UFZ Centre for Environmental Research
Leipzig-Halle
in the Helmholtz-Association

PhD Dissertation 13/2006

Transcriptomic analysis in pedonculate oak (*Quercus robur*) during ectomycorrhizal symbiosis establishment with the basidiomycete *Piloderma croceum*

Patrick Frettinger

ISSN 1860-0387

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Biologie Végétale et Forestière

Soutenue publiquement le 12 juin 2006

par **Patrick FRETTINGER**

Analyse transcriptomique chez le chêne pédonculé (*Quercus robur*) au cours de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne avec le basidiomycète *Piloderma croceum*

Membres du Jury :

Président :	**M. Francis MARTIN**	**Directeur de Recherches, INRA, Nancy**
Rapporteurs :	**M. Roland MARMEISSE**	**Chargé de Recherches hab., Université Claude Bernard, Lyon**
	M. Uwe NEHLS	**Professeur assistant, Université Tübingen, Allemagne**
Examinateurs :	**M. François BUSCOT**	**Professeur, UFZ Halle, Allemagne (encadrant)**
	M. Michel CHALOT	**Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy**
	M. Frédéric LAPEYRIE	**Directeur de Recherches, INRA, Nancy (directeur de thèse)**

UMR INRA/UHP 1136 Interaction Arbres/Micro-organismes, Centre INRA de Nancy (France)

Département d'Ecologie Terrestre, Centre de Recherche Environnementale, UFZ Halle (Germany)

Le savant doit ordonner ; on fait la science avec des faits comme une maison avec des pierres ; mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.

Henri Poincaré (1854-1912)

Table des matières

Remerciements Page 6
Avant-propos Page 7
Introduction générale Page 8

1. Les différents types d'interactions entre plantes et microbes Page 9
1.1. La nodulation Page 9
1.1.1. Les partenaires de la symbiose Page 9
1.1.2. La formation et le fonctionnement du nodule Page 10

1.2. Les interactions parasitaires Page 12
1.2.1. Les protagonistes sont de tous types Page 12
1.2.2. De la pénétration du parasite à sa nutrition Page 12

1.3. Les symbioses mycorhiziennes Page 15
1.3.1. Le type le plus répandu, la mycorhize arbusculaire Page 16
1.3.1.1. Un groupe de champignons particuliers pour la majorité du monde végétal Page 16
1.3.1.2. Le bon moment pour entrer, une structure d'échange performante Page 16

1.3.2. La symbiose ectomycorhizienne Page 18
1.3.2.1. Une association entre arbres et champignons Page 18
1.3.2.2. Une racine hautement modifiée pour permettre l'échange bidirectionnel Page 19

2. Les stades pré-symbiotiques impliquent la perception de signaux Page 20
2.1. Les facteurs Nod sont indispensables à la nodulation Page 21

2.2. Le parasitisme implique également une communication entre plante et micro-organisme Page 22

2.3. Les mécanismes de communications lors des symbioses mycorhiziennes sont encore largement inconnus Page 26
2.3.1. La formation de la mycorhize arbusculaire serait le résultat de la perception d'une molécule volatile Page 26

2.3.2. Les communications lors de l'ectomycorhize Page 27

2.3.2.1. L'acteur majeur de la théorie hormonale : l'auxine Page 28
2.3.2.2. Une hormone fongique à présent bien connue : l'hypaphorine Page 28
2.3.2.3. La perception du champignon ectomycorhizien implique des molécules communes aux champignons pathogènes Page 30

3. La mise en place des symbioses conduit à une régulation différentielle de l'expression de gènes Page 31
3.1. Les outils d'étude du transcriptome Page 31

3.2. Les différentes interactions entre plantes et microbes provoquent des réponses communes chez les plantes Page 32

3.3. Plusieurs modèles pour caractériser l'organe ectomycorhizien et son développement Page 34

4. Le système racinaire de l'arbre Page 36

5. Objectifs Page 38

Chapitre I Page 41
Comparaison de la régulation des gènes de chênes au niveau des racines latérales en présence de Piloderma croceum ou lors d'un apport d'auxine.

Chapitre II Page 52
Analyse de l'expression de chitinases de classe III dans les racines principales ou latérales de chêne durant la phase pré-mycorhizienne.

Chapitre III Page 59
Comparaison de la régulation de 600 gènes dans les racines latérales et dans les racines principales au stade pré-mycorhizien, ainsi que dans la mycorhize fonctionnelle.

Discussion Page 87
Champignon ectomycorhizien et auxine régulent-t-ils les gènes de manières similaires ? Page 88

La phase pré-mycorhizienne entre le chêne et Piloderma croceum implique-t-elle la régulation de gènes codant pour des chitinases ? Page 90

La perception du champignon ectomycorhizien induit-elle une régulation différentielle d'autres gènes entre racine latérale et racine principale durant la phase pré-symbiotique ? Page 92

Catégories fonctionnelles des gènes régulés, type de la régulation et implication fonctionnelle Page 94

Conclusion & Perspectives Page 101

Bibliographie Page 104

Remerciements

Quelques pages noircies ne sont qu'une bien maigre représentation de plus de trois années passées au fin fond de l'Allemagne. Trois ans d'une expérience plus culturelle que culinaire. Trois années de rencontres (professionnelles et privées) et de découvertes où nous nous sommes joués des langues, à ne plus savoir s'il s'agissait d'anglais, d'allemand, de franco-italo-espagnol. Les plus grands linguistes se seraient sans doute arraché les cheveux, mais nous nous sommes amusés et compris car le fond des discussions l'a toujours emporté sur la forme.

Je remercie François Buscot pour m'avoir donné l'opportunité de travailler en Allemagne sur ce sujet passionnant. Je remercie également Frédéric Lapeyrie qui a accepté la lourde tâche d'être le directeur d'une thèse à distance, la mienne en plus. Ich bin auch sehr dankbach zu Ralf Oelmüller, der mich in sein Labor aufgenommen hat.
Un très grand merci à Francis Martin pour la qualité critique de son regard sur le travail effectué et qui a initié la collaboration avec Bordeaux. Merci pour sa disponibilité et ses nombreux conseils.

Merci beaucoup à Sylvie Herrmann pour m'avoir initier à la culture *in vitro* du chêne et à sa complexe mycorhization contrôlée. Merci à Tanya Peškan pour les bases de la difficile extraction d'ARN de racines de chêne. Merci à Sébastien et Annegret pour la compétence de leur aide lors du stade arrays : l'art, la manière et le reste aussi.
Je remercie du fond du cœur l'équipe girondine entraînée par Christophe Plomion dont la disponibilité et les compétences sont remarquables. Un coup de chapeau spécial à Jérémy et Philou qui étaient déjà plus que des doctorants, et à qui je souhaite de s'en sortir car ils le méritent.
Merci aux belges (une fois) d'Eurogentech pour leur accueil sympathique et leurs conseils.
Many thanks also to Julia for the precise formation on the real-time PCR machine.

Between two groups in Germany, the number of interesting people was increased, and sometimes also the quantity of bier drunk was correlated with it....
"Thank you" et "vielen Dank": Barbara, Bationa, Bettina, Blandine, Boris, Carmen, Carsten, Christina, Claudia, Daniela, Gabi, Harald, Heide, Irena, Jana, Jeannette, Katharina, Klaus, Meta, Michael (H), Michael (K), Nancy, Paul, Raik, Stephan (H), Stephan (K), Staver, Susan, Thomas, Uli, Verena (Bl), Verena (Bu), Yvonne.

Merci aux 3 mousquetaires de la microbio : Béa, Dom, Jean-Louis, Patrice, Daniel ; et aussi à tous les autres : Aurélie, Cécile, Christine, Claude, David, François, Jean, Karen, Marc (m, 3 e), Martina, Nicole, Pascale, PE, Stéphane, Thierry, Véronica.

Une reconnaissance spéciale au grand Franck pour sa gentillesse et ses qualités humaines exceptionnelles, ainsi qu'à la compagnie de téléphone qui nous a permis de discuter pendant des heures pour un tarif raisonnable.

Puisqu'ils ont joué un rôle (indirect mais important) dans le déroulement de cette thèse, je tiens à remercier les mécanos du garage .... (pas de pub) de Iéna pour avoir entretenu la voiture du Franzose et autorisé jusqu'à 60 000 Km/an dans de bonnes conditions, on a bien rigolé et « bis nächste Mal ! ».

PS colère : je ne remercie pas pour cause de bêtise aggravée et prétention hors concours une certaine personne du bureau de l'immigration de Iéna. (NB : merci au personnel du bureau de l'immigration de Leipzig pour leur accueil sympathique).

PS célèbre : à Poinca je dis : j'ai un tas de pierres et un sac de ciment
PS deuchiste : merci à Christian et Annie, et aux aventuriers du 1er Rallye Rhône-Alpes (°\=/°)
PS familial : merci maman
PS tendre : pour Patricia, pour tout, pour Patricia

Avant-propos

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'une coopération entre le Département des Sciences de l'Environnement de l'université d'Iéna dirigé par M. le professeur François Buscot, puis à la suite de ses affectations successives à l'université de Leipzig et enfin à l'UFZ de Halle, entre le laboratoire d'Ecologie Terrestre et l'UMR 1136 INRA/UHP « Interaction Arbres/Micro-organismes », dirigée par M. Francis Martin (Directeur de Recherche), grâce à un financement (Bu 941/1-3) obtenu par M. François Buscot auprès de la fondation de recherche allemande Deutsche Forschung Gemeinschaft (DFG). La thèse s'est déroulée sous la direction de M. Frédéric Lapeyrie (Directeur de Recherche au sein l'UMR 1136).

Le projet s'inscrit dans le cadre d'un programme concerté de la DFG (SPP 1084) intitulé « Molmyk » visant à analyser les bases moléculaires des symbioses mycorhiziennes. Une vingtaine d'équipes de recherche allemandes sont impliquées. Les recherches concernent les symbioses à mycorhizes arbusculaires et les ectomycorhizes. Pour près de 85% des équipes concernées, les études de transcriptomique constituent le moyen majoritairement employé pour mieux comprendre ces symbioses. Des travaux de protéomiques, l'utilisation de mutants, et l'hybridation *in situ* complètent l'analyse de l'expression des gènes réalisée par ces équipes.

Le travail de ce mémoire porte sur l'étude du développement de la symbiose ectomycorhizienne chez le chêne pédonculé, et plus précisément sur les modifications dans la régulation de l'expression des gènes avant la mise en place de structures symbiotiques différenciées. Par le biais de l'étude des différents types racinaires et l'utilisation d'approches moléculaires complémentaires, ce travail contribue à élucider une partie des mécanismes impliqués dans le développement de l'interaction entre l'arbre et son partenaire ectomycorhizien.

INTRODUCTION GENERALE

La rhizosphère est la zone du sol au contact et directement influencée par les racines et un cortège de micro-organismes. Les racines d'une plante entrent en compétition avec les systèmes racinaires des plantes voisines pour la conquête de l'espace, de l'eau et des nutriments minéraux. Au delà de cette compétition interne au monde végétal, la plante est confrontée à de nombreux autres organismes, parmi lesquels les microbes jouent un rôle de premier plan. En effet, les interactions entre plantes et microbes fournissent au terme « symbiose » son plein emploi. Dans son sens le plus large, le terme symbiose implique des organismes vivant ensembles, que l'interaction soit mutualiste, commensale, ou parasitique. L'ectomycorhize est une des symbioses biotrophes majeures qui s'établit dans le sol. Sa compréhension passe notamment par la connaissance d'autres associations biotrophes.

1. Les différents types d'interactions entre plantes et microbes

1.1. La nodulation

1.1.1. Les partenaires de la symbiose

La capacité d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec les bactéries appartenant au groupe des rhizobiums est restreinte aux légumineuses, avec cependant une exception pour le genre *Parasponia* des Ulmaceae (Trinick & Galbraith, 1976). La famille des légumineuses comprend trois sous-familles, Caesalpinioideae, Mimosoideae, et Papillionoideae, dont le nombre de genres capables de former des nodules racinaires est variable (Allen & Allen, 1981 ; Polhill & Raven, 1981). Alors qu'il n'y a que quelques genres non-nodulants chez les Papilionoideae et les Mimosoideae, la sous-famille Caesalpinioideae, moins spécialisée, inclut de nombreux genres non-nodulants (de Faria et al. 1989). Comme les Caesalpinioideae représentent la sous-famille la plus primitive des Fabales, il est considéré que la symbiose s'est développée à un stage relativement tardif durant l'évolution des légumineuses (Young & Johnston 1989). Les légumineuses varient en morphologie, habitat, et écologie, comprenant aussi bien des plantes arctiques annuelles que des arbres tropicaux (de Faria et al. 1989). Du fait du grand nombre de légumineuses nodulant avec les rhizobiums, cette symbiose dépendrait donc de particularités génétiques des légumineuses qui sont si complexes qu'elles ont peu évolué ailleurs dans le règne végétal et ne correspondrait pas à une adaptation à une niche écologique (Young & Johnston 1989).

Les cinq genres bactériens participant à cette symbiose *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* sont groupés sous le nom rhizobium (Hernandez-Lucas et al. 2004). Le degré de spécificité à l'hôte varie sensiblement chez les rhizobiums (Young & Johnston, 1989). Certaines souches ont une gamme d'hôtes restreinte, c'est le cas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* qui interagit uniquement avec les espèces du genre *Trifolium*. D'autres, tel *Rhizobium* sp. souche NGR234 possède un spectre d'hôtes bien plus large et nodule avec au moins 35 genres de légumineuses différents, ainsi qu'avec le genre *Parasponia* des Ulmaceae (Lewin et al. 1987).

Les légumineuses constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques et peuvent être majoritaires dans certains écosystèmes. On notera qu'il existe quelques symbioses fixatrices d'azote où interviennent d'autres plantes. Les aulnes (*Alnus*) forment des nodules avec des actinomycètes fixateurs d'azote. La myrte des marais (*Myrica gale*) ainsi qu'une fougère (*Comptonia*) produisent également des associations avec des actinomycètes.

1.1.2. La formation et le fonctionnement du nodule

Les mécanismes de reconnaissance, qui constituent une étape majeure de la mise en place symbiose dont découle probablement la spécificité de certaines associations nodulatrices, seront développés plus précisément dans le paragraphe (2.1.). Suite à l'échange de molécules régissant cette reconnaissance, la symbiose à proprement parlée peut alors se mettre en place. Les rhizobiums s'étant déplacés jusqu'aux racines (Barbour et al. 1991 ; Gaworzewska & Carlile, 1982), se fixent sur la surface racinaire des plantes (Smit et al. 1992), sans qu'il n'y ait de site exclusif à la fixation. En effet, les nombreuses études n'ont montré aucun degré de spécificité d'hôte lors de l'étape d'attachement (Mills & Bauer 1985, Pueppke 1984, Vesper & Bauer 1986).

Bien qu'il existe d'autres modes d'infections que *via* les poils racinaires, c'est ce moyen qui reste le plus décrit. Après fixation des bactéries aux racines, les poils absorbants se déforment et s'enroulent autour d'elles (figure 1a) (Bhuvaneswari & Solheim, 1985 ; Yao & Vincent, 1969). Une structure tubulaire, le cordon d'infection (figure 1b), grandit alors à l'intérieur du poil absorbant vers le primordium du nodule qui s'est formé dans le même temps à la base du poil. Ce primordium est formé par ces cellules du péricycle activement multipliées par mitose

(figue 1c). La plante hôte réagit en déposant du nouveau matériel de paroi cellulaire autour de la lésion le long du cordon d'infection (Callaham & Torrey, 1981 ; Turgeon & Bauer, 1985). Les rhizobiums sont ensuite libérés dans le cytoplasme des cellules végétales se trouvant au sein de ce primordium pour former une structure endosymbiotique appelée bactéroïde. La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et des cellules corticales de la racine produit des excroissances constituant les nodules matures (figure 2).

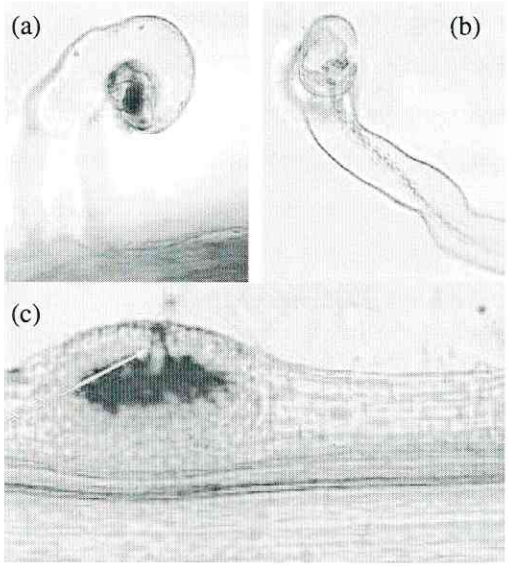


Figure 1. Enroulement du poil absorbant (a) et cordon d'infection (b) lors de la colonisation de racines de *Vicia sativa* subsp. *nigra* par *Rhizobium leguminosarum* (Laus et al. 2005). Primordium (c) formé lors de l'interaction entre *Lotus japonicus* et *Mesorhizobium loti* (Stougaard 2001)

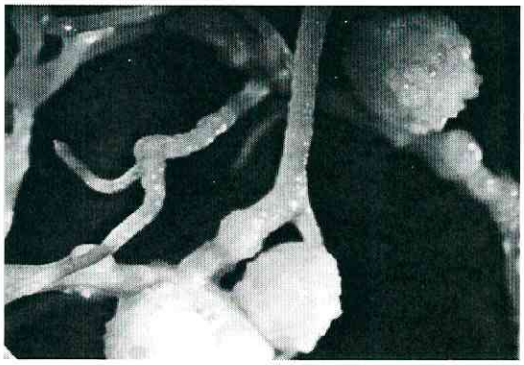


Figure 2. Nodules racinaires durant l'interaction *Rhizobium etli* et *Phaseolus vulgaris* (Velázquez et al. 2005)

Le bactéroïde est capable de fixer l'azote atmosphérique (N_2) pour le transformer en ions ammonium (NH_4^+) grâce à une nitrogénase. L'ammonium est ensuite mis à la disposition de la plante pour produire les acides aminés et les autres composés azotés. En retour la plante fournit divers nutriments au bactéroïde. Chez la légumineuse nodulée, la capacité à fixer de l'azote dépend largement de trois facteurs, l'apport direct de photosynthétats au bactéroïde, le maintien de faibles concentrations d'O_2 à l'intérieur du nodule pour protéger la nitrogénase, et l'exportation rapide de l'azote fixé. A certains stades du développement, le nodule peut consommer jusqu'à 50% des photosynthétats produits par la plante. Le contrôle de la concentration en oxygène est principalement dépendant de l'action d'une leghémoglobine produite lors de la symbiose. L'ammonium produit dans les bactéroïdes est libéré dans le cytosol de la plante, par simple diffusion aux travers des membranes péribactéroïdes. Dans le cytosol végétal, le NH_3 est assimilé via la voie métabolique glutamine synthase (GS)/glutamate synthase (GOGAT) (Marschner 1995).

1.2. Les interactions parasitaires

1.2.1. Les protagonistes sont de tous types

Les plantes doivent faire face à des micro-organismes pathogènes appartenant à des groupes taxonomiques très divers, allant des virus, bactéries, oomycètes, protozoaires, jusqu'aux champignons au sens strict (zygomycète, ascomycètes et basidiomycètes). De plus les aphides et les nématodes induisent souvent des réponses similaires chez la plante à celles observées face aux micro-organismes. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement à la mise en place d'une interaction parasitaire entre la plante et des champignons ou bactéries. Toutes les plantes, sans exception sont susceptibles d'être la cible d'une attaque parasitaire.

1.2.2. De la pénétration du parasite à sa nutrition

Les bactéries pénètrent dans les tissus végétaux majoritairement au niveau d'une blessure, moins fréquemment par une ouverture naturelle, et jamais directement au travers d'une paroi cellulaire intacte. Les bactéries envahissent ensuite les tissus de manière

intercellulaire, et bien qu'une partie de la paroi cellulaire végétale soit dissoute, les bactéries ne se multiplient que de manière extracellulaire (figure 3).

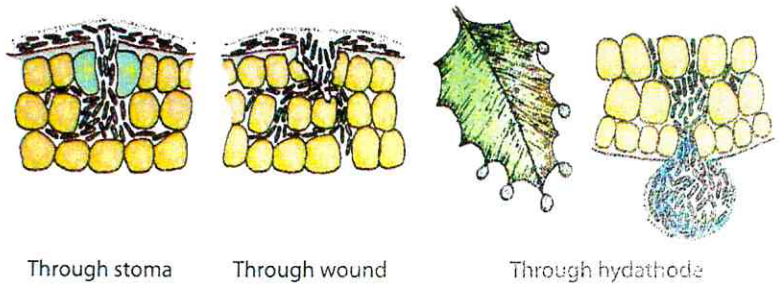


Figure 3. Les principaux modes de pénétration des bactéries pathogènes. De gauche à droite, pénétration par les stomates, par une blessure, par les hydathodes (Agrios 2005)

Les champignons pathogènes ont la possibilité de pénétrer la plante par des orifices naturels (notamment les stomates) ou au niveau de blessures, mais ils peuvent également pénétrer de manière directe au travers de surfaces intactes de la plante (figure 4).

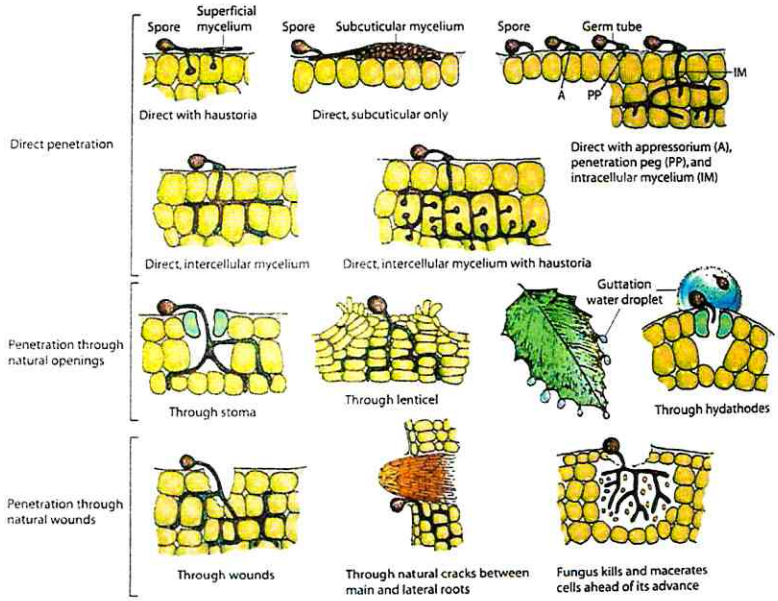


Figure 4. Stratégies invasives employées par les champignons pathogènes. De haut en bas, la pénétration directe, la pénétration via une ouverture naturelle (stomate, lenticelle, hydathode), la pénétration via une blessure (Agrios 2005)

Issus des spores situées sur la surface de l'hôte, des tubes germinatifs produisent du matériel mucilagineux qui leur permet d'adhérer à la surface de l'hôte, soit sur toute la longueur du tube, soit à son extrémité (Celio & Hausbeck 1998). Au niveau des régions en contact avec le tube germinatif, la structure de la cuticule et des parois cellulaires de l'hôte est détériorée, il s'agit sans doute du résultat d'enzymes hydrolytiques contenues dans la gaine mucilagineuse. Une fois l'appressorium formé, il adhère fermement à la surface de la plante (figure 5).

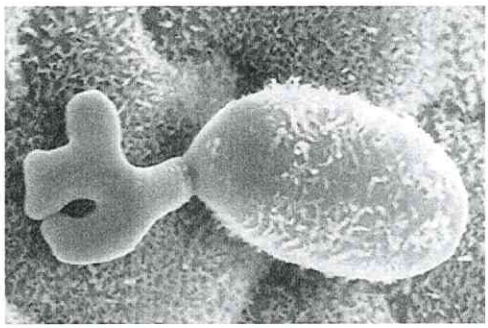


Figure 5. Spore, tube germinatif et appressorium d'*Oidium* sp. sur une feuille d'*Euphorbia pulcherrima* (Celio & Hausbeck 1998)

L'appressorium secrète ensuite des enzymes extracellulaires et génère une force physique pour autoriser la pénétration du champignon au travers de la cuticule. L'appressorium de certains champignons contient des lipides, des polysaccharides et des protéines. Les champignons sont capables de se développer dans la plupart des organes de la plante (feuilles, tiges, racines) qu'ils infectent, soit en croissant directement aux travers des cellules sous forme d'un mycélium intracellulaire, soit entre les cellules sous forme d'un mycélium intercellulaire (Agrios 2005).

Au cours de l'infection, les pathogènes établissent le contact avec des cellules ou tissus de l'hôte qui vont procurer des nutriments aux micro-organismes. Dans le cas d'une infection fongique, les nutriments produits par la plante transitent par une surface d'échange spécifique appelée l'haustorium (figure 6). L'haustorium est une structure invaginée qui s'est développée à l'intérieur même d'une cellule végétale (Götz & Boyle 1998). Cette structure va permettre au champignon de prélever les photosynthétats produits par la plante infectée. On notera que certains champignons ne développent pas d'haustorium, l'échange s'effectue aux niveau des hyphes qui se sont développés dans la plante.

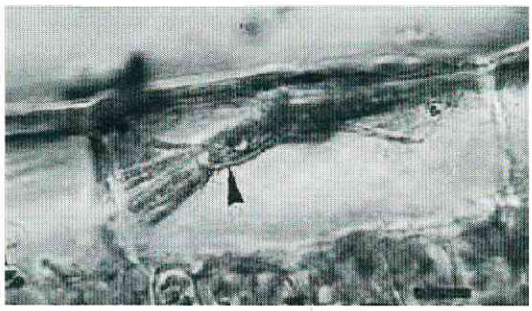


Figure 6. Haustorium de *Blumeria graminis* dans une cellule foliaire de *Triticum aestivum* (Götz & Boyle 1998)

Lors d'une infection bactérienne, les bactéries en multiplication produisent des toxines. Dans le cas d'une infection foliaire, celles-ci diffusent radialement à partir du point d'infection, il en résulte un halo chlorotique, consistent en une zone de cellules non infectées entourant le point contenant les bactéries. Les bactéries vont dégrader les cellules internes au halo, et celui-ci va progressivement s'agrandir avec la population de bactéries. Presque toutes les taches bactériennes sont provoquées par des espèces appartenant à deux genres étroitement apparentés, *Pseudomonas* et *Xanthomonas* (Agrios 2005)

Dans les interactions entre plantes et pathogènes, les flux nutritionnels sont unidirectionnels. En effet, bactéries ou champignons vont prélever l'ensemble des éléments qui leur sont nécessaires chez la plante. Ce prélèvement et le développement du parasite peuvent conduire à la mort du végétal si celui-ci n'arrive pas à contenir l'invasion.

1.3. Les symbioses mycorhiziennes

La mycorhize est l'organe symbiotique résultant de l'association mutualistique entre la racine d'une plante et les hyphes d'un champignon. Quatre types majeurs de symbioses mycorhiziennes sont définis sur la base de la classe fongique impliquée et sur la morphologie de la structure symbiotique. Dans les paragraphes qui suivront, deux de ces quatre types seront plus particulièrement approfondis. Il s'agit de la mycorhize arbusculaire, la plus ancienne symbiose, qui implique tous les genres des Gloméromycètes et de nombreuses plantes terrestres, et la symbiose ectomycorhizienne représentant l'interaction prédominante

chez la plupart des arbres des zones tempérées avec de nombreux champignons filamenteux (par exemple, les truffes, les bolets, les amanites). Les deux autres classes majeures sont les mycorhizes des orchidées impliquant des basidiomycètes et tous les membres des Orchidaceae, et les mycorhizes éricoïdes impliquant des champignons ascomycètes et des membres des Ericales et Bryophyta (Smith & Read 1997).

1.3.1. Le type le plus répandu, la mycorhize arbusculaire

1.3.1.1. Un groupe de champignons particuliers pour la majorité du monde végétal

Initialement, les champignons à mycorhizes arbusculaires étaient classés parmi les zygomycètes et les caractéristiques de leurs spores étaient utilisées comme marqueurs taxonomiques. Récemment, les analyses des séquences de la petite sous-unité d'ARNr ont permis une reclassification et la création d'un nouveau phylum, les Gloméromycètes, un clade frère des Ascomycètes et des Basidiomycètes (Schüßler et al. 2001). Tous les champignons à arbuscules sont membres des Gloméromycètes. Des estimations suggèrent que cette ancienne symbiose, datant du début du Dévonien (il y a 398 millions d'années), affecte approximativement 90% des espèces terrestres (Remy et al. 1994). Cette symbiose est de plus en plus considérée comme un élément important et faisant partie intégrante des écosystèmes naturels du monde entier. L'observation qu'approximativement 150 espèces des champignons arbusculaires (Morton & Bentivenga, 1994) colonisent environ 225 000 espèces de plantes (Law & Lewis, 1983) a abouti à la conclusion que les champignons arbusculaires ont un large éventail d'hôtes. Cette situation indique un haut degré d'adaptabilité et une intégration du processus symbiotique parmi un grand nombre d'espèces de plantes (Smith & Read 1997).

1.3.1.2. Le bon moment pour entrer, une structure d'échange performante

Lors de la germination de la spore (figure 7), le champignon endomycorhizien utilise les réserves (triacylglycérides et glycogène) contenues dans la spore pour permettre la croissance hyphale et l'extension du tube germinatif jusqu'à quelques centimètres à partir de la spore (Bago et al. 2000). En l'absence de racine de plante, la croissance hyphale s'arrête. Ce phénomène apparaît avant que les réserves de la spore soient épuisées, pour offrir la

possibilité de reprendre la croissance hyphale ainsi que des chances additionnelles de trouver une racine hôte. Certaines espèces, aux spores particulièrement grandes, sont capables de germer jusqu'à 10 fois (Koske 1981).

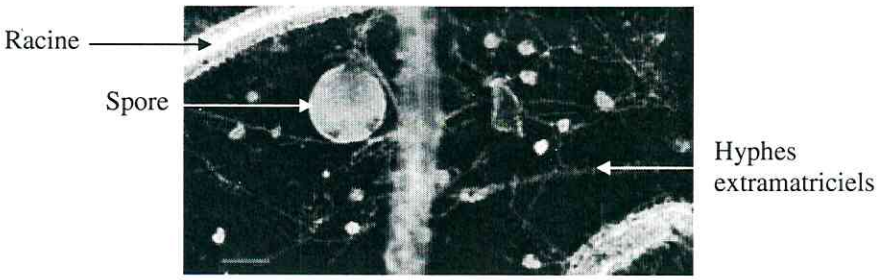


Figure 7. Hyphes extramatriciels produits par la germination d'une spore de *Gigaspora* utilisée lors de l'inoculation en pot d'un trèfle (Brundrett et al. 1996)

La pénétration est caractérisée par la production localisée d'enzymes hydrolytiques par le champignon dégradant la paroi et par l'application d'une pression hydrostatique par l'extrémité hyphale (Bonfante & Perotto, 1995). L'infection de la racine implique la formation d'hyphes intracellulaires et d'une structure d'échanges. L'échange bidirectionnel de nutriments entre les deux partenaires de la symbiose s'établit en partie au niveau des hyphes intercellulaires et principalement au travers d'un haustorium extrêmement ramifié, appelé arbuscule (figure 8).

Figure 8. Arbuscule de *Glomus versiforme* dans une racine de *Medicago truncatula* (Harrison 2005)

La mycorhize arbusculaire constitue en effet un système a bénéfices réciproques. Les champignons à mycorhizes arbusculaires sont des symbiotes obligatoires, qui établissent la symbiose pour obtenir du carbone nécessaire à leur croissance et à la réalisation de leur cycle biologique. Les champignons arbusculaires reçoivent 100% de leur carbone par la plante. Ce flux de carbone dans les racines est estimé à plus de 20% des photosynthétats de la plante. Ainsi, la symbiose arbusculaire joue-t-elle un rôle significatif pour le cycle du carbone entre l'atmosphère et la biosphère (Bago et al. 2000, Zhu & Miller 2003).

La principale contribution du champignon est d'assister la plante dans l'acquisition de nutriments minéraux tel le phosphore. Récemment il a d'ailleurs été suggéré que dans les cas de symbioses arbusculaires les plantes reçoivent la totalité de leur phosphore via le partenaire fongique (Smith et al. 2003). Le phosphore est un nutriment essentiel constituant jusqu'à 0,2% (matière sèche) de chaque cellule végétale, ce qui le rend nécessaire en grandes quantités (Schachtman et al. 1998). En complément, les champignons à mycorhize arbusculaire peuvent entre autre prélever l'ammonium et transporter l'azote (Johansen et al. 1993). Dans un milieu pauvre en azote, le taux de mycorhization d'une plante est supérieur à celui observé dans un milieu non carencé (Blanke et al. 2005). En plus d'une nutrition améliorée, les plantes mycorhizées présentent une résistance accrue aux pathogènes racinaires ainsi qu'une tolérance à la sécheresse augmentée (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Hwang et al. 1992).

1.3.2. La symbiose ectomycorhizienne

1.3.2.1. Une association entre arbres et champignons

Dans les forêts boréales, tempérées mais aussi en forêt tropicale, les ectomycorhizes sont des associations symbiotiques communes chez les arbres. Les ectomycorhizes apparaissent préférentiellement sur des sites pauvres en minéraux solubles et où une litière s'accumule à la surface du sol. Les plantes hôtes incluent des membres des Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Myrtaceae, mais également quelques monocotylédones et fougères (Wilcox 1996). Les ectomycorhizes sont particulièrement importantes pour la croissance de l'arbre dans les régions où la biodisponibilité des nutriments est limitée ou à faible statu hydrique. Les ectomycorhizes se forment habituellement entre les racines fines et le mycélium

dicaryotique de différents basidiomycètes. Certains ascomycètes, dont des membres des Tubérales, sont également impliqués dans ce type de symbiose, tout comme quelques Zygomycètes (Isaac 1992). Plantes et champignons mycorhiziens sont généralement capables de former des symbioses avec différentes espèces, en effet il ne semble pas exister de caractère exclusif aux associations ectomycorhiziennes, tel qu'il peut exister lors de la nodulation. Parfois, une spécificité fongique vis-à-vis du genre (*Larix*) ou de sous-genres (pins à plus de deux aiguilles).

1.3.2.2. Une racine hautement modifiée pour permettre l'échange bidirectionnel

Les racines ectomycorhizées présentent une structure caractérisée par un manteau fongique externe d'épaisseur variable et composé d'hyphes souvent ramifiés et agrégés (figure 9).

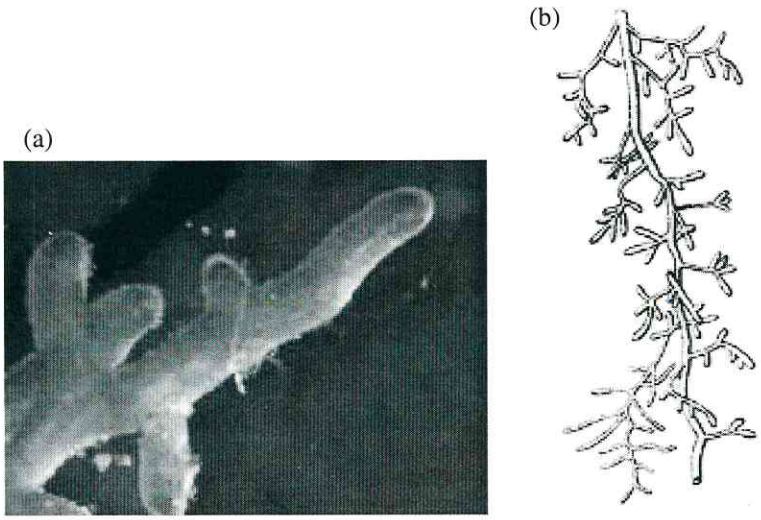


Figure 9. Ectomycorhizes (a) de *Clavulina coralloides* sur une racine de bouleau (Tedersoo et al 2003), et racine (b) de *Carpinus betulus* portant des mycorhizes (Frank 1885)

La partie externe du manteau d'hyphes est connectée au mycélium extramatriciel qui prend en charge la nutrition minérale et le prélèvement d'eau dans le sol. Les hyphes reliés à la partie interne du manteau forment un réseau de digitations, qui s'étend entre les cellules épidermiques (chez les angiospermes) et corticales (chez les gymnospermes) de la plante hôte

(Kottke & Oberwinkler 1986; Barker et al. 1998). Cette interface champignon-plante est appelée réseau de Hartig et représente le site de transfert des nutriments fongiques en échange des photosynthétats de la plante (figure 10).

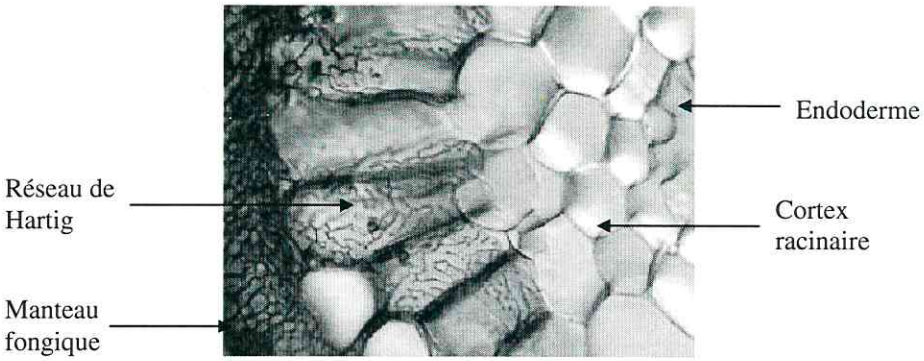


Figure 10. Section transversale d'une ectomycorhize de racine de peuplier (*Populus tremuloides*) (Brundrett et al. 1996)

De manière contrastée par rapport aux autres types de mycorhizes, les hyphes des champignons ectomycorhiziens ne forment pas de structures intracellulaires (Peterson & Farquhar 1994). Tout comme dans le cas de la mycorhize arbusculaire, les plantes ectomycorhizées présentent une résistance accrue à la sécheresse, aux substances toxiques et aux pathogènes (Smith & Read 1997).

Dans la nature, l'observateur se trouve le plus souvent face à une interaction établie, mais que sait-on des mécanismes initiant ces symbioses ?

2. Les stades pré-symbiotiques impliquent la perception de signaux

La mise en place des symbioses et leur fonctionnement sont l'aboutissement des phases de reconnaissance entre plante et microbe. Bien que les mécanismes qui les régissent ne soient pas tous connus, ces phases semblent constituer une condition *sine qua non* à l'interaction.

2.1. Les facteurs Nod sont indispensables à la nodulation

Dans les premiers temps de l'interaction entre les légumineuses et les rhizobiums, la sécrétion de flavonoides par la plante entraîne la synthèse de facteurs Nod par les bactéries. Ces derniers sont secrétés dans l'environnement où ils déclanchent des réponses variées chez les racines de la plante et initient le développement du nodules chez les légumineuses (Bladergroen & Spaink, 1996). Les facteurs Nod sont composés d'oligomères de lipo-chitines ("lipo-chitin oligomers", LCOs) comprenant généralement quatre à cinq résidus N-acétylglucosamine regroupés par des liaisons β1-4. Le groupe N-acétyle du sucre terminal (non réduit) est remplacé par une chaîne acyle. De nombreux facteurs Nod, synthétisés par diverses espèces de rhizobiums, ont été caractérisés. Il semble que la spécificité plante / type rhizobial soit, au moins en partie, déterminée par les modifications chimiques des facteurs Nod. Ces modifications incluent notamment l'attachement de groupes sulfate, acétate, l'addition d'autres sucres tel l'arabinose ou le mannose, des changements dans la chaîne acyle, et des variations dans la longueur de l'oligomère de chitine (Dénarié et al. 1996 ; Kamst et al. 1998) (figure 11).

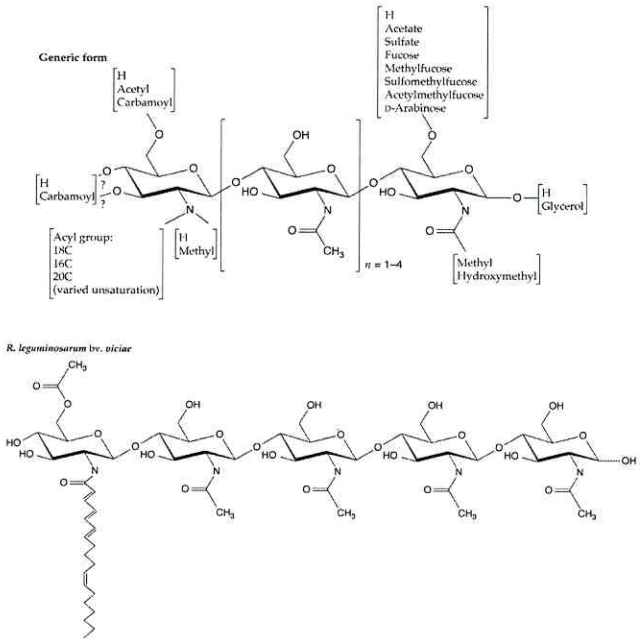


Figure 11. Structure chimique générique des facteurs Nod et structure chimique du facteur Nod produit par *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Buchanan et al. 2001)

Chez une légumineuse compatible, les facteurs Nod peuvent induire différents effets dont la déformation des poils absorbants, la division des cellules racinaires corticales, et la morphogenèse du nodule. Ces réponses sont induites par des concentrations en facteurs Nod très faibles (10^{-12}-10^{-13} M). Leur détection est probablement due à l'existence de récepteurs à haute affinité (Downie & Walker, 1999). Une protéine secrétée par certains rhizobiums augmente la gamme de plantes nodulées (Economou et al. 1994 ; Vlassak et al. 1998), probablement en formant des canaux ioniques dans la membrane des plantes (Sutton et al. 1994). La plante perçoit la présence des facteurs Nod dans les cellules ainsi qu'à la surface des membranes (Philip-Hollingsworth et al. 1997). Timmers et al. (1998) ont montré grâce à des anticorps dirigés contre les LCOs que ces facteurs Nod sont fixés au niveau la paroi cellulaire de la plante.

2.2. Le parasitisme implique également une communication entre plante et micro-organisme

Par opposition aux interactions symbiotiques de types nodulation ou mycorhization, la perception d'un parasite par la plante ne facilite pas la pénétration et l'établissement du micro-organisme dans les tissus végétaux. La reconnaissance du micro-organisme pathogène par la plante et l'induction des mécanismes de défense sont initiées par la perception de molécules appelées éliciteurs. Les éliciteurs sont classiquement regroupés en deux catégories, les éliciteurs généraux et les éliciteurs race-spécifiques.

Les éliciteurs généraux sont soit produits par la plante hôte à partir de ses propres constituants suite à l'interaction avec l'agent pathogène, soit des constituants structuraux de la surface de l'agent pathogène ou des produits de sécrétion de leur métabolisme. Les éliciteurs généraux sont de nature très variée, oligosaccharidique, protéique ou glycoprotéique ou lipidique. Les oligosaccharides sont générés par la dégradation des polysaccharides par des enzymes de l'hôte ou du micro-organisme agresseur (Agrios 2005).

La plante perçoit la présence du micro-organisme en détectant les éliciteurs libérés par le pathogène. Ces éliciteurs n'induisent généralement pas la mort des végétaux, si ce n'est dans le cas d'une réaction d'hypersensibilité qui conduira à la destruction de tissues végétaux.

Dans le cas des champignons, deux principaux types d'éliciteurs (glucanes et chitine) sont bien connus et constituent les éléments majeurs de la paroi fongique (figure 12a).

Le terme générique « glucane » couvre un large groupe de polymères de D-glucose différant à la fois en type et en proportion relatives de ponts glycosidiques. Les glucanes les plus abondants dans les parois cellulaires fongiques présentent une configuration de type β-. Ceux-ci sont habituellement un des constituants des parois. Toutefois, un groupe relativement restreint de champignon contient dans ses parois des polymères de glucoses liés par des ponts α-glycosidiques. La plupart des glucanes fongiques présents dans la paroi cellulaire contient des liaisons glycosidiques mixtes, par exemple des β-1,3 et β-1,6 (Farkas 1979) (figure 12b). Les β-glucanes sont libérés par l'action d'une β-glucanase sur la paroi du parasite. Cette enzyme est secrétée par la plante dans son environnement de manière constitutive. Sa production est également stimulée lors de la présence d'un pathogène, elle est classée parmi les protéines PR-5 ("Pathogenesis Related 5").

La chitine (figure 12c) est un homo-polymère linéaire et insoluble de N-acetyl-D-glucosamines (GlcNAc) liées par des ponts β-1,4 (Collinge et al. 1993). La chitine est synthétisée pendant la croissance apicale des hyphes des champignons (Wessels 1986) et constitue un des composés primaires de la paroi de tous les champignons « vrais » (Farkas 1979). C'est donc au cours de la croissance hyphale que la chitine est le plus facilement accessible pour les enzymes hydrolytiques produites par la plante. Ces enzymes, les chitinases, ont un mode d'action proche des β-glucanases. Les chitinases libèrent des sous unités de chitine.

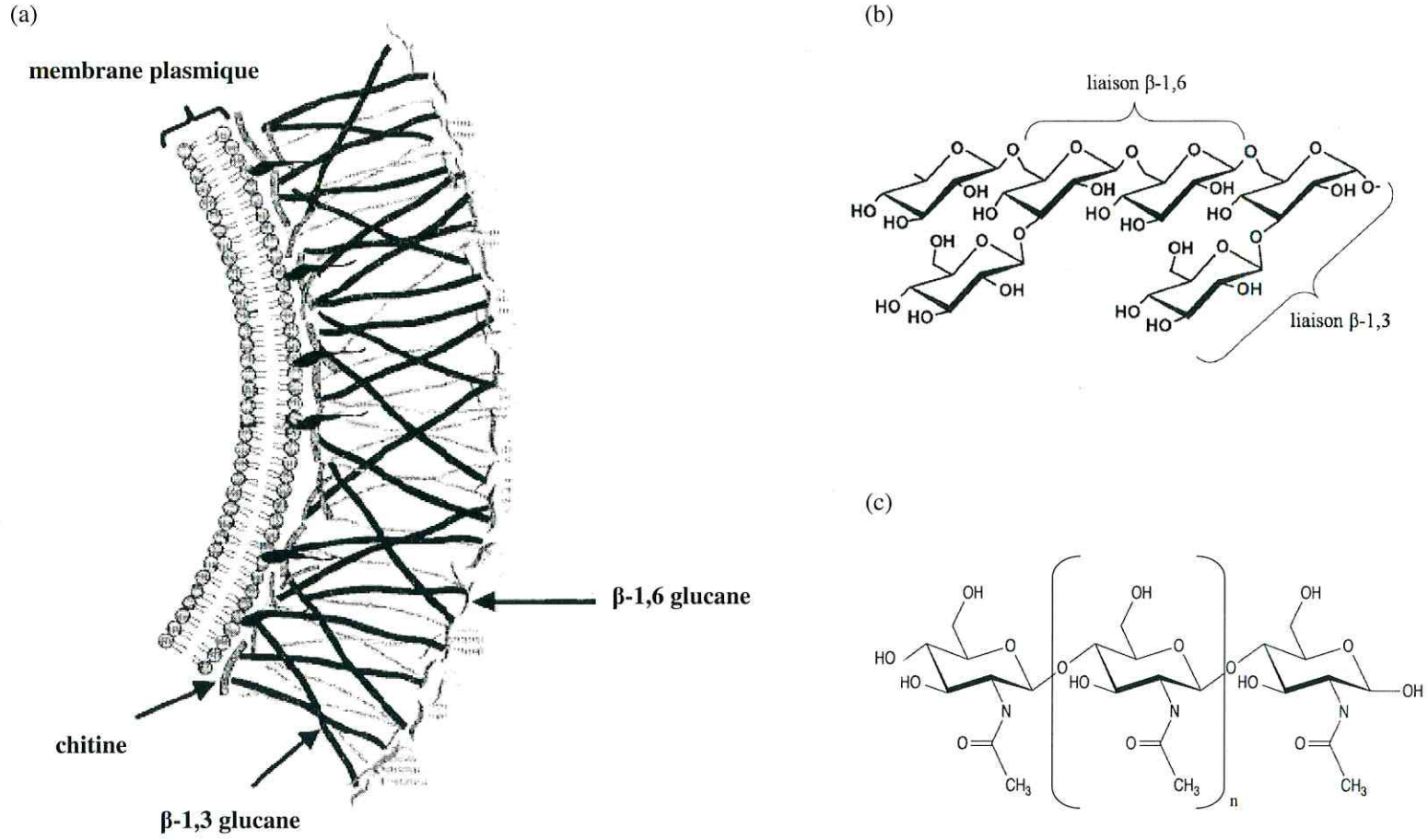


Figure 12. Constituants majeurs de la paroi fongique (a) (Selitrennikoff 2001), structure chimique de β-1,3 et β-1,6 glucanes (b) (d'après Buchanan et al. 2001), structure chimique de la chitine (c) (d'après Buchanan et al. 2001)

La détection de molécules issues de la dégradation des structures végétales par les enzymes libérées par le micro-organisme est double. En effet, le parasite détecte la plante grâce à ces molécules, tandis que la plante percevant également les produits de dégradations de ses propres structures, active sa défense. Ces molécules sont des oligogalacturonates constitués par des homopolymères d'acides α-1,4 galacturoniques. Ils sont issus le plus souvent de la digestion des composés de la lamelle pectique (Agrios 2005).

Dans le cas des éliciteurs race-spécifiques, l'interaction plante/agent pathogène nécessite la reconnaissance spécifique par une protéine de la plante d'une molécule produite par l'agresseur. Le mécanisme moléculaire qui conduit à l'induction de résistance de la plante est classiquement expliqué par la théorie "gène pour gène" (Flor 1971). Pour que la plante soit résistante à un agent pathogène spécifique, une paire de gènes complémentaires sur la plante (gène de résistance) et l'agent pathogène (gène d'avirulence A) doit exister. L'interaction directe ou indirecte entre les produits de ces deux gènes conduit à la résistance. L'absence ou l'altération de l'un ou l'autre des gènes conduit au développement de la maladie. Sur le plan biologique, le modèle très souvent utilisé pour interpréter cette reconnaissance gène pour gène est le modèle ligand (Avr)-récepteur (R) (tableau 1).

Tableau 1. Développement ou non de la maladie selon la théorie « gène pour gène » de Flor (d'après Agrios 2005)

	Gènes de résistance ou susceptibilité chez la plante	
Gènes de virulence ou d'avirulence chez le pathogène	R (résistant) dominant	r (susceptible) récessif
A (avirulent) Dominant	AR (-)	Ar (+)
a (virulent) récessif	aR (+)	ar (+)

Le signe moins (-) indique une réaction incompatible, et ainsi l'absence d'infection. Le signe plus (+) indique une réaction compatible, et ainsi le développement de l'infection

Si le dialogue lors de la nodulation ou la perception d'un pathogène sont largement décrits, le flou persiste sur la communication qui s'établit dans le cas des mycorhizes au sens large.

2.3. Les mécanismes de communications lors des symbioses mycorhiziennes sont encore largement inconnus

2.3.1. La formation de la mycorhize arbusculaire serait le résultat de la perception d'une molécule volatile

Les signaux échangés entre racines hôtes et champignon mycorhizien à arbuscule avant et après colonisation ne sont pas entièrement compris. Cependant des stades morphologiques distincts dans le développement du champignon ont été définis (Smith & Read 1997). Les exsudats racinaires stimulent la germination des spores, mais ne sont pas indispensables à ce processus. Des données expérimentales indiquent que la qualité et la source des exsudats jouent un rôle important dans la stimulation de la germination. Par exemple, les exsudats des plantes non hôtes tels *Brassica* spp. ou *Lupinus* spp. ne stimulent pas la germination (Giovannetti et al. 1993).

Il a été progressivement mis en évidence que les racines émettaient des composés volatiles stimulant une croissance polarisée du champignon mycorhizien (Koske 1982). Une des premières substances volatiles avec ces propriétés est le CO_2, qui peut stimuler la croissance extensive de certains champignons arbusculaires *in vitro* (Bécard & Piché, 1989). Des composés chimiques solubles, dont les exsudats de plantes, élicitent la croissance du champignon. Cet effet est accru quand il est combiné à l'action du CO_2 (Bécard & Piché, 1989). Il a été suggéré que le CO_2 est une source essentielle de carbone pour la croissance des hyphes et qu'il serait impliqué dans le catabolisme des lipides d'hyphes en croissance. Accréditant cette hypothèse, il a été observé que le carbone provenant du CO_2 marqué au ^{14}C était fixé par *Gigaspora rosea in vitro* (Bécard & Piché, 1989). Ainsi, le possible double rôle du CO_2 dans la biologie de la mycorhize arbusculaire, en tant que déclencheur de germination et source de carbone, ne peut être exclue. La généralisation de cette voie à tous les champignons à arbuscule nécessite encore des données complémentaires.

Il est vraisemblable que d'autres composés encore inconnus existent. Ils pourraient être analogues aux oligosaccharides qui agissent comme molécules signales aussi bien dans les interactions plantes-pathogènes, que dans les interactions légumineuses-*Rhizobium*. Fry et al. (1993) ont montré que les champignons mycorhiziens présentent des activités cellulases et endopolygalacturonases, et que ces enzymes présentent la capacité de catalyser la libération

d'oligosaccharides issues de la paroi cellulaire de la plante. Ces derniers composés pourraient déclencher la colonisation de la plante par le champignon grâce à une cascade d'événements qui sont autorégulés et contrôlés par la plante (Salzer & Boller 2000).

Ces composés induisent de drastiques modifications dans la structure hyphale, Buée et al. (2000) ont ainsi principalement observé une intensification des ramifications hyhales sous l'effet d'exsudats racinaires partiellement purifiés. Au cours de ces travaux, le rôle de flavonoïdes ou de composés issus des voies métaboliques qui leur sont liées n'a pu être prouvé (Buée et al. 2000) alors que leur rôle lors de la nodulation est connu.
Récemment, le rôle des sesquiterpènes produits par la plante a été mis en évidence (Kohki et al. 2005). En effet, le strigolactone 5-deoxy-strigol, le sorgolactone et le strigol induisent la ramification des hyphes issus de spores germées du champignon *Gigaspora margarita* à de très faibles concentrations.

La perception du champignon par la plante reste un mécanisme inexpliqué. En effet, aucune molécule fongique issue de champignons arbusculaires n'a été jusqu'à présent isolée. Cependant, l'existence de telles molécules ne fait aucun doute. De manière remarquable, c'est via la régulation d'un gène que la perception de molécules fongiques par la plante a été le plus clairement mise en évidence. Kosuta et al. (2003) ont démontré que les hyphes issus de spores en germination produisent un facteur diffusible qui est perçu par les racines en l'absence de contact physique direct. Ce facteur induit l'expression du gène *MtEnod11* connu pour être exprimé lors de la nodulation. A cours de cette étude, tous les champignons endomycorhiziens testés (*Gigaspora rosea*, *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita*, et *Glomus intraradices*) ont fourni des réponses similaires ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de reconnaissance commun à ce type de symbiose (Kosuta et al. 2003).

2.3.2. Les communications lors de l'ectomycorhize

Comme pour la nodulation ou la mise en place d'une interaction avec un pathogène, l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne implique l'échange de signaux entre les deux partenaires avec pour résultat des modifications morphologiques majeures incluant une augmentation de la croissance mycélienne (Lagrange et al. 2001) mais aussi une augmentation de la croissance et de la résistance des arbres (Smith & Read 1997). La nature

hormonale de cette stimulation de la ramification du système racinaire est souvent évoquée comme résultant de l'action de molécules fongiques. Les champignons ont en effet la capacité de synthétiser des hormones végétales (Ulrich 1960) ou des molécules capables de modifier l'activité hormonale de la plante (Béguiristain et al. 1995).

2.3.2.1. L'acteur majeur de la théorie hormonale : l'auxine

Les travaux d'Ulrich (1960) et Slankis (1973) ont abouti à l'hypothèse que l'acide indole-3-acétique (AIA) pourrait être l'un des composés majeurs dans la formation des ectomycorhizes. En effet, l'incubation de racines de pin dans une solution contenant de l'auxine ou du milieu de culture de champignons ectomycorhiziens stimule la formation de racines latérales morphologiquement comparables à des ectomycorhizes. De plus, une souche d'*Hebeloma cylindrosporum* surproductrice d'AIA présente la capacité de former un plus grand nombre de mycorhizes que la souche sauvage (Gay et al. 1994). Niemi et al. (2002) ont en outre montré qu'un apport exogène d'auxine stimule la formation de mycorhizes chez le pin.

D'un point de vue transcriptomique, il est possible d'obtenir une régulation identique de certains gènes lors de la symbiose ectomycorhizienne ou à la suite d'un apport d'auxine. Ainsi chez l'eucalyptus, un gène codant pour une glutathione-S-transferase est similairement surexprimé en présence du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* ou d'AIA (Nehls et al. 1998). Dans les deux cas, la présence de la protéine a été confirmée (Tagu et al. 2003). De plus, Charvet-Candela et al. (2002) ont montré que de l'AIA fongique modifie l'expression d'un gène *Aux/IAA* exprimé en présence d'auxine chez la plante. Ces divers résultats mettent en évidence la perception d'auxine fongique au cours du dialogue moléculaire. Durant l'échange de signaux entre les partenaires, l'auxine devrait participer à la mise en place de la symbiose via la régulation de l'expression des gènes chez l'arbre.

2.3.2.2. Une hormone fongique à présent bien connue : l'hypaphorine

L'hypaphorine a été détectée chez diverses plantes vasculaires appartenant principalement à la famille des légumineuses. Béguiristain et al. (1995) ont mis en évidence

pour la première fois la production d'hypaphorine chez un micro-organisme, le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* lors de la colonisation de racine d'*Eucalyptus globulus*. L'hypaphorine fongique serait transférée à la plante dans les mycorhizes. Les parties aériennes des plantules dont les racines sont colonisées par les hyphes de *Pisolithus tinctorius* contiennent en effet deux fois plus d'hypaphorine que celles de plantules cultivées en son absence. Selon Ditengou et al. (2000) et Ditengou & Lapeyrie (2000), l'hypaphorine contribuerait à réguler le développement racinaire au cours de la mise en place des tissus symbiotiques. L'hypaphorine possède un noyau indole comme l'AIA. Récemment il a été montré que l'hypaphorine présente une activité anti-auxinique (Ditengou et al. 2000 ; Ditengou & Lapeyrie, 2000). L'hypaphorine inhibe l'allongement des poils absorbants (Béguiristain & Lapeyrie, 1997), toutefois un apport d'auxine exogène permet de restaurer la croissance de poils inhibée en présence d'hypaphorine (Ditengou et al. 2000). Réciproquement, un apport d'hypaphorine rétablit la croissance de pivots racinaires dont l'élongation avait été inhibée en présence de fortes concentrations d'AIA (Ditengou & Lapeyrie, 2000) (figure 13).

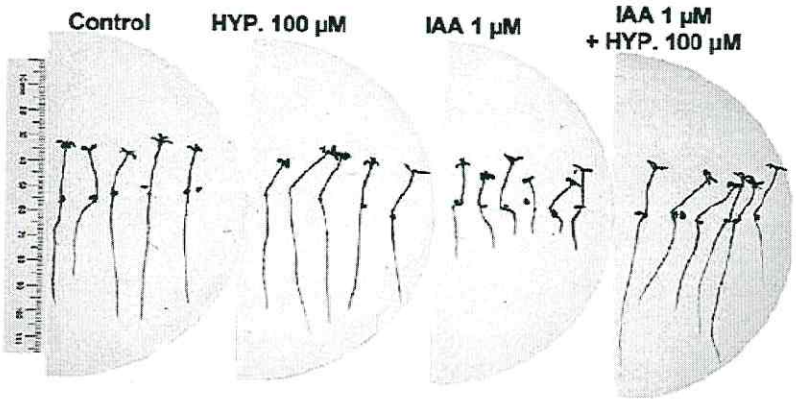


Figure 13. Un exemple de l'antagonisme entre auxine et hypaphorine (Ditengou et al. 2000)

De manière étonnante à la vue de cette caractérisation morphologique, la glutathione-S-transferase présentée plus haut est régulée de manière comparable par le champignon ectomycorhizien, l'auxine, ou l'hypaphorine (Nehls et al. 1998).

La relation entre hypaphorine et AIA semble confirmer que les auxines et les composés indoliques, comme évoqué dans le paragraphe précédent, jouent un rôle important

dans la mise en place de la symbiose. Les hormones ne constituent cependant pas le seul groupe de molécules dont le rôle dans le dialogue moléculaire entre plante et champignon ait été démontré.

2.3.2.3. La perception du champignon ectomycorhizien implique des molécules communes aux champignons pathogènes

La perception du partenaire fongique lors de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne semble répondre aux mêmes mécanismes que dans le cas du parasitisme. Ainsi la présence d'un champignon ectomycorhizien ou d'un champignon pathogène induit la production de chitinases racinaires (Albrecht et al. 1994). La production de chitinases répond à de nombreux stimuli, notamment à la présence des éliciteurs présentés dans le cas des interactions plantes-pathogènes. La stimulation de l'activité chitinasique lors de l'apport d'extraits fongiques issus de souches ectomycorhiziennes, implique que la plante est capable de percevoir son symbiote mycorhizien sans que celui-ci ne différencie de structure symbiotique (Albrecht et al. 1994). On peut donc supposer que les éliciteurs précédemment décrits (α- ou β-glucanes, ainsi que la chitine) constituent des acteurs importants dans la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne.

3. La mise en place des symbioses conduit à une régulation différentielle de l'expression de gènes

3.1. Les outils d'étude du transcriptome

L'étude de la régulation génique chez la plante lors d'interactions avec des micro-organismes utilise les mêmes outils qu'il s'agisse de l'étude de la nodulation, des réponses aux pathogènes ou aux champignons mycorhiziens. Ainsi, quatre modes d'investigations sont actuellement utilisées de manière préférentielle. Sans pousser leurs descriptions dans le détail, il est possible de les caractériser succinctement, et de les classer en fonction du caractère ciblé de leur utilisation.

(1) L'utilisation d'une banque génomique ou d'ADNc existante pour un organisme donné constitue l'approche la plus large. En effet, depuis maintenant quelques années, les efforts de nombreux laboratoires ont permis de produire des quantités considérables de fragments de gènes (constituant des EST pour "Expressed Sequence Tags"). Ces banques offrent la possibilité d'accéder à un nombre très important de gènes. Elles peuvent être utilisées dans des contextes variés et autres que celui qui a motivé leur construction. La régulation dans le cas d'interactions peut notamment être observée dans son ensemble via des techniques d'hybridations sur des puces à ADN. Parmi les espèces végétales, *Arabidopsis*, dont le génome est entièrement séquencé, constitue sans nul doute la plante modèle permettant les études les plus larges. Les récents travaux de Wang et al. (2005) portant sur l'interaction avec *Pseudomonas fluorescens* ou ceux de Hammes et al. (2005) portant sur les modifications induites par les nématodes sur les racines en sont des exemples. Parmi les espèces végétales mycorhizienne, *Medicago truncatula* (Journet et al. 2002) utilisée dans l'étude de la mycorhize arbusculaire ou de la nodulation, et le peuplier (Martin comm. Pers.) utilisé plus particulièrement dans l'étude de l'ectomycorhize sont les espèces ayant connue les avancées les plus significatives en matière de séquençage du génome.

(2) La construction d'une banque d'ADNc permet de rechercher les gènes régulés lors d'une interaction. L'ensemble des ARN de la plante en interaction est extrait, et via une transcription inverse puis un clonage, une banque d'ADNc est obtenue. Cette banque constitue un instantané des gènes exprimés à un moment déterminé de l'interaction. Il est

nécessaire de comparer l'expression de ces gènes lors de l'interaction à celle chez la plante seule. L'utilisation des techniques d'hybridation précédemment évoquées peut ensuite être appliquées. Ces deux stratégies (utilisation d'un génome séquencé, ou construction d'une banques d'ADNc) présentent l'avantage d'autoriser l'étude de gènes aussi bien sur-exprimés que réprimés lors des interactions. Elle permet aussi de rendre compte de la population de gènes non-régulés (Coupe et al.1997 ; Peter et al. 2003).

(3) La construction d'une banque dite « soustraite » permet d'éliminer la population d'ARN communs entre les différents paramètres étudiés (plante seule vs. plante en interaction). Cette technique va restreindre la quantité de gènes étudiés à ceux uniquement exprimés différentiellement par rapport à un contrôle. Comme dans le cas des précédentes approches, l'étude se fait principalement via les mêmes techniques d'hybridation (Asiegbu et al. 2005, Grunwald et al. 2004, Krüger et al. 2004, Menotta et al. 2004).

(4) L'approche gène candidat est la plus ciblée. En effet, il s'agit d'étudier spécifiquement la régulation d'un gène. Cette approche nécessite de posséder un nombre conséquent d'informations justifiant une hypothèse de travail précise. Si la séquence de ce gène n'est pas connue chez l'espèce étudiée, il est nécessaire de la rechercher en utilisant les séquences protéiques homologues présentes dans les bases de données pour d'autres organismes. Le caractère dégénéré du code génétique permet ensuite par PCR l'amplification chez l'organisme étudié du gène ou fragment de gène recherchés. Cette technique permet également d'obtenir plusieurs gènes d'une même famille (Salzer et al. 2000 ; Morel et al. 2005).

3.2. Les différentes interactions entre plantes et microbes provoquent des réponses communes chez les plantes

Ces différentes techniques ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des symbioses entre plantes et microbes. La capacité de certaines plantes appartenant aux genres *Medicago, Lotus,* ou *Vicia* à établir aussi bien des symbioses fixatrices d'azote qu'endomycorhizienne est une caractéristique majeure permettant la mise en évidence de réponses communes lors de la mise en place de ces interactions. Ainsi de nombreux gènes

exprimés durant la nodulation sont également exprimés dans la mycorhize arbusculaire, dont les gènes *ENOD2, ENOD40* (Van Rhijn et al. 1997), *ENOD5*, *ENOD12* (Albrecht et al. 1998), une hémoglobine symbiotique *VFLb29* (Frühling et al. 1997), une aquaporine et une glutathione-S-transferase (Sanchez et al. 2004). Mais de manière encore plus remarquable, il est intéressant de constater que nombres des gènes régulés lors de ces symbioses mutualistiques répondent également à la présence de pathogènes. Ainsi, le gène *MtGmLs154* (Sanchez et al. 2004) homologue à des gènes de réponses à des blessures et des PR10 (Sanchez et al. 2004, Gamas et al. (MPMI) 1998) sont régulés positivement lors de nodulation ou de la mycorhize arbusculaire alors qu'ils ont d'abord été caractérisés lors d'interactions parasitaires.

Afin de caractériser les phases de reconnaissance entre plantes et microbes, la régulation génique a été étudiée avant même le développement de structures symbiotiques visibles. Ainsi chez *Medicago*, le gène de nodulation *MtENOD11* (déjà évoqué au chapitre 2.3.1) est exprimé dès les premiers stades de la symbiose arbusculaire en l'absence de contact direct entre les racines et le champignon. L'expression de ce gène apparaît comme un marqueur des événements de préinfection et d'infection bactérienne dans les cellules racinaires et dans les nodules durant l'interaction symbiotique rhizobienne (Journet *et al.* 2001). De manière remarquable, ce gène code pour une protéine riche en prolines intervenant dans la structuration de la paroi cellulaire. Ce type de protéine appelée en anglais "proline rich protein" (PRP) est impliqué dans la réorganisation de la paroi cellulaire de la plante pendant la phase de réponse à un pathogène (Sheng *et al.* 1991). Il se forme ainsi une matrice extracellulaire enveloppant l'haustorium et les hyphes intracellulaires.

Parmi les gènes exprimés lors de la nodulation, la mycorhize arbusculaire, ou lors d'une attaque parasitaire, il faut citer les chitinases. Les différents types de chitinases sont regroupées dans les protéines de réponse aux pathogènes de type 3 ("pathogen-related protein 3" = PR3). En effet, des gènes codant pour des chitinases sont exprimés et/ou des activités chitinasiques sont augmentées lors d'infections parasitaires fongiques (Albrecht et al. 1994, Davis et al. 2002), bactériennes (Gerhardt et al. 1997) ou virales (Balsalobre et al. 1997; Burketova et al. 2003), mais aussi durant la nodulation (Goormachtig et al. 1998; Kim & Sun 2002) ou la mycorhization arbusculaire (Salzer et al. 2000; Bestel-Corre et al. 2002). Les chitinases catalysent l'hydrolyse de la chitine. Elles présentent la caractéristique d'être exprimées en l'absence d'interaction, en effet de nombreuses publications rendent compte de

leurs stimulations par des éliciteurs (Bravo et al. 2003, Büchter et al. 1997, Goormachtig et al. 1998, Kästner et al. 1998, Salzer et al. 1997).

Le dialogue moléculaire précédent la symbiose apparaît donc comme un élément majeur dans les modifications physiologiques ayant lieu chez la plante. La stimulation de l'expression de gènes codant pour des protéines de défense implique que les plantes perçoivent de manière identique, au moins pour partie, le microbe qu'il soit mutualistique (nodulation ou symbiose arbusculaire) ou parasitaire. La proximité des structures moléculaires des substances émises par les micro-organismes (facteurs Nod, chitine, β-glucanes) apparaît comme une des raisons essentielles de ces réponses. Les protéines produites en réponse à ces éliciteurs pourraient jouer un rôle similaire dans toutes ces interactions : contenir la croissance du micro-organisme dans les tissus végétaux de manière active (utilisation d'enzymes dégradant les structures microbiennes, et créer ainsi une barrière chimique) ou de manière passive (renforcement des parois cellulaires végétales conduisant à la création d'une barrière physique).

3.3. Plusieurs modèles pour caractériser l'organe ectomycorhizien et son développement

Dans le cas des symbioses ectomycorhiziennes, de nombreuses analyses sur la régulation des gènes ont elles-aussi permis de décrire la mise en place de l'interaction. Différents couples ectomycorhiziens ont été utilisés pour étudier soit le partenaire fongique soit le partenaire végétal. Du côté de la plante, trois espèces d'arbres sont utilisées pour caractériser l'organe symbiotique (figure 14): le bouleau (*Betula pendula*), l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), le peuplier (*Populus tremula* L. X *P. tremuloides*). Le chêne pédonculé (*Quercus robur*) (figure 14d) a permis d'étudier la phase pré-symbiotique et la régulation génique dans l'ensemble du système racinaire lors de la présence du champignon ectomycorhizien (Krüger et al. 2004).

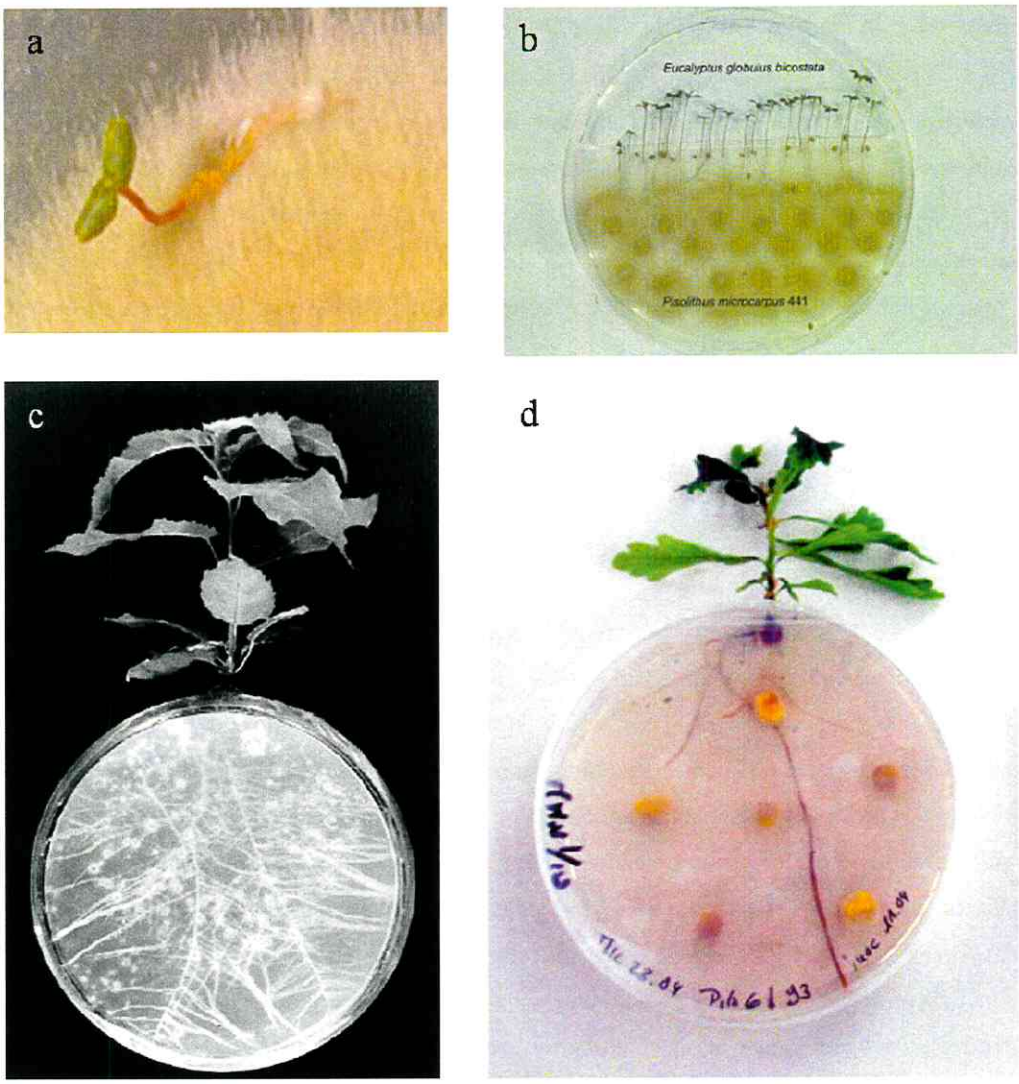


Figure 14. Quatre systèmes de culture *in vitro* permettant d'étudier la symbiose ectomycorhizienne utilisant (a) le bouleau (*Betula pendula*) (Le Quéré et al 2005), (b) l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) (Duplessis et al 2005), (c) le peuplier (*Populus tremula* L. X *P. tremuloides*) (Hampp et al 1996) et (d) le chêne pédonculé (*Quercus robur*)

Les autres modèles ont permis de caractériser précisément l'établissement de la symbiose au niveau de l'organe mycorhizien. Ainsi, la cinétique d'établissement de l'ectomycorhize a été récemment décrite par Duplessis et al. (2005) chez l'eucalyptus et par Le Quéré et al. (2005) chez le bouleau. Ces études ont suivi la régulation des gènes depuis la formation d'agrégats d'hyphes autour de la racine primaire de la graine germée (après 2 à 4

jours selon le modèle), jusqu'à la mycorhize entièrement développée et fonctionnelle (après 14 à 21 jours) (Duplessis et al. 2005, Le Quéré et al. 2005). Ces travaux ont montré que la régulation de certains gènes varie au cours de la mise en place de la symbiose, alors que d'autres gènes sont exprimés de façon constante tout au long des cinétiques présentées. Une réponse défensive de la plante n'a pas, comme dans le cas de la nodulation ou de la symbiose arbusculaire, été clairement appuyée par la régulation de gènes majeurs, bien qu'une "elicitor-induced *O*-methyltransferase" (Duplessis et al. 2005) et une PR10 (Le Quéré et al. 2005) ont été mises en évidence. Une PR10 est en effet exprimé lors de l'interaction entre le bouleau et les champignons *Paxillus involutus* et *Hebeloma cylindrosporum* (Feugey et al. 1999). Il est important de noter que l'amplitude de la régulation de la majorité des gènes impliqués dans la symbiose est très modérée. Ainsi les gènes sont généralement régulés par un facteur proche de 4.

Ces études globales sur les cinétiques structurales ont été réalisées sur la racine unique ou faiblement ramifiée issue de la graine. Grâce à la micro propagation d'un clone de peuplier, Marjanovic et al. (2005) ont récemment suivi l'expression de différentes aquaporines dans les différentes structures racinaires typiques des arbres, chez des individus mycorhizés. Ainsi, cette étude montre que selon l'aquaporine la régulation peut être similaire ou différente dans les racines latérales et/ou dans les racines principales. Cependant, la régulation de gènes d'arbres durant le dialogue moléculaire pré-symbiotique reste encore largement à explorer. En effet, des modifications physiologiques existent avant la mise en place de structures fongiques particulières autour des racines tels les agrégats d'hyphes. Ces modifications impliquent une perception du champignon ectomycorhizien par la plante. De plus, la régulation génique dans les différentes racines n'a pas été étudiée de manière large. Pour mieux comprendre le caractère essentiel de la distinction faite par Marjanovic et al. (2005), il est nécessaire de décrire le système racinaire des arbres.

4. Le système racinaire de l'arbre

La première racine de la plante provient de l'embryon et constitue la racine primaire. Chez les gymnospermes, les magnoliidées et les dicotylées, la racine primaire, aussi appelée racine pivotante ou racine principale, s'enfonce directement dans le sol et produit des racines latérales ou secondaires (Laux & Jürgens 1997). Les plus anciennes des racines latérales se

trouvent près du collet de la racine primaire (à la jonction entre la racine et la tige) et les plus jeunes sont produites au voisinage de la pointe de la racine (figure 15).

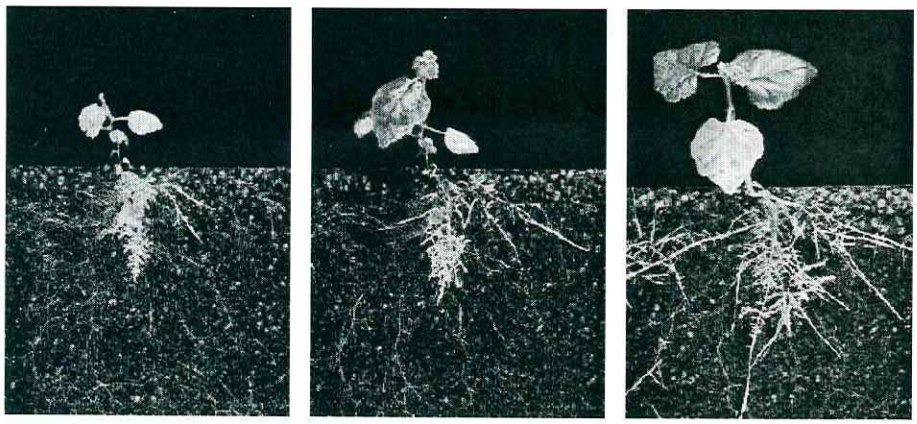


Figure 15. Développement racinaire d'un plant de bouleau issu de graine (Perez-Moreno & Read 2000)

Ce type de système racinaire – formé à l'origine d'une racine primaire bien développée et de ses ramifications – est un enracinement pivotant, par opposition à l'enracinement fasciculé des monocotylées chez qui le système racinaire se développe à partir de racines adventives provenant de la tige (Malamy & Benfey 1997).

Chez la plupart des angiospermes, les racines latérales prennent naissance dans le péricycle. On dit qu'elles sont endogènes parce qu'elles trouvent leur origine en profondeur à l'intérieur de la racine principale. Les divisions du péricycle qui sont à l'origine des racines latérales ont lieu à l'arrière de la zone d'élongation dans les tissus racinaires partiellement ou totalement différenciés (Raven et al. 2003). Chez les racines d'angiospermes, le péricycle et l'endoderme contribuent souvent tous les deux à la production d'un nouveau primordium de racine même si très souvent les cellules dérivées de l'endoderme ont une faible durée de vie. En s'accroissant, la jeune racine latérale poursuit son chemin à travers le parenchyme cortical en digérant éventuellement par des enzymes les cellules corticales se trouvant sur son chemin. Encore très jeune, la racine latérale différencie une coiffe et un méristème apical, les premiers méristèmes font alors leur apparition. A l'origine, les cylindres centraux de la racine latérale et ceux de la racine principale ne sont pas connectés. Ils se rejoignent ultérieurement grâce à la différenciation en xylème et phloème des cellules dérivées du parenchyme qui les séparent (Blakely & Evans 1979 ; Malamy & Benfey 1997).

L'extension du système racinaire, c'est-à-dire la profondeur qu'il atteint et la distance latérale qu'il parcourt dans le sol, dépend de plusieurs facteurs comme l'humidité, la température et les propriétés du sol. La plus grande part de ce que l'on appelle les « racines nourricières » (les minces racines qui interviennent activement dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux) se dispersent généralement à moins d'un mètre de profondeur. Chez beaucoup d'arbres, la plupart de ces racines sont confinées dans l'horizon superficiel de 15 cm normalement le plus riche en matière organique. Certains arbres, comme les épicéas, les hêtres et les peupliers ne produisent que rarement des racines pivotantes profondes alors que d'autres comme les chênes et beaucoup de pins enfoncent souvent leurs racines assez profondément. L'extension latérale des racines dépasse en général de 4 à 7 mètres le diamètre de la couronne de l'arbre (Rameau 1985).

Ce sont les racines nourricières ou racines fines, issues directement des racines latérales qui sont colonisées par les champignons ectomycorhiziens présents dans le sol. La partie apicale de la racine latérale peut elle-même évoluer en mycorhize.

5. Objectifs

Le dialogue moléculaire entre un végétal et un micro-organisme induit la régulation de l'expression des gènes chez les deux partenaires avant même que la symbiose soit effective. La mise en place de la symbiose ectomycorhizienne devrait répondre aux mêmes règles de communications entre plante et microbes que celles des autres interactions. En tenant compte du caractère hiérarchique du système racinaire des arbres, les travaux qui vont être présentés avaient pour but d'étudier la régulation de gènes de chêne au cours de la mise en place de la symbiose avec le basidiomycète *Piloderma croceum* avant le développement de structures différenciées chez l'un ou l'autre des partenaires.

L'utilisation d'un clone de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) permet de travailler sur une base génétique uniforme et affranchit la mise en place de l'ectomycorhize d'une possible influence des réserves contenues dans la graine. Le système racinaire est hiérarchisé et fournit de ce point de vue une copie assez proche d'un système s'étant développé dans un sol forestier. De plus il est possible d'étudier la formation de l'ectomycorhize avec plusieurs partenaires fongiques qui établiront une symbiose après une période variable selon le

champignon (Herrmann et al. 1998). Par contre, la transformation génique du chêne n'est actuellement pas réalisée, et ne permet donc pas d'élargir la gamme des recherches effectuées sur cette plante. De plus, l'utilisation d'un tel clone de chêne présente des contraintes expérimentales limitantes puisque près de 4 mois de cultures sont nécessaires avant d'envisager des études moléculaires sur la phase pré-mycorhizienne (Herrmann et al. 1998). Par comparaison, des systèmes mycorhiziens issus de graines fournissent des ectomycorhizes après quelques jours (Duplessis et al. 2005 ; Le Quéré et al. 2005).

Le partenaire fongique choisi présente également des caractéristiques remarquables. En effet, durant l'interaction *Quercus robur* - *Piloderma croceum* (figure 14 d), les effets classiquement observés lors de l'ectomycorhize apparaissent avant la différenciation de structures mycorhizienne proprement dites. Au cours de la phase pré-symbiotique, la présence du champignon ectomycorhizien dans cette interaction va stimuler l'élongation et la production des racines latérales et va également provoquer l'augmentation de la surface foliaire (Herrmann et al. 1998). On notera que *Paxillus involutus* mycorhize plus vite mais sans provoquer de telles modifications morphologiques (Herrmann et al. 1998). Les capacités photosynthétiques ainsi que le niveau de protection de la machinerie photosynthétique sont accrus au cours de la période pré-mycorhizienne avec *Piloderma croceum* (Herrmann et al. 2004). Ces caractéristiques impliquent la perception par la plante du partenaire fongique.

1. L'implication de l'auxine dans la mise en place de l'ectomycorhize a fait l'objet de nombreuses études. Chez le chêne, de l'AIA exogène n'a pas d'effet significatif sur le développement de la plante seule, par contre il accélère la formation de mycorhizes chez la plante inoculée (Herrmann et al. 2004). Dans un premier temps, l'expression de gènes sélectionnés dans un système racinaire entier a été suivie uniquement dans les racines latérales avec ou sans champignon. Puis nous avons cherché à savoir si une réponse comparable à la présence du champignon ectomycorhizien pourrait être obtenue par un apport exogène d'AIA, dans quelles proportions, et au niveau de quels gènes.

2. Les chitinases sont présentes dans tous les types d'interactions entre plantes et microbes. La régulation de gènes codant pour des chitinases a été étudiée pour tous les types de symbiose, à l'exception de la symbiose ectomycorhizienne bien que leurs présences et activités soient connues (Albrecht et al. 1994). Une seconde étude a donc cherché à isoler des fragments de gènes codant pour des chitinases pour en suivre

l'expression durant la phase pré-symbiotique. L'expression de ces gènes a été suivie de manière distincte dans les racines latérales et dans les racines principales afin de mettre en évidence une possible expression différentielle et peut-être ainsi préciser une spécificité d'action des chitinases.

3. Afin d'obtenir une vision plus globale du caractère distinct des racines latérales et des racines principales, une troisième étape d'analyse a consisté à utiliser près de 2000 EST pour suivre de manière large la régulation génique durant le stade pré-mycorhizien. Cette étude doit également donner des informations sur les catégories fonctionnelles répondant à la présence du champignon ectomycorhizien. La régulation des gènes sélectionnés a été suivie au sein de la mycorhize fonctionnelle.

CHAPITRE I

Comparaison de la régulation des gènes de chênes au niveau des racines latérales en présence de Piloderma croceum ou lors d'un apport d'auxine.

Analyse moléculaire lors de l'établissement de l'ectomycorhize chez le couple modèle *Quercus robur* - *Piloderma croceum*, influence de l'AIA sur la régulation des transcrits

Mots clés : calcium/calmoduline, acide indole-3-acétique (AIA), *Quercus robur*, *Piloderma croceum*, stade pré-mycorhizien

Résumé :

Nous avons utilisé une banque composée de 55 gènes régulés dans l'ensemble du système racinaire d'un clone de chêne inoculé avec *Piloderma croceum* pour comparer la régulation génique dans les racines latérales quatre semaines après l'inoculation fongique ou à la suite de l'application d'AIA exogène. 67% des gènes ont été régulés lors d'au moins un traitement. La présence du champignon provoque des modifications d'expression de 58% des gènes, et l'AIA de seulement 31%. *Piloderma croceum* provoque uniquement une sur-régulation des gènes testés, alors que l'AIA provoque aussi bien des surexpressions que des répressions. Bien qu'un seul stade physiologique et qu'une unique concentration d'AIA aient été analysés, 20% des gènes répondent aux deux traitements suggérant que les effets complexes de *Piloderma croceum* pourraient partiellement correspondre à un effet de l'auxine. La régulation de gènes codant respectivement pour une calmoduline et une calcium ATPase lors des deux traitements indique que les flux de calcium pourraient jouer un rôle lors de la formation de l'ectomycorhize dans notre système.

Endocytobiosis Cell Res. 15 (2), 570-578 (2004)

Molecular investigations in ectomycorrhizae establishment in the *Quercus robur* - *Piloderma croceum* model: influence of indole-3-acetic acid on transcripts regulation

P Frettinger[1,2], R Oelmüller[1] F Buscot[2], S Herrmann[2,3]

[1] *Institute of General Botany and Plant Physiology, FSU Jena, Dornburger Strasse 159, D-07743 Jena, Germany;* [2] *Institute of Botany, Department of Terrestrial Ecology, Johannisallee 21-23, D-04103 Leipzig, Germany;* [3] *Institute of Ecology, FSU Jena, Dornburger Strasse 159, D-07743 Jena, Germany*

Abstract

We used a culture system and 55 cDNA fragments regulated in the total root system of oak microcuttings premycorrhizal with *Piloderma croceum* to compare gene regulation in lateral roots four weeks after fungal infection or after the application of exogenous indole-3-acetic acid (IAA). 67% of these genes responded to the treatments. The fungus regulated 58% and IAA 31% of the genes. All genes which responded to *Piloderma croceum* were upregulated, while up- and down-regulated genes were observed after IAA treatment. Although only one developmental stage and a sole IAA dose were analysed, 20% of the genes responded to both treatments even if not in the same way, suggesting that the complex premycorrhizal effects of *Piloderma croceum* and auxin partially activate the same genes. Regulation of genes encoding calmodulin and calcium ATPase in both treatments indicate that calcium flow could also play a role for EM formation in our system.

Introduction

Ectomycorrhizas (EM) are plant-microbe symbiosis involving soil fungi and roots of boreal, temperate but also some tropical forest trees (Smith and Read 1997). In this association the mycobiont promotes acquisition of water and nutrients from soils (Read and Perez-Moreno 2003). Symbiosis establishment involves signal exchanges and interactions between both partners with strong morphological modifications including growth promotion of mycelium (Lagrange et al. 2001) and increase of growth and health of trees (Smith and Read 1997).

Ectomycorrhizal fungi have the capacity to produce plant hormones (Ulrich 1960) or molecules able to alter hormone activity (Béguiristain et al. 1995). The hypothesis of Slankis (1973) emphasizes that indole-3-acetic acid (IAA) could be one major compound in ectomycorrhiza formation. More recently, Charvet-Candela et al. (2002) showed that fungal IAA alters expression of auxin-related genes in plant. But very little is known about the effect of auxin on symbiotic regulated genes.

In a preliminary work, we developed a system to synthesize EM on oak microcuttings and characterised a long premycorrhizal stage with plant growth stimulation as response to inoculation with the mycobiont *Piloderma croceum* (Herrmann et al. 1998).

With this system, 55 premycorrhiza-regulated plant genes were identified in a full root system by a subtractive suppressive hybridization (SSH) experiment (Krüger et al. 2004). In addition, we could manipulate the onset of EM formation by IAA (Herrmann et al. 2004). Although exogenous auxin did not affect significantly root growth of main or lateral roots, addition of IAA allowed an earlier mycorrhization and an extension of the spatial distribution of ectomycorrhizas (Herrmann et al. 2004). The plant growth enhancement after the pre-mycorrhizal stage as well as the accelerated EM formation after the application of IAA suggest a possible perception of exogenous IAA by oak and an implication of the hormone in symbiosis establishment.

In the present study, we compared the regulation of the 55 plant genes previously identified by SSH analysis on complete premycorrhizal root system, in lateral oak roots either premycorrhizal with *Piloderma croceum* or non-inoculated but treated with exogenous auxin. Based on the results, the hormonal role for the fungus is discussed.

Materials and methods

Biological material

Premycorrhizal interaction between micropropagated *Quercus robur* and *Piloderma croceum* was realized in a 90 mm Petri dish system according to Herrmann et al. (1998). In this system, root develops aseptically and two dimensionally within Petri dishes, while the shoot grows outside of the dish. For plants treated by auxin, indole-3-acetic acid previously dissolved in ethanol was added after sterile filtration at a final concentration of 5 µM. Each plant was placed in a 140 mm Petri dish in which humidity was regulated by moistened paper in order to prevent shoot desiccation. Control, inoculated, and IAA-treated plants were cultivated in growth chambers at 25 ±1°C, and illuminated 16h d^{-1} (70 µmol m^{-2} s^{-1}; Philips TLM 115W/33RS).

Root harvesting was performed after about 4 weeks of culture, during the first root flush, that corresponds to the beginning of the outbursting of the apical bud (Herrmann et al. 1998, 2003). Newly lateral roots formed at the end of their exponential growth flush were frozen in liquid nitrogen before RNA extraction. About 20 plants were used for each treatment in order to gather enough transcripts.

Extraction and analysis of RNA

RNA extraction was performed according to Wang et al. (2000).

The 55 cDNAs used for differential screening between the 3 treatments (control plants, inoculated plants or IAA treated plants) were selected as premycorrhiza-related plant genes in Krüger et al. (2004). Clones were amplified by PCR with M13 forward and reverse primers (94°C, 4 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 30 s and 72°C for 2 min). Purity and length of all PCR products were checked by agarose gel electrophoresis.

For reverse northern blots, amplified fragments were separated on 1.5% agarose gels and blotted onto a nylon mem-

brane (Hybond N; Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Identical membranes were blotted for control, inoculated and IAA treated plants (Sambrook et al. 1989). Labelling of the cDNA probes was performed in the presence of 30 µCi[^{32}P]dCTP from 4 µg of total RNA with the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Nylon membranes were preincubated 4h at 65°C in a hybridization solution (6x standard saline citrate (SSC), 5x Denhardt, 0.5% (w:v) sodium dodecyl sulphate (SDS), 100 µg/ml salmon sperm DNA). Radioactive probes were given to a fresh hybridization mixture before membrane immersion. After 16 h of hybridization, membranes were washed 2 times for 15 min in a SSC 2x, SDS 0.1% (w:v) solution. Finally, membranes were wrapped in plastic film before exposition to a phosphorimaging screen (Molecular Dynamics). Data acquisition and transcripts quantification were performed using IMAGEQUANT Software (Amersham Bioscience). Partial pictures of each membrane are presented on Figure 1.

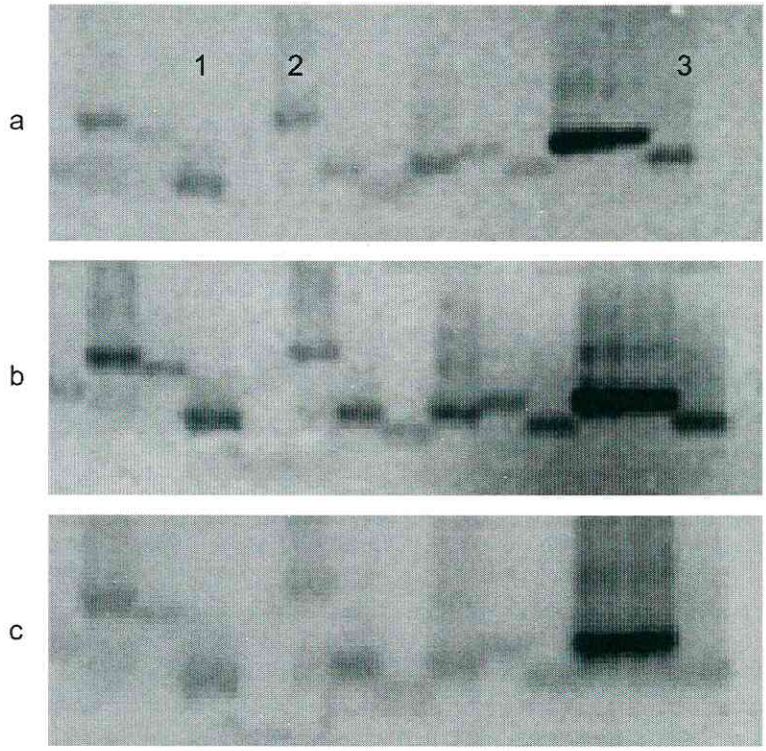


Figure 1: Effects in lateral roots of *Piloderma croceum* or of exogenous IAA on premycorrhiza related genes. Reverse northern blots for (a) control-plants, (b) inoculated-plants, (c) IAA treated-plants. Three example clones are selected: (1) no homology_AJ580040; (2) expansin_AJ577264; (3) no homology_AJ873912. These genes are marked * in Table 1. (1) is only regulated by *Piloderma croceum;* (2) is not regulated for both treatments; (3) is differentially regulated during fungal- and IAA-treatments.

Results-Discussion

Ectomycorrhizal symbiosis formation involves a molecular cross-talking between both partners. It provokes modifications of the root structure that allow establishment of a mixed plant-fungus interface where direct transfer of nutrients takes place. These modifications cause drastic alterations at the transcript level (Duplessis et al. 2005; Johansson et al. 2004). In the present study, we have followed the regulation of 55 pre-symbiotic related genes in the *Quercus robur/Piloderma croceum* model and assessed to which extent these genes were also regulated by exogenous IAA.

From the 55 considered genes, 37 were regulated in at least one of the treatments with either *Piloderma croceum* or IAA (Table 1; see also examples of northern blot experiments in Figure 1). This high proportion (67%) indicates that the SSH bank used was adequate for studying premycorrhizal events. About one third of the genes were not regulated in any of the treatments, which may correspond to the fact that their expression could be specific of main roots, as the SSH bank was obtained from whole root systems (Krüger et al. 2004), and only lateral roots were studied here. It is also possible that some genes of the SSH were not regulated in lateral roots during the narrow development window in which the material was collected for this study. In the following paragraphs we discuss some traits of the regulation pattern found in each treatment. Afterward we compare the patterns of both treatments to enlighten to which extent auxin could be part of the *Piloderma* effect.

Regulation pattern in the Piloderma treatment

In presence of *Piloderma croceum*, 58% of the plant genes regulated in the total roots system (Krüger et al. 2004) were also regulated in the lateral roots (Table 1). Some of these genes, which are upregulated by the fungus, are implicated in signal perception and transmission. Peptidyl-propyl cis-trans isomerase (AJ580022) acts during protein-protein interactions with receptor proteins (Tai et al. 1992; Yem et al. 1992). Calmodulin, (AJ873911) and the identified kinase (AJ580031) play a role as signal transducer in plants (Snedden and Fromm 2001) and as receptor in bacterial or fungal symbiosis (Stracke et al. 2002), respectively. For this functional category of genes, we can therefore hypothesise an implication in the perception pathway, prior to morphological and cellular reorganisation during the EM formation. Further genes of the SSH bank might be implicated in growth and meristemic cell division, i.e. two phosphoglycerate mutases (AJ580028, AJ873927) (Mazarei et al. 2003) and expansin (AJ577264, see Figure 1) (Cosgrove et al., 2002). However, these genes were not regulated in the inoculated lateral roots although in accordance with our previous finding (Herrmann et al. 1998), their growth was strongly stimulated in comparison to the one of non infected plants. This apparent contradiction does not indicate that these genes are not involved in the growth response to the inoculation. Since the roots were harvested at the end of their exponential growth stage toward the end of a root flushing, expression of these genes might have already been down-regulated again.

Table 1: Patterns of expression of premycorrhiza-related genes in lateral roots during the plant-fungus interaction or after IAA treatment compared to control-plants. Levels of expression are indicated by + or –: +, 2-3 fold, ++, 3-5 fold, +++ more than 5 fold upregulated; -, 2-3 fold, --, more than 3 fold repressed; 0, not regulated clone. * refers to reverse northern blot experiments shown in Figure 1.

GenBank Accession no.	Database matches	E value	Inoculated/Control	IAA/Control
cDNA upregulated during the premycorrhizal stage and under IAA treatment				
AJ580039	No match		++	+
AJ873910	No match		+	+
cDNA upregulated during the premycorrhizal stage and repressed under IAA treatment				
AJ580035	60S Ribosomal protein L17	1e-56	+	-
AJ873911	Calmodulin	3e-13	+++	-
AJ616018	Calcium ATPase	8e-06	++	-
AJ577263	Metallothionein	3e-11	+	-
AJ580025	No match		+	-
AJ580037	No match		+	-
AJ873913	No match		++	-
AJ873912*	No match		+	--
AJ873914	No match		++	--
AJ873915	No match		+	-
cDNA upregulated during the premycorrhizal stage, not regulated under IAA treatment				
AJ580022	Peptidylpropyl cis-trans isomerase	5e-42	+	0
AJ580027	Protein kinase	2e-04	+	0
AJ873919	mRNA capping enzyme	1.0	+	0
AJ580042	Probabl sensory box	1.8	+	0
AJ580043	Maltose transporter	3.9	++	0
AJ580044	60S ribosomal protein L23	9e-17	+	0
AJ580045	Chemokine receptor like	1.8	++	0
AJ873917	No match		+	0
AJ873918	No match		+	0
AJ873920	No match		+	0
AJ873921	No match		+	0
AJ580036	No match		+	0
AJ873916	No match		+	0
AJ580040*	No match		++	0
AJ873922	No match		+	0
AJ873923	No match		+++	0
AJ873924	No match		+	0
AJ873925	No match		++	0
AJ873926	No match		+	0
AJ580041	No match		+++	0
cDNA not regulated during the premycorrhizal stage, upregulated under IAA treatment				
AJ580026	Ribosome biogenesis regulatory protein	3e-06	0	+
AJ580031	Putative protein kinase	5e-07	0	+
AJ580028	Phosphoglycerate mutase	4e-13	0	+
AJ873927	Phosphoglycerate mutase	7e-11	0	+
AJ580023	No match		0	+
cDNA not regulated during the premycorrhizal stage and under IAA treatment				
AJ580034	Hypothetical protein, similarity to apoptose inhibitor	8e-08	0	0
AJ577264*	Expansin	2e-87	0	0
AJ580032	Phospholipid-transporting ATPase	0.39	0	0
AJ577266	Formate deshydrogenase	e-177	0	0
AJ580024	Serine carboxypeptidase III	2e-16	0	0
AJ580030	Rev interacting protein mis3-like	2e-43	0	0
AJ580047	Activation associated secreted protein like	1.8	0	0
AJ580046	No match		0	0
AJ580029	No match		0	0
AJ873929	No match		0	0
AJ873930	No match		0	0
AJ873931	No match		0	0
AJ873932	No match		0	0
AJ873928	No match		0	0
AJ873933	No match		0	0
AJ873934	No match		0	0
AJ873935	No match		0	0
AJ580038	No match		0	0

Regulation pattern in the IAA treatment

Morphological effects of auxin on oak were followed in a previous work (Herrmann et al. 2004). We found no growth difference and in particular no significant effect on root growth compared to control plants. Here, we confirmed the finding as the strong increase of lateral root length induced by *Piloderma croceum* could not be obtained by exogenous IAA application. At the molecular level, only 17 pre-mycorrhizal plant genes (i.e. 31 %) were regulated by the IAA treatment and we did not observe any clear relation between the regulation pattern and the functional category to which these genes belong (Table 1). For example, the genes for the identified kinase (AJ580031) and calcium ATPase (AJ616018) showed differential regulations, and were respectively upregulated and repressed in IAA-treated material. Similarly, the growth related genes encoding phosphoglycerate mutases (AJ580028, AJ873927) were upregulated, while expansin (AJ577264) was not regulated (Figure 1). The absence of regulation of 38 genes by exogenous IAA could have two reasons, (1) these genes are not under auxin control, or (2) these genes or some of them are under auxin control but the used IAA concentration and the application mode were not able to trigger their expression.

Comparison of the expression profiles after Piloderma and IAA treatments

The expression patterns found for each treatment clearly indicate that the premycorrhizal interaction between *Piloderma* and oak microcuttings cannot be restricted to a single exogenous IAA effect. First, while 32 genes were upregulated by *Piloderma,* only 7 reacted so in the IAA experiment, and only two of them were identical (Table 1). Second, no gene was down-regulated in the *Piloderma* treatment, while 10 genes were down-regulated in the IAA treatment. Third, the 10 genes which were down-regulated by IAA were upregulated by *Piloderma*. These differential patterns do not mean that IAA is not at all involved in the premycorrhizal *Piloderma* effect. However, the auxin release known from EM fungi (Gay et al. 1992; Rudawska et al. 1997) will probably be balanced by other effects after the inoculation of the root systems. In addition, the effects of an initial and unique application of IAA to the medium on regulation of plant genes are not comparable to the continuous release of fungal auxin during an inoculation experiment over several weeks. In this context, it is remarkable that from 55 studied genes, 12 (i.e. more that 20%) were regulated by both treatments even if not in the same direction. This suggests that an auxin effect is part of the interaction with *Piloderma croceum.*

Only two genes were upregulated in lateral roots of inoculated and auxin treated plants. These genes do not exhibit any homology to known proteins, and their role is still not clear. The fact that auxin and mycorrhizal fungus can equally stimulate identical genes was also observed by Nehls et al. (1998). They found a glutatione-S-transferase (GST) upregulated in *Eucalyptus* ectomycorrhizae and after an auxin treatment, whereas the precise function of this GST is still unclear. We suppose that the control of such genes involves identical per-

ception systems for recognition of the mycobiont and of exogenous IAA.

Five genes upregulated after the IAA-treatment were not regulated by the fungus. Two of them (AJ580028 and AJ873927) code for phosphoglycerate mutases. They are controlled by hormones and are upregulated by IAA in *Arabidopsis* (Mazarei et al. 2003). Mazarei et al. (2003) also showed an induction of this group of enzymes during a plant-parasitic interaction with nematodes. In the *Quercus robur-Piloderma croceum* model, phosphoglycerate mutases are upregulated in the total root system during the premycorrhizal stage (Krüger et al. 2004), but are apparently not regulated in the lateral roots in presence of *Piloderma croceum* or at least not at the development stage in which these roots were harvested.

Some genes are differentially regulated by *Piloderma croceum* and exogenous IAA. Ten genes upregulated in inoculated plants were down-regulated by IAA at the tested concentration. We hypothesise that these genes are under hormonal control, but that their regulation pattern during the premycorrhiza stage was not mimetically reproduced by the IAA application. Calmodulin (AJ873911) and the calcium ATPase (AJ616018) illustrate this differential regulation by IAA and *Piloderma*. The genes encoding both enzymes were upregulated in presence of the fungus but repressed in the IAA treatment. Calmodulin and Ca-ATPase are in direct relation with Ca concentrations in the cell (Snedden and Fromm 2001), and De Ruijter et al. (1998) demonstrated the importance of calcium flow during plant-microbe symbiosis. Yang and Poovaiah (2000) established a relation between calcium-calmodulin and auxin action on gene regulation. They showed that proteins coded by small auxin up RNAs (*SAURs*) are calmodulin binding proteins involved in calcium/calmodulin-mediated signalling during auxin-mediated signal transduction. The presence of those genes in the SSH bank used in this work and the fact that they were again regulated in the present assay strongly suggests that *Piloderma croceum* could regulate calcium metabolism in the presymbiotic stage.

Conclusion

After our demonstration that exogenous auxin triggers the onset of EM formation in the system *Piloderma croceum/Quercus robur* (Herrmann et al. 2004), the two regulation patterns of plant genes by *Piloderma croceum* and by exogenous IAA strongly suggest a fungal control on hormone balance that might facilitate EM formation. The barely detectable morphologically effect of exogenous IAA could be related to an indirect action of regulated genes in plants. According to our results, the IAA concentration tested seems to act on the calcium pathway, but not directly on growth related genes. The low number of presymbiosic related genes reacting after IAA treatment implicates that the fungal recognition by oak involves additional signals. However, a strong limitation of the present work was that only one concentration of external auxin was tested and only one premycorrhizal stage observed. The results obtained with one set of plants must be validated by independent repetitions considering more stages in the *Piloderma*-oak association and consecutive statistical analysis. A better un-

derstanding of the role of auxin in this plant/fungus interaction requires the development of a small array system on the basis of the SSH and other plant/microbe-related genes.

Acknowledgements
This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1084-Bu 941/1-3). The nucleotide sequences are deposited at the EMBL Database.

References

BÉGUIRISTAIN T, COTE R, RUBINI P, JAY-ALLEMAND C, LAPEYRIE F (1995) Hypaphorine accumulation in the hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 40, issue 4, 1089-1091

CHARVET-CANDELA V, HITCHIN S, ERNST D, SANDERMANN H, MARMEISSE R, GAY G (2002) Characterization of an *Aux/IAA* cDNA upregulated in *Pinus pinaster* roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. New Phytologist 154, 769-777

COSGROVE DJ, CHAO L, CHO H-T, HOFFMANN-BENNING S, MOORE RC, BLECKER D (2002) The growing world of expansins. Plant and Cell Physiology 43, 1436-1444

DE RUIJTER NCA, ROOK MB, BISSELING T, EMONS AMC (1998) Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. Plant Journal 13, 341-350

DUPLESSIS S, COURTY P-E, TAGU D, MARTIN F (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytologist 165, 599-611

GAY G, BERNILLON J, DEBAUD J-C (1992). Comparative analysis of IAA production in ectomycorrhizal fungi, ericoid and saprotrophic fungi in pure culture. In DJ Read, DH Lewis, AH Fitter, IJ Alexander (eds) Mycorrhizas in ecosystems, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 356-366

HERRMANN S, MUNCH J-C, BUSCOT F (1998) A gnobiotic culture system with oak microcuttings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before, and in the early phase of, ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. New Phytologist 138, 203-212

HERRMANN S, KRÜGER A, PEŠKAN T, OELMÜLLER R, BUSCOT F (2003) Morphologische Interaktionen und molekulare Regulation vor und während der Ektomykorrhiza-Bildung zwischen *Quercus robur* L. und *Piloderma croceum*. Prozessregulation in der Rhizosphäre. 13. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes Hrsg.: W. Merbach, B.W. Hütsch, L. Wittenmayer, J. Augustin. B.G. Teubner Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden (2003), 13-19

HERRMANN S, OELMÜLLER R, BUSCOT F (2004) Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. Journal of Plant Physiology 161, 509-517

JOHANSSON T, LE QUÉRÉ A, AHREN D, SÖDERSTRÖM B, ERLANDSSON R, LUNDEBERG J, UHLÉN M, TUNLID A (2004) Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. Molecular Plant Microbe Interactions 17, issue 2, 202-215

KRÜGER A, PEŠKAN-BERGHÖFER T, FRETTINGER P, HERRMANN S, BUSCOT F, OELMÜLLER R (2004) Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. New Phytologist 163, 149-157

LAGRANGE H, JAY-ALLEMAND C, LAPEYRIE F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. New Phytologist 149, 349-355

MARX DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine

roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59, 153-163

MAZAREI M, LENNON KA, PUTHOFF DP, RODERMEL SR, BAUM TJ (2003) Expression of an *Arabidopsis* phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes. Plant Molecular Biology 53, 513-530

NEHLS U, BÉGUIRISTAIN T, DITENGOU FA, LAPEYRIE F, MARTIN F (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Planta 207, 296-302

READ DJ, PEREZ-MORENO J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? New Phytologist 157, 475-492

RUDAWSKA ML, & KIELISZEWSKA-ROKICKA B (1997). Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA-synthesizing activity. New Phytologist 137, 509-517.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press

SLANKIS V (1973) Hormonal relationships in mycorrhizal development. Marks GC, Ko TT ed. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. Academic Press, New York, 231-298

SMITH SE, READ DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego

SNEDDEN WA, FROMM H (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. New Phytologist 151, 35-66

STRACKE S, KISTNER C, YOSHIDA S, MULDER L, SATO S, KANEKO T, TABATA S, SANDAL N, STOOGAARD K, SZCZYGLOWSKI K, PARNISKE M (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Nature 417, 959-962

TAI PK, ALBERTS MW, CHANG H, FABER LE, SCHREIBER SL (1992) Association of a 59-kilodalton immunophilin with a glucocorticoid receptor complex. Science 256, 1315-1318

ULRICH JM (1960) Auxin production by mycorrhizal fungi. Physiologia Plantarum 13, 429-443

WANG SX, HUNTER W, PLANT A (2000) Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and white spruce. Biotechniques 28, 292-296

YANG T, POOVAIAH BW (2000) Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. The Journal of Biological Chemistry 275, issue 5, 3137-3143

YEM AW, TOMASSELI AG, HEINRIKSON RL, ZURCHER-NEELY H, RUFF VA, JOHNSON RA, DEIBEL MR (1992) The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. Journal of Biological Chemistry 267, 2868-2871

Received: 20. 12. 2004
Accepted: 31. 12. 2004

CHAPITRE II

Analyse de l'expression de chitinases de classe III dans les racines principales ou latérales de chêne durant la phase pré-mycorhizienne.

Expression différentielle de deux chitinases de classe III dans deux types de racines de *Quercus robur* pendant les interactions pré-mycorhiziennes avec *Piloderma croceum*

Mots clés: ectomycorhize, chitinases de classe III, expression génique, *Piloderma croceum*, *Quercus robur*

Résumé :

L'expression de deux gènes codant pour des chitinases de classe III a été étudiée dans les racines de *Quercus robur* au cours des interactions avec le champignon ectomycorhizien *Piloderma croceum* à un stade pré-mycorhizien. L'expression génique des chitinases a été suivie dans les racines latérales destinées à former les ectomycorhizes, et dans les racines principales qui ne sont pas directement impliquées dans les interactions mycorhiziennes. La première chitinase (*QrchitIII-1*) est surexprimée dans les racines latérales alors qu'aucune expression différentielle n'est observée dans les racines principales. La seconde chitinase (*QrchitIII-2*) n'est régulé ni dans les racines latérales, ni dans les racines principales en présence du champignon. Comme *P. croceum* n'induit pas de réponse significative de la part des chitinases dans les racines principales, l'augmentation du niveau d'expression de *QrchitIII-1* dans les racines latérales après inoculation pourrait être en relation avec des étapes de la mise en place de la symbiose.

Mycorrhiza
DOI 10.1007/s00572-006-0036-y

SHORT NOTE

Patrick Frettinger · Sylvie Herrmann ·
Frédéric Lapeyrie · Ralf Oelmüller · François Buscot

Differential expression of two class III chitinases in two types of roots of *Quercus robur* during pre-mycorrhizal interactions with *Piloderma croceum*

Received: 28 September 2005 / Accepted: 9 January 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Expression of two plant chitinase genes, representing members of class III chitinases, was studied in *Quercus robur* roots during interactions in a pre-mycorrhizal stage with the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum*. Chitinase gene expression was compared in lateral roots destined to form ectomycorrhiza, and in principal roots that are not directly involved in mycorrhizal interactions. The transcript level of the first chitinase (*QrchitIII-1*) was upregulated in lateral roots, whereas no significant differential expression was observed in principal roots. The second chitinase (*QrchitIII-2*) was regulated neither in lateral nor in principal roots in presence of the fungus. Because *P. croceum* did not induce significant chitinase responses in principal roots, the enhanced expression of *QrchitIII-1* in lateral roots after inoculation may be related to some steps in symbiosis ontogenesis.

Keywords Ectomycorrhiza · Class III chitinases · Gene expression · *Piloderma croceum* · *Quercus robur*

P. Frettinger · S. Herrmann · F. Buscot
Department of Terrestrial Ecology, Institute of Botany I,
University of Leipzig,
Johannisallee 21-23,
04103 Leipzig, Germany

S. Herrmann
Institute of Ecology, University of Jena,
Dornburger Straße 159,
07743 Jena, Germany

P. Frettinger · F. Lapeyrie
"Tree-Microbe Interactions Unit",
Institut National de la Recherche Agronomique,
Champenoux 54280, France

P. Frettinger · R. Oelmüller
Institute of General Botany and Plant Physiology,
University of Jena,
Dornburger Straße 159,
07743 Jena, Germany

F. Buscot (✉)
Center for Environmental Research (UFZ),
Department for Soil Ecology,
Theodor-Lieser-Straße 4,
06120 Halle, Germany
e-mail: francois.buscot@ufz.de
Tel.: +49-345-5585402
Fax: +49-345-5585449

Introduction

Seeds germinate and plants grow and die in interaction with a large spectrum of microorganisms. Chitinases are key enzymes involved in plant-microbe interactions and are grouped in the pathogen-related protein type three families (PR-3) (Selitrennikoff 2001). Five classes of plant chitinases have been proposed based on their peptidic sequences, conserved domains and specific activities (Selitrennikoff 2001). Chitinases catalyse the hydrolysis of chitin, an insoluble linear homo-polymer of β-1,4-linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) residues (Collinge et al. 1993). Because chitin is a primary structural component of the wall of all true fungi, chitinases are considered to play a major role during pathogenic plant-fungal interactions (Collinge et al. 1993; Selitrennikoff 2001; Bravo et al. 2003). However, chitinase coding genes have been found to be over-expressed and/or chitinase activities enhanced not only during fungal (Albrecht et al. 1994; Pozo et al. 1998; Davis et al. 2002), bacterial (Gerhardt et al. 1997) or viral (Balsalobre et al. 1997; Burketova et al. 2003) pathogenic infections, but also during symbiotic interactions with *Rhizobium* (Goormachtig et al. 1998; Kim and Sun 2002) or mycorrhizal fungi (Albrecht et al. 1994; Dumas-Gaudot et al. 1994; Hodge et al. 1996; Salzer et al. 2000; Bestel-Corre et al. 2002). Class III chitinases have been reported to be specifically transcribed during arbuscular mycorrhiza interactions (Salzer et al. 2000), but only chitinase enzyme activities have been assessed in the ectomycorrhizal symbiosis (Sauter and Hager 1989; Albrecht et al. 1994).

In the present work, we used a culture system of micro-cuttings of *Quercus robur* and the ectomycorrhizal fungus

Piloderma croceum which is characterised by a long pre-mycorrhizal stage during which the fungus stimulates growth of the lateral root system but not of the principal roots (Herrmann et al. 1998). Physiological responses (Herrmann et al. 2004) and specific gene regulation (Krüger et al. 2004) have been shown to occur in the plant during this pre-mycorrhizal stage. Here, we targeted class III chitinase gene expression during the pre-mycorrhizal stage between *Q. robur* and *P. croceum*, and compared chitinase gene regulation in lateral roots where the symbiosis becomes established, and in principal roots which are not directly involved in mycorrhizal interactions with the fungus. The roles of class III chitinases during the ectomycorrhizal symbiosis are discussed in the light of the observed gene expression profiles.

Materials and methods

Biological material

The pre-mycorrhizal interaction between micro-propagated *Quercus robur* L. (clone DF 159) and *Piloderma croceum* J. Erikss. & Hjortst. (strain 729 from the "TUMY", University of Tübingen, Germany) was established as described by Herrmann et al. (1998). Briefly, oak plants were micro-propagated and rooted aseptically, then transferred into a mycorrhization system consisting in Petri dishes (diameter 90 mm) with MMN medium with 1:10 nitrogen and phosphorus in which roots develop aseptically and two dimensionally, whilst the shoot grows outside of the dish. Each mycorrhization system was placed inside a larger Petri dish (diameter 140 mm) in which humidity was regulated by moistened paper to prevent shoot desiccation (Krüger et al. 2004). Control non-inoculated plants and inoculated plants were cultivated vertically in growth chambers according to Herrmann et al. (1998) and Krüger et al. (2004).

Root harvesting was performed after 4 weeks of culture, at the end of the first root flush, corresponding to the beginning of the apical bud outburst (Herrmann et al. 1998). At this stage, contact between roots and inoculum was highly limited and no mycorrhiza was developed. Newly formed lateral roots and principal roots were frozen in liquid nitrogen before RNA extraction. Three replicates of independent biological experiments were performed for pre-mycorrhizal analysis. Per replicate, about 20 plants were used for each condition (control or inoculated) to obtain enough transcripts.

Cloning and sequencing of class III chitinases from *Q. robur* DNA

Two degenerate primers (Table 1) were designed for plant class III chitinases based on conserved amino acid motifs. Primers used in this study were synthesised by Invitrogen Life Technology (Karlsruhe, Germany). Oak genomic DNA was isolated from frozen material after grinding using the Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer. For polymerase chain reaction (PCR) amplification, 1 μg of

Table 1 Degenerate primers[a] used for polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA from *Quercus robur* and specific primers for *QrchitIII-1* and *QrchitIII-2* reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real-time PCR analysis

Primer types	Oligonucleotide sequences	Fragment sizes (bp)	Database organism matches	*E*-value	GenBank Accession number	Primer specificity
Degenerate primers[a] for class III chitinases	5′ GGN GAY GCN GTN YTN GAY GG 3′	198 to 201	–	–	–	
	5′ YTG NAC CCA NAC GTA RTC RA 3′					
Specific primers for *QrchitIII-1*	5′ GAC TTT GAT ATT GAA GGA GG 3′	160	*Dioscorea oppositifolia*	9e-27	AJ879088	*Q.r. P.c.*
	5′ ATA GAC CTG TCT TAA GGG CAG C 3′					
Specific primers for *QrchitIII-2*	5′ GAT TTT GGC ATT GAG ATT GG 3′	157	*Cicer arietinum*	2e-16	AJ879089	*Q.r. P.c.*
	5′ ACA AGC CGG TTT TGA TAT CGG 3′					

The last column shows primer specificities to plant, with amplifications with cDNA of *Q. robur* (*Q.r.*) and no amplification with cDNA of *P. croceum* (*P.c.*)
[a]In degenerate primers *N* A, C, T or G, *Y* C or T, *R* A or G

genomic DNA was added to a 50 µl reaction mixture containing 5 µl of 10× *Taq* buffer with $MgCl_2$ (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany), 4 µl of dNTPs (2 mM each) (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany), 1 µl of each primer (60 µM) and 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany). PCRs were run on a Primus 96 plus thermocycler (MWG-Biotech, England) with an initial cycle of denaturation (5 min at 94°C) followed by 30 cycles with denaturation (1 min 94°C), annealing (30 s at 50°C) and elongation (2 min at 72°C) and by a final elongation (10 min at 72°C).

PCR products were directly cloned into a pCR4-TOPO vector, using the TOPO TA Cloning kit for sequencing (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturers' instructions. The sequencing reactions were run on an automated multi-capillary DNA sequencer, ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the BigDye Terminator v.3.1, Ready Reaction Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) as recommended by the manufacturer. Genomic class III chitinase gene sequences obtained from *Q. robur* have been deposited at EMBL (see Table 1 for the accession numbers).

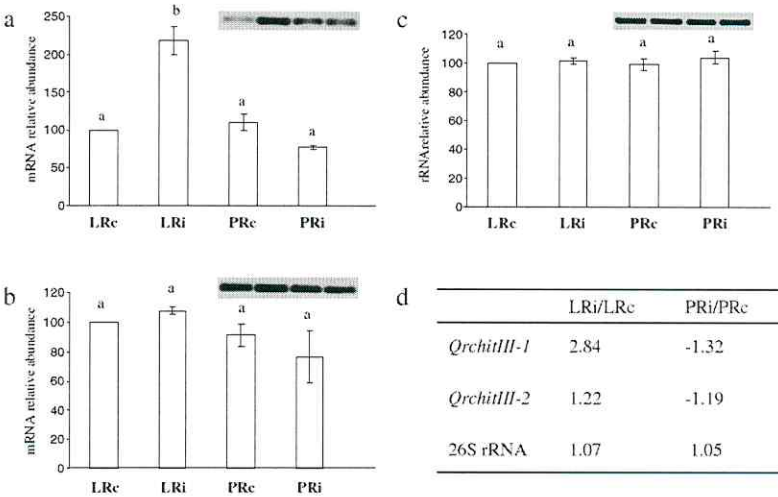
Extraction and analysis of RNA

RNA extractions from control and inoculated roots of *Q. robur*, and from *P. croceum* were performed according to Wang et al. (2000). cDNA was synthesised from 1µg of total RNA using the BD SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Heidelberg, Germany) as recommended by the manufacturer. To perform expression analysis, specific primer sets were designed for the two classes of III chitinases isolated from oak (Table 1). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on a Primus 96 plus thermocycler (MWG-Biotech, England) under the following conditions: an initial cycle of denaturation (2 min at 94°C), followed by 20 cycles with denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 55°C) and elongation (45 s at 72°C) and by a final elongation (10 min at 72°C). Expression of 26S ribosomal RNA was used as control (Fig. 1). Specific primers used to amplify the 26S region under the same PCR conditions were: 5′ AAC GCT TGG CTG CCA CAA GCC 3′ and 5′ GAC TCT CTT AAG GTA GCC AAA TGC C 3′. From each PCR reaction, 5 µl was loaded onto a 2% agarose gel. To confirm primer specificities, amplificats were extracted from gels with QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany), cloned and sequenced as previously described. PCR with *P. croceum* cDNA was performed to eliminate the possibility of fungal class III chitinase amplification (Table 1).

Three technical repetitions on the three independent biological replicates were performed by quantitative real-time PCR on 30 ng of cDNA using iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) on iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) as follows: initial denaturation (2 min at 95°C), 40 cycles (30 s at 95°C, 40 s at 55°C, 45 s at 72°C), final extension (10 min 72°C). A melting curve analysis validated primer gene specificity. Differences in expression between treatments were calculated according to the "Delta-delta method" (Pfaffl 2001) using the 26S rRNA as reference.

Data acquisition and statistical analysis

Expression levels were quantified using ImageQuant version 5.0 Software (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences). To allow comparison between different experiments, the value of 100 was given to the level of expression in lateral roots of control plants. Data were



d

	LRi/LRc	PRi/PRc
QrchitIII-1	2.84	-1.32
QrchitIII-2	1.22	-1.19
26S rRNA	1.07	1.05

Fig. 1 Expression of *QrchitIII-1* (**a**) and *QrchitIII-2* (**b**) in lateral roots of control (LRc) and inoculated plants (LRi) in principal roots of control (PRc) and inoculated plants (PRi) during *Q. robur–P. croceum* interaction. The transcript levels were standardized to the non-regulated 26S rRNA (**c**). *Bars* indicate standard errors of means. *Common letters* indicate non-significant differences between tissues. For each gene, one reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) gel is presented as example in the same lecture order (LRc, LRi, PRc and PRi). Fold changes obtained by quantitative real-time RT-PCR analysis of three technical replicates performed on the three biological samples are presented in (**d**)

submitted to multiple comparisons (Student test, one way ANOVA test, $P<0.05$) with SigmaStat Version 2.03 software.

Results and discussion

Two partial oak DNA sequences, *QrchitIII-1* (accession n° AJ879088) and *QrchitIII-2* (accession n° AJ879089) with high similarities to other plant class III chitinases (Table 1) were isolated and their transcript levels analysed at the pre-mycorrhizal stage during the interaction with *P. croceum* (Fig. 1). Chitinase gene expression was monitored by RT-PCR analysis (Fig. 1a,b) and regulation estimated by quantitative real-time PCR (Fig. 1d). The transcript level of *QrchitIII-1* was upregulated 2.84-fold in lateral roots (Fig. 1d), whereas no significant regulation was observed in principal roots (Fig. 1a,d). The second chitinase, *QrchitIII-2* was regulated neither in lateral nor in principal roots in presence of the fungus (Fig. 1b,d). Because *P. croceum* did not induce a significant chitinase response in principal roots, the strong expression of *QrchitIII-1* in lateral roots in response to inoculation might be related to some steps in symbiosis ontogenesis.

The role of *QrchitIII-1* during ectomycorrhizal symbiosis establishment still has to be elucidated. According to the literature, this enzyme could act in one of two ways. Class III chitinases are expressed in plants during wounding (Rojas-Herrera and Loyola-Vargas 2002) and during aggression by pathogenic microorganisms (Regalado et al. 2000). Recently, Le Quéré et al. (2005) observed an up-regulated chitinase during mantel and Hartig net development in the birch-*Paxillus* interaction. Therefore *Q. robur* might express such a gene as *QrchitIII-1* to modulate the hyphal growth of *P. croceum* before symbiotic structure establishment. Alternatively, *QrchitIII-1* might be involved in modulating elicitor release by *P. croceum*. Elicitors are signal molecules which can be released by symbiotic or pathogenic fungi and which induce defence responses in plants (Salzer et al. 1996; Kästner et al. 1998). The over-expression of a class III chitinase gene was detected in the presence of such elicitors (Busam et al. 1997). It has been suggested that during symbiotic ectomycorrhizal interactions, stimulation of chitinase may be related to the suppression of plant defence reactions through the cleavage of chitinous elicitors produced by the fungal symbiont (Salzer et al. 1997a,b). Goormachtig et al. (1998) have demonstrated that the protein encoded by the cDNA clone *Srchi13*, an homolog to acidic class III chitinase genes, exhibits Nod-factor (the rhizobial elicitor) degrading activity. The lateral root specific over-expression of *QrchitIII-1* (Fig. 1a) during the presymbiotic stage of the *Q. robur–P. croceum* interaction could limit the elicitor presence around this root type and authorise hyphal penetration by restricting plant defence activation.

According to our results, a member of the class III chitinase family may be associated with initial steps of ectomycorrhiza establishment in *Q. robur* because expression of this gene is modulated only in the root type where ectomycorrhiza formation is likely to occur. It remains to be enlightened whether class III chitinase over-expression corresponds to plant defence response or to elicitor modulation. The absence of regulation of *QrchitIII-2* (Fig. 1b) indicates that only a selective chitinase gene regulation is activated by the fungus.

Acknowledgement This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1084-Bu 941/1-3).

References

Albrecht C, Asselin A, Piché Y, Lapeyrie F (1994) Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. Physiol Plant 91:104–110

Balsalobre JM, Mas P, Sanchez–Pina MA, Pallas V (1997) Spatial distribution of acidic chitinases and their messenger RNAs in tobacco plants infected with cherry leaf roll virus. Mol Plant–Microb Interact 10:784–788

Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (2002) Mycorrhiza-related chitinase and chitosanase activity isoforms in *Medicago truncatula* Gaertn. Symbiosis 32:173–194

Bravo JM, Campo S, Murillo I, Coca M, San Segundo B (2003) Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein (PR-4) family of maize. Plant Mol Biol 52:745–759

Burketova L, Stillerova K, Feltlova M (2003) Immunohistological localization of chitinase and β-1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. Physiol Mol Plant Pathol 63:47–54

Busam G, Kassemeyer HH, Matern U (1997) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiol 115:1029–1038

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. Plant J 3:31–40

Davis JM, Wu H, Cooke JEK, Reed JM, Luce KS, Michler CH (2002) Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. Mol Plant–Microb Interact 15:380–387

Dumas-Gaudot E, Asselin A, Gianinazzi-Pearson V, Gollotte A, Gianinazzi S (1994) Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Sci 99:27–37

Gerhardt LBD, Sachetto-Martins G, Contarini MG, Sandroni M, Ferreira RD, de Lima VM, Cordeiro MC, de Oliveira DE, Margis-Pinheiro M (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. FEBS Lett 419:69–75

Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, Von Montagu M, Holsters M (1998) Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinase. Plant Cell 10:905–915

Herrmann S, Munch JC, Buscot F (1998) A gnotobiotic culture system with oak microcuttings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before, and in the early phase of, ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. New Phytol 138:203–212

Herrmann S, Oelmüller R, Buscot F (2004) Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. J Plant Physiol 161:509–517

Hodge A, Alexander IJ, Gooday GW, Williamson FA (1996) Localization of chitinolytic activities in *Fagus sylvatica* mycorrhizas. Mycorrhiza 6:181–187

Kästner B, Tenhaken R, Kauss H (1998) Chitinase in cucumber hypocotyls is induced by germinating fungal spores and by fungal elicitor in synergism with inducers of acquired resistance. Plant J 13:447–454

Kim HB, Sun AC (2002) Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata*. Mol Plant–Microb Interact 15:209–215

Krüger A, Peškan-Berhöfer T, Frettinger P, Herrmann S, Buscot F, Oelmüller R (2004) Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. New Phytol 163:149–157

Le Quéré A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Mol Plant–Microb Interact 18:659–673

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:2002–2007

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1998) Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. J Exp Bot 49:1729–1739

Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S, Chaves I, Ricardo CPP, Rodrigues-Pousada C (2000) The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. Planta 210:543–550

Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. Plant Sci 163:705–711

Salzer P, Hebe G, Reith A, Zitterell-Haid B, Stransky H, Gaschler K, Hager A (1996) Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce cell enzymes. Planta 198:118–126

Salzer P, Hebe G, Hager A (1997a) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K^+ and Cl^- release, extracellular alkalinisation and H_2O_2 synthesis of *Picea abies* cells. Planta 203:470–479

Salzer P, Hübner B, Sirrenberg A, Hager A (1997b) Differential effect of purified spruce chitinases and ß-1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. Plant Physiol 114:957–968

Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher RA, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller T (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. Mol Plant–Microb Interact 13:763–777

Sauter M, Hager A (1989) The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspension cultured cells of its host *Picea abies*. Planta 179:61–66

Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. Appl Environ Microbiol 67:2883–2894

Wang SH, Hunter W, Plant A (2000) Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and white spruce. Biotechniques 28:292–296

CHAPITRE III

Comparaison de la régulation de 600 gènes dans les racines latérales et dans les racines principales au stade pré-mycorhizien, ainsi que dans la mycorhize fonctionnelle.

Changements transcriptomiques entre les racines latérales et les racines principales de chêne (*Quercus robur*) au stade pré-mycorhizien avec *Piloderma croceum*, expression des gènes régulés dans les ectomycorhizes

Mots clés: ectomycorhize, ESTs, racines latérales, racines principales, RT-PCR quantitative en temps réel, *Quercus robur*

Résumé:

Le changement de l'expression génique constitue un mécanisme majeur pour la formation d'ectomycorhize et débute avant la formation d'une interface symbiotique entre les racines de la plante et les champignons. Cependant, peu de choses sont connues sur le profil de régulation dans différentes parties du système racinaire. Nous avons utilisé un clone de chêne micro-propagé présentant un système racinaire hiérarchisé montrant des caractéristiques fonctionnelles avant la différenciation de tissus mycorhizés lors de l'inoculation avec le basidiomycète *Piloderma croceum*. Grâce à des filtres d'ADNc, la régulation des gènes de plantes a été analysée durant la phase pré-mycorhizienne. Soixante quinze transcrits ont montré une expression différentielle dans les racines latérales et principales pré-mycorhizés, et chaque type racinaire présente des groupes différents de gènes régulés. Pour des gènes sélectionnés, les résultats ont été confirmés par RT-PCR et PCR quantitative en temps réel. Les gènes régulés au stade pré-mycorhizien dans les racines latérales présentent une régulation quasi identique dans les mycorhizes. Par contre, des régulations différentielles furent détectées entre les racines principales au stade pré-mycorhizien et les ectomycorhizes. Une régulation négative domine la catégorie des gènes en relation avec le métabolisme, alors que la surexpression est dominante dans le groupe des gènes codant pour la protection cellulaire, la régulation du stress hydrique et les réponses défensives. La régulation de tels gènes pourrait expliquer l'accroissement de la résistance globale observée chez les plantes mycorhizées.

Springer
http://www.springer.com/journal/425

Planta
An International Journal of Plant Biology
Editors-in-Chief: D. Bartels; A. Melis
ISSN: 0032-0935 (print version)
ISSN: 1432-2048 (electronic version)
Journal no. 425
Springer Berlin Heidelberg

Dear Prof. Buscot:

I am pleased to be able to accept your revised manuscript, entitled "Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with Piloderma croceum", for publication in "Planta".

Thank you for submitting your work to "Planta". On behalf of the Editors, we look forward to your continued contributions to this journal.

Sincerely,
Prof. Dorothea Bartels
Editor in Chief, "Planta"
planta@uni-bonn.de

Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*

Running title: *Gene profiling in oak roots during ectomycorrhizal interactions*

Patrick Frettinger [1,2,3], Jérémy Derory [4], Sylvie Herrmann [1], Christophe Plomion [4], Frédéric Lapeyrie [2], Ralf Oelmüller [3], Francis Martin [2], François Buscot [1*]

[1] University of Leipzig, Institute of Biology I, Department of Terrestrial Ecology, Johannisallee 21-23, D-04103 Leipzig, Germany ; [2] Unité Mixte de Recherche INRA/UHP 1136 'Interactions Arbres /Microorganismes', Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Nancy, F-54280 Champenoux, France ; [3] Friedrich-Schiller University of Jena, Institute of General Botany and Plant Physiology, Dornburger Straße 159, D-07743 Jena, Germany ; [4] INRA, UMR Biodiversité Gènes et Ecosystèmes, 33612 Cestas cedex, France

** Corresponding Author*

François Buscot

Present address: Center for Environmental Research (UFZ), Department of Soil Ecology, Theodor-Lieser-Straße 4, D-06120 Halle, Germany

Tel: +49 345 558 5402

Fax: +49 345 558 5449

Email: francois.buscot@ufz.de

Article accepté pour publication dans le journal Planta

Abstract

The formation of the ectomycorrhiza implies an alteration in gene expression of both the plant and fungal partners, a process which starts before the formation of any symbiotic interface. However little is known on the regulation pattern occurring in different parts of the root system. Our experimental system consisting of a micropropagated oak with a hierarchical root system was shown to exhibit symbiosis functional traits prior to any mycorrhizal tissue differentiation after the inoculation with the basidiomycete *Piloderma croceum*. Using a cDNA array, the plant gene regulation was analyzed in the pre-mycorrhizal phase. Seventy-five transcripts showed differential expression in pre-mycorrhizal lateral and principal roots, and both root types exhibited different sets of responsive genes. For transcripts selected according to a statistical analysis, the alteration in gene expression was confirmed by RT-PCR and quantitative real-time PCR. Genes regulated in pre-mycorrhizal lateral roots displayed an almost identical expression in mycorrhizas. In contrast, genes regulated in pre-mycorrhizal principal roots were often regulated differently in ectomycorrhizas. Down-regulation affected most of the regulated genes involved in metabolism, whereas most of the regulated genes related to cell rescue functions, water regulation and defence response were up-regulated. Regulation of such genes could explain the increase of global resistance observed in mycorrhizal plants.

Keywords: ectomycorrhiza, ESTs, lateral roots, principal roots, quantitative real-time RT-PCR, *Quercus robur*

Introduction

The ectomycorrhizal (EM) symbiosis between trees and soil fungi is of major ecological importance in temperate and boreal forests (Read and Perez-Moreno 2003). Differentiation of effective EM encompasses complex developmental processes in mycelium and tree roots (Kottke et al. 1997), and a cascade of changes in gene expression in both partners (Martin et al. 2001; Voiblet et al. 2001; Duplessis et al. 2005; Le Quéré et al. 2005; Morel et al. 2005). Studies on gene expression in EM are mostly performed on culture systems using young seedlings with low differentiated root systems, while the ones in older trees consist of principal roots which contribute to anchorage into the soils and of lateral roots which perform the essential part of the water and nutrient uptake (Lynch 1995). Lateral roots include mother and short roots which are both able to form EM (Buscot and Herrmann 2004). On *in vitro* propagated oak microcuttings (*Quercus robur*) with such a hierarchical root system, the inoculation with the late stage EM fungus *Piloderma croceum* was shown to enhance the growth of lateral but not of principal roots during a long pre-mycorrhizal stage (Herrmann et al. 1998). In addition, pre-mycorrhizal and mycorrhizal microcuttings displayed similar physiological responses to *P. croceum* with increase of photosynthesis and protection against oxidative stress (Herrmann et al. 2004). This indicates a certain functionality of the system prior to the differentiation of symbiotic tissues. The culture model was used to identify plant genes involved in the pre-mycorrhizal interaction in the whole root system (Krüger et al. 2004). In a following work, one class III chitinase gene was found up-regulated in lateral but not in principal roots (Frettinger et al. 2006). On the basis of this finding, the present study compared gene expression in principal and lateral roots of oak microcuttings pre-mycorrhizal with *P. croceum* for an extended set of genes and EST. Furthermore, we assessed whether the genes regulated in pre-mycorrhizal roots were expressed in mycorrhizal parts of lateral roots.

Material & Methods

Biological material

The interaction between *Quercus robur* L. and *Piloderma croceum* J. Erikss. & Hjortst. was performed in a double (90 and 140 mm) Petri dish system according to Herrmann et al. (1998) and Krüger et al. (2004). For the pre-mycorrhizal stage, principal and lateral roots were harvested 4 weeks after inoculation, during the first root flush, corresponding to the beginning of the apical bud outburst (Krüger et al. 2004). Roots of non inoculated plants were harvested at the same development stage. Three independent biological replicates of control and inoculated plants were carried out. In addition, ectomycorrhizal terminal parts of lateral roots (EM) were harvested after the short root differentiation in week 5 to 6 (two independent biological replicates). The three kinds of materials were sampled and snap frozen in liquid nitrogen pending RNA extractions.

cDNA array construction

RNA was extracted as described in Wang et al. (2000). A cDNA library containing 1866 EST of *Quercus petraea* buds (Derory et al. 2006) and 55 EST of *Q. robur* pre-mycorrhizal roots (Krüger et al. 2004) was produced, hybridized and analyzed according to Duplessis et al. (2005). cDNA complex probes were then prepared following Duplessis et al. (2005) from pre-mycorrhizal principal and lateral roots and from ectomycorrhizal parts of lateral roots. Six major functional groups of genes were represented in the array (Fig. 1a). Approximately one third of the EST corresponded to genes coding for unknown or hypothetical proteins. The

second and third most important categories grouped genes involved in carbon metabolism and transduction pathway, respectively. Two categories, accounting for approximately 10% each, were related to protein synthesis and stress defence. Last, a small group encompassed EST in relation with the lipid metabolism. Details on the EST used for the array are given in Derory et al. (2006) and Krüger et al. (2004).

Array data analysis

To calculate signal intensities of each spot, a grid was overlaid on phosphorimages, and quantifications of signals were performed by using the volume quantification method of XdotsReader (Cose, Paris, France). Signal intensities lower than two times the mean of the background were discarded. Central normalization was applied to compensate plant RNA dilution in ectomycorrhizal probes containing plant and fungal transcripts. A Bayesian statistical method from Cyber-T web interface (http://www.igb.uci.edu/servers/cybert/) was used to select genes significantly (up- or down-) regulated between control and inoculated lateral roots or control and inoculated principal roots.

The absence of interaction on selected genes between the two main effects, root type (lateral vs. principal roots) and treatment (control vs. inoculated plants), was verified by a two-way analysis of variance. K-means analysis was used to identify groups of co-regulated genes (TigrMeV version 3.0, The Institute for Genomic Research, www.tigr.org/software/tm4/). Gene expression changes were analyzed by hierarchical clustering with the TigrMeV software (Saeed et al. 2003).

Macroarray validation by RT-PCR and quantitative real-time PCR

Reverse transcriptase reactions were performed with total RNA and with the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). (i) For the amplification, 80 ng of cDNA were added to a 50 µl reaction mixture containing 5 µl of 10× *Taq* buffer with $MgCl_2$ (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany), 4 µl of dNTPs (2 mM each) (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany), 1 µl of each primer (60 µM), and 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany). PCR were performed on a Primus 96 plus thermocycler (MWG-Biotech, England) under the following conditions: an initial cycle of denaturation (5 min at 94°C), followed by 20 cycles with denaturation (1 min at 94°C), annealing (30 s at 55°C) and elongation (2 min at 72°C), and by a final elongation (10 min at 72°C). cDNA from *Piloderma croceum* were also used in PCR to verify that detected signals on filters did not result from cross hybridizations between fungal cDNA and oak clones. (ii) Three technical repetitions on the two independent biological samples with mycorrhizas were performed by quantitative PCR on 30 ng of cDNA using iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) on iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) as follows: initial denaturation (2 min at 95°C), 40 cycles (30 s 95°C, 40 s at 55°C, 45 s at 72°C), final extension (10 min 72°C). A melting curve analysis validates primer gene specificity. Differences of expression were calculated according to the "Delta-delta method" (Pfaffl 2001). A cDNA coding for a photosystem II reaction center M protein appeared unregulated on arrays and was selected as standard for RNA quantity for RT-PCR and quantitative real-time PCR. Amplification of 26S rRNA confirms results observed with PSII. Primers used are given in Table S1.

Results

Cultivation of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum* was performed by using the described Petri dish system over 4 weeks, a time span in which no EM formation occurred. Root material was gathered and RNA was extracted for transcriptome analysis which allowed us to compare inoculated pre-mycorrhizal lateral and principal roots to non inoculated control roots. For this main experiment, three biological replicates were performed and statistical assessment of the confidence of expression regulation was applied. As a complementary step, we analyzed the regulation of the revealed genes in EM. For the latter analysis, two biological repeats were used.

During the pre-mycorrhizal interaction between *P. croceum* and lateral vs. principal roots, the vast majority of genes present in the used libraries were not significantly ($P<0.05$) regulated compared to non-inoculated control roots. The two-way ANOVA did not show any interaction between root type and treatment effects. This result allowed to compare gene regulation in both root types in the pre-mycorrhizal stage. Pair-wise analyses indicated that 75 non-redundant transcripts (i.e., 3%) displayed low but significant ($P<0.05$) changes in expression in at least one type of pre-mycorrhizal roots with 53 and 51 genes regulated in lateral and principal roots, respectively (Table 1). Genes showing changes in expression coded for homologs of proteins involved in defence and response to stress (23%), protein synthesis (21%), transduction pathway (9%), carbon (7%) or lipid (3%) metabolism. About 37% of the transcripts with differential expression coded for hypothetical or unknown proteins (Fig. 1b). Only 21 of the 75 detected transcripts (i.e. 28%) showed identical response in both root types upon *P. croceum* inoculation (Table 1). The other transcripts were either regulated in an opposite way in both root types (11%) or regulated in only one type of roots (61%).

All transcripts showing differential expression levels in pre-mycorrhizal roots were analyzed in ectomycorrhizal parts of lateral roots (EM) (Table 1). Of the 51 regulated genes found in pre-mycorrhizal principal roots, 38 presented a similar regulation pattern in EM, whereas 13 displayed a contrasting pattern. Among the 53 genes showing up- or down-regulation in pre-mycorrhizal lateral roots, only two coding for unknown proteins displayed contrasting patterns in EM, being not differentially expressed. A hierarchical clustering analysis (Fig. 2) confirmed that genes regulated in pre-mycorrhizal lateral roots displayed an almost identical expression pattern in EM. In contrast the analysis showed differential regulations in pre-mycorrhizal principal roots and in EM.

Differential expression of 35 transcripts representing various cellular functions (Table 1) was validated by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 3). The observed changes in expression rates were comparable to those detected with the cDNA array analysis. In addition, real time quantitative PCR was used to measure changes at the level of transcripts related to plant defence response/cell rescue (PR5, PRP1, type III metallothionein, nonsymbiotic hemoglobin, thioredoxin H-type). Regulation ratios were similar to those determined by cDNA array analysis, although higher regulation levels were observed for the proline-rich protein homolog (Table 2).

Discussion

Like previous studies on plant gene regulation in EM (Krüger et al. 2004; Duplessis et al. 2005; Le Quéré et al. 2005; Marjanovic et al. 2005) the present work was performed by using an *in vitro* system. It is legitimate to ask whether such culture conditions besides the advantage of being strictly gnotobiotic do not introduce bias. In our system, oxidative stress becomes obvious in non inoculated microcuttings after 8-10 weeks of culture but is not detected after 5

weeks (Herrmann et al. 2004). In inoculated microcuttings, no stress is noted over the whole duration of co-culture experiments (i.e. 10 weeks). In the present work, the plant harvest was performed not later than after 4 weeks for pre-mycorrhizal roots and 5 to 6 weeks for EM that is far before any stress occurrence.

Array studies allow large screenings for detecting genes putatively involved in specific functions. However, because they do not provide any evidence of protein activities, they must be interpreted cautiously especially for EM symbiosis in which low increases at the transcription levels (1-3 folds) are usually found (Duplessis et al. 2005; Le Quéré et al. 2005). Keeping this limitation in mind, some general points can be made based on the results obtained in this study, as these were assessed statistically for the main comparison (pre-mycorrhizal lateral vs. principal roots), confirmed by RT-PCR in many and real-time PCR in some cases, and as the found patterns were coherent themselves and with results on other systems.

Besides gene expression studies at different stages of EM tissue development (Martin et al. 2001; Le Quéré et al. 2005; Duplessis et al. 2005), the present expression analysis add new information at two levels. First, because the used system displays typical symbiotic functions in the pre-mycorrhizal stage, i.e. stimulation of growth and photosynthesis apparatus and protection against oxidative stress (Herrmann et al. 1998, 2004), one could expect to detect a number of core genes, the expression of which is not specific of a particular stage of EM development. The fact that the regulated genes in pre-mycorrhizal lateral roots showed an identical regulation in EM meets this expectation. However it is to underline that this only indicates a partial identity as the regulation pattern in EM was not analyzed exhaustively. Furthermore, we are aware that the array used in the present study only includes a limited part of the whole oak genome. Second, the hierarchical root system of the microcuttings was adequate for analyzing differential effects of fungal inoculation on different parts of the root

system, which to our knowledge has not been investigated previously in various functional categories of genes during EM symbiosis. We detected a transcriptional response to pre-mycorrhizal infection in lateral as well as in principal roots, but only about one fourth of the transcripts displayed a similar response. Considering that principal roots do not form mycorrhizal structures themselves, one can hypothesize that the minority of similarly regulated transcripts might correspond to systemic responses of the plant to the fungal inoculation at least at the root system level. The majority of differentially-expressed genes might on the contrary reflect root type specific responses.

Interestingly, about 70% of the transcripts were down-regulated after fungal infection (see Table 1). This is consistent with the fact that EM symbioses allow plants to slow down-regulative pathways (see for example Ouziad et al. 2005), which may compensate the cost of photoassimilate transfer to the fungal partner. Down-regulation was specially pronounced in gene categories related to metabolism. In contrast, up-regulation dominated (67% and 62% in lateral and principal roots, respectively) in the group of transcripts corresponding to stress and defence proteins. Genes in relation with response to stresses and pathogen attacks represented 11% of the EST used on the array. Among the genes significantly regulated during the *Q. robur / P. croceum* interaction, their proportion raised 23% (compare Fig. 1a and 1b). Stress and defence responses have been noticed in the plant partner during development of nodules (Bueno et al. 2001; Gamas et al. 1998; Kim and Sun 2002; Pawlowski et al. 2003), and arbuscular mycorrhizas (Garcia-Garrido and Ocampo 2002; Ruiz-Lozano et al. 1999). In EM, links between pathogen and mutualistic plant responses have recently been reported (Tagu et al. 2005). Among the genes of this category found in our study, one codes for a PR5 protein. PR5 proteins are involved in plant defence against pathogens (Asiegbu et al. 2005), cause permeability changes in fungal cell walls (Roberts and Selitrennikoff 1990) and display (1,3) β-glucanase activity (Trudel et al. 1998). Expression of a Proline Rich Protein 1 (PRP1) was also

found. PRP1 plays a role in pathogen rejection by cell wall strengthening (Kauss et al. 2003), probably by remodeling of the plant cell wall (Sheng et al. 1991). A member of the PRP family is a molecular marker in *Medicago* spp. for both preinfection and infection during the rhizobial symbiotic interaction (Journet et al. 2001). A large number of the regulated genes revealed in the study are involved in stress responses, notably in water related stress. Ectomycorrhizal symbiosis triggers aerial part development. Leaf surface and photosynthetic activity are also increased (Smith and Read 1997; Herrmann et al. 2004). The resulting water lost by transpiration must be balanced by enhanced root water uptake. In oak, an aquaporin coding gene was over-expressed in inoculated lateral roots and in EM. The regulation of this gene is conform to recent results obtained in an *in vitro* system with poplar, in which Marjanovic et al. (2005) showed an increased water conductance correlated with upregulation of aquaporin coding plant genes in mycorrhizal roots. Apart triggering water uptake, mycorrhizal status may also increase expression of plant genes involved in water stress resistance. The found over-expressions of Lea5, as well as the dormancy associated and pollen specific proteins in principal and lateral oak roots are consistent with this hypothesis as these genes are involved in cellular protection against drought (Wise and Tunnacliffe 2004, Laberge et al. 1993, Wang et al. 2003).

The present data set of differentially-expressed genes contained several genes coding for unknown proteins. Functional analysis of these genes will provide insights into the regulation and processes involved in symbiosis formation.

Acknowledgements

This work was supported by the German Science Foundation (DFG) within its MolMyk Program (SPP 1084-Bu 941/1-3). We would like to thank Drs Annegret Kohler and Sébastien

Duplessis (INRA Nancy) for their help in macroarrays hybridization and data analysis. We thank Julia Sauer (Department of Nutritional Toxicology, University of Jena) for valuable help during real-time PCR analysis. We are indebted to Dr. Jean-Luc Jany (Department of Plant Pathology, Cornell University, USA) for kindly improving the language of the manuscript, and to two anonymous reviewers for constructive remarks that helped to improve the quality of the article. The sequences reported here have been deposited in the EMBL nucleotide database (http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html).

References

Asiegbu FO, Nahalkova J, Li G (2005) Pathogen-inducible cDNAs from the interaction of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Plant Sci 168:365-372

Bueno P, Soto MJ, Rodriguez-Rosales MP, Sanjuan J, Olivares J, Donaire JP (2001) Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H_2O_2 accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. New Phytol 152:91-96

Buscot F, Herrmann S (2004) At the frontier between basidiomycetes and plants: reciprocal interactions between fungal and roots in an *in vitro* system with oak and different ectomycorrhizal basidiomycetes. In: Frontier in Basidiomycote Mycology: IHW-Verlag, Eching, Germany pp. 361-376

Derory J, Léger P, Garcia V, Schaeffer J, Hauser MT, Salin F, Luschnig C, Plomion C, Glössl J, Kremer A (2006) Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). New Phytol 170:723-738

Duplessis S, Courty PE, Tagu D, Martin F (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytol 165:599-611

Frettinger P, Herrmann S, Lapeyrie F, Oelmüller R, Buscot F (2006) Differential expression of two class III chitinases in two types of roots of *Quercus robur* during pre-mycorrhizal interactions with *Piloderma croceum*. Mycorrhiza 16:219-223

Gamas P, de Billy F, Truchet G (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defence proteins. Mol Plant-Microb Interact 11:393-403

Garcia-Garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. J Exp Bot 53:1377-1386

Herrmann S, Munch JC, Buscot F (1998) A gnobiotic culture system with oak microcuttings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before, and in the early phase of, ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. New Phytol 138:203-212

Herrmann S, Oelmüller R, Buscot F (2004) Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. J Plant Physiol 161:509-517

Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D, Barker DG, Gianinazzi-Pearson G (2001) *Medicago truncatula ENOD11* : A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. Mol Plant-Microb Interact 14:737-748

Kauss H, Seehaus K, Franke R, Gilbert S, Dietrich RA, Kröger N (2003) Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. Plant J 33:87-95

Kim HB, Sun AC (2002) Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata*. Mol Plant-Microb Interact 15:209-215

Kottke I, Münzenberger B, Oberwinkler F (1997) Structural approach to function in ectomycorrhizae. In: Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds) Trees- Contribution to modern tree physiology. Backhuys Publishers, pp 357-376

Krüger A, Peškan-Berhöfer T, Frettinger P, Herrmann S, Buscot F, Oelmüller R (2004) Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. New Phytol 163:149-157

Laberge S, Castonguay Y, Vezina LP (1993) New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. Plant Physiol 101:1411-1412

Le Quéré A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Mol Plant-Microb Interact 18:659-673

Lynch J (1995) Root architecture and plant productivity. Plant Physiol 109:7-13

Marjanovic Z, Uehlein N, Kaldenhoff R, Zwiazek JJ, Weiß M, Hampp R, Nehls U (2005) Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes! Planta 222: 258–268

Martin F, Duplessis S, Ditengou FA, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. New Phytol 151:145-154

Morel M, Jacob C, Kohler A, Johansson T, Martin F, Chalot M, Brun A (2005) Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. Appl Env Microbiol 71:382-391

Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. J Plant Physiol 162: 634-649

Pawlowski K, Swensen S, Guan C, Hadri AE, Berry AM, Bisseling T (2003) Distinct patterns of symbiosis-related gene expression in actinorhizal nodules from different plant families. Mol

Plant-Microb Interact 16:796-807

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:2002-2007

Read DJ, Perez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytol 157:457-492

Roberts W, Selitrennikoff CP (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. J Gen Microbiol 136:1771-1778

Ruiz-Lozano JM, Roussel H, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1999) Defence genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. Mol Plant-Microb Interact 12:976-984

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 34:374-378

Sheng J, D'Ovidio R, Mehdy MC (1991) Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. Plant J 1:345-354

Smith SE, Read DJ 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. San Diego, CA, USA: Academic Press.

Tagu D, Bastien C, Faivre-Rampant P, Garbaye J, Vion P, Villar M, Martin F (2005) Genetic analysis of phenotypic variation for ectomycorrhiza formation in an interspecific F1 poplar full-sib family. Mycorrhiza 15:87-91

Trudel J, Grenier J, Potvin C, Asselin A (1998) Several thaumatin-like proteins bind to β-1,3-glucans. Plant Physiol 118:1431-1438

Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F (2001) Identification of symbiosis-regulated genes

in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant J 25:181-191

Wang HJ, Jauh GU, Hsu YH, Wang CS (2003) The nuclear localization signal of a pollen specific, desiccation-associated protein of lily is necessary and sufficient for nuclear targeting. Bot Bull Acad Sin 44:123-128

Wang SH, Hunter W, Plant A (2000) Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and white spruce. Biotechniques 28:292-296

Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? TRENDS Plant Sci 9:13-17

Table 1 Genes identified as differentially-expressed in roots of oak microcuttings (*Quercus robur*) during interactions with the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum*. Significantly different values after Bayesian test ($P<0.05$) are highlighted in grey on pre-mycorrhizal principal (PR) (column 3) or lateral roots (LR) (column 4). Fold changes in ectomycorrhizal parts of lateral roots (EM) are given in column 5. * indicates genes for which expressions were validated by RT-PCR, ** indicates genes for which expressions were validate by RT-PCR and quantitative real-time PCR. Minus corresponds to down-regulation.

AC numbers	Putative gene products by category	Fold change between pre-mycorrhizal PR and control PR	Fold change between pre-mycorrhizal LR and control LR	Fold change between EM and control LR
	Stress defence			
CR628301	Thaumatin-like protein PR5 **	1.82	1.92	1.46
CT010142	Proline-rich protein PRP1 **	3.08	2.10	3.31
CR627833	Aquaporin *	1.13	1.72	2.08
CR627776	Late embryogenesis abundant protein Lea5 *	1.45	2.04	4.02
CR627822	Pollen specific protein SF21 *	1.74	1.69	1.97
CT010009	Dormancy-associated protein *	1.72	1.56	1.70
CR627834	Metallothionein-like protein type 2	1.54	1.63	1.41
CR627847	Metallothionein-like protein type 3 **	-1.98	2.04	1.36
CT010129	Iron transport protein 2 *	-1.20	-1.87	-1.60
CT010139	Thioredoxin H-type **	1.36	1.90	1.49
CR627830	Nonsymbiotic hemoglobin**	2.03	-1.47	-1.56
CR627712	Class I heat shock protein *	-1.51	1.27	1.62
CT010145	Heat shock protein 17.4 *	-1.85	-1.44	1.28
CT009912	NADH dehydrogenase *	-1.84	1.57	1.15
CR627826	Phosphoenolpyruvate carboxykinase *	-1.07	-1.84	-1.16
CR627568	Defender against cell death 1 *	-1.84	-1.82	-1.68
CR628014	Early light-induced protein *	-1.03	-1.52	-2.14
	Transduction pathway			
CT010119	GPI-protein transamidase complex subunit *	-1.16	-1.72	-1.55
CT010146	Putative kinase *	1.43	1.56	1.57
CT010137	Putative serine/threonine protein kinase	1.34	-1.52	-1.12
CR627577	ATP synthase epsilon subunit *	-1.55	1.06	-1.29
CR627507	S-phase kinase-associated protein 1A	-1.51	-1.10	-1.27
CR627979	Protein translation factor SUI1 homolog	1.21	-1.64	-1.01
CR627971	Putative glycosyl hydrolase family protein	-1.64	1.32	-1.21
	Carbon metabolism			
CR627824	Small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate	1.16	-1.62	-1.04
CR627808	Ribulose bisphosphate carboxylase *	-1.58	1.86	1.76
CR627918	Galactinol synthase *	-1.68	1.02	1.21
CR627903	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-1.55	-1.38	-1.29
CR627667	Cp10-like protein *	-1.21	-1.51	-2.44
	Lipid metabolism			
CT010117	Acyl-CoA-binding protein*	-1.57	-1.10	-1.64
CR627835	PVR3-like protein*	-1.78	1.11	1.14
	Protein synthesis and transcription			
CT010115	40S ribosomal protein S23	-1.44	-1.54	-2.21

CR627513	40S ribosomal protein S28	-1.69	-1.27	-1.55
CR627691	40S ribosomal protein S21	-1.56	-1.81	-2.15
CR628064	40S ribosomal protein S11-1	-1.57	-1.49	-1.97
CR627961	50S ribosomal protein L14	-1.15	-2.20	-2.03
CR627517	60S ribosomal protein L13	-1.29	-1.48	-2.37
CR627508	60S ribosomal protein L18a	-1.73	-1.64	-1.55
CT010155	60S ribosomal protein L17 *	-1.61	-1.39	-2.06
CR628254	60S ribosomal protein L23	-1.67	-1.18	-2.07
CR628009	60S ribosomal protein L24 *	-1.55	-1.95	-2.03
CR627566	Histone H3.3	-1.20	-1.70	-1.38
CR627506	Histone H4	-1.33	-2.44	-2.20
CT010120	Histone H3.2 *	-1.54	-1.84	-1.69
CR628250	*Castanea mollissima* 10 tRNA-Lys (trnK) gene	-1.72	-1.04	-1.44
CR627985	Cysteine proteinase RD19a precursor	-1.22	-1.59	-1.22
CT010130	APS reductase *	-1.77	-1.08	-1.76
	No function			
CT010122	Hypothetical protein CBG16863 *	-1.39	-2.31	-2.01
CT010138	Hypothetical protein *	1.65	-1.11	1.30
CR627824	Unknown 1 *	1.40	-1.92	-1.19
CR627775	Unknown 2 *	2.47	1.81	2.94
CT010123	Unknown 3 *	-1.53	1.17	-1.36
CT010116	Unknown	-1.72	1.09	1.03
CT010121	Unknown	-1.57	1.04	-1.28
CR627669	Unknown	-1.10	-2.99	-1.81
CT010131	Unknown	-1.86	-1.21	-1.33
CR627615	Unknown	-1.68	-1.32	-1.30
CT010132	Unknown	-1.09	-1.79	-1.91
CT010133	Unknown	-1.26	-1.75	-1.59
CT010143	Unknown	-1.44	-1.82	-1.93
CT009838	Unknown	-1.94	1.50	1.06
CT010149	Unknown	-1.64	-1.66	-2.26
CR628002	Unknown	1.31	-1.70	-1.37
CR628146	Unknown	1.57	-1.83	-1.33
CT010025	Unknown	-1.66	1.47	-1.22
CT010150	Unknown	1.13	-2.23	-1.08
CT010158	Unknown	2.13	1.44	1.21
CT010061	Unknown	-1.50	1.37	-1.45
CT010156	Unknown	1.29	1.61	2.07
CT009915	Unknown	1.55	-2.35	-1.52
AJ580046	Unknown	-1.49	-1.77	1.25
CT010147	Unknown	-1.50	-1.99	-1.92
AJ580041	Unknown	2.45	3.00	2.28
AJ873930	Unknown	-1.85	-1.75	-1.37
AJ873932	Unknown	-1.54	-2.00	-1.80

Table 2 Comparison between fold changes obtained on macroarrays (first value) and real-time PCR (value in brackets) for genes differentially-expressed in roots of oak microcuttings (*Quercus robur*) during interactions with the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum*. Mean expression level obtained by macroarrays data is based on three biological replicates for pre-mycorrhizal lateral roots (LR) and principal roots (PR) and on two biological replicates for ectomycorrhizal parts of lateral roots (EM). Mean expression level obtained by real-time PCR analysis is based on two biological replicates for LR, PR and EM, with three technical replicates for each biological repetition.

Gene	Fold change between pre-mycorrhizal PR and control PR	Fold change between pre-mycorrhizal LR and control LR	Fold change between EM and control LR
Proline-rich protein PRP1	3.1 (2.6)	2.1 (3.0)	3.3 (18.6)
PR5	1.8 (2.8)	1.9 (2.0)	1.5 (3.5)
Thioredoxin H-type	1.4 (1.8)	1.9 (1.8)	1.5 (2.7)
Metallothionein-like protein type 3	-2.0 (-1.6)	2.0 (4.6)	1.4 (5.4)
Nonsymbiotic hemoglobin	2.0 (1.5)	-1.5 (-2.2)	-1.6 (-2.7)

Figure legends

Fig. 1 Distribution in functional categories of the genes present on the array (a) and of those significantly regulated in pre-mycorrhizal roots of oak microcuttings (*Quercus robur*) inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum* (b).

Fig. 2 Hierarchical clustering of differentially-regulated genes and ratio in roots of oak micro-cuttings (*Quercus robur*) inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum*. LR, PR, and EM correspond to pre-mycorrhizal Lateral and Principal Roots and to ectomycorrhizal parts of lateral roots, respectively. Each horizontal line reflects the expression ratio for one gene in inoculated vs. control roots. Red and green colors reflect up- and down-regulation respectively. Absence of regulation is given in black.

Fig. 3 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) expression patterns for representative genes in the different root types of oak microcuttings (*Quercus robur*) after inoculation with the ectomycorrhizal fungus *P. croceum*. The results shown are representative of 3 biological replicates. LRc (lateral roots of control plants), LRi (lateral roots of pre-mycorrhizal plants), PRc (principal roots of control plants), PRi (principal roots of pre-mycorrhizal plants), EM (ectomycorrhizal parts of lateral roots). Primer specificity for oaks is confirmed by the absence of amplification in *Piloderma croceum*.

Fig. 1

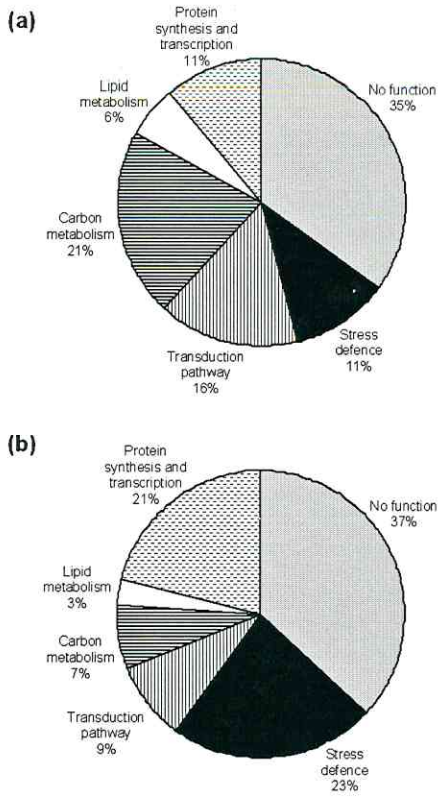

(a)
Protein synthesis and transcription 11%
No function 35%
Lipid metabolism 6%
Carbon metabolism 21%
Stress defence 11%
Transduction pathway 16%
(b)
Protein synthesis and transcription 21%
No function 37%
Lipid metabolism 3%
Carbon metabolism 7%
Transduction pathway 9%
Stress defence 23%

Fig. 2

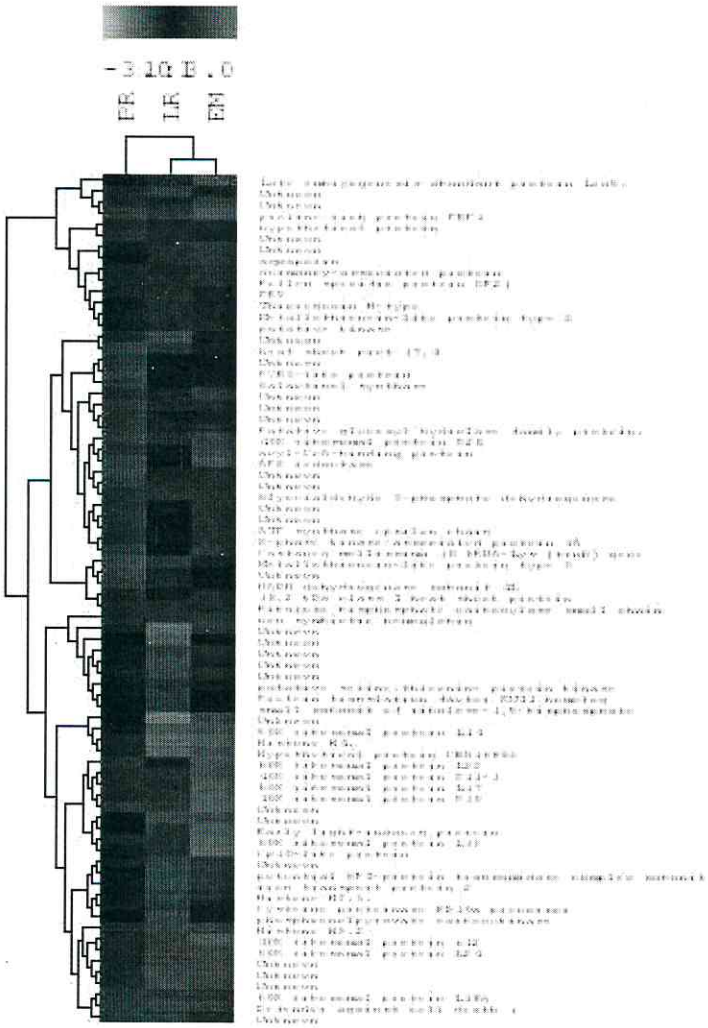


Fig. 3

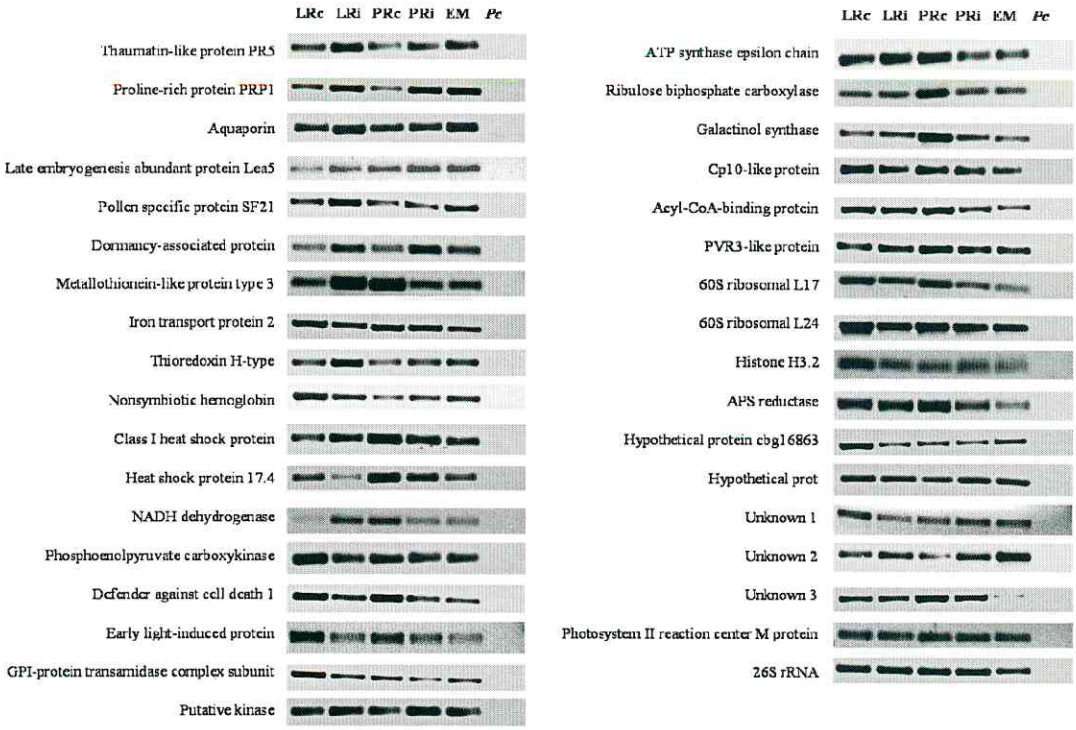

LRc LRi PRc PRi EM Pc
Thaumatin-like protein PR5
Proline-rich protein PRP1
Aquaporin
Late embryogenesis abundant protein Lea5
Pollen specific protein SF21
Dormancy-associated protein
Metallothionein-like protein type 3
Iron transport protein 2
Thioredoxin H-type
Nonsymbiotic hemoglobin
Class I heat shock protein
Heat shock protein 17.4
NADH dehydrogenase
Phosphoenolpyruvate carboxykinase
Defender against cell death 1
Early light-induced protein
GPI-protein transamidase complex subunit
Putative kinase
LRc LRi PRc PRi EM Pc
ATP synthase epsilon chain
Ribulose biphosphate carboxylase
Galactinol synthase
Cp10-like protein
Acyl-CoA-binding protein
PVR3-like protein
60S ribosomal L17
60S ribosomal L24
Histone H3.2
APS reductase
Hypothetical protein cbg16863
Hypothetical prot
Unknown 1
Unknown 2
Unknown 3
Photosystem II reaction center M protein
26S rRNA

Table S1 Primer sequences used in this study to confirm macroarrays analysis, by RT-PCR. Name in bold corresponds to gene expression regulation confirmed by both RT-PCR and real-time PCR.

Corresponding PCR products (size in pb)	Sequences	Corresponding PCR products (size in pb)	Sequences
Thaumatin-like rotein PR5 (240)	5' GTAATACATACTGATCGAGG 3' 5' GTGAAGGTTCTTCAAGGATAGG 3'	ATP synthase epsilon chain (221)	5' GAAGTGGACCGTTGGCAAGCCC 3' 5' GAGCATCCCATTTAGATTCC 3'
roline-rich protein RP1 (273)	5' GCATAAACAGTAGTCGGATGGG 3' 5' CATTGGACGGGATTGATGAGG 3'	Ribulose biphosphate carboxylase (186)	5' GACGCACCTGGGTGATGTGG 3' 5' CATCTTAGTAGCCAGGAGGC 3'
Aquaporin (246)	5' GCCCAAGCGATCCCTTGAATTCC 3' 5' CAAGTTCCCAGAGAGGCAGCC 3'	Galactinol synthase (249)	5' GGTCCTCCATGGCTTAGAGC 3' 5' CTGGCTTCTTTGTGTATGGGC 3'
ate embryogenesis bundant protein Lea5 348)	5' GTGATCAGTGACCTCCAGGC 3' 5' GCTCGCTCTCTCACTCAGGC 3'	Cp10-like protein (212)	5' CTCACACTTTCACTCACTTCC 3' 5' GCAGCTTTGACAACCAGACC 3'
ollen specific SF21 363)	5' CGTCCAAGAGGGTGCTTTGC 3' 5' GGACAAGCCAGCTCTTGTCAC 3'	Acyl-CoA-binding protein (283)	5' GCAACATGGGTCTCAAGGAGG 3' 5' GATATCAAGCAGATGCGGCAGC 3'
Dormancy-associated rotein (225)	5' GGCTGGACCTCAGCCTGATGC 3' 5' GTGGCAAGGTTGCTACCTGGG 3'	PVR3-like protein (285)	5' GACTCTGACAACATGAATGTG 3' 5' GGTCGAGTGCAGTGACCTTG 3'
Metallothionein type 3 248)	5' GTTACACACAGCATATATTCC 3' 5' GTGTGGCAACTGTGACTGCG 3'	60S ribosomal L17 (280)	5' GCTGGCGAACAATGACAGCAGG 3' 5' CACAGAAAGAGGCACAGGCG 3'
ron transport protein 2 222)	5' GGATGGCAGGAATTATGCTC 3' 5' GCTTGCCCTGGCCCTCACCATGG 3'	60S ribosomal L24 (286)	5' ACAGTGGCTCAGCGCTTTCC 3' 5' GCGACGTGCCAAGAAGCC 3'
Thioredoxin H-type 198)	5' CCTGCGAATCTCAGCTTAC 3' 5' GCAAGCTCTGCCAGAACTGG 3'	Histone H3.2 (230)	5' GCGGGGGCTCAATCAATCTTCTG 3' 5' GATCTCACGGAGAGCAACGG 3'
Nonsymbiotic emoglobin (290)	5' GCACCTCGGAAGTGATCACAGG 3' 5' CAAGGTTGACTCTCTCACGG 3'	APS reductase (368)	5' GAGCGAGCTAACAGTTCCTC 3' 5' CCACATCTGCCACTGCATTCG 3'
Class I heat shock rotein (316)	5' GTCGACCATACAGGCAGTGAGC 3' 5' CAGGGTTGAGAGGAGCTCTGG 3'	Hypothetical protein cbg 16863 (362)	5' CCATCAATGTGACCGCACACG 3' 5' GGGTGAGCGTGCTTAAGCTC 3'
Heat shock protein 17.4 363)	5' GCAAATCCAATGGCGCTCAG 3' 5' CTTCAGACCCGGAAGATCAG 3'	Hypothetical prot (300)	5' GGATGGCTGAGCCGACAGGC 3' 5' GGTATTGGTAACCCTCTTCTGC 3'

NADH dehydrogenase 370)	5' GTT GGCAGCAAGTCTAGTTC 3' 5' GCTACAGATGAAGAGAGTGGG 3'	Unknown 1 (363)	5' GAGAAGGGGCCTGCCGTATGG 3' 5' GACCTCTGCCACAACAGAAAGCG 3'
hosphoenolpyruvate arboxykinase (205)	5' GAGATGATGAGCACTGCTGG 3' 5' GCACGAGTGTTCTCTGTAACTCC 3'	Unknown 2 (300)	5' CTCAAGCGCCGACTTTCCTG 3' 5' CTTTGCCACCCACCTTGTCG 3'
Defender against cell eath 1 (186)	5' GCGAGGTACTCCTGACGAAACG 3' 5' GTCGACGAGCAAGGACACCCAG 3'	Unknown 3 (320)	5' CAGGGGTGCTTAAGGTGCAGC 3' 5' CAGCTGGGAAATCAAGCAGC 3'
arly light-induced rotein (322)	5' CTCGGTGAGGGCTAGAGCAACC 3' 5' GTCTGTGACAACTTCAACACC 3'		Constitutive :
GPI prot transamidase omplex subunit (225)	5' CATCAATGTGACCGCACACG 3' 5' AGGTAGCAGCTAGGTAGGTC 3'	26S rRNA (612)	5' AAC GCT TGG CTG CCA CAA GCC 3' 5' GAC TCT CTT AAG GTA GCC AAA TG
utative kinase (166)	5' GTTGGAGTGTTCTCTGTAACTCC 3' 5' GCTTCACAATATTTGGATGACTC 3'	**Photosystem II reaction center M protein (223)**	5' GCATTTACAGGCGAAAGG 3' 5' GATAAGAACGAAACAGTC 3'

DISCUSSION

Comme il a été décrit dans l'introduction, plantes et micro-organismes se trouvent en interactions et établissent des symbioses. Ces associations peuvent permettre aux deux parties de tirer des bénéfices réciproques. C'est le cas lors de la symbiose fixatrice d'azote ou lors des symbioses mycorhiziennes au sens large. Plantes et microbes peuvent aussi interagir de manière moins équilibrée, dans les associations parasitaires, où les microbes infectent le végétal pour y puiser tous les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires sans contrepartie (Agrios 2005). Quelque soit le type d'interaction, la symbiose fonctionnelle n'apparaît pas sans un dialogue préliminaire. Les facteurs Nod sont ainsi indispensables aux modifications morphologiques des racines de légumineuses, de plus ils jouent un rôle clé dans la spécificité hôte-bactéries symbiotiques (van Rhjin & Vanderleyden 1995). Les éliciteurs, qu'ils soient généraux ou races spécifiques, constituent des éléments essentiels au développement et au contrôle de la pathologie chez la plante (Agrios 2005). L'existence d'un dialogue moléculaire entre champignons mycorhiziens et racines de plante ne fait elle non plus aucun doute. Cependant, les molécules impliquées lors de la mise en place des ectomycorhizes sont toujours sujettes à investigations, puisque le rôle des éliciteurs généraux (connus dans les relations plantes-microbes pathogènes) ou des hormones fongiques n'est toujours pas clairement établi bien que leurs perceptions ont été mises en évidence par de nombreuses études (Smith & Read 1997).

Quoiqu'il en soit, il semble évident que la présence du micro-organisme induit des modifications importantes dans la régulation de l'expression des gènes chez la plante hôte comme dans le cas d'autres associations symbiotiques. Pour étudier cette régulation, le travail présenté s'adressait au stade pré-symbiotique du développement ectomycorhizien entre *Quercus robur* et *Piloderma croceum*. Dans un premier temps, l'hypothèse hormonale a été testée. L'auxine constitue l'acteur principal de cette théorie. Son influence dans la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne ainsi que dans la régulation des gènes constituent autant d'éléments impliquant cette hormone dans l'association symbiotique (Gay et al. 1994 ; Charvet-Candela et al. 2002).

Champignon ectomycorhizien et auxine régulent-t-ils les gènes de manières similaires ?

Pour tenter de répondre à cette question, la régulation de 55 gènes de chêne lors de la présence de *Piloderma croceum* a été comparée à leur régulation lors d'un apport exogène d'auxine. A cours de ce travail, la régulation génique fut uniquement observée dans les racines

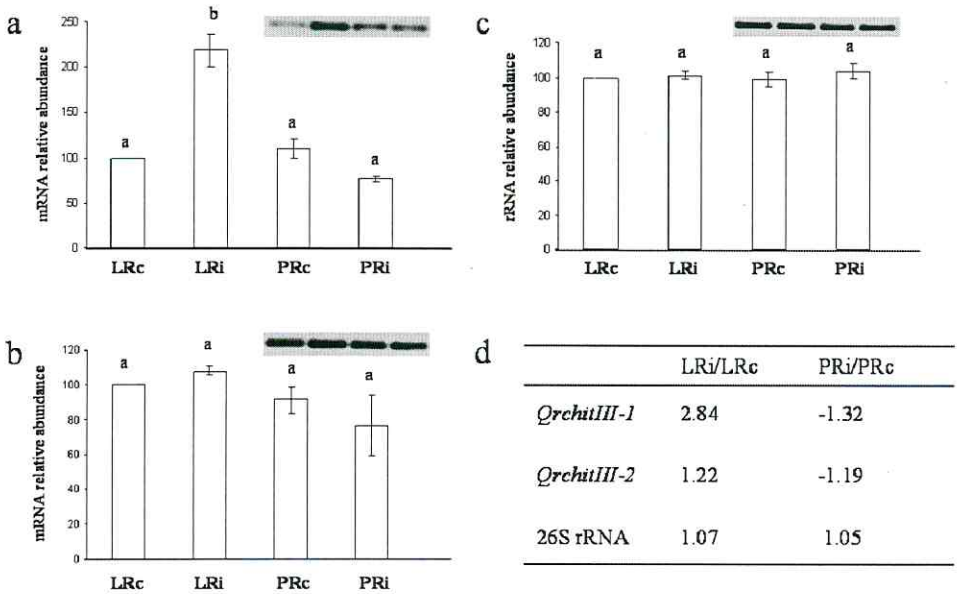
latérales, tissu dont sont issues les mycorhizes. Un total de 32 gènes apparaît être régulé par *Piloderma croceum*, contre seulement 17 gènes pour l'AIA. Parmi ces gènes, 12 sont régulés à la fois en présence du champignon et de l'AIA, mais seulement 2 gènes répondent de manières identiques à ces deux traitements. En effet, deux gènes codant pour des protéines aux fonctions inconnues sont surexprimés lors de la phase pré-symbiotique avec le champignon et en présence d'auxine. La régulation de l'expression de gènes chez la plante en présence du champignon ou d'auxine semble confirmer de précédents résultats observés durant d'autres interactions ectomycorhiziennes (Nehls et al. 1998, Charvet-Candela et al. 2002). D'après les résultats obtenus chez le chêne, il semble que la perception du champignon par le chêne n'implique que de manière modérée l'auxine.

Cette conclusion doit cependant être nuancée par le concept même de l'approche. La différence entre la production et la libération d'hormones, en particulier d'auxine, par le champignon en association avec un plante et un apport exogène d'AIA dans un milieu ne peut permettre de conclusions tranchées. Notons que l'auxine semble tout de même capable de réguler des gènes qui sont également régulés par le champignon ectomycorhizien. Il est probable que le champignon produise d'autres hormones que l'AIA (Béguiristain et al. 1995). De plus, il est possible que les concentrations d'auxine fluctuent dans des proportions inconnues au cours de la phase pré-symbiotique. Ces variations de quantités et de qualités dans la libération d'auxine pourraient permettre la régulation d'une plus grande proportion de gènes que ce qui a été observé dans ce travail à la suite de l'adjonction d'auxine.

Néanmoins, la régulation génique doit être le fruit de la perception d'autres molécules lors du dialogue pré-mycorhizien. Les chitinases sont exprimées sous l'impact de plusieurs stress tels les blessures ou la présence d'un parasite. De manière expérimentale, les chitinases peuvent être induites par des éliciteurs généraux dont les glucanes, mais aussi par leur substrat. En effet, la chitine ou des composés associés tel le chitosan vont réguler positivement l'expression des chitinases (Collinge et al. 1993).

La phase pré-mycorhizienne entre le chêne et Piloderma croceum implique-t-elle la régulation de gènes codant pour des chitinases ?

Parmi les gènes connus pour répondre à la présence de micro-organismes, les chitinases sont la cible de nombreuses investigations (Salzer et al. 2000). Ces études montrent que la plante répond à la présence de bactéries lors de la nodulation (Goormachtig et al. 1998 ; Kim & Sun 2002), à la présence de parasites (Collinge et al. 1993), à la présence de champignon endomycorhizien, par l'expression de chitinases. Les travaux de Salzer et al. (2000) ont clairement démontré l'implication des chitinases de classe III dans la mise en place de la mycorhize arbusculaire. Cependant jusqu'à présent, aucune étude n'a étudié la régulation de gènes codant pour des chitinases (toutes classes confondues) lors de la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne. L'utilisation d'amorces dégénérées puis d'amorces spécifiques et PCR a permis d'identifier deux gènes codant des chitinases de classe III chez le chêne et de suivre leur expression lors de l'établissement de la symbiose avec le champignon ectomycorhizien *Piloderma croceum*. Ces gènes respectivement nommés *QrchitIII-1* et *QrchitIII-2*, répondent différemment à la présence du champignon (figure 16).



	LRi/LRc	PRi/PRc
QrchitIII-1	2.84	-1.32
QrchitIII-2	1.22	-1.19
26S rRNA	1.07	1.05

Figure 16. Expression de *QrchitIII-1* (a) et *QrchitIII-2* (b) dans les racines latérales de plantes contrôles (LRc) et inoculées (LRi), dans les racines principales de plantes contrôles (PRc) et

inoculées (PRi) pendant l'interaction *Quercus robur – Piloderma croceum*. Les niveaux de transcrits sont standardisés grâce à l'ARNr 26S (c). Les barres indiquent l'erreur standard de la moyenne. Les lettres identiques indiquent une différence non significative entre les tissus. Pour chaque gène, un gel de "reverse transcription polymerase chain reaction" (RT-PCR) est présenté en exemple, dans le même ordre de lecture (LRc, LRi, PRc and PRi). Les niveaux de régulation obtenus par RT-PCR quantitative de trois répétitions techniques réalisées sur trois échantillons biologiques sont présentés en (d).

En effet, alors que le gène *QrchitIII-1* est surexprimé dans les racines latérales avant la formation de toute structure symbiotique et non régulé dans les racines principales, le gène *QrchitIII-2* n'est quant à lui ni régulé dans les racines latérales ni dans les racines principales. La stimulation de l'expression du gène *QrchitIII-1* corrobore les observations d'Albrecht et al. (1994) montrant que la présence d'un champignon ectomycorhizien stimule les activités chitinasiques racinaires. De plus, il est réaliste d'élargir l'hypothèse de l'implication majeure des chitinases de classes III évoquée par Salzer et al. (2000) non plus uniquement à la mycorhize arbusculaire mais aux mycorhizes en général. Le rôle et les conditions d'expression du gène *QrchitIII-2* sont quant à eux des plus incertains. En effet, on ne peut que supposer que ce gène n'interviendrait pas dans l'interaction entre *Quercus robur* et *Piloderma croceum*, et qu'il pourrait être en revanche exprimé lors d'interaction avec d'autres champignons mycorhiziens, ou lors de réponses à des pathogènes. Une agressivité supérieure du champignon (mycorhizien ou parasite) pourrait impliquer la stimulation d'un plus grand nombre de chitinases pour accroître le contrôle sur le micro-organisme comme il l'a été proposé par Albrecht et al. (1994). Le rôle potentiel de ces chitinases de classe III chez le chêne lors de la mise en place de l'ectomycorhize avec *Piloderma croceum* sera discuté plus en détail ultérieurement.

La présence de *Piloderma croceum* semble donc induire une réponse différentielle chez la plante en fonction du type de racines dès la phase pré-symbiotique. Récemment Marjanovic et al. (2005) ont également mis en évidence une telle différence d'expression entre racines latérales et racines principales dans le cadre de l'étude d'aquaporines chez le peuplier. Cependant, cette analyse ayant été réalisée une fois l'ectomycorhize établie, le présent résultat obtenu avec le gène *QrchitIII-1* semble élargir cette observation à d'autres gènes et au stade pré-symbiotique.

La perception du champignon ectomycorhizien induit-elle une régulation différentielle d'autres gènes entre racines latérales et racines principales durant la phase pré-symbiotique ?

L'utilisation de près de 2000 EST provenant de l'UMR Biodiversité Gènes et Ecosystèmes de Bordeaux a permis de comparer la régulation des niveaux de transcrits d'environ 600 gènes dans les racines latérales et principales en présence du champignon ectomycorhizien avant même le développement de toute structure symbiotique. La perception de *Piloderma croceum* a été confirmée au niveau génique par la régulation de 53 gènes dans les racines latérales et de 51 dans les racines principales. L'ensemble des gènes régulés constitue un groupe de 75 gènes permettant de comparer les types racinaires lors de la phase pré-mycorhizienne. Parmi ces 75 gènes, seulement 28% montrent une régulation identique dans les deux types de racines lors de l'inoculation avec *Piloderma croceum*. Les autres gènes sont soit régulés de manières opposées pour 11% d'entre eux, soit uniquement régulés dans un seul des types racinaires pour 61% des gènes sélectionnés. La réponse différentielle observée lors de l'étude des chitinases ne semblent donc pas constituer un cas particulier, et révèle une réponse adaptatée précoce des racines avant même la formation de structures symbiotiques chez la plante. On peut alors supposer que cette spécificité racinaire observée chez le chêne se poursuit ensuite quand la symbiose est établie. La différence de régulation se prolongerait pour aboutir aux observations de Marjanovic et al. (2005).

Pour conforter cette hypothèse, les niveaux de transcrits des 75 gènes ont été suivis dans la mycorhize fonctionnelle. Ainsi, et de manière remarquable, la régulation de ces gènes dans les racines latérales pré-symbiotiques et la régulation de ces derniers dans les mycorhizes formées sont quasi identiques. De plus, la différence d'expression observée avec les racines principales reste toujours aussi marquée (figure 17).

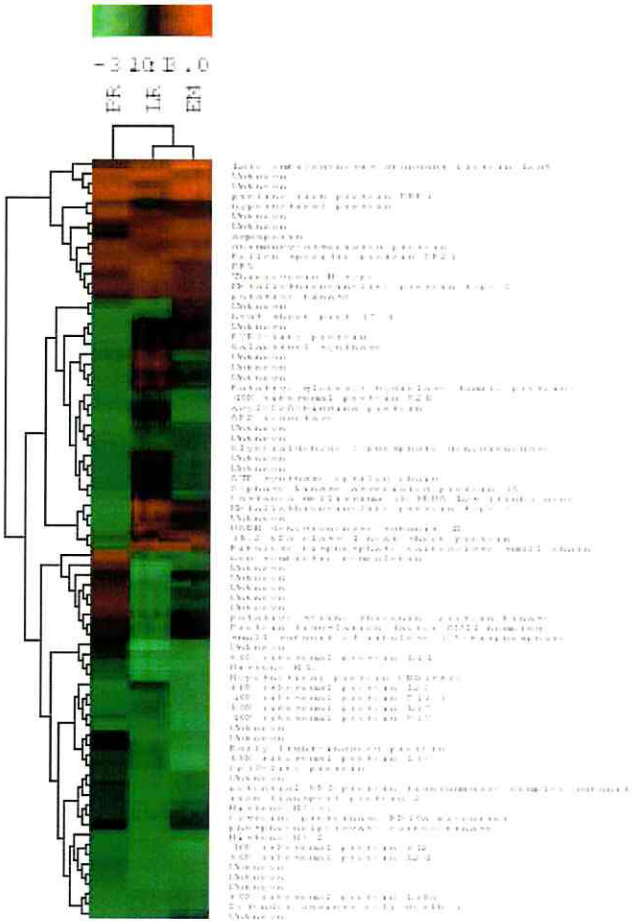


Figure 17. Regroupement hiérarchisé des profils d'expression pour les gènes significativement régulés en fonction des types racinaires lors de l'interaction entre *Quercus robur* et *Piloderma croceum*. LR, PR et EM correspondent respectivement à racines latérales, racines principales et ectomycorhizes.

On peut donc postuler que les gènes exprimés dès la phase pré-mycorhizienne dans les racines latérales jouent un rôle majeur dans la symbiose. En tenant compte des activités des protéines codées par ces gènes, il apparaît possible d'interpréter la régulation génique observée lors de la phase de reconnaissance entre *Piloderma croceum* et *Quercus robur*.

Catégories fonctionnelles des gènes régulés, type de la régulation et implication fonctionnelle

Un peu plus de 600 gènes, toutes fonctions confondues, ont été utilisés pour étudier la régulation génique chez des racines de chênes en phase pré-mycorhizienne. Les gènes régulés sont connus pour jouer un rôle dans les phénomènes de transduction et dans le métabolique des composés carbonés, lipidiques ou protéiques. Par ailleurs, un peu plus d'un tiers des gènes régulés codent pour des protéines aux fonctions encore inconnues.
La proportion de gènes dans les différentes catégories fonctionnelles régulées n'est pas la même lorsque l'on compare l'ensemble des gènes utilisés pour l'étude aux gènes significativement régulés lors de la phase pré-symbiotique. Il apparaît une augmentation du pourcentage de gènes liés à une réponse aux stress. En effet, si l'on ne prend en compte que les gènes codant pour des protéines aux fonctions connues parmi les 600 gènes testés, les gènes codant pour des protéines de réponses à des agressions biotiques ou abiotiques représentent environ 17% du total (Derory et al. accepté). Alors que parmi les 76 gènes significativement régulés lors de l'interaction entre *Quercus robur* et *Piloderma croceum*, 38% des gènes identifiés codent pour des protéines de défenses et de résistance aux agressions. Dans les racines latérales, 75% de ces gènes sont surexprimés. Dans les racines principales, ils ne sont plus que 50% à être surexprimés.

Parmi les gènes en relation avec une réponse au stress qui ont été régulés, certains correspondent à des mécanismes majeurs d'autres interactions entre plantes et microbes. Ainsi, le niveau de transcrits codant pour une PR5 est régulé positivement dans les racines latérales et principales en présence de *Piloderma croceum*. Les protéines de type PR5 sont impliquées dans la défense de la plante envers les pathogènes dont les champignons parasites de racines (Asiegbu et al. 2005). Ces protéines, qui présentent des homologies significatives dans leurs séquences en acides aminés avec les thaumatines, sont également connues sous le terme de "thaumatin like (TL) protein". Bien que la fonction précise des protéines PR5 ne soit pas clairement établie, certaines observations permettent de supposer leur rôle dans la défense contre les champignons : (i) certaines protéines TL provoquent des changements de perméabilité dans la paroi fongique (Roberts & Selitrennikoff 1990), (ii) certaines "PR5" présentent des affinités de fixation avec les β-1,3 glucanes et ont une activité β-1,3 glucanase (Trudel et al. 1998), (iii) une protéine TL de tabac cause des perturbations dans la régulation de l'assemblement de la paroi fongique (Yun et al. 1998). Chez le chêne, cette PR5 pourrait jouer

plusieurs rôles comme le contrôle de la croissance fongique pour limiter l'invasion du champignon. Il est également possible que l'action de cette PR5 sur les hyphes intra-racinaires puisse favoriser l'échange nutritionnel entre les partenaires de la symbiose à la suite de l'augmentation de perméabilité des structures fongiques du réseau de Hartig.

Un gène codant pour une "proline rich protein 1" (PRP1) est également surexprimé dans les deux types racinaires en présence du champignon ectomycorhizien. Les PRP, caractérisées par des séquences répétitives avec deux résidus proline adjacents, représentent une classe de protéines présentes dans la paroi cellulaire des plantes. Les PRP joueraient un rôle dans le rejet des micro-organismes par fixation de la paroi cellulaire (figure 18) (Parniske 2000). Une PRP1 catalyse le dépôt de silice sur le site de pénétration d'un champignon pathogène (Kauss et al. 2003). Les PRP sont également impliquées dans la réorganisation de la paroi végétale lors de la réponse défensive de la plante afin de former une matrice extracellulaire enveloppant l'haustorium et les hyphes extracellulaires (Sheng et al. 1991). Le gène *MtENOD11* évoqué aux chapitres 2.3.1. et 3.2. de l'introduction pour son implication durant la nodulation et la mycorhize arbusculaire code pour une PRP (Journet *et al.* 2001). Dans la symbiose avec *Piloderma croceum*, cette protéine pourrait permettre de protéger les cellules du chêne des enzymes lytiques libérées par les hyphes du champignon (par exemple de type laccase).

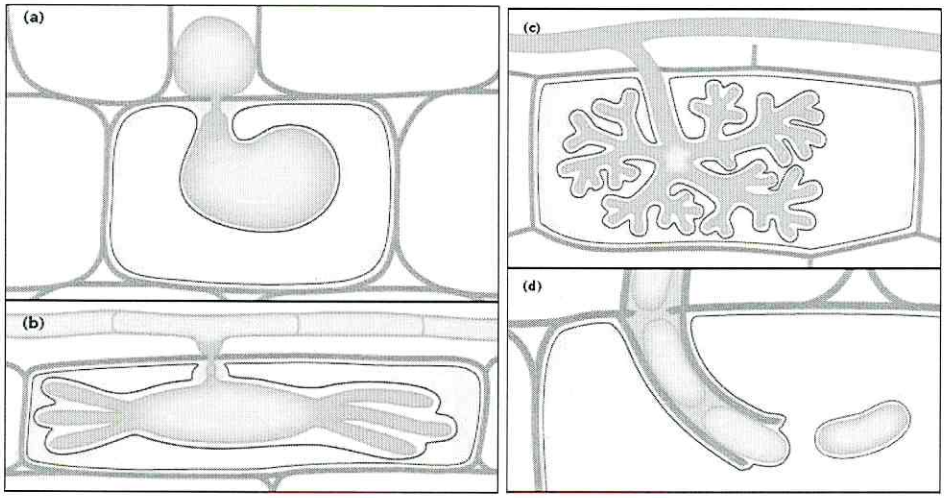


Figure 18. Exemples d'interactions où le rôle de PRP a été mis en évidence dans le développement d'une structure périmicrobiale (en rouge) : **(a)** l'haustorium de *Peronospora* dans une cellule du mésophile de feuille, **(b)** l'haustorium d'*Erysyphe graminis* dans une

cellule de l'épiderme de feuille, **(c)** l'arbuscule de *Glomus sp.* dans une cellule du cortex racinaire, **(d)** le cordon d'infection et un bactéroïde dans une cellule de racine nodulée (Parniske 2000)

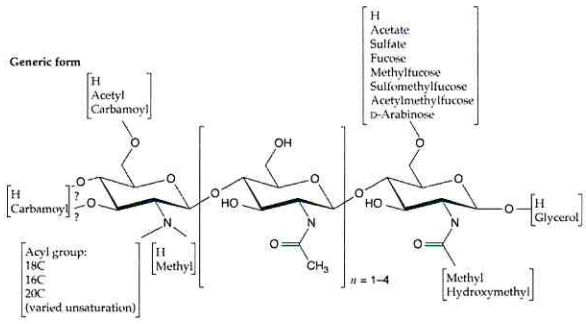
Par ailleurs, la phase pré-symbiotique est également marquée par l'expression d'une chitinase, dont l'implication dans d'autres interactions a été décrite plus haut et a permis son affiliation aux PR3. En effet, le gène *QrchitIII-1* est surexprimé dans les racines latérales. Les chitinases de classe III sont exprimées chez les plantes lors de blessures (Rojas-Herrera & Loyola-Vargas 2002) et lors d'agressions par des micro-organismes pathogènes (Regalado et al. 2000). Récemment, Le Quéré et al. (2005) ont identifié une chitinase surexprimée pendant la formation du manteau et du réseau de Hartig lors de l'interaction entre *Betula pendula* et *Paxillus involutus*. Il est raisonnable de penser que les chitinases jouent un rôle de contrôle dans les processus de différentiation du champignon. Le chêne exprimerait des gènes codant pour des chitinases tel *QrchitIII-1* pour moduler la croissance hyphale de *Piloderma croceum* avant le développement de structures symbiotiques.

Une hémoglobine non symbiotique est régulée différentiellement entre les différentes racines. Elle est réprimée dans les racines latérales, surexprimée dans les racines principales. Les hémoglobines non symbiotiques sont exprimées lors d'hypoxie, mais il n'est pas encore clairement établi quel est leur rôle lors d'interactions avec des microbes. Cependant, les résultats de Shimoda et al. (2005) suggèrent fortement que l'hémoglobine non symbiotique et l'oxyde nitrique (NO) jouent un rôle important dans l'adaptation au stress et dans les premiers stades de la nodulation. Le NO est connu comme signal pour l'activation du système défensif des plantes (Collinge et al. 2001). L'hémoglobine non symbiotique limiterait les défenses de la plante en fixant le NO (Uchium et al. 2002). La répression de ce gène dans les racines latérales du chêne et dans les ectomycorhizes pourrait refléter une activation des défenses de l'arbre car plus de NO serait disponible. Cette défense supérieure là où le champignon va pénétrer permettrait de mieux contrôler la croissance hyphale.

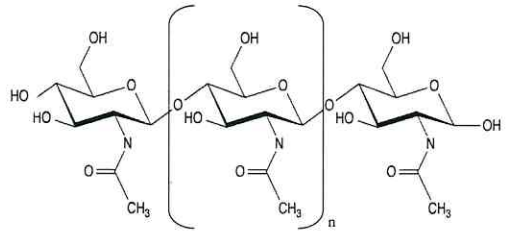
La régulation précoce de cet ensemble de gènes dans l'association *Quercus robur / Piloderma croceum* implique que la perception du microbe par la plante répond à des mécanismes signalétiques comparables à ceux intervenant dans le cadre de la nodulation, de la mycorhize arbusculaire, ou d'une pathologie. Les similarités structurales des éliciteurs produits

par les microbes concernés sont sans doute la raison de la régulation de ces gènes durant la phase de reconnaissance (figure 19).

(a)



(b)



(c)

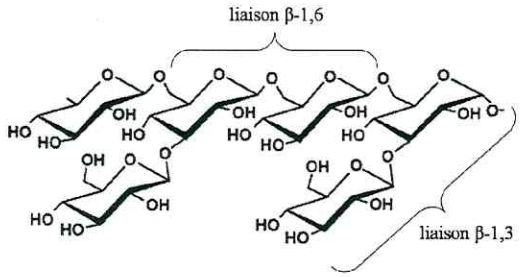


Figure 19. Similarité structurale des molécules impliquées dans des interactions entre plantes et microbes (a) le facteur Nod, (b) la chitine, (c) les β-glucanes (d'après Buchanan et al. 2001)

La stimulation de gènes de défense répond sans doute à des voies similaires de conquêtes utilisées par les micro-organismes. En effet, la frontière entre microbe mutualiste et microbe pathogène n'est pas toujours très nette. Les récents travaux de Velázquez et al. (2005) montrent qu'il existe des souches du genre *Rhizobium* qui peuvent être pathogène pour des plantes non-légumineuses, mais aussi nodulantes avec les légumineuses. Il a également été

montré que *Magnaporthe grisea* un parasite foliaire du riz est capable d'envahir les racines de riz (Sesma & Osboum 2004). La morphologie de l'appressorium produit par *Magnaporthe grisea* va différer entre feuille et racine. Sur la feuille l'appressorium sera mélanisé alors que sur la surface racinaire il se forme un hyphe enflé proche des appressoriums formé par les champignons arbusculaires (Sesma & Osboum 2004). De plus, des événements moléculaires associés à la formation de l'appressorium chez les champignons pathogènes ou à arbuscules apparaissent similaires (Breuninger & Requena 2004). Lors de l'interaction ectomycorhizienne entre *Tuber borchii* et *Tilia americana*, Menotta et al. (2005) ont montré que la truffe exprime durant la phase pré-symbiotique des gènes similaires (codant pour une glyoxal oxidase, et une GAS-2 protein-like) à ceux qu'expriment les champignons pathogènes parasitant la plante. Enfin, les structures d'apposition développées lors de symbioses biotrophes, tels les arbuscules, haustoriums ou de réseaux de Hartig, présentent une structure et un fonctionnement très proches. Leurs mises en place impliquent vraisemblablement des mécanismes similaires. Les points communs unifiant les microbes symbiotiques ou pathogènes pourraient donc expliquer une réponse de même type chez les plantes. Les molécules élicitrices impliquant une réponse similaire quelque soit le type de symbiose sont de plus en plus regroupées sous le terme de PAMPs ("Pathogen Associated Molecular Patterns") (Gomez-Gomez & Boller 2000, Harrisson 2005). Ceci pourrait expliquer le lien génique entre résistance à la rouille et capacité à mycorhizer chez le peuplier montré par Tagu et al. (2005).

L'expression des gènes défensifs chez le chêne semble avoir une finalité commune, à savoir le contrôle de la croissance du micro-organisme symbiotique. La plante use de deux stratégies pour cela, (i) la formation d'une barrière chimique, grâce aux β-glucanases et chitinases, (ii) la formation d'une barrière physique par renforcement des structures cellulaires via les PRP. Pour faire, la plante modulerait les voies activatrices liées au NO.

Des gènes en relation avec d'autres types de contraintes environnementales sont aussi régulés lors de la phase de reconnaissance entre *Piloderma croceum* et le chêne. Ainsi, des gènes codant pour des protéines impliquées dans les phénomènes de résistance à la sécheresse sont exprimés. La symbiose ectomycorhizienne conduit à une augmentation de croissance du système aérien et à un accroissement des capacités photosynthétiques (Smith & Read 1997 ; Herrmann et al. 1998, 2004). Les pertes d'eau au niveau aérien causées par une plus grande évapotranspiration impliquent de plus grandes contraintes au niveau racinaire. La plante répond à deux niveaux. Elle accroît sa capacité captatrice d'eau et développe des structures de

résistances cellulaires. Ainsi une aquaporine est surexprimée dans les racines latérales. Ce transporteur augmenterait la perméabilité de la membrane aux solutés, et ainsi stimulerait le transport à longue distance dans les racines puis dans la plante (Schäffner 1998). La stimulation de cette aquaporine chez le chêne confirme les observations réalisées par Marjanovic et al. (2005) sur le peuplier. De plus, les gènes codant pour une protéine Lea5 ("Late embryogenesis abundant protein") (Wise & Tunnacliffe 2004), pour une protéine associée à la dormance ("Dormancy-associated protein") (Laberge et al. 1993), et pour protéine spécifique du pollen ("Pollen specific protein SF21") (Wang et al. 2003) sont surexprimés dans les deux types de racines étudiés. Ces protéines sont impliquées dans des modifications du cytosquelette. De nombreuses études mettent en évidence leurs capacités de protection des structures cellulaires contre les effets de la perte ou limitation de l'eau (Laberge et al. 1993, Wang et al. 2003, Wise & Tunnacliffe 2004).

Enfin, des gènes connus pour répondre à des composés toxiques sont régulés positivement avant la mise en place de toute structure symbiotique. Ainsi une thiorédoxine et des métalloprotéines sont positivement régulées. Ces protéines sont impliquées dans la résistance aux formes actives de l'oxygène et aux métaux lourds (Köhler et al. 2004).

Les symbioses mycorhiziennes fournissent à la plante une résistance accrue aux pathogènes, à la sécheresse, et aux divers éléments toxiques présents dans l'environnement (Smith & Read 1997). La gamme des gènes régulés chez *Quercus robur* dès la phase pré-symbiotique avec *Piloderma croceum* correspond à chacune de ces fonctions (figure 20).

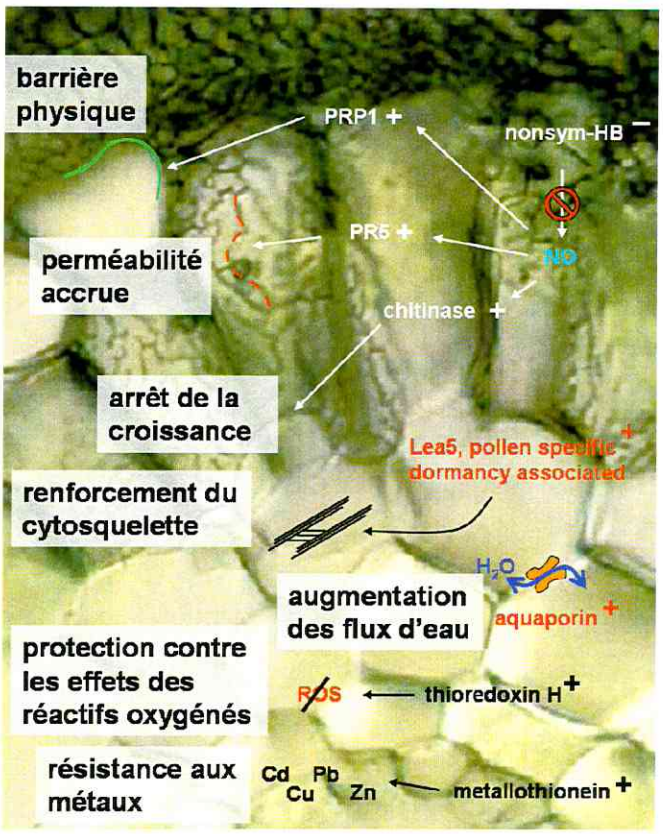


Figure 20. Schéma récapitulatif des principaux gènes régulés lors de l'interaction entre *Quercus robur* et *Piloderma croceum*, pour chaque gène il est indiqué le sens de la régulation (surexpression ou répression) ainsi que le rôle potentiel qu'il va jouer dans la symbiose

Les effets positifs de la symbiose observés dans le modèle étudié, à savoir une stimulation de la croissance (Herrmann et al. 1998) mais aussi une diminution du stress oxydatif lié à la machinerie photosynthétique (Herrmann et al. 2004), confirment le caractère mutualistique de l'interaction alors même que la symbiose n'est pas différenciée. Au delà du contrôle du partenaire fongique, il est raisonnable de penser que les gènes exprimés permetteraient la mise en place de mécanismes globaux augmentant la résistance de la plante aux contraintes biotiques et abiotiques de son environnement. La régulation de certains de ces gènes dans les racines principales alors que celles-ci ne sont pas directement impliquées dans l'interaction laisserait supposer une réponse systémique de la plante pour certaines fonctions.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Le dialogue moléculaire précédant la mise en place des interactions entre plantes et microbes apparaît comme une condition *sine qua non* à la réussite de la symbiose. L'utilisation de systèmes *in vitro* où il est possible de synthétiser des ectomycorhizes constituent à l'heure actuelle un des meilleurs moyens de comprendre les mécanismes moléculaires gouvernant la mise en place et le développement de cette symbiose. Grâce à l'utilisation du couple *Quercus robur* et *Piloderma croceum* et d'approches moléculaires complémentaires, il a été possible de confirmer au niveau génique les observations physiologiques indiquant qu'avant la mise en place de toute structure symbiotique différenciée la plante perçoit le champignon.

Sur la base des travaux réalisés sur ce modèle, un rôle très limité a été attribué à l'auxine dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la symbiose. De manière remarquable, la régulation d'un grand nombre de gènes identifiés dans d'autres interactions a été mise en évidence pendant la phase pré-symbiotique et l'ectomycorhize fonctionnelle. L'expression de gènes de défense ou de réponse à d'autres stress pourrait, au-delà d'un simple contrôle de la croissance fongique, expliquer la résistance systémique des plantes mycorhizées face aux agressions de leur environnement.

La compréhension des mécanismes de contrôle du partenaire mycorhizien par la plante passe par l'élargissement des observations réalisées à de nouvelles investigations. La cinétique de mycorhization du chêne varie selon le partenaire fongique, ainsi en présence *Paxillus involutus* la symbiose se met en place de façon plus rapide (Herrmann et al. 1998). Pour élargir les observations réalisées durant ce travail et accréditer les hypothèses émises, la régulation des gènes sélectionnés doit être suivie en présence d'autres partenaires fongiques. D'autres catégories de champignons doivent en effet être testées, ainsi il est possible d'inoculer le chêne avec des champignons pathogènes, ou de mettre les racines en présence de champignons saprophytes.

Ces nouvelles interactions doivent permettre de répondre à plusieurs questions :

(i) les gènes sélectionnés sont-ils spécifiques à la présence de *Piloderma croceum* ?

(ii) les gènes sélectionnés sont-ils spécifiques à la présence de champignons ectomycorhiziens ?

(iii) y a-t-il une corrélation entre l'intensité de la régulation des gènes et l'agressivité du champignon ectomycorhizien ?

(iv) y a-t-il des gènes spécifiquement régulés par les champignons symbiotiques (mycorhizien ou pathogène), et des gènes régulés par un champignon non-symbiotique ?

Il est de plus envisageable de réaliser des mesures d'activités enzymatiques au niveau des racines pour permettre de compléter les analyses transcriptomiques. Les activités chitinasiques peuvent notamment être étudiées (Albrecht et al. 1994). Ce genre d'étude complémentaire pourrait être le moyen de corréler la régulation de *QrchitIII-1* et la non régulation de *QrchitIII-2* avec des mesures physiologiques. L'existence de clones d'arbres mutants surexprimant des gènes codant pour des chitinases (pommier, cacaotier) peut de plus permettre de mieux comprendre le rôle primordial de ces enzymes dans la mise en place des mycorhizes.

La présence de *Piloderma croceum* modifie la régulation des gènes dans les racines latérales, mais aussi dans les racines principales permettant de supposer une réponse systémique de la plante. Le suivi de la régulation des gènes de défense (PR5, PRP1, chitinases) dans le reste de la plante (tiges, feuilles, bourgeons) permettra de confirmer, d'infirmer ou de limiter cette hypothèse.

L'utilisation d'EST réalisées sur des bourgeons de chêne sessile (*Quercus petraea*) à différents stades de développement pour étudier la mise en place d'une symbiose racinaire chez *Quercus robur* s'est révélée être une stratégie audacieuse mais qui a néanmoins permit de caractériser des mécanismes assez peu décrits. Cependant, la régulation génique liée aux échanges azotés ou carbonés entre les partenaires n'a pu être observée, une approche comparable à celle utilisée pour les chitinases de classe III est envisageable pour compléter nos observations.

BIBLIOGRAPHIE

Agrios GN (2005) Plant Pathology (5th Edition). Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo 922 pp.

Albrecht C, Asselin A, Piché Y, Lapeyrie F (1994) Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. Physiol Plant 91 : 104-110

Albrecht C, Geurts R, Lapeyrie F, Bisseling T (1998) Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PSENOD12A*. Plant J 15 : 605-614

Allen ON, Allen EK (1981) The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison

Asiegbu FO, Nahalkova J, Li G (2005) Pathogen-inducible cDNAs from the interaction of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Plant Sci 168 : 365-372

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. Plant Physiol 124 : 949–57

Balsalobre JM, Mas P, Sanchez-Pina MA, Pallas V (1997) Spatial distribution of acidic chitinases and their messenger RNAs in tobacco plants infected with cherry leaf roll virus. Mol Plant-Microb Interact 10 : 784-788

Barbour WM, Hatterman DR, Stacey G (1991) Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. Appl Environ Microbiol 57 : 2635–2639

Barker SJ, Tagu D, Delp G (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. Plant Physiol 116 : 1201-1207

Bècard G, Piché Y (1989) Fungal growth stimulation by CO2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl Environ Microbiol 55 : 2320–2325

Béguiristain T, Cote R, Rubini P, JAY-Allemand C, Lapeyrie F (1995) Hypaphorine accumulation in the hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 40 : 1089-1091

Béguiristain T, Lapeyrie F (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. New Phytol 136 : 525-532

Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (2002) Mycorrhiza-related chitinase and chitosanase activity isoforms in *Medicago truncatula* Gaertn. Symbiosis 32 : 173-194

Bhuvaneswari TV, Solheim B (1985) Root hair deformation in the white clover/*Rhizobium trifolii* symbiosis. Physiol Plant 63 : 25–31

Bladergroen MR, Spaink RP (1996) Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminoseae symbiosis. Curr Opin Plant Biol 1 : 353-359

Blakely LM, Evans TA (1979) Cell dynamics studies on the pericycle of radish seedling roots. Plant Sci Lett 14 : 79-83

Blanke V, Renker C, Wagner M, Füllner K, Held M, Kuhn AJ, Buscot F (2005) Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. New Phytol 166 : 981–992

Bonfante P, Perotto S (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi infecting host plants. New Phytol 130 : 3–21

Bravo JM, Campo S, Murillo I, Coca M, San Segundo B (2003) Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein (PR-4) family of maize. Plant Mol Biol 52 : 745-759

Breuninger M, Requena N (2004) Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. Fungal Genet Biol 41 : 794–804

Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. The Australian Centre for International Agricultural Research, 653 pp.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones JDG (2001) Illustrations from Biochemistry and molecular biology of plants. BIOTXT-CD300. American Society of Plant Biologist.

Büchter R, Strömberg A, Schmelzer E, Kombrink E (1997) Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. Plant Mol Biol 35 : 749-761

Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Bécard G (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. Mol Plant-Microb Interact 13 : 693-698

Burketova L, Stillerova K, Feltlova M (2003) Immunohistological localization of chitinase and ß-1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. Physiol Mol Plant Pathol 63 : 47-54

Callaham DA, Torrey JG (1981) The structural basis for the infection of root hairs in *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Can J Bot 59 : 1647–1664

Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995) A pathway for lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev 9 : 2131-2142

Celio GJ, Hausbeck MK (1998) Conidial germination, infection structure formation, and early colony development of powdery mildew on Poinsettia. Phytopathology 88 : 105-113

Charvet-Candela V, Hitchin S, Ernst D, Sandermann H, Marmeisse R, Gay G (2002) Characterization of an *Aux/IAA* cDNA upregulated in *Pinus pinaster* roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. New Phytol 154 : 769-777

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. Plant J 3 : 31-40

Collinge DB, Borch J, Madriz-Ordeñana K, Newman M-A (2001) The response of plants to pathogens. M.J. Hawkesford and P. Buchner (eds), The molecular analysis of plant adaptation to environment. Kluwer, Dordrecht, pp. 131-158

Coupe SA, Taylor JE, Roberts JA (1997) Temporal and spatial expression of mRNAs encoding pathogenesis-related proteins during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. Plant Cell Environ 20 : 1517-1524

Davis JM, Wu H, Cooke JEK, Reed JM, Luce KS, Michler CH (2002) Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. Mol Plant-Microb Interact 15 : 380-387

de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. New Phytol 111 : 607–619

Dénarié J, Debellé F, Promé JC (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu Rev Biochem 65 : 503-535

Derory J, Léger P, Garcia V, Schaeffer J, Hauser MT, Salin F, Luschnig C, Plomion C, Glössl J, Kremer A (accepté) Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.).

Ditengou FA, Béguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211 : 722-728

Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* conteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedling. Mol Plant-Microb Interact 13 : 151-158

Downie JA, Walker SA (1999) Plant responses to nodulation factors. Curr Opin Plant Biol 2 : 483–489

Duplessis S, Courty PE, Tagu D, Martin F (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus.* New Phytol 165 : 599-611

Economou A, Davies AE, Johnston AWB, Downie JA (1994) The *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae nodO* gene can enable a *nodE* mutant of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to nodulate vetch. Microbiology 140 : 2341-2347

Farkas V (1979) Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. Microbio Rev 43 : 117-144

Feugey L, Srullu D-G, Poupard P, Simoneau P (1999) Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. New Phytol 144 : 541-547

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopath 9 : 275-296

Frank AB (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber Dtsch Bot Ges 3 : 128–145

Frühling M, Roussel H, Gianinazzi-Pearson V, Puhler A, Perlick AM (1997) The *Vicia faba* leghemoglobin gene *VfLb29* is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum.* Mol Plant Microbe Interact 10 : 124–131

Fry SC, Aldington S, Hetherington PR, Aitken J (1993) Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physiol 103 : 1–5

Gamas P, de Billy F, Truchet G (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defence proteins. Mol Plant-Microb Interact 11 : 393-403

Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romugnesi have increased mycorhizal activity. New Phytol 128 : 645-650

Gaworzewska ET, Carlile MJ (1982) Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J Gen Microbiol 128 : 789–798

Gerhardt LBD, Sachetto-Martins G, Contarini MG, Sandroni M, Ferreira RD, de Lima VM, Cordeiro MC, de Oliveira DE, Margis-Pinheiro M (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. FEBS Lett 419 : 69-75

Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. New Phytol 125 : 587–593

Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. Mol Cell 5 : 1003–11

Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, Van Montagu M, Holsters M (1998) Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinase. Plant Cell 10 : 905-915

Götz M, Boyle C (1998) Haustorial Function During Development of Cleistothecia in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Plant Dis 82 : 507-511

Grunwald U, Nyamsuren O, Tamasloukht MB, Lapopin L, Becker A, Mann P, Gianinazzi-Pearson V, Krajinski F, Franken P (2004) Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. Plant Mol Biol 55 : 553-566

Hammes UZ, Schachtman DP, Berg RH, Nielsen E, Koch W, McIntyre LM, Taylor CG (2005) Nematode-Induced Changes of Transporter Gene Expression in *Arabidopsis* Roots. Mol Plant Microbe Interact 18 : 1247–1257

Hampp R, Ecke M, Schaeffer C, Wallenda T, Wingler A, Kottke I, Sundberg B (1996) Axenic mycorrhization of wild type and transgenic hybrid aspen expressing T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. Trees 11 : 59-64

Harrison MJ (2005) Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. Annu Rev Microbiol 59 : 19-42

Hernandez-Lucas I, Rogel-Hernandez M, Segovia L, Rojas-Jiménez K, Martinez-Romero E (2004) Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. System Appl Microbiol 27 : 703-706

Herrmann S, Munch JC, Buscot F (1998) A gnotobiotic culture system with oak microcuttings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before, and in the early phase of, ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. New Phytol 138 : 203-212

Herrmann S, Oelmüller R, Buscot F (2004) Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. J Plant Physiol 161 : 509-517

Hochholdinger F, Woll K, Sauer M, Dembinsky D (2004) Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specic developmental programmes. Ann Bot 93 : 359-368

Hwang SF, Chang KF, Chakaravaty P (1992) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of *Verticillium* and *Fusarium* wilts of alfalfa. Plant Dis 76 : 239–243

Isaac S (1992) Fungal-plant interactions. Chapman & Hall, Cambridge, UK. ISBN 0-412-36470-0.

Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1993) Hyphal transport by a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. Biol Fertil Soil 16 : 66–70

Jordan DC (1984) Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321AL, p. 234–254. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology,vol. 1. The Williams et Wilkins Co., Baltimore

Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D, Barker DG, Gianinazzi-Pearson V (2001) *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. Mol Plant-Microbe Interact 14 : 737–48

Journet EP, van Tuinen D, Gouzy J, Crespeau H, Carreau V, Farmer MJ, Niebel A, Schiex T, Jaillon O, Chatagnier O, Godiard L, Micheli F, Kahn D, Gianinazzi-Pearson V, Gamas P (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. Nucleic Acids Res 30 : 5579-5592

Kamst E, Spaink HP, Kafetzopoulos D (1998) Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. Subcell Biochem 29 : 29-71

Kästner B, Tenhaken R, Kauss H (1998) Chitinase in cucumber hypocotyls is induced by germinating fungal spores and by fungal elicitor in synergism with inducers of acquired resistance. Plant J 13 : 447-454

Kauss H, Seehaus K, Franke R, Gilbert S, Dietrich RA, Kröger N (2003) Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. Plant J 33 : 87–95

Kim HB, Sun AC (2002) Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata*. Mol Plant-Microb Interact 15 : 209-215

Kohki A, Matsuzaki K, HayashiH (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 435 : 824-827

Köhler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. New Phytol 164 : 83-93

Koske RE (1982) Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. Trans Br Mycol Soc 76 : 328–30

Kosuta S, Chabaud M, Lougnon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G (2003) A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific *MtENOD11* Expression in Roots of *Medicago truncatula*. Plant Physiol 131 : 952–962

Kottke I, Oberwinkler F (1986) Mycorrhiza of forest trees - structure and function. Trees 1 : 1-24

Krüger A, Peškan-Berhöfer T, Frettinger P, Herrmann S, Buscot F, Oelmüller R (2004) Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. New Phytol 163 : 149-157

Laberge S, Castonguay Y, Vezina LP (1993) New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. Plant Physiol 101 : 1411-1412

Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. New Phytol 149 : 349-355

Laus MC, van Brussel AAN, Kijne JW (2005) Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. Mol Plant-Microbe Interact 18 : 533–538

Laux T, Jürgens G (1997) Embryogenesis: a new start in life. Plant Cell 9 : 989-1000

Law R, Lewis DH (1983) Biotic environments and the maintenance of sex-some evidence from mutualistic symbioses. Biol J Linn Soc 20 : 249–276

Le Quéré A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Mol Plant-Microb Interact 18 : 659-673

Lewin A, Rosenberg C, Meyer ZAH, Wong CH, Nelson L, Manen JF, Stanley J, Downing DN, Dénarié J, Broughton WJ (1987) Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. Plant Mol Biol 8 : 447–459

Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124 : 33-44

Marjanovic Z, Uehlein N, Kaldenhoff R, Zwiazek JJ, Weiß M,Hampp R, Nehls U (2005) Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes! Planta in press, doi: 10.1007/s00425-005-1539-z

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. (2nd Ed.). Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 889 pp.

Menotta M, Amicucci A, Sisti D, Gioacchini AM, Stocchi V (2004) Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia americana* L. Curr Genet 46 : 158–165

Mills KM, Bauer WD (1985) *Rhizobium* attachment to clover roots. J Cell Sci Suppl 2 : 333–345

Morel M, Jacob C, Kohler A, Johansson T, Martin F, Chalot M, Brun A (2005) Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. Appl Env Microbiol 71 : 382-391

Morton JB, Bentivenga SP (1994) Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. Plant Soil 159 : 47–59

Nehls U, Béguiristain T, Ditengou FA, Lapeyrie F, Martin F (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Planta 207 : 296-302

Niemi K, Vuorinen T, Ernstsen A, Häggmann H (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cutting *in vitro*. Tree Physiol 22 :1231-1239

Parniske M (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? Curr Opin Plant Biol 3 : 320–328

Perez-Moreno J, Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants New Phytol 145 : 301-309

Peter M, Courty PE, Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Tagu D, Frey-Klett P, Duplessis S, Chalot M, Podila G, Martin F (2003) Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytol 159 : 117–129

Peterson L, Farquhar M (1994) Mycorrhizas - integrated development between roots and fungi. Mycologia 86 : 311-326

Philip-Hollingsworth S, Dazzo FB, Hollingsworth RI (1997) Structural requirements of Rhizobium chitolipooligosaccharides for uptake and bioactivity in legume roots as revealed by synthetic analogs and fluorescent probes. J Lipid Res 38 : 1229-1241

Polhill R M, Raven PH (1981) Advances in legume systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, England.

Pueppke SG (1984) Absorption of slow- and fast-growing rhizobia to soybean and cowpea roots. Plant Physiol 75 : 924–928

Rameau JC (1985) L'arbre, la forêt, les forêts française. Données écologiques fondamentales. ENGREF Centre de Nancy. Laboratoire de Botanique et de Phytosociologie forestière ed. 51 pp

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2003) Biologie végétale. De Boek édition. 944 pp

Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S, Chaves I, Ricardo CPP, Rodrigues-Pousada C (2000) The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. Planta 210 : 543-550

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 11841–11843

Roberts W, Selitrennikoff CP (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. J Gen Microbiol 136 : 1771–1778

Rojas-Herrara R, Loyola-Vargas VM (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. Plant Sci 163 : 705-711

Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. Cell 99 : 463-472

Salzer P, Hebe G, Hager A (1997) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K^+ and Cl^- release, extracellular alkalinisation and H_2O_2 synthesis of *Picea abies* cells. Planta 203 : 470-479

Salzer P, Boller T (2000) Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their suppression. *In* GK Podila, DD Douds, eds, Current Advances in Mycorrhizae Research. APS Press, St. Paul, MN, pp 1–10

Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher RA, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller T (2000) Differential expression of eight chitinase genes in

Medicago truncatula roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. Mol Plant-Microb Interact 13 : 763-777

Sanchez L, Weidmann S, Brechenmacher L, Batoux M, van Tuinen D, Lemanceau P, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2004) Common gene expression in *Medicago truncatula* roots in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodulation. New Phytol 161 : 855-863

Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol 116 : 447–53

Schäffner AR (1998) Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? Planta 204 : 131-139

Schüßler A, Schwarzott D,Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol Res 105 : 1414–1421

Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. Appl Environ Microbiol 67 : 2883-2894

Sesma A, Osbourn AE (2004) The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. Nature 431 : 582–586

Sheng J, D'Ovidio R, Mehdy MC (1991) Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. Plant J 1 : 345-354

Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol 46 : 99-107

Slankis V (1973) Hormonal relationships in mycorrhizal development. Marks GC, Ko TT ed. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. Academic Press, New York, 231-298

Smit G, Swart S, Lugtenberg BJJ, Kijne J (1992) Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. Mol Microbiol 6 : 2897–2903

Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39 : 221–244

Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis (2nd Ed). Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 605 pp.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. Plant Physiol 133 : 16–20

Stougaard J (2001) Genetics and genomics of root symbiosis. Curr Opin Plant Biol 4 : 328–335

Sutton JM, Lea EJA, Downie JA (1994) The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 9990-9994

Tagu D, Palin B, Balestini R, Gelhaye E, Lapeyrie F, Jacquot JP, Sautière PE, Bonfante P, Martin F (2003) Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-S-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. Plant Physiol Bioch 41 : 611-618

Tedersoo L, Kõljalg U, Hallenberg N, Larsson KH (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest New Phytol 159 : 153–165

Timmers ACJ, Auriac MC, de Billv F, Truchet G (1998) Nod factor internalization and micretubula; etoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. Development 125 : 339-349

Trinick MJ, Galbraith J (1976) Structure of root nodules formed by *Rhizobium* on the non-legume *Trema cannabina* var *scabra*. Arch. Microbiol. 108 : 159–166

Trudel J, Grenier J, Potvin C, Asselin A (1998) Several thaumatinlike proteins bind to b-1,3-glucans. Plant Physiol 118 : 1431–1438

Turgeon BG, Bauer WD (1985) Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Planta 163 : 328–349

Uchium T, Shimoda Y, Tsuruta T, Mukoyoshi Y, Suzuki A, Senoo K, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Abe M (2002) Expression of symbiotic and nonsymbiotic globin genes responding to microsymbionts on *Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol. 43 : 1351–1358

Ulrich JM (1960) Auxin production by mycorrhizal fungi. Physiol Plant 13 : 429-443

Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. Nature 378 : 62-65.

Van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. Nature 390 : 287-289.

van Rhijn P, Fang Y, Galili S, Shaul O, Atzmon N, Wininger S, Eshed Y, Lum M, Li Y, To V, Fujishige N, Kapulnik Y, Hirsch AM (1997) Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 5467–5472

van Rhijn P, Vanderleyden J (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol Rev 59 : 124–142

Velázquez E, Peix A, Zurdo-Piñeiro JL, Palomo JL, Mateos PF, Rivas R, Muñoz-Adelantado E, Toro N, García-Benavides P, Martínez-Molina E (2005) The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. Mol Plant-Microb Interact 18 : 1325–1332

Vesper SJ, Bauer WD (1986) Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. Appl Environ Microbiol 52 : 134–141

Vlassak KM, Luyten E, Verreth C, van Rhijn P, Bisseling T, Vanderleyden J (1998) The *Rhizobium* sp. BR816 *nodO* gene can function as a determinant for nodulation of *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris* and *Trifolium repens* by a diversity of *Rhizobium* spp. Mol Plant–Microbe Interact 11 : 383-392

Wang H-J, Jauh GU, Hsu Y-H, Wang C-S (2003) The nuclear localization signal of a pollen specific, desiccationassociated protein of lily is necessary and sufficient for nuclear targeting. Bot Bull Acad Sin 44 : 123-128

Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. Mol Plant–Microbe Interact 18 : 385–396

Wessels JGH (1986) Cell wall synthesis in apical growth. Int Rev Cytology 104 : 37-79

Wilcox H (1996) Mycorrhizae. *In:* Plant roots - the hidden half, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp. 149-174. ISBN 0-8247-9685-3

Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? Trends Plant Sci 9 : 13-17

Yao PY, Vincent JM (1969) Host specificity in the root hair ''curling factor'' of *Rhizobium sp.* Aust J Biol Sci 22 : 413–423

Young JPW, Johnston AWB (1989) The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. Trends Ecol Evol 4 : 331–349

Yun DJ, Ibeas JI, Lee H, Coca MA, Narasimhan ML, Uesono Y, Hasegawa PM, Pardo JM, Bressan RA (1998) Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. Mol Cell 1 : 807–817

Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde B (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 6529-6534

Zhu YG, Miller RM (2003) Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. Trends Plant Sci 8 : 407–409

UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Internet: www.ufz.de