendants de la présence et de l'abondance des différentes espèces de plantes appartenant aux trois familles précédemment citées dans cet article. De plus, les caractéristiques de la parcelle et les objectifs du viticulteur (lutte contre l'érosion, impact sur la structure du sol, apport de matière organique, concurrence avec les adventices, stimulation de la mycorhization de la vigne...) doivent être pris en compte dans la sélection des espèces de couverture.

Outre les nombreuses possibilités d'un couvert semé, laisser la végétation naturelle se développer est une solution d'enherbement qui peut paraître intéressante et peu coûteuse pour le viticulteur. Cette méthode est par ailleurs fortement utilisée en arboriculture. Les espèces végétales composant ce type d'enherbement sont en général adaptées aux conditions pédoclimatiques de la parcelle mais elles ne sont pas toujours compatibles ou bénéfiques à la production viticole.

Après le choix des espèces végétales vient l'étape de semis, qui est réalisé de préférence à l'automne juste après les vendanges et avant une période de pluie afin d'améliorer la germination des graines. Le semis à la volée est envisageable mais il est le plus souvent réalisé avec des semoirs adaptés des grandes cultures, même si de plus en plus de matériels spécifiques à la vigne arrivent sur le marché. La présence d'un couvert oblige les viticulteurs à procéder à un entretien régulier et un désherbage du rang et de l'interrang, mécaniquement ou chimiquement. Lorsque le couvert n'est pas entretenu, la végétation peut devenir trop importante et engendrer une concurrence pour l'eau et les nutriments vis-à-vis de la vigne, pouvant affecter la vigueur et les rendements de la vigne. La gestion de l'enherbement passe généralement soit par des tontes régulières soit par la destruction de celui-ci, notamment par un couchage ou un roulage de la végétation additionné d'un labour pour enfouir les résidus. Dans certaines régions, le gel permet une destruction efficace du couvert, laissant alors à



l'exploitant uniquement le soin de l'enfouissement des résidus. Pour un enherbement temporaire, la destruction de la couverture végétale est réalisée fin avril pour les couverts hivernaux jusqu'au début de l'été pour des couverts plus tardifs. L'utilisation d'herbicides pour le désherbage sous le rang et la destruction du couvert dans l'interrang est parfois préférée.

Biovine un projet multidisciplinaire pour l'optimisation des couverts au vignoble en Europe

Le projet européen CORE Organic Cofund Biovine (2018-2021, <https://www.biovine.eu>, **figure 3**) vise à augmenter certains services écosystémiques, que les couverts pourraient rendre en les intégrant dans de nouveaux systèmes viticoles. Les objectifs sont d'augmenter la diversité végétale au sein et autour des vignobles (cultures de couverture, haies...) en plantant des espèces végétales sélectionnées pour lutter naturellement contre les pathogènes telluriques et foliaires, et ainsi, réduire la dépendance aux pesticides. En effet, la capacité des plantes à accroître la résistance de l'écosystème aux ravageurs et aux espèces envahissantes est un service écosystémique bien connu. Cependant, les vignobles n'exploitent pas encore (ou pas suffisamment) le potentiel de la diversité végétale. De nouveaux systèmes viticoles végétaux seront conçus, suivant un cycle de conception-évaluation-ajustement, et testés en France, mais aussi en Espagne, en Italie, en Roumanie et en Suisse. Ces systèmes viticoles innovants devraient améliorer la lutte contre

■ Encadré 1 : Les services rendus par la mycorhize au vignoble.

La mycorhization de la vigne est un atout majeur pour la vigueur et la santé du cep. La symbiose avec les champignons mycorhiziens à arbuscules permet :

- d'améliorer l'accessibilité de la vigne aux nutriments (azote, phosphore...) et à l'eau du sol par l'augmentation du volume de sol exploré (au moins 40 fois);
- d'augmenter la tolérance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité, la chlorose ferreuse et à la toxicité des métaux lourds;
- de protéger la vigne contre des pathogènes, notamment racinaires, comme le champignon *Armillaria* responsable du pourridié ou le nématode *Xiphinema index* vecteur du virus du court noué, via des phénomènes de compétition et d'induction des défenses systémiques de la plante.

Cette symbiose est également bénéfique pour le vignoble dans son ensemble, la présence de champignons mycorhiziens permettant :

- d'accroître la stabilité du sol via la production de glycoprotéines et le développement d'un réseau d'hyphes très dense;
- de réduire l'utilisation d'intrants de synthèse (fertilisants et pesticides).

(pour plus d'informations : cf. Courty et al., *Revue des Œnologues* n° 169 Spécial, p. 25-27).

les ravageurs, tout en influençant positivement la biodiversité fonctionnelle et les services écosystémiques. La qualité des services rendus par ces systèmes

innovants offrira des itinéraires technico-économiques plus favorables aux viticulteurs (ex. réduction de leur dépendance aux pesticides).



■ **Encadré 2 : Actions et partenaires du projet Biovine (figure 3).**

Pour conduire à bien ce projet, un partenariat international transdisciplinaire a été défini. Ce consortium est constitué de spécialistes scientifiques :

- de la mycorhize à arbuscules et des services écosystémiques rendus par celles-ci, de l'UMR Agroécologie, INRAE Dijon;
- de la conception et de la modélisation de nouveaux itinéraires de cultures, de l'Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italie;
- du contrôle des pathogènes telluriques, et notamment des nématodes, du Plant Protection Department, Ljubljana, Slovénie;
- du test et de la validation au vignoble de nouveaux itinéraires de culture, Constanta, Roumanie;
- de la lutte contre les arthropodes de l'Agroscope, Nyon, Suisse;
- des pathogènes foliaires de la vigne, de l'Instituto Agroforestal Mediterráneo de Valence, Espagne.

Il s'appuie sur un partenariat fort avec des viticulteurs d'Espagne, France, Italie, Roumanie, Slovénie et Suisse, qui mettent leurs parcelles à disposition du projet. ■

Approches et impacts attendus

Le contrôle des parasites de la vigne est un des défis les plus importants, notamment pour la viticulture biologique. Un contrôle insuffisant peut conduire à l'abandon de ce type de pratique (biologique), empêchant ainsi l'accès à un marché en pleine expansion. Les recherches effectuées durant le projet Biovine visent à :

- fournir aux viticulteurs des stratégies basées sur la diversité des plantes de couvert qui permettent le contrôle du développement des pathogènes et la réduction de l'utilisation de pesticides dans les vignobles;
- identifier et étudier les plantes candidates conduisant à une amélioration de la diversité fonctionnelle dans les vignobles;
- développer de nouvelles stratégies pour le contrôle des pathogènes de la vigne;
- tester de nouveaux itinéraires de cultures dans des vignobles européens (Espagne, France, Italie, Roumanie, Slovénie et Suisse);
- estimer l'effet des nouveaux itinéraires viticoles sur les services écosystémiques.

Pour développer ces approches, le projet Biovine est structuré en 7 tâches (figure 3):

- T1: gestion du projet et dissémination des résultats;
- T2: contrôle des arthropodes nuisibles;
- T3: contrôle des pathogènes d'origine tellurique;
- T4: augmentation de la résistance des plantes par l'intermédiaire des champignons mycorhiziens à arbuscules.
- T5: contrôle des pathogènes foliaires;
- T6: approche innovante des systèmes viticoles;
- T7: essai des itinéraires viticoles innovants.

Les couverts végétaux utilisés dans le projet Biovine

Dans le projet Biovine, les partenaires identifieront et sélectionneront des plantes potentiellement intéressantes pour leurs capacités à contrôler les arthropodes nuisibles, à limiter les pathogènes d'origine tellurique (Oomycètes, champignons, nématodes), et à promouvoir le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules et valoriser leurs services rendus au vignoble (Courty et al., *Revue des Œnologues* n° 169 spécial, p. 25-27). L'ensemble des espèces sélectionnées (sur la base des critères mentionnés dans cet article et des mélanges commerciaux existants) fera l'objet d'essais au vignoble. ■

Les couverts végétaux

Partie 1/2: Une pratique agroécologique au service de la vigne

Pierre-Antoine Noceto¹, Mathilde Hériché¹, Laure Gontier², Daniel Wipf¹, Benoît Bazerolle³, Jean-Yves Cahurel⁴, Pierre-Emmanuel Courty¹

¹ Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Université de Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

² Institut français de la vigne et du vin – Pôle Sud-Ouest – V'innopôle – Lisle-sur-Tarn – France.

³ Agricultures & Territoires – Chambre d'agriculture de Côte-d'Or – Bretenière – France.

⁴ Institut français de la vigne et du vin – Pôle Bourgogne, Beaujolais, Jura, Savoie – Villefranche-sur-Saône – France.

Les couverts végétaux sont couramment utilisés en tant que cultures intermédiaires, intégrant pleinement les plans de rotation en tant qu'interculture des cultures annuelles (ex.: céréales) et en tant que cultures intercalaires dans le cadre des cultures pérennes (ex.: vergers, vigne). Ce type de culture a fait l'objet de dénominations différentes au cours des dernières décennies comme « engrais vert », en référence à sa contribution à la fertilité des sols, ou « CIPAN » (Culture intermédiaire piège à nitrate), et dernièrement « CIMS » (Cultures intermédiaires/intercalaires multiservices) (Justes et Richard, 2017). Les plantes de couvert sont cultivées, non pas dans un objectif de production mais dans un objectif de promotion et de valorisation des services écosystémiques au sein de l'exploitation agricole. Parmi ceux-ci, le couvert permet notamment à l'agriculteur de limiter l'impact des intempéries sur ses parcelles, de favoriser les relations trophiques et limiter la pression des ravageurs et des insectes, ou encore de réduire l'utilisation des intrants de synthèse et notamment des herbicides. En viticulture, l'enherbement est pratiqué depuis les années 1990, pour des raisons environnementales et sociétales, mais également

avec une volonté d'améliorer la qualité du vin. Cependant, une méconnaissance et une mauvaise gestion de l'enherbement peuvent engendrer une concurrence sur la vigne, qui peut être très préjudiciable en fonction de la fertilité initiale du sol, de la réserve hydrique et de la vigueur du matériel végétal. Il convient donc de bien penser son couvert afin de le réussir et de valoriser les services écosystémiques rendus par celui-ci (encadré 1).

Valorisation des services écosystémiques et de la biodiversité

Les plantes de couvert implantées dans les systèmes agricoles et viticoles sont pourvoyeuses de nombreux services écosystémiques (figure 1). La présence d'une diversité végétale importante fournit par exemple un service culturel lié à l'écotourisme, ainsi qu'à l'aménagement et l'organisation des paysages. À l'échelle de la parcelle, le couvert végétal offre un maillage racinaire dense qui améliore la stabilité structurale du sol et limite, sur les terrains prédisposés, les phénomènes d'érosion. De même, lors d'épisodes pluvieux intenses, la présence des parties aériennes du couvert limite l'impact physique de l'eau sur la surface du sol. Dans l'horizon supérieur du sol, la lixiviation des éléments minéraux est fortement atténuée par cette augmentation de la stabilité

structurale des sols, qui améliore également la retenue, au sein des microagrégats, des molécules d'eau et des éléments nutritifs accessibles aux plantes. Par ailleurs, une augmentation de la diversité végétale permet d'améliorer les relations trophiques au sein de l'agrosystème. Pour cause, la couverture végétale est un excellent support pour la biodiversité en fournissant le gîte et le couvert à la faune locale (insectes bénéfiques et pollinisateurs) et permet le maintien des services écosystémiques liés à cette dernière. D'autre part, certaines espèces de plantes peuvent diminuer la pression exercée par des ravageurs. C'est notamment le cas de la tagète, dont les exsudats racinaires sont nématicides (Bano et al., 2019). De plus, la composition spécifique du couvert permanent, et dans une moindre mesure du couvert temporaire, impacte également la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes des sols.

Promotion des symbioses racinaires et influence du couvert sur le cycle des nutriments

La matière organique est une source de nourriture indispensable aux microorganismes. À côté de son rôle biologique direct, la matière organique joue un rôle physique (ex.: structure, rétention en eau) et chimique (ex.: stockage d'éléments minéraux,

■ Encadré 1 : Quelle stratégie d'enherbement en viticulture ?

L'enherbement en viticulture se concentre généralement sur les interrangs, mais peut être également implanté sous le rang (Gontier et al., 2019). Plusieurs stratégies d'enherbement peuvent être choisies par les viticulteurs selon leurs objectifs et leurs contraintes de production :

– **l'enherbement permanent spontané** présente comme avantages le développement d'espèces naturellement présentes et adaptées aux parcelles, ainsi qu'un coût fortement réduit (consacré au seul entretien de la couverture végétale). Cependant, le viticulteur n'a alors pas de « contrôle » sur l'installation des espèces. L'itinéraire de culture précédent, ainsi qu'un désherbage, mécanique et/ou chimique, peuvent avoir sélectionné des espèces végétales à croissance rapide, voire invasives, dont le développement peut engendrer une concurrence forte pour l'accès à l'eau et aux nutriments ;

– **l'enherbement permanent semé** permet d'adapter le choix des espèces aux conditions pédoclimatiques de la parcelle et surtout à un niveau de concurrence acceptable vis-à-vis de la vigne. Le coût du semis peut être un frein ; selon la pérennité des espèces semées, il sera à renouveler à plus ou moins longue échéance afin de limiter le « salissement de la parcelle » ;

– **l'enherbement temporaire spontané** permet des stratégies adaptatives. Cet enherbement ne demandant pas d'investissement pour sa mise en place, il peut être plus facilement détruit « à la demande », sur tout ou une partie de la parcelle ; par exemple, si la contrainte hydrique devenait trop élevée ;

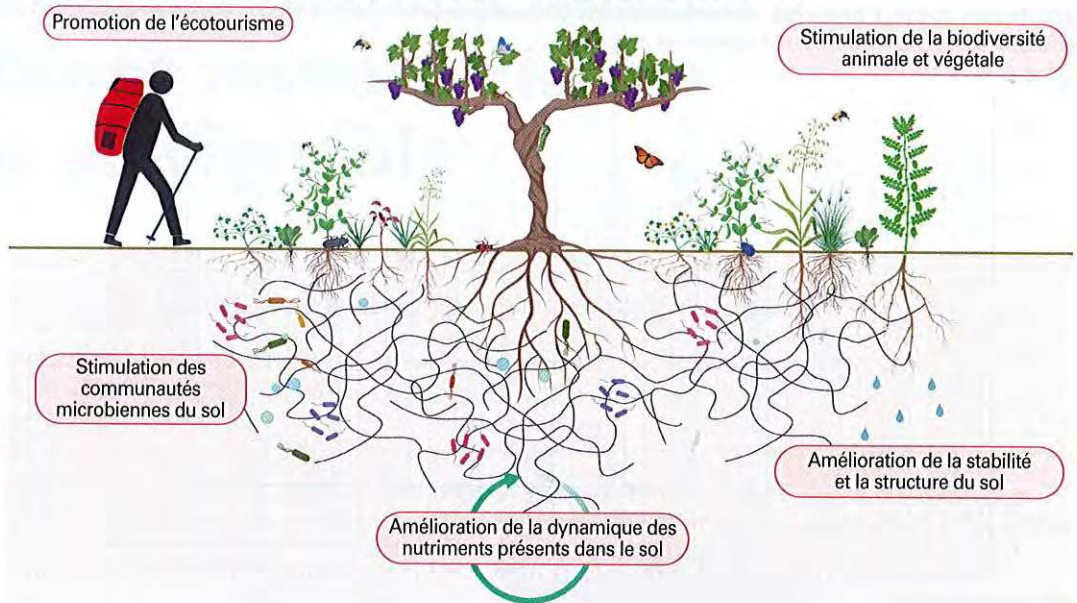
– **l'enherbement temporaire semé** permet l'installation d'un panel choisi d'espèces végétales adaptées aux objectifs du viticulteur ; la sélection des plantes de couvert se faisant sur les paramètres pédoclimatiques du vignoble et les services apportés par les plantes. Il est par exemple possible d'installer un couvert de type engrais vert, enrichi en légumineuses pour apporter de l'azote à la parcelle, ou bien des plantes à haut potentiel mycorhizien. Un entretien régulier et un équipement spécial peuvent être nécessaires pour permettre une bonne gestion de ce couvert. ■

complexation d'éléments). En augmentant les teneurs en matière organique et en améliorant l'aération du sol, l'enherbement stimule sensiblement le développement de la biomasse microbienne. Le feutrage racinaire du couvert végétal des premiers horizons du sol joue un rôle de limitation du compactage et de source de matière organique, créant ainsi un biotope très favorable au développement de la flore et de la faune.

Les microorganismes bénéfiques du sol comme certaines bactéries et champignons participent activement à la dynamique des nutriments dans le sol, aux processus de minéralisation de la matière organique, facilitent le mouvement des nutriments essentiels et leur accessibilité à la vigne (**figure 1**). Ces mécanismes se caractérisent par des relations symbiotiques mutualistes, intimes, entre les plantes et les microorganismes du sol. Dans le cadre des couverts végétaux, deux symbioses sont importantes : la symbiose mycorhizienne à arbuscules largement répandue chez les plantes terrestres et la symbiose rhizobienne, spécifique aux légumineuses.

La symbiose mycorhizienne à arbuscules est une association à bénéfices réciproques entre les champignons mycorhiziens à arbuscules (*Glomeromycota*) et les racines des plantes. Cette symbiose concerne plus de 80 % des végétaux, dont la majorité des plantes cultivées, comme la vigne. Les hyphes du champignon permettent d'augmenter l'accessibilité de la plante à l'eau et aux différents nutriments (ex. : phosphore, azote) (*Trouvelot*

■ **Figure 1 : Services écosystémiques rendus par le couvert en viticulture.**



et al., Revue des Œnologues, n° 178, pages 27-29).

La symbiose rhizobienne est mise en place entre les racines de plantes de la famille des légumineuses et les bactéries du genre *Rhizobia*. Ces bactéries ont la capacité de fixer le di-azote (N_2) atmosphérique, de le modifier et de le transférer à la plante sous une forme assimilable (NO_3^-) (*Courty et al., 2015*).

Dans le cas des cultures pérennes comme la vigne, le couvert végétal permet de maintenir les relations avec ces microorganismes et les services rendus par ces derniers, notamment pendant la période de repos hivernal de la vigne.

Récemment, plusieurs essais ont été mis en place par l'UMR Agroécologie (INRAE Dijon Bourgogne Franche-Comté, Université de Bourgogne) dans le cadre du projet européen Core Organic Biovine, pour déterminer l'impact des couverts végétaux

sur les communautés microbiennes et les champignons mycorhiziens associés à la vigne. Les champignons mycorhiziens à arbuscules ayant la capacité de coloniser les racines de plantes d'espèces différentes, ces essais visent à identifier parmi un large panel d'espèces végétales (enherbement spontané, engrais vert, couvert semé) les espèces compagnes qui pourraient avoir un effet bénéfique sur la vigne (nutrition, protection) (*Hao et al., 2012*) au travers d'un réseau mycélien commun. Ces plantes pourraient, par exemple, être un réservoir de diversité de champignons mycorhiziens avec lesquels la vigne pourrait interagir au cours de son cycle de développement et bénéficier des services rendus par la mycorhize à arbuscules (*Noceto et al., Revue des Œnologues n° 175, pages 14-17*). À terme, l'objectif sera de pouvoir fournir aux acteurs de la profession, des clés permettant, dans le cadre d'une gestion agroécologique, de choisir une stratégie pour l'implantation d'un couvert végétal dans leurs parcelles, afin de dynamiser les communautés mycorhiziennes présentes dans les vignobles et augmenter les services écosystémiques rendus par ces dernières. Les résultats préliminaires obtenus en conditions contrôlées (**figure 2**) montrent que chaque espèce, mais aussi chaque famille de plante, présente une mycorhization différente. Ainsi, la famille des *Fabaceae* (ex. : trèfles, luzernes, vesces) présente les taux de mycorhization les plus élevés (supérieurs à 65 %). Au contraire, les *Poaceae* (ex. : avoine, seigle) ont des taux de mycorhization plus faibles (inférieurs à 50 %). Les abondances en arbuscules (structures d'échanges entre le champignon et la plante) dans les racines suivent les mêmes tendances. Comme attendu, certaines familles de plantes telles que les *Brassicaceae* (ex. : radis fourrager, moutarde), les *Chenopodiaceae* (ex. : amarante, chénopode blanc) ou les *Boraginaceae* (ex. : phacélie,



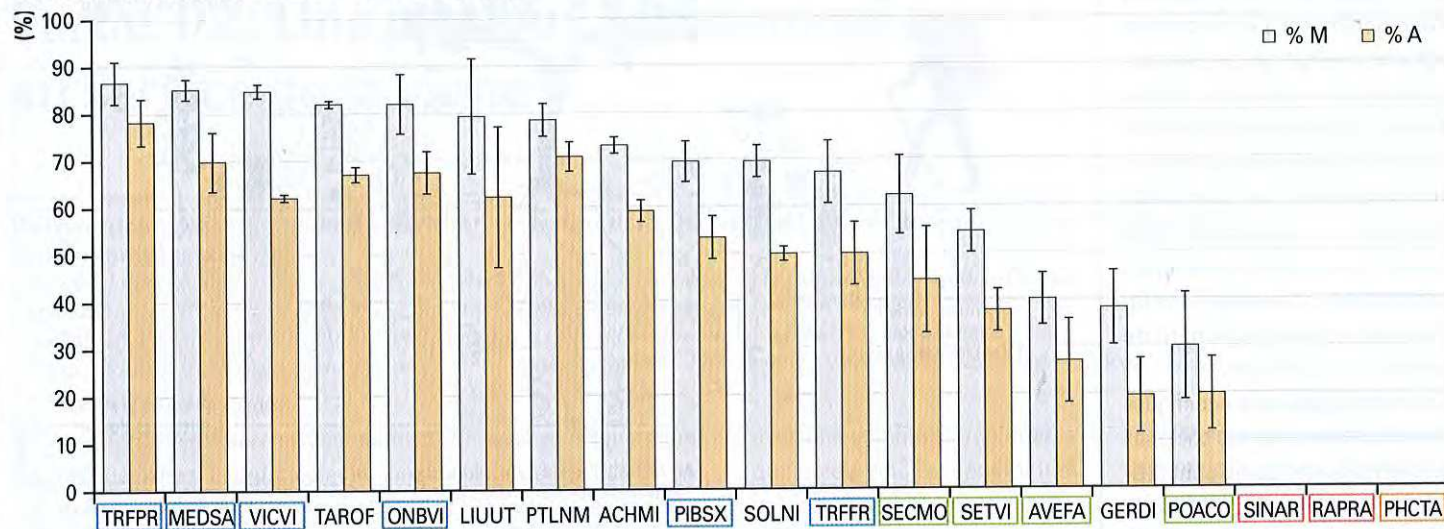
Château Pontus de Tyard
ses vignes conservatoires, son vin

Les actes des Journées Pontus de Tyard*
« Biodiversité et patrimoine viticoles »
de 2012 à 2019 sont disponibles

* Journées organisées par l'association Renaissance du château Pontus de Tyard, Le Jardin des Sciences et la Chaire Unesco Culture et Tradition du vin.

Pour les éditions papier ou téléchargeables, consulter :
www.pontus-de-tyard.com

■ **Figure 2: Pourcentages de racines colonisées (barres grises) et pourcentages d'arbuscules (barres jaunes) dans les racines de plantes de couvert cultivées en serre pendant 60 jours en présence du champignon mycorhizien *Rhizophagus irregularis*.** Mesures effectuées selon la méthode de Trouvelot *et al* (1986).



Code EPPO: ACHMI = *Achillea millefolium* (Asteraceae); AVEFA = *Avena fatua* (Poaceae); GERDI = *Geranium dissectum* (Geraniaceae); LIUUT = *Linum usitatissimum* (Linaceae); MEDSA = *Medicago sativa* (Fabaceae); ONBVI = *Onobrychis viciifolia* (Fabaceae); PHCTA = *Phacelia tanacetifolia* (Boraginaceae); PIBSX = *Pisum sativum* (Fabaceae); POACO = *Poa compressa* (Poaceae); PTLNM = *Potentilla neumaniana* (Rosaceae); RAPRA = *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae); SECMO = *Secale montanum* (Poaceae); SETVI = *Setaria viridis* (Poaceae); SINAR = *Sinapsis arvensis* (Brassicaceae); SOLNI = *Solanum nigrum* (Solanaceae); TAROF = *Taraxacum officinale* (Asteraceae); TRFFR = *Trifolium fragiferum* (Fabaceae); TRFPR = *Trifolium pratense* (Fabaceae); VICVI = *Vicia villosa* (Fabaceae).

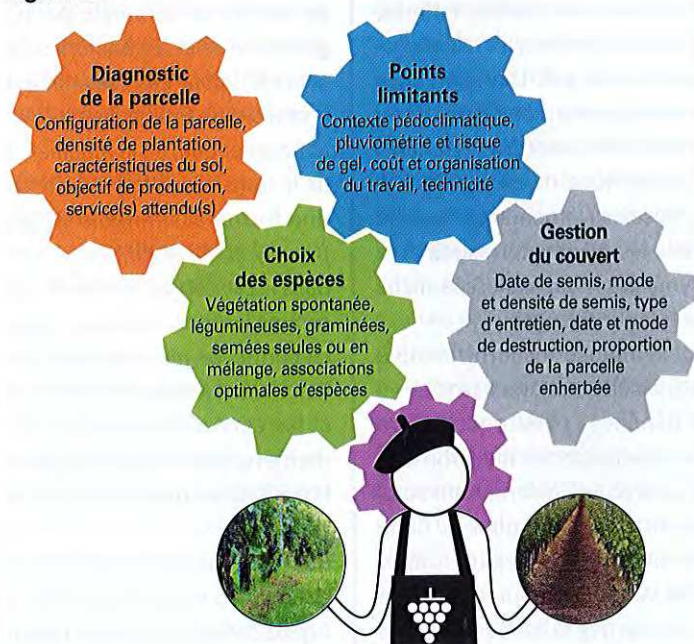
bourache officinale) ne forment aucune structure mycorhizienne (figure 2). Chez les plantes communément classées comme adventices en agronomie, nous observons que plusieurs d'entre elles (ex. : pissenlit, achillée) sont capables d'interagir fortement avec les champignons mycorhiziens, parfois même plus que certains couverts couramment utilisés, suggérant un rôle important de réservoirs de biodiversité fongique au vignoble pour ces plantes.

Des expérimentations actuellement menées en vignoble viseront à déterminer, grâce à des outils de biologie moléculaire, l'impact du couvert sur l'identité et l'organisation des communautés de champignons mycorhiziens associées à la fois aux ceps et aux plantes de couvert.

Conclusion

Les différentes études menées depuis plusieurs années montrent qu'à côté de pratiques agricoles vertueuses, certaines pratiques comme le labour intensif ou l'usage de certains fertilisants de synthèse, dégradent la qualité générale des sols. Un des enjeux de l'agriculture durable est la réduction de ces pratiques et la valorisation des mécanismes biologiques qui sont liés aux organismes présents dans l'écosystème. En viticulture, l'utilisation d'un couvert végétal dans l'interrang ou sous le rang, comme alternative au désherbage mécanique ou chimique, est une pratique connue, mais parfois peu mise en œuvre du fait notamment de la compétition pour l'eau et les nutriments qu'elle pourrait engendrer. Cependant, les différents couverts qu'il est possible d'installer sur une parcelle (semé/spontané; permanent/temporaire) rendent de nombreux services écosystémiques qui s'étendent à toutes les échelles, du paysage à la vigueur de la vigne, en passant par la structuration des sols et la fertilité de la parcelle (ex. : dynamique de la matière organique). De plus, les plantes ne vivent pas seules dans leur environnement, elles interagissent entre elles et avec d'autres organismes et microorganismes. Les espèces végétales qui composent le couvert influencent fortement les communautés microbiennes présentes. Ces dernières jouent un rôle fondamental dans les processus biologiques du sol dans les écosystèmes naturels ou agricoles. Les plantes sont capables de réaliser une ou plusieurs symbioses avec

■ **Figure 3: Points clés pour l'optimisation du couvert en vignoble.**



ces microorganismes, c'est le cas de la symbiose mycorhizienne à arbuscules ou la symbiose fixatrice d'azote. Une bonne gestion du couvert est primordiale afin de favoriser ces services, et éviter les phénomènes de compétition interplantes. C'est pourquoi, adapter une conduite de culture dans le but d'exploiter l'ensemble de ces services est ambitieux (figure 3). Par conséquent, les acteurs de la recherche (INRAE, IFV, chambre d'agriculture, les interprofessions)

travaillent aujourd'hui sur ces problématiques dans le but de fournir aux acteurs de la filière viticole, les clés pour mettre en place une conduite de couvert adaptée à leur vignoble et leur objectif de production. ■

NDLR: La 2^e partie de cet article sera publiée dans le n° 179 (avril 2021) de la Revue des Enologues.

NDLR: Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur le site internet de la Revue des Enologues: search.oeno.tm.fr

Les couverts végétaux

Partie 2/2: Engrais verts en viticulture

Laure Gontier¹, Mathilde Hériché², Pierre-Antoine Noceto², Daniel Wipf², Pierre-Emmanuel Courty², Jean-Yves Cahurel³, Benoît Bazerolle⁴

¹ Institut français de la vigne et du vin – Pôle Sud-Ouest – V'innopôle – Lisle-sur-Tarn – France.

² Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Université de Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

³ Institut français de la vigne et du vin – Pôle Bourgogne, Beaujolais, Jura, Savoie – Villefranche-sur-Saône – France.

⁴ Agricultures & Territoires – Chambre d'agriculture de Côte-d'Or – Bretenière – France.

Depuis plusieurs années, les prises de conscience sanitaires et environnementales, promeuvent la gestion de l'enherbement au vignoble selon différentes méthodes. Pour répondre à la problématique de la perte de fertilité des sols viticoles, mais également en lien avec une gestion agroécologique (*Desanlis, 2018*), nous assistons à une évolution des pratiques d'enherbement en viticulture marquée par l'implantation de couverts hivernaux temporaires de type « engrais vert », qui limitent la concurrence avec la vigne pour l'eau et les nutriments. Un engrais vert est une culture intermédiaire semée sur une parcelle agricole dans le but de fertiliser la culture de vente successive, principalement via l'apport d'azote (1). Les conditions de mise en œuvre des engrais verts en viticulture sont travaillées depuis une dizaine d'années au sein de l'IFV et des chambres d'agriculture dans différents contextes pédoclimatiques et viticoles. La mise en commun de données obtenues en contexte de vignes étroites en Bourgogne (CA21), et en contexte de vignes larges, sous climat septentrional (IFV Beaujolais) ou océanique (IFV Sud-ouest), permet de faire ressortir des points clés dans la gestion de ces couverts innovants.

Des essais sont actuellement menés pour cerner les conditions optimales de mise en œuvre des engrais verts au vignoble

L'enjeu principal dans la gestion des couverts est de bénéficier des services écosystémiques rendus par ces couverts tout en minimisant leurs potentiels impacts négatifs tels que la compétition pour les ressources. Pour ce faire, différents leviers d'action sont à disposition des viticulteurs, tels que le choix des espèces, les modalités d'installation, la date de destruction.

Ces couverts sont majoritairement composés d'espèces annuelles, semés en été ou en début d'automne, et détruits en sortie d'hiver ou début de printemps pour restituer au sol la matière organique. L'affinité des espèces semées varie selon les régions et la parcelle. En Bourgogne, même si les légumineuses du type pois, vesce, féverole, trèfle ont tendance à pouvoir être implantées dans de nombreuses situations, ce n'est pas forcément le cas pour la moutarde et le radis qui nécessitent une fertilité et une disponibilité en azote (N) plus importante pour leur installation.

La dose par hectare de semis est également un paramètre prépondérant dans la réussite du semis: il convient le plus

souvent de « sur doser » de l'ordre de 25 % par rapport à la recommandation donnée en grandes cultures, ce qui implique un surcoût pour les viticulteurs. Cela est d'autant plus important en vignes étroites où l'ombre portée par le palissage peut intervenir dans la qualité et la régularité de levée des graines.

Le semis est une opération importante et déterminante pour la réussite du couvert. Il requiert une certaine technicité, et intervient à une période où la charge de travail est importante en viticulture. En vignes étroites, la technique en est à ses prémices. Depuis 2017, une expérimentation menée en Côte-d'Or par la chambre d'agriculture de Côte-d'Or compare les performances de huit mélanges dans deux contextes pédoclimatiques différents (plaine et coteau). Un semis précoce (à partir de fin juillet / début août) permet d'obtenir les résultats les plus réguliers en termes de biomasse aérienne, même si la variabilité intermélange reste forte (**tableau 1**). Ceci est d'autant plus vrai que la destruction du couvert sera envisagée le plus souvent précocement, à partir de la mi-mars, afin de pallier notamment le risque de gelées. Dans des expérimentations parallèles menées en vignes larges (IFV Beaujolais), les semis ont tous été réalisés après les vendanges. Si ces dernières sont précoces (comme cela est de plus en plus le cas), le semis est réalisé en septembre ou début octobre et les biomasses fournies par les couverts sont intéressantes. Si les vendanges sont plutôt tardives (cas de 2016), le semis, réalisé après la mi-octobre, donne une biomasse faible, voire un échec (**tableau 1**).

Un essai a également été mis en œuvre dans le Sud-ouest, sur le vignoble de Gaillac (81) par l'IFV, en 2016 et 2017, afin d'évaluer l'incidence de la date de semis, souvent plus tardive dans cette région, et de la date de destruction sur les performances des couverts. Bien que la date de semis joue un rôle significatif sur la biomasse produite par les couverts et sur leur composition (**tableau 1**), cette incidence, soumise aux conditions météorologiques particulières qui suivent le semis, présente une forte variabilité interannuelle et est difficilement prévisible.

Les contraintes techniques liées à l'organisation des parcelles sont parfois nombreuses et impliquent des choix judicieux d'espèces et des dates de semis adaptées afin d'obtenir des résultats optimaux. L'utilisation de couverts comme engrais verts doit devenir un nouveau maillon dans la chaîne de l'entretien des sols; il convient donc de l'aborder en ayant une connaissance suffisamment précise de ses parcelles (viguer, fertilité, équilibre K-Mg...) et des objectifs visés. La mise en place de couverts doit être perçue comme un complément aux pratiques agricoles utilisées et non comme une contrainte nouvelle.

(1) <https://dicoagroecologie.fr/encyclopedie/engrais-vert/>

■ **Tableau 1 : Biomasse produite en fonction de différentes modalités de couvert et estimation des restitutions potentielles en azote pour la vigne.**

Vignoble	Millésime	Composition du couvert	Proportion de la parcelle de vigne enherbée (%)	Semis	Destruction	Biomasse aérienne (t MS/ha)	Proportion de légumineuses (%)	Restitution potentielle du couvert en azote*	
								kg N/ha	kg N/ha vigne
Sud-ouest	2016	Orge, féverole d'hiver	34 %	15-30 sept.	1 ^{er} -15 avril	2,4	43 %	51	17
				15-30 oct.		2,6	29 %	44	15
				15-30 sept.	15-30 avril	3,7	34 %	48	16
				15-30 oct.		3,5	29 %	35	12
	2017			15-30 sept.	1 ^{er} -15 avr	2,9	75 %	60	20
				15-30 oct.		1,7	64 %	35	12
				15-30 sept.	15-30 avril	4,0	71 %	60	20
				15-30 oct.		2,7	81 %	55	19
Beaujolais	2016	Féverole	38 %	15-30 sept.	15-31 mars	2,3	100 %	50	19
	2017			1 ^{er} -15 nov.	1 ^{er} -15 mai	0,6	100 %	15	6
	2019			1 ^{er} -15 oct.	1 ^{er} -15 mai	7,7	100 %	145	55
Bourgogne	2018	Féverole d'hiver, pois fourrager, avoine rude, seigle	50 %	1 ^{er} -15 oct.	1 ^{er} -15 avril.	1,9	83 %	33	17

* le calcul est effectué avec la méthode MERCI – Méthode d'estimation des restitutions par les cultures intermédiaires – développée par la chambre régionale d'agriculture de Nouvelle-Aquitaine.

Le cycle de l'azote

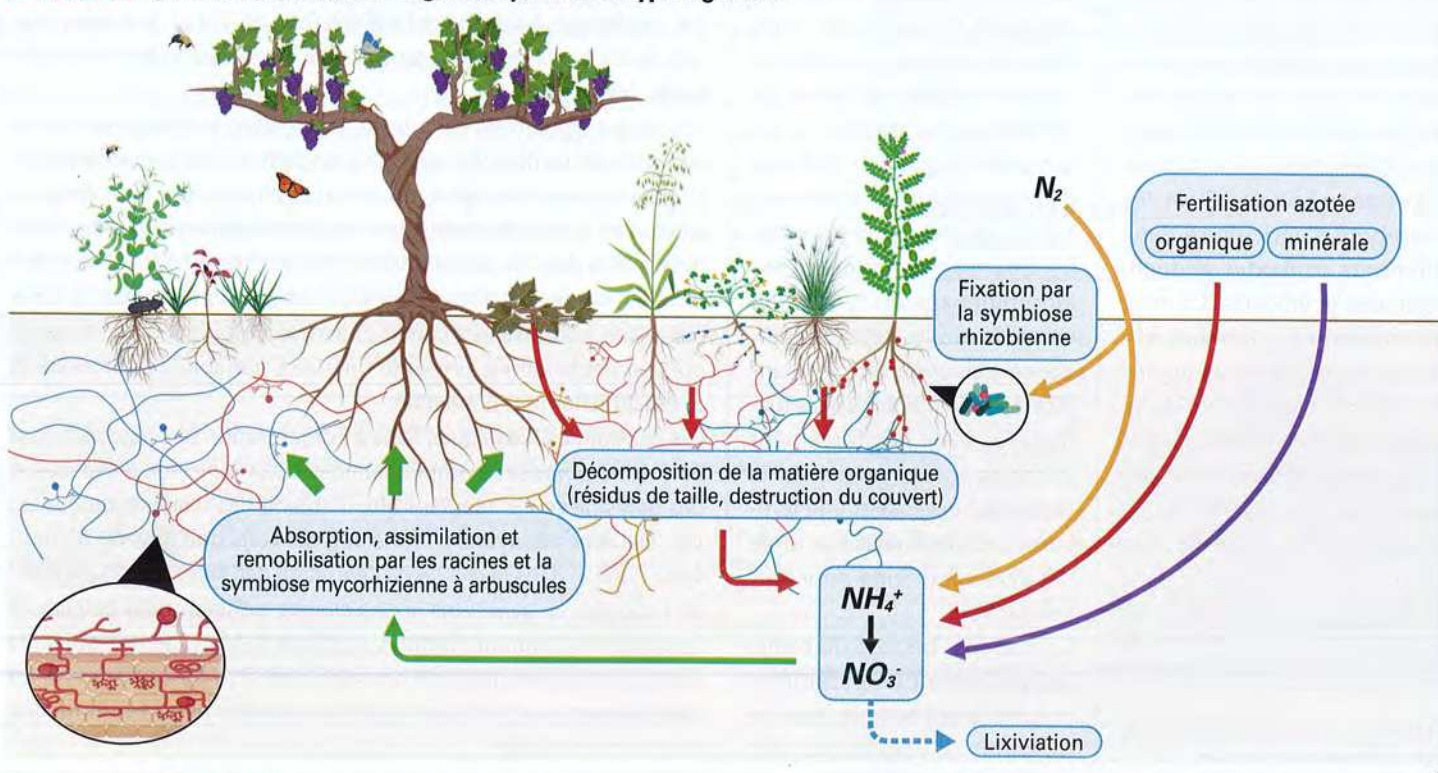
L'enjeu consiste à optimiser la gestion de l'azote (N) disponible pour la vigne par la maîtrise du couvert à la fois en termes d'espèces présentes et de chronologie des pratiques. L'azote est l'élément le plus abondant dans l'atmosphère. C'est également un élément crucial de la vie en tant que composant essentiel des acides nucléiques (ADN, ARN) et des protéines. Cependant, l'azote utilisable par les plantes n'est pas uniformément distribué dans le sol et il représente souvent un facteur limitant dans les écosystèmes. Il est donc important pour les plantes d'établir des mécanismes d'assimilation de l'azote en lien avec les microorganismes du sol. Il existe différentes formes d'azote dans les sols : l'azote organique et l'azote inorganique. Différents processus biologiques conduisent à une dynamique complexe

de l'azote, entre le pool organique et le pool inorganique. Il existe deux sources principales d'azote, le di-azote (N_2) atmosphérique et l'azote organique issu de la matière organique en décomposition.

L'azote est converti à partir de sa forme atmosphérique (gazeuse inerte ; N_2) en une forme utilisable dans les processus biologiques (**figure 1**). En effet, le N_2 est « fixé » par trois grandes catégories de microorganismes

pour former de l'ammonium (NH_4^+) : les bactéries formant une symbiose avec les légumineuses (fixation rhizobienne), les bactéries libres et les algues. Une petite quantité de N_2 est « fixée » par un processus à haute énergie, la foudre, qui produit du NH_4^+ et des nitrates (NO_3^-). Le N_2 peut également être « fixé » par des processus industriels (procédé Haber-Bosch) qui créent des engrais riches en azote, principalement en NO_3^- .

■ **Figure 1 : Cycle de l'azote dans un agroécosystème de type vignoble.**



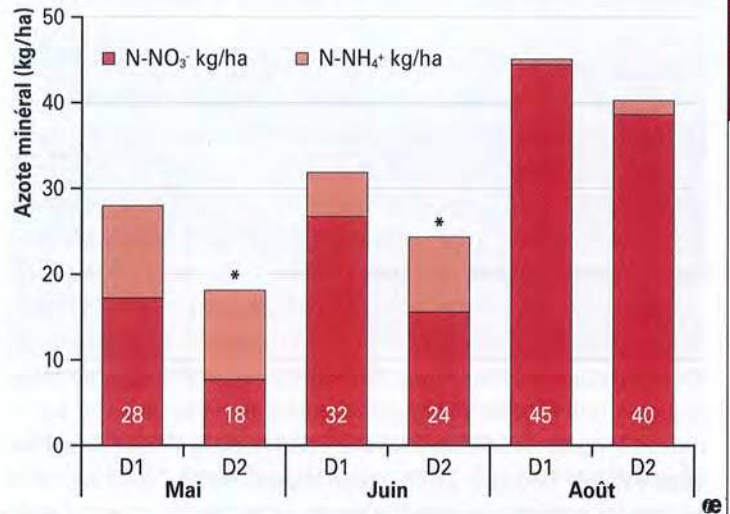
Dans presque tous les écosystèmes des climats tempérés et dans les sols cultivés, les plantes, mais aussi les champignons et les bactéries associées, absorbent préférentiellement le NH_4^+ et le NO_3^- plutôt que les acides aminés ou d'autres molécules organiques azotées (Courty et al., 2015). Le NO_3^- est la source d'azote la plus importante et la plus disponible pour les cultures; il est présent à des concentrations de l'ordre du milli-molaire (mM) dans les sols et il est bien plus mobile (plusieurs mm par jour) que le NH_4^+ (adsorbé sur les sites d'échange de cations du sol).

L'azote organique présent dans l'humus, les matières organiques labiles (ex.: effluents d'élevage) et d'autres sous-produits de l'activité humaine constitue une source d'azote importante pour la fertilisation des sols. La majeure partie de cet azote organique n'est pas directement assimilable par les plantes. Deux processus liés principalement à l'activité bactérienne du sol permettent de rendre l'azote assimilable par les plantes: la minéralisation (qui produit du NH_4^+) et la nitrification (transformation du NH_4^+ en NO_3^-). La nitrification ainsi que la minéralisation sont des processus pouvant aller de quelques jours à quelques semaines en fonction de la qualité et de la quantité de matière organique, et des conditions pédo-climatiques. Enfin, le NO_3^- , plus mobile, peut être entraîné par les eaux de surface et de ruissellement hors

de portée des racines: c'est la lixiviation.

Au regard des différents services rendus par les couverts végétaux et de leur place dans le cycle de l'azote, l'étude de l'impact des couverts végétaux sur la fertilité chimique du sol est centrale. Globalement, l'estimation des restitutions potentielles en azote par un couvert végétal comprenant des légumineuses montre qu'un couvert mis en place, un interrang sur deux, permettrait une restitution potentielle moyenne de l'ordre de 20 kg/ha d'azote l'année de sa destruction (tableau 1). Ces restitutions, basées sur de la modélisation, seraient susceptibles de couvrir en partie les besoins annuels d'une parcelle de vigne et permettraient ainsi une réduction des apports de fertilisants azotés, plus ou moins importante selon l'objectif de production. En sus de l'impact pédo-climatique, la dynamique de restitution de l'azote est impactée par les modalités de pilotage du couvert. Dans le Sud-ouest (essai de Gaillac précédemment mentionné), l'importance des restitutions potentielles en azote est en lien avec la forte proportion de légumineuses à la destruction. Elles tendent à être supérieures pour une date de destruction plus tardive, en lien avec l'augmentation de la biomasse, la teneur en azote du couvert ayant plutôt tendance à être stable ou à diminuer. La date de destruction du couvert influence également l'évolution de l'humidité du sol et

■ **Figure 2: Influence de la date de destruction du couvert (orge, féverole d'hiver) sur l'évolution de l'azote minéral du sol en kg/ha, dans les 30 premiers cm du sol. Essai Gaillac: 2017 : D1 = 1^{re} quinzaine d'avril; D2 = 2^e quinzaine d'avril. *: significativité $p < 0,05$.**



sa teneur en azote minéral (figure 2). Globalement, même si le stock d'azote minéral est maximum à la véraison quelle que soit la date de destruction, le sol est plus humide, plus riche en azote nitrique et moins riche en azote ammoniacal lorsque l'engrais vert a été détruit plus tôt. Ainsi, même si un décalage de la date de destruction de début à fin avril permet un gain moyen de biomasse de l'ordre de 40 %, ce gain se traduit par une augmentation relativement modérée des restitutions potentielles en azote par le couvert à la vigne. En Beaujolais, la quantité d'azote disponible pour la vigne a également été fonction de la biomasse produite (l'échec du semis tardif en 2016 résulte en une très faible fourniture en azote en 2017) et reste toutefois modeste (tableau 1). De façon à ce que la vigne puisse profiter de l'azote fourni (absorption à la floraison), la destruction ne doit pas être trop précoce (ex.: pas au débourrement) et se réaliser plutôt début mai (figure 3).

Conclusion sur l'influence des couverts sur la fourniture en azote

Le cycle de l'azote est un processus clé qui peut être largement affecté par l'implantation d'un couvert végétal. Ainsi, tout l'enjeu de l'utilisation des couverts en viticulture est de faire coïncider au mieux les restitutions azotées avec les besoins de la vigne. Après vendange, la présence d'un couvert permet l'absorption de l'azote

VITICULTURE

de Dorian AMAR – Viticulteur – Ingénieur œnologue – Technicien forestier spécialisé en aménagement de l'espace

BIODYNAMIE : tradition et savoir-faire

Éléments de compréhension des usages en viticulture, en œnologie et en dégustation de l'antiquité à aujourd'hui

Plusieurs chemins coexistent, à l'image de la permaculture ou de la culture biologique. La biodynamie est assurément l'un d'entre eux et Dorian Amar permet au lecteur de s'y plonger avec plaisir grâce à une approche réfléchie tendant vers l'exhaustivité. Au fil des pages, des exemples pratiques vécus dans plusieurs domaines situés dans deux pays forts différents d'un point de vue climatique permettent de visualiser concrètement la vie du vigneron biodynamique.

La lecture de cet ouvrage nous plonge dans cette formidable histoire écrite par nos ancêtres vigneron, vinificateurs et dégustateurs, à travers le regard de professionnels suisses et grecs ayant entrepris de cultiver leur vigne avec respect.

Franco France: 29 € TTC
Franco tous pays: 39 €

collection
Avenir Œnologie

Livres de la collection Avenir Œnologie disponibles sur www.oeno.tm.fr
Bulletin de commande en page 1 de la revue.

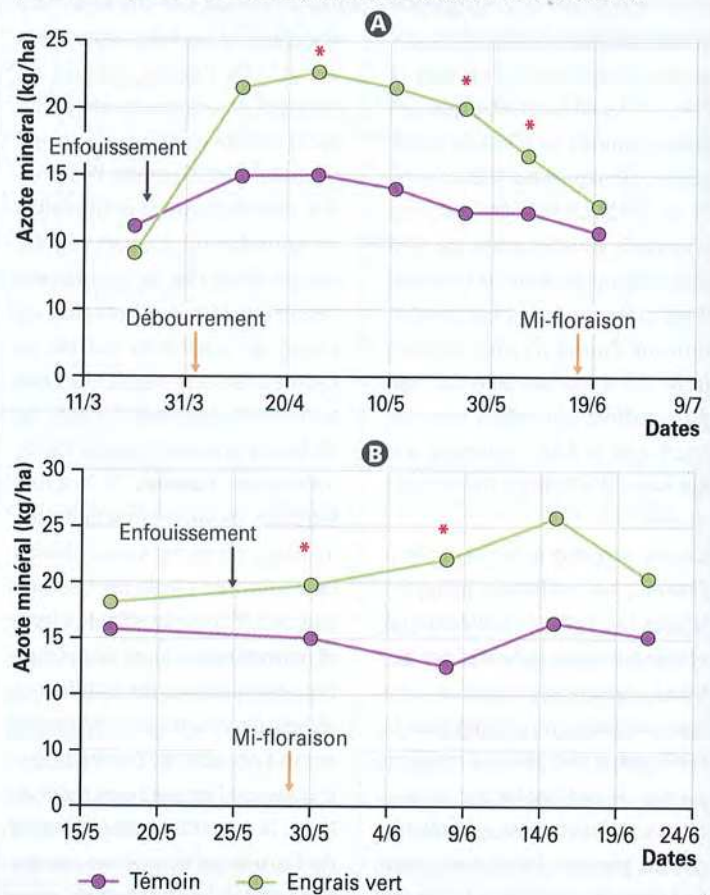
nitrique, ou nitrate, résiduel dans le sol, et ainsi d'en réduire les pertes par lixiviation et de limiter la contamination des eaux souterraines. De par leur action de piégeage de l'azote durant leur croissance, la dégradation des couverts intercalaires par les communautés microbiennes du sol peut jouer sur les quantités d'azote minéralisées après leur destruction. Afin d'optimiser cet approvisionnement en azote, les espèces à privilégier doivent présenter une bonne capacité d'absorption de l'azote, de persistance et des caractéristiques permettant une bonne minéralisation de l'azote séquestré (ex. : taux de lignine, rapport C/N) (Justes et al., 2009). Par ailleurs, un couvert végétal enrichi en légumineuses permettra un apport accru d'azote grâce à la symbiose bactérienne fixatrice de l'azote atmosphérique. Les paramètres de production que nous avons enregistrés dans nos expérimentations montrent peu d'incidence sur le rendement, mais une possible augmentation de la vigueur et de la teneur en azote assimilable des moûts. Ces expérimentations ont toutefois une antériorité limitée et l'impact des engrais verts est à voir sur le moyen-long terme, en particulier en lien avec le stock de matière organique du sol.

In fine, les restitutions potentielles en azote par un couvert végétal qui dépendent de nombreux facteurs (ex. : qualité de la matière organique et conditions pédoclimatiques influençant la vitesse de minéralisation et de nitrification) constituent un levier agroécologique pour réduire l'apport de fertilisants azotés au champ. ■

NDLR : La première partie de cet article a été publiée dans le numéro 178 (janvier 2021) de la Revue des Œnologues.

NDLR : Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur le site internet de la Revue des Œnologues : search.oeno.tm.fr

■ **Figure 3** : Influence de la date de destruction du couvert sur l'évolution de l'azote minéral du sol en kg/ha, dans les 30 premiers cm du sol. Essai Beaujolais : 2016 (A), 2018 (B) (étoiles rouges : différences significatives ; engrais vert : féverole).

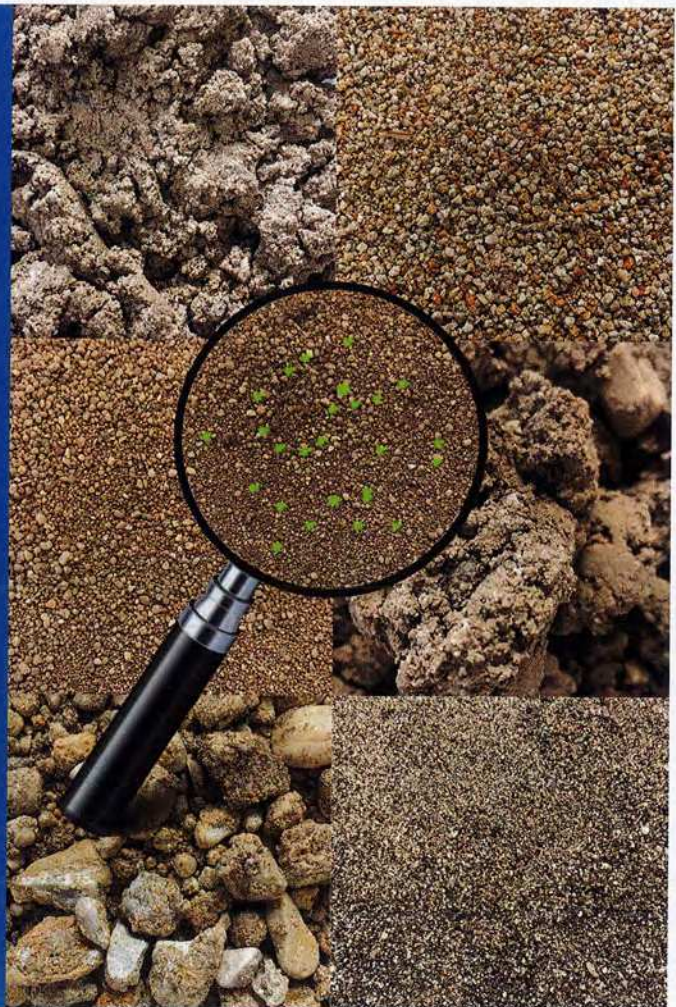


LES ANALYSES AGRONOMIQUES EXCELL

Apprenez de la
vitalité biologique
de vos sols

excell
L'EXPERTISE ANALYTIQUE

Pour plus de renseignements
secretariat@labexcell.com



Les couverts végétaux dans le vignoble: un atout pour augmenter les services écosystémiques et réduire les intrants



Essai d'enherbement en conditions sèches.

Introduction

Un couvert végétal se définit par une espèce ou une communauté d'espèces végétales recouvrant le sol de manière permanente ou temporaire. L'agriculteur a la possibilité de semer ces couverts selon un choix raisonné ou de laisser la végétation spontanée se développer (cet article résume l'article de Noceto *et al.*, 2020, récemment publié dans la Revue des œnologues).

En Europe, on distingue trois types de couverts semés avec des objectifs différents pour l'exploitant:

- le couvert hivernal, installé pour pallier l'érosion du sol, importante pendant cette période de repos végétatif;
- les engrais verts, installés dans l'objectif d'amender naturellement la parcelle; en détruisant les résidus du couvert, la matière organique est libérée puis minéralisée, permettant ainsi d'alimenter la culture au cycle suivant;
- les cultures intermédiaires pièges à nitrates, installées en automne pour capter dans le sol les nitrates en excès afin de limiter la contamination des eaux par ceux-ci.

L'intérêt des couverts en agriculture

Les espèces végétales les plus couramment utilisées dans ces couverts font essentiellement partie de trois

familles présentant chacune différents avantages quant à leur utilisation. Nous retrouvons:

- les Fabacées (féverole, luzernes, trèfles, vesces, etc.), qui sont fréquemment utilisées, seules ou en mélange, pour leur capacité à réaliser une symbiose avec certaines bactéries du sol. Celles-ci sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de le rendre assimilable par la plante. L'azote ainsi assimilé est alors redistribué dans le sol lors de la destruction de ces plantes;
- les Brassicacées (colza fourrager, moutardes, navette fourragère, radis chinois, etc.), qui servent couramment à retenir les nitrates en excès dans le sol («piège à nitrates») et qui présentent l'avantage de s'implanter rapidement, empêchant le développement des adventices. En proportion importante, elles peuvent cependant agir comme bio-fumigateur (fig. 1) en libérant certains composés volatils et ainsi nuire à certains champignons mycorhiziens bénéfiques pour le sol;
- les Poacées (avoines, bromes, fétuques, orges, ray-grass, seigle, etc.), avantageuses par leur rapport C/N élevé, qui produisent une biomasse (fig. 1) importante, bénéfique lors de sa destruction.

Les couverts sont fréquemment utilisés entre deux cultures d'intérêt. Ceux-ci se sont développés notam-

ment pour contrer les phénomènes de battance et d'érosion des sols liés à l'exploitation des milieux agricoles et à la destruction de la couverture végétale naturelle.

De manière générale, l'installation d'une couverture végétale améliore la structure du sol (fig. 1). La présence de racines contribue à l'agrégation des particules du sol, ce qui permet une meilleure rétention de l'eau et des éléments minéraux nécessaires à la croissance de la culture d'intérêt et des plantes du couvert (fig. 2). On observe aussi que l'apport de biomasse du couvert à sa destruction entraîne une augmentation du taux de matière organique et donc une réduction des besoins en engrais.

De plus, un couvert diversifié abrite une micro- et une macrofaune diverses (fig. 1) impliquées dans différents services écosystémiques comme la décomposition, le contrôle des maladies et ravageurs et la pollinisation. Un choix de plantes spécifiques, selon leurs caractéristiques répulsives ou attractives, peut permettre de gérer certains organismes ou groupes d'organismes

(bénéfiques et/ou pathogènes) en les attirant ou les éloignant de la culture. Le couvert participe également au développement des champignons mycorhiziens ainsi qu'au maintien d'un réseau mycélien commun entre les plantes du couvert et de la culture d'intérêt (fig. 2), favorisant l'accessibilité aux nutriments du sol.

Les couvertures dans le vignoble

La couverture végétale d'une parcelle peut être permanente ou temporaire, totale ou partielle (sous le rang uniquement, un inter-rang sur deux ou couvrant tous les inter-rangs). Il existe de nombreuses associations d'espèces végétales avec leurs avantages et inconvénients. En effet, les services écosystémiques rendus par le couvert à la vigne sont directement dépendant de la présence et de l'abondance des différentes espèces de plantes appartenant aux trois familles précédemment citées. Les caractéristiques de la parcelle et les objectifs du viticulteur (lutte contre l'érosion, impact sur la structure du sol, apport de matière orga-

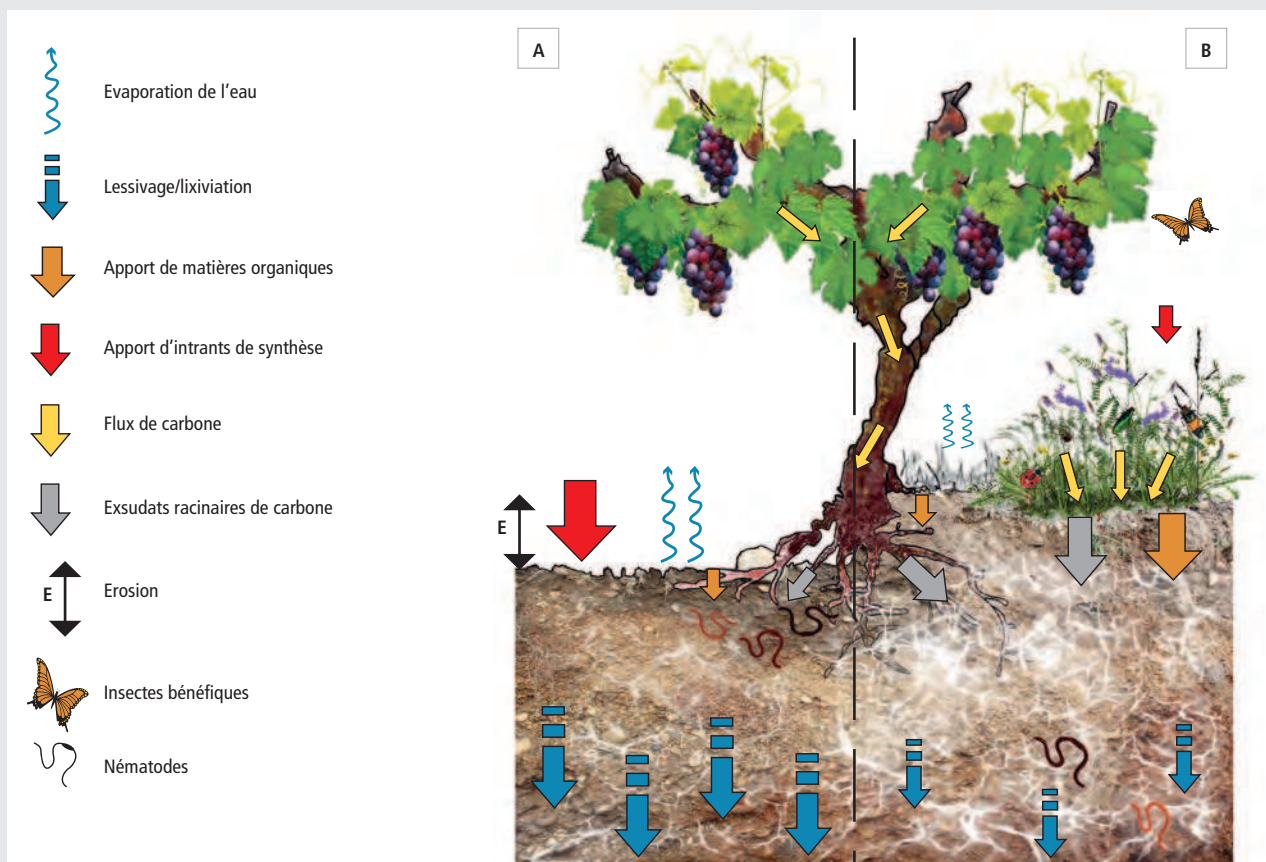


Figure 1 | Comparaison du fonctionnement de l'écosystème vignoble en absence (A) ou présence (B) d'un couvert. La présence d'un couvert permet: 1) de réduire l'érosion du sol, le lessivage des particules, la lixiviation des nitrates et les pertes d'eau par évaporation; 2) de stimuler la croissance des champignons mycorhiziens à arbuscules et du réseau mycélien commun (RMC; figure 2); 3) de diminuer l'apport d'engrais de synthèse par une meilleure circulation/mobilisation des nutriments via le RMC et par une augmentation de l'apport de matière organique; 4) de diminuer l'apport de pesticides par l'effet répulsif sur certains parasites de la vigne (par les exsudats du couvert ou via le RMC et les mycorhizes à arbuscules) et l'attraction d'insectes bénéfiques (pollinisateurs, prédateurs de ravageurs, etc.).

nique, concurrence avec les adventices, stimulation de la mycorhization de la vigne...) doivent donc être pris en compte dans la sélection des espèces végétales pour un couvert adapté.

En plus des nombreuses possibilités de couverts semés, laisser la végétation spontanée se développer est une solution d'enherbement qui peut paraître intéressante et peu coûteuse pour le viticulteur. Cette méthode est par ailleurs fortement utilisée en arboriculture. Les espèces végétales composant ce type d'enherbement sont en général adaptées aux conditions pédo-climatiques de la parcelle, mais elles ne sont pas toujours avantageuses pour la production du raisin.

Une fois le choix des espèces végétales effectué, le semis se réalise de préférence à l'automne juste après les vendanges et avant une période de pluie afin d'améliorer la germination des graines. La présence d'un couvert ne dispense pas les viticulteurs de procéder à un entretien régulier du rang et de l'inter-rang. Lorsque le couvert n'est pas entretenu, la végétation peut devenir trop importante et engendrer une concurrence pour l'eau et les nutriments vis-à-vis de la vigne, pouvant par conséquent affecter la vigueur et la



Figure 2 | Le réseau mycélien commun (RMC) est formé entre les pieds de vigne et les plantes du couvert, connectés par les hyphes des champignons mycorhiziens à arbuscules. Ce réseau permet l'échange (flèches) de nutriments et de signaux (par exemple, composés organiques volatils) entre les plantes d'une même espèce ou d'espèces différentes.

récolte. L'enherbement est généralement géré soit par la destruction du couvert, soit par des tontes régulières, ou alors un roulage ou couchage de la végétation. Dans certaines régions, le gel permet une destruction efficace du couvert, laissant alors uniquement à l'exploitant le soin de l'enfouissement des résidus. Dans le cas d'un enherbement temporaire, la destruction de la couverture végétale est réalisée fin avril pour

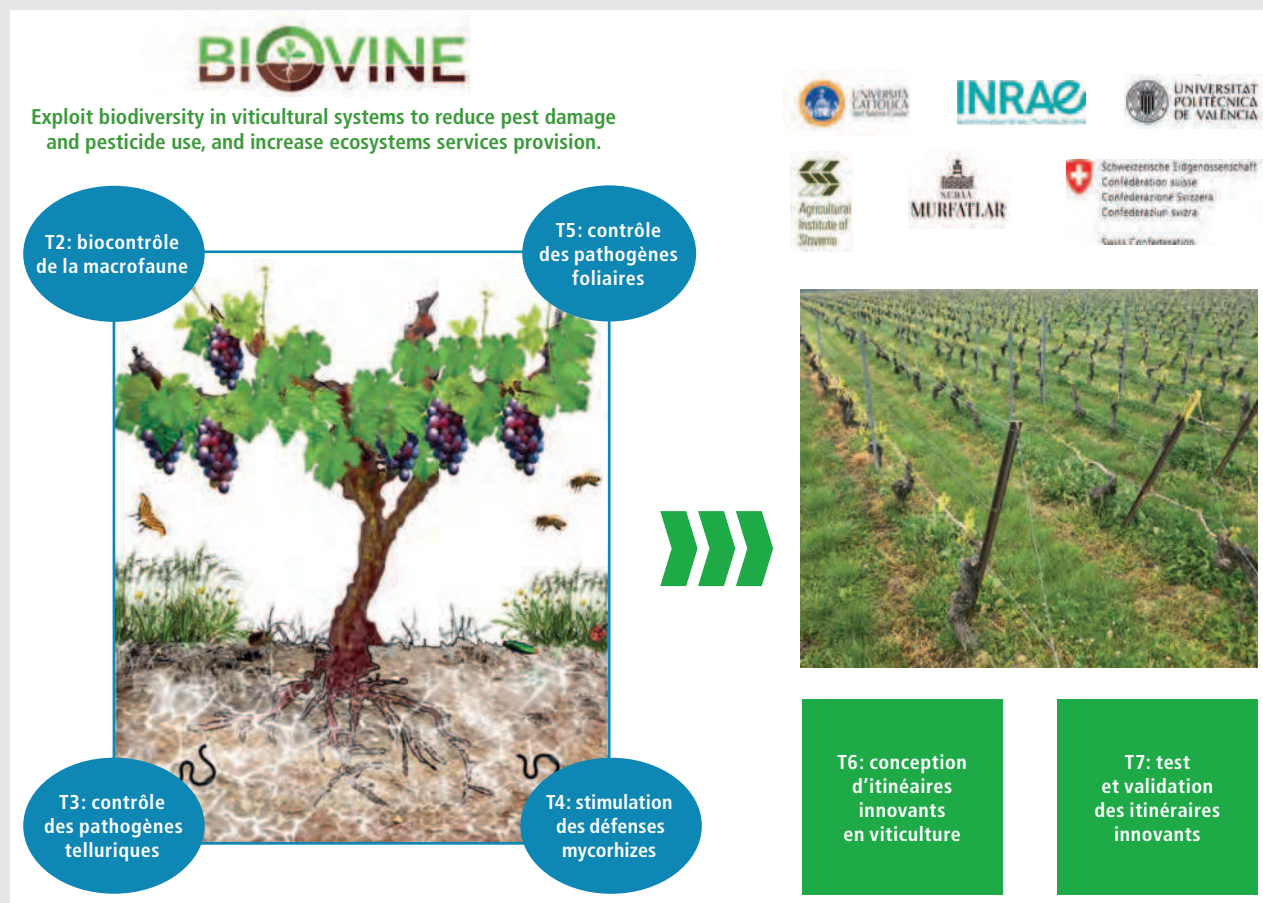


Figure 3 | Présentation schématique des actions, tâches et partenaires du projet Biovine.

les couverts hivernaux ou jusqu'au début de l'été pour des couverts plus tardifs. L'utilisation d'herbicides pour le désherbage sous le rang et dans l'inter-rang est parfois préférée.

Biovine, un projet multidisciplinaire pour l'optimisation des couverts viticoles en production biologique

Le projet européen CORE Organic Cofund Biovine (2018–2021, www.biovine.eu, fig. 3) vise à contrôler naturellement les pathogènes du sol et foliaires ainsi que les principaux ravageurs en plantant des espèces végétales sélectionnées au sein et autour des vignobles (par exemple, couverts, haies) afin de réduire la dépendance aux produits phytosanitaires. Les vignobles européens n'exploitent en effet pas encore suffisamment le potentiel de la diversité végétale. De nouveaux systèmes viticoles seront conçus suivant un cycle de conception-évaluation-ajustement, et testés en Suisse, en France, en Italie, en Espagne et en Roumanie. Ces systèmes viticoles innovants devraient améliorer la gestion des maladies et ravageurs viticoles, tout en influençant positivement la biodiversité fonctionnelle et d'autres services écosystémiques. La qualité des services rendus par ces systèmes innovants offrira des itinéraires technico-économiques plus favorables aux viticulteurs européens, car le contrôle des maladies et ravageurs est un des défis les plus importants, notamment pour la viticulture biologique. Un contrôle insuffisant peut conduire à l'abandon de la production biologique, empêchant ainsi l'accès à un marché en pleine expansion.

Pour favoriser le potentiel de la diversité végétale, le projet Biovine est structuré en différentes tâches (fig. 3). Les partenaires du projet Biovine identifieront et sélectionneront donc des plantes potentiellement intéressantes pour leurs capacités à contrôler les arthropodes nuisibles (T2), à limiter les pathogènes du sol ou foliaire (oomycètes, champignons, nématodes) (T3), à promouvoir le développement des champignons mycorrhiziens à arbuscules et valoriser leurs services rendus au vignoble (T4), et à réduire les dégâts liés aux pathogènes foliaires (T5). L'ensemble des espèces sélectionnées (sur la base des critères mentionnés dans cet article et des mélanges commerciaux existants) fera l'objet d'essais au vignoble (T6 et T7). ■

Les auteurs

Pierre-Antoine NOCETO¹, Anne-Laure FRAGNIÈRE², Patrik KEHRLI², Mathilde HÉRICHÉ¹, Jérôme FROMENTIN¹, Vittorio ROSSI³, Saša ŠIRCA⁴, Aurora RANCA⁵, Josep ARMENGOL⁶, Sophie TROUVELOT¹, Diederik VAN TUINEN¹, Pierre-Emmanuel COURTY¹ et Daniel WIPF¹

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

² Agroscope, route de Duillier 50, 1260 Nyon, Suisse

³ Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, 8429122 Piacenza, Italie

⁴ Plant Protection Department, Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slovénie

⁵ S.C.D.V.V. Murfatlar, Calea Bucuresti nr. 2, Murfatlar, 905100 Constanta, Roumanie

⁶ Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera S/N, 46022 Valencia, Espagne

Renseignements: Patrik Kehrlí, tél. +41 58 460 43 16,

e-mail: patrik.kehrlí@agroscope.admin.ch

Remerciements

Les auteurs remercient les organes de financement transnationaux, partenaires du H2020 ERA-net projet, le CORE Organic Cofund et la Commission européenne pour le soutien financier du projet.

Bibliographie

- Courty P.-E., Trouvelot S., Mondy S., Adrian M., Bonneau L., Martin F., Van Tuinen D., Wipf D. & Selosse M.A. (2018). Le microbiote de la vigne: de nouveaux paradigmes et une perspective pour la vigne de demain. *Revue des œnologues* **169**, 25–27.
- Noceto P.-A., Hériché M., Fromentin J., Rossi V., Širca S., Ranca A., Kehrlí P., Armengol J., Trouvelot S., van Tuinen D., Courty P.-E. & Wipf D. (2020). Les couverts végétaux: un atout majeur pour réduire les intrants de synthèse et augmenter les services écosystémiques au vignoble. *Revue des œnologues* **175**, 14–17.

Les services rendus par les mycorhizes au vignoble

La mycorhization de la vigne est un atout majeur pour la vigueur et la santé du cep. La symbiose avec les champignons mycorrhiziens permet:

- d'améliorer l'accessibilité de la vigne aux nutriments (par exemple, azote, phosphore) et à l'eau du sol par l'augmentation du volume de sol exploré (au moins 40 fois);
 - d'augmenter la tolérance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité, la chlorose ferrique et la toxicité des métaux lourds;
 - de protéger la vigne contre des pathogènes, notamment racinaires, comme le champignon *Armillaria* responsable du pourridié par compétition ou le nématode *Xiphinema* index vecteur du virus du court-noué par induction des défenses systémiques de la plante.
- Cette symbiose est également bénéfique pour le vignoble dans son ensemble, la présence de champignons mycorrhiziens permettant:
- d'accroître la stabilité du sol via la production de glycoprotéines et le développement d'un réseau d'hyphes très dense;
 - de réduire l'utilisation d'intrants (fertilisants et pesticides).

Pour plus d'informations cf. Courty *et al.* 2018