

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

Préparée au sein de l'école doctorale : **Systèmes Intégrés
en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences,
Environnement (SIBAGHE)**

Et de l'unité de recherche de **Biochimie & Physiologie
Moléculaire des Plantes (B&PMP)**

Spécialité : **Biologie Intégrative des Plantes**

Présentée par **Kevin GARCIA**

**Echanges trophiques entre *Hebeloma
cylindrosporum* et *Pinus pinaster*: analyse
de systèmes de transport fongiques de
potassium et de phosphate inorganique
impliqués dans la symbiose
ectomycorhizienne**

Soutenue le 13 décembre 2013 devant le jury composé de

M. Gilles GAY, Professeur, Université Claude-Bernard, Lyon
M. Uwe NEHLS, Professeur, Universität Bremen, Allemagne
M. Daniel WIPF, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
M. Michel LEBRUN, Professeur, Université Montpellier II
Mme Sabine ZIMMERMANN, CR, CNRS, Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président du jury
Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire de Biologie et Physiologie Moléculaire des Plantes (B&PMP), et plus particulièrement dans l'équipe Canaux Ioniques dirigée par Hervé Sentenac.

Mes tout premiers remerciements vont évidemment à Sabine Zimmermann pour avoir dirigé et encadré mon travail. Ces trois années passées dans le même bureau que toi ont été une véritable chance pour moi. Tu m'as toujours considéré comme un collègue, m'as fait confiance et m'as laissé prendre mes propres initiatives. Ce rôle si effrayant au début a été au final tellement enrichissant. Ta bonne humeur constante, ta gentillesse, ta disponibilité, ton efficacité et ton soutien ont rendu cette aventure palpitante. Comme j'aime à le répéter, tu es "la meilleure chef du monde". Au moment d'écrire ces quelques lignes je me rend compte avec une certaine nostalgie du bonheur que j'ai eu de t'avoir comme encadrante. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as pu m'apporter. Mais trêve de mots larmoyants, au boulot! Hop hop hop, on a des articles à écrire, même à plusieurs milliers de kilomètres de distance!

J'adresse également un immense merci à Claude Plassard qui a joué un rôle primordial dans la partie phosphate de ce travail. Ta gentillesse, ta grande disponibilité (peut-être un peu trop, attention, il faut parfois savoir dire "non je ne veux pas t'aider, débrouille toi avec ton ED") et ton savoir m'ont été très précieux durant ces trois ans. Je t'en suis profondément reconnaissant Tu m'as également permis d'agrémenter d'au moins 1700 pages mon petit "dictionnaire des expressions oubliées qui auraient dû le rester" avec des pépites comme "ça me court sur le haricot", "tant que je t'ai au bout du mail" ou le tube interplanétaire "comme qui rigole!". Pour toutes ces bonnes "tranches de rigolades", merci ma Claudia.

Un merci particulier à tous les membres présents et passés du "groupuscule Myco". Merci Amandine pour ta bonne humeur, pour toutes ces discussions enrichissantes et pour ces fous-rires sous la hôte levure! J'espère sincèrement que tu pourras rebondir dans ou en dehors de la Recherche, mais je ne me fais pas trop de soucis pour toi, tu es une battante! Adeline, je ne te remercie pas, va bosser plutôt au lieu de lire ça! J'appelle Claude! Non bien sûr, un grand merci à toi pour ta sympathie, ta gentillesse et ta motivation à toute épreuve! Bien que tu sois maintenant en thèse, tu resteras TOUTE TA VIE à mes yeux la petite stagiaire qui manque de

faire péter les centri et qui crame des trucs à l'étuve (non non, à peine exagéré). On se revoit à l'ICOM8? Merci aux stagiaires Pauline, Carole, Sylvain et Yoan qui ont transité dans ce cercle très fermé qu'est le groupuscule Myco, et qui ont permis de faire grandement avancer nos projets. Un grand merci aussi à Geneviève Conéjéro pour son aide précieuse en HIS, sa pédagogie et son implication dans ce projet. Beaucoup de choses n'auraient pas été menées sans toi.

Je remercie également tous les membres de l'équipe KNO pour avoir rendu ces trois ans inoubliables. Un merci spécial aux "djeuns" de l'équipe, Alice, Mam et Manolo, ainsi qu'à ceux qui ont quitté le navire: Ronald (j'espère que tu as remarqué que je te classe parmi les jeunes), Cécile, Christelle, Imran, Farrukh, Muhammad, et mes amis Ali et Thomas.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'ANR TRANSMUT qui ont fait des ces réunions bisannuelles des moments géniaux. Merci également au jury d'avoir accepté de juger ces trois ans de travail, et à Christophe Roux d'avoir apporté un avis éclairé et constructif sur mon travail lors des comités de thèse.

Je ne saurais assez remercier toutes les personnes qui me sont chères, qui partagent ma vie et qui font semblant de s'intéresser (ou pas) à ces histoires de champignons et de racines. Je sais que vous ne lirez jamais cette thèse, et ce n'est pas bien. En vrac, merci à vous Audrey le tapir, général Arnaud, Fanette (alias trompette), Laurent le geek, Steph la gothique, Justine la rousse, Lilice, bro Symon, Harold le corniste albinos, Damien le gitanos et j'en oublie certainement.

Evidemment, je remercie très chaleureusement ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont toujours encouragé, soutenu et témoigné de leur confiance. Sans vous, je ne serais pas arrivé là où j'en suis actuellement. Je vous dois beaucoup et vous en serais éternellement reconnaissant.

Enfin, il arrive parfois que la vie prenne un grand coup d'accélérateur. J'adresse donc mes plus tendres remerciements à vous, Lauriane et Eléonore. Merci d'avoir magnifiquement bouleversé ma vie, d'avoir supporté toutes mes sautes d'humeur durant cette dernière année et de me soutenir dans cette folle passion qu'est la Recherche. Outre-Atlantique, une belle aventure s'ouvre à nous mes petites femmes!

ABREVIATIONS

AcPase	<u>A</u> lcaline <u>p</u> hosphatase	Po	<u>P</u> hosphate <u>o</u> rganique
ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique	Prom	<u>P</u> romoteur
ADNc	<u>A</u> DN <u>c</u> omplémentaire	PT	<u>P</u> hosphate <u>t</u> ransporter
ADNg	<u>A</u> DN <u>g</u> énomique	qPCR	quantitative <u>P</u> CR
ARNc	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique	RNAi	<u>R</u> NA <u>i</u> nterference
ARNc	<u>A</u> RN <u>c</u> omplémentaire	RNase	<u>R</u> ibo <u>n</u> ucléase
ARNt	<u>A</u> RN de <u>t</u> ransfert	RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranscription
AS	<u>A</u> ntisens	S	<u>S</u> ens
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignement <u>R</u> esearch <u>T</u> ool	sec	<u>S</u> econdes
dATP	<u>D</u> ésoxyadénosine <u>t</u> riphosphate	SKC	<u>S</u> haker-like <u>c</u> hannel
dCTP	<u>D</u> ésoxycytidine <u>t</u> riphosphate	TIV	<u>T</u> ranscription <i>in vitro</i>
DEPC	<u>D</u> iéthylpyro <u>c</u> arbonate	TOK	<u>T</u> andem-pore <u>o</u> utward
dGTP	<u>D</u> ésoxyguanosine <u>t</u> riphosphate		<u>K</u> ⁺ channel
DNase	<u>D</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléase	Trk	<u>T</u> ransporter of <u>K</u> ⁺
dig	<u>D</u> igoxygénine	WGA	<u>W</u> heat <u>G</u> erm <u>A</u> gglutinin
dUTP	<u>D</u> éoxyuridine <u>t</u> riphosphate	YMG	<u>Y</u> east extract, <u>M</u> alt
EDTA	<u>E</u> thylenediaminetetraacetic <u>a</u> cid		extract, <u>G</u> lucose
EGFP	<u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein		
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equence <u>T</u> ag		
h	<u>H</u> eures		
HAK	<u>H</u> igh-affinity <u>K</u> ⁺ transporter		
HIS	<u>H</u> ybridation <i>in situ</i>		
K ⁺	Potassium		
min	<u>M</u> inutes		
OE	<u>O</u> ver- <u>e</u> xpression (surexpression)		
P	<u>P</u> hosphore		
pb	<u>P</u> aires de <u>b</u> ases		
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline		
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction		
Pi	<u>P</u> hosphate <u>i</u> norganique		
Pm	<u>P</u> hosphore <u>m</u> inéral		

SOMMAIRE

Chapitre I - Introduction	17
1.1 Les différents types d'associations mycorhiziennes	17
1.2 La symbiose ectomycorhizienne	20
1.2.1 Origines de la symbiose ectomycorhizienne.....	20
1.2.2 Rôle écologique de la symbiose ectomycorhizienne	22
1.2.3 Symbiose ectomycorhizienne: du dialogue à la relation durable.....	23
1.2.3.1 Dialogue moléculaire entre plantes et champignons ectomycorhiziens	23
1.2.3.2 Echanges nutritionnels: la base d'un couple qui dure	25
1.3 Le couple symbiotique <i>Hebeloma cylindrosporum</i> – <i>Pinus pinaster</i>	27
1.3.1 <i>Hebeloma cylindrosporum</i> : un modèle de champignon	27
1.3.2 <i>Pinus pinaster</i> : l'alliance de l'écologie et de l'économie.....	30
1.4 La base moléculaire du transport membranaire	32
1.5 Nutrition potassique mycorhize – dépendante: une revue	35
1.6 Nutrition phosphatée ectomycorhize – dépendante	53
1.6.1 Importance du phosphore chez les plantes: le phosphate inorganique.....	53
1.6.2 Amélioration de la nutrition phosphatée des plantes ectomycorhizées.....	55
1.6.3 Transport du phosphate inorganique au coeur de l'ectomycorhize	57
1.7 De la génomique à l'analyse fonctionnelle de systèmes de transport fongiques	59
1.8 Objectifs et intégration de mes travaux de doctorat dans le contexte général	61
Chapitre II - Matériel et méthodes	65
2.1 Matériel biologique	65
2.1.1 Partenaire fongique	65
2.1.2 Partenaire végétal	65
2.2 Milieux et conditions de culture	65
2.2.1 Culture solide d' <i>Hebeloma cylindrosporum</i>	65
2.2.2 Culture liquide d' <i>Hebeloma cylindrosporum</i>	67
2.2.3 Cinétique de carence en potassium, sodium et phosphate d' <i>Hebeloma cylindrosporum</i>	67
2.3 Production d'ectomycorhizes	67
2.4 Agrotransformation d'<i>Hebeloma cylindrosporum</i> (d'après Combiér <i>et al.</i>, 2003)	69

2.4.1 Préparation du champignon.....	69
2.4.2 Préparation de la bactérie	71
2.4.3 Agrotransformation	71
2.4.4 Sélection des transformants et test de stabilité mitotique	72
2.5 Localisation de l'expression des gènes, des transcrits et des protéines	72
2.5.1 Construction de vecteurs de fusion transcriptionnelle	72
2.5.2 Construction de vecteurs de fusion traductionnelle	73
2.5.3 Observation des échantillons en culture pure au microscope à épifluorescence.....	75
2.5.4 Observation des ectomycorhizes au microscope confocal.....	76
2.6 Localisation de transcrits par hybridation <i>in situ</i>	76
2.6.1 Synthèse des sondes sens et antisens marquées à la dUTP-digoxigénine.....	76
2.6.2 Fixation et inclusion en paraffine des ectomycorhizes	79
2.6.3 Préparation et traitement des coupes.....	80
2.6.4 Hybridation	81
2.6.5 Révélation du signal	81
2.7 Surexpression et RNAi de gènes chez <i>Hebeloma cylindrosporium</i>	83
2.7.1 Construction de vecteurs de surexpression	83
2.7.2 Construction de vecteurs RNAi	83
2.8 Analyses phénotypiques	85
2.8.1 Détermination de la matière fraîche et de la matière sèche.....	85
2.8.2 Dosage du potassium et du sodium par spectrophotométrie de flamme.....	86
2.8.3 Dosage du phosphore par la méthode de vert de Malachite.....	86
2.9 Analyses RT-qPCR	86
2.9.1 Extraction des ARNs.....	86
2.9.2 Traitement à la DNase et vérification des ARNs	87
2.9.3 Synthèse des ADNc : <i>Reverse Transcription</i>	87
2.9.4 qPCR	88
2.10 Analyses électrophysiologiques : expression hétérologue en ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>.....	89
2.10.1 Synthèse d'ARNc.....	89
2.10.2 Récupération des ovocytes et injection des ARNc	90
2.10.3 Voltage-clamp à deux électrodes	91
2.11 Analyses phylogénétiques	92

Chapitre III - Analyse de systèmes de transport d'*Hebeloma cylindrosporum* potentiellement impliqués dans la nutrition potassique ectomycorhize-dépendante de *Pinus pinaster* 95

3.1 Localisation et rôle du transporteur *HcTrk1* dans la symbiose ectomycorhizienne.. 95

3.1.1 Brève introduction sur les transporteurs de type Trk des *Fungi* 96

3.1.2 Manuscrit d'article présentant la localisation et le rôle du transporteur *HcTrk1* d'*Hebeloma cylindrosporum* dans la nutrition potassique et l'homéostasie du phosphore de la plante hôte *Pinus pinaster* 98

3.1.3 Résultats complémentaires – Stratégie RNAi pour étudier le rôle du transporteur *HcTrk1* 135

3.1.3.1 Production de lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporum*..... 135

3.1.3.2 Analyse phénotypique des lignées RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9 136

3.1.3.3 Impact de la sous-expression de *HcTrk1* sur l'expression des autres systèmes de transport de potassium et du transporteur de phosphate *HcPT1.1* 138

3.1.3.4 Mycorhization de *Pinus pinaster* par des lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporum*..... 141

3.2 Rôle du canal potassique *HcSKC* dans le transfert du potassium du champignon à la plante hôte 144

3.2.1 Brève introduction sur les canaux potassiques des *Fungi*..... 144

3.2.2 Analyse phylogénétique des canaux de type Shaker-like chez les *Fungi*..... 146

3.2.3 Localisation des transcrits et des protéines de *HcSKC* dans l'ectomycorhize 148

3.2.4 Production et analyse phénotypique de lignées RNAi-SKC..... 150

3.2.5 Mycorhization de *Pinus pinaster* par des lignées RNAi-SKC d'*Hebeloma cylindrosporum*..... 153

3.3 Caractérisation fonctionnelle du transporteur *HcTrk2* en ovocytes de *Xenopus laevis*..... 155

Chapitre IV - Analyse de transporteurs d'*Hebeloma cylindrosporum* potentiellement impliqués dans la nutrition phosphatée ectomycorhize-dépendante de *Pinus pinaster* 159

4.1 Brève introduction sur les transporteurs de Pi des *Fungi*..... 159

4.2 Localisation des transporteurs *HcPT1.1* et *HcPT2* dans l'ectomycorhize 160

4.2.1 Manuscrit d'article présentant l'importance de la région promotrice du transporteur <i>HcPT1.1</i> d' <i>Hebeloma cylindrosporium</i> dans la réponse à la carence en phosphate inorganique, et sa localisation dans l'ectomycorhize.....	162
4.2.2 Analyse du promoteur de <i>HcPT1.1</i>	178
4.2.3 Localisation de <i>HcPT2</i> dans l'ectomycorhize	180
4.3 Rôle de <i>HcPT1.1</i> et <i>HcPT2</i> dans la nutrition phosphatée végétale ectomycorhize-dépendante	182
4.3.1 Production de lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2 d' <i>Hebeloma cylindrosporium</i> ...	182
4.3.2 Analyse phénotypique préliminaire des lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2.....	183
Chapitre V - Discussion générale et perspectives.....	187
5.1 Bilan général	187
5.1.1 Implication de <i>HcTrk1</i> et <i>HcSKC</i> dans le transfert de potassium d' <i>Hebeloma cylindrosporium</i> à <i>Pinus pinaster</i>	187
5.1.2 Implication de <i>HcPT1.1</i> et <i>HcPT2</i> dans le transfert de phosphore d' <i>Hebeloma cylindrosporium</i> à <i>Pinus pinaster</i>	190
5.1.3 Interaction entre le potassium et le phosphore dans la symbiose ectomycorhizienne	191
5.2 De l'analyse génomique à l'identification de systèmes de transport de K⁺ et de P chez <i>Hebeloma cylindrosporium</i>	192
5.2.1 Vers la caractérisation fonctionnelle de nouveaux systèmes de transport de potassium.....	193
5.2.1.1 Les transporteurs <i>HcTrk2</i> et <i>HcHAK</i>	193
5.2.1.2 Les canaux <i>HcTOK1</i> , <i>HcTOK2.1</i> et <i>HcTOK2.2</i>	194
5.2.2 Vers l'analyse des transporteurs de phosphore <i>HcPT1.2</i> , <i>HcSMT1</i> et <i>HcPTc</i>	195
5.3 Intégration du transportome ectomycorhizien dans l'adaptation des plantes aux stress environnementaux	197
Bibliographie	201
Annexes	215
Annexe 1: Rapport de congrès	215
Annexe 2: Article de revue	221
Annexe 3: Agrotransformation de <i>Laccaria bicolor</i> S238N.....	253
Annexe 4: Milieux de cultures utilisés pour l'Agrotransformation.....	257

Chapitre I - Introduction

La symbiose mycorhizienne se définit comme une association mutualiste à bénéfices réciproques permettant principalement l'échange d'eau, de nutriments et de microéléments entre la plupart des plantes supérieures et des champignons du sol (Selosse, 2000; Smith & Read, 2008). De par sa considérable représentativité dans les écosystèmes terrestres (environ 80% des végétaux sont mycorhizés) et son utilisation dans la gestion des cultures, la compréhension des mécanismes régissant la mise en place et la pérennité de cette symbiose est cruciale tant sur le plan écologique qu'économique (Martinez-Garcia *et al.*, 2013, présenté en Annexe 1). Ce manuscrit de thèse aborde l'étude d'une infime partie de ce vaste monde sous-terrain, la symbiose ectomycorhizienne. Ainsi, les travaux présentés s'intéressent au couple symbiotique formé par la plante hôte *Pinus pinaster*, le pin maritime, et le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*.

1.1 Les différents types d'associations mycorhiziennes

Sous le terme "symbiose mycorhizienne" se regroupent en réalité plusieurs types d'associations symbiotiques se différenciant d'un point de vue écologique, morphologique et physiologique. La figure 1 présente les cinq principaux types de symbioses mycorhiziennes connus, à savoir les endomycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes, et les endomycorhizes à pelotons des *Ericaceae* et des *Orchidaceae*. Deux associations supplémentaires ectendo-types existent mais ne sont pas représentées en figure 1. Il s'agit des mycorhizes arbutoïdes et monotroïdes.

La plus importante d'un point de vue écologique et économique est la symbiose endomycorhizienne à arbuscules. En effet, parmi les 65% des plantes terrestres qui forment ce type d'association (Wang & Qiu, 2006; Bücking *et al.*, 2012), beaucoup sont des plantes d'intérêt agronomique telles que le riz (Maiti *et al.*, 2011), le maïs (Paszkowski *et al.*, 2006), ou encore la vigne (Balestrini *et al.*, 2010). Cette symbiose se caractérise par la formation d'organes nouveaux à l'intérieur des cellules corticales de la plante hôte. Les hyphes traversent la paroi mais pas la membrane des cellules végétales qui est alors invaginée. Ces nouveaux organes nommés arbuscules constituent la zone d'échange entre les deux partenaires. De plus, certains champignons forment des vésicules de stockage à l'intérieur des cellules du cortex de l'hôte. Les champignons responsables de cette association appartiennent au phylum des *Glomeromycota*, l'espèce modèle la plus étudiée étant *Rhizophagus irregularis*. Cette espèce fongique possède un large spectre d'hôtes, dont les légumineuses

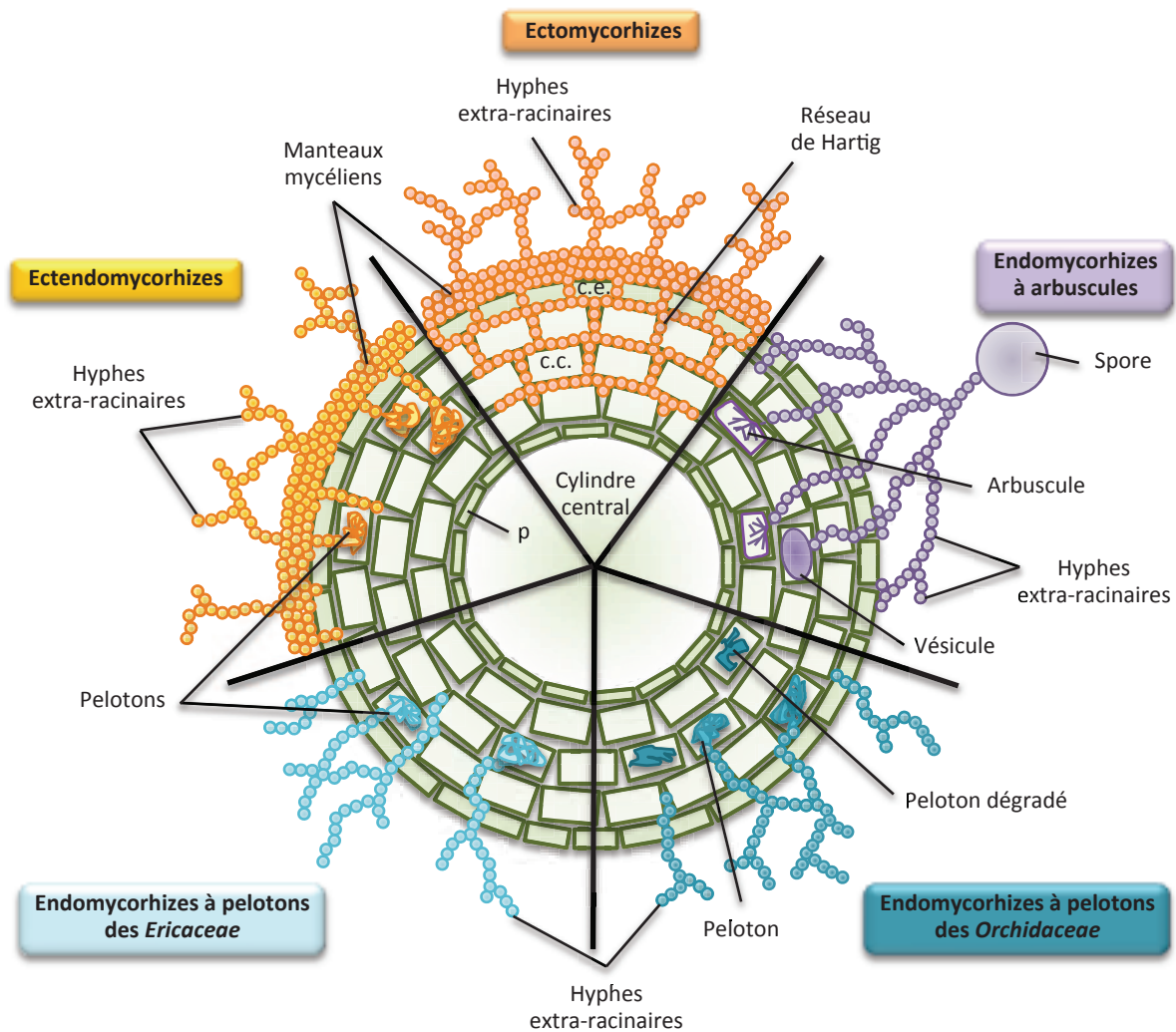


Figure 1: Schéma d'une coupe transversale de racine montrant les principaux types de mycorhizes.

Les ectomycorhizes (orange) sont caractérisées par des hyphes entourant les cellules corticales de la racine pour former le réseau de Hartig (zone d'échange) et d'un manteau mycélien entourant la racine. Les champignons endomycorhiziens à arbuscules (violet) pénètrent dans des cellules épidermiques et corticales en traversant la paroi cellulaire sans franchir la membrane plasmique afin de former des arbuscules (zone d'échange) et parfois des vésicules selon le champignon considéré (zone de stockage). Les ectendomycorhizes (jaune) pénètrent les cellules corticales de la plante pour former des pelotons (zone d'échange) et entourent la racine d'un manteau mycélien. Les endomycorhizes des *Ericaceae* (bleu clair) et des *Orchidaceae* (bleu foncé) forment des pelotons. Ces derniers sont lysés en vieillissant (peloton dégradé). Chez tous les types de mycorhizes, des hyphes extra-racinaires explorent le sol et permettent la récupération de nutriments. c.e.: cellule épidermique; c.c.: cellule corticale; p: péricycle entourant le cylindre central de la racine qui contient les tissus vasculaires. Redessiné d'après LeTacon (1985).

modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*. Ainsi, de nombreuses équipes de recherche travaillent actuellement sur les acteurs moléculaires responsables de la mise en place de cette symbiose (Venkateshwaran *et al.*, 2013), et sur son utilisation en agriculture afin de limiter la quantité d'intrants et d'augmenter la productivité des cultures (Verbruggen *et al.*, 2013). Un trait caractéristique de ces organismes fongiques est qu'il leur est impossible de survivre au-delà de quelques jours après germination s'ils ne rencontrent pas d'hôte. Cette symbiose est donc obligatoire pour eux.

La deuxième symbiose mycorhizienne la plus étudiée est la symbiose ectomycorhizienne. Les organismes fongiques formant des ectomycorhizes appartiennent au phylum des *Basidiomycota* ou des *Ascomycota*. Ils entourent la racine pour former le manteau mycélien. Ce manteau, dont la fonction est encore mal comprise, est considéré comme une zone tampon entre les hyphes extra- et intra-racinaires où les nutriments échangés transitent avant d'être transférés (Bücking *et al.*, 2002). Contrairement aux symbioses endomycorhiziennes, les hyphes à l'intérieur de la racine entourent les cellules corticales sans jamais les pénétrer, et forment le réseau de Hartig. Ce dernier est la zone d'échange entre les deux organismes. Par ailleurs, les champignons ectomycorhiziens sont capables de croître sans la présence de la plante, mais l'association symbiotique avec cette dernière s'avère nécessaire pour terminer leur cycle biologique. La description de la symbiose ectomycorhizienne sera plus amplement développée dans la suite de ce manuscrit.

Les symbioses mycorhiziennes ectendo-types regroupent en réalité trois types d'associations moins représentées dans la nature (Smith & Read, 2008). Ce sont les ectendomycorhizes présentés en figure 1, les mycorhizes arbutoïdes et les mycorhizes monotropoïdes s'associant respectivement avec des arbres forestiers, des plantes de la famille des *Ericaceae* et des plantes non chlorophylliennes. Toutes trois sont caractérisées par la présence d'un manteau mycélien entourant la racine et de pelotons d'hyphes se formant dans les cellules de l'hôte pour permettre les échanges de nutriments. Ces hyphes intra-cellulaires colonisent les cellules corticales dans le cas de la symbiose ectendomycorhizienne, ou les cellules épidermiques dans le cas des mycorhizes arbutoïdes. De façon intéressante, un même champignon peut être capable de former plusieurs types d'ectendomycorhizes ainsi que des ectomycorhizes en fonction des plantes hôtes rencontrées.

Enfin, deux autres types d'associations mycorhiziennes forment des pelotons dans les cellules de l'hôte. Ce sont les endomycorhizes caractéristiques des *Ericaceae* (ou mycorhizes éricoïdes) et des *Orchidaceae* (Figure 1). En comparaison avec les symbioses précédemment décrites, ces associations symbiotiques sont encore très mal connues.

1.2 La symbiose ectomycorhizienne

1.2.1 Origines de la symbiose ectomycorhizienne

On estime que le nombre d'espèces appartenant au règne des *Fungi* est compris entre 530 000 et 1,1 millions, et que les champignons macroscopiques représentent 10 % de cette estimation (Mueller *et al.*, 2007). Quant au nombre d'espèces de champignons ectomycorhiziens, on l'estime entre 20 000 et 25 000 (Rinaldi *et al.*, 2008). Les origines de la symbiose ectomycorhizienne sont très incertaines. Contrairement aux endomycorhizes à arbuscules qui seraient apparues une seule fois et aurait évolué depuis 500 millions d'années (Corradi & Bonfante *et al.*, 2012), la symbiose ectomycorhizienne serait apparue et aurait persisté au moins 66 fois au cours de l'évolution (Tedersoo *et al.*, 2010). En effet, des reconstructions phylogénétiques basées sur six marqueurs moléculaires différents ont permis de constater que le "caractère ectomycorhizien" serait apparu au moins 11 fois dans l'ordre des *Agaricales* (Matheny *et al.*, 2006). Concernant la date de l'apparition de la symbiose ectomycorhizienne, les deux plus vieux fossiles d'ectomycorhizes découverts datent respectivement de 50 (fossile d'ectomycorhize de gymnosperme: LePage *et al.*, 1997) et 52 millions d'années (fossile d'ectomycorhize d'angiosperme: Beimforde *et al.*, 2011) (Figure 2a,b). Or, le plus vieux fossile de pin découvert remonte à environ 145 millions d'années (LePage *et al.*, 2003) et le plus vieux fossile de *Basidiomycota* est daté d'environ 300 millions d'années (Dennis RL, 1970). On peut donc imaginer que l'émergence de la symbiose ectomycorhizienne puisse coïncider avec l'apparition des premiers conifères, soit aux alentours de -150 millions d'années.

On suppose depuis plusieurs années que les champignons ectomycorhiziens dérivent de champignons saprophytes (Hibbett *et al.*, 2000). De récentes données laissent penser que cette évolution se serait faite par une diminution progressive du nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation des molécules du bois telles que les CAZymes (carbohydre active enzymes) pour la cellulose ou encore les PODs (péroxydases de classe II) pour la lignine (Floudas *et al.*, 2012). Cette évolution aurait alors conduit à l'apparition des pourritures brunes à partir des pourritures blanches, et des symbiontes ectomycorhiziens à partir des pourritures brunes (Figure 2c). La comparaison des génomes a également permis de constater une augmentation du nombre de gènes codant pour des systèmes de transport chez les organismes ectomycorhiziennes par rapport aux espèces saprophytes (F. Martin, communication personnelle). Par des analyses phylogénétiques, Hibbett *et al.* (2000) ont également démontré une certaine instabilité de la symbiose ectomycorhizienne qui a pu

conduire à une perte du caractère symbiotique chez certains champignons. Cette capacité de "retour" à la vie saprophyte est cependant fortement discutée (Bruns & Shefferson, 2004), notamment pour des espèces appartenant au genre *Amanita* (Wolfe *et al.*, 2012).

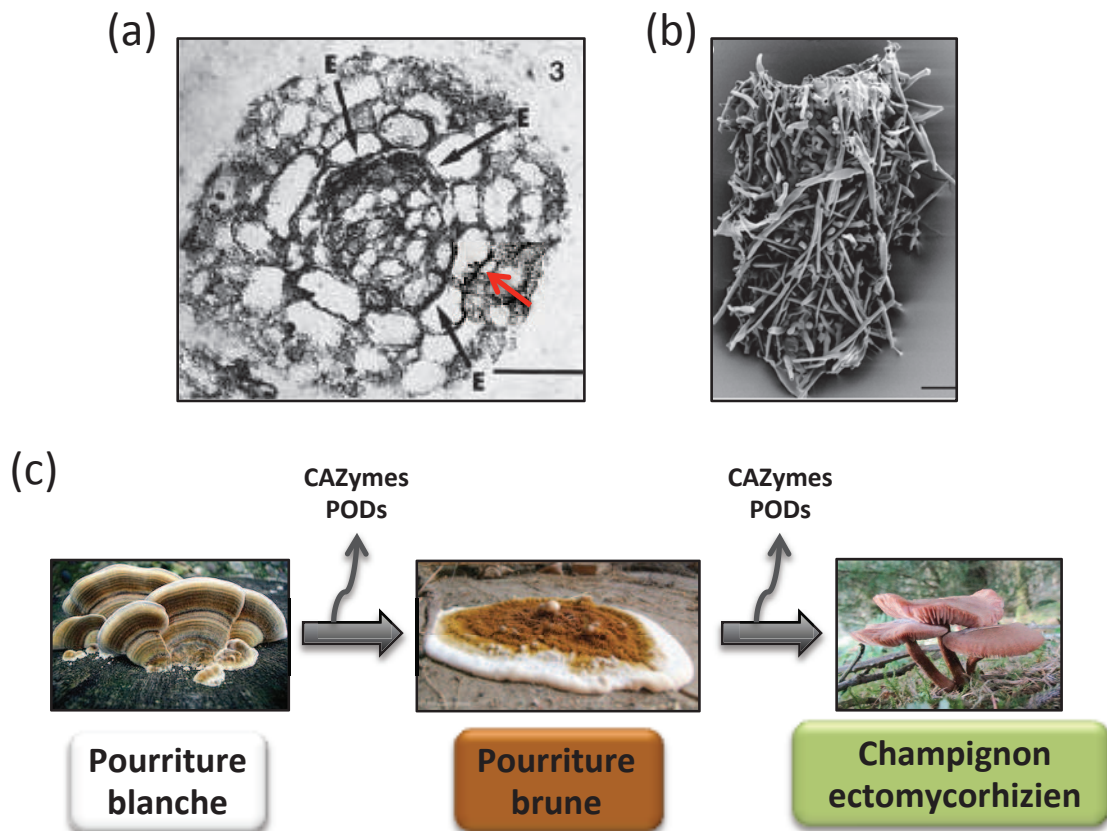


Figure 2: Origines de la symbiose ectomycorhizienne.

(a) Fossile d'ectomycorhize de gymnosperme âgé de 50 millions d'années. Le réseau de Hartig est clairement présent (flèche rouge). D'après LePage *et al.* (1997). (b) Fossile du manteau mycélien d'ectomycorhize d'angiosperme âgé de 52 millions d'années. D'après Beimforde *et al.* (2011). (c) Exemple de schéma évolutif représentant l'apparition des ectomycorhizes. La perte progressive de gènes impliqués dans la dégradation du bois (CAZymes et PODs) a conduit à l'apparition des pourritures brunes à partir des pourritures blanches, et des champignons ectomycorhiziens à partir des pourritures brunes. La pourriture blanche: *Trametes versicolor*; la pourriture brune: *Serpula lacrymans*; le champignon ectomycorhizien: *Laccaria bicolor*.

1.2.2 Rôle écologique de la symbiose ectomycorhizienne

La symbiose ectomycorhizienne a une action majeure sur l'amélioration de la nutrition hydrominérale des plantes. On estime que seulement 3 à 5 % des plantes terrestres, essentiellement des plantes ligneuses, sont capables de former des ectomycorhizes (Smith & Read, 2008). Cependant, ce faible pourcentage reflète mal l'importance écologique de cette association car elle est clairement majoritaire dans les écosystèmes forestiers où elle participe activement à la séquestration du carbone et à la nutrition minérale des plantes (Clemmensen *et al.*, 2013). De plus, on estime que 95 % des racines d'arbres sont ectomycorhizées dans les forêts tempérées et boréales. En outre, aucun individu appartenant à la famille des *Pinaceae* dépourvu de symbionte ectomycorhizien n'a été décrit dans la nature (Kendrick, 1991). L'amélioration de la récupération des nutriments chez une plante mycorhizée s'explique principalement par l'augmentation considérable du volume d'exploration du sol grâce au mycélium de ses symbiontes. Ainsi, l'abondance et la finesse des hyphes leur permettent une absorption des solutés 60 fois supérieure aux plus fines racines des plantes ligneuses (Simard *et al.*, 2002). En plus de l'exploration d'un grand volume de sol, les champignons ectomycorhiziens sont capables de dégrader les minéraux du sol afin de les rendre disponibles pour la plante. Il est ainsi décrit que les champignons ectomycorhiziens sécrètent des ions oxalates, qui sont considérés comme l'élément clef de la dégradation des minéraux (Landeweert *et al.*, 2001; Rineau & Garbaye, 2010). Il est possible que des laccases interviennent également dans ces mécanismes. L'observation d'une forte activité sécrétrice de laccases dans le sol a ainsi été faite chez le champignon *Lactarius subdulcis* (Rineau & Garbaye, 2009; Rineau *et al.*, 2010). Par ailleurs, des analyses spectroscopiques et transcriptomiques ont aussi permis de montrer que le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* dégrade la matière organique par un mécanisme utilisé par les pourritures brunes, la réaction de Fenton (Rineau *et al.*, 2012). Concernant le champignon étudié au cours de ce travail, *Hebeloma cylindrosporum*, la sécrétion de phosphatases acides nécessaires à l'hydrolyse du phosphore organique a été détectée par chromatographie à échange d'ions (Louche *et al.*, 2010).

En plus de ces apports nutritifs, il a été décrit que les champignons ectomycorhiziens participent à la résistance des plantes à des stress environnementaux biotiques ou abiotiques. Par exemple, Chakravarty & Hwang (1991) ont montré que le champignon *Laccaria laccata* diminue fortement la croissance du pathogène *Fusarium oxysporum*, protégeant ainsi la plante hôte *Pinus banksiana*. Les champignons étant de grands sur-accumulateurs de composés

toxiques, il a aussi été décrit que la mycorhization permet de protéger les plantes des métaux lourds dans des sols forestiers pollués (Colpaert & van Assche, 1993; Jentschke & Godbold, 2000).

Au vu de ce bref constat montrant l'importance de la symbiose ectomycorhizienne dans les écosystèmes forestiers, il s'avère crucial de disséquer les mécanismes moléculaires qui interviennent dans son établissement et dans les échanges nutritifs entre les différents protagonistes.

1.2.3 Symbiose ectomycorhizienne: du dialogue à la relation durable

1.2.3.1 Dialogue moléculaire entre plantes et champignons ectomycorhiziens

Beaucoup d'avancées ont été réalisées ces dix dernières années dans la description du dialogue moléculaire aboutissant à l'établissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscule (Venkateshwaran *et al.*, 2013). En revanche, beaucoup moins de données sont disponibles chez les ligneux. Ceci est dû notamment à la difficulté d'obtention de plantes ligneuses transgéniques permettant des stratégies de génétique inverse. Cependant, des projets actuels tendent à combler cette lacune (J.M. Ané, communication personnelle).

Chez la symbiose endomycorhizienne, les deux premières étapes clés du dialogue moléculaire font intervenir la synthèse de strigolactones par la plante, et de molécules Myc-LCO par le symbionte. Les strigolactones vont permettre la germination des spores et la ramification des hyphes des champignons endomycorhiziens (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006), tandis que les Myc-LCO vont être captés par la plante et être à l'origine d'une cascade de transduction aboutissant à l'entrée en symbiose (Gough & Cullimore, 2011; Maillet *et al.*, 2011). L'action des strigolactones sur la germination de spores et sur la ramification hyphale du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*, ainsi que la production de Myc-LCO par ce même organisme ont été investiguées sans succès (G. Gay, communication personnelle). Ceci n'est guère surprenant car comme nous l'avons vu précédemment, ces deux types d'associations ont une origine évolutive différente et font intervenir des partenaires fongiques phylogénétiquement éloignés.

L'obtention du génome et du transcriptome de *Laccaria bicolor* a cependant permis de réaliser quelques progrès sur le décryptage du dialogue moléculaire au cours de l'ectomycorhization. Ainsi, une petite protéine fongique (MiSSP7) dont l'expression est fortement induite en condition symbiotique avec le peuplier, a été identifiée (Figure 3; Martin *et al.*, 2008). Des travaux récents sur cette protéine ont montré qu'elle était excrétée par

L. bicolor puis intégrée par la plante hôte par endocytose avant de migrer jusqu'aux noyaux des cellules corticales de la racine (Plett *et al.*, 2011). Cette protéine altère ensuite la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la mise en place de l'architecture racinaires et dans le remodelage de la paroi cellulaire. De plus, la production de lignées transgéniques de *L. bicolor* dont l'expression de MiSSP7 est diminuée a permis de démontrer son rôle dans la mise en place de l'ectomycorhize chez le peuplier. En effet, ces lignées transgéniques présentent un défaut de mycorhization. On peut donc penser que MiSSP7 stimule l'expression de gènes conduisant à une fragilisation de la paroi végétale pour permettre la pénétration des hyphes entre les cellules corticales.

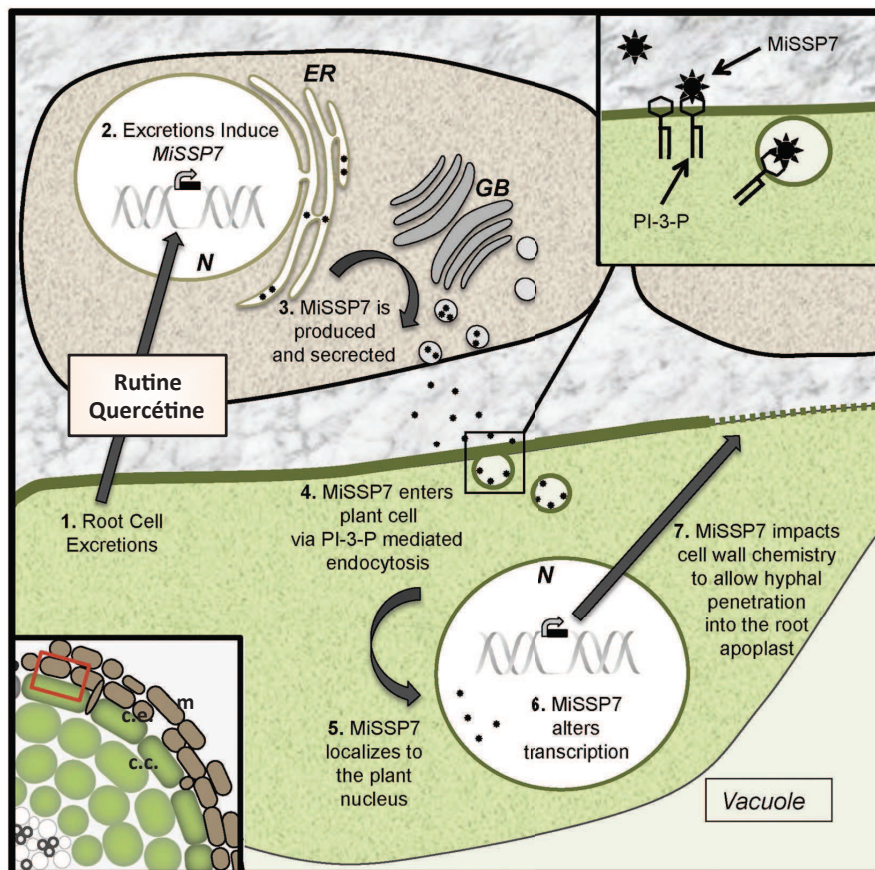


Figure 3: Schéma représentant le rôle de la protéine MiSSP7 dans la formation des ectomycorhizes entre *Laccaria bicolor* et le peuplier.

La sécrétion de rutine et de quercétine (1.) du partenaire végétal entraîne l'expression de la protéine fongique MiSSP7 (2., Plett & Martin, 2012) qui va être sécrétée (3.), captée par des récepteurs de la plante pour être endocytée (4.) puis envoyée au noyau de la cellule (5.) afin d'altérer la transcription de gènes (6.) impliqués dans l'architecture racinaire et la formation de la paroi végétale (7.). c.e.: cellule épidermique; c.c.: cellule corticale; m: manteau mycélien entourant la racine. Adapté de l'abstract graphique de Plett *et al.* (2011).

De plus, les auteurs ont démontré que son excrétion était dépendante de la présence de la plante, qu'elle soit un hôte (le peuplier) ou non (*Arabidopsis thaliana*), laissant supposer la sécrétion de molécules signales captées par le champignon. Certaines d'entre elles ont par la suite été identifiées. Il s'agit de deux flavonoïdes, la rutine et la quercétine, présent dans les exsudats racinaires du peuplier (Plett & Martin, 2012). D'autres protéines de type MiSSP de *L. bicolor* sont actuellement en cours d'étude, ce qui va permettre d'avoir une vue d'ensemble du rôle de ces effecteurs dans l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (C. Fourrey, communication personnelle). Ainsi, la description de ce début de dialogue entre un champignon ectomycorhizien et une plante ligneuse est très prometteuse dans l'élucidation des processus moléculaires responsable de l'entrée en phase symbiotique.

1.2.3.2 Echanges nutritionnels : la base d'un couple qui dure

Dans ce paragraphe, les échanges nutritionnels ne seront abordés que très succinctement. Le but ici est de montrer un bref aperçu des connaissances actuelles sur le transfert de solutés d'un organisme à l'autre, et de faire ressortir son importance dans la durabilité de la symbiose, sans entrer dans les détails. Une vision plus détaillée, notamment sur le transportome impliqué, est décrite dans la revue de Casieri *et al.* (2013) présentée en Annexe 2.

L'association ectomycorhizienne améliore la nutrition des plantes ligneuses en leur permettant d'accéder à des ressources difficilement accessibles. Pour effectuer de tels transferts, des systèmes de transport doivent être exprimés de façon polarisée entre sites de prélèvement et sites de sécrétion. Les ressources récupérées sont essentiellement le phosphore et l'azote, d'un point de vue quantitatif. Mais d'autres éléments tels que le potassium ou le sulfate sont transférés à la plante (Figure 4). La nutrition azotée à travers le prélèvement d'azote, d'ammonium, de peptides et d'acides aminés par le champignon est largement expliquée dans les revues de Casieri *et al.* (2013; Annexe 2) et de Müller *et al.* (2007). Il en va de même pour la nutrition sulfatée, notamment avec les revues de Mansouri-Bauly *et al.* (2006) et de Casieri *et al.* (2013; Annexe 2). Pour ce qui est de l'implication de l'ectomycorhization dans la nutrition potassique et phosphorée de la plante ligneuse, elle sera plus amplement abordée dans les paragraphes 1.5 et 1.6, respectivement.

En retour, le champignon hétérotrophe vis-à-vis du carbone, récupère jusqu'à 20-25% des composés carbonés produits par la plante hôte lors de la photosynthèse (Lopez *et al.*, 2008). Il est communément accepté depuis plusieurs années que la plante libère dans

l'apoplasme du saccharose et des invertases permettant de le dégrader. Les hexoses libérés sont ensuite récupérés par le champignon (Figure 4). Or, des travaux récents ont permis de décrire chez le peuplier des transporteurs de types SWEET (Chen *et al.*, 2010) exprimés au cours de l'ectomycorhization (U. Nehls, ICOM7, 2013). L'identification de ces protéines perméables au glucose indique que cet hexose pourrait être directement relargué dans l'apoplasme, et donc que des invertases interviendraient directement dans les cellules végétales. A l'heure actuelle, on peut penser que ces deux mécanismes coexistent pour assurer la nutrition carbonée du champignon ectomycorhizien.

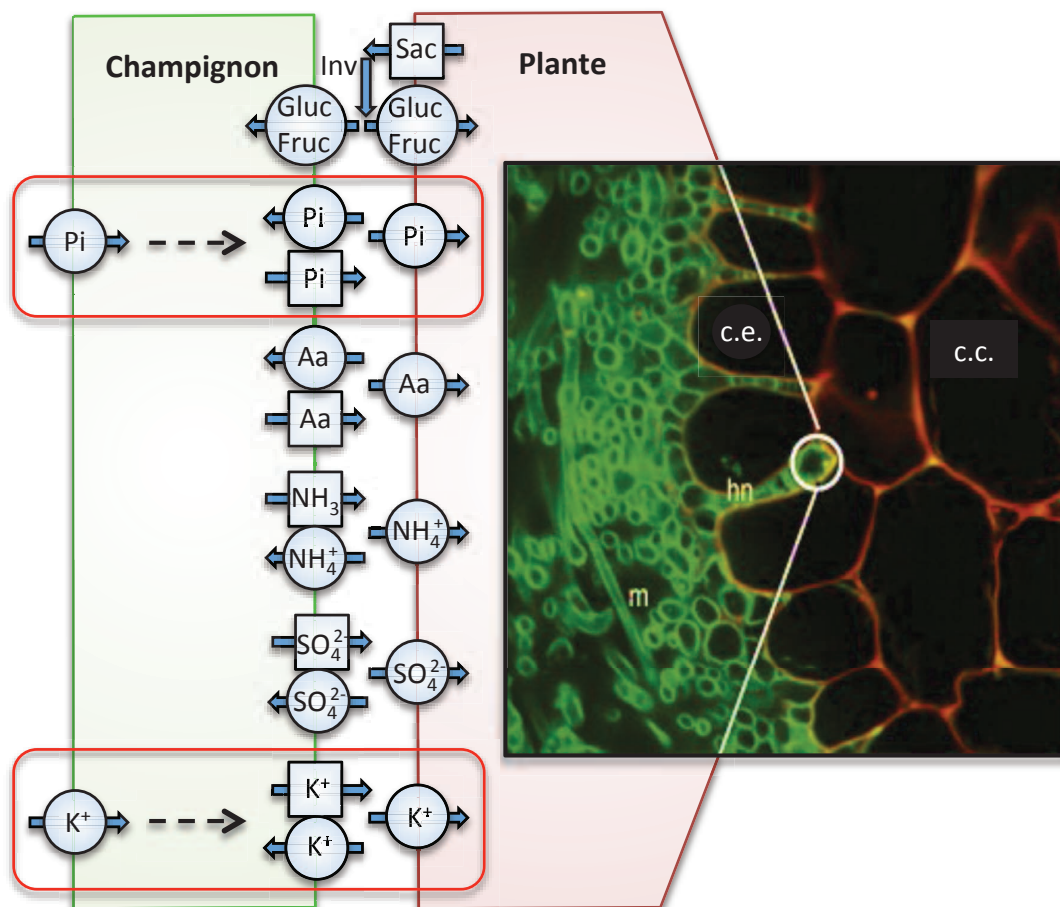


Figure 4: Schéma représentant les échanges de nutriments à l'interface plante-champignon de la symbiose ectomycorhizienne.

Les protéines d'import sont représentées par des carrés et les protéines d'export putatives par des cercles. Les flèches en pointillées représentent le flux de K⁺ et de Pi des hyphes extra-racinaires aux hyphes du réseau de Hartig. Les encadrés rouges indiquent les transports de nutriments (K⁺ et Pi) étudiés au cours de ce travail dans le cadre de l'ectomycorhization entre *Pinus pinaster* et *Hebeloma cylindrosporum*. Sac: saccharose; Gluc: glucose; Fruc: fructose; Inv: invertase; Pi: phosphate inorganique; Aa: acides aminés; NH₃: nitrate; NH₄⁺: ammonium; SO₄²⁻: sulfate; K⁺: potassium; c.e.: cellule épidermique; c.c.: cellule corticale; m: manteau mycélien entourant la racine; hn: réseau de Hartig. La photo est une coupe transversale d'ectomycorhize de *Populus trichocarpa* – *Laccaria bicolor*. Adapté de Martin & Nehls (2009).

De récents travaux sur la symbiose endomycorhizienne à arbuscules ont montré que la plante et le champignon étaient capables de discriminer les bons des mauvais partenaires sur la base de l'échange du carbone, du phosphore et de l'azote. Qui plus est, l'un et l'autre sont capables de "récompenser" les bons partenaires en leur fournissant plus de nutriments, au détriment des mauvais (Kiers *et al.*, 2011; Fellbaum *et al.*, 2012). Ainsi, il semble apparaître que les nutriments eux-mêmes seraient des éléments régulateurs importants de l'association endomycorhizienne, notamment le phosphate inorganique (Yang & Paszkowski, 2011). Cette hypothèse peut être corroborée par le fait qu'en présence d'une trop forte concentration en phosphate dans le milieu extérieur, la plante libère moins de strigolactones conduisant à une inhibition de l'endomycorhization (Balzergue *et al.*, 2011). Au vu de ce bref état de l'art, la question du rôle des échanges de solutés dans l'établissement et le maintien de la symbiose ectomycorhizienne à travers le choix de partenaires efficaces reste ouverte.

1.3 Le couple symbiotique *Hebeloma cylindrosporum* – *Pinus pinaster*

1.3.1 *Hebeloma cylindrosporum*: un modèle de champignon

Seuls quelques champignons capables de former des ectomycorhizes sont considérés comme des espèces modèles grâce à différents "atouts" tels que leur facilité de culture en laboratoire, leur transformation génétique ou encore le séquençage de leur génome et éventuellement de leur partenaire végétal. Ainsi, *L. bicolor* fut le premier *Basidiomycota* ectomycorhizien séquencé (Martin *et al.*, 2008) et *Tuber melanosporum* le premier *Ascomycota* (Martin *et al.*, 2010). Parmi ces champignons considérés comme des espèces modèles, *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi est utilisé depuis plusieurs années en laboratoire. Ce champignon septé appartient à l'embranchement des *Basidiomycota*, au sous-embranchement des *Agaricomycotina*, à l'ordre des *Agaricales* et à la famille des *Cortinariaceae* (Figure 5).

Son aire de répartition s'étend de la Finlande au sud de l'Espagne (Marmeisse *et al.*, 2004). En France, on le retrouve essentiellement au niveau de l'écosystème dunaire de la côte Atlantique où il est généralement associé à son hôte naturel, le pin maritime (*Pinus pinaster*), et est considéré comme une espèce pionnière (Gryta *et al.*, 1997). Il a cependant été montré que son spectre d'hôtes est beaucoup plus large. En effet, sur environ 70 espèces de pin testées, toutes sont capables de former des ectomycorhizes avec *H. cylindrosporum* (G. Gay, communication personnelle). De plus, son association symbiotique avec d'autres plantes ligneuses telles que le mélèze d'Amérique (*Larix laricina*; Wong & Fortin, 1989), *Dryas integrifolia* (Melville *et al.*, 1987), ou encore deux espèces de chênes (*Quercus serrata*

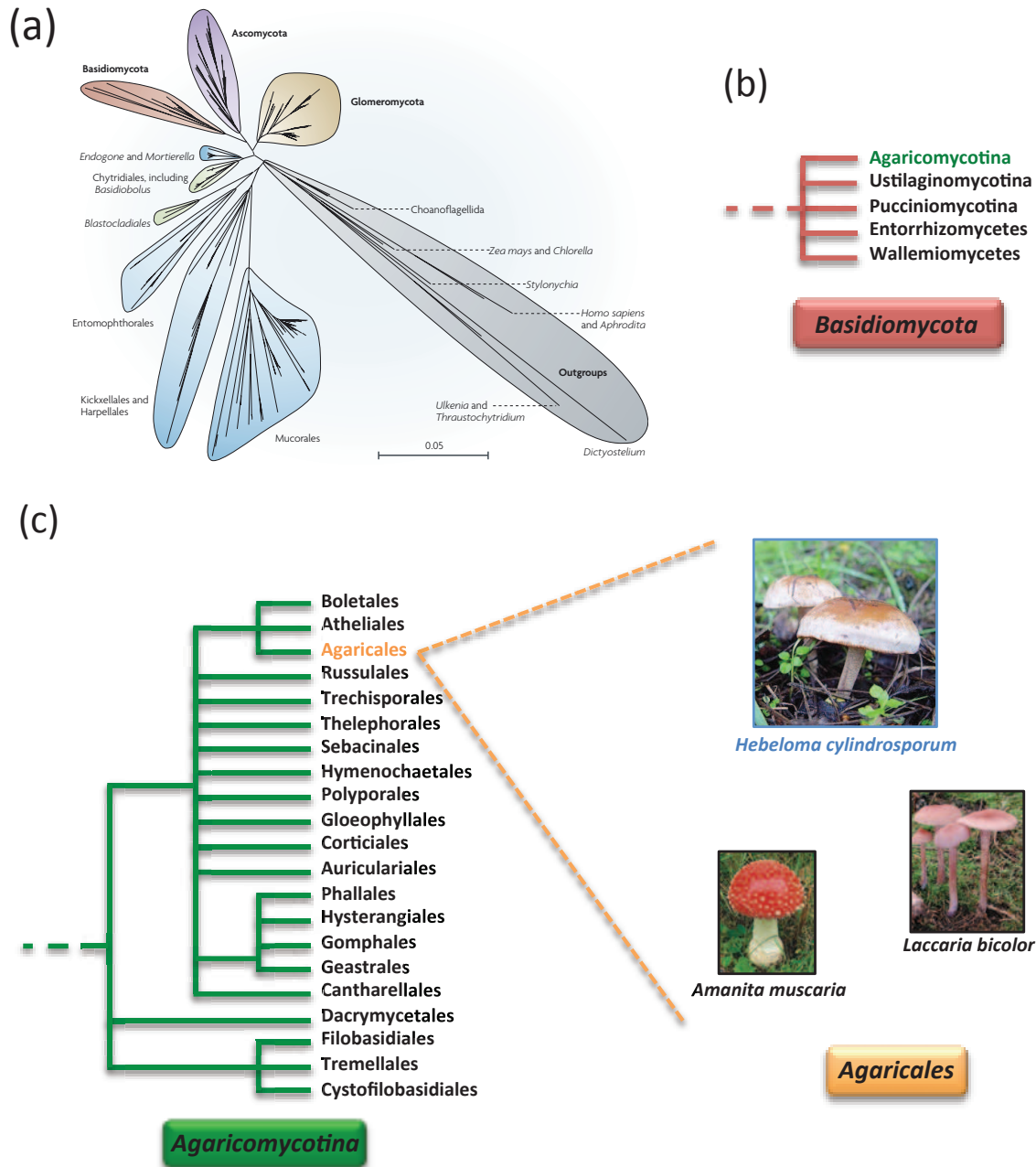


Figure 5: Localisation phylogénétique d'*Hebeloma cylindrosporum* dans le règne des *Fungi*.

(a) Arbre phylogénétique représentant les liens de parentés entre les principaux groupes du règne des *Fungi*. Les embranchements des *Basidiomycota* (rouge) et des *Ascomycota* (violet) contiennent des champignons ectomycorhiziens. L'embranchement des *Glomeromycota* (orange) contient des champignons endomycorhiziens à arbuscules. Parniske (2008). (b) L'embranchement des *Basidiomycota* contient cinq sous-embranchements, dont celui des *Agaricomycotina* qui est le plus important en terme de quantité d'espèces. Modifié d'après McLaughlin *et al.* (2009). (c) Le sous-embranchement des *Agaricomycotina* contient 21 ordres. *Hebeloma cylindrosporum* appartient à l'ordre des *Agaricales*. A noter également que d'autres champignons ectomycorhiziens modèles font partie de cet ordre, tels que *Laccaria bicolor* ou *Amanita muscaria*. Modifié d'après McLaughlin *et al.* (2009).

et *Quercus acutissima*; Oh *et al.*, 1995), ont également été décrites. Cette aptitude à mycorrhizer de nombreux hôtes traduit du caractère colonisateur et du rôle pionnier d'*H. cylindrosporum*.

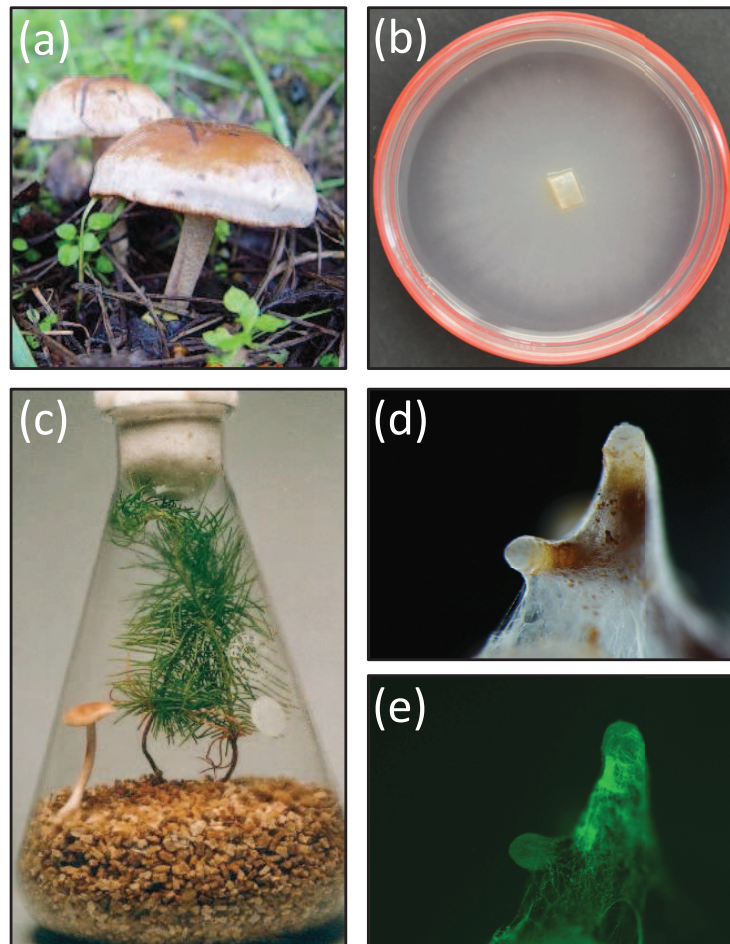


Figure 6: Le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi.

(a) Basidiocarpes d'une souche dicaryotique sauvage d'*H. cylindrosporum*. (b) Culture solide en laboratoire de la souche monocaryotique h7 d'*H. cylindrosporum* sur milieu nutritif gélosé. (c) Co-culture d'*H. cylindrosporum* et *Pinus pinaster* en erlenmeyer sur vermiculite, en conditions stériles de laboratoire. Son cycle de spore à spore peut donc être réalisé en laboratoire. © Gilles Gay, Université Claude Bernard à Lyon. (d,e) Ectomycorhize mature de *P. pinaster* produite en laboratoire avec une souche monocaryotique transgénique d'*H. cylindrosporum* exprimant constitutivement une protéine fluorescente (EGFP). Observations réalisées sous lumière blanche (d) ou avec un filtre EGFP (e).

H. cylindrosporum présente de nombreux avantages qui en font une espèce modèle à la fois pour l'étude du mode de vie des champignons ectomycorhiziens et pour la compréhension de la symbiose ectomycorhizienne. Tout d'abord, le choix de son utilisation en laboratoire a été fait car son cycle biologique de spore à spore est maîtrisé, permettant ainsi

des études génétiques de ce champignon (Debaud & Gay, 1987). Son cycle biologique est constitué de l'alternance d'une phase courte monocaryotique résultant de la germination des spores et d'une phase plus longue dicaryotique qui va aboutir à la formation des carpophores (Figure 6a). Etant donné que les souches mono- et dicaryotiques d'*H. cylindrosporium* sont capables de mycorhizer (Figure 6c,d), le choix de leur utilisation en laboratoire doit être étroitement lié à la question biologique sous-jacente. En effet, des travaux concernant des questions d'ordre écologique telles que l'étude sur l'implication d'*H. cylindrosporium* dans l'hydrolyse organique du phosphore contenu dans des sols, nécessite l'emploi de souches dicaryotiques car celles-ci sont majoritairement présentes dans les écosystèmes considérés (Louche *et al.*, 2010). En revanche, des questionnements portant sur des mécanismes moléculaires aboutissant à la formation des ectomycorhizes tels que l'analyse de lignées transgéniques incapables de mycorhizer correctement (Comber *et al.*, 2004), nécessitent l'utilisation de souches monocaryotiques qui sont plus facilement modifiables génétiquement (Figure 6b,e). En effet, la possibilité d'obtenir des transformants génétiques par l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Figure 6e) est un autre avantage important d'*H. cylindrosporium* (Comber *et al.*, 2003) qui est à la base de tout ce travail de doctorat. Enfin, des outils moléculaires globaux tels que les banques d'ADNg, d'ADNc et d'ESTs (Wipf *et al.*, 2003; Lambilliotte *et al.*, 2004), ainsi que le séquençage génomique (2011) et transcriptomique (en cours) ont été obtenus. Les données de séquençage du génome ne sont pas encore publiées mais sont tout de même accessibles à la communauté scientifique concernée (<http://genome.jgi.doe.gov/Hebcy2/Hebcy2.home.html>). Ceci nous a ainsi permis d'identifier de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans les échanges nutritifs étudiés au cours de ce travail (Cf 1.7).

1.3.2 *Pinus pinaster*: l'alliance de l'écologie et de l'économie

Comme cité précédemment, un des hôtes naturels d'*H. cylindrosporium* est le pin maritime ou pins des Landes, *Pinus pinaster* Ait (Figure 7a). Ce dernier, principalement présent en France dans la forêt des Landes (Figure 7b), se trouve dans des régions appauvries en nutriments à cause des embruns marins qui salinisent considérablement les sols (C. Plassard, communication personnelle). La récupération de nutriments qui lui sont difficilement accessibles nécessite donc la mise en place de stratégies telle que l'association ectomycorhizienne. Tout comme *H. cylindrosporium* est capable de coloniser plusieurs plantes hôtes, *P. pinaster* possède tout un cortège de symbiontes ectomycorhiziens. En effet, le pin

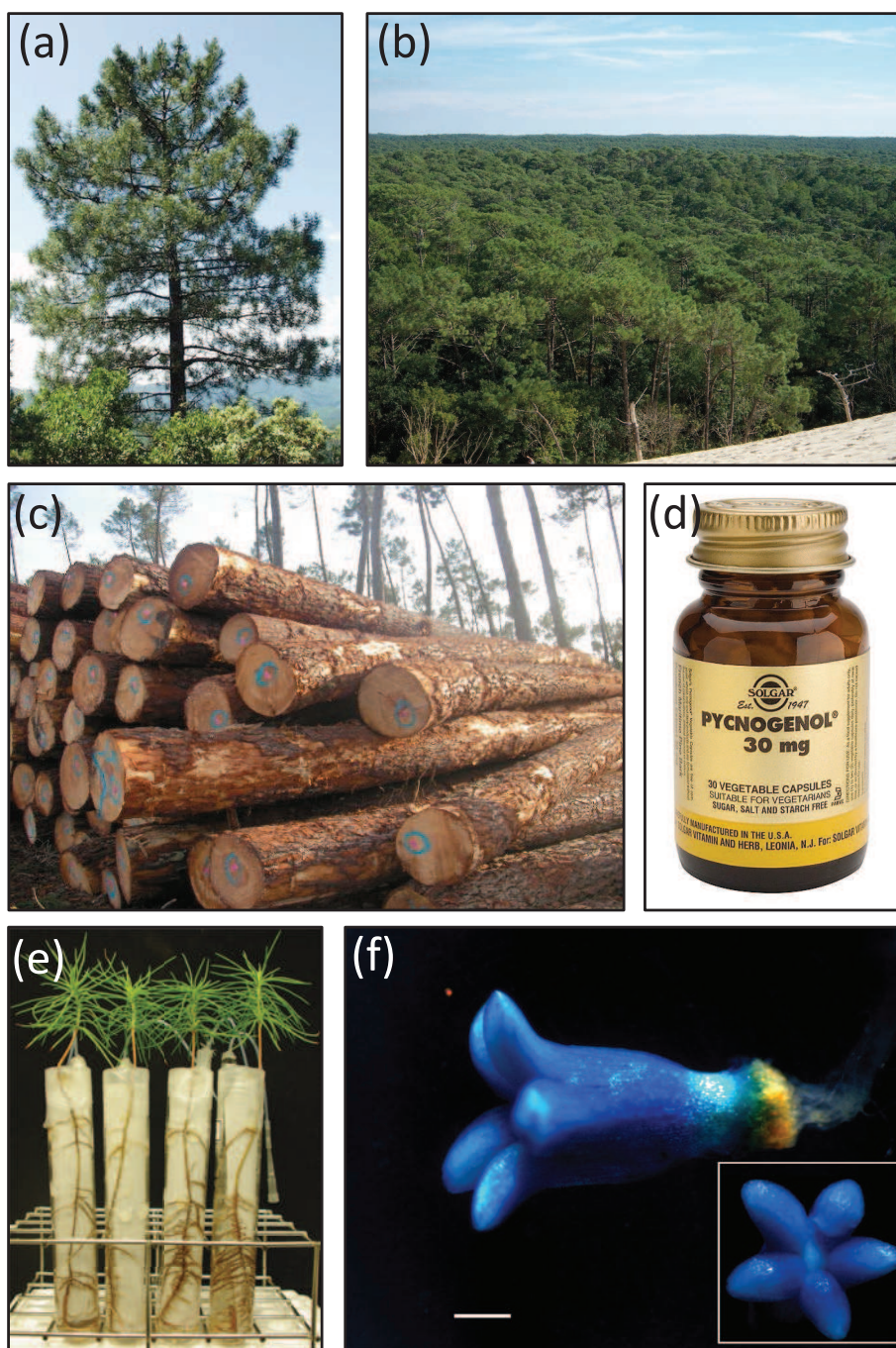


Figure 7: La plante hôte *Pinus pinaster* Ait.

(a) Individu de pin maritime. (b) Forêt des Landes (France) essentiellement boisée de pins maritimes. (c) Grumes (bois coupé mais encore recouvert de son écorce) de pin maritime. Le bois de pin maritime est très utilisé dans la confection de meubles, de bois de charpente ou encore de papier. (d) Pycnogenol® produit à partir de l'écorce de *P. pinaster* (<http://www.solgar.fr>). (e) Culture *in vitro* en tube de pins maritimes (deux mois) pour la production de mycorhizes avec *H. cylindrosporum*. Seule cette méthode de culture a été utilisée au cours de ce travail. (f) Embryon mature transgénique de *P. pinaster* exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS) sous contrôle du promoteur d'un régulateur de réponse de type A (*PipsRRI*) (Alvarez *et al.*, 2012).

maritime peut-être mycorhizé par *Pisolithus arhizus* (Lamhamedi *et al.*, 1990), *Rhizopogon spp.* (Gobert & Plassard, 2007; Ali *et al.*, 2009) ou encore *Tricholoma auratum* (Moukha *et al.*, 2013). De plus, des travaux récents ont montré que l'adaptation du pin maritime à des conditions variables de l'environnement (température et luminosité) est améliorée lorsque celui-ci est inoculé avec les souches fongiques *Lactarius deliciosus*, *Lactarius quieticolor*, *Pisolithus arhizus*, et *Suillus luteus* (Sanchez-Zabala *et al.*, 2013).

D'un point de vue économique, le pin maritime est une essence dont le bois est couramment utilisé dans la confection de meubles, de bois de charpente ou encore de papier (Figure 7c). Ainsi, des travaux portant sur l'identification des bases moléculaires de la formation de son bois (Paiva *et al.*, 2008) et de sa production en composés pariétaux tels que la lignine ou la cellulose (Villalobos *et al.*, 2012) ont été menés. En outre, le Pycnogenol[®] (Figure 7d) est utilisé depuis de nombreuses années comme complément alimentaire. C'est un produit parapharmaceutique composé de flavonoïdes et d'acides phénoliques issus de l'écorce de pin maritime ayant des propriétés anti-oxydatives (Devaraj *et al.*, 2002) et vasodilatatrices (Nishioka *et al.*, 2007). Ainsi, l'amélioration de la nutrition du pin maritime à travers la compréhension de son association symbiotique, notamment avec *H. cylindrosporum*, est un enjeu économique important.

Les avantages de l'utilisation de *Pinus pinaster* en laboratoire, sont d'une part son fort taux de germination (variable selon la saison, mais avoisinant en moyenne les 50 %), et d'autre part l'obtention rapide de plantules capables de mycorhizer (Figure 7e). Enfin, Alvarez *et al.* (2012) ont pour la première fois obtenu des lignées transgéniques afin de localiser l'expression d'un gène potentiellement impliqué dans la formation des méristèmes apicaux adventifs et de l'embryon du pin maritime (Figure 7f). L'obtention de cette biotechnologie ouvre la voie vers l'élaboration future de stratégies de génétique inverse permettant d'analyser l'importance de gènes candidats chez *P. pinaster*.

1.4 La base moléculaire du transport membranaire

Les échanges de solutés entre le cytoplasme des cellules et le milieu extérieur ou les différents organites se font par l'intermédiaire de protéines ancrées dans les membranes telles que les canaux et les transporteurs (Figure 8). Ces systèmes de transport permettent un passage plus ou moins sélectif et finement contrôlé des ions afin d'ajuster les concentrations intracellulaires en fonction des besoins de la cellule ou de l'organite. En plus de ces protéines de transport, des pompes à protons sont exprimées et permettent l'énergisation de la membrane plasmique,

facilitant ainsi le transport d'ions via les canaux ou les transporteurs. En général ces systèmes de transport sont conservés chez les animaux, les plantes, ou les champignons, mais il existe également des familles plus spécifiques.

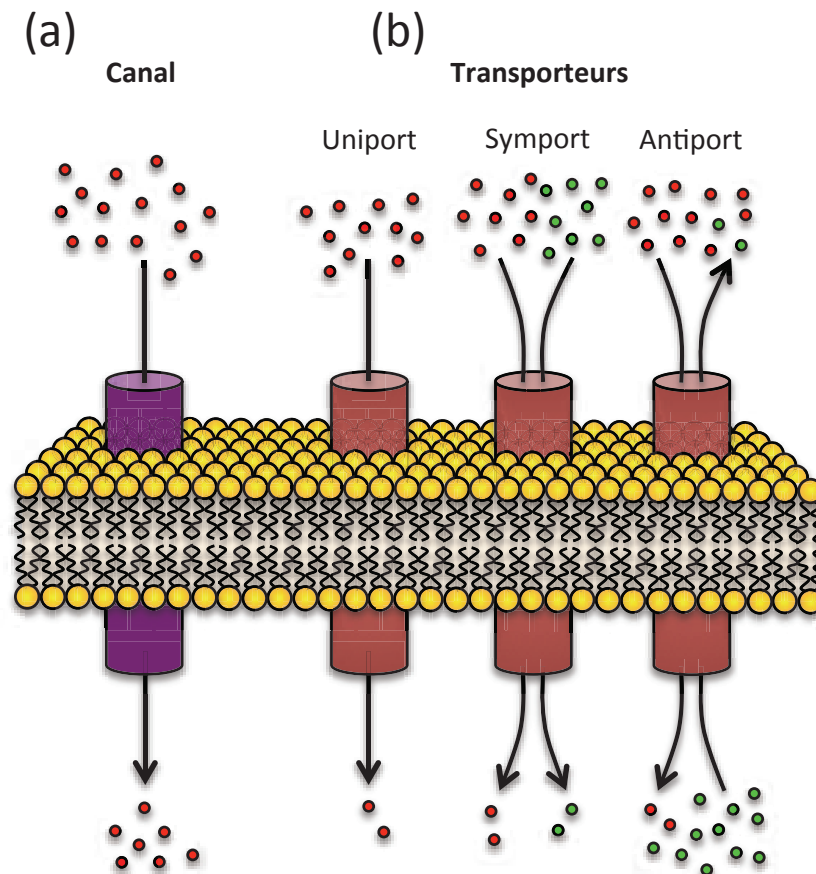


Figure 8: Représentation schématique du transport de solutés à travers les canaux et les transporteurs.

(a) Les canaux sont des systèmes de transport passifs dont l'activité est due à une modification du potentiel membranaire, de la fixation d'un ligand ou d'une variation de la tension membranaire. Le transport des ions se fait selon leur gradient électrochimique. (b) Les transporteurs permettent le transport d'un ion après une modification de leur conformation. Le transport d'un ion peut se faire dans le sens de son gradient électrochimique (uniport) ou non. Dans ce dernier cas, l'énergie nécessaire au transport est fournie par une autre espèce ionique. Ainsi, les symports et les antiports permettent le transport de deux types d'ions dans la même direction ou dans des directions opposées, respectivement. Redessiné d'après Jeanguenin (2008).

Les canaux (Figure 8a) transportent les ions selon leur gradient électrochimique. Ce sont donc des systèmes de transport passifs. Tous les canaux sont caractérisés par la présence d'un pore permettant le passage des solutés. L'ouverture de ce pore se fait grâce à l'action de

divers stimuli tels que la modification du potentiel membranaire (stimuli électriques), la fixation d'un ligand (stimuli chimiques) ou la modification physique de la membrane (stimuli mécaniques). Les canaux potassiques de types Shaker sont principalement régulés par le voltage et aussi par leur interaction avec d'autres types de protéines comme par exemple les sous-unités β (Torres *et al.*, 2007).

Le mode d'action des transporteurs (Figure 8b) est différent des canaux. En effet, un changement conformationnel est nécessaire pour permettre le passage des ions. Il existe trois types de transporteurs: les systèmes d'uniport, de symports et d'antiports. A l'instar des canaux, les systèmes d'uniport sont capables de transporter des solutés dans le sens de leur gradient électrochimiques. Le transport de molécule peut également se faire dans le sens opposé au gradient électrochimique de l'ion considéré. Un co-transport avec une autre espèce ionique suivant son gradient électrochimique est alors effectué pour fournir l'énergie nécessaire. Ces transporteurs sont appelés symports si les deux solutés se déplacent dans le même sens, et antiports s'ils se déplacent dans le sens opposé.

La présentation des différentes familles de systèmes de transport étudiés au cours de ce travail sera effectuée dans les chapitres III et IV.

1.5 Nutrition potassique mycorhize – dépendante: une revue

Comme indiqué précédemment, la symbiose ectomycorhizienne améliore la nutrition hydrominérale des plantes ligneuses. La plupart des études portant sur ces aspects nutritifs sont essentiellement focalisées sur l'amélioration de la nutrition phosphatée et azotée de la plante hôte. Cependant, la nutrition potassique est également affectée puisqu'on estime que 5 à 6 % du potassium total contenu dans les plantes ligneuses ectomycorhizées provient de leurs symbiontes fongiques (Jentschke et al., 2001).

Ainsi, un résumé de l'état de l'art abordant la contribution de la symbiose mycorhizienne à la nutrition potassique des végétaux est présenté ci-dessous dans un manuscrit de mini-revue. Bien que ces travaux de thèse portent uniquement sur la symbiose ectomycorhizienne, ce manuscrit s'appuie également sur la littérature ayant trait aux connaissances actuelles sur l'endomycorhization à arbuscules. Un schéma plaçant les systèmes de transport du potassium chez les champignons et chez les plantes formant des mycorhizes est aussi proposé. Enfin, les conséquences de l'amélioration de la nutrition potassique mycorhize-dépendante sur divers mécanismes biologiques sont présentées.

L'objectif visé est de soumettre cette mini-revue dans *Frontiers in Plant Science*, et plus particulièrement dans une édition spéciale soutenue par Daniel Wipf et Pierre-Emmanuel Courty. Le sujet de cette édition spéciale à paraître en 2014 sera "*Nutrient transport in plant microbe interactions*".

The disregarded mycorrhizal contribution to plant potassium nutrition

Kevin Garcia and Sabine Zimmermann

Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 5004 CNRS/INRA/SupAgro/UM2,
Campus INRA/SupAgro, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

Corresponding author: Sabine Zimmermann, mail: sabine.zimmermann@supagro.inra.fr

Tel: + 33 4 99 61 27 18 ; Fax: + 33 4 67 52 57 37

Abstract

Potassium (K^+) is one of the most abundant element of soil composition but its very low availability limits plant growth and productivity of ecosystems. Because this cation participates in many biological processes, its constitutive uptake from soil solution is crucial for the plant cell machinery. Thus, the understanding of strategies responsible of K^+ nutrition is a major issue in plant science. Mycorrhizal associations occurring between roots and hyphae of underground fungi improve hydro-mineral nutrition of the majority of terrestrial plants. The contribution of this mutualistic symbiosis to the enhancement of plant K^+ nutrition is still underestimated and poorly studied so far. This mini-review examines the current knowledge about the impact of both arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal symbioses on the transfer of K^+ from the soil to the plants. A model summarizing plant and fungal transport systems identified and hypothetically involved in K^+ transport is proposed. In addition, some data related to benefits for plants provided by the improvement of K^+ nutrition thanks to mycorrhizal symbioses are presented.

Keywords: Potassium, plant nutrition, arbuscular mycorrhizal symbiosis, ectomycorrhizal symbiosis, transport systems.

Introduction

Potassium (K^+) is one of the most important macronutrient for all organisms. In plants, K^+ represents 2 to 10 % of the dry biomass and its optimal cytoplasmic concentration for enzyme activities is around 100 to 200 mM (Leigh & Wyn Jones, 1984). This cation participates to various crucial processes such as plasma membrane polarization, growth, stomatal aperture or adaptation to environmental changes (for detailed reviews see Broadley & White, 2005; Wang & Wu, 2013). Thus, maintaining an elevated K^+ concentration in plant cells is vital for the smooth running of such physiological processes. Although K^+ ions are extremely abundant in soil, their availability is very low due to their strong mineral adsorption. Depending on soil type, the K^+ concentration in soil solution is approximately in the range of 0.1 to 1 mM (Asher & Ozanne, 1967). This weak offer combined to the constitutive demand of plants lead to the formation of depletion areas around root uptake sites (Drew & Nye, 1969). Consequently, plants needed to develop efficient strategies to improve the K^+ uptake from soil, such as the acquisition of several transport systems or the establishment of plant-microbe associations.

Mycorrhizal symbioses are mutualistic interactions between the root system of around 80% of land plants and the mycelium of various fungi (Wang and Qiu, 2006). Among all types of mycorrhizal associations, two of them are mainly studied due to their ecological importance. Indeed, arbuscular mycorrhizal (AM) and the ectomycorrhizal (ECM) fungi colonize the large majority of terrestrial plants and participate actively to their development (Smith and Read, 2008). The major role of these close relationships is to provide to the plants an improved access to nutrients, particularly when resources become scarce as in the depletion area around the roots. In turn, vegetal partners provide up to 20-25% of photosynthetic carbohydrates to their symbionts (Lopez *et al.*, 2008). The improvement of plant nutrition through mycorrhizal symbioses and the molecular bases of nutrient transfer are currently well studied for phosphorus (Javot *et al.*, 2007; Plassard and Dell, 2010) and nitrogen (Müller *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2012). However, only few data concern the mycorrhizal contribution to plant K^+ nutrition.

In this mini-review, we compiled and summarized the current knowledge concerning the involvement of AM and ECM symbioses in K^+ uptake of inoculated plants. Besides, an overview of transport systems acting putatively in transfer of K^+ from soil to the fungal cells, and from the fungi to the plant cells is proposed. Lastly, examples of benefits for the plant due to the improvement of K^+ acquisition by mycorrhizal associations are presented.

Improvement of plant potassium nutrition by mycorrhizal symbiosis

Arbuscular mycorrhizal symbiosis

Plant K^+ nutrition through the arbuscular mycorrhizal pathway has been rarely studied. However, the potassium distribution in AM fungi (AMF), was assessed in some studies using particle-induced X-ray emission (PIXE) experiments (Johansson and Campbell, 1988). This technique showed a strong accumulation of K^+ in spores (Pallon *et al.*, 2007), hyphae (Olsson *et al.*, 2008), and vesicles (Olsson *et al.*, 2011) of *Rhizophagus irregularis*. Interestingly, PIXE analyses showed a higher K^+ concentration in root-sections of *Aster tripolium* mycorrhized by *R. irregularis* than non-mycorrhized plants, suggesting a better K^+ nutrition due to the AM colonization (Scheloske *et al.*, 2004). This potassium enrichment of mycorrhized plants was previously observed in root steles of *Zea mays* mycorrhized by two different isolates of AMF (Kaldorf *et al.*, 1999), and in shoots of *Pelargonium peltatum* inoculated with a mixture of several AMF (Perner *et al.*, 2007). Due to the short life time of its radioactive isotope, K^+ transport was commonly visualized by the utilization of the rubidium (Rb^+) as a K^+ analog tracer. Therefore, Hawkes and Casper (2002) used four herbaceous species to show that putative competition mechanisms occur for the Rb^+ uptake from soil with the help of AMF. More data from the literature focusing on the effects of AM symbiosis for various plant biological processes involving improved mycorrhizal K^+ nutrition are presented below.

Ectomycorrhizal symbiosis

Potassium fluxes from ECM fungi to host plants were first observed by determination of Rb^+ contents (Rygiewicz and Bledsoe, 1984). Later, quantification of K^+ contents in *Picea abies* cultivated in a 230 μM of K^+ medium resulted in an estimation of around 5-6 % of total K^+ that came from the ECM fungus *Paxillus involutus* (Jentschke *et al.*, 2001). Regarding the cellular distribution of K^+ within fungal hyphae, X-ray microanalysis showed that K^+ is mainly localized in vacuoles of the ECM fungus *Pisolithus tinctorius* (Orlovich and Ashford, 1993; Ashford *et al.*, 1999). In addition, PIXE experiments with *Pinus sylvestris* / *Suillus luteus* mycorrhizae highlighted a high concentration of K^+ in plant vascular tissues of the ectomycorrhizae (Turnau *et al.*, 2001). Excitingly, data obtained in multiple field isolates of *Rhizopogon sp.* showed an important sequestration of K^+ in rhizomorphs of some isolates, that could be vital for forests subjected to long periods of K^+ starvation (Wallander *et al.*, 2002; Wallander and Pallon, 2005). Another fungus that can be considered as an important K^+ accumulator is *Suillus granulatus* (Wallander *et al.*, 2003). Strong mineral degradation

capacities of these two ECM fungi were suggested by the identification of calcium-rich crystals originating from K^+ -rich mineral apatite on rhizomorph surfaces. Thus, *Rhizopogon sp.* and *S. granulatus* could be considered as key intermediaries between soil and trees for plant K^+ nutrition in forest ecosystems. Interestingly, an increase of K^+ contents of about 35 % was observed in *Pinus pinaster* mycorrhized by *Hebeloma cylindrosporum* only in K^+ deficiency, suggesting that this fungus improves plant adaptation to limiting conditions (Garcia *et al.*, 2013). By contrast, *Quercus ilex* and *Quercus faginea* colonized by *T. melanosporum* during 12 and 20 months displayed in any case a reduction of K^+ concentrations (Dominguez Nunez *et al.*, 2006). However, in another experiment, no significant difference in K^+ contents was observed between control plants of *Pinus halepensis*, *Q. faginea*, and *Quercus petraea*, and those inoculated with *T. melanosporum* (Dominguez Nunez *et al.*, 2008). These contradictory data show one more time that K^+ allocation from soil to plants through ECM fungi is still misunderstood and need further functional investigations.

Transport of potassium in mycorrhizal interactions

Transport systems on the fungal side

Recent access to nuclear genomes of ECM fungi *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008), *T. melanosporum* (Martin *et al.*, 2010) and many unpublished others (http://genome.jgi.doe.gov/Mycorrhizal_fungi/Mycorrhizal_fungi.info.html), provide wonderful tools for the mycorrhizal community, allowing the identification of new candidate genes involved in resource exchanges between hosts and symbionts (Casieri *et al.*, 2013). Consequently, four putative K^+ transport system families could be identified in ECM fungi (Figure 1) on the basis of their homology to yeast Trk1 and Trk2 transporters (Ko and Gaber, 1991), to yeast TOK channels (Ketchum *et al.*, 1995), to bacterial and yeast KT/KUP/HAK transporters (Bossemeyer *et al.*, 1989, Bañuelos *et al.*, 1995) and to animal Shaker-like channels (SKC) (Papazian *et al.*, 1987; Jan and Jan, 1997). Before this high-throughput genomic era, a K^+ transporter and a K^+ channel were identified in an EST library of *H. cylindrosporum* (Lambilliotte *et al.*, 2004). Among these candidates, one member of the Trk/Ktr/HKT family (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010) was functionally characterized. Indeed, *HcTrk1* of *H. cylindrosporum* was shown to restore partially the wild-type phenotype of a yeast strain deficient in K^+ uptake (Corratgé *et al.*, 2007). Moreover, electrophysiological analyses performed by expression of cRNA in *Xenopus* oocytes argued that *HcTrk1* is a $Na^+ - K^+$ transporter. More recently, the use of transgenic lines of *H. cylindrosporum* allowed

the localization of this transporter exclusively in external hyphae of *P. pinaster* mycorrhizae (Garcia *et al.*, 2013), showing a specialized localization of *HcTrk1* to uptake sites. The other candidate identified in the *H. cylindrosporum* EST library belongs to the Shaker-like ion channel family. Interestingly, SKC channels were found exclusively in *Basidiomycota* fungi and in some members of basal fungi, whereas they are absent in sequenced *Ascomycota*, suggesting a loss of this kind of K^+ channel in this clade (unpublished data). Interestingly, the genome accession provides two other types of transport systems, *HcTOK* channels and a *HcHAK* transporter. The analysis of these new candidates is currently in progress in order to dissect the whole K^+ transportome of ECM fungi (unpublished data).

Transporters and channels of AMF are still the missing part of the K^+ transport from soil to host. Four sequences of *R. irregularis* from an EST library (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMG/GlomerusGenome>) were identified as K^+ transport systems. Three of them are coding for SKC channels and one for a KT/KUP/HAK transporter. However, no Trk and TOK members were identified so far. Probably, the recent sequenced *R. irregularis* genome (<http://genome.jgi.doe.gov/Gloin1/Gloin1.home.html>) will provide more precise information concerning candidate genes involved in nutrient transport occurring in AM symbiosis.

Future researches on AM and ECM K^+ transport systems need to precise their involvement in K^+ uptake from the soil and in K^+ release towards plant cells. Based on homology of the so far identified candidates with genes of other organisms, it is tempting to argue that transporters of the Trk/Ktr/HKT and KT/KUP/HAK families could take up K^+ from the soil. Similarly, Shaker-like K^+ and TOK channels could be probably involved in the transfer of K^+ from the arbuscule / Hartig net to host plant cortical cells (Figure 2C,D). However, caution must be taken on these predictions due to the bidirectional behavior of some transport systems in specific conditions and due to the unknown subcellular localization.

Transport systems on the plant side

The direct pathway of K^+ uptake (Figure 2A) of woody plants is poorly studied so far in contrast to K^+ uptake of model plants as *e.g.* *Arabidopsis thaliana* (Alemán *et al.*, 2011). However, some authors identified transport systems putatively involved in K^+ nutrition of woody plants able to form ECM associations. For example, two channels from *Populus euphratica* (*PeKC1* and *PeKC2*) were characterized (Zhang *et al.*, 2010). Interestingly, their over-expression led to complement the *A. thaliana akt1* mutant. Because AKT1 is involved in

K⁺ nutrition in *A. thaliana* (Hirsch *et al.*, 1998), this finding strongly suggests that these two transport systems could play a role in K⁺ uptake in poplar trees. However, no investigation was carried out to dissect the involvement of these proteins in the allocation of K⁺ during mycorrhizal associations. Therefore, their expression analysis upon AM and ECM symbioses would be a good starting point for the identification of transport systems required in K⁺ nutrition, as already shown for phosphate transporters of *Populus trichocarpa* (Loth-Pereda *et al.*, 2011). In turn, in AM plants, the direct pathway of K⁺ uptake is well known since many years (Figure 2B). Indeed, several transport systems were identified, functionally characterized and their role in K⁺ nutrition in various conditions was investigated. These proteins belong to the families of Trk/Ktr/HKT transporters (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010), of KT/KUP/HAK transporters (Grabov, 2007) and of Shaker-like channels (Dreyer and Uozumi, 2011).

Although several plant genomes were available for many years, very few studies concerned the plant K⁺ transportome in the mycorrhizal pathway so far (Figure 2C,D). Recently two ESTs of *Pinus sylvestris* related to outward Shaker-like channels were found to be highly up-regulated during ECM interaction with *Ceonococcum geophilum*, *S. granulatus* and *Rhizopogon roseolus* (Martina Peter, personal communication). In plants which form AM associations, a KT/KUP/HAK transporter was found to be 44-fold up-regulated in *Lotus japonicus* mycorrhized by the AMF *Gigaspora margarita* (Guether *et al.*, 2009). More recently, a SKOR channel of *Z. mays* was identified to be up-regulated by AM colonization (Hawkes *et al.*, 2013). Future functional analyses on these first plant candidates are needed to dissect the molecular bases of K⁺ uptake from the plant-fungus interface.

Benefits of mycorrhizal potassium uptake for plants

Improvement of salt and drought stress tolerance in AMF-inoculated plants

Concerning the advantages conferred by K⁺ originating from mycorrhizae, several studies investigated its involvement in various stress tolerance of the host plant. Even though the acquisition of plant salinity tolerance by AM symbiosis is described for several decades (Hirrel and Gerdemann, 1980; Ojala *et al.*, 1983), very few is known about physiological and molecular mechanisms enhancing this adaptation. Many reports on divers host plants growing under salt stress conditions as *Vicia faba* (Rabie and Almadini, 2005), *Acacia nilotica* (Giri *et al.*, 2007), *Ocimum basilicum* (Zuccarini and Okurowska, 2008), *Glycine max* (Sharifi *et al.*, 2007), *Olea europaea* (Porrás-Soriano *et al.*, 2009) or *Z. mays* (Estrada *et al.*, 2013) demonstrated that AM colonization enhances the plant K⁺ uptake, whereas the Na⁺ content is

maintained at low level. These data support the idea that AM symbiosis improves salt stress tolerance of the host plant through the modification of the K^+ / Na^+ balance. This purpose was corroborated by the observation of high internal K^+ concentrations in several AM fungi collected in natural saline sites (Hammer *et al.*, 2011a). Recently, Estrada *et al.* (2013) demonstrated for the first time that three K^+ transport systems of *Z. mays* putatively involved in phloem loading/unloading (*ZmAKT2*), xylem release (*ZmSKOR*) and Na^+/K^+ homeostasis (*ZmSOS1*) displayed modification of their expression levels during AM colonization. These exciting findings open the way to the elucidation of plant proteins involved in transport of K^+ originating from mycorrhizal fungi, especially under salt stress conditions.

Input of AM symbiosis on drought stress resistance of plants has been well studied (Harley and Smith, 1983; Al-Karaki, 1998; Porcel and Ruiz-Lozano, 2004). Improvement in drought resistance is accompanied by an elevation of K^+ concentrations observed *e.g.* in *Citrus tangerine* (Wu and Xia, 2006), suggesting a role of AM symbiosis in hydric stress tolerance through K^+ uptake required for osmotic adjustment. Interestingly, El-Mesbahi *et al.* (2012) demonstrated that hydraulic conductivity of AM-colonized *Z. mays* growing under hydric stress was enhanced by supply of K^+ in external medium. Moreover, in these conditions the expression level of the plant aquaporin *ZmPIP2;6* was modulated, suggesting that molecular adaptation of mycorrhized plants to drought stress is dependent on K^+ resource availability.

Interaction between plant potassium and phosphorus nutrition

Interestingly, several authors reported recently a strong correlation between K^+ and phosphorus (P) during AM symbiosis. Olsson and co-authors (2008, 2011) highlighted a co-distribution and a linked ratio of K^+ and P in spores, hyphae and vesicles of *R. irregularis*. When spores were enriched in P, an increase of K^+ content was observed (Olsson *et al.*, 2011). Several studies on ECM symbiosis reported similar results. Indeed, a strong correlation in K^+ and P distribution was described in rhizomorphs of *Rhizopogon sp.* using PIXE (Wallander and Pallon, 2005). Other studies showed that the decrease of P availability in soil could lead to either a decrease or an increase of K^+ content in ECM *Pinus rigida* (Cumming, 1993) or in AM *Trifolium subterraneum* (Smith *et al.*, 1981), respectively. Moreover, K^+ and P were also found in same fungal compartments of *P. involutus* such as vacuoles (Orlovich and Ashford, 1993; Ashford *et al.*, 1999). Interestingly, it is assumed that K^+ is one of the major counter-ions of polyphosphate (polyP) granules, especially of soluble short-chains of polyP mainly located in fungal vacuoles (Bücking and Heyser, 1999). In addition, we have

shown recently that the over-expression of a K^+ transporter of *H. cylindrosporium* led to an alteration of K^+ and P translocation from roots to shoots of mycorrhized *P. pinaster* (Garcia *et al.*, 2013), providing new evidences on K^+ and P interaction during their transport in ECM symbiosis. All these data demonstrating the strong link between these two elements suggest that K^+ seems to be a more important component of mycorrhizal symbiosis than formerly suspected. Therefore, K^+ needs to be considered not only as a direct trophic element involved in plant K^+ nutrition, but also as an “indirect-trophic” component required for the homeostasis and the correct transfer of other nutrients to the host plant, such as inorganic phosphate. Moreover, Hammer *et al.* (2011b) described a K^+ accumulation in an AMF related to low C supply from the plant. Consequently, we can imagine that in condition of low availability of C originating from the host plant, the high concentration of K^+ observed in the fungus could be related to the accumulation of P (in polyP form) which is not transferred to the plant. However, additional investigations are needed to validate or not this hypothesis and to get more evidences on the interaction occurring between K^+ , P and C in mycorrhizal symbioses.

Protection against radiocaesium pollution

Radiocaesium isotopes (^{134}Cs , ^{137}Cs) are important soil contaminants that can be present within the food chain by the intermediate of plant uptake (Delvaux *et al.*, 2001). It is well known that external K^+ affects the acquisition of radiocaesium by plants (reviewed in Tamponnet *et al.*, 2008). Several studies reported the involvement of the mycorrhization on radiocaesium uptake. Evaluation of the Cs^+/K^+ ratio in *P. abies* showed a lower acquisition of ^{134}Cs by plants inoculated with *Hebeloma crustuliniforme* due to its retention in the outer hyphae and to a better transfer of K^+ to the plant (Brunner *et al.*, 1996). By contrast, *P. pinaster* mycorrhized by *R. roseolus* displayed more elevated concentrations in ^{134}Cs than non-mycorrhized plants, whereas the K^+ content remained stable (Ladeyn *et al.*, 2008), highlighting the importance of the considered host – symbiont couple. The influence of K^+ on ^{134}Cs accumulation was also investigated in relation to AM symbiosis. Thus, in *Medicago truncatula*, radiocaesium accumulation of plants colonized by *R. irregularis* is inversely correlated to K^+ contents in the external medium (Gyuricza *et al.*, 2010a). The authors suggested that AM symbiosis combined with high K^+ concentrations in external medium would be crucial to avoid ^{134}Cs accumulation in plants growing on contaminated soil. Interestingly, external P displayed the same effect than K^+ on ^{134}Cs uptake during AM colonization of *M. truncatula* (Gyuricza *et al.*, 2010b), reinforcing the idea of a close relationship between K^+ and P via polyP synthesis, storage and transport.

Conclusion

Although the role of K^+ is still poorly investigated in mycorrhizal studies, it appears that plant K^+ nutrition is clearly improved by mycorrhization, especially under K^+ limiting conditions as e.g. found in forest ecosystems. Moreover, this improvement could act on abiotic stress tolerance, P homeostasis maintenance, or exclusion of soil contaminants such as radiocaesium. Thanks to genome and transcriptome access, the dissection of molecular mechanisms involved will be unraveled in the coming years, strengthening our knowledge on the mycorrhizal contribution to plant K^+ nutrition.

Acknowledgment

This work was supported by the ANR project "TRANSMUT" 2010 BLAN 1604 03. KG was financially supported by a grant from the French Minister of Research and Technology. Sequencing and annotation of the fungal genomes were conducted in the frame of the Fungal Genome Program by the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute that is supported by the Office of Science of the U.S. Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231.

References

- Al-Karaki, G.N. (1998). Benefit, cost and water-use efficiency of arbuscular mycorrhizal durum wheat grown under drought stress. *Mycorrhiza* 8, 41-45.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F. (2011). Root K^+ acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant Cell Physiol.* 52, 1603-1612.
- Asher, C.J., Ozanne, P.G. (1967). Growth and potassium content of plants in solution cultures maintained at constant potassium concentrations. *Soil Sci.* 103, 155-161.
- Ashford, A.E., Vesk, P.A., Orlovich, D.A., Markovina, A.L., Allaway W.G. (1999). Dispersed polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis* / *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. *Fungal Genetics and Biology* 28, 21-33.
- Bañuelos, M.A., Klein, R.D., Alexander-Bowman, S.J., Rodríguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* 14, 3021–3027.
- Bossemeyer, D., Schlosser, A., Bakker, E.P. (1989). Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K^+ uptake system. *Journal of Bacteriology* 171, 2219-2221.
- Broadley, M.R., White, P.J. (2005). *Plant nutritional genomics*. Oxford: Blackwell Publishing. CRC Press 26-65.
- Brunner, I., Frey, B., Riesen, T.K. (1996). Influence of ectomycorrhization and cesium / potassium ratio on uptake and localization of cesium in Norway spruce seedlings. *Tree Physiol.* 16, 705-711.

- Bücking, H., Heyser, W. (1999). Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi – an X-ray microanalytical study. *Mycological Research* 103, 31-39.
- Casieri, L., Lahmidi, N.A., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., Courty, P.E., Garcia, K., Charbonnier, M., Delteil, A., Brun, A., Zimmermann, S., Plassard, C., Wipf, D. (2013). Biotrophic transportome in mutualistic plant fungal interactions. *Mycorrhiza* 23, 597-625.
- Corratgé, C., Zimmermann, S., Lambilliotte, R., Plassard, C., Marmeisse, R., Thibaud, J.B., Lacombe, B., Sentenac, H., (2007). Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26057-26066.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnour, M., Zimmermann, S., Véry, A.A., Fizames, C., Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 2511-2532.
- Cumming, J.R. (1993). Growth and nutrition of nonmycorrhizal and mycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings under phosphorus limitation. *Tree Physiology* 13, 173-187.
- Delvaux, B., Kruyts, N., Maes, E., Smolders, E. (2001). Fate of radiocesium in soil and rhizosphere, in *Trace Elements in the Rhizosphere*, eds Gobran, G.R., Wenzel, W.W., and Lombi, E. (Boca Raton, FL, USA: CRC Press), 61–91.
- Dominguez Nunez, J.A., Selva Serrano, J., Rodriguez Barreal, J.A., Saiz de Omenaca Gonzalez, J.A. (2006). The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. *Forest Ecology and Management* 231, 226-233.
- Dominguez, Nunez J.A., Planelles Gonzalez, R., Rodriguez Barreal, J.A., Saiz de Omenaca Gonzalez, J.A. (2008). The effect of *Tuber melanosporum* Vitt. mycorrhization on growth, nutrition, and water relations of *Quercus petraea* Liebl., *Quercus faginea* Lamk., and *Pinus halepensis* Mill. seedlings. *New Forests* 2, 159-171.
- Drew, M.C., Nye, P.H. (1969). The supply of nutrient ions by diffusion to plant roots in soil. II. The effect of root hairs on the uptake of potassium by roots of ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Plant & Soil* 31, 407-424.
- Dreyer, I., Uozumi, N. (2011). Potassium channels in plant cells. *FEBS J.* 278, 4293-303.
- El-Mesbahi, M.N., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R. (2012). Plant potassium content modifies the effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on root hydraulic properties in maize plants. *Mycorrhiza* 22, 555-564.
- Estrada, B., Aroca, R., Maathuis, F.J., Barea, J.M., Ruiz-Lozano, J.M. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. *Plant Cell Environ.* 36, 1771-1782.
- Garcia, K., Delteil, A., Conéjéro, G., Becquer, A., Plassard, C., Sentenac, H., Zimmermann, S. (2013). Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of the *Hebeloma cylindrosporum* HcTrk1 transporter affects the translocation of both K⁺ and P in the host plant. *New Phytologist* (in press).

- Giri, B., Kapoor, R., Mukerji, K.G. (2007). Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum*, may be partly related to elevated K^+/Na^+ ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology* 54, 753–760.
- Grabov, A. (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family - multiple functions. *Ann Bot.* 99, 1035-1041.
- Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M.K., Bonfante, P. (2009). Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 182, 200-212.
- Gyuricza, V., Declerck, S., Dupré de Boulois, H. (2010a). Arbuscular mycorrhizal fungi decrease radiocesium accumulation in *Medicago truncatula*. *Journal of Environmental Radioactivity* 101, 591-596.
- Gyuricza, V., Dupré de Boulois, H., Declerck, S. (2010b). Effect of potassium and phosphorus on the transport of radiocesium by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Environmental Radioactivity* 101, 482-487.
- Hammer, E.C., Nasr, H., Pallon, J., Olsson, P.A., Wallander, H. (2011a). Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. *Mycorrhiza* 21, 117-129.
- Hammer, E.C., Pallon, J., Wallander, H., Olsson, P.A. (2011b). Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *FEMS Microbiology Ecology* 76, 236-244.
- Harley, J.L., Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- Hawkes, C.V., Casper, B.B. (2002). Lateral root function and root overlap among mycorrhizal and nonmycorrhizal herbs in a Florida shrubland, measured using rubidium as a nutrient analog. *American Journal of Botany* 89, 1289-1294.
- Hirrel, M.C., Gerdemann, J.W. (1980). Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America Journal* 44, 654–655.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., Sussman, M.R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280, 918-921.
- Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 91-123.
- Javot, H., Pumplin, N., Harrison, M.J. (2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30, 310-322.
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Godbold, D.L. (2001). Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 149, 327-337.
- Jin, H.R., Liu, J., Liu, J., Huang, X.W. (2012). Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Sci. China Life Sci.* 55, 474–482.
- Johansson, S.A.E., Campbell, J.L. (1988). *PIXE, a novel technique for elemental analysis*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Kaldorf, M., Kuhn, A.J., Schroder, W.H., Hildebrandt, U., Bothe, H. (1999). Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 154, 718-728.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.N. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with 2 pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.

- Ko, C.H., Gaber, R.F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11, 4266-4273.
- Ladeyn, I., Plassard, C., Staunton, S. (2008). Mycorrhizal association of maritime pine, *Pinus pinaster*, with *Rhizopogon roseolus* has contrasting effects on the uptake from soil and root-to-shoot transfer of ¹³⁷Cs, ⁸⁵Sr and ⁹⁵mTc. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 853-863.
- Lambilliotte, R., Cooke, R., Samson, D., Fizames, C., Gaymard, F., Plassard, C., Tatry, M.V., Berger, C., Laudie, M., Legeai, F., Karsenty, E., Delseny, M., Zimmermann, S., Sentenac, H. (2004). Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 164, 505-513.
- Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J., Hedrich, R. (2002). Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *Plant J.* 32, 997-1009.
- Leigh, R.A., Wyn Jones, R.G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist* 97, 1-13.
- López, M.F., Dietz, S., Grunze, N., Bloschies, J., Weiss, M., Nehls, U. (2008) The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae. *New Phytologist* 180, 365-378.
- Loth-Pereda, V., Orsini, E., Courty, P.E., Lota, F., Kohler, A., Diss, L., Blaudez, D., Chalot, M., Nehls, U., Bucher, M., Martin, F. (2011). Structure and expression profile of the phosphate Pht1 transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology* 156, 2141-2154.
- Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H.J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buee, M., Brokstein, P., Canback, B., Cohen, D., Courty, P.E., Coutinho, P.M., Delaruelle, C., Detter, J.C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P.J., Jain, P., Kilaru, S., Labbe, J., Lin, Y.C., Legue, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Secq, M.P.O.-L., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kues, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G.K., Polle, A., Pukkila, P.J., Richardson, P.M., Rouze, P., Sanders, I.R., Stajich, J.E., Tunlid, A., Tuskan, G., Grigoriev, I.V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452, 88-92.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P.M., Jaillon, O., Montanini, B., Morin, E., Noel, B., Percudani, R., Porcel, B., Rubini, A., Amicucci, A., Amselem, J., Anthouard, V., Arcioni, S., Artiguenave, F., Aury, J.M., Ballario, P., Bolchi, A., Brenna, A., Brun, A., Buee, M., Cantarel, B., Chevalier, G., Couloux, A., Da Silva, C., Denoeud, F., Duplessis, S., Ghignone, S., Hilselberger, B., Iotti, M., Marcais, B., Mello, A., Miranda, M., Pacioni, G., Quesneville, H., Riccioni, C., Ruotolo, R., Splivallo, R., Stocchi, V., Tisserant, E., Viscomi, A.R., Zambonelli, A., Zampieri, E., Henrissat, B., Lebrun, M.H., Paolocci, F., Bonfante, P., Ottonello, S., Wincker, P. (2010). Périgord Black Truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464, 1033-1038.

- Müller, T., Avolio, M., Olivi, M., Benjdia, M., Rikirsch, E., Kasaras, A., Fitz, M., Chalot, M., Wipf, D. (2007). Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 68, 41-51.
- Ojala, J.C., Jarrell, W.M., Menge, J.A. (1983). Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil. *Agronomy Journal* 75, 255-259.
- Olsson, P.A., Hammer, E.C., Wallander, H., Pallon, J. (2008). Phosphorus availability influences elemental uptake in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, as revealed by particle-induced X-ray emission analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4144-4148.
- Olsson, P.A., Hammer, E.C., Pallon, J., van Aarle, I.M., Wallander, H. (2011). Elemental composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. *Fungal Biology* 115, 643-648.
- Orlovich, D.A., Ashford, A.E. (1993). Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Protoplasma* 173, 91-102.
- Pallon, J., Wallander, H., Hammer, E., Arteaga Marrero, N., Auzelyte, V., Elfman, M., Kristiansson, P., Nilsson, C., Olsson, P.A., Wegdén, M. (2007). Symbiotic fungi that are essential for plant nutrient uptake investigated with NMP. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 260, 149-152.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1987). Cloning of the genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237, 749-753.
- Perner, H., Schwarz, D., Bruns, C., Mäder, P., George, E. (2007). Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. *Mycorrhiza* 17, 469-474.
- Plassard, C., Dell, B. (2010). Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiol.* 30, 1129-1139.
- Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55, 1743-1750.
- Porrás-Soriano, A., Soriano-Martín, M.L., Porrás-Piedra, A., Azcón, R. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *Journal of Plant Physiology* 66, 1350-1359.
- Rabie, G.H., Almadini, A.M. (2005). Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 4, 210-222.
- Rygielwicz, P.T., Bledsoe, C.S. (1984). Mycorrhizal effects on potassium fluxes by northwest coniferous seedlings. *Plant Physiol.* 76, 918-923.
- Scheloske, S., Maetz, M., Schneider, T., Hildebrandt, U., Bothe, H., Povh, B. (2004). Element distribution in mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of the halophyte *Aster tripolium* determined by proton induced X-ray emission. *Protoplasma* 223, 183-189.
- Sharifi, M., Ghorbanli, M., Ebrahimzadeh, H. (2007). Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* 164, 1144-1151.
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd edition). New York, NY, USA: Academic Press.

- Smith, S.E., Smith, F.A., Nicholas, D.J.D. (1981). Effects of endomycorrhizal infection on phosphate and cation uptake by *Trifolium subterraneum*. *Plant & Soil* 63, 57-64.
- Tamponnet, C., Martin-Garin, A., Gonze, M.A., Parekh, N., Vallejo, R., Sauras-Year, T., Casadesus, J., Plassard, C., Staunton, S., Norden, M., Avila, R., Shaw, G. (2008). An overview of BORIS: Bioavailability of radionuclides in soils. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 820-830.
- Turnau, K., Berger, A., Loewe, A., Einig, W., Hampp, R., Chalot, M., Dizengremel, P., Kottke, I. (2001). Carbon dioxide concentration and nitrogen input affect the C and N storage pools in *Amanita muscaria*-*Picea abies* mycorrhizae. *Tree Physiol.* 21, 93-99.
- Wallander, H., Johansson, L., Pallon, J. (2002). PIXE analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different minerals in forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 39, 147-156.
- Wallander, H., Mahmood, S., Hagerberg, D., Johansson, L., Pallon, J. (2003). Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 57-65.
- Wallander, H., Pallon, J. (2005). Temporal changes in the elemental composition of *Rhizopogon* rhizomorphs during colonization of patches with fresh organic matter or acid-washed sand. *Mycologia* 97, 295-303.
- Wang, B., Qiu, Y.L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299-363.
- Wang, Y., Wu, W.H. (2013). Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 64, 4.1-4.26.
- Wu, Q.S., Xia, R.X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology* 163, 417-425.
- Zhang, H., Yin, W., Xia, X. (2010). Shaker-like potassium channels in *Populus*, regulated by the CBL-CIPK signal transduction pathway, increase tolerance to low-K⁺ stress. *Plant Cell Reports* 29, 1007-1012.
- Zuccarini, P., Okurowska, P. (2008). Effects of mycorrhizal colonization and fertilization on growth and photosynthesis of sweet basil under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 31, 497-513.

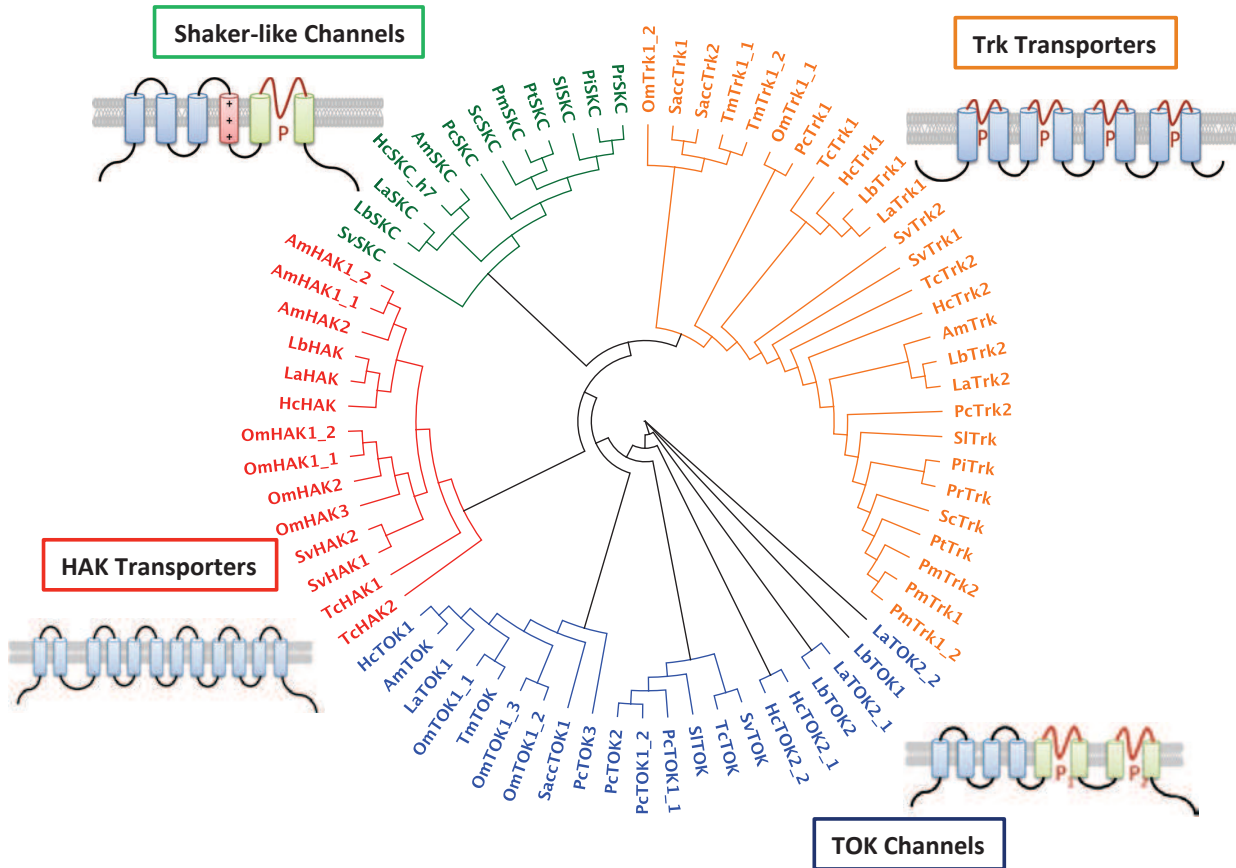


Figure 1: Phylogenetic tree of potassium transport systems from ECM fungi.

Four families of K^+ transport systems are identified in ECM fungi. Two of them code for putative transporters (HAK and Trk) and the two others for putative channels (SKC and TOK). The structure models of each family are represented. The tree was constructed using maximum likelihood method. Am: *Amanita muscaria*, Hc: *Hebeloma cylindrosporium*, La: *Laccaria amethystina*, Lb: *Laccaria bicolor*, Om: *Oidiiodendron maius*, Pc: *Piloderma croceum*, Pi: *Paxillus involutus*, Pm: *Pisolithus microcarpus*, Pr: *Paxillus rubicundulus*, Pt: *Pisolithus tinctorius*, Sacc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sc: *Scleroderma citrinum*, Sl: *Suillus luteus*, Sv: *Sebacina vermifera*, Tc: *Tulasnella calospora*, Tm: *Tricholoma matsutake*.

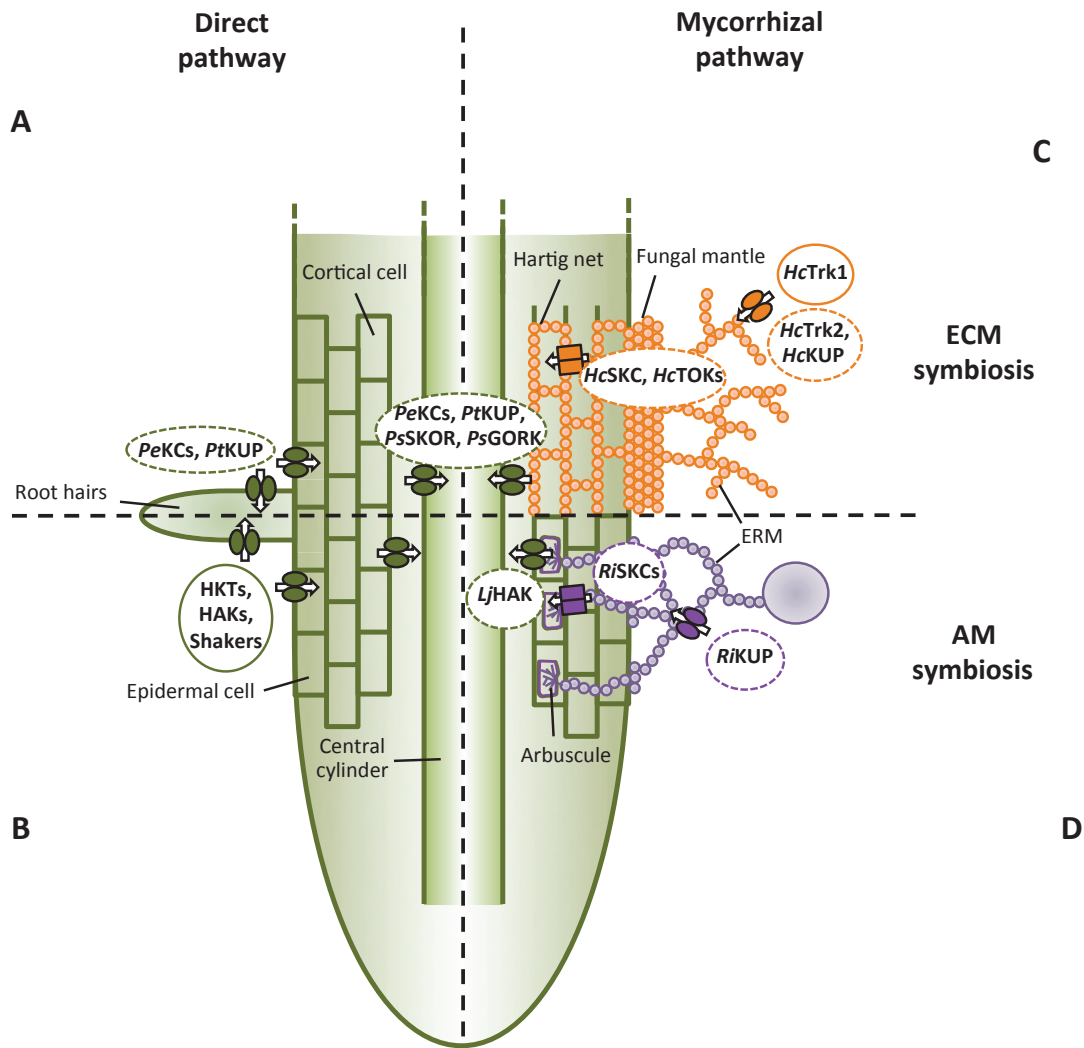


Figure 2: Current knowledge about potassium transport systems in mycorrhizal associations.

A,B. The transfer of potassium (K⁺) from the soil to plant cells by the direct pathway needs plant transport systems in root uptake and release sites. A. Shaker type channels from *Populus euphratica* (PeKCs) and a KUP transporter of *Populus trichocarpa* (PtKUP) could be involved in K⁺ uptake in poplar trees (Zhang *et al.*, 2010). B. Members of HKT, HAK and Shaker families were identified and characterized in various AM plants as transport systems involved in K nutrition. C. To our knowledge, only K⁺ transport systems of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* are currently analyzed in ECM symbiosis, and just one, HcTrk1, is already characterized (Corratgé *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2013). Few transcriptomic data suggest the role of some plant proteins allowing K⁺ uptake from the apoplast. D. EST library of *Rhizophagus irregularis* allows the identification of several K⁺ transport related proteins (Casieri *et al.*, 2013), and transcriptomic analysis revealed an highly overexpression of a K⁺ transporter in inoculated *Lotus japonicus* (Guether *et al.*, 2009). Full lines indicate transport systems whose capability in K⁺ transport was verified. Dotted lines indicate transport systems whose involvement in K⁺ transport during mycorrhizal symbioses is suggested. Hc: *Hebeloma cylindrosporum*, Ri: *Rhizophagus irregularis*, Pe: *Populus euphratica*, Pt: *Populus tremula*, Ps: *Pinus sylvestris*, Lj: *Lotus japonicus*, Zm: *Zea mays*.

1.6 Nutrition phosphatée ectomycorhize – dépendante

La symbiose mycorhizienne améliore la nutrition minérale des végétaux, et notamment le prélèvement du phosphore dans le sol. De par son enjeu économique préalablement évoqué, la symbiose endomycorhizienne à arbuscules détient un rôle majeur dans la nutrition phosphatée des plantes terrestres. C'est pourquoi de nombreux travaux portent actuellement sur l'impact de cette association dans la récupération du phosphore par les végétaux (Javot *et al.*, 2007). De par l'axe général de ce travail de doctorat, des données bibliographiques mettant en lumière la nutrition phosphatée des plantes ligneuses à travers la symbiose ectomycorhizienne seront principalement développées par la suite.

1.6.1 Importance du phosphore chez les plantes: le phosphate inorganique

Le phosphore (P) est un macroélément essentiel pour tous les organismes. Il est impliqué dans de nombreux processus vitaux tels que la synthèse des acides nucléiques, la synthèse des phospholipides de la membrane plasmique ou encore la régulation post-traductionnelle des protéines via la phosphorylation / déphosphorylation de certains acides aminés. De plus, la disponibilité en P limite considérablement la productivité des écosystèmes (Batjes, 1997; Wardle *et al.*, 2004). Par ailleurs, le P utilisé dans la plupart des fertilisant phosphatés provient de minerai de phosphate. Or cette ressource s'amenuise très rapidement et aucun substitut n'existe à l'heure actuelle. En effet, on estime que le pic de P qui correspond au moment où la production du minerai de phosphate commencera à diminuer à cause de l'épuisement des ressources, devrait se produire dans à peine vingt ans (Rhodes, 2013). Il s'avère donc que la mise en place de mécanismes efficaces dans la récupération du P est cruciale pour tous les organismes afin de garantir une nutrition phosphatée constante, quelles que soient les conditions environnementales.

Le P est extrêmement présent dans le sol sous diverses formes minérales (Pm) et organiques (Po). Cependant, ces différentes formes sont difficilement disponibles pour les végétaux à cause de leur faible mobilité. Celle-ci est due à leur forte adsorption, leur précipitation avec des cations métalliques ou leur agrégation à l'humus (Richardson & Simpson, 2011). Ainsi, le Pm doit être solubilisé et le Po minéralisé pour aboutir au P en solution, principalement sous forme d'ions orthophosphates ou de Po dissout, qui sont la seule source disponible pour les plantes. Ces mécanismes de recyclage du P sont essentiellement réalisés par les plantes et les microorganismes du sol, tels que les bactéries, les nématodes ou

encore les champignons. Ces microorganismes participent aussi au bouclage du cycle du P en l'immobilisant sous forme organique et minérale (Figure 9).

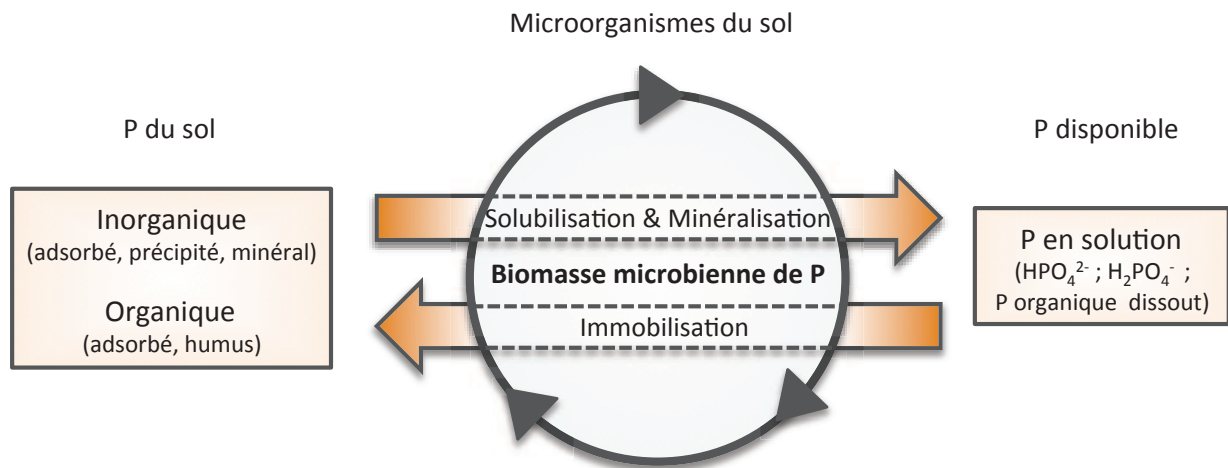


Figure 9: Représentation schématique de l'importance des microorganismes dans la disponibilité en phosphate du sol.

Le phosphore (P) dans les sols est principalement présent sous forme organique ou inorganique (minérale) peu disponible pour les plantes. La solubilisation et la minéralisation de ce P par les microorganismes aboutie à une solution de P (essentiellement sous forme d'ions orthophosphates HPO_4^{2-} ; H_2PO_4^-) disponible pour les plantes. Une immobilisation de ce P en solution permet un retour au P organique et inorganique. Redessiné d'après Richardson & Simpson (2011).

La seule source de P directement assimilable par les plantes est le phosphate inorganique (Pi), sous forme d'ions orthophosphates (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-). Or, le Pi est présent en faible concentration dans le sol et sa diffusion est réduite. Ces deux facteurs combinés au besoin constant en Pi des végétaux épuise considérablement le sol autour des sites de prélèvement racinaires, créant ainsi des zones de déplétion (Bielecki 1973; Tinker & Nye 2000, Hinsinger, 2001). Les plantes ont donc développé au cours de leur évolution diverses stratégies permettant une assimilation continue de Pi, telles que la modification de leur architecture racinaire (Peret *et al.*, 2011), la mise en place de racines spécialisées ou "cluster roots" (Lambers & Shane, 2007; Lambers *et al.*, 2012), l'expression de transporteurs de Pi à haute affinité (Remy *et al.*, 2012), la sécrétion d'acides organiques (Jones, 1998), ou encore la symbiose mycorhizienne (Smith & Read, 2008).

1.6.2 Amélioration de la nutrition phosphatée des plantes ectomycorhizées

La première mise en évidence du transfert de P du sol à une plante ligneuse au travers d'hyphes de champignons ectomycorhiziens, a été réalisée en utilisant du Pi marqué au ^{32}P sur des plantules de *Pinus sylvestris* inoculées par divers champignons (Melin & Nilson, 1950). Le transfert unidirectionnel de P du champignon à la plante a été démontré en inoculant des plantules de *P. sylvestris* et de *Pinus concorta* par *Suillus bovinus*, toujours en utilisant du Pi marqué (Finlay & Read, 1986). Depuis, l'utilisation d'isotopes radioactifs du P (^{32}P ou ^{33}P) est toujours utilisé afin d'évaluer ou de visualiser (Figure 10) l'action de champignons ectomycorhiziens sur la nutrition phosphatée des plantes ligneuses (Finlay & Read, 1986; Wallander *et al.*, 2005; Zadworny *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2012).

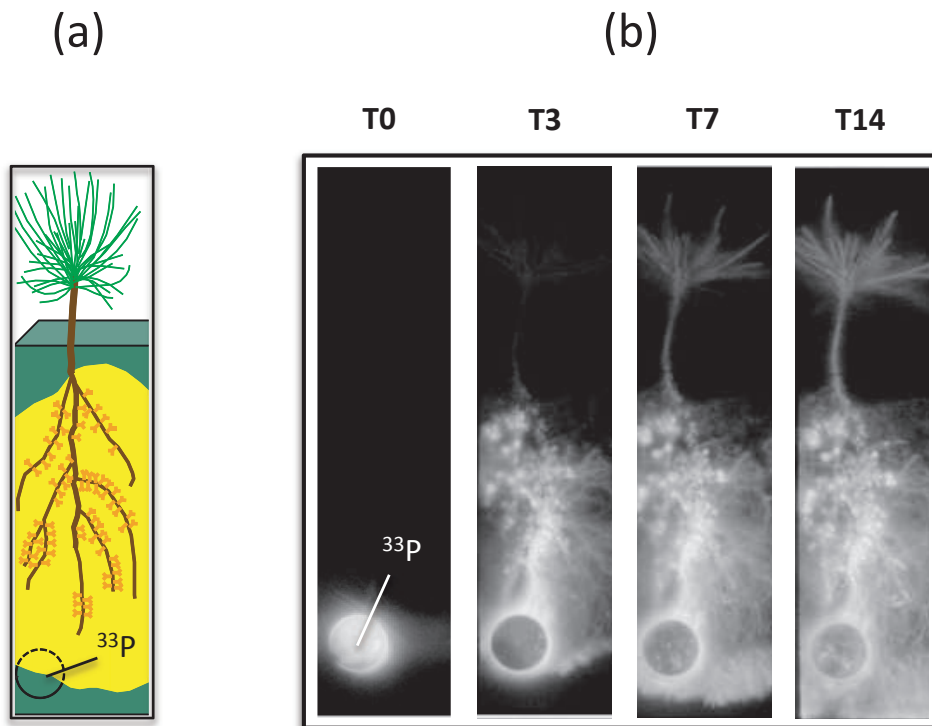


Figure 10: Flux de phosphore marqué au ^{33}P du champignon ectomycorhizien *Pisolithus sp.* à la plante hôte *Pinus thunbergii*.

(a) Les plantules de *P. thunbergii* sont inoculées avec un isolat de *Pisolithus sp.* récolté dans la province de Shiga (Japon) et cultivées en rhizoboxes. Une pastille contenant du phosphore marqué au ^{33}P est placée sur le mycélium, sans contact direct avec les racines de la plante hôte. (b) L'autoradiographie de la rhizobox montre de la radioactivité uniquement dans la pastille de ^{33}P à T0. Le ^{33}P est ensuite absorbé par les hyphes du champignon et transféré au système racinaire de la plante via les ectomycorhizes (observable le troisième jour, T3), puis transféré aux parties aériennes (T7) qui vont en accumuler progressivement (T14). D'après Wu *et al.* (2012).

Le cycle d'acquisition et d'utilisation du P chez les plantes ligneuses est encore mal connu, particulièrement en ce qui concerne le Po (Figure 11). En effet, il est possible que les arbres soient capables de solubiliser le Po directement, ou grâce à leurs symbiontes ectomycorhiziens (Rennenberg & Herschbach, 2013). En revanche, l'implication de l'association ectomycorhizienne dans la récupération du Pi est beaucoup plus étudiée (Plassard & Dell, 2010). Or, comme énoncé précédemment, le P est présent sous des formes

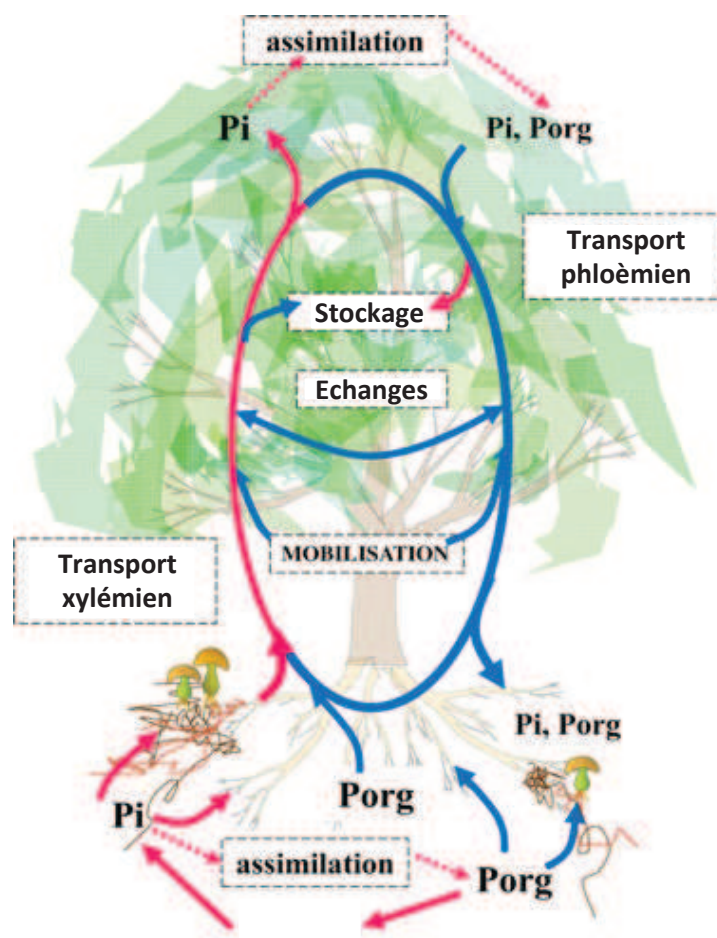


Figure 11: Modèle d'acquisition et utilisation du phosphore chez les plantes ligneuses.

Les flèches roses montrent les flux de phosphore (P) vérifiés en laboratoire chez les plantes ligneuses. Les flèches bleues indiquent les flux de P non encore vérifiés en laboratoire chez les espèces ligneuses. Les flèches en pointillées représentent l'assimilation de P dans les parties aériennes et racinaires. Pi: phosphate inorganique; Porg: phosphore organique. D'après Rennenberg & Herschbach (2013).

très peu mobiles dans les sols, et est donc peu disponible pour les plantes. Les microorganismes jouent alors un rôle majeur dans la disponibilité du P (Figure 9). Il a été démontré que les champignons ectomycorhiziens sont capables de dégrader le Po à l'aide d'enzymes comme les phosphomonoesterases (Nygren & Rosling, 2009). Ils sécrètent aussi des acides organiques permettant d'améliorer la disponibilité en Pi à partir du Pm peu soluble (Jones, 1998; Ström *et al.*, 2005). Ainsi, il a été décrit que le champignon *Rhizopogon roseolus* sécrète une grande quantité d'acide oxalique, permettant une augmentation de la disponibilité en P et pouvant aboutir à une meilleure nutrition en P de la plante hôte *P. pinaster* (Arvieu *et al.*, 2003; Casarin *et al.*, 2004). Il est également connu que des phosphatases acides (AcPases) peuvent être sécrétées par les champignons ectomycorhiziens (Tibbett *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002) et qu'elles pourraient être impliquées dans la dégradation du Po, améliorant ainsi la disponibilité en P dans les sols (Louche *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a récemment été montré que l'inoculation de jeunes peupliers par *L. bicolor* entraîne une surexpression de deux AcPases végétales (Pap5 et Pap7) potentiellement impliquées dans la mobilisation du Po (Courty *et al.*, 2011), qui est encore mal connue (Figure 11). Au cours de la symbiose endomycorhizienne, des résultats similaires montrant une surexpression d'AcPases chez l'œillet d'Inde (*TpPAP1*; Ezawa *et al.*, 2005) et chez le soja (*GmPAP4* et *GmPAP33*; Li *et al.*, 2012) ont été décrits en condition carencée en P. Toutes ces données montrent que la mycorhization peut aussi conduire à un contrôle de l'expression de gènes de la plante afin d'améliorer l'assimilation du P, et que ces mécanismes sont communs entre la symbiose ectomycorhizienne et endomycorhizienne à arbuscules.

1.6.3 Transport du phosphate inorganique au coeur de l'ectomycorhize

Une fois le P solubilisé sous forme d'ions orthophosphates, il devient disponible pour les organismes du sol. Des systèmes de transport exprimés à la membrane des cellules en contact avec l'extérieur sont alors nécessaires pour faire entrer le Pi. La nutrition phosphorée des plantes ligneuses mycorhizées se fait donc soit directement, soit par l'intermédiaire des ectomycorhizes (Figure 12).

Les systèmes de transport des plantes ligneuses impliqués dans la récupération de Pi sont encore mal connus. Actuellement, aucun transporteur n'a été caractérisé. Cependant, Loth-Pereda *et al.* (2011) ont identifié chez le peuplier plusieurs transporteurs dont l'expression est modifiée en fonction de la disponibilité en Pi. Des études plus ciblées restent

donc à mener afin d'évaluer l'implication de chacune de ces protéines dans la nutrition phosphatée mycorhize-indépendante des plantes ligneuses.

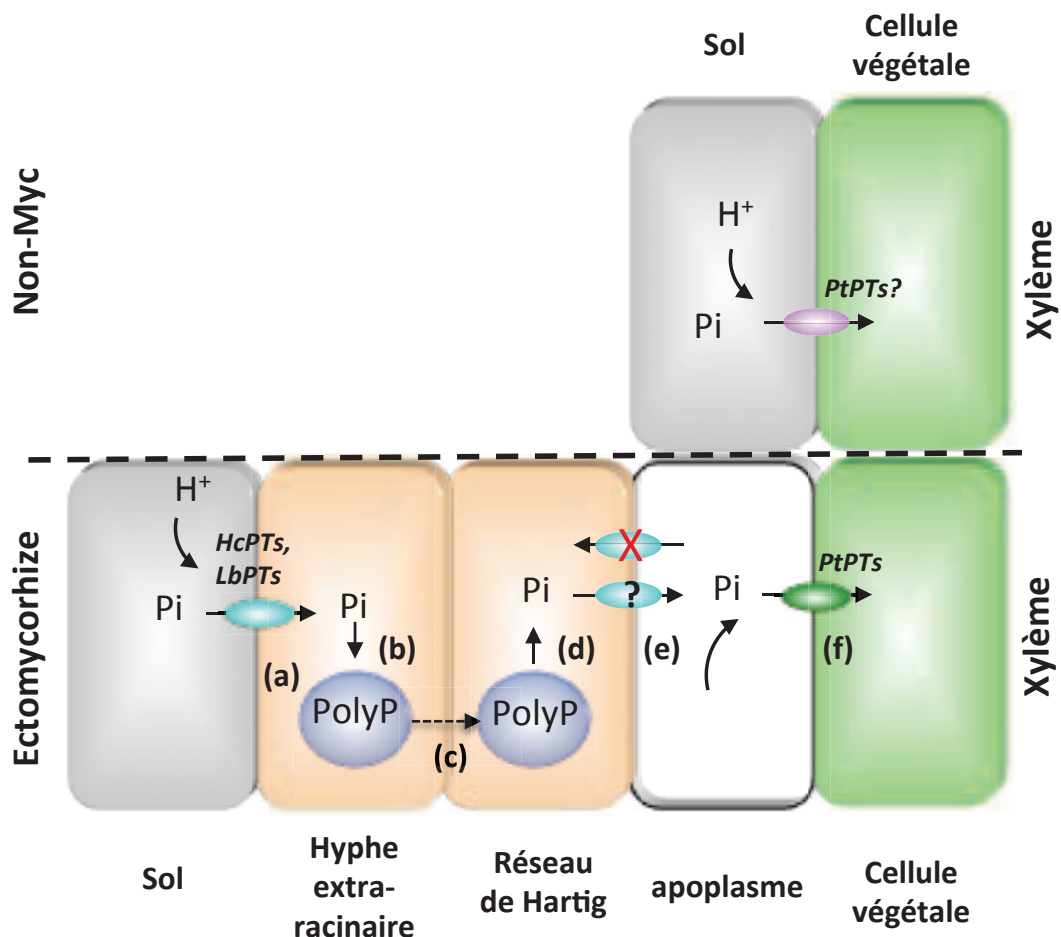


Figure 12: Transport du phosphate inorganique dans la symbiose ectomycorhizienne.

Dans les racines non mycorhizées (Non-Myc), des transporteurs de la famille Pht1 (nommés PTs, symports Pi:H^+) peuvent être impliqués dans le prélèvement du Pi. Dans l'ectomycorhize, des symports fongiques de la famille des Pht1 (nommés PTs) participent au prélèvement de Pi de la solution du sol au niveau des hyphes extra-racinaires (a). Ce Pi sera stocké dans les vacuoles sous forme de polyphosphate (PolyP) (b), puis transféré le long des hyphes grâce à des vacuoles mobiles (c) jusqu'aux hyphes du réseau de Hartig après dégradation des PolyP (d). Le mécanisme de sortie du Pi dans l'apoplasme n'est pas encore décrit, mais pourrait faire intervenir les mêmes transporteurs PTs que pour l'entrée (e). Leur activité pourrait être alors régulée afin d'éviter le retour du Pi de l'apoplasme aux cellules fongiques, le rendant ainsi disponible pour la plante (f). Les hyphes extra-racinaires comprennent ici les hyphes explorant le sol et les hyphes du manteau mycélien. Pi: phosphate inorganique; Hc: *Hebeloma cylindrosporum*; Am: *Amanita muscaria*; Lb: *Laccaria bicolor*; Pt: *Populus trichocarpa*. Adapté d'après Casieri *et al.* (2013).

En ce qui concerne la nutrition ectomycorhize-dépendante (Figure 12), seuls des transporteurs de Pi de champignons ectomycorhiziens appartenant à la famille des Pht1 (symports Pi:H^+) ont pour l'instant été identifiés. Ceci suggère que l'activité de ces protéines est dépendante du pH (Casieri *et al.*, 2013). Trois à cinq transporteurs ont donc pu être mis en évidence selon le champignon considéré. Ainsi, *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* sont les trois transporteurs de Pi identifiés chez *H. cylindrosporum*. Jusqu'à présent, seuls *HcPT1.1* et *HcPT2* ont été étudiés (Tatry *et al.*, 2009) et semblent impliqués dans la récupération de Pi extérieur en condition carencée ou non, respectivement. Concernant *HcPT1.2*, des analyses complémentaires tant sur sa localisation que sur son rôle biologique sont nécessaires. Pour ce qui est des autres champignons ectomycorhiziens, la capacité d'absorption des cinq transporteurs de Pi de *L. bicolor* est actuellement en cours d'analyse (C. Plassard, communication personnelle).

Une fois le Pi entré dans les cellules fongiques, il est accumulé dans des vacuoles tubulaires mobiles (Ashford & Allaway, 2002) sous forme de chaînes stables de polyphosphates (Bücking & Heyser, 1999). Les vacuoles vont ensuite se déplacer par un réseau de tubules jusqu'aux hyphes du réseau de Hartig où le Pi va être libéré puis déchargé dans l'apoplasme. On ne connaît pour l'instant aucun système de transport fongique qui permette ce relargage, mais il se pourrait que les transporteurs décrits précédemment soient remobilisés à ce niveau afin d'effectuer cette fonction (Casieri *et al.*, 2013). Pour ce qui est des protéines végétales impliquées dans la récupération du Pi contenu dans l'apoplasme, il a été décrit que deux transporteurs Pht1 de *Populus trichocarpa* (*PtPT9* et *PtPT12*) sont surexprimés durant l'ecto- et l'endomycorhization (Loth-Pereda *et al.*, 2011). Il est donc possible d'imaginer que ces symports puissent intervenir chez le peuplier dans le prélèvement du Pi provenant du champignon.

1.7 De la génomique à l'analyse fonctionnelle de systèmes de transport fongiques

Depuis quelques années maintenant, de nombreuses données génomiques et transcriptomiques sont générées chez les champignons ectomycorhiziens (Martin & Kohler, 2013). *L. bicolor* fut le premier *Basidiomycota* mycorhizien à être séquencé (Martin *et al.*, 2008), et *Tuber melanosporum* le premier *Ascomycota* (Martin *et al.*, 2010). Depuis, plusieurs autres génomes ont été obtenus (http://genome.jgi.doe.gov/Mycorrhizal_fungi/Mycorrhizal_fungi.info.html), dont celui de la souche h7 d'*H. cylindrosporum*. Concernant le champignon endomycorhizien *R. irregularis*, son génome mitochondrial (Lee and Young, 2009; Formey *et al.*, 2012), son

transcriptome (Tisserant *et al.*, 2012), et plus récemment son génome complet (<http://genome.jgi.doe.gov/Gloin1/Gloin1.home.html>) sont maintenant disponibles. Le génome mitochondrial de *Gigaspora margarita* a également été publié l'année dernière (Pelin *et al.*, 2012).

Toutes ces données générées s'avèrent être de formidables outils pour l'étude des gènes fongiques impliqués dans la symbiose mycorhizienne. Ainsi, des stratégies visant à identifier, caractériser fonctionnellement et localiser des gènes et protéines candidats deviennent plus facilement réalisables avec de tels outils. De plus, l'étude du rôle de ces candidats peut être menée par des stratégies de génétique inverse. Actuellement, des lignées transgéniques de *L. bicolor* présentant une forte diminution de l'expression de certains gènes ont pu être produites et étudiées. Ainsi, le rôle de la nitrate réductase (Kemppainen *et al.*, 2009) et de la protéine effectrice MiSSP7 (Plett *et al.*, 2011) a été démontré. La production de souches RNAi pour le transporteur de nitrate *LbNrt* a montré récemment que la diminution drastique de son expression entraîne un défaut de mycorhization (Kemppainen & Pardo, 2013). Ces résultats obtenus pour la première fois chez un système de transport d'un champignon ectomycorhizien permettent de souligner que l'efficacité de l'apport nutritionnel du partenaire fongique à la plante est indispensable pour l'établissement de la symbiose.

Concernant *H. cylindrosporum*, une banque d'EST était disponible jusqu'à maintenant (Lambilliotte *et al.*, 2004). Quatre des gènes étudiés au cours de ce travail ont été identifiés à partir de cette banque avant mon arrivée. Or, avant l'obtention de la séquence complète du génome fin 2011 (<http://genome.jgi.doe.gov/Hebcy2/Hebcy2.home.html>), il était délicat de se lancer dans des stratégies d'étude fonctionnelle comme le RNAi car on ne pouvait pas être sûr que seul le gène d'intérêt était affecté. Pour ce qui est de la stratégie de surexpression de gènes, il en allait de même. On ne pouvait en effet pas évaluer les conséquences de la surexpression d'un gène endogène donné sur l'expression d'autres gènes qui n'étaient pas dans la banque EST. C'est pourquoi jusqu'à présent les seuls travaux utilisant la technique de surexpression génique chez *H. cylindrosporum* employaient des gènes d'autres organismes tels que ceux codant pour des protéines fluorescentes de type GFPs (Müller *et al.*, 2006; Rekanalt *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2013a) ou celui codant pour la metallothionéine de *P. involutus* (Bellion *et al.*, 2007). Par ailleurs, de nouveaux systèmes de transport de potassium et de phosphate ont été identifiés, ce qui nous a permis d'élargir l'éventail de gènes potentiellement impliqués dans les échanges de nutriments entre *H. cylindrosporum* et *P. pinaster*.

1.8 Objectifs et intégration de mes travaux de doctorat dans le contexte général

Le passage en revue de la littérature montre que la fonction principale de la symbiose ectomycorhizienne pour la plante est l'amélioration de sa nutrition hydrominérale. Or, très souvent, la disponibilité en nutriments, et en particulier en K^+ et en Pi , est fortement limitée à cause de leur forte adsorption aux minéraux du sol. L'association symbiotique avec des champignons ectomycorhiziens devient donc vitale pour les arbres forestiers qui peuvent alors accéder à des ressources qui leur sont peu ou pas accessibles. En retour, les champignons récupèrent des composés carbonés issus de la photosynthèse végétale qui leur est difficile de récupérer seuls. Dans ce contexte-ci, la mise en place de systèmes de transport efficaces occupe une place centrale dans la survie des deux partenaires. Ainsi, l'identification, la caractérisation et l'étude du rôle de ces protéines dans les échanges de solutés s'avère être un enjeu majeur tant pour la compréhension des mécanismes régissant cette association symbiotique que pour son utilisation en agroforesterie afin d'améliorer les rendements tout en limitant la quantité d'intrants.

C'est dans ce vaste contexte d'étude du transportome ectomycorhizien que s'intègrent mes travaux de thèse. En effet, ceux-ci visent à évaluer l'implication de deux systèmes de transport de K^+ (*HcTrk1* et *HcSKC*) et de deux transporteurs de Pi (*HcPT1.1* et *HcPT2*) du champignon *H. cylindrosporum* dans la nutrition ectomycorhize-dépendante du pin maritime. Tous ont été identifiés à partir d'une banque d'EST d'*H. cylindrosporum* (Lambilliotte *et al.*, 2004). *HcTrk1* a été caractérisé fonctionnellement en système hétérologue (levures et ovocytes de xénopes) comme étant un transporteur de K^+ et de sodium (Corratgé *et al.*, 2007). Le canal *HcSKC* reste récalcitrant à toutes les tentatives de caractérisation fonctionnelle (PhD R. Lambilliotte, 2004; PhD M.Z. Haider, 2009; post-doc A. Delteil, 2011-2013). Cependant, de par son homologie de séquence avec les canaux Shaker des animaux, on peut supposer qu'il intervient dans la sortie cellulaire du K^+ . *HcPT1.1* et *HcPT2* ont quant à eux été caractérisés en levures comme transporteurs de Pi (Tatry *et al.*, 2009). De plus, l'analyse de leur expression en culture pure a montré que *HcPT1.1* est régulé lors de carence en Pi et que *HcPT2* est exprimé constitutivement.

Afin de poursuivre l'analyse de ces systèmes de transport fongiques, trois questions biologiques majeures ont été posées en amont:

- Ou sont localisés les transcrits et les protéines de ces différents systèmes de transport au sein de l'ectomycorhize?

- Quelle est leur importance dans la biologie d'*H. cylindrosporum*? La modification de leur expression via des stratégies de génétique inverse (RNAi et surexpression) va-t-elle avoir un impact sur la nutrition du champignon?
- La mycorhization de *P. pinaster* par des lignées transgéniques d'*H. cylindrosporum* sur- ou sous-exprimant ces systèmes de transport va-t-elle impacter la nutrition potassique et phosphatée de la plante hôte?

Par ailleurs, de nouveaux gènes candidats ont pu être identifiés à partir du séquençage du génome d'*H. cylindrosporum*. Ainsi, cinq candidats potentiellement impliqués dans le transport de K^+ ont été mis en évidence. La participation à la caractérisation fonctionnelle en système hétérologue a été réalisée pour l'un d'entre eux, *HcTrk2*, homologue de *HcTrk1*. De plus, des outils moléculaires nécessaires à sa localisation dans l'ectomycorhize et à la compréhension de son rôle dans le transport de K^+ ont été élaborés. Tout ce travail a donc pour but d'apporter des connaissances sur les bases moléculaires de la nutrition potassique et phosphatée ectomycorhize-dépendante des plantes ligneuses.

Chapitre II - Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Partenaire fongique

Le symbionte ectomycorhizien étudié dans ce travail est le champignon supérieur *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi appartenant au clade des *Basidiomycota*. Les souches qui ont été utilisées sont la souche homocaryotique h7 qui présente l'avantage d'être séquencée, et la souche dicaryotique D2. Cette souche diploïde a été reconstituée en laboratoire à partir des souches haploïdes h7 et h1. A l'origine, toutes nous ont été fournies par l'équipe de recherche Symbiose Mycorhizienne du laboratoire Ecologie Microbienne (UMR CNRS 5557, Université Claude Bernard, Lyon, France). Elles sont maintenant gérées et stockées au laboratoire depuis une dizaine d'années.

De nouvelles lignées transgéniques génétiquement stables ont été obtenues par Agrotransformation de la souche homocaryotique h7 (Cf 2.4).

2.1.2 Partenaire végétal

La plante hôte qui a été utilisée est le pin maritime (*Pinus pinaster* Soland in Ait., Medoc, Landes-Sore-VG source, France) car il est considéré comme l'hôte habituel d'*H. cylindrosporum* en France. Les graines ont été obtenues à partir de semis.

2.2 Milieux et conditions de culture

2.2.1 Culture solide d'*Hebeloma cylindrosporum*

La culture solide d'*H. cylindrosporum* a fait intervenir principalement deux types de milieux. Le milieu YMG (yeast extract 4 g L⁻¹, malt extract 10 g L⁻¹, glucose 4 g L⁻¹, pH 7,2) est couramment employé pour le maintien des souches originelles et transgéniques. La composition de ce milieu très riche n'est pas finement contrôlée.

Le milieu contrôlé N6 (KNO₃ 6 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 0,5 mM, citrate ferrique 1 % 1 mL L⁻¹, thiamine HCl (100 µg L⁻¹) 1 mL L⁻¹, microéléments 0,2 mL L⁻¹, glucose 5 g/L, pH 5,5 ; mélange de microéléments : MnSO₄·1H₂O 3,08 g L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 4,41 g L⁻¹, H₃BO₃ 2,82 g L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0,98 g L⁻¹, Na₂MoO₄·2H₂O 0,29 g L⁻¹) a été quant à lui utilisé comme moyen de pré-culture pour des analyses phénotypiques en culture liquide.

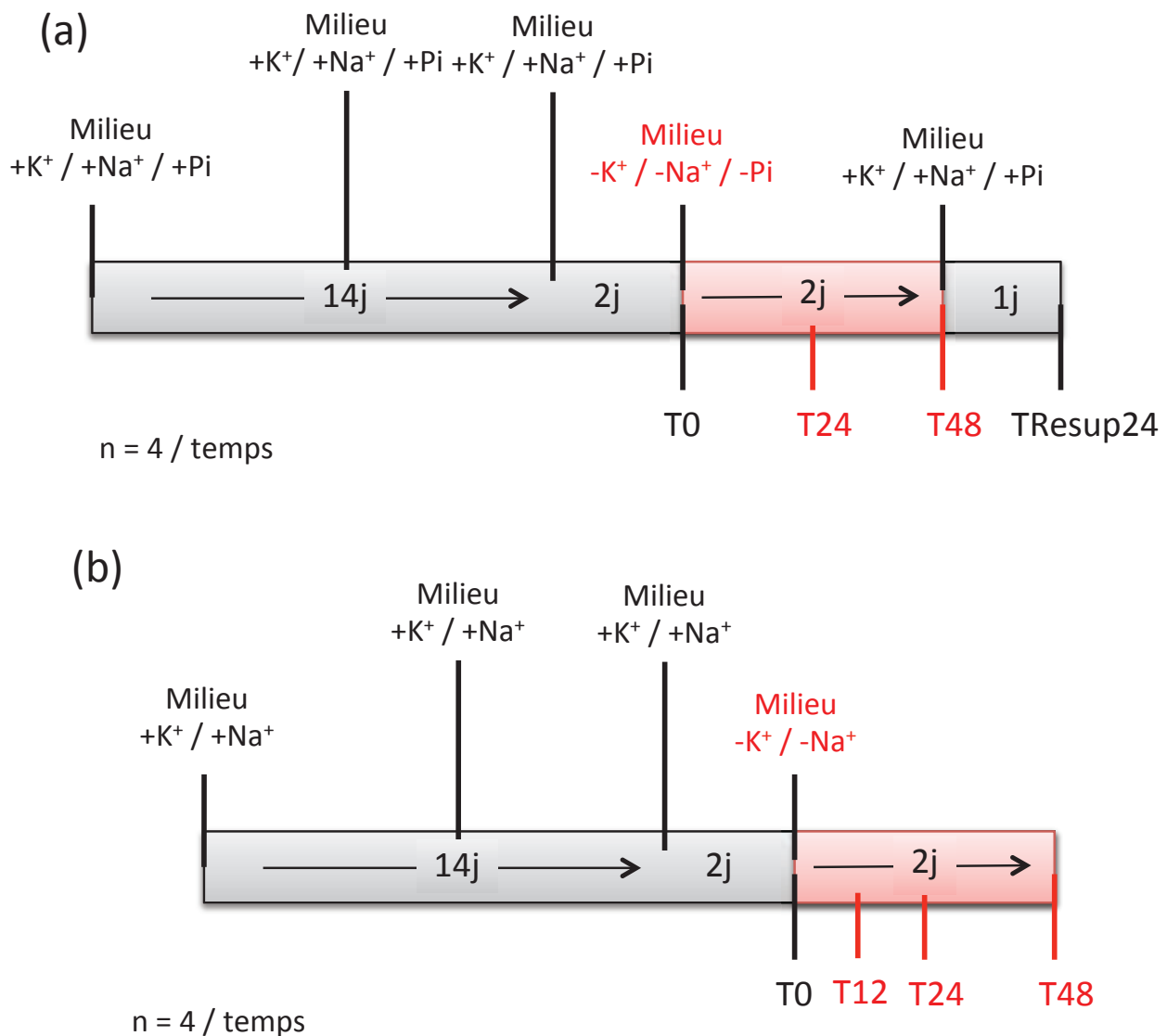


Figure 13: Représentation schématique des expériences de cinétique de carence en potassium, sodium ou phosphate inorganique d'*Hebeloma cylindrosporium* en culture pure.

Des cultures pures de la souche sauvage h7 uniquement (a) ou de h7 et des différentes souches transgéniques produites (b) sont cultivées durant 14 jours en milieu N6 liquide contenant notamment 10 mM de K⁺, 3 mM de Na⁺ et 3 mM de Pi. Un renouvellement de ce milieu a été réalisé à mi-parcours (J7) et au bout de ces 14 jours (a,b). Deux jours après ce renouvellement, le prélèvement T0 (a,b) est effectué puis les échantillons restants sont rincés et placés dans un milieu dépourvu de K⁺, Na⁺ ou Pi. Un prélèvement est effectué au bout de 12 h (T12, (b)), 24 h (T24, (a,b)) et 48 h (T48, (a,b)). Les échantillons restants sont placés dans un milieu N6 (a) et un prélèvement est effectué au bout de 24 h (TResup24, (a)).

2.2.2 Culture liquide d'*Hebeloma cylindrosporum*

La culture en milieu liquide d'*H. cylindrosporum* a fait intervenir le milieu YMG pour des expériences où la connaissance précise de la composition en nutriments du milieu n'est pas nécessaire, telles que les extractions d'ADN génomique ou les tests de stabilité mitotique.

Le milieu N6 liquide est utilisé pour des expériences où la quantification des composants du milieu est indispensable, comme les extractions d'ARN ou les dosages d'éléments. Des variantes du milieu N6 dépourvues de potassium (N6-K), de sodium (N6-Na) ou de phosphore (N6-P) ont été également utilisées, notamment pour évaluer la régulation de l'expression génique des différents systèmes de transport étudiés en fonction de la disponibilité en nutriments.

2.2.3 Cinétique de carence en potassium, sodium et phosphate d'*Hebeloma cylindrosporum*

Afin de réaliser des cinétiques de carence en nutriments d'*H. cylindrosporum* (Figure 13), la souche sauvage h7 a été inoculée dans du milieu N6 liquide à raison de quatre répétitions biologiques par point de prélèvement, et a été mise en culture à 24 °C. Le milieu est renouvelé au bout de 7 et 14 jours de culture afin de s'affranchir des conséquences d'une carence prolongée. Deux jours après, l'échantillon T0 est récupéré et les autres sont transférés dans du milieu liquide N6-K, N6-Na ou N6-P en fonction de la carence appliquée. Quatre répétitions biologiques ont été prélevées à différents temps (soit à 24 et 48 h, soit à 12, 24 et 48 h). Enfin, selon la cinétique considérée, les derniers échantillons restants ont été transférés sur du milieu N6 puis prélevés 24 h après afin d'obtenir le point T24-*resupply*.

2.3 Production d'ectomycorhizes

Afin de préparer la co-culture *Pinus pinaster* – *Hebeloma cylindrosporum*, les graines de pin ont été désinfectées à l' H_2O_2 30 % pendant 30 min. Elles ont ensuite été rincées plusieurs fois à l'eau déminéralisée stérile pour éliminer toute trace d' H_2O_2 . Elles ont enfin été hydratées 48 h à 72 h à 4 °C dans de l'eau déminéralisée. Elles sont ensuite placées dans des boîtes de Petri contenant un milieu gélosé (agar, 15 g L^{-1}) supplémenté en glucose (2 g L^{-1}) à raison d'une dizaine de graines par boîte. Ces dernières sont disposées verticalement en chambre de culture (16 h de jour, 8 h de nuit, 20 °C, humidité relative de 60 %, intensité lumineuse de 210 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pendant une quinzaine de jours.

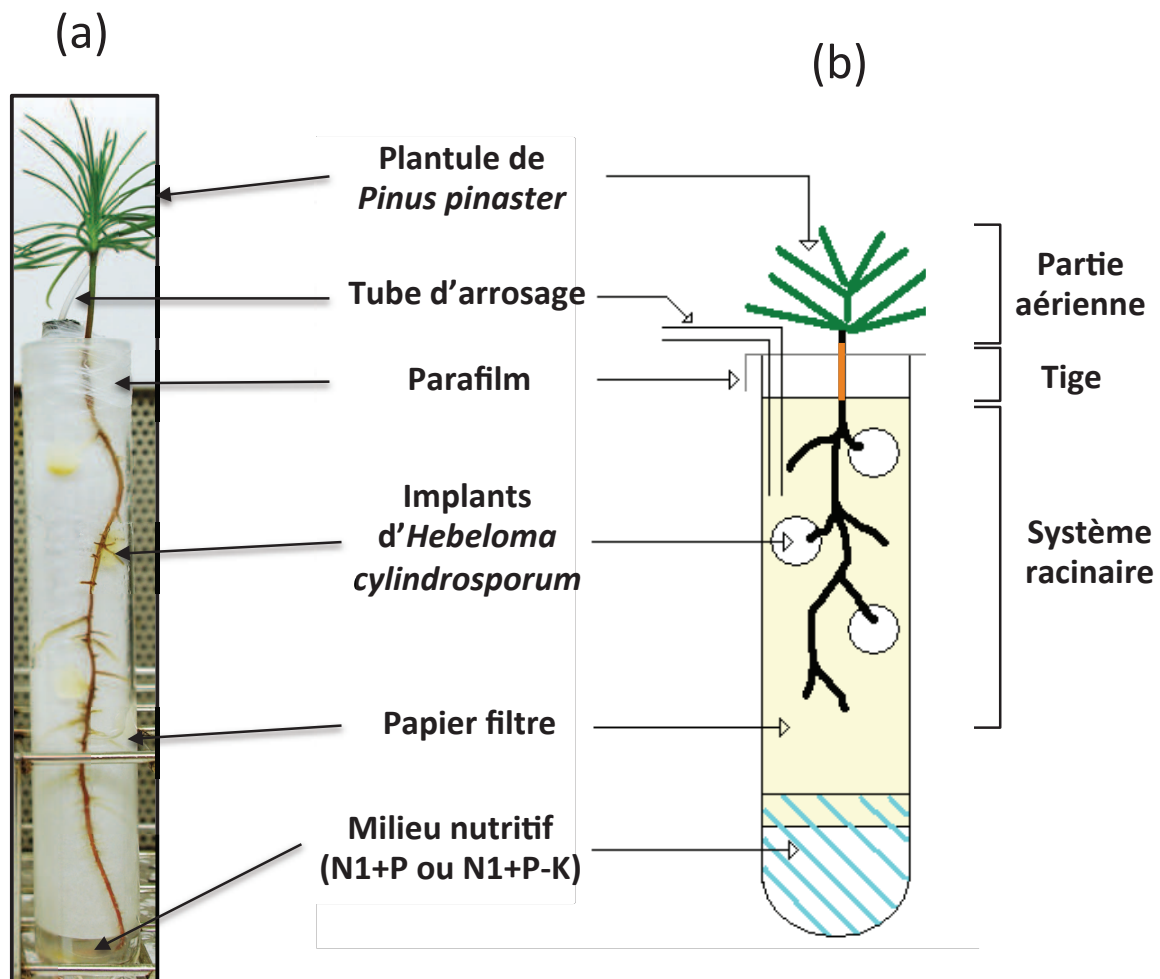


Figure 14: Production de mycorhizes *in vitro* formées par la plante hôte *Pinus pinaster* et le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*.

(a) Photographie du système de co-culture plante-champignon en tube après un mois de culture. (b) Schéma du système de co-culture plante-champignon correspondant. Les graines germées de *Pinus pinaster* et des implants d'*Hebeloma cylindrosporum* (4 à 5 implants par tube) sont placées pendant deux mois dans un tube en verre, entre une feuille de papier filtre et la paroi du tube. Du milieu de culture (environ 20 mL à chaque arrosage) est ajouté par le tube d'arrosage prévu à cet effet. Les solutions d'arrosages utilisées ici sont les milieux N1+P (milieu standard) ou N1+P-K (pauvre en potassium). Ces solutions vont remonter par capillarité le long du papier filtre afin de nourrir la plante. Les tubes sont recouverts de parafilm afin de garder l'intérieur stérile. Seule la partie aérienne n'est pas en condition stérile.

La mycorhization des plantes s'effectue dans des tubes en verre stériles d'après Plassard *et al.* (1994). Avec ce procédé de culture, seule la partie racinaire des plantes reste confinée dans un environnement stérile, ce qui évite une quelconque altération de croissance de la partie aérienne (Figure 14). Une feuille de papier stérile (Whatmann) est disposée dans chacun des tubes contenant 10 mL d'eau glucosée (2 g L⁻¹). Les tubes sont autoclavés deux fois à 48 h d'intervalle. L'eau glucosée est éliminée et 20 mL de milieu N1+P (Ca(NO₃)₂ 0,2 mM, KNO₃ 0,6 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM, MgSO₄ 1 mM, KCl 0,2 mM, citrate ferrique 1 % 0,5 mL L⁻¹, microelements 0,2 mL L⁻¹, thiamine (100 µg L⁻¹) 1 mL L⁻¹, pH 5,5) ou N1+P-K contenant vingt fois moins de potassium (Ca(NO₃)₂ 0,5 mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, MgSO₄ 1 mM, KCl 0,05 mM, citrate ferrique 1 % 0,5 mL L⁻¹, microelements 0,2 mL L⁻¹, thiamine (100 µg L⁻¹) 1 mL L⁻¹), sont ajoutés. Quatre implants des souches sauvages ou transgéniques d'*H. cylindrosporium* poussant depuis 15 jours sur du milieu YMG solide, sont ensuite disposés entre le papier filtre et la paroi du tube. La racine de la jeune plantule de pin est ensuite placée contre ces implants, et les tubes sont refermés par du parafilm. Ceux-ci sont transférés en chambre de culture et les plantes et / ou les mycorhizes sont récoltées au bout de deux mois. Un apport de milieu (environ 20 mL) une fois par semaine est nécessaire.

2.4 Agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporium* (d'après Combiér *et al.*, 2003)

Le protocole d'Agrotransformation décrit ci-dessous, issu des travaux de Combiér *et al.* (2003), nous a été gracieusement communiqué par Jeanne Doré et Delphine Melayah de l'équipe Symbiose Mycorhizienne du laboratoire Ecologie Microbienne (UMR CNRS 5557, Université Claude Bernard, Lyon, France) et a été légèrement modifié (Figure 15). Ce protocole a été couramment employé dans ce travail pour la production de lignées transgéniques d'*H. cylindrosporium*. Il a aussi été utilisé dans la tentative de transformation de *Laccaria bicolor* S238N présentée en Annexe 3.

2.4.1 Préparation du champignon

Un mois avant l'Agrotransformation, une culture liquide d'*H. cylindrosporium* a été broyée dans 80 mL d'YMG à l'aide d'un ultra-turrax (IKA, <http://www.ika.com/>). Le broyat est réparti dans quatre boîtes de Petri non scellées puis placé à 24 °C pendant une semaine. Deux des quatre thalles nouvellement formés sont de nouveau broyés comme précédemment indiqué. La production de thalles à partir du broyat est de plus en plus rapide, le but étant d'arriver à la formation d'un nouveau thalle le lendemain du broyage. Ainsi, des broyages

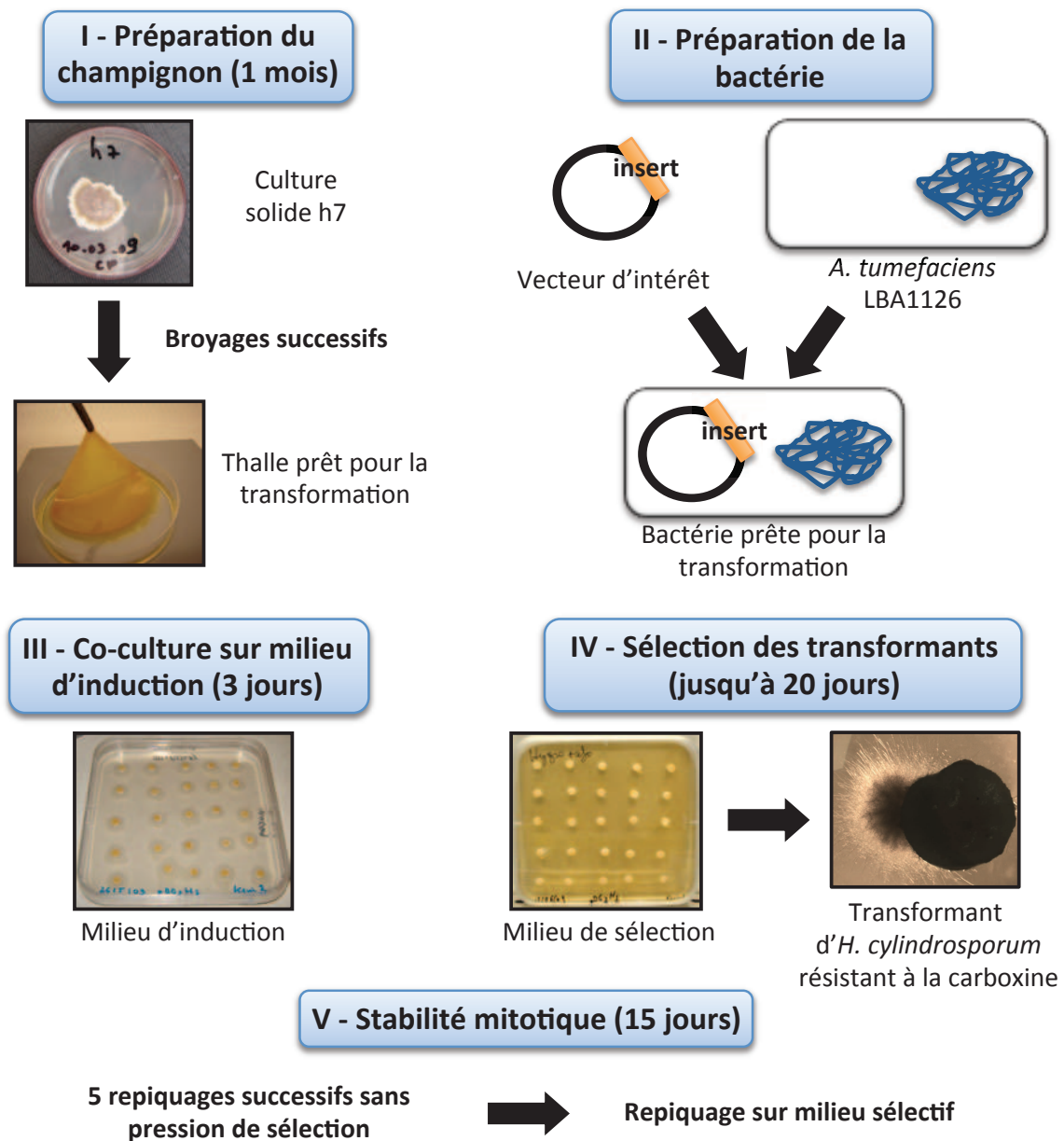


Figure 15: Etapes clés de la transformation d'*Hebeloma cylindrosporum* par *Agrobacterium tumefaciens*

I: Un mois de broyages successifs à partir d'une culture liquide est nécessaire pour obtenir un thalle susceptible d'être transformé par *Agrobacterium tumefaciens*. II: La souche LBA1126 d'*A. tumefaciens* est transformée avec les vecteurs d'intérêts. III: Le broyat de champignon (50 μ L / filtre) et la solution de bactéries (50 μ L / filtre) sont mis en contact sur des filtres de microfibrilles de verre, et inoculés pendant 3 jours sur du milieu d'induction. IV: Après transfert des filtres sur du milieu de sélection (YMG + carboxine), la sélection des transformants se fait de 10 à 20 jours. Les transformants sont individualisés sur du milieu de sélection pour confirmer la résistance à la carboxine. V: Quinze jours de repiquage des transformants sur du milieu sans pression de sélection (5 repiquages successifs) puis sur du milieu de sélection, à raison d'un repiquage tous les deux ou trois jours, permettent d'éliminer les transformants qui ne sont pas stables.

successifs de plus en plus rapprochés dans le temps sont nécessaires pendant un mois environ. Durant toute cette étape, aucun antibiotique n'est ajouté. Cependant, en cas de contamination du broyat, de la kanamycine ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), de la streptomycine ($30 \mu\text{g L}^{-1}$), du chloramphénicol ($30 \mu\text{g L}^{-1}$) et de la rifampicine ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) peuvent être ajoutés car *H. cylindrosporium* et les *Agrobacteria* transformées sont résistants (Figure 15I).

2.4.2 Préparation de la bactérie

La bactérie utilisée pour l'Agrotransformation d'*H. cylindrosporium* est la souche LBA1126 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Ngari *et al.*, 2009). Pour transformer les bactéries avec les vecteurs obtenus, une culture liquide de 50 mL d'*Agrobacteria* est réalisée dans du LBmod supplémenté en rifampicine ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). Elles sont incubées une nuit à $28 \text{ }^\circ\text{C}$, sous agitation. Le lendemain, la DO mesurée à une longueur d'onde de 600 nm doit être comprise entre 0,5 et 1. La culture est centrifugée à 6000 rpm pendant 5 min, puis le surnageant est évacué et le culot est repris dans 1 mL de CaCl_2 (20 mM) froid. Les bactéries doivent être conservées dans la glace. Un volume de 1 μL de chaque vecteur d'intérêt est mélangé à 100 μL d'*Agrobacteria*. Le tout est incubé dans la glace pendant 30 min, congelé rapidement à l'azote liquide, et enfin incubé 5 min à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Le mélange est ensuite replacé sur la glace pour quelques minutes puis 1 mL de LBmod est ajouté. Le tout est incubé 2 h à $28 \text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation puis étalé en partie sur des boîtes de LBmod supplémenté en rifampicine et en kanamycine ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). Après 2 à 3 jours d'incubation à $28 \text{ }^\circ\text{C}$, les colonies transformées commencent à apparaître. Les bactéries contenant le vecteur sont sélectionnées par PCR sur colonies avec les amorces correspondantes puis étalées individuellement. La veille de l'Agrotransformation, une colonie pour chaque vecteur est récupérée et inoculée dans 20 mL de LBmod supplémenté en rifampicine et en kanamycine, puis placé à $28 \text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation pendant 16 h (Figure 15II).

2.4.3 Agrotransformation

Le jour de l'Agrotransformation, chaque culture bactérienne est centrifugée à 3700 rpm pendant 15 min à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Le culot est repris dans 5 mL de milieu d'induction (Annexe 4). Un volume de 100 μL de la solution est prélevé, dilué au $10^{\text{ème}}$ dans du milieu d'induction et mesuré à une DO de 660 nm. La suspension bactérienne est diluée pour obtenir 5 ml à l'équivalent d'une $\text{DO}_{660\text{nm}}$ de 0,15 dans la solution finale, puis incubée 4 à 6 h à $28 \text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation. La $\text{DO}_{660\text{nm}}$ finale doit être comprise entre 0,3 et 0,4.

Cinquante filtres en microfibre de verre ont été disposés de façon homogène dans une boîte de Petri en verre et stérilisés au four pasteur. Juste avant l'Agrotransformation, 2 thalles de champignon sont broyées dans 60 mL de milieu YMG liquide. Un volume de 50 μL de ce broyat est déposé sur chacun des filtres. Chaque filtre est ensuite transféré sur des boîtes de Petri carrées (25 filtres par boîte) contenant du milieu d'induction solide (Annexe 4), et un volume de 30 μL de bactérie est ajouté rapidement. Chaque boîte est ensuite scellée par du parafilm et incubée 3 jours à 24 °C (Figure 15III).

2.4.4 Sélection des transformants et test de stabilité mitotique

Après trois jours de co-culture sur du milieu d'induction solide, les filtres sont transférés à l'envers sur le milieu de sélection composé d'YMG supplémenté en carboxine (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) pour sélectionner les champignons transformés, et en céfotaxime (200 μM) pour se débarrasser des *Agrobacteria* (Figure 15IV). Les transformants apparaissent à partir d'une dizaine de jours. Ils sont repiqués sur des boîtes individuelles contenant du milieu YMG et de la carboxine pour confirmer la résistance. Après 20-22 jours de co-culture, les éventuels nouveaux transformants ne sont plus récupérés.

Afin de vérifier la stabilité mitotique de la transformation, chaque transformant est repiqué successivement cinq fois de suite sur du milieu YMG sans pression de sélection. Le 6^{ème} repiquage est quant à lui effectué sur du milieu de sélection (YMG + carboxine). Seuls les transformants poussant à nouveau sur ce milieu sont utilisés pour la suite (Figure 15V).

2.5 Localisation de l'expression des gènes, des transcrits et des protéines

2.5.1 Construction de vecteurs de fusion transcriptionnelle

La localisation de l'expression génique des systèmes de transport candidats a été réalisée par une stratégie de fusion transcriptionnelle qui a été commencée au cours de mon stage de M1 (2009) et poursuivie lors du doctorat de Muhammad Z. Haider (2011). Brièvement, cette stratégie nécessite la production de souches transgéniques d'*H. cylindrosporum* contenant l'ADNc du gène marqueur EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) sous contrôle de la région promotrice de chaque gène candidat.

La construction des vecteurs appropriés a nécessité l'amplification des régions promotrices d'environ 1 kb pour chaque gène candidat par les amorces correspondantes (Haider, 2011). Au commencement de ces analyses, le génome d'*H. cylindrosporum* n'était pas disponible. Par conséquent, une séquence d'environ 1000 nucléotides avait été définie et

amplifiée pour chacun des gènes. Suite aux résultats obtenus avec la construction contenant le promoteur du gène *HcPT1.1*, discutés dans le chapitre IV, une région promotrice de 629 nucléotides a été amplifiée à l'aide des amorces pPT1.1-3/5-SpeI-For et pPT1.1-SpeI-Rev (Garcia *et al.*, 2013a). L'obtention de ces différentes constructions étant détaillées dans les travaux de M.Z. Haider (2011) et dans l'article Garcia *et al.* (2013a) présenté au chapitre IV, elle n'est pas répétée ici. De plus, M.Z. Haider avait obtenu les lignées transgéniques contenant les fusions transcriptionnelles pour les gènes *HcTrk1* et *HcSKC* et les résultats en microscopie confocale correspondants. Ainsi, seuls les travaux concernant la nouvelle construction pour *HcPT1.1* seront présentés dans le chapitre IV.

2.5.2 Construction de vecteurs de fusion traductionnelle

Dans ce travail, la localisation des protéines candidates a été effectuée par une stratégie de fusion traductionnelle en C-terminal. Cette stratégie a consisté à produire des vecteurs exprimant la cassette EGFP fusionnée à l'ADNc de nos gènes candidats. Ces derniers ont été dépourvus de leur codon STOP et chaque cassette a été placée sous contrôle de la région promotrice du gène candidat considéré.

Il a donc fallu dans un premier temps construire le vecteur intermédiaire possédant la cassette EGFP en amont du terminateur fort T35S. Pour ce faire, la cassette EGFP::T du vecteur pBGgHg (Chen *et al.*, 2000, Figure 16a) a été amplifiée à l'aide des amorces EGFP-EcoRI-SpeI-F et T35S-XbaI-R (Tableau 1) afin d'introduire les sites de restriction *EcoRI* et *SpeI* en amont de la cassette, et le site *XbaI* en aval. Le fragment obtenu a ensuite été digéré par *EcoRI* et *XbaI*, puis inséré dans le MCS du vecteur pPZP133 (Ngari *et al.*, 2009, Figure 16b) conférant la résistance à la carboxine à *H. cylindrosporium*. Ainsi, le vecteur pPZP-EGFP-T possédant les sites de restriction *EcoRI* et *SpeI* uniques en amont de la EGFP a été produit (Figure 16c).

En parallèle, la cassette Promoteur::ADNc de chaque gène candidat a été amplifiée par la technique de PCR chevauchante. Brièvement, la région promotrice est amplifiée à l'aide d'une amorce spécifique contenant le site de restriction *SpeI* (PromY-*SpeI*-F ; Y = nom du gène candidat) et d'une amorce chevauchante constituée des 20 nucléotides terminant la région promotrice et des 20 nucléotides débutant l'ADNc (PromY-Y-R). De la même façon, l'ADNc correspondant a été amplifié à l'aide d'une amorce spécifique contenant le site de restriction *EcoRI* ou *SpeI* et dépourvue du codon STOP (Y-*SpeI*-R), et d'une amorce chevauchante (PromY-Y-F). Les séquences de ces amorces sont listées dans le tableau 1.

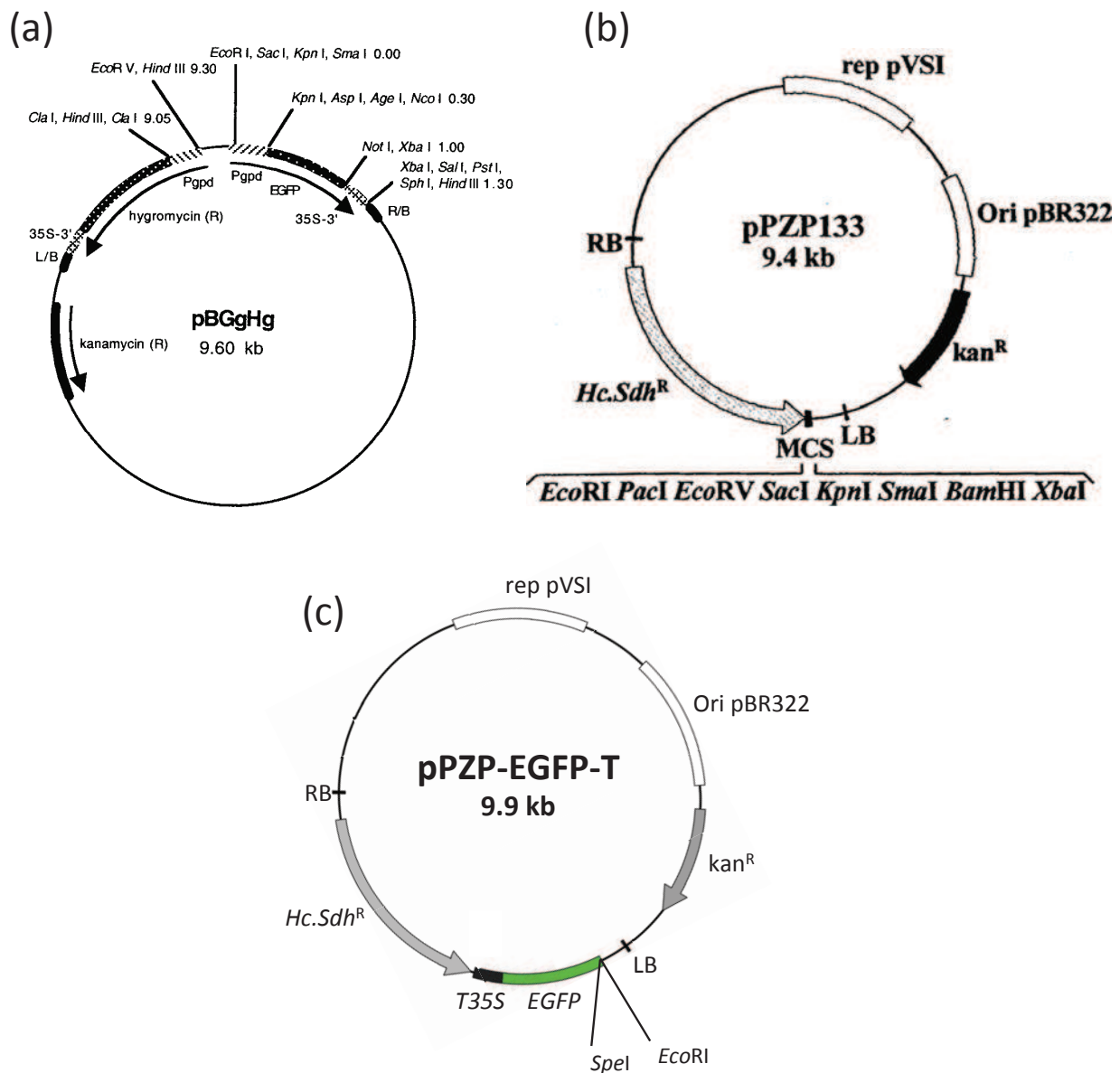


Figure 16: Carte des vecteurs pBGgHg, pPZP133 et pPZP-EGFP-T utilisés pour la stratégie de fusion traductionnelle chez *Hebeloma cylindrosporum*.

(a) Carte du vecteur pBGgHg publié par Chen *et al.* (2000). (b) Carte du vecteur pPZP133 publié par Ngari *et al.* (2009). (c) Carte du vecteur pPZP-EGFP-T construit au cours de ce travail. Les sites de restriction *SpeI* et *EcoRI* situés en amont de l'ADNc de la EGFP permettent d'insérer la cassette Promoteur::ADNc des gènes candidats pour former des vecteurs de fusion traductionnelle et conférer la résistance à la carboxine à *Hebeloma cylindrosporum*. LB: bordure gauche de l'ADN-T; RB: bordure droite de l'ADN-T; kan^R: cassette de résistance à la kanamycine (sélection des bactéries transformées); *Hc.Sdh^R*: cassette de résistance à la carboxine (sélection des champignons transformés); rep pVSI et Ori pBR322: cassettes nécessaires à la répllication du plasmide. Dessiné en conservant le format du pPZP133.

Une fois ces amplifications effectuées, 1 μ L de chacun des deux produits PCR (produit 1 = promoteur ; produit 2 = ADNc) est utilisé pour une nouvelle amplification PCR à l'aide des deux amorces spécifiques précédemment citées (PromY-*EcoRI*/*SpeI*-F et Y-*EcoRI*/*SpeI*-R). Le produit final obtenu, constitué de la cassette Promoteur::ADNc, est alors purifié, digéré par *EcoRI* et / ou *SpeI*, et inséré dans le vecteur pPZP-EGFP-T. Ainsi, les vecteurs pPZP-CterTrk1, pPZP-CterSKC, pPZP-CterPT1.1 et pPZP-CterPT2 ont été créés et utilisés pour produire les lignées transgéniques correspondantes d'*H. cylindrosporum*.

Utilisation	Nom	Séquence 5' - 3'
Vecteur pPZP-EGFP-T	EGFP- <i>EcoRI</i> - <i>SpeI</i> -F	GAATTC ACTAGT ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
	T35S- <i>XbaI</i> -R	GGATCCT CTAG AGGATCAATTCGGGGGATC
Vecteur pPZP-PTrk1-Trk1::E	PromTrk1- <i>SpeI</i> -F	CCTT ACTAGT TTACCTAGAACCAAGCTCATCGACG
	PromTrk1-Trk1-R	TCTGCGGGCTGGTCCACCATGGGTATCAGGATAGGTATAA
	PTrk1-Trk1-F	TTATACCTATCCTGATACCCATGGTGGACCAGCCCGCAGA
	HcTrk1- <i>SpeI</i> -R	CCTT ACTAGT AATTCTAAGAGGCGGTAAATTAGGAG
Vecteur pPZP-PSKC-SKC::E	PromSKC- <i>SpeI</i> -F	CCTT ACTAGT CCCAATCACCTTCAAAAACGAAGG
	PromSKC-SKC1-R	ATGGTCGAGGCGGAGGCCATCAAGCAACGTGCACACAAAC
	PSKC-SKC-F	GTTTGTGTGCACGTTGCTTGATGGCCTCCGCCTCGACCAT
	HcSKC- <i>SpeI</i> -R	CCTT ACTAGT GCTAGCTTCTCCAGCTACCTTC
Vecteur pPZP-PPT1.1-PT1.1::E	PromPT1.1- <i>SpeI</i> -F	CCTT ACTAGT TATGACAGCTGAGAGTTGACATGTT
	PromPT1.1-PT1-R	TTCTCTTGGTAGCTAGCCATTGGAAGACGAGGAGGATTGG
	PPT1.1-PT1-F	CCAATCCTCCTCGTCTTCCAATGGCTAGCTACCAAGAGAA
	HcPT1.1- <i>SpeI</i> -R	CCTT ACTAGT AGCGGTGGTGTATGGGCGCA
Vecteur pPZP-PPT2-PT2::E	PromPT2- <i>SpeI</i> -F	CCTT ACTAGT TGACCAATAATTATATGCCGAGCGG
	PromPT2-PT2-R	TCGTGCATAGGTTCCGCCATCCGGGTATGGTTGCAGCCTG
	PPT2-PT2-F	CAGGCTGCAACCATACCCGGATGGCGGAACCTATGCACGA
	HcPT2- <i>SpeI</i> -R	CCTT ACTAGT AGTTTCCTTCACCACTGGTTCTG

Tableau 1: Amorces utilisées pour la construction des vecteurs de fusion traductionnelle des candidats *HcTrk1*, *HcSKC*, *HcPT1.1* et *HcPT2*.

Les séquences en rouge correspondent aux sites de restrictions indiqués dans le nom de l'amorce.

2.5.3 Observation des échantillons en culture pure au microscope à épifluorescence

Le mycélium de champignons transformés ayant poussé une semaine en culture pure liquide a été récupéré, rincé à l'eau et monté entre lame et lamelle en évitant toute blessure et tout contact direct avec la lumière. En effet, ces deux facteurs semblent stresser *H. cylindrosporum* qui va alors émettre une autofluorescence dans le vert gênant les observations. Les lames ont été observées au microscope à épifluorescence (Olympus BX61 avec une camera ORCA-ER Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Japan)) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission de 509 nm.

2.5.4 Observation des ectomycorhizes au microscope confocal

Après deux mois de co-culture, les ectomycorhizes ont été récoltées puis incluses dans de l'agarose 4 %. Des coupes de 50 μm ont ensuite été faites à l'aide d'un vibratome (Microm HM650V, Thermo Scientific). Un traitement au *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) conjugué avec de l'Alexa Fluor[®] 555 a été réalisé afin de marquer spécifiquement la chitine, facilitant la localisation du champignon dans les mycorhizes. Ainsi, les coupes sont incubées dans une boîte de Petri contenant du PBS 1 X (Na_2HPO_4 7 mM, NaH_2PO_4 3 mM, NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) et du WGA-Alexa Fluor[®] 555 (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce (6-9 rpm). Le lendemain, les coupes sont rincées par trois bains successifs de 5 min dans du PBS 1 X, montées entre lame et lamelle, puis observées au microscope confocal (Axiovert 200M Zeiss LSM 510 Meta, avec un objectif C-Apochromat 40 X/1,2 ; plateforme MRI (*Montpellier RIO Imaging*)) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm pour la EGFP et de 555 nm pour l'Alexa Fluor[®] 555. La fluorescence émise a été observée aux longueurs d'ondes de 509 nm pour la EGFP ("band-pass" 505-530 nm) et de 565 nm pour l'Alexa Fluor[®] 555 ("band-pass" 530-600 nm). L'analyse des images a été faite à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser Version 4,2,0,121.

2.6 Localisation de transcrits par hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* (HIS) consiste en une localisation des transcrits d'un gène sur des coupes histologiques à l'aide de sondes ARN (300 à 400 nucléotides) capables de former des duplex ARN (sonde) / ARN (transcrit). Les HIS présentées ici ont été la continuité des travaux effectués par Claire Corratgé (2006) qui a fourni un travail de mise au point colossal au cours de son doctorat. Parmi les méthodes testées, seul un marquage des sondes à l'UTP-digoxigénine et une révélation du signal à l'anticorps digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline ont été utilisés ici. Les HIS ont été faites sur des coupes d'ectomycorhizes obtenues après deux mois de co-culture entre *P. pinaster* et les souches sauvages d'*H. cylindrosporum* h7 ou D2 sur milieu de culture standard (N1+P) ou carencé en phosphate (N1-P) en fonction des gènes étudiés.

2.6.1 Synthèse des sondes sens et antisens marquées à la dUTP-digoxigénine

Une succession de plusieurs étapes a été nécessaire pour synthétiser les sondes sens et antisens de chaque gène étudié (Figure 17I). Ces synthèses avaient déjà été réalisées avant mon arrivée dans l'équipe, hormis pour *HcTrk2*. Ainsi, une première amplification PCR a été

faite à partir de l'ADNc de *HcTrk2*. Le couple d'amorces employé (Tableau 2) permet d'ajouter le promoteur T7 en amont (sonde sens, Trk2-T7-F / Trk2-R) ou en aval (sonde antisens, Trk2-F / Trk2-T7-R) de la matrice ADNc.

Utilisation	Nom	Séquence 5' - 3'
Sonde sens	Trk2-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCTTCTGTTGCCATGTCAG
	Trk2-R	GGAATGCCGAATTCCTGCCAAC
Sonde antisens	Trk2-F	CACCTTCTGTTGCCATGTCAG
	Trk2-T7-R	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAATGCCGAATTCCTGCCAAC

Tableau 2: Amorces utilisées pour la construction des sondes sens et antisens utilisées en hybridation *in situ* pour le candidat *HcTrk2*.

Les séquences en rouge correspondent au promoteur T7 indiqué dans le nom de l'amorce.

Une seconde amplification PCR à partir d'une dilution au 1:100 de la première a été faite à l'aide des amorces T7-promo et Trk2-dir ou Trk2-rev afin d'enrichir le produit PCR en amplicons contenant bien le promoteur T7. Les produits obtenus sont purifiés grâce aux kit GeneJET PCR Purification (Termo Scientific) et dosés au nanodrop afin d'en connaître la concentration.

La troisième étape est une transcription *in vitro* (TIV) aboutissant à la synthèse d'ARNc à partir du produit des deuxièmes PCR. Pour ce faire, le kit MAXIscript® (Ambion) a été utilisé. Brièvement, 500 ng du produit des deuxièmes PCR sont incubés 2 h à 37 °C avec 1 µL de dATP, de dCTP et de dGTP (10 mM), 0,6 µL de dUTP et 0,4 µL de dUTP fusionnés à la digoxygénine (dUTP-dig) (10 mM), 2 µL de tampon et 3 µL de T7 ARN polymerase. Afin d'éliminer toute trace d'ADN, un traitement DNase avec 1 µL (2U) de DNase I est effectué à 37 °C pendant 30 min. Les ARNc obtenus sont purifiés et précipités à l'ammonium acétate et à l'isopropanol, puis dosés au nanodrop.

Afin d'augmenter le signal, une queue dUTP-dig est ajoutée en 3' de chaque sonde à l'aide du kit *Dig Oligonucleotide Tailing* (Roche). Pour cela, 4 µL de sonde sont mélangés à 5 µL d'eau DEPC puis dénaturés à 65 °C pendant 3 min. A ce mélange est ajouté 4 µL de tampon, 4 µL de CoCl₂, 1 µL de dUTP-dig, 1µL de dATP et 1 µL de *Terminal transferase* avant d'être incubé à 37 °C pendant 15 min.

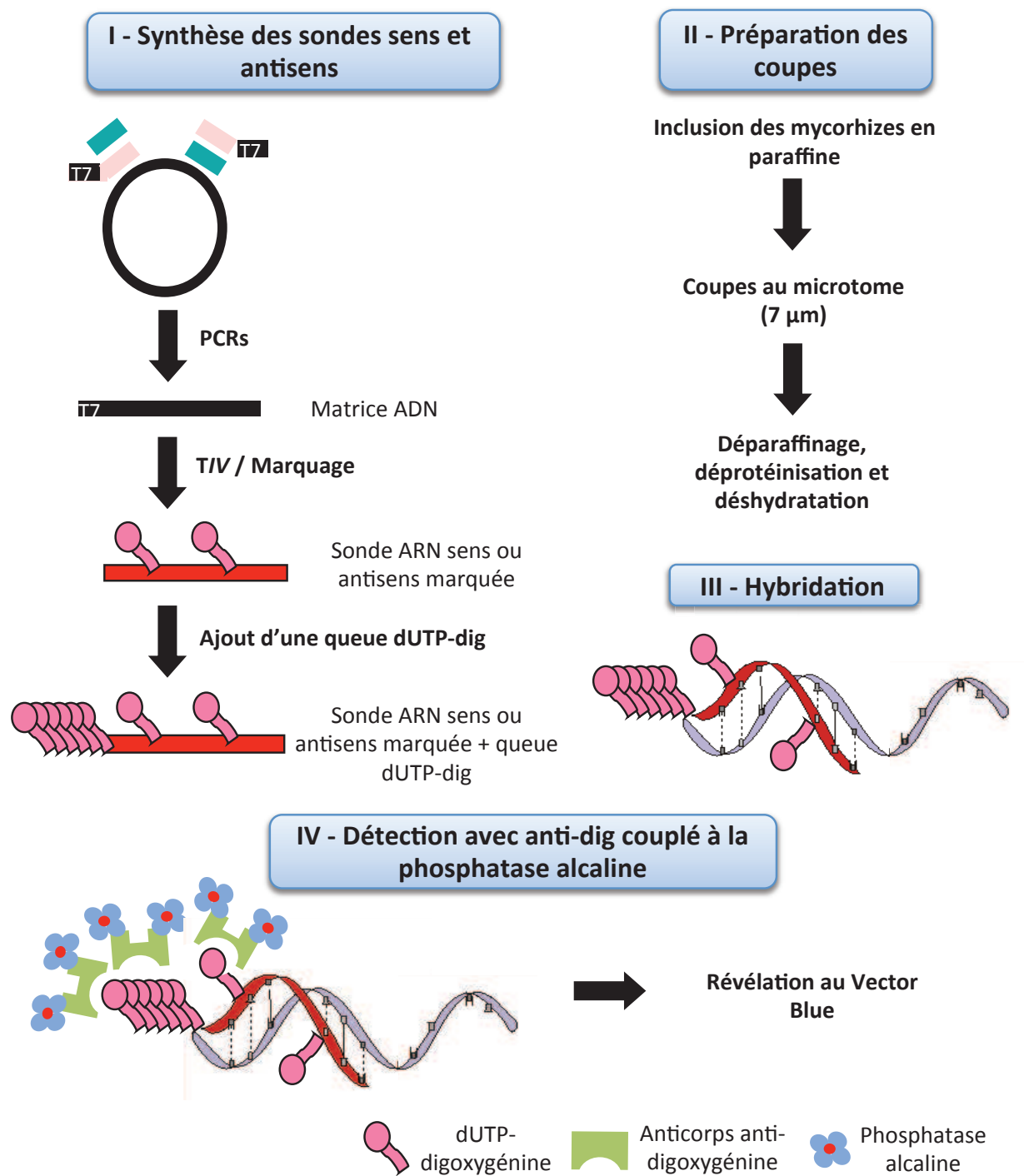


Figure 17: Etapes clés de l'hybridation *in situ*.

I: Synthèse des sondes sens et antisens faisant intervenir deux amplifications PCR successives, une transcription *in vitro* (TIV), un marquage à l'dUTP-digoxygénine et l'ajout d'une queue dUTP-dig. II: Etapes de la préparation de coupes de mycorhizes de *Pinus pinaster* – *Hebeloma cylindrosporum* âgées de 2 mois. III: Etape d'hybridation des sondes antisens sur les ARN sens des coupes histologiques formant des duplex ARN sonde (rouge) / ARN transcrit (gris). IV: Utilisation d'anticorps fusionnés au substrat du Vector Blue, la phosphatase alcaline. Ces anticorps vont reconnaître la digoxigénine. Redessiné d'après Corratgé (2006).

La dernière étape consiste à vérifier le marquage des sondes par la technique de Dot-Blot. Ainsi, trois dilutions de chaque sonde (1:10, 1:100 et 1:1000) ont été réalisées dans de l'eau DEPC. Un volume de 1 μ L de chaque dilution est ensuite disposé sur une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham). De plus, 1 μ L d'une sonde dont la concentration est connue est également déposée. Après séchage des dépôts, les acides nucléiques sont fixés par une exposition aux UV durant 2 min. Puis, la membrane est bloquée par une solution de blocage (dilution 1:10 d'une solution 10 % de Roche dans du tampon PBS 1 X) pendant 1 h sous agitation. Ensuite, la membrane est incubée durant 1 h sous agitation dans une dilution dans du PBS 1 X (1:1000) d'anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline. La réaction est arrêtée avec 2 μ l d'EDTA (0,2 M). Enfin, la membrane est rincée 3 fois 10 min dans une première solution de rinçage (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 150 mM), puis 10 min dans une deuxième solution (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 100 mM) avant d'être incubée dans une solution de NBT/BCIP (Euromedex) sous agitation jusqu'à apparition des spots. L'intensité des spots permet d'estimer la quantité de chaque sonde. Celles-ci sont donc à présent prêtes pour l'hybridation.

2.6.2 Fixation et inclusion en paraffine des ectomycorhizes

Toutes les étapes de fixation des échantillons et d'inclusion en paraffine décrites ci-dessous (Figure 17II) ont été réalisées soit par Claire Corratgé au cours de son doctorat (2006), soit par Geneviève Conéjéro de la plateforme d'imagerie du CIRAD de Montpellier.

Une fois les ectomycorhizes collectées, elles ont été placées dans du paraformaldéhyde (4 % dans du PBS 1 X) supplémenté de 20 μ L d'une solution aqueuse de Tween20 (0,01 %). Cette étape permet de fixer les tissus, consolidant ainsi les structures cellulaires des échantillons. La pénétration du fixateur dans les tissus est améliorée par une incubation sous vide pendant 1 h. La solution de fixation est ensuite renouvelée et les échantillons sont placés une nuit à 4 °C sous agitation. Le fixateur est bloqué par deux rinçages successifs de 15 min dans du PBS 1 X contenant de la glycine, puis un rinçage de 15 min dans du PBS 1X uniquement.

Les échantillons sont alors déshydratés à l'aide de bains éthanol-eau aux concentrations croissantes en éthanol afin d'éliminer progressivement l'eau. Ainsi, un bain de 30 min dans de l'éthanol à 50 %, un bain de 30 min puis d'une heure dans de l'éthanol à 70 %, deux bains de 30 min dans de l'éthanol à 95 % sont successivement effectués. Afin de rendre les échantillons moins friables, l'éthanol est progressivement remplacé par du butanol

grâce à un bain de 30 min, puis un bain d'1 h dans un mélange d'éthanol / butanol (v/v). Les échantillons sont ensuite incubés dans du butanol pur à 4 °C durant 2 à 3 jours avec un renouvellement du butanol le deuxième jour. Le butanol est ensuite remplacé par le solvant de la paraffine (Safesolv, Labonord) à l'aide de 3 bains successifs (un bain d'1 h avec un ratio butanol / Safesolv de 2/1 (v/v), puis un bain d'1 h avec un ratio butanol / Safesolv de 1/2 et deux bains d'1 h dans du Safesolv pur). Trois autres bains permettent de substituer progressivement la paraffine (Paraplast X tra, Labonord) à son solvant. Ainsi, un premier bain d'1 h à 45 °C avec un ratio Safesolv / Paraplast de 3/1 (v/v), puis un bain d'une nuit à 45 °C avec un ratio Safesolv / Paraplast 1/1 et le lendemain un dernier bain de 2 h à 58 °C avec un ratio Safesolv / Paraplast de 1/3 sont réalisés. Les échantillons sont ensuite incubés dans de la paraffine pure pendant 24 h à 58 °C sous agitation en renouvelant une fois le bain. Le lendemain les échantillons sont prélevés et déposés préalablement remplis de Paraplast à 58 °C. Une fois les blocs refroidis, les coupes peuvent être faites.

2.6.3 Préparation et traitement des coupes

Des coupes d'une épaisseur de 7 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Hisorange, LKB). Elles sont ensuite transférées sur des gouttes d'eau DEPC préalablement déposées sur des lames de verre silanisées. Afin que l'eau s'évapore, les lames sont mises à sécher à 40 °C pendant une heure, puis une nuit à 37 °C.

Afin d'enlever la paraffine des coupes, une succession de plusieurs bains est réalisée. Trois bains de 10 min dans du Safesolv, permettent de supprimer toute trace de paraffine. Cependant, ce traitement déshydrate les coupes. Pour les réhydrater, les coupes sont plongées dans trois bains successifs de 5 min d'éthanol 100 %; un bain de 2 min d'éthanol 70 %, un bain de 2 min d'éthanol 50 %; et enfin deux bains de 2 min dans de l'eau DEPC.

Pour supprimer les protéines associées aux acides nucléiques qui pourraient gêner l'hybridation, une protéase sélective est utilisée. Il s'agit de la protéinase K dont le cofacteur est le calcium. Elle est diluée 1500 fois dans du tampon protéinase K (Tris-HCl pH 7,5 100 mM, EDTA 50 mM) pour une concentration finale de 0,1 U mL⁻¹ (3,3 µg mL⁻¹).

Les coupes se décollant très facilement des lames, la suite sera faite en déposant 1 mL de chaque solution sur les lames posées à plat, et non par des bains. Ainsi, 1 mL de solution de protéinase K est déposé sur chaque lame. Ces dernières sont mises à incuber 35 min à 37 °C. Pour stopper la réaction, 1 mL de tampon d'arrêt de la protéinase K (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 50 mM) est déposé sur les lames pendant 5 min, et ce deux fois

de suite. Puis, 1 mL de tampon PBS 1 X + 0,2 % de glycine est déposé sur chaque lame pendant 2 min, et enfin 1 mL de PBS 1 X durant deux fois 2 min.

Les coupes sont ensuite déshydratées afin de contrôler la concentration de la sonde. En effet, les RNases continuent à être actives si le milieu reste hydraté. Ainsi, 1 mL d'éthanol 50 % puis 1 mL d'éthanol 70 % sont déposés sur les lames pendant 1 min puis 1 mL d'éthanol 100 % durant deux fois 1 min permettent de les déshydrater complètement. Les lames sont enfin séchées quelques minutes avant de coller les chambres d'hybridation.

2.6.4 Hybridation

Une fois les chambres d'hybridation collées sur les lames, 100 µL de la solution d'hybridation constituée de 50 µL de formamide déionisé, 10 µL de tampon SSC 20 X (NaCl 3 M, citrate de sodium 300 mM, pH 7), 20 µL de dextran sulfate 50 %, 1 µL de Denhardt 100 x, d'ARNt (100 mg mL⁻¹) préalablement dénaturés à 80 °C pendant 5 min, et 200 ng de sonde dénaturée à 65 °C pendant 8 min sont préparés et déposés dans chaque chambre d'hybridation (Figure MM5III). Les lames sont ensuite placées à 45 °C pendant 15 h dans un thermocycleur dont l'atmosphère est saturée en eau.

Le lendemain, les chambres d'hybridation sont enlevées et une succession de bains est réalisée pour nettoyer les coupes. Ainsi, vont se succéder un bain de 5 min à température ambiante dans du SSC 2 X, un bain de 45 min à 50 °C dans du SSC 2 X, un bain de 5 min à température ambiante dans du tampon NTE 1 X (Tris 0,01 M, NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, pH 7,5), un bain de 5 min à 37 °C dans du NTE 1 X, un bain de 30 min à 37 °C dans une solution de RNase A (20 µg mL⁻¹) dans du NTE 1 X, deux bains de 5 min à 37 °C dans du NTE 1 X et un bain de 30 min à 55 °C dans du SSC 1 X.

2.6.5 Révélation du signal

Afin de localiser les transcrits de nos gènes candidats, les lames sont rincées 10 min avec du PBS 1 X, puis incubées 1 h dans une solution de blocage 1 %. Ensuite, une dilution 1:500 d'anticorps anti-digoxigénine (anti-dig) conjugués à la phosphatase alcaline dans la solution de blocage 1 % est préparée et ajoutée sur les lames. Celles-ci sont alors incubées 45 min à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau, puis rincées dans trois bains de 10 min de PBS 1 X suivi d'un bain de 10 min dans du Tris pH 8,2. Enfin, une solution du substrat de la phosphatase alcaline, le Vector Blue, est préparée (2 gouttes de chacun des trois réactifs dans 5 mL de Tris-HCl 100 ml pH 8.2) et 1 mL est déposé sur chaque lame. Le tout est incubé

durant 3 h maximum à température ambiante et à l'obscurité (Figure 17IV). L'opération est répétée une seconde fois après avoir rincé les lames. Le tout est incubé une nuit dans du tampon Tris pH 8,2. Enfin, les lames sont montées au Mowiol (Calbiochem) et observées à l'aide d'un microscope à lumière blanche.

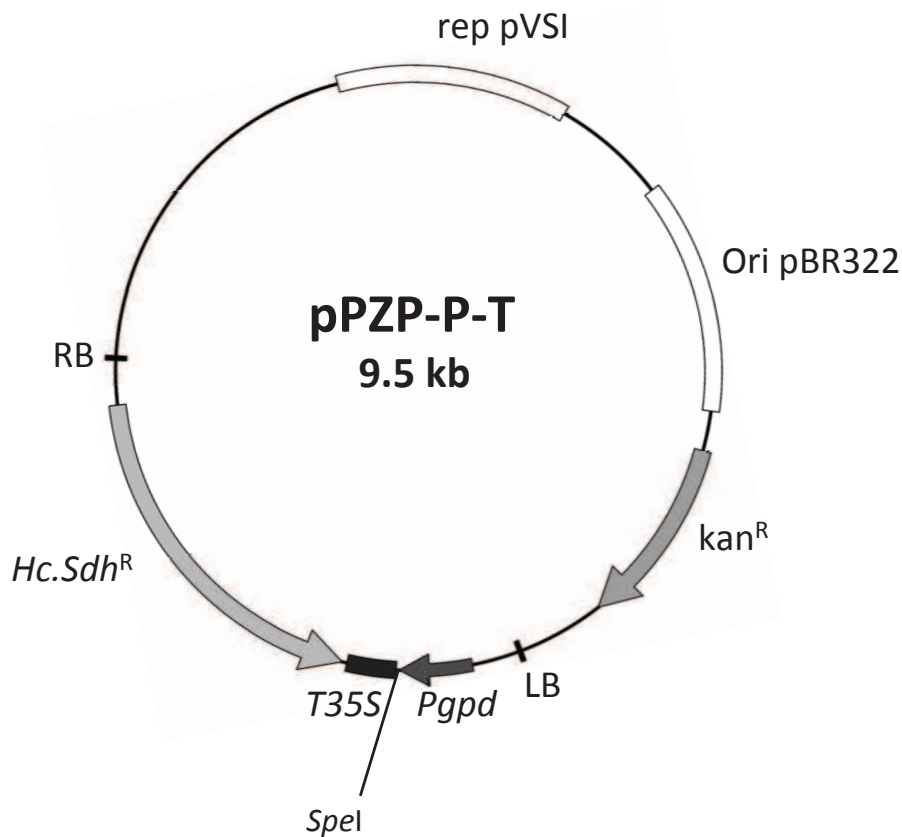


Figure 18: Carte du vecteur intermédiaire pPZP-P-T utilisé pour la surexpression de gènes chez *Hebeloma cylindrosporum*.

Le site de restriction *SpeI* situé entre le promoteur constitutif *Pgpd* et le terminateur fort *T35S* permet d'insérer la cassette ADNc des gènes candidats pour former des vecteurs de surexpression et conférant la résistance à la carboxine à *Hebeloma cylindrosporum*. LB: bordure gauche de l'ADN-T; RB: bordure droite de l'ADN-T; *kan^R*: cassette de résistance à la kanamycine (sélection des bactéries transformées); *Hc.Sdh^R*: cassette de résistance à la carboxine (sélection des champignons transformés); *rep pVSI* et *Ori pBR322*: cassettes nécessaires à la répllication du plasmide. Dessiné en conservant le format du pPZP133 d'après Ngari *et al.* (2009).

2.7 Surexpression et RNAi de gènes chez *Hebeloma cylindrosporum*

2.7.1 Construction de vecteurs de surexpression

La construction de vecteurs de surexpression de gènes endogènes chez *H. cylindrosporum* a nécessité en amont l'obtention du vecteur pPZP-P-T (Figure 18) contenant le promoteur fort *Pgpd* et le terminateur *T35S*. Seuls les sites de restriction uniques *EcoRI* et *SpeI* sont présents entre le promoteur et le terminateur pour l'insertion de l'ADNc. L'ADNc des différents gènes étudiés a donc été amplifié par PCR à l'aide des couples d'amorces correspondants (Tableau 3), puis ligué au vecteur pPZP-P-T. Ainsi, les plasmides pPZP-OE-Trk1 ; pPZP-OE-SKC ; pPZP-OE-PT1.1 et pPZP-OE-PT2 ont été produits.

Utilisation	Nom	Séquence 5' - 3'
Vecteur OE-Trk1	HcTrk1-SpeI-F	CCTT ACTAGT ATGGTGGACCAGCCCCGAGATTTA
	HcTrk1-SpeI-R	CCTT ACTAGT CTAAATTCTAAGAGGCGGTAAATTAGG
Vecteur OE-SKC	HcSKC-SpeI-F	CCTT ACTAGT ATGGCCTCCGCCTCGACCAT
	HcSKC-SpeI-R	CCTT ACTAGT TTAGCTAGCTTCTCCAGCTACCTTC
Vecteur OE-PT1.1	HcPT1.1-SpeI-F	CCTT ACTAGT ATGGCTAGCTACCAAGAGAAAGG
	HcPT1.1-SpeI-R	CCTT ACTAGT TTAAGCGGTGGTGATGGGCGCA
Vecteur OE-PT2	HcPT2-SpeI-F	CCTT ACTAGT ATGGCGGAACCTATGCACGAGA
	HcPT2-SpeI-R	CCTT ACTAGT TCAAGTTTCCTTCAACCACTTGGTTCTG

Tableau 3: Amorces utilisées pour la construction des vecteurs de surexpression des gènes candidats *HcTrk1*, *HcSKC*, *HcPT1.1* et *HcPT2*.

Les séquences en rouge correspondent aux sites de restrictions indiqués dans le nom de l'amorce.

2.7.2 Construction de vecteurs RNAi

Le plasmide pSILBA γ (Figure 19) utilisé pour la construction de vecteurs RNAi chez *L. bicolor* (Kemppainen *et al.*, 2009 ; Kemppainen & Pardo, 2010) nous a été gracieusement fourni par Alejandro Pardo et Minna J. Kemppainen du laboratoire de Mycologie Moléculaire de l'Université Nationale de Quilmes en Argentine. A noter que pour la construction de vecteurs RNAi chez *H. cylindrosporum*, la séquence intronique de la nitrate réductase de *L. bicolor* nécessaire à la formation de la boucle a été conservée dans les vecteurs finaux.

Deux couples d'amorces ont été dessinés pour chaque gène afin d'amplifier un fragment sens (S) et un fragment antisens (AS) d'environ 300 nucléotides (Tableau 4). Ces fragments choisis ont été blastés contre la séquence génomique d'*H. cylindrosporum* pour être sûr qu'ils sont spécifiques du gène considéré. Un site de restriction a été ajouté en 5' de chaque amorce en fonction de ceux présents dans les deux sites MCS du vecteur pSILBA γ .

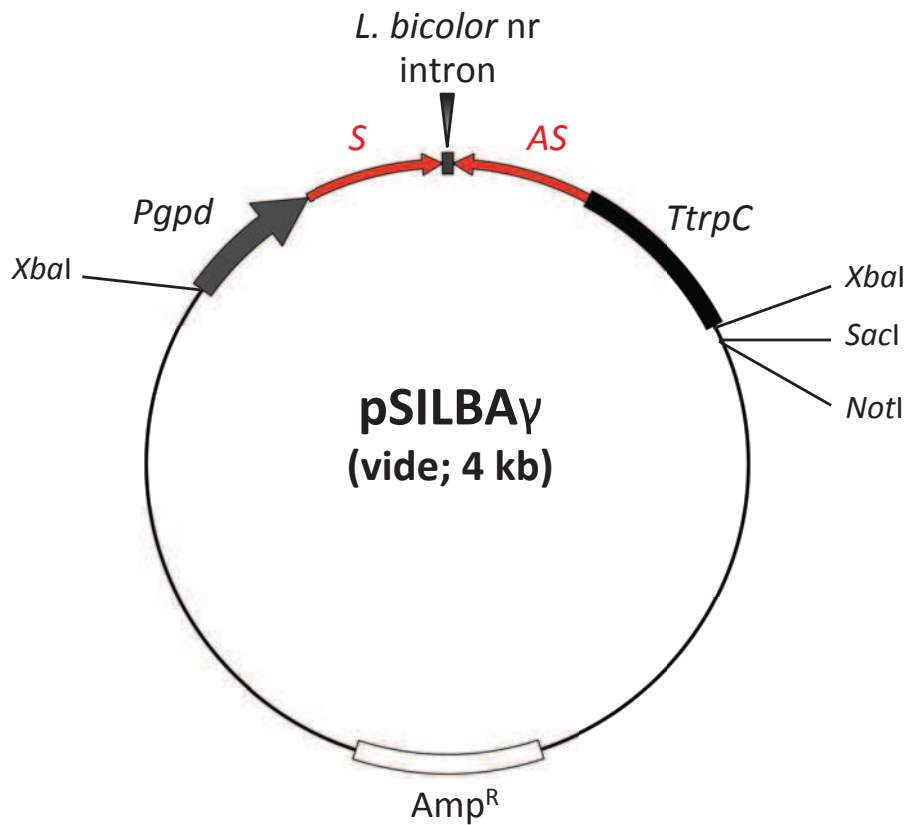


Figure 19: Carte du vecteur intermédiaire pSILBA γ utilisé pour le silencing de gènes chez *Hebeloma cylindrosporum*.

Les fragments sens (S) et antisens (AS) de chaque gène candidat sont insérés grâce aux sites de restriction décrits par Kempainen & Pardo (2010) entre le promoteur constitutif *Pgpd* et le terminateur fort *TtrpC*, et de part et d'autre de la séquence intronique de la nitrate réductase (nr) de *Laccaria bicolor*. Les sites de restriction *XbaI* permettent de récupérer la cassette RNAi et de l'insérer dans le vecteur final pPZP133 conférant la résistance à la carboxine à *Hebeloma cylindrosporum*. *Amp^R*: cassette de résistance à l'ampicilline (sélection des bactéries transformées). La taille du vecteur indiquée correspond au vecteur dépourvu des cassettes sens et antisens qui peuvent légèrement varier en taille selon le gène considéré. Redessiné d'après Kempainen & Pardo (2010).

Les fragments S et AS ont ainsi été amplifiés par PCR puis insérés dans pSILBA γ par ligation. Toute la cassette RNAi contenant le promoteur fort *Pgpd*, les fragments S et AS, la séquence intronique et le terminateur fort *TrpC*, a ensuite été récupérée par digestion par *XbaI* afin d'être insérée dans le vecteur pPZP133. Ainsi, les vecteurs pPZP-RNAi-Trk1; pPZP-RNAi-SKC; pPZP-RNAi-PT1.1 et pPZP-RNAi-PT2 ont été produits et utilisés pour l'obtention de transformants d'*H. cylindrosporum*.

Utilisation	Nom	Séquence 5' - 3'
Vecteur RNAi-Trk1	RNAi-SKC-S-SnaBI	CCTT TACGT ACGTTTCGTGATACAGATGTTCTCG
	RNAi-SKC-S-HindIII	CCTT AAGCTT CGCAGGAGACGAAACATTTCG
	RNAi-SKC-AS-KpnI	CCTT GGTACC CGTTTCGTGATACAGATGTTCTCG
	RNAi-SKC-AS-SphI	CCTT GCATG CCGCAGGAGACGAAACATTTCG
Vecteur RNAi-SKC	RNAi-Trk1-S-SnaBI	CCTT TACGT ACCGCACACATTGCGAATATA
	RNAi-Trk1-S-HindIII	CCTT AAGCTT GTATCTCTTCTGACTTTGGGGAC
	RNAi-Trk1-AS-KpnI	CCTT GGTACC CCGCACACATTGCGAATATA
	RNAi-Trk1-AS-SphI	CCTT GCATG CGTATCTCTTCTGACTTTGGGGAC
Vecteur RNAi-PT1.1	RNAi-PT1.1-S-SnaBI	CCTT TACGT AGACCGACATCACAAACCTCCA
	RNAi-PT1.1-S-HindIII	CCTT AAGCTT GCGGTACCGAAGAGAATTTTG
	RNAi-PT1.1-AS-KpnI	CCTT GGTACC GACCGACATCACAAACCTCCA
	RNAi-PT1.1-AS-SphI	CCTT GCATG GCGGTACCGAAGAGAATTTTG
Vecteur RNAi-PT2	RNAi-PT2-S-SnaBI	CCTT TACGT AGGAGTGTGGCGAATTATCGTTG
	RNAi-PT2-S-HindIII	CCTT AAGCTT CACATCAACAGGAGCAGTTGC
	RNAi-PT2-AS-KpnI	CCTT GGTACC GGAGTGTGGCGAATTATCGTTG
	RNAi-PT2-AS-SphI	CCTT GCATG CCACATCAACAGGAGCAGTTGC

Tableau 4: Amorces utilisées pour la construction des vecteurs RNAi des gènes candidats *HcTrk1*, *HcSKC*, *HcPT1.1* et *HcPT2*.

Les séquences en rouge correspondent aux sites de restrictions indiqués dans le nom de l'amorce. Pour chacun des gènes, deux amorces sont utilisées pour synthétiser le fragment sens (S) et deux autres pour le fragment antisens (AS).

2.8 Analyses phénotypiques

2.8.1 Détermination de la matière fraîche et de la matière sèche

Les échantillons biologiques (mycélium en culture pure ou parties aériennes et racinaires des plantes) ont été récoltés et pesés à l'aide d'une balance de précision pour déterminer la matière fraîche. Chaque échantillon a ensuite été séché à 65 °C pendant 7 à 14 jours en fonction du type de tissu considéré, puis à nouveau pesé avec la même balance afin de déterminer la matière sèche.

2.8.2 Dosage du potassium et du sodium par spectrophotométrie de flamme

Une fois les échantillons séchés, ils ont été incubés une nuit à température ambiante dans 5 mL d'HCl 0,1 N. Le lendemain, des dilutions appropriées sont réalisées pour chacun d'entre eux, puis la concentration en potassium et en sodium est déterminée au spectrophotomètre de flamme en absorption atomique (SpectrAA 220 FS, Varian).

2.8.3 Dosage du phosphore par la méthode de vert de Malachite

Avant de pouvoir doser le phosphore (P) contenu dans les tissus des différents échantillons, il est nécessaire de réaliser une minéralisation. Pour ce faire, chaque échantillon séché est placé dans un tube à vis puis incubé 16 h à 110 °C dans de l'HCl 6 N. Il est important de connaître la quantité exacte d'HCl ajoutée pour la suite des calculs. Ainsi, les tubes sont pesés vides, puis après ajout de l'HCl, et enfin avec la matière sèche. Les tubes sont ensuite centrifugés afin d'éliminer les débris biologiques issus de la minéralisation. Un volume de 0,5 mL est récupéré et dilué dans 2,5 mL d'acétate de sodium 1,25 M (dilution 1:6) pour neutraliser l'acidité. Les échantillons sont encore dilués, puis dosés au vert de Malachite.

Afin de réaliser ce dosage, une gamme entre 10 et 400 μg de P L^{-1} est établie à partir d'une solution mère de P (1 g L^{-1}) diluée 1000 fois. A un volume de 1 mL de cette gamme et de chaque échantillon est ajouté 0,2 mL de réactif 1 (H_2SO_4 36 N 168 mL L^{-1} , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 17,55 g L^{-1}). Le tout est incubé 10 min à température ambiante. Un volume de 0,2 mL de réactif 2 (alcool polyvinylique (PVA) 3,5 g L^{-1} , oxalate de vert de Malachite 0,35 g L^{-1}) est ajouté avant une incubation de 30 min à température ambiante. Enfin, les échantillons sont dosés grâce à un spectrophotomètre (ELx 808 microplate photometer (DIALAB)), à une longueur d'onde de 630 nm.

2.9 Analyses RT-qPCR

2.9.1 Extraction des ARNs

Deux méthodes de broyages d'*H. cylindrosporum* ont été testées pour une extraction optimale des ARNs. La première faisant intervenir un broyeur automatique à billes n'a pas été concluante. Le champignon est très peu broyé et les rendements en ARNs se sont avérés médiocres. Ainsi, des cultures liquides en milieu N6 de 14 jours ont été broyées au mortier dans de l'azote liquide.

Un volume de 1 mL de TRIzol® Reagent (Life Technologies, <http://www.lifetechnologies.com>) est ajouté à la poudre obtenue. Le tout est mélangé au

vortex et incubé à température ambiante pendant 15 min. Après 10 min de centrifugation à 12000 g à 4 °C, le surnageant est récupéré. Un volume de 200 µL de chloroforme est ajouté, puis le tout est agité au vortex pendant 15 sec et incubé 5 min à température ambiante. Chaque échantillon est ensuite centrifugé à 12000 g pendant 15 min à 4 °C. Trois phases distinctes sont observées dans chaque tube: la phase inférieure organique contenant les protéines, l'interphase blanche contenant l'ADN et la phase aqueuse supérieure contenant les ARNs. Un volume de 350 µL maximum de cette dernière est récupéré et 200 µL d'isopropanol sont ajoutés. Une incubation sur la nuit à -20 °C est nécessaire pour optimiser le rendement de précipitation des ARNs. Le lendemain, une centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4 °C permet de former un culot avec l'ARN précipité. Les culots sont ensuite lavés avec 1 mL d'éthanol 75 %, séchés 5 à 10 min puis repris dans 20 à 50 µL d'eau RNase-free en fonction de leur taille.

2.9.2 Traitement à la DNase et vérification des ARNs

Afin d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN, un traitement à la DNase est réalisé pendant 1 h à 37 °C. Pour ce faire, 2 µL de DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, <http://www.thermoscientificbio.com>) et 2 µL de tampon correspondant sont ajoutés. Enfin 2 µL d'EDTA 25 mM sont ajoutés pour purifier les ARNs. Le tout est incubé à 65 °C pendant 10 min.

La vérification des ARNs se déroule en deux étapes distinctes. Une PCR est réalisée sur les ARNs afin d'être sûr d'avoir éliminé toute trace d'ADN. L'amplification se déroule pendant 40 cycles pour être dans les mêmes conditions que la qPCR. Par ailleurs, une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée à partir de 1 µL d'ARN auquel est ajouté 10 µL d'eau RNase-free et 2 µL de tampon de charge afin de vérifier que les ARNs ne sont pas dégradés.

2.9.3 Synthèse des ADNc : *Reverse Transcription*

La production des ADNc a été réalisée selon les instructions fournies dans le kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, <http://www.thermoscientificbio.com>). Brièvement, les ARNs ont été dosés au nanodrop puis dilués dans 11 µL d'eau RNase-free afin de réaliser la transcription réverse sur une quantité de 500 ng à 5 µg d'ARN. Un volume de 1 µL d'amorces oligo (dT)₁₈ est ajouté, et les échantillons sont incubés 5 min à 65 °C pour dénaturer les ARNs. Un volume d'1 µL de RiboLock™ *RNase Inhibitor*, 1 µL de *Reverse*

Transcriptase, 4 μ L de tampon correspondant et 2 μ L de dNTP (10 mM) sont ajoutés avant une incubation d'une heure à 42 °C.

2.9.4 qPCR

La première étape pour quantifier l'expression de gènes candidats, a été d'optimiser les amorces de chaque gène afin de connaître la concentration pour laquelle le couple d'amorce présente une efficacité proche de 100 %. Pour ce faire, trois concentrations de chaque amorce (Tableau 5) sont testées : 150 nM, 300 nM et 600 nM. La matrice utilisée correspond à une dilution à 1/10 d'ADNc obtenus à partir de 5 μ g d'ARNs de la souche sauvage h7. De cette dilution, quatre dilutions supplémentaires ont été réalisées: 1/3, 1/9, 1/27 et 1/81. Ainsi, les différents couples d'amorces sont utilisés sur ces cinq dilutions et sur de l'eau uniquement. L'équation $ax+b$ de la droite de chacune de ces gammes est alors obtenue. Les valeurs ax et b de la droite dont l'efficacité du couple d'amorces est la meilleure (le plus proche de 2) sont récupérées pour être utilisées par la suite dans le calcul du niveau d'expression de chaque gène.

Gène cible	Nom	Séquence 5' - 3'
<i>α-tubuline</i>	qPCR-Tub-F	GTCTTCAAGGCTTCTTCGTCCTC
	qPCR-Tub-R	ACAGTCAGAGTGCTCCAAGGTAGT
<i>HcTrk1</i>	qPCR-Trk1-F	TGGAACCCAACCTCATTGCTG
	qPCR-Trk1-R	GAAACCAAGCGAGGTTGAGC
<i>HcTrk2</i>	qPCR-Trk2-F	GAGTTCAAGCAGGACGAAGG
	qPCR-Trk2-R	CACACCATTCCCGTTCTCTT
<i>HcHAK</i>	qPCR-HAK-F	GTGCGGTTTTCCACAAGATT
	qPCR-HAK-R	GCGAACCTTGGTTACGACAT
<i>HcSKC</i>	qPCR-SKC-F	GGCCAGATTGGGAAAGGCCG
	qPCR-SKC-R	CCGGCCAACCTCCTCTATCTG
<i>HcTOK1</i>	qPCR-TOK1-F	GGAACCAGGGGATGGTCTAT
	qPCR-TOK1-R	ATGGGTTGTATGCGGAAGAG
<i>HcTOK2.1</i>	qPCR-TOK2.1-F	GGTGCACCACTATCCGAACT
	qPCR-TOK2.1-R	CACCCATGCTTACGTGTGTC
<i>HcPT1.1</i>	qPCR-PT1.1-F	CACAAATAAATTCGTCAAGCATATTCTCG
	qPCR-PT1.1-R	GCGTTCTCGCACACCTCTG
<i>HcPT2</i>	qPCR-PT2-F	CTTCGTTGCTGTATCGCTG
	qPCR-PT2-R	TACGCACACGGATTTCTCC

Tableau 5: Amorces utilisées pour les amplifications RT-qPCR.

A partir des RT obtenues précédemment, une dilution peut s'avérer nécessaire pour obtenir des concentrations de l'ordre de $500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ qui seront utilisées lors de la qPCR. Le choix de la concentration d'amorce à utiliser est en fonction de la valeur d'efficacité obtenue lors de leur optimisation décrite plus haut.

Les résultats obtenus ont été exprimés en expression relative déterminée par le rapport entre l'efficacité de la RT-qPCR du gène cible sur celle du gène de ménage (α -tubuline) en fonction de l'efficacité des couples d'amorces correspondants. Cette méthode de calcul est décrite par Michael W. Pfaffl (2001).

2.10 Analyses électrophysiologiques : expression hétérologue en ovocytes de *Xenopus laevis*

Des analyses électrophysiologiques ont été menées afin de caractériser fonctionnellement en système hétérologue le transporteur d'*H. cylindrosporum* *HcTrk2*. Cette caractérisation a été réalisée par injection d'ARNc de *HcTrk2* dans des ovocytes de xénopes ayant la capacité d'exprimer fonctionnellement des protéines de transport, et par analyse des courants par la technique du voltage-clamp à deux électrodes.

2.10.1 Synthèse d'ARNc

Une amplification de l'ADNc de *HcTrk2* est réalisée à l'aide des amorces Trk2-SpeI-F (CCTTACTAGTATGACCTCGATATTATCGCG) et Trk2-SpeI-R (CCTTACTAGTTTATG GTCCGTGCCCGAGAT) possédant le site de restriction *SpeI*. Le fragment obtenu est ensuite inséré grâce au site *SpeI* au niveau du MCS du vecteur pGEM Xho (Figure 20I). Ce vecteur est ensuite linéarisé en utilisant une des trois enzymes de restriction disponibles (*NheI*, *SphI* ou *PstI*) en fonction des sites de restriction présents dans l'ADNc inséré. En l'occurrence, l'enzyme *NheI* a été utilisée pour digérer 10 μg de plasmide.

La synthèse des ARNc est effectuée à l'aide du kit mMessage mMachine[®] T7 Ultra (Life Technologies). Pour ce faire, environ 1 μg (6 μL au maximum) de plasmide linéarisé, 2 μL de tampon T7, 10 μL de dNTP et 2 μL d'enzymes ont été incubés dans un volume final de 20 μL pendant 2 h 30 à 37 °C. Un volume de 50 μL de LiCl est ajouté pour précipiter les ARNc, et le tout est incubé une nuit à -20 °C. Le lendemain, les ARNc précipités sont lavés à l'éthanol 70 % et repris dans 20 μL d'eau dépourvue de RNase. La qualité des ARNc est ensuite vérifiée par migration sur gel d'agarose après 10 min de dénaturation à 70 °C. Enfin, les ARNc sont dosés au nanodrop et aliquotés (2 μL , 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$).

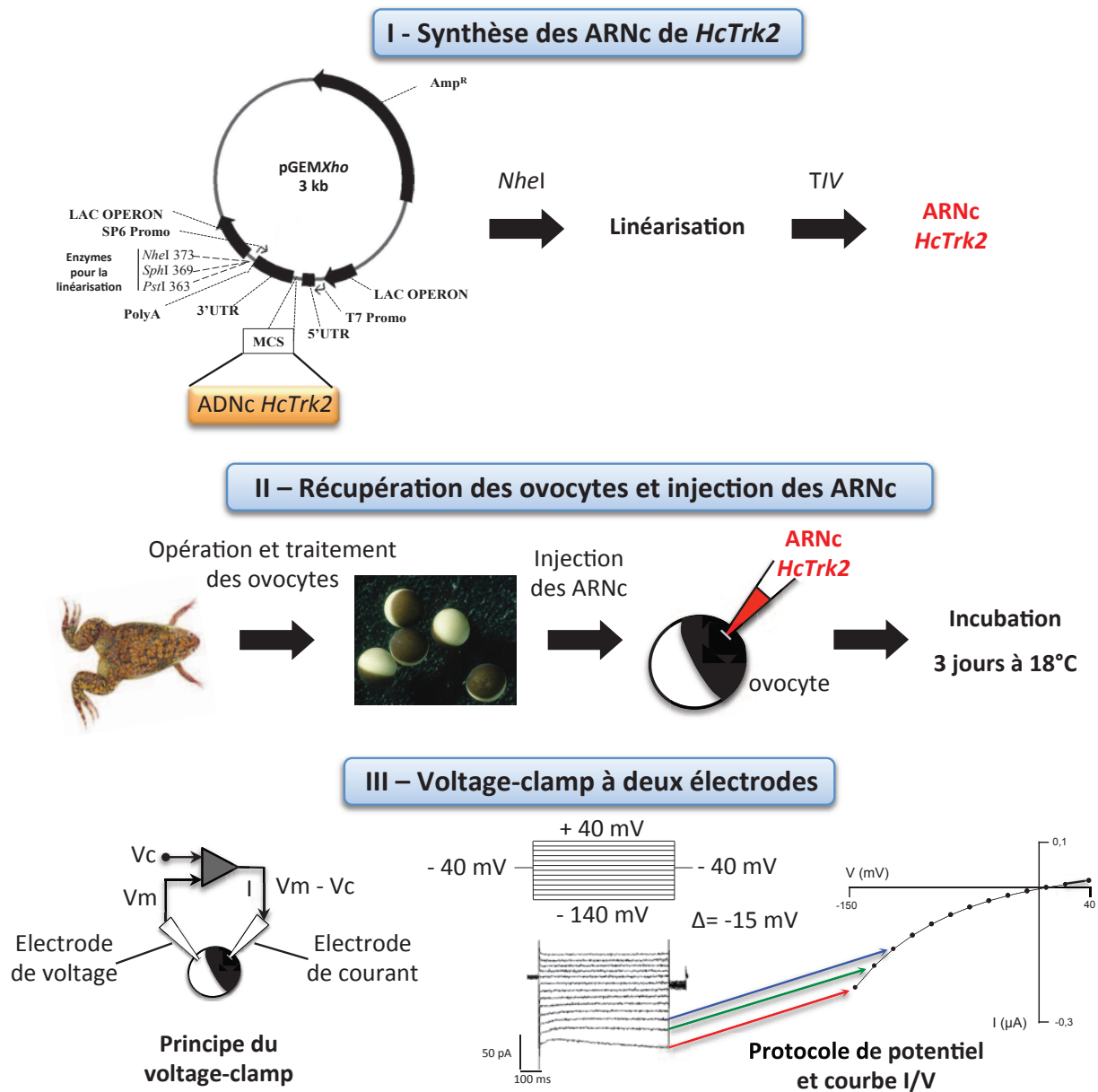


Figure 20: Etapes clés de la caractérisation fonctionnelle du transporteur *HcTrk2* en ovocytes de xénopes par la technique du voltage-clamp à deux électrodes.

I: L'ADNc de *HcTrk2* a été amplifié puis inséré dans le vecteur pGEMXho. La digestion de celui-ci par l'enzyme *NheI* permet de le linéariser. Enfin, la transcription *in vitro* (TIV) permet de synthétiser les ARNc de *HcTrk2*. II: Les ovocytes sont récupérés par opération de femelles xénopes puis préparés avant d'être injectés avec de l'eau (contrôle négatif), les ARNc de *HcTrk1* (contrôle positif) ou *HcTrk2*, puis incubés 3 jours à 18°C. III: Technique du voltage-clamp à deux électrodes. Les ovocytes sont piqués avec une électrode de mesure du voltage (V_m) et une autre permettant l'injection d'un courant (I) pour ajuster ($V_m - V_c$) le potentiel de membrane à la valeur imposée (V_c). Les courants membranaires en réponse aux voltages imposés sont enregistrés. La courbe I/V représente la relation entre le potentiel imposé (V) et le courant mesuré (I).

2.10.2 Récupération des ovocytes et injection des ARNc

Les ovocytes ont été récupérés par opération de xénopes (*Xenopus laevis*) femelles élevées au laboratoire (Figure 20II). Ainsi, une incision de la peau et de la paroi musculaire sont réalisées sur un côté, en bas de l'abdomen d'une xénope préalablement endormie dans de la glace. Les ovocytes sont récupérés, disposés dans une boîte de Petri contenant de la Barth's solution (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, MgSO₄ 0,82 mM, HEPES 5 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, CaCl₂ 0,41 mM, Na-pyruvate 2,5 mM, gentamycine 50 µg mL⁻¹, pH 7,4) et séparés délicatement en petites grappes. Ils sont ensuite rincés avec de la Barth's solution et incubés 1 h 30 sous agitation (6 - 9 rpm) dans un bain contenant de la collagénase (20 mg dans 20 mL de Barth's solution). Puis, les ovocytes sont rincés cinq fois avec de la Barth's solution contenant de la BSA (1 g L⁻¹). Un choc osmotique est alors réalisé avec une solution de K₂HPO₄ (100 mM, pH 6,5 puis ajout d'1 g L⁻¹ de BSA) pendant 1 h sous agitation (6-9 rpm) afin d'individualiser les ovocytes. Ces derniers sont séparés manuellement tous les quarts d'heure au cours de cette incubation. Enfin, les ovocytes sont de nouveau rincés cinq fois avec de la Barth's solution contenant de la BSA (1 g L⁻¹), puis triés et incubés une nuit à 18 °C dans une solution de ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, Na-pyruvate 2,5 mM, gentamycine 50 µg mL⁻¹, pH 7,4).

Le lendemain, les ovocytes triés sont injectés avec 10 ou 50 nL d'eau (contrôles négatifs), d'ARNc de *HcTrk1* (contrôles positifs) ou *HcTrk2*. Après 3 jours d'incubation à 18 °C, les ovocytes morts ou malades sont éliminés. Les autres sont utilisés pour les mesures électrophysiologiques.

2.10.3 Voltage-clamp à deux électrodes

Trois jours après incubation à 18 °C, les ovocytes injectés sont mesurés par la technique du voltage-clamp à deux microélectrodes (Figure 20III). Brièvement, le principe général consiste à imposer des potentiels membranaires ("voltage-clamp") pour enregistrer les courants correspondants aux flux ioniques traversant la membrane de l'ovocyte en fonction du voltage. Le contrôle des potentiels membranaires se fait avec l'aide de deux électrodes implantées dans l'ovocyte et deux électrodes de référence dans la solution où baignent les ovocytes. Pour ce faire, le potentiel membranaire de l'ovocyte "au repos" (V_m) est mesuré par une microélectrode reliée à un amplificateur. Ce dernier va permettre de soustraire la valeur d'un potentiel de commande (V_c) à cette valeur V_m pour pouvoir envoyer à l'aide d'une seconde microélectrode le courant (I) nécessaire pour atteindre le potentiel à imposer. Ce courant

correspondant à un potentiel donné est représenté par une courbe exprimant le courant I (μA ou nA) en fonction de la valeur du potentiel imposé V (mV).

Pour effectuer ces mesures, les ovocytes ont été placés dans différents bains contenant 10 mM, 50 mM ou 100 mM de K^+ ou de Na^+ additionnés ou non d'un cation non perméant (N-méthyl-D-glucamine (NMDG)) afin d'atteindre une concentration cationique finale de 100 mM. Ces milieux contiennent également 1 mM de MgCl_2 , 1,5 mM de CaCl_2 , 10 mM de MES, 5 mM de Tris et sont à pH 6,5. Par ailleurs, des solutions de K^+ et Na^+ 100 mM ont également été préparées à pH 5 et 7,5 afin de voir si l'activité du transporteur est dépendante de la concentration extérieure en proton. Les courants traversant la membrane ont été mesurés à différentes valeurs du potentiel membranaire obtenues par un amplificateur (GeneClamp 500B, Axon Instruments, Foster City, CA) avec une interface (Digidata 1322A, Axon Instruments) pilotée par le logiciel Clampex (pClamp10, Axon Instruments). Les protocoles de voltage-clamp ont été appliqués avec des potentiels membranaires imposés entre +40 mV et -140 mV par palier de -15 mV (Δ). (Figure 20III). Les logiciels Clampfit (pClamp10, Axon Instruments) et Sigmaplot (Jandel Scientific, Erkrath, Allemagne) ont été utilisés pour l'analyse des données, et les graphes ont été faits par Excel.

2.11 Analyses phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques présentés dans ce travail ont été réalisés à partir de séquences protéiques de systèmes de transport de champignons ectomycorhiziens récupérées sur le site du JGI (http://genome.jgi.doe.gov/Mycorrhizal_fungi/Mycorrhizal_fungi.info.html). Toutes ces séquences ont été converties au format fasta et alignées grâce au programme Muscle 3.8.31 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>). Ce site a également permis le calcul des arbres (100 ou 1000 bootstraps) par maximum de vraisemblance. Enfin, ils ont été dessinés à l'aide du logiciel geneious (<http://www.geneious.com/>).

Chapitre III - Analyse de systèmes de transport d'*Hebeloma cylindrosporum* potentiellement impliqués dans la nutrition potassique ectomycorhize-dépendante de *Pinus pinaster*

3.1 Localisation et rôle du transporteur *HcTrk1* dans la symbiose ectomycorhizienne

L'obtention d'une banque d'EST du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* a permis d'identifier plusieurs systèmes de transport putatifs (Lambilliotte *et al.*, 2004). Ainsi, une protéine appartenant à la famille des transporteurs Trk/Ktr/HKT (*HcTrk1*; Cf. 3.1.1) a été mise en évidence par une analyse BlastX effectuée contre le génome de la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Sa caractérisation fonctionnelle par complémentation de levures déficientes en systèmes de transport potassiques entrants a montré que cette protéine était capable de transporter du potassium (K^+). Par ailleurs, l'expression de *HcTrk1* en ovocytes de xénopes a permis de constater que cette protéine était également perméable au sodium (Na^+) (Corratgé *et al.*, 2007). Au vu de ces différents travaux, il a donc été tout naturellement supposé que *HcTrk1* pouvait jouer un rôle majeur dans la nutrition potassique et sodique du champignon. De plus, la question de son implication potentielle dans l'apport de K^+ à la plante hôte *Pinus pinaster* à travers l'association ectomycorhizienne a été posée. Les données présentées dans ce chapitre tendent à apporter des réponses à ces interrogations.

La première étape a été de savoir où étaient localisés les transcrits et les protéines de *HcTrk1* dans l'ectomycorhize. Une stratégie d'hybridation *in situ* a donc été entreprise afin de localiser les transcrits *HcTrk1*. En outre, une stratégie de fusion traductionnelle employant la protéine marqueur EGFP a permis la localisation des transporteurs *HcTrk1* au niveau des sites de prélèvement de l'ectomycorhize. Ces données sont présentées dans un manuscrit d'article (Garcia *et al.*, 2013b; Cf. 3.1.2).

Afin d'étudier l'implication de *HcTrk1* dans la nutrition potassique du champignon et de la plante, des analyses en génétique inverse ont été menées. Ainsi, le manuscrit d'article présenté ci-dessous montre que la surexpression de *HcTrk1* entraîne une meilleure tolérance du champignon aux conditions limitées en K^+ . De plus, la concentration en K^+ et en phosphore (P) de la plante hôte *Pinus pinaster* est affectée au niveau de la partie aérienne quand elle est mycorhizée par ces souches surexprimant *HcTrk1*.

Par ailleurs, des constructions RNAi ciblant spécifiquement *HcTrk1* ont été produites et des lignées d'*H. cylindrosporum* sous-exprimant ce transporteur ont été obtenues. L'analyse

de ces lignées en culture pure et en condition symbiotique est abordée dans le paragraphe 3.1.3.

3.1.1 Brève introduction sur les transporteurs de type Trk des *Fungi*

Les transporteurs de type Trk appartiennent à la grande famille des transporteurs Trk/Ktr/HKT (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010) qui existe chez les bactéries, les champignons et les plantes, mais pas chez les animaux. Ils sont très bien caractérisés chez les plantes, et beaucoup moins chez les champignons. Ils possèdent en général 8 domaines transmembranaires et 4 domaines pores (Figure 21). Il se pourrait que ces transporteurs dérivent de protéines ancestrales codant pour des canaux potassiques et présentant une seule sous-unité qui se serait dupliquée puis auraient fusionné au cours de l'évolution (Durell *et al.*, 1999).

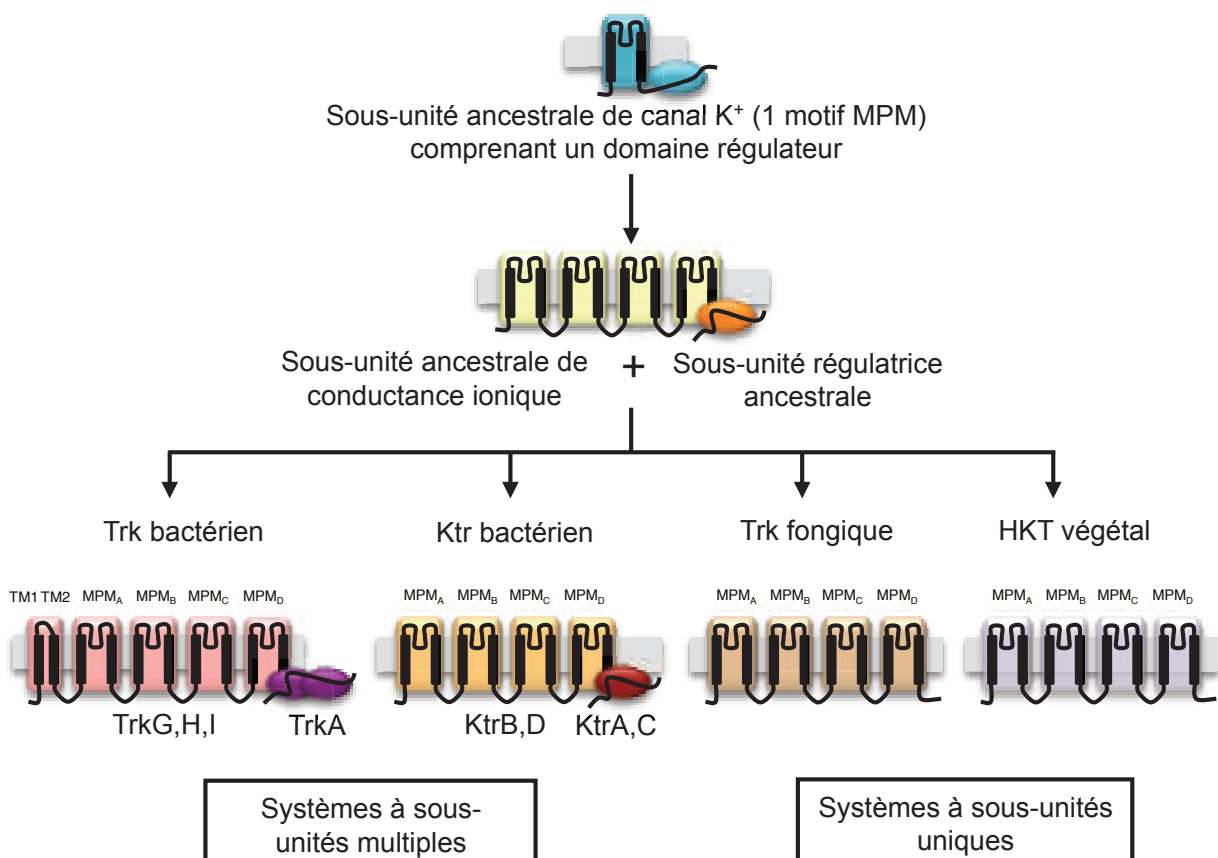


Figure 21: Structure et évolution possibles des transporteurs de type Trk/Ktr/HKT.

Les transporteurs Trk des champignons et HKT des plantes sont des systèmes à une seule sous-unité. Les Trk et Ktr des bactéries sont des systèmes plus complexes associés à des sous-unités transmembranaires (TrkG, H ou I, et KtrB ou D) et à une sous-unité de régulation située en périphérie (TrkA et KtrA ou C). MPM: Membrane-Pore-Membrane. D'après Corratgé-Faillie *et al.* (2010).

Chez les *Fungi*, les premiers transporteurs de type Trk qui ont été identifiés sont les protéines ScTrk1 et ScTrk2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1991). Leur analyse a montré qu'ils sont les acteurs majoritaires de la récupération du K⁺ contenu dans le milieu extérieur. Cependant, il semble tout de même exister d'autres transporteurs entrant de K⁺ chez *S. cerevisiae* car des levures dépourvues de ces protéines sont tout de même capables de croître si le milieu est suffisamment supplémenté en K⁺ (Arino *et al.*, 2010). Par la suite, de tels transporteurs ont été identifiés chez d'autres levures comme *S. pombe* (Soldatenkov *et al.*, 1995; Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1996) *Schwanniomyces occidentalis* (Bañuelos *et al.*, 2000) ou *Debaryomyces hansenii* (Prista *et al.*, 2007). Ils ont aussi été découverts et clonés chez d'autres champignons plus évolués comme *Neurospora crassa* (Haro *et al.*, 1999) ou en ce qui nous concerne, *H. cylindrosporum* (Corratgé *et al.*, 2007). Deux protéines de type Trk sont identifiables chez la plupart des champignons ectomycorhiziens séquencés (Cf. 1.5, Figure 1). De façon intéressante, aucun membre n'est présent dans le génome du champignon endomycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*. Le séquençage d'autres espèces appartenant au groupe des *Glomeromycota* est donc nécessaire pour savoir si les transporteurs de type Trk sont bel et bien absents chez ces champignons symbiotiques. La faculté de transport de K⁺ chez ces différentes protéines a été mise en évidence principalement par leur expression en systèmes hétérologues (levures et ovocytes de xénopes). Il a également été parfois observé que les transporteurs Trk de champignons pouvaient laisser passer du Na⁺ ou du Cl⁻ (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010).

Bien que détectés chez de nombreux champignons supérieurs, l'implication des transporteurs Trk dans leur nutrition potassique est encore méconnue. Ce manque d'information est en partie dû à la difficulté d'obtenir des organismes génétiquement modifiés. Ainsi, *H. cylindrosporum* s'avère être un bon candidat pour l'intégration de ces protéines de transport dans le schéma global de la nutrition potassique fongique. De par son caractère symbiotique, il est également un bon modèle pour la compréhension de la nutrition potassique ectomycorhize-dépendante des plantes ligneuses, notamment à travers l'implication éventuelle de protéines appartenant à la famille Trk/Ktr/HKT. Il est cependant à noter que deux autres protéines codant pour des transporteurs de type Trk (*HcTrk2*) et KT/KUP/HAK (*HcHAK*), ont été récemment identifiées. Ainsi, *HcTrk1* est un candidat possible dans le prélèvement du K⁺, mais l'étude des deux autres protéines s'avèrera indispensable dans la compréhension des bases moléculaires impliquées dans la nutrition potassique d'*H. cylindrosporum*.

3.1.2 Manuscrit d'article présentant la localisation et le rôle du transporteur *HcTrk1* d'*Hebeloma cylindrosporum* dans la nutrition potassique et l'homéostasie du phosphore de la plante hôte *Pinus pinaster*

Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of the *Hebeloma cylindrosporum* *HcTrk1* transporter affects the translocation of both K⁺ and P in the host plant.

Garcia K, Delteil A, Conéjéro G, Becquer A, Plassard C, Sentenac H, Zimmermann S

New Phytologist (2013) (sous presse)

1 **Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of**
2 **the *Hebeloma cylindrosporum* *HcTrk1* transporter affects the translocation**
3 **of both K⁺ and P in the host plant**

4 Kevin Garcia¹, Amandine Delteil¹, Geneviève Conéjéro^{1,3}, Adeline Becquer², Claude
5 Plassard², Hervé Sentenac¹, Sabine Zimmermann^{1*}

6 ¹Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 5004 CNRS/INRA/SupAgro/UM2,
7 Campus INRA/SupAgro, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

8 ²INRA, UMR 1222 Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

9 ³Plateforme Histocytologie et Imagerie Cellulaire Végétale, INRA-CIRAD 34398
10 Montpellier, France

11 Author for correspondence: Sabine Zimmermann, tel +33 499612718, fax +33 467525737;

12 e-mail: sabine.zimmermann@supagro.inra.fr

13 Total word count (Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and
14 Acknowledgements): 4051

15 Summary: 197

16 Introduction: 736

17 Materials and Methods: 1042

18 Results: 1112

19 Discussion: 1048

20 Acknowledgements: 113

21 Figures: 7 (Fig. 1, 2, 3 in colour)

22 Supporting Information: Fig. S1, S2, S3, S4, Table S1

23 **Summary**

- 24 • Mycorrhizal associations are known to improve the hydro-mineral nutrition of their
25 host plants. However, the importance of mycorrhizal symbiosis for plant potassium
26 nutrition has so far been poorly studied. We therefore investigated the impact of the
27 ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* on the potassium nutrition of *Pinus*
28 *pinaster* and examined the involvement of the fungal potassium transporter *HcTrk1*.
- 29 • *HcTrk1* transcripts and proteins were localized in ectomycorrhizas using *in situ*
30 hybridization and EGFP translational fusion constructs. Importantly, an over-
31 expression strategy was performed on a *H. cylindrosporum* endogenous gene in order
32 to dissect the role of this transporter.
- 33 • The potassium nutrition of mycorrhizal pine plants was significantly improved under
34 potassium limiting conditions. Fungal strains over-expressing *HcTrk1* reduced the
35 translocation of potassium and phosphorus from the roots to the shoots of inoculated
36 plants in mycorrhizal experiments. Furthermore, expression of *HcTrk1* and the
37 phosphate transporter *HcPT1.1* were reciprocally linked to the external inorganic
38 phosphate and potassium availability.
- 39 • The development of these approaches provides a deeper insight into the role of
40 ectomycorrhizal symbiosis on host plant K⁺ nutrition and in particular, the K⁺
41 transporter *HcTrk1*. The work augments our knowledge of the link between potassium
42 and phosphorus nutrition *via* the mycorrhizal pathway.

43 **Key words:** Ectomycorrhizal symbiosis; *Hebeloma cylindrosporum*; *in situ* hybridization;
44 over-expression; phosphate transporter *HcPT1.1*; plant potassium nutrition; potassium-sodium
45 transporter *HcTrk1*; protein-EGFP fusion

46 **Introduction**

47 Ectomycorrhizal (ECM) symbiosis is a mutual association between fungal symbionts and
48 woody plant roots. Although only 3 to 5% of higher plants are able to form ECM associations,
49 this symbiosis is strongly represented in northern forests and plays a crucial role in the
50 equilibrium of forest ecosystems (Smith & Read, 2008). The fungal symbiont provides
51 nutrients and water in exchange for photosynthetically-derived carbohydrates from the plant
52 (Nehls *et al.*, 2010). These underground “trades” are situated in a specialized plant-fungus
53 organ called the ectomycorrhiza, located at the interface between the root cortical cells and
54 the fungal hyphae that form the Hartig net.

55 The external fungal hyphae produce two main structures, the fungal sheath and the
56 extra-radical mycelium. The fungal sheath surrounding the root forms a buffer compartment
57 between the inner root and external environment and is thought to act as a storage
58 compartment for nutrients (Bücking *et al.*, 2007). This tissue is described in *Pisolithus*
59 *tinctorius* ECM as a low permeability zone for certain ions such as potassium (Bücking *et al.*,
60 2002). Extra-radical hyphae explore a large volume of soil, taking up the nutrients and water
61 that are otherwise inaccessible to the host plant, translocating them to the inner root hyphae.

62 Studies investigating the nutrient exchanges in ECM symbiosis have primarily focused
63 on nitrogen (Wallenda & Read, 1999; Müller *et al.*, 2007) and inorganic phosphate (Pi)
64 (Plassard & Dell, 2010). However, other nutrients are also traded, including potassium, sulfate
65 and microelements (Casieri *et al.*, 2013). In higher plants, potassium (K⁺) is the most
66 abundant cation in the cytoplasm where it is vital for metabolic processes (Clarkson &
67 Hanson, 1980; Leigh & Wyn Jones, 1984) and plays major roles in numerous other
68 physiological functions such as neutralization of negative charges, osmoregulation, growth, or
69 hydric and salinity stress tolerance (Broadley & White, 2005). Within the plant, K⁺ transport
70 has been well studied at both the physiological and molecular levels (Lebaudy *et al.*, 2007;

71 Hedrich, 2012; Wang & Wu, 2013). However, the role of ECM associations in the K⁺
72 nutrition of plants is largely unexplored.

73 Potassium uptake by the mycorrhizal pathway has been shown for both ECM and
74 arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis (Marschner & Dell, 1994). For ECM fungi,
75 beneficial effects on net plant K⁺ uptake have been shown (Rygiewicz & Bledsoe, 1984;
76 Jongbloed *et al.*, 1991). Jentschke *et al.* (2001) reported that the ectomycorrhizal pathway
77 provides only a small fraction (5-6%) of the total K⁺ in Norway spruce seedlings. However,
78 this contribution could be important under the limiting conditions that frequently occur in
79 natural forest habitats. Recent studies have highlighted the impact of ECM and AM fungi on
80 plant K⁺ nutrition in relation to increased salt tolerance in poplar (Li *et al.*, 2012) and *Olea*
81 *europaea* (Porras-Soriano *et al.*, 2009), and better adaptation to drought stress in *Zea mays*
82 (El-Mesbahi *et al.*, 2012). Nonetheless, any substantial molecular data regarding the fungal
83 K⁺ transport systems that could be involved in the K⁺ nutrition of host plants are lacking.

84 Relationships between K⁺ and phosphorus (P) in mycorrhizal symbiosis are also
85 poorly studied, even though K⁺ is considered as one of the major counter-ions of the soluble
86 short-chain polyphosphates (Bücking & Heyser, 1999), which forms a phosphate reserve for
87 the host plant in AM symbiosis (Takanishi *et al.*, 2009). Related to the co-localization of K⁺
88 and P in the vacuoles of ECM basidiomycota such as *Pisolithus tinctorius* (Ashford *et al.*,
89 1999), K⁺ could be a key element in forming and stabilizing polyphosphates in vacuoles.

90 In this study, we examined the contribution of the ECM symbiosis to K⁺ nutrition in
91 the host plant *Pinus pinaster* and investigated the involvement of a fungal K⁺ transport
92 system, *HcTrk1*. *HcTrk1* belongs to the Trk/Ktr/HKT transporter family (Corratgé-Faillie *et*
93 *al.*, 2010; Vieira-Pires *et al.*, 2013), and was earlier identified in an EST library of the model
94 fungus *Hebeloma cylindrosporum* (Lambilliotte *et al.*, 2004). This transporter is known to
95 complement yeast *Δtrk1-Δtrk2* mutants defective in K⁺ uptake. Its electrophysiological

96 characterization in *Xenopus laevis* oocytes has shown it to be a Na⁺-K⁺ transporter (Corratgé
97 *et al.*, 2007). To dissect the role of this transporter within the fungus and the ectomycorrhizal
98 symbiosis, we investigated the expression of *HcTrk1*, the localization of the encoded protein
99 in ectomycorrhiza and its involvement in K⁺ nutrition of the host plant *Pinus pinaster* using
100 an over-expression strategy. Finally, we examined the consequence of impaired K⁺
101 translocation due to *HcTrk1* overexpression for plant P nutrition.

102 **Materials and Methods**

103 **Wild-type and transgenic fungal strains**

104 The homokaryotic strain h7 of the ECM basidiomycota *Hebeloma cylindrosporium*
105 Romagnesi (Debaud & Gay, 1987) was grown in the dark at 26 °C in standard medium YMG
106 (Yeast extract, Malt extract, Glucose; Rao & Niederpruem, 1969) either on agar-solidified
107 Petri dishes or in liquid cultures without shaking.

108 For Agrotransformations of the strain h7 (Combier *et al.*, 2003), thalli growing in
109 liquid medium were ground in 80 ml of YMG using an ultra-turrax (IKA,
110 <http://www.ika.com/>), and transferred to Petri dishes (90 mm diameter). For one month,
111 successive grindings were made until a new thallus was formed in one day that was suitable
112 for transformation. The Agrotransformation method, mitotic stability test and the production
113 of the control fungal strain pPZP-133 (transformed by the empty vector) have been detailed in
114 previous work (Garcia *et al.*, 2013). Using the same protocol, translational fusion and over-
115 expressing fungal lines, which are carboxin resistant, were obtained for *HcTrk1* studies.

116 **Potassium, sodium and phosphorus shortage in fungal pure cultures**

117 Wild-type and transgenic fungal strains were cultivated for 14 days in control N6 liquid
118 medium (Louche *et al.*, 2010) containing 10 mM K⁺ (6 mM KNO₃, 4 mM KCl) with fresh N6
119 supplied at days 7 and 12. Thalli were washed five times with N6-K, N6-Na or N6-P media
120 (N6 medium without added K⁺, Na⁺ or Pi, respectively), cultivated in these media and

121 periodically sampled for quantification of their intra-cellular ion content and for qRT-PCR
122 analyses. In some experiments, following the deprivation treatment, they were re-supplied
123 with complete N6 medium before sampling for qRT-PCR experiments.

124 **Ectomycorrhiza production**

125 Maritime pine seeds (*Pinus pinaster* Soland in Ait. from Medoc, Landes-Sore-VG source,
126 France) were sterilized with 37% H₂O₂ (Ali *et al.*, 2009) and sown on Petri dishes containing
127 agarose (Eurobio Molecular Biology Grade) and 0.2% glucose. Germinated seeds were co-
128 cultivated with plugs of fungal strains in a glass tube between filter paper and the wall of the
129 tube (Fig. S1). Standard K⁺ (SK, 1 mM K⁺) liquid medium (0.2 mM Ca(NO₃)₂, 0.6 mM
130 KNO₃, 0.2 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 0.2 mM KCl, 0.5 ml l⁻¹ ferric citrate 1%, 0.2 ml l⁻¹
131 Morizet & Mingeau (1976) micronutrient solution, 1 ml l⁻¹ thiamine (100 µg l⁻¹)) was used in
132 these plant-fungus cultures for *in situ* hybridization and protein localization in
133 ectomycorrhizas. For functional analyses with *HcTrk1* over-expressing fungal strains, SK and
134 low K⁺ (LK, 0.05 mM K⁺) (0.5 mM Ca(NO₃)₂, 0.2 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 0.05 mM
135 KCl, 0.5 ml l⁻¹ ferric citrate 1%, 0.2 ml l⁻¹ Morizet & Mingeau (1976) micronutrient solution,
136 1 ml l⁻¹ thiamine (100 µg l⁻¹)) liquid media were used for K⁺-sufficient and K⁺-deficient
137 culture conditions, respectively. For each experiment, four to five 2-month old plants were
138 collected for quantification of K⁺, Na⁺ and P in roots and shoots.

139 ***In situ* hybridization**

140 Sense and antisense probes (300 bp) were generated by two successive PCR amplifications of
141 *HcTrk1* cDNA contained in the pFL61 vector. The first amplification was prepared with a
142 primer containing the T7 promoter fused to the cDNA of *HcTrk1* ISHTrk-T7-F, and the
143 specific ISHTrk-R primer (Table S1) to select specifically the *HcTrk1* cDNA. For the second
144 amplification, ISHT7-Prom and specific Trk-R primers (Table S1) were used with a 1:100
145 dilution of the first PCR. Preparation of hybridization probes and ectomycorrhizal samples

146 from test tube cultures and *in situ* hybridization followed the protocol previously described by
147 Garcia *et al.* (2013).

148 **Construction of plasmids for localization and functional analyses of *HcTrk1***

149 For localization of *HcTrk1* proteins, a translational fusion vector was constructed, allowing
150 expression of *HcTrk* fused to EGFP under control of the *HcTrk1* promoter region. Sequences
151 of *HcTrk1* without its STOP codon and of its promoter region (*PTrk1*) were amplified from
152 cDNA and from a gDNA library of h1 strain using PromTrk1-Trk1-F/FTTrk1-SpeI-R and
153 PromTrk1-SpeI-F/PromTrk1-Trk1-R primers, respectively (Table S1). The two amplified
154 fragments were fused using the PCR fusion strategy and replaced the *Pgpd* promoter of pPZP-
155 *Pgpd*-E plasmid (Garcia *et al.*, 2013), to form the pPZP-PTrk1-Trk1::E vector.

156 To over-express *HcTrk1* in transformed fungi, a vector pPZP-OETrk1 was
157 constructed. The cDNA sequence of *HcTrk1* (2376 bp) was amplified using Trk1-SpeI-F and
158 OETrk1-SpeI-R primers (Table S1) and inserted in the pPZP-Pgpd vector.

159 **Protein localization using confocal microscopy**

160 Localization of *HcTrk1* proteins was analyzed in ectomycorrhizas produced with fungal
161 strains transformed with the pPZP-PTrk1-Trk1::E vector. EGFP fluorescence pictures were
162 acquired using a confocal microscope (Axiovert 200M Zeiss LSM 510 Meta, with a C-
163 Apochromat 40X/1,2 objective, Montpellier RIO Imaging Platform). Mycorrhizas were
164 embedded in 4% agarose and sliced (50 μm) with a vibratome (Microm HM650V, Thermo
165 Scientific). To specifically mark the chitin, cut tissues were incubated in a Petri dish
166 containing 1x PBS buffer and Wheat Germ Agglutinin (WGA), conjugated with Alexa
167 Fluor® 555 (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for one night under constant conditions of shaking, then washed three
168 times with 1x PBS buffer. Detection of EGFP and Alexa Fluor® 555 was performed using an
169 argon laser with 488 nm and 555 nm excitation wavelengths, respectively. The fluorescence
170 emission was observed using an adapted spectral filter (band-pass 505-530 nm and 530-600

171 nm, respectively). Image analyses were carried out with Zeiss LSM Image Browser Version
172 4,2,0,121 software.

173 **Quantification of potassium, sodium and phosphorus contents**

174 Mycelia and plant tissue samples were weighed, dried (65 °C for 1 week) and weighed again
175 (dry weight, DW). Dried samples were mineralized in 6 N HCl at 110 °C for 16 h, centrifuged
176 and supernatants collected. Appropriate dilutions were made to determine K⁺ and Na⁺
177 contents using flame atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA 220, Varian). Total
178 phosphorus contents were determined using the Malachite green method (Ohno & Zibilske,
179 1991). Samples were incubated in 1.25 M sodium acetate (1:6 v/v) before dilution in water for
180 colorimetric assay. Quantifications were made using an ELx 808 microplate photometer
181 (DIALAB, <http://dialab.at>) at 630 nm and the software Gen5 (BioTek, www.biotek.fr).

182 **qRT-PCR analyses**

183 qRT-PCR experiments were performed as previously described (Garcia *et al.*, 2013).
184 Expression levels of the transporter and channel genes *HcTrk1* (445173), *HcTrk2* (176376),
185 *HcHAK* (435192), *HcPT1.1* (446637), *HcSKC* (79961), *HcTOK1* (31571), *HcTOK2.1*
186 (129509) and *HcTOK2.2* (127201) were determined relative to the internal control α -tubulin
187 (24108) on mycelium samples (see Table S1 for primers). Numbers represent protein IDs
188 from the *H. cylindrosporum* h7 genome database v2.0 ([http://genome.jgi-](http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html)
189 [psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html)).

190 **Results**

191 **Ectomycorrhizal association with *Hebeloma cylindrosporum* improves the potassium** 192 **nutrition of *Pinus pinaster* under K⁺ limiting conditions**

193 To evaluate the influence of K⁺ supply on the growth of *Pinus pinaster* and to investigate the
194 impact of ECM symbiosis on K⁺ uptake by the host plant, non-mycorrhized and mycorrhized
195 plants were cultivated in two different culture conditions. Growth and the K⁺ content of the

196 plants reflecting their K⁺ uptake were compared after 2 months in either K⁺ sufficient
197 conditions (SK) or K⁺ deficiency conditions (LK). Pine plants were co-cultivated with
198 *Hebeloma cylindrosporum* h7 wild-type strain or with the strain transformed with an empty
199 vector.

200 The biomass of both the non-mycorrhized and mycorrhized plants subjected to LK
201 conditions was reduced compared to plants cultured in the higher K⁺ medium (Fig. 1a), a
202 visual observation that was confirmed by the whole plant DW measurements (Fig. 1b).
203 Between non-mycorrhized and mycorrhized plants, no significant difference was observed in
204 either culture conditions after 2 months.

205 When grown in SK medium, no significant difference in K⁺ contents between
206 mycorrhized and non-inoculated plants was observed (Fig. 1c). In contrast, in LK medium,
207 the mycorrhized plants contained significantly higher K⁺ contents in both the roots (37%) and
208 shoots (32%) than the non-inoculated plants (Fig. 1d). Thus, ECM colonization strongly
209 improved the plant K⁺ nutrition in conditions of low external K⁺.

210 **Localization of the *HcTrk1* transporter transcripts and proteins in ectomycorrhizas**

211 To determine the localization of the potassium transporter *HcTrk1* (Corratgé *et al.*, 2007)
212 within ectomycorrhizas, *in situ* hybridization and translational fusion approaches were used to
213 detect, respectively, the relevant transcripts and proteins. Ectomycorrhizas were produced by
214 co-culturing *H. cylindrosporum* and *P. pinaster* for 2 months in SK medium (the expression
215 of *HcTrk1* did not depend on external K⁺ or Na⁺ concentrations (Fig. S2)). For *in situ*
216 hybridization, cross-sections of ectomycorrhizas were treated and marked with antisense and
217 sense rRNA 18S and *HcTrk1*-specific probes (Fig. 2). Control sense probes displayed no
218 signal (Fig. 2a,c). Blue signals were detected in extraradical hyphae, the fungal mantle and the
219 Hartig net when the *HcTrk1* antisense probe was used (Fig. 2b). The control rRNA 18S
220 antisense probes marked all cell types within the ectomycorrhizas (Fig. 2d).

221 To localize *HcTrk1* proteins within the ectomycorrhizas, a translational fusion strategy
222 using EGFP as a reporter was applied. Representative pictures of two independent lines
223 (isolates 3 and 8) are shown (Fig. 3). Mycorrhizal association was first verified by fungal
224 chitin staining (Fig. 3, second panels). Strong WGA-Alexa-555 signals were observed in the
225 cross-sections of all mycorrhizas, formed by either the empty vector fungal transformant (Fig.
226 3a) or by each of the two strains carrying the translational fusion construct (Fig. 3b,c). EGFP
227 fluorescence was observed in the fungal sheath and, to a lesser extent, in the extraradical
228 hyphae of mycorrhized plant roots with fungi transformed with *HcTrk1*-EGFP constructs
229 (Fig. 3b,c, third and fourth panels). No fluorescence signal was detected within the Hartig net
230 or in the mycorrhizal tissues produced with the empty vector fungal transformant (Fig. 3a,
231 third panel).

232 **Production of *HcTrk1* over-expression lines of *Hebeloma cylindrosporum***

233 To dissect the role of the K⁺ transporter *HcTrk1* within the symbiotic association,
234 *H. cylindrosporum* transgenic lines displaying increased levels of *HcTrk1* transcripts, were
235 created (Fig. 4). From the OE-Trk1 fungal lines obtained, two lines with the highest *HcTrk1*
236 expression, OE-Trk1-7 and OE-Trk1-9, were selected for further analyses (Fig. 4a) and
237 compared to the empty vector control line, which behaved like the wild-type h7 strain (data
238 not shown). T-DNA integration of the two selected lines was verified using PCR on gDNA
239 (Fig. 4b).

240 **Phenotype analyses of *HcTrk1* over-expressing lines of *Hebeloma cylindrosporum***

241 The consequences of *HcTrk1* over-expression on fungal cell growth (biomass) and mycelium
242 ion contents were investigated using lines OE-Trk1-7 and OE-Trk1-9. In addition, qRT-PCR
243 analyses performed on these lines revealed slight changes in the expression levels of other
244 putative K⁺ transporters (*HcTrk2* and *HcHAK*) and channels (*HcTOK1*, *HcTOK2.1*,
245 *HcTOK2.2* and *HcSKC*) (Fig. S3).

246 Biomass production was measured on fungal pure cultures grown for two weeks in
247 liquid medium (K^+ 10 mM). Strains over-expressing *HcTrk1* displayed a lower DW
248 production than the control lines (Fig. 5a). Ion contents were monitored in mycelia transferred
249 into medium without added K^+ (Fig. 5b,c). Before the transfer, the OE-Trk1-7 and OE-Trk1-9
250 strains displayed K^+ contents similar to those of the control lines. Culturing in absence of K^+
251 resulted in decreased K^+ contents in both types of strains. After 48 h of K^+ deprivation, K^+
252 contents were however significantly higher in the OE-Trk1-7 and OE-Trk1-9 strains (Fig. 5b),
253 indicating that *HcTrk1* over-expression resulted in improved K^+ "retention" probably due to
254 re-uptake from the medium. In contrast, no difference in Na^+ accumulation was detected
255 between the fungal lines despite a general Na^+ increase in response to K^+ deprivation (Fig.
256 5c).

257 **Potassium and sodium status of plants mycorrhized with *HcTrk1* over-expressing fungal**
258 **lines**

259 To study the impact of *HcTrk1* on the functioning of the symbiotic association, the control
260 and *HcTrk1* over-expressing fungal lines were co-cultivated with maritime pine seedlings for
261 2 months under standard (SK) or low K^+ (LK) conditions. Under SK conditions, no
262 significant differences in K^+ concentration were observed in roots or shoots between non-
263 mycorrhized and mycorrhized plants (Fig. 6a). In LK conditions, all mycorrhized plants
264 accumulated a greater amount of K^+ in the roots than the non-mycorrhized plants (Fig. 6b).
265 Higher K^+ contents were also observed in shoots of plants mycorrhized with the two control
266 lines. Interestingly, plants mycorrhized with the two *HcTrk1* over-expressing transformants
267 accumulated less K^+ in shoots than other mycorrhized plants, despite their higher K^+ content
268 in roots.

269 Much larger Na^+ contents were found in all plants grown in LK conditions compared
270 to SK conditions (Fig. 6c,d). In contrast, no significant difference in Na^+ contents was

271 observed between non-mycorrhized and mycorrhized plants, indicating no impact of the
272 *HcTrk1* over-expression on Na⁺ uptake and distribution.

273 **Phosphorus contents of *Pinus pinaster* seedlings mycorrhized with *HcTrk1* over-**
274 **expressing fungal lines**

275 Total P content assays revealed no significant differences between mycorrhized and non-
276 mycorrhized plants when grown in SK conditions (Fig. 7a). In LK conditions, mycorrhized
277 and non-mycorrhized plants displayed an increased total P content in roots and shoots
278 compared to SK conditions. Remarkably, mycorrhization with the *HcTrk1* over-expressing
279 fungal lines OE-Trk1-7 and OE-Trk1-9 led to lower shoot P contents compared to control
280 plants (Fig. 7b) despite similar P contents in roots. In addition, qRT-PCR analyses of gene
281 expression in fungal mycelia growing in Pi-free or K⁺-free medium (Fig. S4) revealed that Pi
282 deprivation for 48 h resulted in increased expression of the K⁺ transporter gene *HcTrk1* and
283 K⁺ deprivation resulted in increased expression of the previously identified Pi transporter
284 *HcPT1.1* (Tatry *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013).

285 **Discussion**

286 ***Hebeloma cylindrosporum* improves potassium uptake in *Pinus pinaster* subjected to low**
287 **potassium availability**

288 Growth of young pine seedlings was significantly reduced after culturing in K⁺ limiting
289 conditions for 2 months (Fig. 1). This K⁺ shortage dramatically decreased the K⁺ content in all
290 parts of the plants, but was compensated by an increase in Na⁺. Maintenance of plant fitness
291 during this period implies that *Pinus pinaster* seedlings are able to tolerate K⁺-limiting
292 conditions, confirming the capacity of this species to adapt to various environmental
293 conditions as already shown for drought (Eilmann & Rigling, 2012) or frost (Korhonen *et al.*,
294 2013).

295 Symbiotic association of young pine seedlings with *H. cylindrosporum* improved K⁺
296 nutrition of mycorrhized plants under K⁺-limiting conditions, although no obvious effect on
297 host plant growth was observed during the early stages of co-culture. A remarkable increase
298 in the K⁺ content of roots and shoots of about 35% was observed under these culture
299 conditions. This demonstrates the importance of the *H. cylindrosporum* fungus in plant
300 adaptation to resource scarcity. This increase in K⁺ content by mycorrhization is much higher
301 than the reported 5-6% found in other nutrient conditions and in another symbiotic association
302 (Jentschke *et al.*, 2001). Clearly, the increase of K⁺ uptake in mycorrhized plants can be
303 expected to play a more important role in plant nutrition when the nutrient is limited, as in
304 most natural forest ecosystems.

305 **The localization of the *HcTrk1* transporter suggests a role in potassium uptake in *Pinus***
306 ***pinaster* - *Hebeloma cylindrosporum* mycorrhizas**

307 The potassium transporter *HcTrk1* has been previously identified and characterized as a first
308 candidate for K⁺ (and Na⁺) uptake by the ECM fungus *H. cylindrosporum* (Corratgé *et al.*,
309 2007). Our study demonstrates that *HcTrk1* is localized exclusively in the root-surrounding
310 and soil-exploring hyphae of *P. pinaster* ectomycorrhizas, showing a specific localization of
311 *HcTrk1* proteins in sites of nutrient uptake. In contrast, *HcTrk1* transcripts were present in all
312 types of hyphae. This observation suggests that *HcTrk1* tissue-specific expression might be
313 mediated by post-transcriptional regulation mechanisms. These localization data support the
314 model that such *HcTrk1* could participate in the uptake of soil K⁺ and/or Na⁺ within the
315 mycorrhizal association.

316 **Over-expression of *HcTrk1* affects the translocation of K⁺ from roots to shoots in *Pinus***
317 ***pinaster***

318 Over-expression of genes in *H. cylindrosporum* has previously been used to express
319 constitutively GFP markers (Müller *et al.*, 2006; Rekanalt *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2013)

320 and to investigate the function of a metallothionein of *Paxillus involutus* (Bellion *et al.*, 2007).
321 To our knowledge, we present the first example of an over-expression strategy aiming at
322 altering the expression of an endogenous gene in an ECM fungus. When grown in pure
323 culture conditions, *HcTrk1* over-expressing lines have a superior ability to adapt to K⁺
324 limiting conditions than the control strains. The use of these over-expressing fungal lines in
325 mycorrhizal assays revealed a defective translocation of K⁺ from roots to shoots in a K⁺-
326 deficient medium. Thus, K⁺ appears to be retained in root tissues, perhaps due to competition
327 for K⁺ uptake at the fungus-plant interface at the expense of mutualism. Over-expression of a
328 K⁺ uptake transport system in all types of hyphae, particularly in the Hartig net where *HcTrk1*
329 proteins are normally undetectable, could lead to a less “cooperative” fungus that does not
330 sufficiently transfer the K⁺ accumulated from the soil to the host plant when K⁺ is limited.
331 The fungal K⁺ released into the apoplasm could be recovered by the fungus, and a pool of K⁺
332 would be retained in roots and not transferred to the shoot. Consequently, artificial ectopic up-
333 regulation of the *HcTrk1* transporter of *H. cylindrosporum* could not improve the global host
334 plant K⁺ nutrition.

335 The over-expression of a transport protein able to mediate K⁺ efflux (secretion)
336 towards the plant root cortical cells within the Hartig net would be a worthwhile challenge. In
337 this perspective, dissection of the role of the complete set of fungal K⁺ transport systems
338 would provide an integrated view of all the transport systems involved in K⁺ uptake and
339 transfer to the host plant. The recent availability of the *H. cylindrosporum* genome
340 (<http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html>) does allow the completion of the
341 initial set of transport systems putatively involved in K⁺ homeostasis (*HcTrk1* and *HcSKC*) by
342 identifying further candidates, namely two K⁺ transporters, *HcTrk2* and *HcHAK*, and three K⁺
343 channels, *HcTOK1*, *HcTOK2.1* and *HcTOK2.2*. Specifically, regarding K⁺ absorption from
344 the soil, analysis of *HcHAK* and *HcTrk2*, in addition to that of *HcTrk1*, should highlight the

345 individual contribution of each K^+ uptake system under diverse conditions, as performed in
346 *Schwanniomyces occidentalis* (Banuelos *et al.*, 2000) or *Neurospora crassa* (Rivetta *et al.*,
347 2013). The over-expression and RNAi strategies, possible thanks to the *H. cylindrosporum*
348 Agrottransformation, combined with gene expression and protein localization approaches (this
349 study; Garcia *et al.*, 2013), provide a promising "tool-box" for further investigating the
350 protein actors involved in nutrient exchange in ECM symbiosis.

351 **The alteration of the translocation of potassium affects that of phosphorus in pine**

352 Total P quantification in mycorrhized pine seedlings led to unexpected results. Plants
353 mycorrhized with the *HcTrk1* over-expressing strains contained less P in the shoots than did
354 the control plants. This defect might result from the retention of K^+ in roots. Previous reports
355 (Ashford *et al.*, 1999) have proposed K^+ as one of the major counter-ions of polyphosphates,
356 the main storage form of P in fungi. Moreover, Bücking & Heyser (1999) have hypothesized
357 that a relationship exists between K^+ and P transport along the mycelium of ECM fungi. Our
358 results, revealing that altered K^+ transfer towards the host plant affects fungal P translocation
359 to the shoots, are consistent with this hypothesis. In addition, in the wild-type strain of *H.*
360 *cylindrosporum*, Pi deficiency led to an increase in *HcTrk1* expression and, reciprocally, K^+
361 deficiency triggered an up-regulation of the Pi transporter gene *HcPT1.1* (Tatry *et al.*, 2009;
362 Garcia *et al.*, 2013). Such cross responses of *HcTrk1* and *HcPT1.1* gene expression to Pi and
363 K^+ deprivation reinforces the hypothesis of interactions between these two nutrients regarding
364 their membrane transport and transfer to the host plant in ECM symbiosis. Thus, K^+ seems to
365 play a role as a regulator of P transport. Clearly, the functions of K^+ in mycorrhizal symbiosis
366 and the roles of the transport systems responsible for K^+ uptake and translocation towards the
367 host plants deserve to be further investigated.

368 **Acknowledgements**

369 We thank the students Pauline Carretier and Carole Martin for participating in this study
370 during their laboratory internships. The authors thank Tracey Ann Cuin and Claire Marsden
371 for critical reading of the manuscript. KG was financially supported by a grant from the
372 French Minister of Research and Technology, AD by funding of the ANR project
373 "TRANSMUT" 2010 BLAN 1604 03, and AB by a fellowship from INRA. Sequencing and
374 annotation of the *Hebeloma cylindrosporum* genome was conducted in the frame of the
375 Fungal Genome Program by the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute that is
376 supported by the Office of Science of the U.S. Department of Energy under Contract No. DE-
377 AC02-05CH11231.

378 **References**

- 379 **Acquaviva R, Vanella L, Sorrenti V, Santangelo R, Iauk L, Russo A, Savoca F,**
380 **Barbagallo I, Di Giacomo C. 2012.** Biochemical modifications in *Pinus pinaster* Ait.
381 as a result of environmental pollution. *Environmental Science and Pollution Research*
382 *International* **19**: 3850-3858.
- 383 **Ali MA, Louche J, Legname E, Duchemin M, Plassard C. 2009.** *Pinus pinaster* seedlings
384 and their fungal symbionts show high plasticity in phosphorus acquisition in acidic
385 soils. *Tree Physiology* **29**: 1587-1597.
- 386 **Ashford AE, Vesk PA, Orlovich DA, Markovina AL, Allaway WG. 1999.** Dispersed
387 polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis* / *Pisolithus tinctorius*
388 ectomycorrhizas. *Fungal Genetics and Biology* **28**: 21–33.
- 389 **Banuelos MA, Madrid R, Rodriguez-Navarro A. 2000.** Individual functions of the HAK
390 and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Molecular*
391 *Microbiology* **37**: 671-679.

- 392 **Bellion M, Courbot M, Jacob C, Guinet F, Blaudez D, Chalot M. 2007.** Metal induction of
393 a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma*
394 *cylindrosporum*. *New Phytologist* **174**: 151-158.
- 395 **Broadley MR, White PJ. 2005.** Plant nutritional genomics. Oxford: Blackwell Publishing.
396 CRC Press pp. 26-65.
- 397 **Bücking H, Heyser W. 1999.** Elemental composition and function of polyphosphates in
398 ectomycorrhizal fungi – an X-ray microanalytical study. *Mycological Research* **103**:
399 31-39.
- 400 **Bücking H, Kuhn AJ, Schröder WH, Heyser W. 2002.** The fungal sheath of
401 ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium,
402 and potassium into the root cortex? *Journal of Experimental Botany* **53**: 1659-1669.
- 403 **Bücking H, Hans R, Heyser W. 2007.** The apoplast of ectomycorrhizal roots - site of
404 nutrient uptake and nutrient exchange between the symbiotic partners. *The Apoplast of*
405 *Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*, 97-108, B.
406 Sattelmacher and W.J. Horst (eds.), Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- 407 **Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty**
408 **PE, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, et al. 2013.** Biotrophic transportome in
409 mutualistic plant fungal interactions. *Mycorrhiza* doi:10.1007/s00572-013-0496-9.
- 410 **Clarkson DT, Hanson JB. 1980.** The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of*
411 *Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **31**: 239-298.
- 412 **Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Gay G, Marmeisse R. 2003.** *Agrobacterium*
413 *tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the
414 symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology*
415 *Letters* **220**: 141-148.

- 416 **Corratgé C, Zimmermann S, Lambilliotte R, Plassard C, Marmeisse R, Thibaud JB,**
417 **Lacombe B, Sentenac H, 2007.** Molecular and functional characterization of a Na⁺-
418 K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma*
419 *cylindrosporum*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 26057-26066.
- 420 **Corratgé-Faillie C, Jabnoue M, Zimmermann S, Véry AA, Fizames C, Sentenac H.**
421 **2010.** Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT
422 transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 2511-2532.
- 423 **Debaud JC, Gay G. 1987.** *In vitro* fruiting under controlled conditions of the
424 ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*.
425 *New Phytologist* **105**: 429-435.
- 426 **Eilmann B, Rigling A. 2012.** Tree-growth analyses to estimate tree species' drought
427 tolerance. *Tree Physiology* **32**: 178-187.
- 428 **El-Mesbahi MN, Azcón R, Ruiz-Lozano JM, Aroca R. 2012.** Plant potassium content
429 modifies the effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on root hydraulic properties
430 in maize plants. *Mycorrhiza* **22**: 555-564.
- 431 **Garcia K, Haider MZ, Delteil A, Corratgé-Faillie C, Conéjero G, Tatry MV, Becquer A,**
432 **Amenc L, Sentenac H, Plassard C, Zimmermann S. 2013** Promoter-dependent
433 expression of the fungal transporter HcPT1.1 under Pi shortage and its spatial
434 localization in ectomycorrhiza. *Fungal Genetics and Biology* **58-59**: 53-61.
- 435 **Hedrich R. 2012.** Ion channels in plants. *Physiological Reviews*. **92**: 1777-1811.
- 436 **Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Godbold DL. 2001.** Interdependence of
437 phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal
438 fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* **149**: 327-337.

- 439 **Jongbloed RH, Clement JMAM, Borst-Pauwels GWFH. 1991.** Kinetics of NH_4^+ and K^+
440 uptake by ectomycorrhizal fungi. Effect of NH_4^+ on K^+ uptake. *Physiologia Plantarum*
441 **83:** 427-432.
- 442 **Korhonen A, Lehto T, Repo T. 2013.** Frost hardiness of mycorrhizal (*Hebeloma* sp.) and
443 non-mycorrhizal Scots pine roots. *Mycorrhiza* **23:** 551-559.
- 444 **Lambilliotte R, Cooke R, Samson D, Fizames C, Gaymard F, Plassard C, Tatry MV,**
445 **Berger C, Laudie M, Legeai F et al. 2004.** Large-scale identification of genes in the
446 fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of
447 ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **164:** 505-513.
- 448 **Lebaudy A, Véry AA, Sentenac H. 2007.** K^+ channel activity in plants: genes, regulations
449 and functions. *FEBS Letters* **581:** 2357-2366.
- 450 **Leigh RA, Wyn Jones RG. 1984.** A hypothesis relating critical potassium concentrations for
451 growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist*
452 **97:** 1-13.
- 453 **Li J, Bao S, Zhang Y, Ma X, Mishra-Knyrim M, Sun J, Sa G, Shen X, Polle A, Chen S.**
454 **2012.** *Paxillus involutus* strains MAJ and NAU mediate K^+/Na^+ homeostasis in
455 ectomycorrhizal *Populus x canescens* under NaCl stress. *Plant Physiology* **159:** 1771-
456 1786.
- 457 **Louche J, Ali MA, Cloutier-Hurteau B, Sauvage FX, Quiquampoix H, Plassard C. 2010.**
458 Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma*
459 *cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology*
460 *Ecology* **73:** 323-335.
- 461 **Marschner H, Dell B. 1994.** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* **159:** 89-
462 102.

- 463 **Morizet J, Mingeau M. 1976.** Effect of environment on water uptake, as studied on
464 beheaded exuding tomato. 1. Role of nutrients. *Annales Agronomiques* **27**: 183–205.
- 465 **Müller T, Benjdia M, Avolio M, Voigt B, Menzel D, Pardo A, Frommer WB, Wipf D.**
466 **2006.** Functional expression of the green fluorescent protein in the ectomycorrhizal
467 model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* **16**: 437–442.
- 468 **Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M,**
469 **Wipf D. 2007.** Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma*
470 *cylindrosporum* - *Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* **68**: 41–51.
- 471 **Nehls U, Göhringer F, Wittulsky S, Dietz S. 2010.** Fungal carbohydrate support in the
472 ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology* **12**: 292–301.
- 473 **Ohno T, Zibilske LM. 1991.** Determination of low concentrations of phosphorus in soil
474 extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal*. **55**: 892–895.
- 475 **Plassard C, Dell B. 2010.** Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology* **30**:
476 1129–1139.
- 477 **Porrás-Soriano A, Soriano-Martín ML, Porrás-Piedra A, Azcón R. 2009.** Arbuscular
478 mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive
479 trees under nursery conditions. *Journal of Plant Physiology* **66**: 1350–1359.
- 480 **Rao PS, Niederpruem DJ. 1969.** Carbohydrate metabolism during morphogenesis of
481 *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *Journal of Bacteriology* **100**: 1222–1228.
- 482 **Rekangalt D, Verner MC, Kües U, Walser PJ, Marmeisse R, Debaud JC, Fraissinet-**
483 **Tachet L. 2007.** Green fluorescent protein expression in the symbiotic basidiomycete
484 fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters* **268**: 67–72.
- 485 **Rivetta A, Allen KE, Slayman CW, Slayman CL. 2013.** Coordination of K⁺ transporters in
486 *Neurospora*: TRK1 is scarce and constitutive, while HAK1 is abundant and highly
487 regulated. *Eukaryotic Cell* **12**: 684–696.

- 488 **Rygiewicz PT, Bledsoe CS. 1984.** Mycorrhizal effects on potassium fluxes by northwest
489 coniferous seedlings. *Plant Physiology* **76**: 918-923.
- 490 **Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis* (3rd edition). New York, NY, USA:
491 Academic Press.
- 492 **Takanishi I, Ohtomo R, Hayatsu M, Saito M. 2009.** Short-chain polyphosphate in
493 arbuscular mycorrhizal roots colonized by *Glomus spp.*: A possible phosphate pool for
494 host plants. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 1571–1573.
- 495 **Tatry MV, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, Van Aarle I, Amenc LK, Alary R,**
496 **Zimmermann S, Sentenac H, Plassard C. 2009.** Two differentially regulated
497 phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and
498 phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant Journal* **57**: 1092-
499 1102.
- 500 **Vieira-Pires RS, Szollosi A, Morais-Cabral JH. 2013.** The structure of the KtrAB
501 potassium transporter. *Nature* **496**: 323-328.
- 502 **Wallenda T, Read DJ. 1999.** Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. *Plant*
503 *& Cell Environment* **22**: 179-187.
- 504 **Wang Y, Wu WH. 2013.** Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual Review*
505 *of Plant Biology* **64**: 4.1-4.26.

506 **Supporting Information**

507 **Fig. S1** *In vitro* method of co-culture of *Pinus pinaster* host plant and *Hebeloma*
508 *cylindrosporum* ectomycorrhizal fungus.

509 **Fig. S2** Quantification of the expression level of the potassium transporter *HcTrk1* under K⁺
510 and Na⁺ deprivation in *Hebeloma cylindrosporum* h7.

511 **Fig. S3** Expression of putative potassium transport systems of *Hebeloma cylindrosporum* in
512 *HcTrk1* over-expressing fungal lines.

513 **Fig. S4** Quantification of the expression level of the potassium transporter *HcTrk1* and
514 phosphate transporter *HcPT1.1* under Pi and K⁺ deprivation, respectively, in *Hebeloma*
515 *cylindrosporum* h7.

516 **Table S1** Primer list.

517 **Figures**

518 **Fig. 1** Impact of ectomycorrhizal symbiosis on plant fitness under potassium deprivation. (a)
519 Two-month old *Pinus pinaster* plants non-mycorrhized (Non-Myc) or mycorrhized with
520 *Hebeloma cylindrosporum*. Either the wild-type strain (h7) or the strain transformed with an
521 empty vector (E.V.) were grown in K⁺ sufficient (SK) or deficient (low K⁺; LK) conditions.
522 Note the difference in growth of plant shoots in K⁺ deficient conditions. (b) Dry matter (DW)
523 of whole plants (n = 4 to 5) was determined for plants grown either in SK or LK conditions.
524 (c,d) The K⁺ content in roots and shoots of non-mycorrhized and mycorrhized plants was
525 determined for plants grown under SK (c) and LK (d) conditions. Double stars indicate
526 significant differences (using the Student's test) between SK and LK conditions (b) or
527 between the mycorrhized and non-mycorrhized plants (d) (p < 0.01).

528 **Fig. 2** Expression of *HcTrk1* transcripts in ectomycorrhiza. *In situ* hybridization on
529 mycorrhizas from 2-month co-cultures of *P. pinaster*/*H. cylindrosporum* with *HcTrk1*-specific
530 (a,b) and rRNA 18S probes (c,d). Control sense probes did not show any signals (a,c). *HcTrk1*
531 transcripts were detected in extraradical hyphae, in the fungal sheath and in the Hartig net (b).
532 Blue signals were observed in all cells using control antisense rRNA 18S probes (d). Scale bar
533 = 100 μm. Hn: Hartig net; sh: sheath; exh: extraradical hyphae.

534 **Fig. 3** Localization of *HcTrk1* proteins in external hyphae of the ectomycorrhiza formed by
535 *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. *P. pinaster* and *H. cylindrosporum* transgenic
536 lines were co-cultivated for 2 months. (a) Empty vector fungal strain. (b, c) Two independent
537 transgenic strains expressing *HcTrk1*-EGFP translational fusion proteins (isolate 3 (b) and 8
538 (c)). First lane, bright field microscopy. Second lane, wheat germ agglutinin (WGA)
539 conjugated with Alexa Fluor® 555 fluorophore, used to identify the structures of the fungal
540 partner. Third lane, EGFP signals observed in fungal transformants with the *HcTrk1*-EGFP
541 fusion proteins (b, c) in sheath and weakly in soil exploratory hyphae (arrowheads). Fourth
542 lane, WGA-Alexa 555 - EGFP merged pictures. Magnification: 40x (a) and 20x (b,c). Hn:
543 Hartig net; sh: sheath; exh: extraradical hyphae.

544 **Fig. 4** Production of *HcTrk1* over-expressing lines in *Hebeloma cylindrosporum* and T-DNA
545 insertion verification. (a) Expression levels of *HcTrk1* were quantified using qRT-PCR in an
546 empty vector (E.V.) and *HcTrk1* over-expressing (OE-Trk1-1, OE-Trk1-2, OE-Trk1-7 and
547 OE-Trk1-9) fungal strains. Relative expression was normalized using the α -tubulin
548 housekeeping gene from *H. cylindrosporum*. (b) PCR test of T-DNA insertion into the two
549 *HcTrk1* over-expressing fungal lines selected. Lanes 1 and 4: fungal line transformed with the
550 empty vector pPZP-133 (isolate 28.2). Lanes 2-3: fungal lines transformed with the pPZP-
551 OETrk1 vector (isolates 7 and 9). Amplifications were made with primers specific for LB and
552 RB of the T-DNA for lane 1 (pPZP-219-F and pPZP-492-R), and with *Pgpd* promoter (*Pgpd*-
553 F) and *HcTrk1* cDNA (OETrk1-SpeI-R) primers for lanes 2-4. Statistical tests were made
554 with the Student's test, with respect to the empty vector controls (a) (**: $p < 0.01$).

555 **Fig. 5** Phenotype analysis of *HcTrk1* over-expressing lines of *Hebeloma cylindrosporum*. (a)
556 DW of *HcTrk1* over-expressing fungal strains was determined after two weeks culture in N6
557 liquid medium (10 mM K⁺). (b,c) Two-week old cultures of control and transgenic fungal
558 strains were transferred into N6 medium without K⁺ (N6-K medium) and sampled at 12, 24

559 and 48 hours (T12, T24 and T48). T0 corresponds to the sample taken just before K⁺ removal.
560 The K⁺ (b) and Na⁺ (c) contents were measured in the empty vector control mycelia(◆), and
561 in transgenic OE-*HcTrk1-7* (Δ) and OE-*HcTrk1-9* (○) lines. Mean values are given with the
562 standard error (n = 4 to 6) for each data point. Statistical tests were made with the Student's
563 test, with respect to the empty vector control (a) and to the T0 point (b,c) (**: p < 0.01).

564 **Fig. 6** Potassium and sodium contents in *Pinus pinaster* plants grown for two months alone or
565 in co-culture with *Hebeloma cylindrosporum* under K⁺ sufficient (SK) or deficient (low K⁺;
566 LK) conditions. Root and shoot contents of non-mycorrhized plants (Non-Myc) are compared
567 with those of mycorrhized plants inoculated with the wild-type fungus (h7), the fungal strain
568 transformed with the empty vector (E.V.) or with *HcTrk1* over-expressing fungi (OE-Trk1-7
569 and OE-Trk1-9). (a,b) K⁺ contents of plants grown in K⁺ sufficient (a) or deficient (b)
570 conditions. (c,d) Na⁺ contents of plants grown in K⁺ sufficient (c) or deficient (d) conditions.
571 Mean values are provided with the standard error (n = 4 to 5). Statistical tests were made
572 using the Student's test with respect to non-mycorrhized plants (**) (p < 0.01).

573 **Fig. 7** The impact of external K⁺ on the P contents of non-mycorrhized and mycorrhized
574 *Pinus pinaster* plants. Total phosphorus contents in roots and shoots of non-mycorrhized
575 (Non-Myc) or mycorrhized plants inoculated with the control wild type h7 strain, the control
576 strain transformed with the empty vector (E.V.) or the *HcTrk1* over-expressing lines OE-
577 Trk1-7 and OE-Trk1-9. (a) K⁺-sufficient (SK) and (b) K⁺-deficient (low K⁺; LK) co-culture
578 conditions. Mean values are given with the standard error (n = 4 to 5). Statistical tests were
579 made with the Student's test with respect to the non-mycorrhized plants (**) or h7 and empty
580 vector controls (##) (p < 0.01).

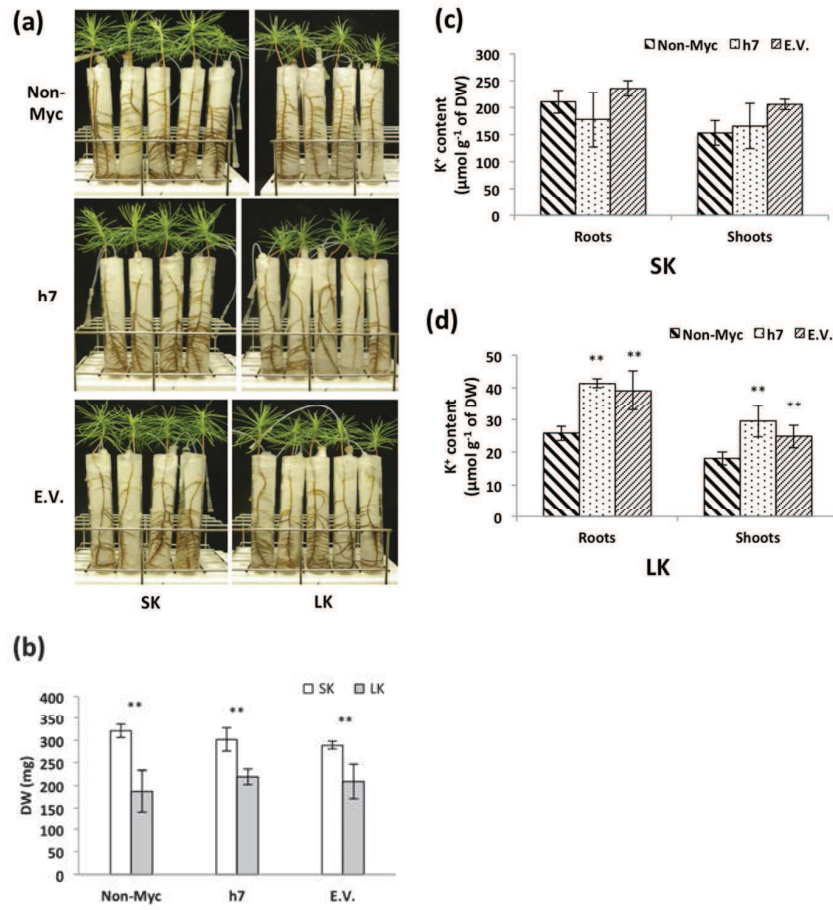


Fig. 1

Figure 1
190x254mm (150 x 150 DPI)

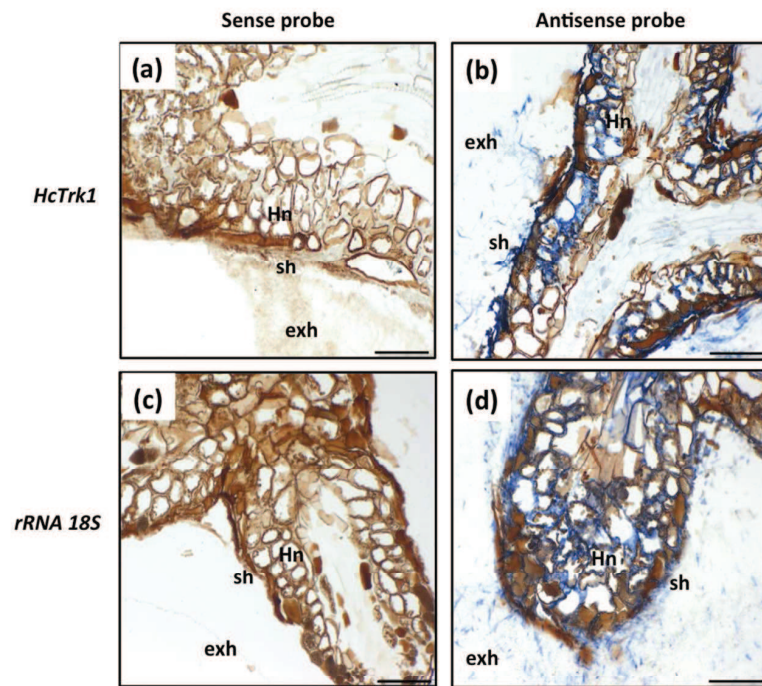


Fig. 2

Figure 2
190x254mm (150 x 150 DPI)

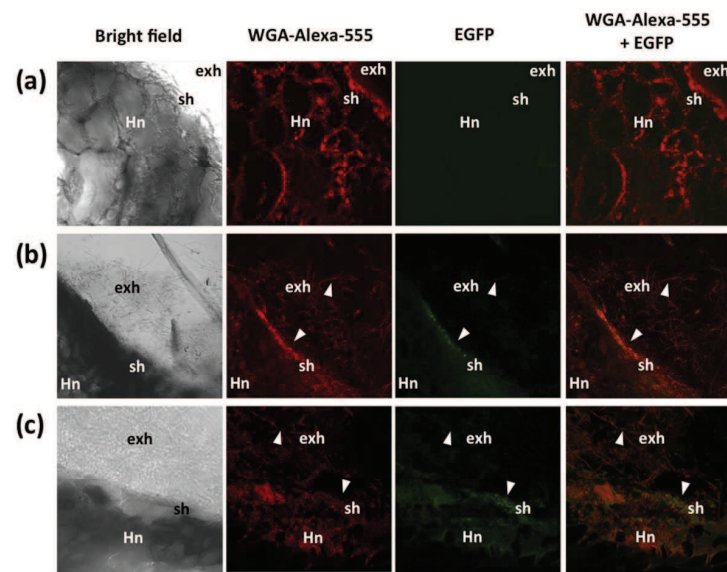


Fig. 3

Figure 3
190x254mm (150 x 150 DPI)

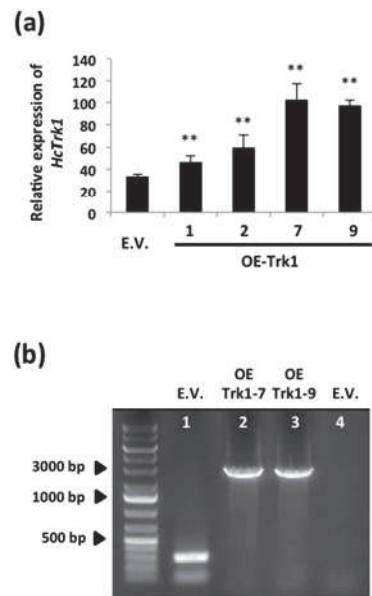


Fig. 4

Figure 4
190x254mm (150 x 150 DPI)

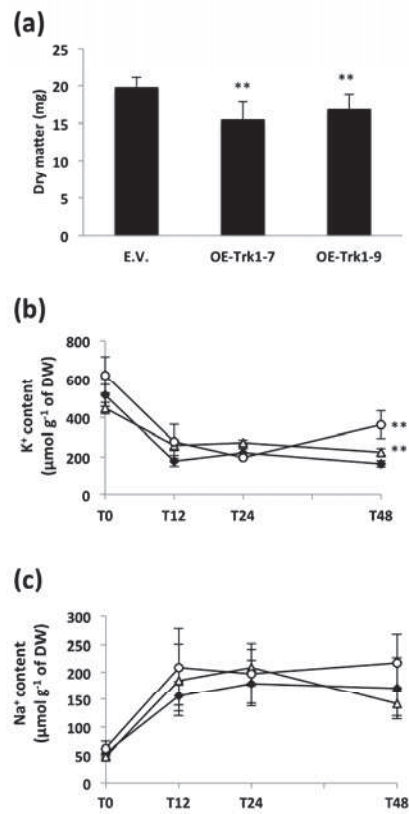


Fig. 5

Figure 5
190x254mm (300 x 300 DPI)

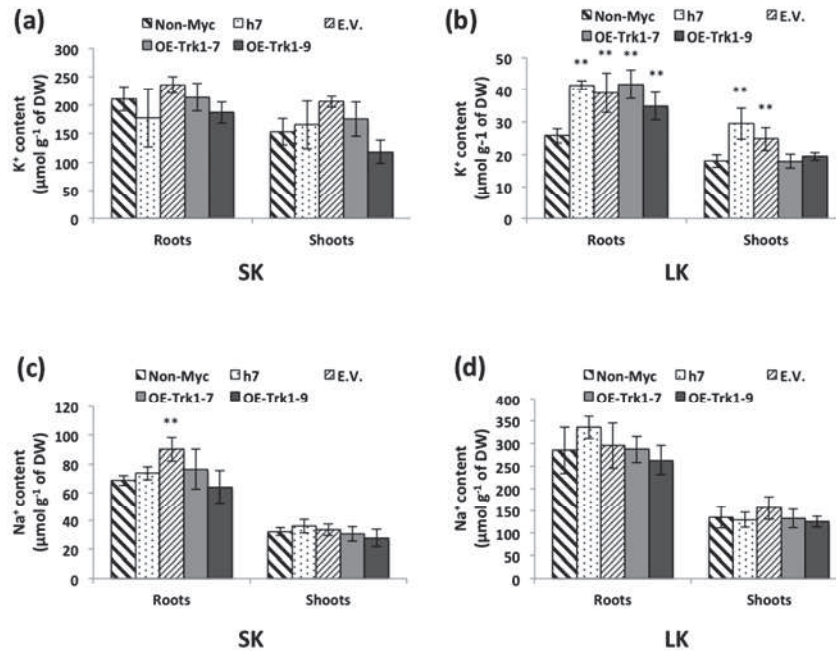


Fig. 6

Figure 6
190x254mm (150 x 150 DPI)

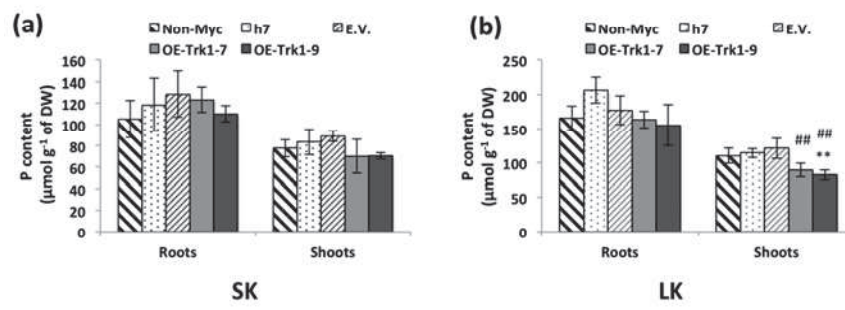


Fig. 7

Figure 7
190x254mm (150 x 150 DPI)

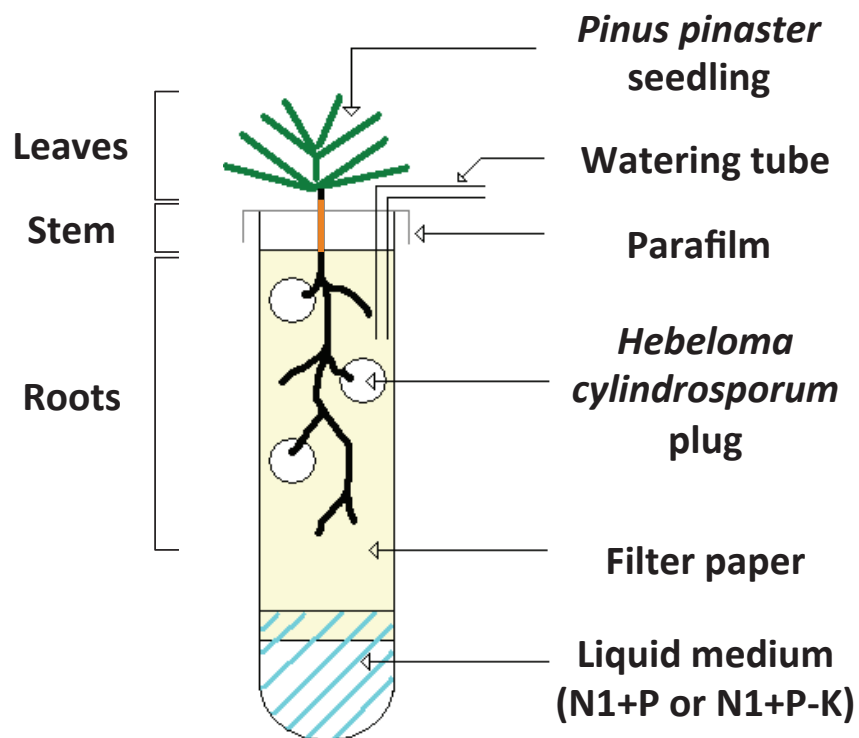


Fig. S1 *In vitro* method of co-culture of the *Pinus pinaster* host plant and *Hebeloma cylindrosporum* ectomycorrhizal fungus. Plant seedlings were co-cultivated with three to five plugs of agarose containing the fungus in a glass tube. Filter paper was placed in the tube to maintain the plant-fungus system against the tube wall and to let the culture media travel up. N1+P or N1+P-K media were provided regularly using the watering tube. The system was covered with parafilm, with the aerial part of the plant outside the tube.

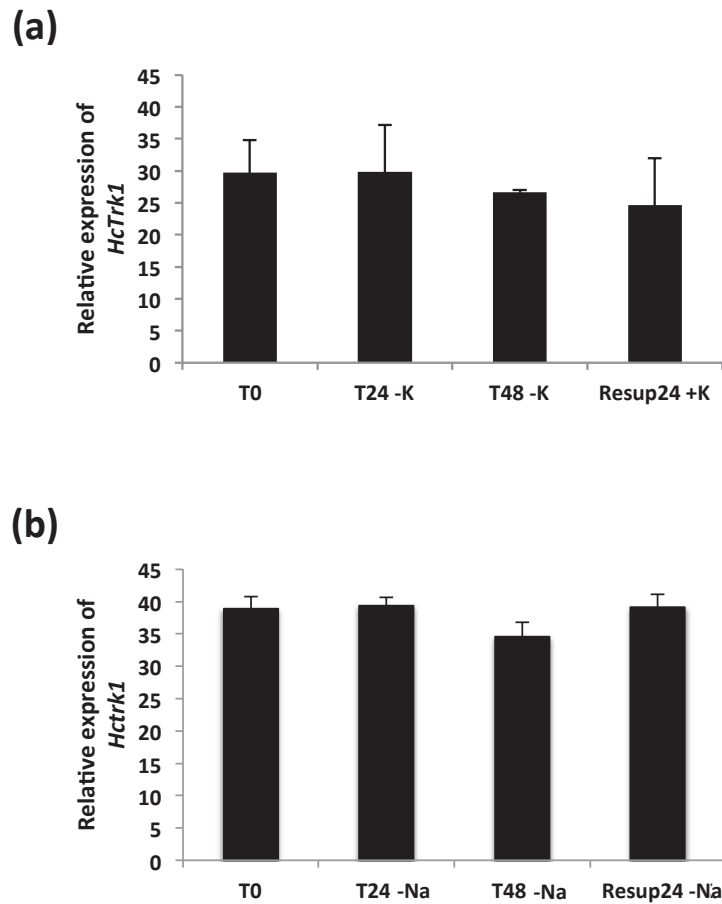


Fig. S2 Quantification of the expression level of the potassium transporter *HcTrk1* under K^+ and Na^+ deprivation in *Hebeloma cylindrosporium* h7. Expression levels of *HcTrk1* were quantified by RT-qPCR after (a) K^+ or (b) Na^+ removal for 24 and 48 h, followed by 24 h of re-supply. Relative expression levels were normalized using the α -tubulin housekeeping gene from *H. cylindrosporium*. Mean values are given with standard errors ($n = 4$) for each data point.

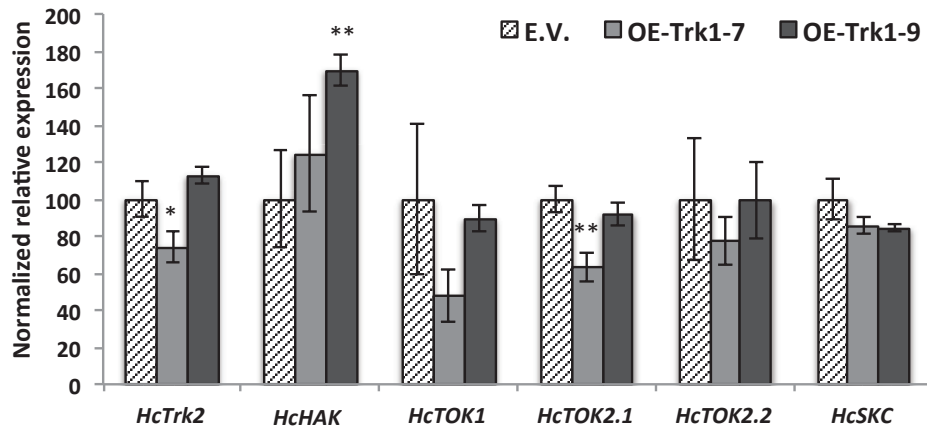


Fig. S3 Expression of putative potassium transport systems of *Hebeloma cylindrosporum* in *HcTrk1* over-expressed fungal lines. Expression levels of *HcTrk2* and *HcHAK* transporters and *HcTOK1*, *HcTOK2.1*, *HcTOK2.2* and *HcSKC* channels were quantified using RT-qPCR in the empty vector (E.V.) and over-expressing (OE-Trk1-7 and OE-Trk1-9) fungal strains. Mean values are given with the standard error (n = 4 to 6) for each data point. Statistical tests were made with the Student's test, with respect to the empty vector control (*: p < 0.05; **: p < 0.01).

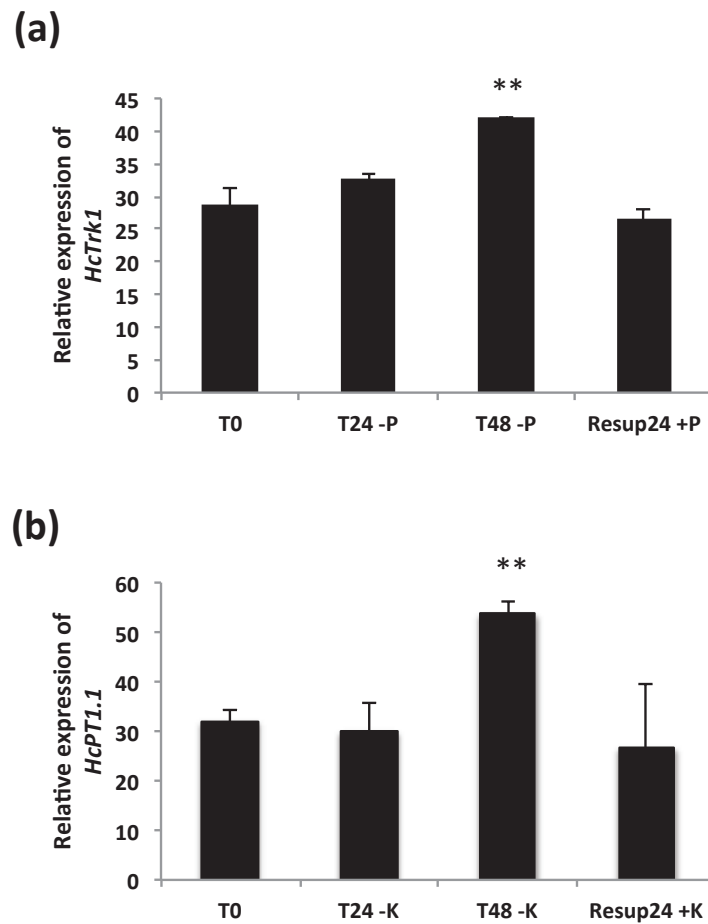


Fig. S4 Quantification of the expression level of the potassium transporter *HcTrk1* and phosphate transporter *HcPT1.1* under Pi and K⁺ deprivation respectively in *H. cylindrosporium* h7. Expression levels of *HcTrk1* (a) and *HcPT1.1* (b) were quantified by RT-qPCR after Pi (a) or K⁺ (b) restriction for 24 and 48 h, followed by 24 h of re-supply. Relative expression levels were normalized using the α -tubulin housekeeping gene from *H. cylindrosporium*. Mean values are given with standard errors (n = 4) for each data point. Statistic tests were made with Student's test with respect to the T0 point ($p < 0.01$).

Amplification	Name	5' - 3' Sequence
<i>HcTrk1</i> - Translational fusion vector	PromTrk1-SpeI-F	<u>CCTTACTAGTT</u> ACCTAGAACCAAGTCATCGACG
	FT-Trk1-SpeI-R	<u>CCTTACTAGT</u> AATTCTAAGAGGCGGTAAATTAGGAG
	PromTrk1-Trk1-F	TTATACCTATCCTGATACCCATGGTGGACCAGCCCGCAGA
	PromTrk1-Trk1-R	TCTGCGGGCTGGTCCACCATGGGTATCAGGATAGGTATAA
<i>HcTrk1</i> cDNA	Trk1-SpeI-F	<u>ACTAGT</u> ATGGTGGACCAGCCCGCAGATTTA
	OETrk1-SpeI-R	<u>ACTAGT</u> CTAAATTCTAAGAGGCGGTAAATTAGG
<i>HcTrk1</i> - In situ hybridization	ISHTrk1-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAAGGATTGCTTCAAGGATTCTCCGGA
	ISHTrk1-R	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAAGGGTGAAGGCTCGCAACTGGAAC
	ISHTrk1-Prom	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAA
PCR verifications	pPZP-219-F	TCATTAGGCACCCAGGCTTTAC
	pPZP-492-R	ATTGTAAAGCGGGGTGCCTGA
	Pgpd-F	GAGCTCGGTACCCGGGGATCAGCTTTA
<i>Tubuline</i> -qPCR	qPCR-Tub-F	GTCTTCAAGGCTTCTTCGTCTTC
	qPCR-Tub-R	ACAGTCAGAGTGCTCCAAGGTAGT
<i>HcTrk1</i> -qPCR	qPCR-Trk1-F	TGGAACCAACTCATTGCTG
	qPCR-Trk1-R	GAAACCAAGCGAGGTTGAGC
<i>HcTrk2</i> -qPCR	qPCR-Trk2-F	GAGTTCAAGCAGGACGAAGG
	qPCR-Trk2-R	CACACCATTCCCGTTCTCTT
<i>HcHAK</i> -qPCR	qPCR-HAK-F	GTGCGTTTTCCACAAGATT
	qPCR-HAK-R	GCGAACCTTGTTACGACAT
<i>HcSKC</i> -qPCR	qPCR-SKC-F	GGCCAGATTGGGAAAGGCCG
	qPCR-SKC-R	CCGGCCAACCTCCTATCTG
<i>HcTOK1</i> -qPCR	qPCR-TOK1-F	GGAACCAGGGGATGGTCTAT
	qPCR-TOK1-R	ATGGGTTGTATGCGGAAGAG
<i>HcTOK2.1</i> -qPCR	qPCR-TOK2.1-F	GGTGCACCACTATCCGAAC
	qPCR-TOK2.1-R	CACCCATGCTTACGTGTGTC
<i>HcPT1.1</i> -qPCR	qPCR-PT1.1-F	CACAAATAAATTCGTCAAGCATATTCTCG
	qPCR-PT1.1-R	GCGTTCTCGCACACCTCTG
<i>HcPT2</i> -qPCR	qPCR-PT2-F	CTTCGGTTGCTGTATCGCTG
	qPCR-PT2-R	TACGCACACGGATTCCTCC

Table S1 Primer list. Restriction enzyme sites indicated in primer name, are underlined in the corresponding 5'-3' sequence.

3.1.3 Résultats complémentaires – Stratégie RNAi pour étudier le rôle du transporteur *HcTrk1*

3.1.3.1 Production de lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporum*

Une stratégie complémentaire à la surexpression génétique a été menée afin d'apprécier le rôle du transporteur *HcTrk1* d'*H. cylindrosporum*, en culture pure et en condition symbiotique. Ainsi, un plasmide contenant une cassette RNAi ciblant spécifiquement *HcTrk1* a été construit et utilisé pour transformer génétiquement *H. cylindrosporum* (Cf. 2.7.2). Parmi les

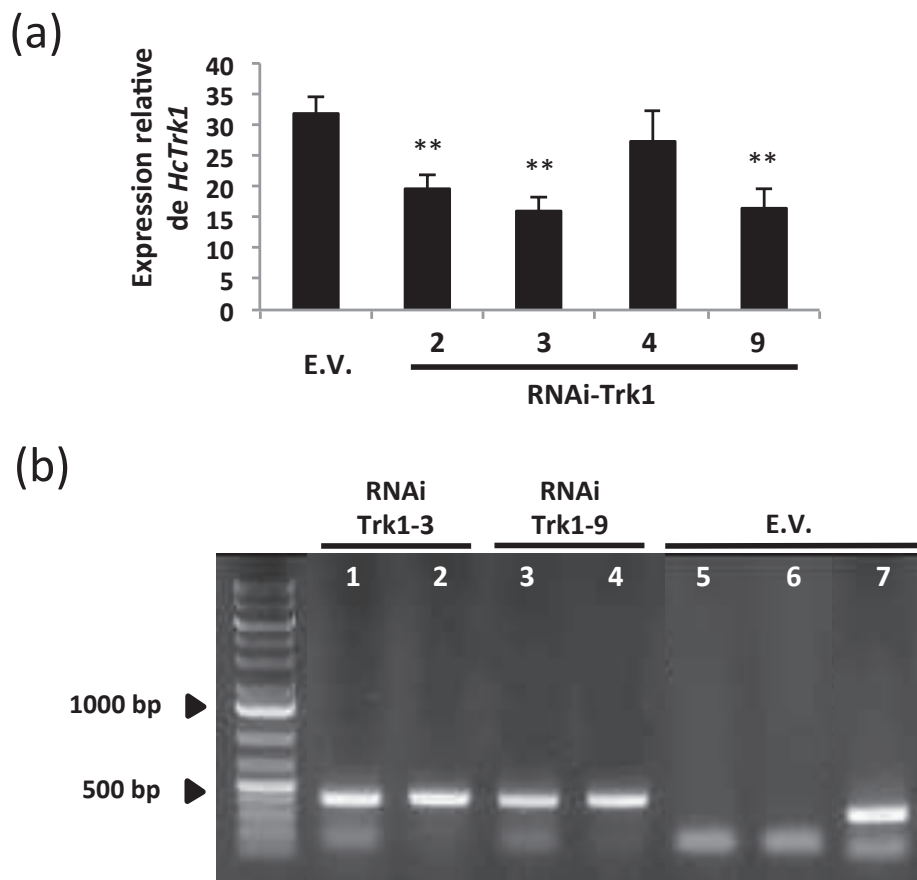


Figure 22: Obtention et validation de lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporum*.

(a) Quantification du niveau d'expression de *HcTrk1* par RT-qPCR dans les lignées vecteur vide (E.V.) et RNAi-Trk1-2, RNAi-Trk1-3, RNAi-Trk1-4 et RNAi-Trk1-9 d'*H. cylindrosporum*. L'expression relative a été normalisée par le gène de ménage codant pour l' α -tubuline. Les étoiles (**) indiquent une différence significative avec le vecteur vide ($p < 0.01$; test de Student)

(b) Vérification de l'insertion de l'ADN-T par PCR sur l'ADNg des lignées E.V. (lignes 5-7) RNAi-Trk1-3 (ligne 1-2) et RNAi-Trk1-9 (ligne 3-4). Les amplifications ont été réalisées à l'aide des amorces spécifiques des bordures LB et RB de l'ADN-T (pPZP-219-F et pPZP-492-R; ligne 7); de l'amorce LbNR-intron-R spécifique de l'intron et de l'amorce RNAi-Trk1S-SnaBI spécifique du fragment sens de *HcTrk1* (lignes 1,3,5); et de l'amorce LbNR-intron-F spécifique de l'intron et de l'amorce RNAi-Trk1AS-KpnI spécifique du fragment anti-sens de *HcTrk1* (lignes 2,4,6).

lignées obtenues, quatre ont été sélectionnées sur la base du faible niveau d'expression de *HcTrk1* (Figure 22a). La lignée RNAi-Trk1-4 avait été sélectionnée à partir d'un premier crible qui montrait une très faible réduction de l'expression du transporteur (données non montrées). Le second crible caractérisé par la mise en place de 3 à 4 répétitions biologiques n'a cependant pas pu significativement valider cette lignée (Figure 22a). Les lignées RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk-9 ont été sélectionnées sur la base de la diminution de l'expression de *HcTrk1* (2 fois) et utilisées pour la suite des analyses et pour les expériences de mycorhization.

Afin de vérifier que la faible expression de *HcTrk1* chez les lignées RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk-9 était bien liée à la présence du transgène RNAi, des analyses PCR sur leur ADNg ont été réalisées (Figure 22b). Ainsi, une amplification des fragments sens et antisens fusionnés à l'intron de la nitrate réductase de *L. bicolor* a été obtenue pour chacune des lignées (Figure 22b, lignes 1 à 4). L'absence d'amplification en utilisant ces mêmes amorces sur l'ADNg du champignon transformé avec le vecteur vide (E.V.) a permis de contrôler leur spécificité (Figure 22b, lignes 5 et 6). Enfin, le transformant E.V. a été vérifié à l'aide d'amorces s'hybridant aux bordures droite (RB) et gauche (RB) de l'ADN-T (Figure 22b, ligne 7).

3.1.3.2 Analyse phénotypique des lignées RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9

Dans le but d'évaluer les effets physiologiques que peut avoir la réduction de l'expression du transporteur *HcTrk1* sur *H. cylindrosporum*, la biomasse sèche et la concentration intracellulaire en K^+ et en Na^+ ont été déterminées chez les lignées RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9.

La détermination de la matière sèche faite sur des cultures de 14 jours en milieu N6 liquide a permis de constater que les lignées sous-exprimant *HcTrk1* ont une biomasse significativement moins importante que les lignées contrôles (seule la lignée E.V. est montrée). Ces résultats montrent que la diminution du niveau d'expression de *HcTrk1* affecte la croissance du champignon (Figure 23a). En effet, on note chez ces lignées une diminution de la croissance d'environ 25 % en comparaison à la lignée E.V.

Afin de voir si la diminution de l'expression de *HcTrk1* impacte la teneur en K^+ du champignon, les différentes lignées ont été mises en culture liquide dans du milieu N6 pendant 14 jours, prélevées (T0) et carencées en K^+ (milieu N6-K) durant 12, 24 et 48 h avant prélèvement (T12, T24 et T48 respectivement). De façon inattendue, la concentration en K^+

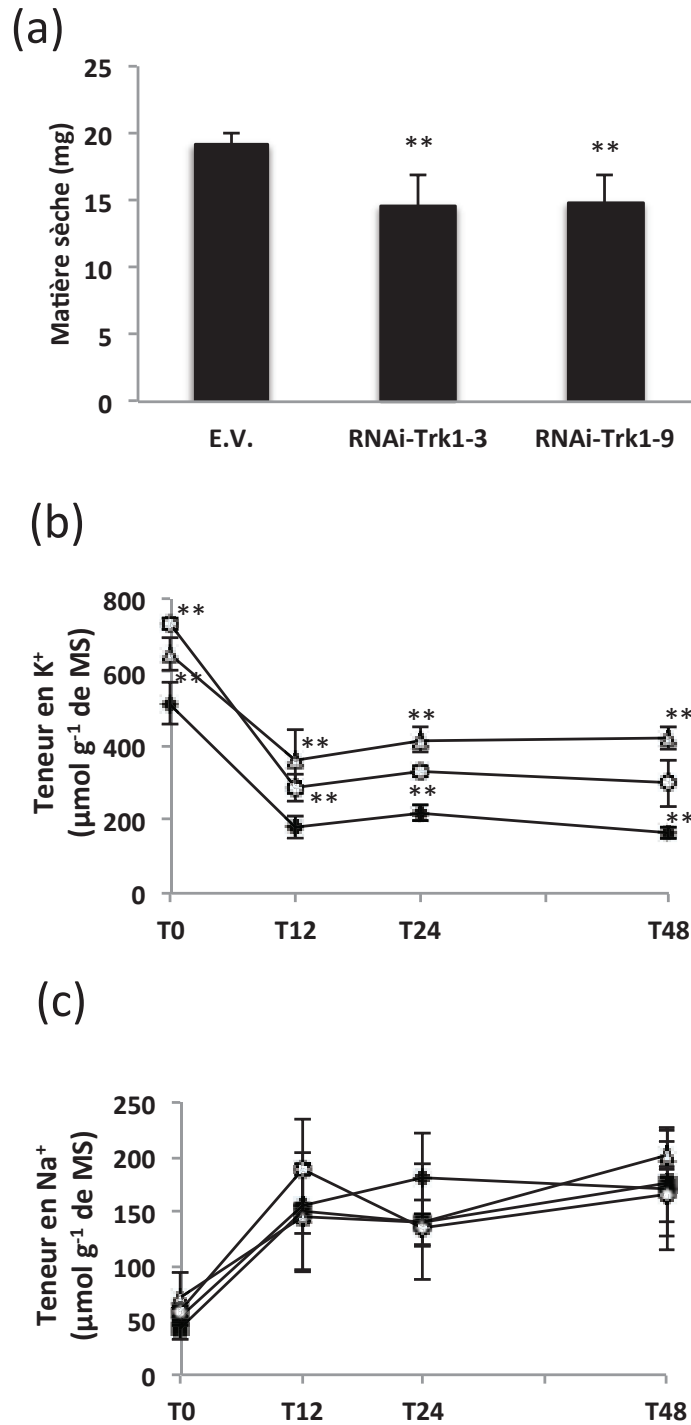


Figure 23: Analyse phénotypique des lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporium*.

(a) Quantification de la matière sèche (MS) des lignées vecteur vide (E.V.) et RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9 d'*H. cylindrosporium* après 14 jours de culture en milieu N6. (b,c) Suivi de la teneur intracellulaire en K⁺ (b) et en Na⁺ (c) des lignées E.V. (◆), RNAi-Trk1-3 (Δ) et RNAi-Trk1-9 (○) au cours d'une cinétique de carence en K⁺. Les échantillons sont prélevés après 14 jours de croissance en milieu N6 (T0) puis après 12 h (T12), 24 h (T24) et 48 h (T48) de culture en milieu dépourvu de potassium (N6-K). n = 4 à 6. Les étoiles (**) indiquent une différence significative avec le vecteur vide (p < 0.01; test de Student).

est significativement plus élevée à T0 chez les lignées RNAi-Trk1 que chez la lignée contrôle (Figure 23b). On aurait en effet pu imaginer que la diminution de l'expression d'un système de transport entrant de K^+ entrainerait une diminution de la teneur en K^+ . Par ailleurs, cette plus grande concentration en K^+ reste observable une fois les champignons transférés dans du milieu N6-K, et tend même à s'intensifier (jusqu'à deux fois plus de K^+ chez la lignée RNAi-Trk1-3 par rapport à la lignée E.V.). Ainsi, ces lignées tolèrent mieux les conditions limitantes en K^+ . En revanche, la concentration en Na^+ reste similaire entre les lignées avec une augmentation d'un facteur 3-4 en condition carencée en K^+ (Figure 23c), indiquant que *HcTrk1* n'intervient pas (directement ou indirectement) dans la récupération du Na^+ dans nos conditions expérimentales.

3.1.3.3 Impact de la sous-expression de *HcTrk1* sur l'expression des autres systèmes de transport de potassium et du transporteur de phosphate *HcPT1.1*

Afin de trouver une explication aux résultats inattendus concernant la concentration en K^+ dans les lignées RNAi-Trk1 présentés précédemment, le niveau d'expression des systèmes de transport putatifs de K^+ d'*H. cylindrosporum* a été analysé par RT-qPCR (Figure 24). Les données d'expression de chaque gène de la figure 24a ont été mises arbitrairement à la valeur 100 afin de placer les différents gènes sur le même graphe. Ainsi, l'expression du transporteur *HcTrk2* et des canaux putatifs *HcTOK1*, *HcTOK2.1*, *HcTOK2.2* et *HcSKC* n'est pas affectée par la diminution de l'expression de *HcTrk1*. En revanche, une augmentation faible (moins de deux fois) mais significative du niveau d'expression du transporteur putatif *HcHAK* est observée chez les lignées RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9 par rapport à la lignée E.V. (Figure 24a). Au cours de la cinétique de carence potassique décrite précédemment, une augmentation de l'expression de *HcHAK* est détectée à 12 h dans les lignées contrôles (h7 non montré) (Figure 24b). Cette surexpression dépendante de la disponibilité en K^+ a également été observée chez la souche h7, 3 h après le début de la carence, pour décroître progressivement jusqu'à 48 h (données non montrées). Il apparaît donc que la surexpression *HcHAK* fait partie d'une des premières adaptations moléculaires d'*H. cylindrosporum* à la carence en K^+ . Ceci laisse penser que ce transporteur pourrait être fortement impliqué dans la nutrition potassique du champignon. Quand on regarde l'expression de *HcHAK* chez les lignées RNAi-Trk1 poussant en carence en K^+ , on s'aperçoit qu'il n'y a pas de surexpression à 12 h (Figure 24b). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en milieu riche en K^+ , *HcHAK* est déjà légèrement surexprimé dans les lignées RNAi-Trk1. En revanche, après 48 h de carence, *HcHAK* est 3 à 4

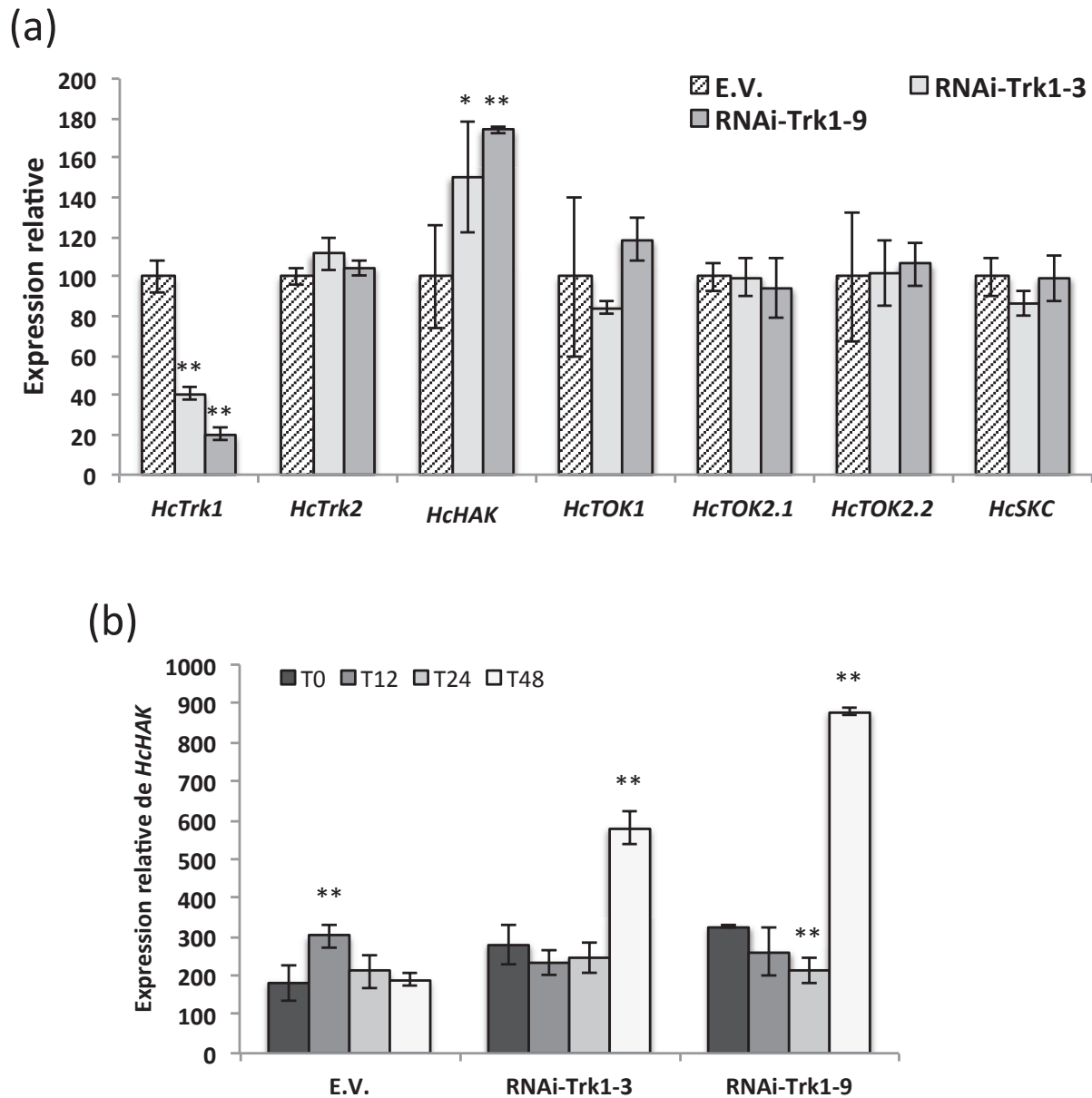


Figure 24: Niveau d'expression des systèmes de transport putatifs de potassium d'*Hebeloma cylindrosporium* chez les lignées RNAi-Trk1.

(a) Quantification par RT-qPCR du niveau d'expression de *HcTrk1*, des transporteurs putatifs de potassium *HcTrk2* et *HcHAK* et des canaux potassiques putatifs *HcTOK1*, *HcTOK2.1*, *HcTOK2.2* et *HcSKC* dans les lignées vecteur vide (E.V.) et RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9 d'*H. cylindrosporium* après 14 jours de culture en milieu N6. (b) Suivi du niveau d'expression de *HcHAK* dans les lignées E.V. et RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9 au cours d'une cinétique de carence en potassium. Les échantillons sont prélevés après 14 jours de croissance en milieu N6 (T0) puis après 12 h (T12), 24 h (T24) et 48 h (T48) de culture en milieu dépourvu de potassium (N6-K). n = 4. Les étoiles indiquent une différence significative avec le vecteur vide (a) ou le temps T0 correspondant (b) (**: p < 0.01; *: p < 0.05; test de Student).

fois surexprimé chez les lignées RNAi-Trk1. Cette réponse plus tardive montre que ces champignons transformés tolèrent mieux la carence en K^+ grâce à la surexpression de *HcHAK* engendrée par la diminution de l'expression de *HcTrk1*. Cette réaction de surexpression de *HcHAK* est donc décalée dans le temps chez ces lignées par rapport aux souches contrôles. Ce mécanisme de surexpression de *HcHAK* chez les transformants RNAi *HcTrk1* rappelle celui observé chez un membre de la même famille de transporteurs chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, chez le mutant d'*A. thaliana atakt1-2* (un canal potassique entrant), une accumulation des transcrits de *AtHAK5* (homologue de *HcHAK*) a été décrite en condition carencée ou non en K^+ (Rubio *et al.*, 2008). Il apparaît également que *AtHAK5* est surexprimé en condition carencée en K^+ et que *AtAKT1* est exprimé constitutivement mais à un niveau plus bas (Rubio *et al.*, 2010), comme nous l'avons observé chez *H. cylindrosporum* pour *HcTrk1*. Ainsi, *AtHAK5* permettrait le prélèvement du K^+ quand celui-ci devient limitant, et *AtAKT1* interviendrait à des concentrations en K^+ plus importantes. Par analogie, on peut supposer qu'un même processus de prélèvement du K^+ interviendrait chez *H. cylindrosporum* en fonction de sa disponibilité dans le milieu. Ainsi, il s'avère que *HcHAK* pourrait être un très bon candidat pour la compréhension des bases moléculaires du transport de K^+ chez les champignons ectomycorhiziens. Des études plus approfondies sur la caractérisation fonctionnelle de *HcHAK* et sur son implication dans la nutrition potassique du champignon et de la plante hôte en milieu pauvre en K^+ sont donc nécessaires.

Dans le manuscrit d'article, des données moléculaires montrant des interactions entre le K^+ et le P via la modification de l'expression de systèmes de transport en milieu pauvre en nutriments ont été présentées (Garcia *et al.*, 2013b; Cf. 3.1.2). L'évaluation du niveau d'expression du transporteur de phosphate *HcPT1.1* chez les lignées RNAi-Trk1 a indiqué qu'il était surexprimé constitutivement (3 à 4 fois) à T0 par rapport à la lignée vecteur vide (Figure 25). *HcPT1.1* est donc surexprimé chez des lignées dont l'expression de systèmes de transport du K^+ est bouleversée, et dont la teneur en K^+ est supérieure aux souches contrôles. De plus, chez la lignée vecteur vide, l'expression de *HcPT1.1* est induite seulement à T12 et à T24, en réponse à la carence en K^+ , puis diminue jusqu'à retrouver son niveau basal à T48. De façon intéressante, chez les deux lignées RNAi-SKC, cette diminution de l'expression de *HcPT1.1* est également observée 48 h après la carence en K^+ , alors que ce transporteur est constitutivement surexprimé. On peut donc imaginer que cette diminution de l'expression est due à la forte surexpression de *HcHAK* observée chez ces mêmes lignées 48 h après la carence en K^+ (Figure 24b). Toutes ces données laissent ainsi supposer que l'expression de *HcPT1.1* qui est dépendante de la concentration extérieure en phosphate (Tatry *et al.*, 2009;

Garcia *et al.*, 2013a), pourrait l'être également du statut potassique du champignon. Ces résultats montrent à nouveau qu'un lien semble exister entre la nutrition potassique et la nutrition phosphatée chez *H. cylindrosporum*, et que l'expression des systèmes de transport *HcTrk1* et *HcPT1.1* peut être dépendante des ressources extérieures en K^+ et en P.

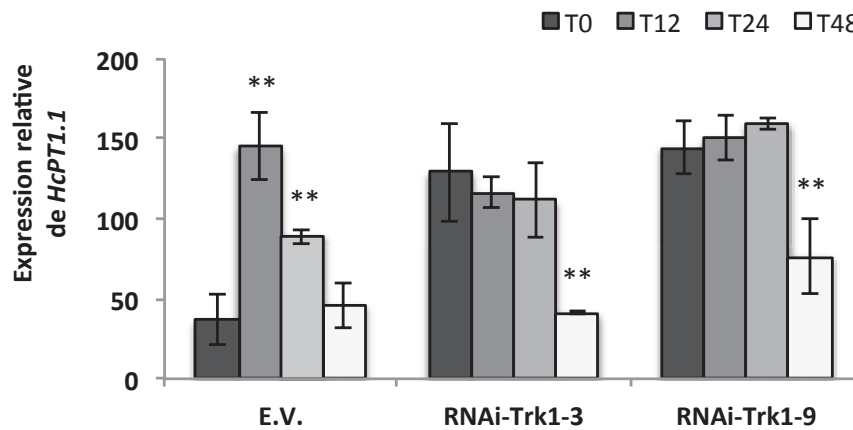


Figure 25: Niveau d'expression du transporteur de phosphate *HcPT1.1* d'*Hebeloma cylindrosporum* chez les lignées RNAi-Trk1.

Suivi du niveau d'expression du transporteur de phosphate *HcPT1.1* dans les lignées E.V. et RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9 au cours d'une cinétique de carence en potassium. Les échantillons sont prélevés après 14 jours de croissance en milieu N6 (T0) puis après 12 h (T12), 24 h (T24) et 48 h (T48) de culture en milieu dépourvu de potassium (N6-K). n = 4. Les étoiles indiquent une différence significative avec le temps T0 correspondant (**: $p < 0.01$; test de Student).

3.1.3.4 Mycorhization de *Pinus pinaster* par des lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporum*

La stratégie d'étude du transfert de nutriments (K^+ , Na^+ et P) du milieu de culture à la plante hôte *P. pinaster* est la même que celle présentée précédemment dans le manuscrit d'article (Garcia *et al.*, 2013b; Cf. 3.1.2). Ces éléments ont donc été dosés dans les parties racinaires et aériennes de plantes âgées de deux mois, mycorhizées ou non et poussant en milieu riche (+K, 1 mM) ou pauvre (-K, 50 μ M) en K^+ .

La quantification de la concentration en K^+ montre que les plantes mycorhizées présentent la même teneur en K^+ que les plantes non mycorhizées en milieu +K (Figure 26a). En revanche, en milieu -K, les plantes mycorhizées par les lignées contrôles (h7 et E.V.) et les deux lignées RNAi-Trk1 ont des teneurs en K^+ dans les racines et dans les parties aériennes supérieures aux plantes non mycorhizées (Figure 26b). Ces données contrastent avec celles obtenues par la stratégie de surexpression de *HcTrk1* qui montraient une plus faible concentration en K^+ dans les parties aériennes des plantes mycorhizées avec les champignons

surexpresseurs, en milieu carencé. Comme on l'a vu en culture pure, la diminution de l'expression de *HcTrk1* est compensée par la forte surexpression de *HcHAK*. Ainsi, l'absence de phénotype en mycorhization laisse supposer que la surexpression de *HcHAK* doit se faire principalement au niveau des sites de récupération des nutriments dans l'ectomycorhize, et non au niveau du réseau de Hartig. De plus, cette compensation qui entraîne une plus grande concentration en K^+ dans le champignon (Figure 23b), n'améliore pas la nutrition potassique de la plante hôte. On peut donc en conclure que ce n'est pas parce qu'un champignon mycorhizien récupère plus de potassium dans le milieu extérieur qu'il en transfèrera plus au partenaire végétal. Il apparaît donc que la sécrétion du K^+ fongique vers les racines de la plante via les canaux potassiques reste limitante. De plus, cette constatation est en accord avec

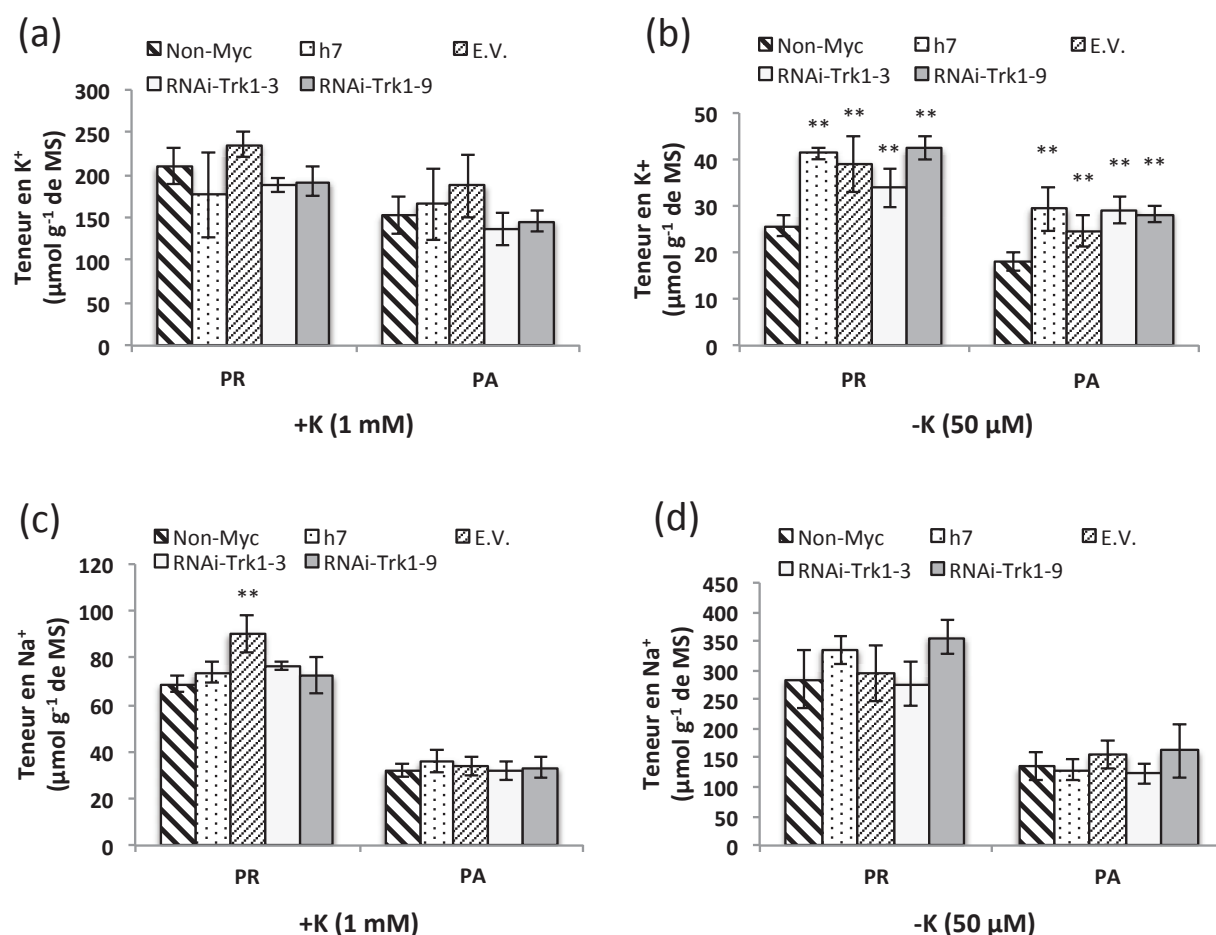


Figure 26: Teneurs en K^+ et Na^+ dans des plantules de *Pinus pinaster* mycorhizées par les lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporium*.

Teneurs en K^+ (a,b) et en Na^+ (c,d) des parties racinaires (PR) et aériennes (PA) en condition carencée en K^+ (b,d) ou non (a,c). Les plantes ne sont pas mycorhizées (Non-Myc) ou mycorhizées par les lignées contrôles (h7 et E.V.) et les lignées transgéniques RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9. n = 4 à 5. Les étoiles indiquent une différence significative avec les plantes non mycorhizées (**: p < 0.01; test de Student).

les récents travaux abordant la "récompense" de chacun des partenaires en fonction de la quantité de nutriments transférée au cours de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules (Kiers *et al.*, 2011; Fellbaum *et al.*, 2012). Si on suit cette hypothèse, on peut supposer que bien que les lignées transgéniques RNAi-Trk1 d'*H. cylindrosporum* prélèvent plus de K^+ dans le milieu extérieur, son transfert au partenaire végétal ne peut pas être amélioré car l'éclaircissement des plantes en chambre de culture n'est pas modifié et n'entraîne donc pas une plus grande synthèse de composés carbonés potentiellement disponibles pour le champignon. Pour valider ou invalider cette hypothèse, il sera nécessaire de modifier artificiellement le statut carboné de la plante hôte et d'observer si l'apport de K^+ du champignon à la plante est affecté ou non en fonction des lignées fongiques utilisées.

Concernant la concentration en Na^+ des plantes, on constate qu'elle augmente d'un facteur 4 en milieu -K (Figure 26c,d). En revanche, elle n'est nullement affectée par la mycorhization, que ce soit en milieu +K (Figure 26c) ou en milieu -K (Figure 26d). Par conséquent, il s'avère que dans nos conditions de culture *H. cylindrosporum* n'est pas impliqué dans la nutrition sodique de la plante, et que le transporteur *HcTrk1* ne joue pas un rôle important dans la récupération du Na^+ chez le champignon et dans son transfert au partenaire végétal.

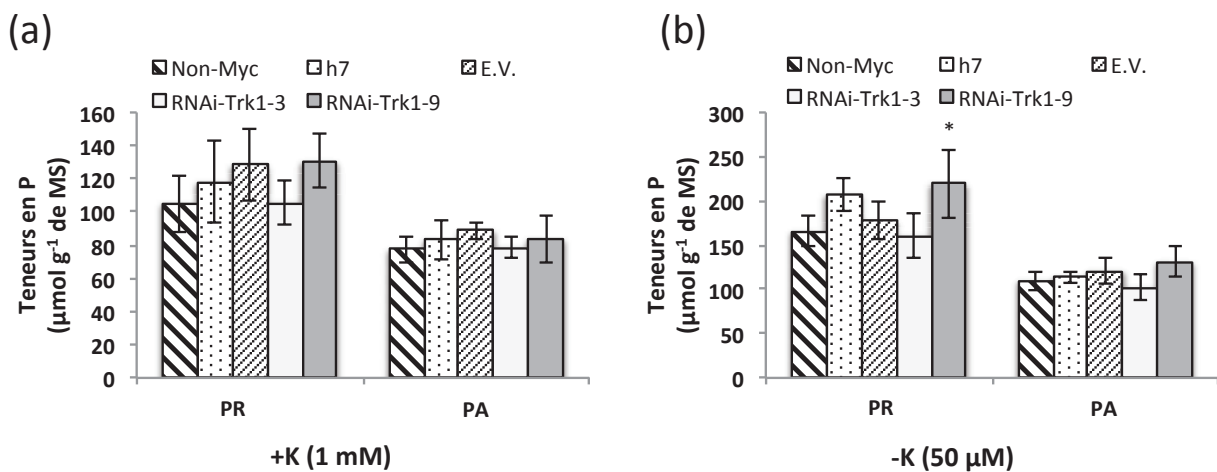


Figure 27: Teneurs en P dans des plantules de *Pinus pinaster* mycorhizées par les lignées RNAi-Trk1 d'*Hebeloma cylindrosporum*.

Teneurs en P des parties racinaires (PR) et aériennes (PA) en condition carencée en K^+ (b) ou non (a). Les plantes ne sont pas mycorhizées (Non-Myc) ou mycorhizées par les lignées contrôles (h7 et E.V.) et les lignées transgéniques RNAi-Trk1-3 et RNAi-Trk1-9. n = 4 à 5. Les étoiles indiquent une différence significative avec les plantes non mycorhizées (*: p < 0.05; test de Student).

Comme dans l'article présenté au paragraphe 3.1.2, la teneur en P dans les plantes mycorhizées par les différentes souches a été quantifiée (Figure 27). Comme on l'a vu précédemment, la culture des plantes en milieu -K entraîne une légère hausse de la teneur en P dans les parties aériennes et racinaires. Par contre, aucune différence n'est à noter entre les différentes lignées, quelles que soient les conditions nutritives de culture. Seules les plantes mycorhizées par la lignée RNAi-Trk1-9 présentent plus de P dans les parties racinaires. Ce résultat n'est cependant pas observable chez les plantes mycorhizées par la lignée RNAi-Trk1-3. Ainsi, l'expérience doit être renouvelée afin de savoir si cette différence significative est réelle ou si elle est due à un biais expérimental.

3.2 Rôle du canal potassique *HcSKC* dans le transfert du potassium du champignon à la plante hôte

3.2.1 Brève introduction sur les canaux potassiques des *Fungi*

Des canaux potassiques de différents types ont été identifiés chez tous les organismes. Ils présentent tous une structure très conservée responsable du transfert de solutés à travers la membrane plasmique et possèdent un motif déterminant la sélectivité pour le K^+ , le pore. Les canaux potassiques voltage-dépendants de type Shaker possèdent des sous-unités contenant 6 domaines transmembranaires dont un domaine senseur du voltage (Figure 28a). Ces sous-unités se regroupent en homo- ou hétérotétramère pour former un canal fonctionnel (Figure 28b). Ils sont très bien caractérisés chez les animaux et chez les plantes. Leur implication dans de nombreux processus physiologiques est abondamment référencée chez les végétaux (voir *e.g.* les revues Dreyer & Uozumi, 2011; Hedrich, 2012). Cependant très peu de travaux portent sur l'identification et la caractérisation de canaux potassiques de champignons.

Chez les levures, un canal potassique de type TOK (*ScTOK1*) a été identifié et caractérisé (Ketchum *et al.*, 1995). Ces canaux possèdent 8 domaines transmembranaires incluant deux domaines pores (Figure 29). Des stratégies de génétique inverse (surexpression et délétion) ont montré que *ScTOK1* jouait un rôle primordial dans le maintien du potentiel membranaire chez *S. cerevisiae* (Maresova *et al.*, 2006). Très peu de données existent chez les champignons filamenteux. Un membre appartenant à la famille des canaux à double pores (*NcTOKA*) a été cloné et identifié chez *N. crassa* (Roberts, 2003). Par ailleurs, plusieurs canaux potassiques de champignons pathogènes humains appartenant aux canaux double pores de type TOK et aux canaux Shaker ont été identifiés (Prole & Taylor, 2012).

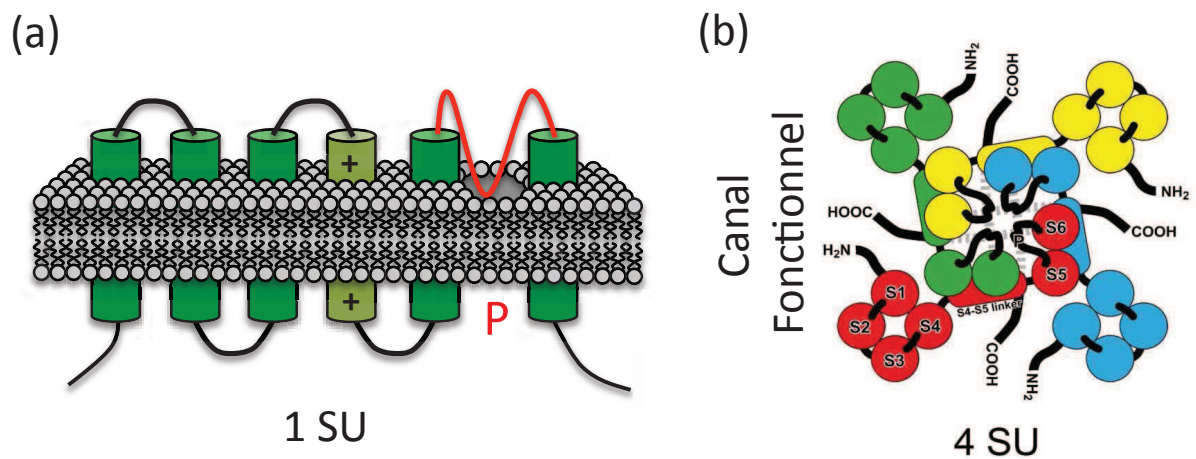


Figure 28: Structure des canaux potassiques de type Shaker.

Les canaux potassiques de type Shaker sont formés par quatre sous-unités comprenant 6 domaines transmembranaires, dont un domaine senseur du voltage (S4), et d'un domaine pore (P) entre les domaine 5 et 6 (a). Quatre sous-unités s'assemblent en homo- ou hétéro-tétramères pour former un canal fonctionnel (b). D'après Sharma *et al.* (2013).

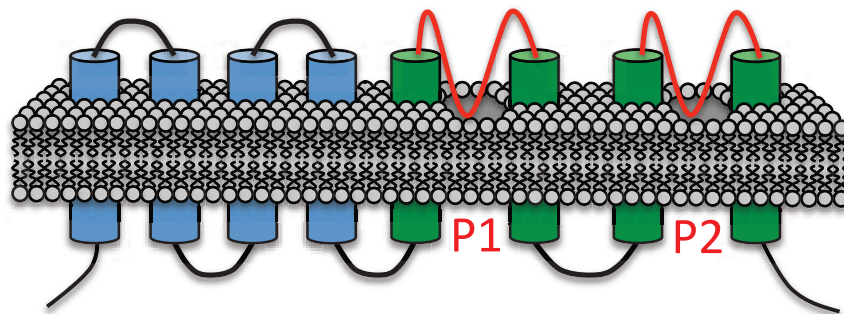


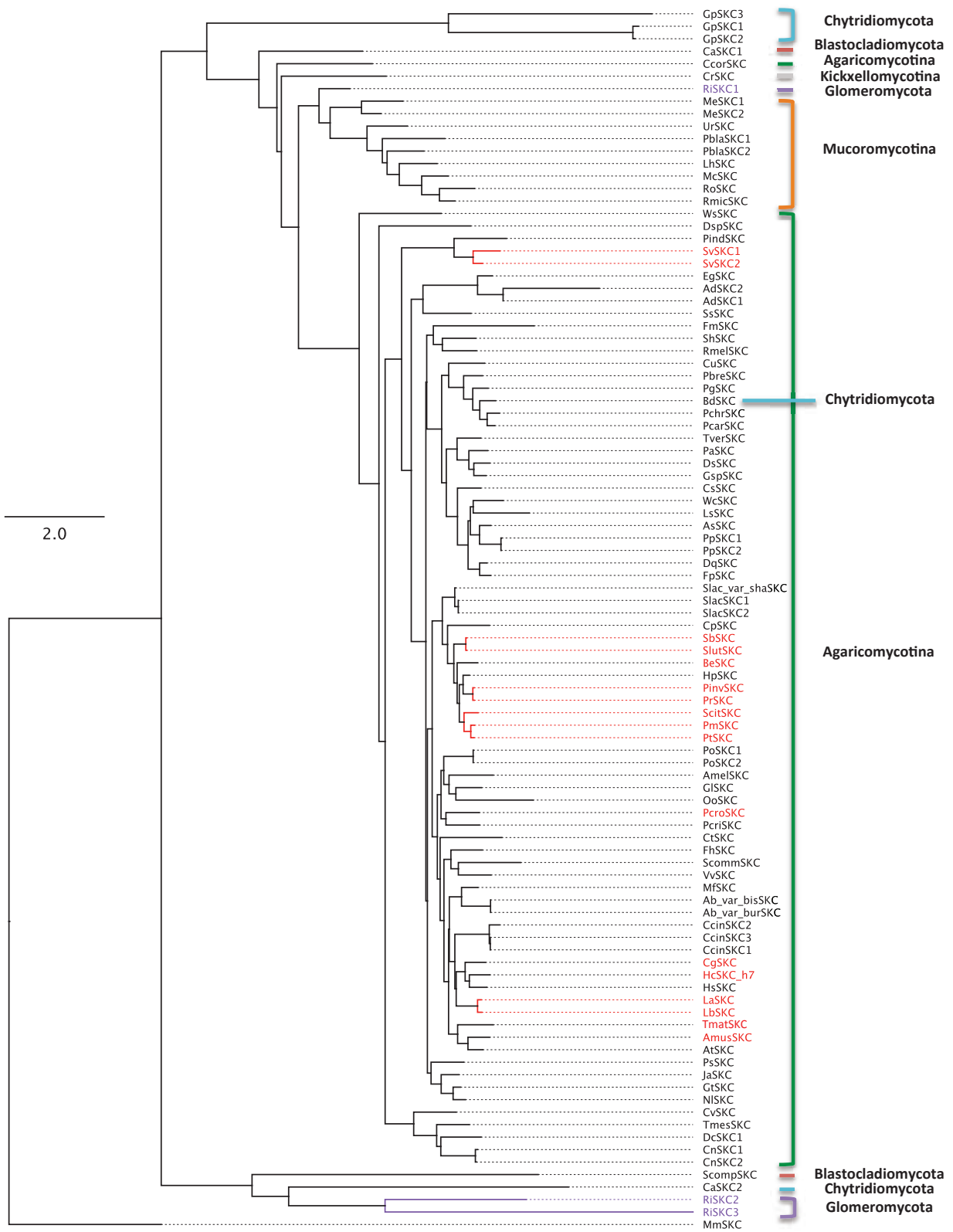
Figure 29: Structure des canaux potassiques de type TOK.

Les canaux potassiques de type TOK sont formés par 8 domaines transmembranaires et de 2 domaines pores (P1 et P2). Les canaux TOK ont pour l'instant été identifiés uniquement chez les *Fungi*.

Dans le cas des *Basidiomycota*, aucun canal potassique n'a encore été fonctionnellement caractérisé à ce jour. Le travail présenté ci-dessous tend à apporter des réponses sur l'implication potentielle d'un canal de type Shaker d'*H. cylindrosporum* dans la nutrition potassique du champignon en culture pure et de la plante en condition symbiotique. Ce canal nommé *HcSKC* a été identifié à partir d'une banque EST (Lambilliotte *et al.*, 2004). Enfin, trois protéines codant pour des canaux de type TOK ont aussi été identifiées chez *H. cylindrosporum*. Des données préliminaires sur ces canaux seront présentées dans le chapitre V.

3.2.2 Analyse phylogénétique des canaux de type Shaker-like chez les *Fungi*

L'obtention et l'accessibilité croissantes de génomes de champignons permettent d'évaluer la représentativité d'un gène candidat dans le règne des *Fungi*. Ainsi, la séquence protéique de *HcSKC* a été blastée contre les génomes des champignons actuellement séquencés (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>). Les séquences de type SKC identifiées (98 séquences) ont été alignées et un arbre utilisant la méthode de maximum de vraisemblance a été construit (Figure 30). D'une manière générale on peut constater que les séquences SKC sont très conservées entre les différentes divisions du règne des *Fungi*. En effet, toutes les séquences appartenant aux *Agaricomycotina*, sauf une, se regroupent dans un sous-groupe. De plus, dans ce sous-groupe très conservé, seule une séquence d'un organisme appartenant aux *Chytridiomycota* est présente (*BdSKC*). Concernant *HcSKC*, il se place avec les membres des *Agaricomycotina* et est très proche des protéines de type Shaker de champignons ectomycorhiziens tels que *L. bicolor* et *Cortinarius glaucopus*. De façon intéressante, parmi les trois séquences SKC de *R. irregularis* deux d'entre elles (*RiSKC2* et *RiSKC3*) se distinguent fortement des autres. Il serait donc intéressant de les cloner et de tenter de les caractériser fonctionnellement afin de connaître leur implication dans la nutrition potassique d'un champignon endomycorhizien. Étonnamment, aucun champignon appartenant au groupe des *Ascomycota* ne semble posséder de canaux potassiques de type Shaker. Or, ces canaux ont été détectés chez des organismes plus anciens tels les *Mucoromycotina*, les *Glomeromycota*, les *Blastocladiomycota*, les *Chytridiomycota* et les *Kickxellomycotina*. Il semblerait donc que les *Ascomycota* aient perdu ce type de protéines au cours de l'évolution. Une seule exception est cependant à noter. Il s'agit de la protéine *ScompSKC* appartenant à *Saitoella complicata* qui est un organisme encore très mal connu (Goto *et al.*, 1987; Nishida *et al.*, 2011).



3.2.3 Localisation des transcrits et des protéines de *HcSKC* dans l'ectomycorhize

Les mêmes stratégies employées pour localiser les transcrits et protéines de *HcTrk1* ont été utilisées pour la localisation du canal putatif *HcSKC*, à savoir l'hybridation *in situ* et la fusion traductionnelle avec l'EGFP.

Le marquage au Vector Blue après l'hybridation *in situ* a permis la révélation du signal au niveau de tous les hyphes composant l'ectomycorhize. Les transcrits *HcSKC* sont donc présents dans les hyphes extra-racinaires, le manteau mycélien et le réseau de Hartig (Figure 31). Ces données permettent d'affirmer que dans nos conditions de culture qu'il n'y a pas de régulation transcriptionnelle au cours de la symbiose ectomycorhizienne conduisant à une expression localisée des transcrits de *HcSKC* dans certains types d'hyphes.

Figure 30: Arbre phylogénétique des canaux potassiques putatifs de type SKC des *Fungi*.

L'arbre des séquences protéiques des canaux potassiques de type Shaker (SKC) des *Fungi* a été réalisé par maximum de vraisemblance (100 bootstraps). L'arbre a été enraciné par la séquence protéique MmSKC de la souris. Les séquences protéiques appartenant à des champignons endo- et ectomycorhiziens sont indiquées en violet et rouge, respectivement. Ab_var_bis: *Agaricus bisporus* var *bisporus*, Ab_var_bis: *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, Ad: *Auricularia delicata*, Amel: *Armillaria mellea*, Amus: *Amanita muscaria*, As: *Antrodia sinuosa*, At: *Amanita thiersii*, Bd: *Batrachochytrium dendrobatidis*, Be: *Boletus eludis*, Ca: *Catenaria anguillulae*, Ccin: *Coprinopsis cinerea*, Ccor: *Calocera cornea*, Cg: *Cortinarius glaucopus*, Cn: *Cryptococcus neoformans*, Cs: *Ceriporiopsis subvermispora*, Cu: *Cerrena unicolor*, Cr: *Coemansia reversa*, Cp: *Coniophora puteana*, Ct: *Cylindrobasidium torrendii*, Cv: *Cryptococcus vishniacii*, Dc: *Dioszegia cryoxerica*, Dq: *Daedalea quercina*, Ds: *Dichomitus squalens*, Dsp: *Dacryopinax* sp., Eg: *Exidia glandulosa*, Fh: *Fistulina hepatica*, Fm: *Fomitiporia mediterranea*, Fp: *Fomitopsis pinicola*, Gp: *Gonapodya prolifera*, Gsp: *Ganoderma* sp., Ri: *Rhizophagus irregularis*, Gl: *Gymnopus luxurians*, Gt: *Gloeophyllum trabeum*, Hc: *Hebeloma cylindrosporum*, Hp: *Hydnomerulius pinastri*, Hs: *Hypholoma sublateralitium*, Ja: *Jaapia argillacea*, La: *Laccaria amethystina*, Lb: *Laccaria bicolor*, Lh: *Lichtheimia hyalospora*, Ls: *Laetiporus sulphureus*, Mc: *Mucor circinelloides*, Me: *Mortierella elongata*, Mf: *Macrolepiota fuliginosa*, Mm: *Mus musculus*, Nl: *Neolentinus lepideus*, Oo: *Omphalotus olearius*, Pa: *Polyporus arcularius*, Pbla: *Phycomyces blakesleeanus*, Pbre: *Phlebia brevispora*, Pcar: *Phanerochaete carnosa*, Pchr: *Phanerochaete chrysosporium*, Pcri: *Plicaturopsis crispa*, Pcro: *Piloderma croceum*, Pp: *Phlebiopsis gigantea*, Pind: *Piriformospora indica*, Pinv: *Paxillus involutus*, Pm: *Pisolithus microcarpus*, Po: *Pleurotus ostreatus*, Pp: *Postia placenta*, Pr: *Paxillus rubicundulus*, Ps: *Punctularia strigosozonata*, Pt: *Pisolithus tinctorius*, Rmel: *Rickenella mellea*, Rmic: *Rhizopus microsporus*, Ro: *Rhizopus oryzae*, Sbre: *Suillus brevipes*, Scit: *Scleroderma citrinum*, Scomm: *Schizophyllum commune*, Scomp: *Saitoella complicata*, Sh: *Stereum hirsutum*, Slac: *Serpula lacrymans*, Slac_var_sha: *Serpula lacrymans* var *shastensis*, Slut: *Suillus luteus*, Ss: *Sistotremastrum suecicum*, Sv: *Sebacina vermifera*, Tmat: *Tricholoma matsutake*, Tmes: *Tremella mesenterica*, Tver: *Trametes versicolor*, Ur: *Umbelopsis ramanniana*, Vv: *Volvvariella volvacea*, Wc: *Wolfiporia cocos*, Ws: *Wallemia sebi*. Les séquences ont été récupérées sur le site du JGI: <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>.

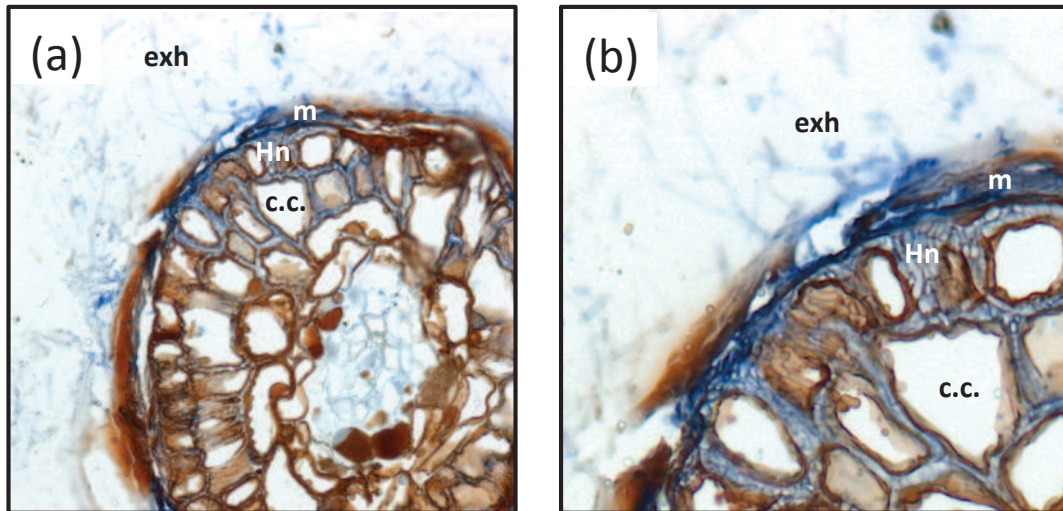


Figure 31: Localisation des transcrits *HcSKC* d'*Hebeloma cylindrosporum* dans l'ectomycorhize.

Les transcrits *HcSKC* ont été localisés dans les hyphes extracellulaires (exh), le manteau mycélien (m) et dans les hyphes du réseau de Hartig (Hn) entourant les cellules corticales (c.c.) de la racine par hybridation *in situ*. Grossissement x 20 (a) et x 40 (b).

En revanche, il semble que les protéines *HcSKC* sont présentes uniquement dans les hyphes du réseau de Hartig et non dans les hyphes situés à l'extérieur de la racine de *P. pinaster* (Figure 32). Cette localisation de *HcSKC* qui semble spécifique au réseau de Hartig permet de supposer que ces canaux pourraient participer au relargage de K^+ dans l'apoplasme. Cependant, la caractérisation fonctionnelle de cette protéine nous faisant encore défaut, il est délicat de lui conférer un rôle précis, notamment dans les échanges nutritionnels au cours de l'ectomycorhization.

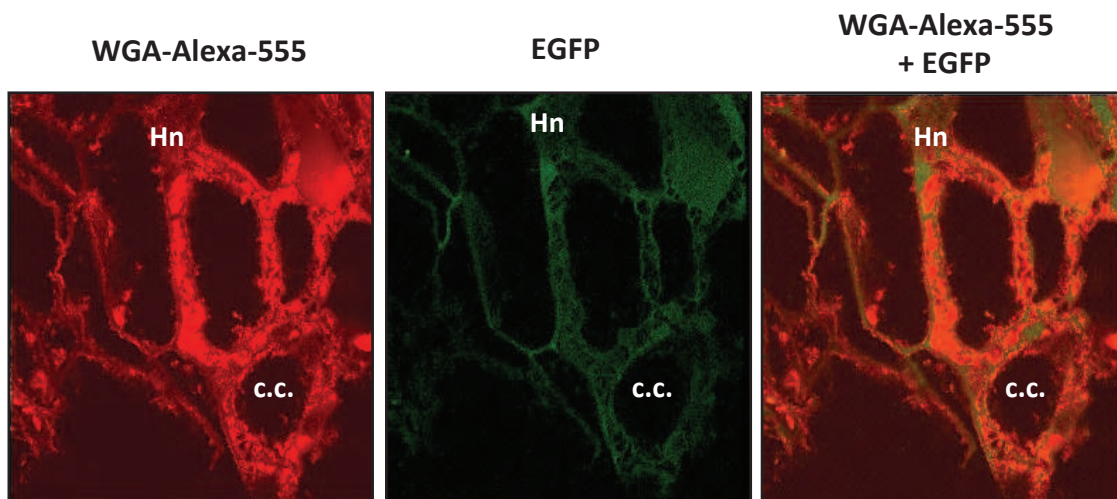


Figure 32: Localisation des protéines *HcSKC* d'*Hebeloma cylindrosporum* dans l'ectomycorhize.

Les protéines de *HcSKC* ont été localisées uniquement au niveau du réseau de Hartig (Hn) entourant les cellules corticales de la racine (c.c.) par fusion traductionnelle avec le marqueur EGFP. Le marquage au WGA-Alexa-555 a permis de visualiser les hyphes dans la racine.

3.2.4 Production et analyse phénotypique de lignées RNAi-SKC

Afin d'évaluer la fonction du canal putatif *HcSKC*, des lignées RNAi d'*H. cylindrosporum* ont été obtenues par Agrotransformation. Des analyses RT-qPCR ont permis de constater que trois lignées présentaient une plus forte diminution du niveau d'expression de *HcSKC* (Figure 33). Parmi elles, les lignées RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7 présentant une réduction de l'expression de *HcSKC* d'un facteur 3 ont été sélectionnées pour la suite des expérimentations.

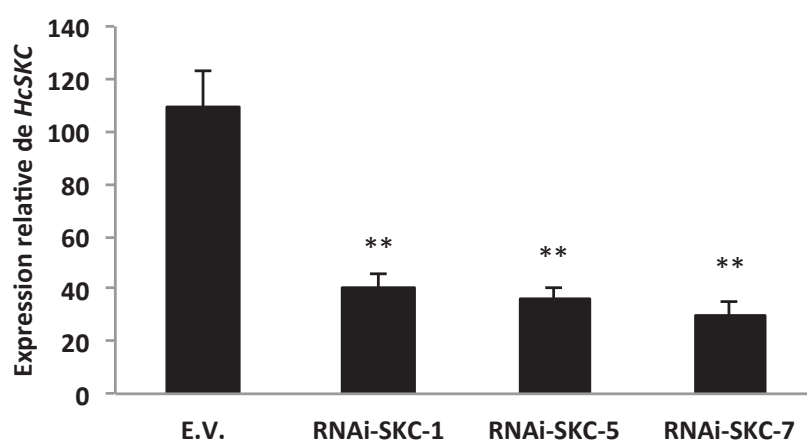


Figure 33: Obtention de lignées RNAi-SKC d'*Hebeloma cylindrosporum*.

Quantification du niveau d'expression de *HcSKC* par RT-qPCR dans les lignées vecteur vide (E.V.) et RNAi-SKC-1, RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7 d'*H. cylindrosporum*. L'expression relative a été normalisée par le gène de ménage codant pour l' α -tubuline. Les étoiles (**) indiquent une différence significative avec le vecteur vide ($p < 0.01$; test de Student).

Après 14 jours de culture en milieu N6 liquide, la biomasse et la concentration en K^+ et en Na^+ ont été déterminées (Figure 34). La mesure de la matière sèche a permis de voir que la croissance des deux lignées RNAi-SKC n'est pas affectée par la réduction de l'expression du canal (Figure 34a). Pour ce qui est de la concentration en K^+ , les deux lignées sous-exprimant *HcSKC* présentent une teneur en K^+ intracellulaire significativement plus importante (environ 20 %) que la lignée E.V. (Figure 34b), indiquant que la diminution de l'expression de *HcSKC* conduit à une suraccumulation de K^+ par le champignon. Ceci peut être dû au fait que la sous-expression du canal sortant putatif *HcSKC* perturbe la sortie du K^+ dans le milieu extérieur. Par contre, la concentration sodique n'est pas affectée chez les deux lignées RNAi-SKC d'*H. cylindrosporum* (Figure 34c).

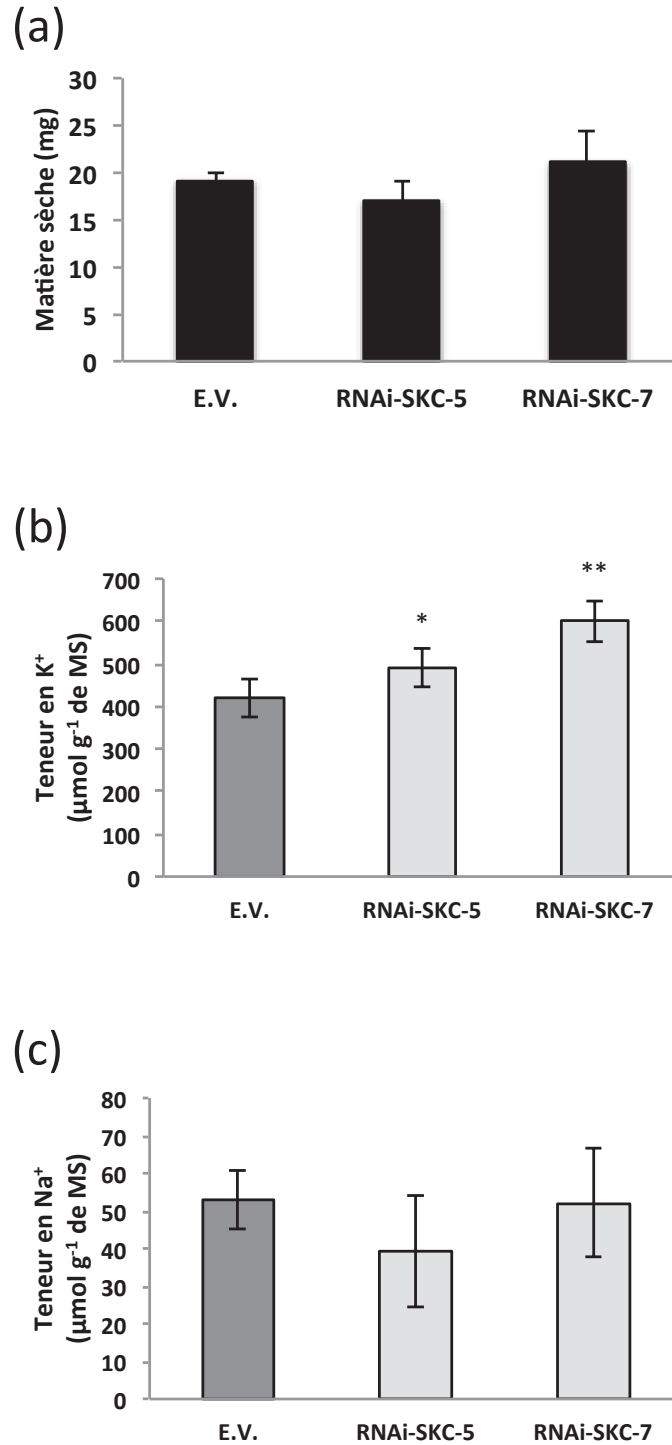


Figure 34: Analyse phénotypique des lignées RNAi-SKC d'*Hebeloma cylindrosporium*.

(a) Quantification de la matière sèche (MS) des lignées vecteur vide (E.V.), RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7 d'*H. cylindrosporium* après 14 jours de culture en milieu N6. (b,c) Teneur intracellulaire en K⁺ (b) et en Na⁺ (c) des lignées E.V., RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7 après 14 jours de croissance en milieu N6. n = 4 à 6. Les étoiles indiquent une différence significative avec le vecteur vide (*: p < 0.05; **: p < 0.01; test de Student).

La perturbation de l'expression d'un gène par des approches RNAi peut avoir des effets collatéraux sur l'expression d'autres gènes. Par l'analyse RT-qPCR du niveau d'expression des autres systèmes de transport putatifs de K^+ , on peut constater que chez les lignées RNAi-SKC, le transporteur *HcTrk2* et le canal *HcTOK2.1* sont surexprimés et que le canal *HcTOK1* est sous-exprimé (Figure 35). Bien que ces différences d'expression soient significativement différentes de la souche transformée par le vecteur vide, elles restent quand même très faibles. En effet, les sur- et sous-expressions observées sont bien inférieures à un facteur 2. Les effets sur l'homéostasie du K^+ sont difficiles à évaluer. Probablement, la suraccumulation du K^+ dans ces lignées est principalement due à la diminution de l'expression de *HcSKC*.

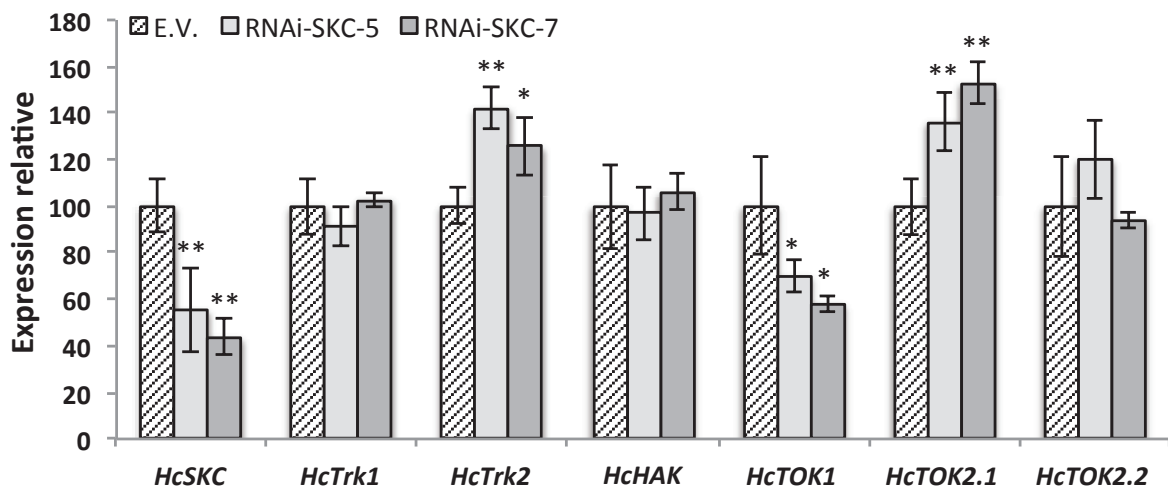


Figure 35: Niveau d'expression des systèmes de transport putatifs de potassium d'*Hebeloma cylindrosporum* chez les lignées RNAi-SKC.

Quantification par RT-qPCR du niveau d'expression des transporteurs putatifs de potassium *HcTrk1*, *HcTrk2* et *HcHAK* et des canaux potassiques putatifs *HcSKC*, *HcTOK1*, *HcTOK2.1* et *HcTOK2.2* dans lignées vecteur vide (E.V.), RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7 d'*H. cylindrosporum* après 14 jours de culture en milieu N6. n = 4. Les étoiles indiquent une différence significative avec le vecteur vide (**: p < 0.01; *: p < 0.05; test de Student).

3.2.5 Mycorhization de *Pinus pinaster* par des lignées RNAi-SKC d'*Hebeloma cylindrosporum*

Comme présenté et discuté précédemment pour l'analyse du rôle de *HcTrk1* en condition symbiotique, les lignées RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7 ont été utilisées dans des expériences de mycorhization de la plante hôte *P. pinaster*. Après deux mois de co-culture en milieu riche (+K, 1 mM) et pauvre (-K, 50 μ M) en K^+ , les concentrations en K^+ , Na^+ et P des parties racinaires et aériennes des plantes ont été mesurées par spectrophotomètre de flamme en absorption atomique.

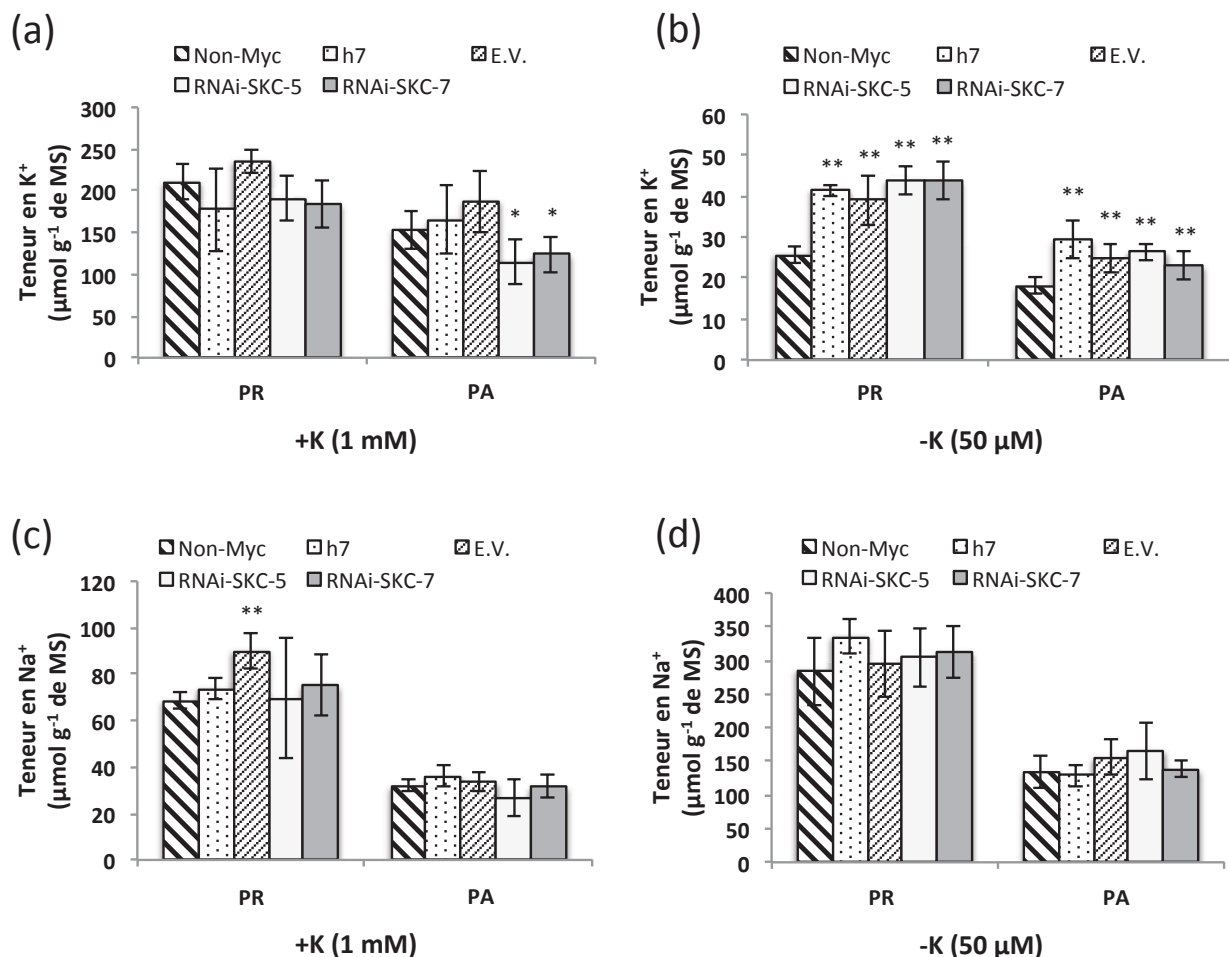


Figure 36: Teneurs en K^+ et Na^+ dans des plantules de *Pinus pinaster* mycorhizées par les lignées RNAi-SKC d'*Hebeloma cylindrosporum*.

Teneurs en K^+ (a,b) et en Na^+ (c,d) des parties racinaires (PR) et aériennes (PA) en condition carencé en K^+ (b,d) ou non (a,c). Les plantes ne sont pas mycorhizées (Non-Myc) ou mycorhizées par les lignées contrôles (h7 et E.V.) et les lignées transgéniques RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7. n = 4 à 5. Les étoiles indiquent une différence significative avec les plantes non mycorhizées (**: p < 0.01; test de Student).

En condition standard (+K) la teneur en K^+ des plantes mycorhizées avec les souches contrôles (h7 et E.V.) n'est pas différente par rapport aux plantes non mycorhizées (Figure 36a). En revanche, on note une concentration en K^+ dans les parties aériennes des plantes mycorhizées par les souches RNAi-SKC significativement plus faible que dans les plantes non inoculées ou dans les plantes mycorhizées avec les souches contrôles. Ce phénomène n'est cependant pas observable dans les parties racinaires de ces mêmes plantes. De plus, en condition pauvre en K^+ , les plantes inoculées avec les lignées RNAi-SKC se comportent comme les plantes mycorhizées par les souches contrôles (Figure 36b). En effet, il y a plus de K^+ dans ces plantes, que ce soit dans les parties aériennes ou dans les parties racinaires. Ainsi, l'association symbiotique de *P. pinaster* et de souches d'*H. cylindrosporum* sous-exprimant le canal putatif *HcSKC* entraîne une perturbation de la nutrition potassique de la plante en conditions standard de culture, se traduisant par un défaut de K^+ dans les parties aériennes. Il se peut donc que *HcSKC* soit bien impliqué dans le transfert de K^+ du champignon à la plante, et que la diminution de son expression empêche un transfert correct de K^+ au partenaire végétal. En outre, on peut imaginer que la perte de ce phénotype en conditions carencées en K^+ peut être due au fait que d'autres systèmes de transport sortants (et entrants) dépendant de la concentration en K^+ soient mobilisés lorsque les ressources extérieures deviennent limitantes. Des analyses supplémentaires, notamment sur les autres systèmes de transport sortants de type *HcTOK*, méritent donc d'être réalisées afin de décortiquer l'ensemble des mécanismes moléculaires responsables du transport du K^+ des cellules fongiques aux cellules végétales, et d'intégrer ces différents canaux candidats dans le modèle global du transportome potassique.

Pour ce qui est de la concentration en P des plantes mycorhizées par les lignées RNAi-SKC, on constate une plus faible teneur en P dans les parties aériennes de ces plantes lorsqu'elles poussent en milieu riche en K^+ (Figure 37). Cette plus faible teneur en P n'est significative que pour une seule des deux lignées (RNAi-SKC-5). Cette observation souligne une fois encore le lien entre la nutrition potassique et la nutrition phosphatée de la plante hôte à travers l'association ectomycorhizienne.

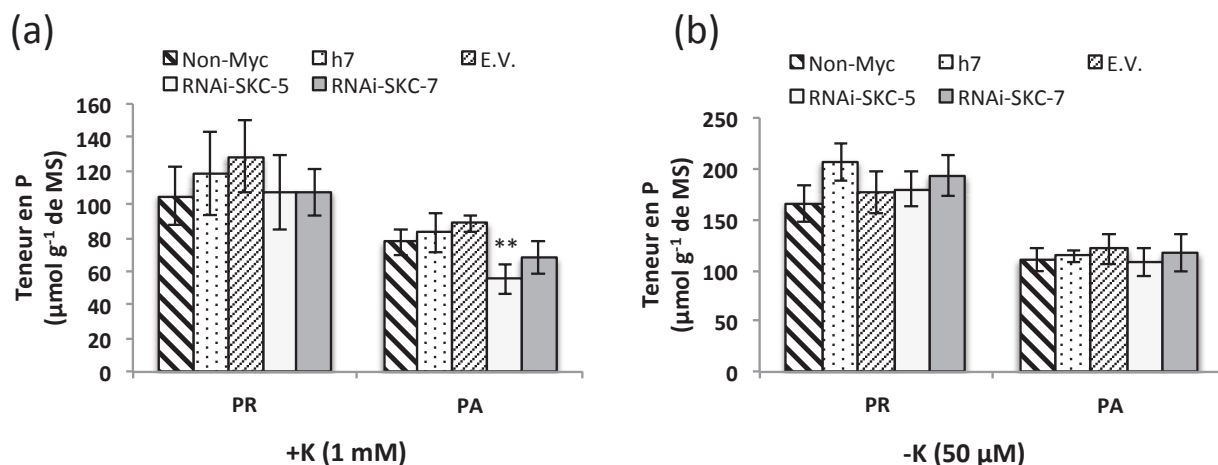


Figure 37: Teneurs en P dans des plantules de *Pinus pinaster* mycorhizées par les lignées RNAi-SKC d'*Hebeloma cylindrosporum*.

Teneur en P des parties racinaires (PR) et aériennes (PA) en condition carencé en K⁺ (b) ou non (a). n = 4 à 5. Les plantes ne sont pas mycorhizées (Non-Myc) ou mycorhizées par les lignées contrôles (h7 et E.V.) et les lignées transgéniques RNAi-SKC-5 et RNAi-SKC-7. Les étoiles indiquent une différence significative avec les plantes non mycorhizées (*: p < 0.05; test de Student).

3.3 Caractérisation fonctionnelle du transporteur *HcTrk2* en ovocytes de *Xenopus laevis*

L'obtention récente du génome d'*H. cylindrosporum* a permis de mettre en évidence d'autres systèmes de transport potentiellement impliqués dans le transfert de K⁺. Parmi ceux-ci, un homologue de *HcTrk1* a été identifié et nommé *HcTrk2*. Comme on a pu le voir précédemment (Cf. 3.1.1), il est courant que deux gènes appartenant à la famille des Trk/Ktr/HKT soient détectés chez les espèces de champignons séquencés. On s'attendait donc à ce qu'un autre membre de type Trk soit identifié à partir du génome d'*H. cylindrosporum*. Ainsi, au cours de ce travail de doctorat, j'ai pu m'initier à l'électrophysiologie via la technique du voltage-clamp à deux électrodes, afin de participer à la caractérisation fonctionnelle de *HcTrk2*. Ces travaux ont été réalisés avec l'aide d'un stagiaire M2, Sylvain Kumanski, que j'ai co-encadré, notamment pour les mesures électrophysiologiques en ovocytes de xénope.

HcTrk1 ayant été caractérisé en système hétérologue comme transporteur de K⁺ et de Na⁺ (Corratgé *et al.*, 2007), la stratégie a été de tenter de caractériser *HcTrk2* de la même façon. Ainsi, des ovocytes ont été récupérés, traités et injectés avec 50 nL d'eau (contrôles négatifs), 50 ng d'ARNc *HcTrk1* (contrôles positifs, non montrés) et 50 ng d'ARNc *HcTrk2*. Afin de voir si la concentration en K⁺ de la solution externe modifiait les flux ioniques, des solutions de K⁺ à 10, 50 et 100 mM ont été préparées. Les ovocytes injectés avec *HcTrk2* présentent des courants négatifs plus importants que les ovocytes injectés avec de l'eau dans

une solution de K100 (Figure 38a). De plus, on observe que l'intensité de ces courants est dépendante de la concentration extérieure en K^+ . En effet, l'analyse des courbes I/V permet de visualiser un courant potassique entrant dans les ovocytes injectés avec *HcTrk2* plus important à K100 qu'à K10 (Figure 38b). Ces résultats confirmés par la complémentation de levures déficientes en systèmes de transport potassiques entrants (A. Delteil, résultats non publiés), montrent que *HcTrk2* est capable de faire entrer du K^+ dans les cellules.

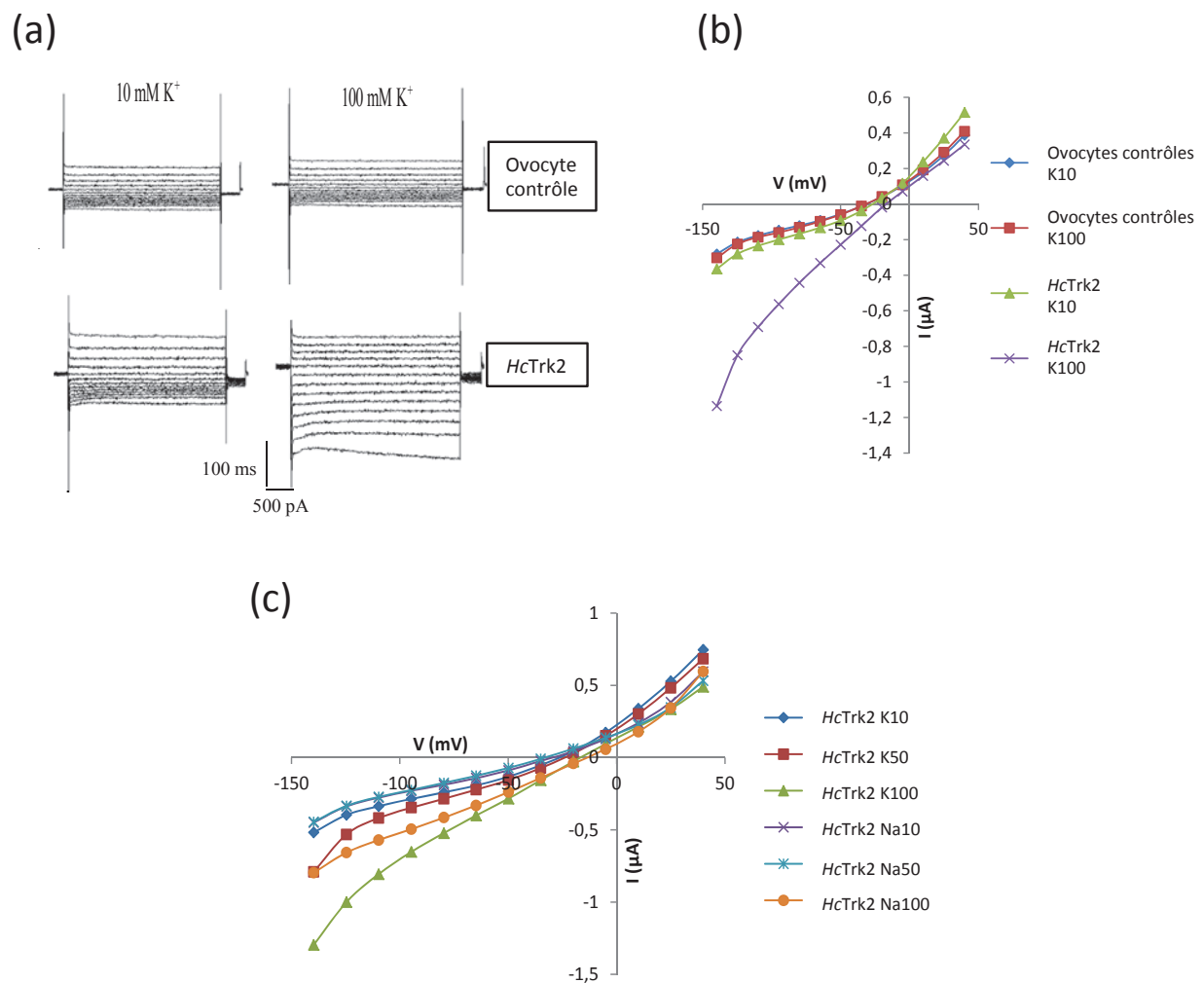


Figure 38: Caractérisation fonctionnelle en ovocytes de xénope du transporteur *HcTrk2*.

(a) Exemple de courants enregistrés dans des ovocytes injectés avec de l'eau (haut) ou avec des ARNc *HcTrk2* (bas) dans des solutions externes de 10 mM (K10) ou de 100 mM (K100) de K^+ , en réponse aux voltage-pulses de +40 à -140 mV. (b) Relations courant / voltage (I / V) obtenues en réponse aux voltage-pulses pour les ovocytes injectés avec 50 nL d' H_2O (contrôles) et 50 ng d'ARN *HcTrk2* dans les solutions K10 et K100. (c) Relations courant / voltage (I / V) obtenues en réponse aux voltage-pulses pour les ovocytes injectés avec 50 ng d'ARNc *HcTrk2* dans les solutions K10, K50, K100, Na10, Na50 et Na100.

La dépendance des courants potassiques au pH a également été testée. Ainsi, des solutions extérieures de K100 à pH 5, 6,5 (pH utilisé dans les autres expériences) et 7,5 ont été utilisées. Aucune différence dans l'intensité des courants n'a été observée (données non montrées), indiquant que le pH du milieu extérieur n'influe pas sur le transport de K^+ via *HcTrk2*.

Par ailleurs, comme il a été montré que *HcTrk1* permet le transport de Na^+ , il a été tout naturel de tester la perméabilité sodique de *HcTrk2*. Ainsi, les ovocytes injectés avec *HcTrk2* présentent des courants entrants de Na^+ (Figure 38c). Comme pour le K^+ , l'amplitude de ces courants est proportionnelle à la concentration en Na^+ de la solution externe. Cependant, ces courants sodiques sont moins forts que les courants potassiques, indiquant une meilleure perméabilité de *HcTrk2* au K^+ en système hétérologue. Ces résultats intéressants contrastent avec ce qui a été préalablement observé avec *HcTrk1* qui montrait une plus forte perméabilité au Na^+ qu'au K^+ dans les mêmes conditions d'expérience (Corratgé *et al.*, 2007). On peut donc émettre l'hypothèse que *HcTrk2* est plus impliqué dans la récupération du K^+ extérieur que *HcTrk1*. Des analyses complémentaires, notamment via l'obtention de transformants fongiques sur- ou sous-exprimant ce transporteur sont nécessaires afin d'évaluer son implication dans la nutrition potassique du champignon en culture pure, et de la plante en condition symbiotique.

Chapitre IV - Analyse de transporteurs d'*Hebeloma cylindrosporum* potentiellement impliqués dans la nutrition phosphatée ectomycorhize-dépendante de *Pinus pinaster*

4.1 Brève introduction sur les transporteurs de Pi des *Fungi*

De par sa faible concentration dans les sols, le prélèvement de Pi nécessite la mise en place de systèmes de transport permettant sa récupération contre son gradient électrochimique. Les protéines PHO84 et PHO89 de *S. cerevisiae* ont été les premiers transporteurs de Pi identifiés et caractérisés chez les *Fungi* (Bun-ya *et al.*, 1991; Martinez & Persson, 1998). Ils appartiennent respectivement à la famille des co-transporteurs Pi:H^+ et Pi:Na^+ (Figure 39).

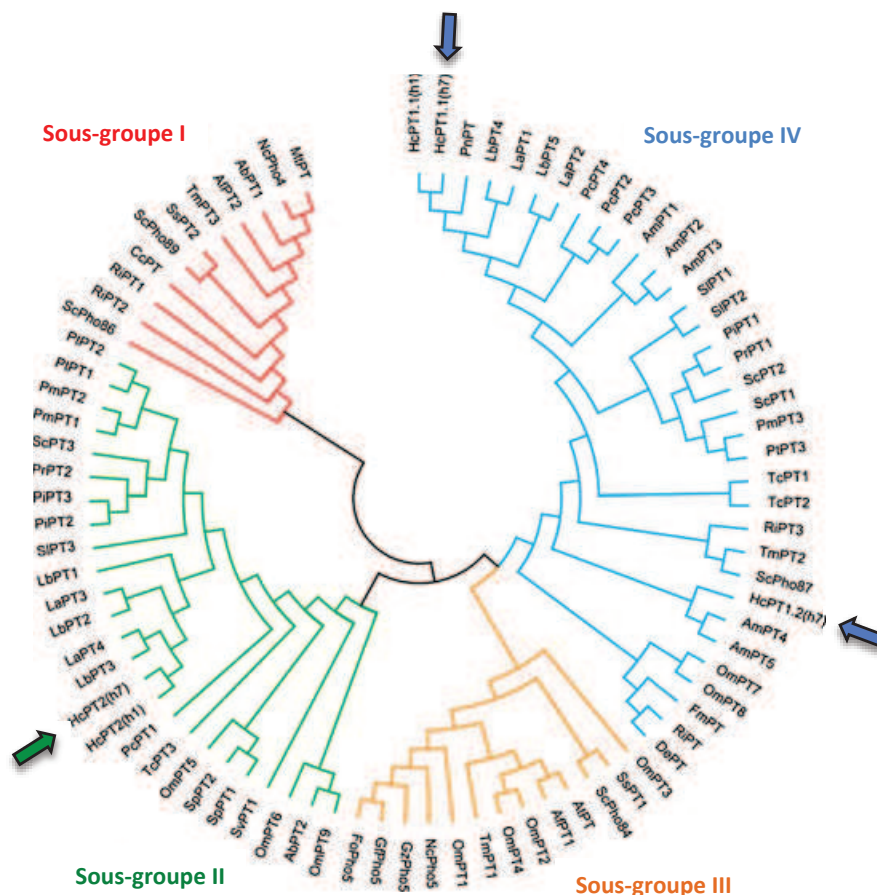


Figure 39: Arbre phylogénétique de transporteurs Pi:H^+ et Pi:Na^+ fongiques.

L'arbre présente 4 sous-groupes de transporteurs de Pi. Le sous-groupe I contient principalement des transporteurs de type Pi:Na^+ et les trois autres sous-groupes, des transporteurs de type Pi:H^+ . Les flèches bleues et la flèche verte indiquent respectivement les transporteurs *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* d'*Hebeloma cylindrosporum*, présentés au cours de ce travail. D'après Casieri *et al.*, 2013.

Chez le champignon filamenteux *N. crassa*, un gène codant pour un symport Pi:Na⁺ fonctionnant à pH basique, *NcPHO-4*, et pour un symport Pi:H⁺ fonctionnant à pH acide, *NcPHO-5*, ont aussi été identifiés (Mann *et al.*, 1989; Versaw, 1995). Tous les deux sont des transporteurs à haute affinité qui interviendraient dans la récupération du Pi extérieur en fonction de sa concentration.

Concernant les champignons mycorhiziens, le premier transporteur de Pi qui a été cloné est *GvPT* de *Glomus vesiforme* (Harrison & Van Buuren, 1995). Sa caractérisation fonctionnelle en levure a permis de le définir comme un transporteur Pi:H⁺ à haute affinité. De plus, sa localisation et son expression spécifiques dans les hyphes explorant le sol ont permis de valider son implication dans la récupération du Pi extérieur en condition carencée. Des transporteurs du même type ont été identifiés par la suite chez les champignons endomycorhiziens *R. irregularis* et *Funneliformis mosseae* (*GiPT* renommé *RiPT*, et *GmPT* renommé *FmPT* dans Casieri *et al.*, 2013; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001).

Concernant les champignons ectomycorhiziens, deux transporteurs de Pi ont été caractérisés chez *H. cylindrosporum* (Tatry *et al.*, 2009). Il s'agit de *HcPT1.1* et *HcPT2* dont la description sera développée dans le paragraphe suivant. Le séquençage génomique de nombreux autres champignons ectomycorhiziens, ainsi que de *R. irregularis*, a permis de mettre en évidence plusieurs protéines appartenant aux familles de transporteurs Pi:H⁺ et Pi:Na⁺ (Figure 39). Ainsi, un troisième gène candidat nommé *HcPT1.2* a été mis en évidence chez *H. cylindrosporum*. Par ailleurs, cinq homologues à *HcPT1.1* et *HcPT2* ont été identifiés chez *L. bicolor* et sont actuellement en cours de caractérisation fonctionnelle en levure (C. Plassard, communication personnelle). Pour ce qui est des autres champignons ectomycorhiziens séquencés, tous présentent des protéines permettant l'entrée du Pi dans les cellules (Figure 39). Cependant, leur caractérisation fonctionnelle et l'évaluation de leur rôle dans la nutrition phosphatée de leurs plantes hôtes restent à déterminer.

4.2 Localisation des transporteurs *HcPT1.1* et *HcPT2* dans l'ectomycorhize

La banque d'EST d'*H. cylindrosporum* déjà évoquée (Lambilliotte *et al.*, 2004) a permis l'identification de deux gènes potentiellement impliqués dans le transport de P. Ces deux candidats nommés au départ *HcPT1* et *HcPT2* ont par la suite été caractérisés fonctionnellement en levure comme étant des transporteurs de Pi. *HcPT1* appartient au sous-groupe IV des transporteurs Pi:H⁺, et *HcPT2* au sous-groupe II (Casieri *et al.*, 2013; Annexe 2). De plus, des analyses d'expression génétique en culture pure ont montré que *HcPT1* est induit par la carence en Pi (dès 6 h), contrairement à *HcPT2* dont l'expression

diminue légèrement à partir de 12-24 h (Tatry *et al.*, 2009). L'obtention du génome d'*H. cylindrosporum* a permis d'identifier une autre protéine présentant 65,7 % de similarité avec *HcPT1* et 48 % avec *HcPT2* (Figure 40). Ainsi, *HcPT1* a été renommé *HcPT1.1* et la protéine nouvellement identifiée, *HcPT1.2*. Par ailleurs, cette dernière est en cours de caractérisation fonctionnelle (C. Plassard, communication personnelle) et n'a pas été étudiée dans le travail présenté ci-dessous.

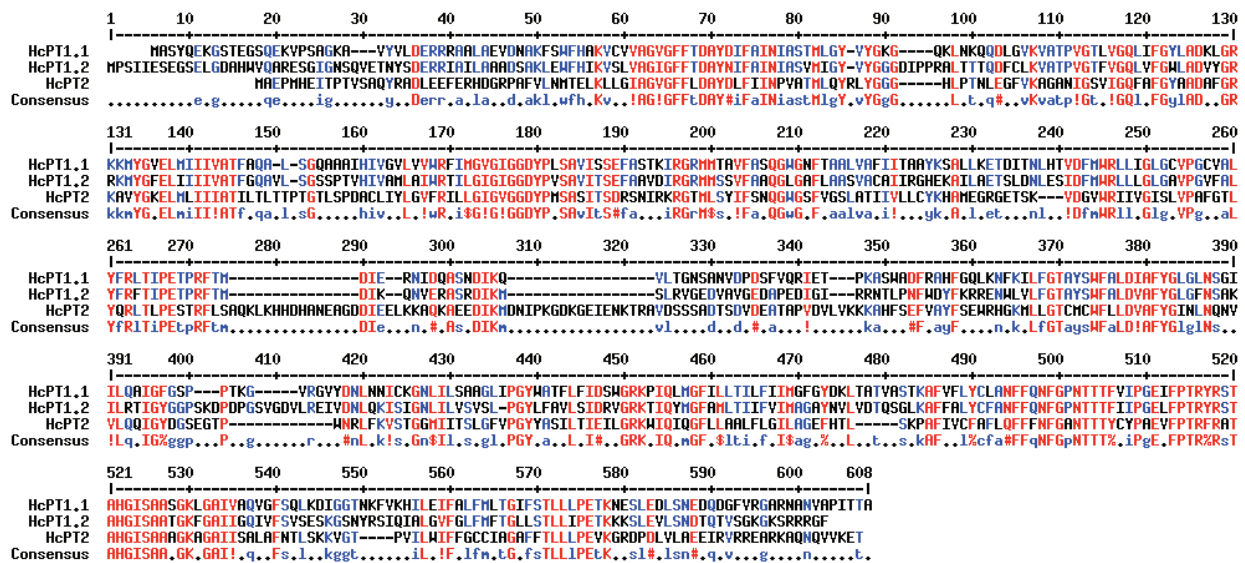


Figure 40: Alignement protéique de *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* d'*Hebeloma cylindrosporum*.

La protéine *HcPT1.2* présente 53,3 % d'identité et 65,7 % de similarité avec *HcPT1.1*, contre 30,1 % d'identité et 48 % de similarité avec *HcPT2*. *HcPT1.1* et *HcPT1.2* font partie du sous-groupe IV et *HcPT2* du sous-groupe II des transporteur Pi:H⁺ (Casieri *et al.*, 2013). Les acides aminés rouges sont présents dans les trois séquences, les bleus dans seulement deux, et les noirs dans une seule.

Comme pour les systèmes de transport de K⁺, l'évaluation de l'implication des transporteurs de Pi *HcPT1.1* et *HcPT2* dans les échanges nutritifs au cours de l'ectomycorhization nécessite de connaître leur localisation dans la mycorhize. Ainsi, l'article présenté au paragraphe 4.2.1 aborde la localisation des transcrits et des protéines de *HcPT1.1* en culture pure et en condition symbiotique, ainsi que la régulation de l'expression de *HcPT1.1* en réponse à la concentration en Pi extérieure. A la suite de cette publication, des résultats complémentaires portant sur l'analyse du promoteur de *HcPT1.1* et sur la localisation du transporteur *HcPT2* seront présentés.

4.2.1 Manuscrit d'article présentant l'importance de la région promotrice du transporteur *HcPT1.1* d'*Hebeloma cylindrosporum* dans la réponse à la carence en phosphate inorganique, ainsi que sa localisation dans l'ectomycorhize

Promoter-dependent expression of the fungal transporter HcPT1.1 under Pi shortage and its spatial localization in ectomycorrhiza

Garcia K, Haider MZ, Delteil A, Corratgé-Faillie C, Conéjéro G, Tatry MV, Becquer A, Amenc L, Sentenac H, Plassard C, Zimmermann S

Fungal Genetics & Biology (2013) 58-59: 53-61



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

Regular Articles

Promoter-dependent expression of the fungal transporter *HcPT1.1* under Pi shortage and its spatial localization in ectomycorrhiza

Kevin Garcia^{a,1}, Muhammad Zulqurnain Haider^{a,1,2}, Amandine Delteil^{a,1}, Claire Corratgé-Faillie^a, Geneviève Conéjero^{a,b}, Marie-Violaine Tatry^c, Adeline Becquer^c, Laurie Amenc^c, Hervé Sentenac^a, Claude Plassard^c, Sabine Zimmermann^{a,*}

^a Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 5004 CNRS/INRA/SupAgro/UM2, Campus INRA/SupAgro, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

^b Plateforme Histocytologie et Imagerie Cellulaire Végétale, INRA-CIRAD, 34398 Montpellier Cedex 2, France

^c INRA, UMR 1222 Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2013

Accepted 27 June 2013

Available online 11 July 2013

Keywords:

Ectomycorrhizal (ECM) symbiosis
Hebeloma cylindrosporum phosphate transporter *HcPT1.1*
 Agrotransformation
 GFP-promoter expression
In situ hybridization
 Protein immunolocalization

ABSTRACT

Mycorrhizal exchange of nutrients between fungi and host plants involves a specialization and polarization of the fungal plasma membrane adapted for the uptake from the soil and for secretion of nutrient ions towards root cells. In addition to the current progress in identification of membrane transport systems of both symbiotic partners, data concerning the transcriptional and translational regulation of these proteins are needed to elucidate their role for symbiotic functions. To answer whether the formerly described Pi-dependent expression of the phosphate transporter *HcPT1.1* from *Hebeloma cylindrosporum* is the result of its promoter activity, we introduced promoter-EGFP fusion constructs in the fungus by Agrotransformation. Indeed, *HcPT1.1* expression in pure fungal cultures quantified and visualized by EGFP under control of the *HcPT1.1* promoter was dependent on external Pi concentrations, low Pi stimulating the expression. Furthermore, to study expression and localization of the phosphate transporter *HcPT1.1* in symbiotic conditions, presence of transcripts and proteins was analyzed by the *in situ* hybridization technique as well as by immunostaining of proteins. In ectomycorrhiza, expression of the phosphate transporter was clearly enhanced by Pi-shortage indicating its role in Pi nutrition in the symbiotic association. Transcripts were detected in external hyphae and in the hyphal mantle, proteins in addition also within the Hartig net. Exploiting the transformable fungus *H. cylindrosporum*, Pi-dependent expression of the fungal transporter *HcPT1.1* as result from its promoter activity as well as transcript and protein localization in ectomycorrhizal symbiosis are shown.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In most species and environmental conditions, plant mineral nutrition is improved by mycorrhizal associations (Smith and Read, 2008). Fungal hyphae exploring the soil far from the host root take up mineral nutrients, which are translocated towards a net of hyphae that is present within the root cortex, named the Hartig net in the case of ectomycorrhizae (ECM). At this interface, the fungus secretes nutrients towards root cortical cells and receives in exchange sugars from the plant (Doidy et al., 2012). Hyphae developing at the root surface constitute the mantle, which covers and somehow isolates and protects the colonized roots. Thus, the symbiotic interaction requires a specialization of plasma mem-

brane transport activity of the fungal partner for loading and unloading of nutrients (Cairney and Burke, 1996). Such fungal transport systems have been identified at the molecular level since about one decade (Casieri et al., 2013; Chalot et al., 2002). Among functionally characterized systems are transporters of major nutrients such as sugars (Nehls et al., 1998), ammonium (Javelle et al., 2001; Montanini et al., 2002), nitrate (Jargeat et al., 2003; Montanini et al., 2006), amino acids (Wipf et al., 2002), potassium (Corratgé et al., 2007), or phosphate (Tatry et al., 2009). Fungal phosphate transporters should play a central role in the mycorrhizal symbiosis as it has been shown repeatedly that mycorrhizal plants accumulate more P than non mycorrhizal ones (Smith and Read, 2008). However, the transport system(s) responsible for P loading and especially unloading remain to be identified (Cairney, 2011; Smith and Smith, 2011). Large scale sequencing of fungal genomes (Martin et al., 2011), which has recently opened a new era of research on ECM symbiosis, is going to rapidly increase the molecular information available on such transport systems and

* Corresponding author. Fax: +33 4 67 52 57 37.

E-mail address: sabine.zimmermann@supagro.inra.fr (S. Zimmermann).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Current address: Dept. of Botany, Government College University, Faisalabad, Pakistan.

to provide a comprehensive and almost complete view of the gene families. Excitingly, sequencing of the ECM basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* (strain h7), completed in 2011 (<http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html>), will accelerate the identification of candidate genes and their promoter regions needed for gene expression analyses.

Specialization of the fungal plasma membrane could be achieved by different types of mechanisms, resulting e.g. in regulation of gene transcription, transcript stability, translation and targeting of the protein to the plasma membrane or post-translational modifications controlling protein stability or activity. Such biological questions have been raised (Cairney and Burke, 1996) and mainly considered so far by studying global differential gene expression (Morel et al., 2005; Nehls et al., 2001; Wright et al., 2005). More detailed analyses are still missing, mainly because of a lack of convenient models and of straightforward methodological tools. No analysis of gene expression based on promoter-reporter gene strategy has been reported so far for ECM research. However, significant progress has been made regarding the transformation of ECM fungi, as *Laccaria bicolor* (Kemppainen et al., 2005), *Pisolithus tinctorius* (Rodríguez-Tovar et al., 2005), *Paxillus involutus* and *Suillus bovinus* (Pardo et al., 2002), and especially of *H. cylindrosporum* (Combiér et al., 2003; Ngari et al., 2009). In addition, the detection of exogenous fluorescence signals in fungi transformed with GFP constructs has been demonstrated (Grimaldi et al., 2005; Müller et al., 2006; Re kangalt et al., 2007; Rodríguez-Tovar et al., 2005). These methodological tools have opened new perspectives on the development of cell imaging approaches in ECM fungi.

Within the present study, using *H. cylindrosporum* as a model (Marmeisse et al., 2004), we have developed cell imaging approaches aiming at dissecting regulation and localization of a phosphate transporter from the fungal H⁺:Pi transporter family. This transporter, named HcPT1.1, was previously identified in an EST library from *H. cylindrosporum* and functionally characterized (originally called HcPT1; Lambilliotte et al., 2004; Tetry et al., 2009). Dissection of proteins involved in Pi uptake by the fungus and in transfer towards the host plant is of high importance with respect to symbiotic plant Pi nutrition. Global expression studies have consistently shown that *HcPT1.1* transcript levels are strongly increased upon phosphate deprivation (Tetry et al., 2009; Van Aarle et al., 2007), providing support to the hypothesis that the encoded transporter plays a crucial role in fungal Pi uptake at least under limiting conditions. To answer the question whether this Pi-dependent expression results from the *HcPT1.1* promoter activity, we analyzed promoter-EGFP reporter gene expression in transformed fungi. In addition, localization of HcPT1.1 transcripts and proteins in ECM has been investigated in the present study.

2. Materials and methods

2.1. Fungal and ectomycorrhizal material

Homokaryotic strains h7 and h1 and the dikaryotic strain D2 resulting from the plasmogamy of h7 and h1 from the ECM fungus *H. cylindrosporum* Romagnesi (Debaud and Gay, 1987) were grown in dark at around 22 °C in standard medium YMG (Yeast extract, Malt extract, Glucose; Rao and Niederpruem, 1969) either in liquid cultures without shaking or on agar-solidified medium. For Agrobacterium-mediated transformation, liquid cultures of h7 were grown in Petri dishes (90 mm diameter) following successive repetitions of grinding with a blender until production of mitotically highly active, very fast growing fungus, establishing thalli in few days and lastly within only one or two days (Combiér et al., 2003). To study dependency of *HcPT1.1* expression on phosphate availability in the external

medium, fungal cultures were grown first in liquid N6 nutrient medium at pH 5.5 (corresponding to standard medium; Louche et al., 2010) supplemented with 3 mM Pi (added as NaH₂PO₄) for two weeks with a renewal of the culture medium for additional two days before starting the kinetic analysis. These pre-grown fungal cultures were then rinsed with water before culturing further in standard medium or in Pi-free N6 (nominal concentration). For qRT-PCR kinetic analysis, starved cultures got an additional re-supply of Pi after two days (standard N6).

ECM were obtained either under simplified conditions or in soil. For simplified conditions, mycorrhizal plants were grown under sterile conditions in vertical square Petri dishes (Corratgé et al., 2007) filled with 70 ml of MMN/2-modified medium (Modified Melin Norkrans; Marx, 1969) containing low (0.05 mM) or high (1 mM) phosphate (added as KH₂PO₄), solidified with agarose 1% (w/w) (Eurobio Molecular Biology Grade) to minimize phosphate contaminations, and covered with sterile cellophane (Burgess et al., 1996). Actively growing fungal mycelia plugs were placed close to lateral roots of maritime pine seedlings grown from sterilized seeds (*Pinus pinaster* Soland in Ait. from Medoc, Landes-Sore-Vergé source), and these inoculated plants were then cultivated for two to three months. For soil conditions, ECM plants were grown for 2.5 months in rhizoboxes containing a thin layer of soil (chromic cambisol; Casarin et al., 2003), whether or not supplemented with KH₂PO₄ to obtain +P or -P soil, respectively (Tetry et al., 2009). In both cases, ECM were produced from dikaryotic D2 *Hebeloma* and further used for *in situ* hybridization and for immunolocalization approaches.

2.2. Promoter amplification, destination vector construction and Agrobacterium-mediated fungal transformation

The destination vector pPZP-PPT1.1-E for expression of EGFP under control of *HcPT1.1* promoter was constructed as described (Suppl. Methods) by amplification of the *HcPT1.1* promoter region and cloning into the vector pPZP-133 (Ngari et al., 2009), which confers carboxin resistance to transformants. *H. cylindrosporum* was transformed by fungal Agrobacterium-mediated transformation as described (Suppl. Methods).

2.3. Verification of T-DNA insertion in transformed fungal lines

For the verification of stable T-DNA insertion into the fungal genome, genomic DNA (gDNA) of independent transformants was extracted as described from YMG liquid cultures (Van Kan et al., 1991). Fungal transformants were verified by PCR on gDNA by amplification of a 1019 bp fragment containing the corresponding promoter fused to EGFP with the primers pPT1.1-3/5-Spel-For and EGFP-390-Rev. These primers were also used for the negative control line to test their specificity. Integration of the T-DNA in the negative control transformant was tested by amplification of a fragment of 274 bp with primers pPZP-219-For and pPZP-492-Rev. T-DNA integration into positive control transformants was verified by PCR amplification of about 690 bp from gDNA of positive control transformants (pPZP-Pgpd-E) using primers Pgpd-For and EGFP-390-Rev.

2.4. Analysis of fungal transformants by epifluorescence

Analysis of EGFP expression in mycelia was done by epifluorescence microscopy (Olympus BX61 upright microscope coupled with a camera ORCA-ER Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Japan)). Image acquisition was performed using GFP filter (excitation with lamp X-Cite[®] 120 PC, 470 +/- 20 nm and emission band pass 500–535 nm) with the help of Cell[^]P software.

2.5. Quantitative PCR analyses of fungal transformants

Frozen fungal tissues were ground in liquid nitrogen and the resulting powder was treated with 1 ml of TRIZOL (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) as recommended. After a DNase I treatment (Thermo Fisher Scientific), 5 µg of RNA were denatured for 5 min at 65 °C with oligo(dT)18. These RNA preparations were then subjected to reverse transcription for 60 min at 42 °C with 200 U of RevertAid reverse transcriptase, dNTP and Ribolock RNase in the appropriate buffer (Thermo Fisher Scientific). Two microliters of cDNA (dilution 1:10) were used for qRT-PCR reactions. Following manufacturer's recommendations for the LightCycler® 480 Real-Time system (Roche, Mannheim, Germany), qRT-PCR mixtures contained LightCycler® 480 SYBR Green I Master reagent, forward and reverse primers for amplification of *HcPT1.1* (primers qPCR-PT1.1For and qPCR-PT1.1Rev) or of *EGFP* (primers qEGFPFor and qEGFPRev) at final concentrations of 600 nM or 1200 nM, respectively, according to their efficiency. Amplifications were performed as follows: 95 °C for 10 min; 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s; finally, 95 °C for 1 min and 55 °C for 30 s. Data were extracted using LightCycler® 480 software. The amount of fungal RNA in each sample was normalized using α tubulin (protein ID 24108 based on *H. cylindrosporum* h7 genome database v2.0; <http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html>) as an internal control (primers α TubFor and α TubRev). The calculation of gene expression was performed using the measured efficiency for each gene and primer pair as described by Vergne et al. (2007) and expressed as relative expression.

2.6. In situ hybridization

Sense and antisense probes (390 bp) were prepared by PCR amplification of *HcPT1.1* cDNA contained in pFL61 vector (Tatry et al., 2009) using F3ISdir and F3ISrev primers (5'-CTTCATCA TCATGGGTTTCGATACG-3' and 5'-CTCGCACACCTCTGACGAAAC CGTC-3'). Primers containing the latter sequences with the T7 RNA polymerase promoter at the 5' ends were named F3dirIST7 and F3revIST7, respectively. The 18S ribosome probes (sense and antisense) were amplified with Rib-Up and Rib-Down primers (Jabnousse et al., 2009). *In vitro* transcriptions were made by Maxi-Script kit (Ambion, <http://www.ambion.com/>) to obtain RNA probes labeled with digoxigenin. To increase signals, we used the Dig Oligonucleotide Tailing kit (Roche, <http://www.roche-applied-science.com/index.jsp>) to add a poly-DigUTP tail at the 3' end of the amplified RNA sequence.

ECM obtained from cellophane-over-agarose cultures were included in paraffin (Jabnousse et al., 2009) and 8 µm sections were made using a microtome (Leica RM2255). The cross-sections were transferred on silanized slides and dried completely. The samples were then dewaxed by three Safesolv (Labonord, <http://www.labonord.com/>) baths of 10 min and rehydrated following successive baths in 100% (3×, 5 min), 70% (1×, 2 min), and 50% (1×, 2 min) ethanol, respectively, and finally in DEPC-pretreated water (1×, 2 min). To suppress proteins linked to nucleic acids, ECM sections were incubated at 37 °C during 35 min with proteinase K, diluted in proteinase K buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA) to a final concentration of 0.1 U ml⁻¹. Reaction was completed by two successive incubations (5 min) in stop proteinase K buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂). To control primer concentrations and suppress active RNases, samples were dehydrated by successive incubations (1 min each) in bathes containing 50%, 70% and 100% ethanol.

Hybridizations were made at 45 °C for 15 h with 200 ng of probe by slide. Then, non-linked probes were suppressed by RNase A (20 µg ml⁻¹) treatment during 30 min at 37 °C. To reveal signals, anti-digoxigenin antibodies conjugated with alkaline phosphatase

were used. Alkaline phosphatase reacts with Vector Blue (Vector Laboratories, <http://www.vectorlabs.com/>) substrate to give blue staining. The slides were observed on a Leica DM6000 wide-field microscope (Montpellier RIO Imaging platform, www.mri.cnrs.fr). The pictures were obtained with Velocity Acquisition 5.1.0 (Perkin Elmer, www.perkinelmer.com).

2.7. Antibody production and immunolocalization of HcPT1.1

Antibodies were prepared in rabbits by Genosphere Biotechnologie France (www.genosphere-biotech.com). They were raised against a peptide corresponding to the N-terminal 15 amino acids of the HcPT1.1 protein (5'-MASYQEKSTEGSQE-3') predicted to be outside of the plasma membrane. An additional Cys residue was added to the C-terminus of the peptide to enable coupling to protein carrier KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). ELISA analyses showed that the antibodies had a good titre, with an absorbance 13 times higher than those from the pre-immune serum (dilution 1/10,000). The antibodies were used at a dilution of 1:500 (corresponding to 20 µg ml⁻¹). ECM root tips were embedded in 4% low melting agarose and cut into 80 µm longitudinal or radial sections with a vibratome (Micro-cut H1200, Biorad). Agarose slices were placed in 4% (w/v) paraformaldehyde prepared in phosphate-buffered saline (PBS) (5 mM Na₂HPO₄ and 130 mM NaCl). The root segments were fixed under vacuum for 2 h at room temperature. After fixation, mycorrhizal root tips were washed three times for 5 min each with PBS buffer and then incubated in 4% BSA (IgG free) in PBS for 2 h. The BSA was removed and the roots were incubated overnight at 4 °C with anti-HcPT1.1 antibody in 4% BSA in PBS. The sections were washed five times in PBS and incubated in 4% BSA in PBS containing the goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes, Invitrogen™, Carlsbad, CA) (20 µg ml⁻¹), used as secondary antibody, for 1 h in the dark. After three washes in PBS, the sections were mounted in Mowiol 4.88 and analyzed by confocal microscopy (Zeiss LSM 510 Meta, with a Plan-Neofluar 40×/1.3 Oil objective, Montpellier RIO Imaging platform). An argon laser (488 nm) was used for the excitation of Alexa Fluor 488, and an emission band-pass 505–530 nm was used for detection of Alexa Fluor 488 fluorescence. Image analysis and merging of images were carried out with Image J software (Abramoff et al., 2004).

3. Results

3.1. Construction of EGFP-expressing fungal transformation vectors for reporter gene approaches in ectomycorrhizal fungi and transformation of *H. cylindrosporum*

Efficient tools for transformation of the ECM fungus *H. cylindrosporum* by promoter-reporter gene constructs were established in two steps. In the first step, a binary vector was constructed (Suppl. Fig. 1) joining the recently described carboxin resistance for selection of fungal transformants obtained by Agrot transformation by pPZP-133 (Ngari et al., 2009) with the expression of EGFP (Müller et al., 2006; Rekanalt et al., 2007). The resulting obtained vector, harboring EGFP under control of promoter *P_{gpd}* was called pPZP-P_{gpd}-E and served both as positive control vector for expression of EGFP within the fungus and as basis for the construction of vectors for promoter analyses of candidate genes. In the second step, to study the regulation of expression of the phosphate transporter *HcPT1.1* (Tatry et al., 2009), we compared the promoter region of about 1 kb (EMBL database AJ970313.2) with the available *Hebeloma* genome sequence (<http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html>) and a more restricted promoter region of 629 bp of *HcPT1.1* was identified for amplification. The constitutive pro-

motor *Pgpd* from the pPZP-Pgpd-E vector was eliminated and replaced by this *HcPT1.1* promoter region to give the final pPZP-PPT1.1-E vector (Suppl. Fig. 1B).

After transformation of *H. cylindrosporium* using the *Agrobacterium* strain LBA1126 (Ngari et al., 2009) harboring the different constructs, screening of fungal transformants resulted in selection of 7, 9 and 3 mitotically stable independent transgenic lines were selected for pPZP-133, pPZP-Pgpd-E, and pPZP-PPT1.1-E, respectively.

T-DNA integration within the fungal genome and stability of the fusion between promoter and EGFP was verified by PCR on gDNA from each transformant (Fig. 1). Amplification of specific DNA fragments of expected length evidenced integration of the T-DNAs of the corresponding vectors into the fungal genome (Fig. 1, lanes 1–3 and 6). In addition, PCR with the primer pairs used for pPZP-PPT1.1-E and pPZP-Pgpd-E transformants confirmed that the expression of EGFP was under control of the *HcPT1.1* or the *gpd* promoter, respectively. Specificity of primer pairs used for pPZP-PPT1.1-E transformants was verified with the fungal line transformed by the empty vector (no amplification; Fig. 1, lane 4). Insertion of the carboxin resistance cassette in this fungal transformant, representing a negative control, was verified by amplification with T-DNA-specific primers (Fig. 1, lane 5).

EGFP expression was analyzed by comparison of fluorescence signals in fungal hyphae of control strains (Suppl. Fig. 2) showing either low autofluorescence in the wild-type strain h7 or in fungal transgenic lines transformed with the empty vector pPZP-133. In contrast, fungal lines transformed with the EGFP positive control vector, pPZP-Pgpd-E, displayed significant fluorescence in fungal hyphae, indicating expression of functional EGFP.

3.2. The *HcPT1.1* promoter controls the EGFP expression within pure fungal hyphae in dependence on external Pi concentration

The *HcPT1.1* promoter activity was analyzed in fungal lines transformed with pPZP-PPT1.1-E. Fluorescence signals in the fungal hyphae appeared to be clearly enhanced when the mycelia was grown in Pi-depleted external medium for two days (Fig. 2).

Additional experiments using qRT-PCR measurements were performed to quantify the enhancement of EGFP expression driven

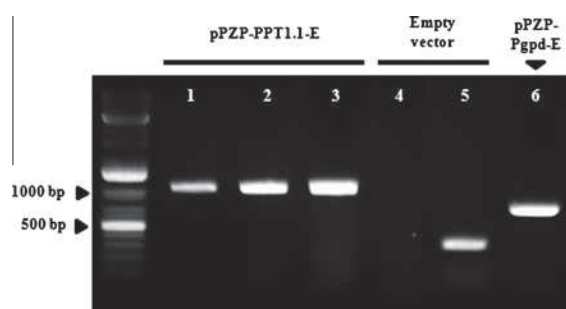


Fig. 1. Analysis of fungal transformants. Confirmation of T-DNA insertion in fungal transformants. PCR test of presence and integrity of T-DNA insertion into selected transformed fungal lines. Lanes 1–3: three independent lines of h7 strain transformed with the pPZP-PPT1.1-E (isolates 1–3). Lanes 4–5: h7 fungal line transformed with the empty vector pPZP-133 (EGFP negative control, isolate 28.2). Lane 6: fungal line of h7 strain transformed with pPZP-Pgpd-E (isolate 8, EGFP positive control). Amplifications were performed using a forward primer hybridizing either with the *HcPT1.1* promoter (pPT1.1-3/5-Spel-For) in pPZP-PPT1.1-E or with the *gpd* promoter (Pgpd-For) in pPZP-Pgpd-E, and a reverse primer hybridizing in the EGFP sequence (EGFP-390-Rev), resulting in amplifications of 1019 bp or 690 bp DNA fragments, respectively. Control empty vector: PCR performed using the same primers as for pPZP-PPT1.1-E transformed lines (lane 4) or using primers specific for LB and RB of the T-DNA (pPZP-219For and pPZP-492Rev; lane 5).

by the *HcPT1.1* promoter together with that of the endogenous *HcPT1.1* gene as a function of Pi withdrawal and after Pi re-supply. As shown in Fig. 3 (left panels), the expression of the endogenous *HcPT1.1* gene increased rapidly upon Pi deprivation as previously shown by Taty et al. (2009) and declined rapidly upon Pi re-supply in all transgenic fungal lines tested. Fungal control lines showed either no EGFP expression when transformed with the empty vector as expected (Fig. 3A, right panel), or rather constant EGFP transcript levels besides a transient increase after one day of Pi deprivation when transformed with the EGFP positive control vector (Fig. 3B, right panel). In contrast, the levels of EGFP transcripts in three transgenic fungal lines expressing EGFP under control of the *HcPT1.1* promoter varied similarly as those of the endogenous *HcPT1.1* gene (Fig. 3C) even that the expression level remained much lower. This observed reduced expression level of EGFP under control of the *HcPT1.1* promoter compared to the endogenous expression might be due to the genomic context of insertion or to different mRNA stability. Nevertheless, Pi withdrawal induced significant expression of EGFP after one day with a further increase after two days, whereas re-supply reduced the EGFP expression after one additional day to the level before Pi shortage (Fig. 3C, right panel). These results argue clearly for the control of the Pi deprivation-dependent expression of *HcPT1.1* by its promoter.

3.3. In situ hybridization of *HcPT1.1* in ectomycorrhiza

The *in situ* hybridization technique had to be adapted to the ECM, joining fragile fungal hyphae with plant root tissue (Suppl. Fig. 3). Different types of signal revelation (anti-digoxigenin antibodies coupled to CY3 or to Alexa Fluor 488 or to alkaline phosphatase, respectively) were tested to reveal the signal on sections of ECM obtained from sterile cellophane-over-agarose culture dishes (data not shown). Finally, anti-digoxigenin antibodies conjugated to alkaline phosphatase were selected after optimization of labeling intensity by addition of a poly-DigUTP tail to probes. For revelation, alkaline phosphatase conjugated with anti-digoxigenin antibodies reacted with Vector blue substrate resulting in a blue staining when labeling was successful.

Cross-sections of mycorrhizal roots of *P. pinaster* were hybridized with sense and antisense probes for 18S ribosome controls as well as for specific detection of *HcPT1.1* transcripts. The 18S ribosome sense probe did not give rise to any signal (Fig. 4A), whereas the antisense probe revealed a strong labeling in extramatrical hyphae, mantle and Hartig net (Fig. 4B) demonstrating RNA integrity and feasibility of *in situ* hybridization in ECM.

HcPT1.1 expression pattern was analyzed in ECM from cultures at low (0.05 mM) or high (1 mM) Pi concentration. Negative controls using the *HcPT1.1* sense probe did not display any signal (Fig. 4C and E). ECM from plants grown at low Pi concentrations revealed hybridization with the *HcPT1.1* antisense probe. *HcPT1.1* expression was clearly localized (blue labeling) in hyphae from the fungal mantle surrounding the root and in extramatrical mycelium (Fig. 4D). However, in ECM from pines cultivated in high phosphate culture conditions, no labeling signal was observed (Fig. 4F) indicating that the expression of *HcPT1.1* was down-regulated and at least too low to be detected in this condition.

3.4. Immunolocalization of *HcPT1.1* proteins in ectomycorrhizae

Aiming at the localization of *HcPT1.1* proteins within ECM, specific antibodies were raised against a peptide of the N-terminal region of *HcPT1.1* that was predicted to be outside of the plasma membrane. First, immunodetection of *HcPT1.1* through the fluorescence of secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 was analyzed in the fungus grown in liquid medium, either with full P (Pi 3 mM) or no P supply to the hyphae for five days after ini-

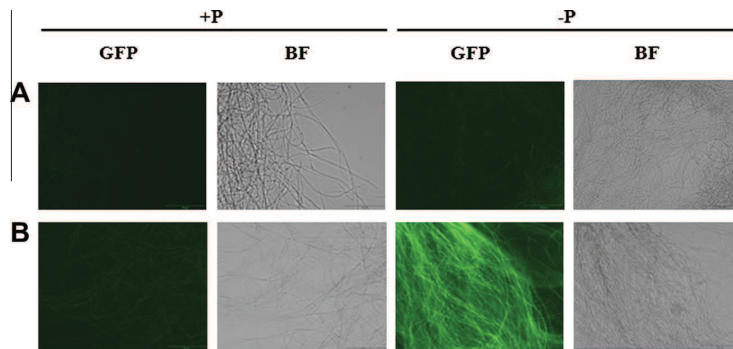


Fig. 2. EGFP fluorescence intensity in *H. cylindrosporium* lines transformed with *EGFP* under control of the promoter of the phosphate transporter *HcPT1.1* is increased by phosphate deprivation. Fungal transformants with the empty vector pPZP-133 (A) or with pPZP-PPT1.1-E (B) were grown on N6 medium in presence (3 mM) of orthophosphate (Pi) (left panels, labeled +P) or in absence of added Pi (nominal concentration; right panels, labeled -P). Scale bar: 100 μ m.

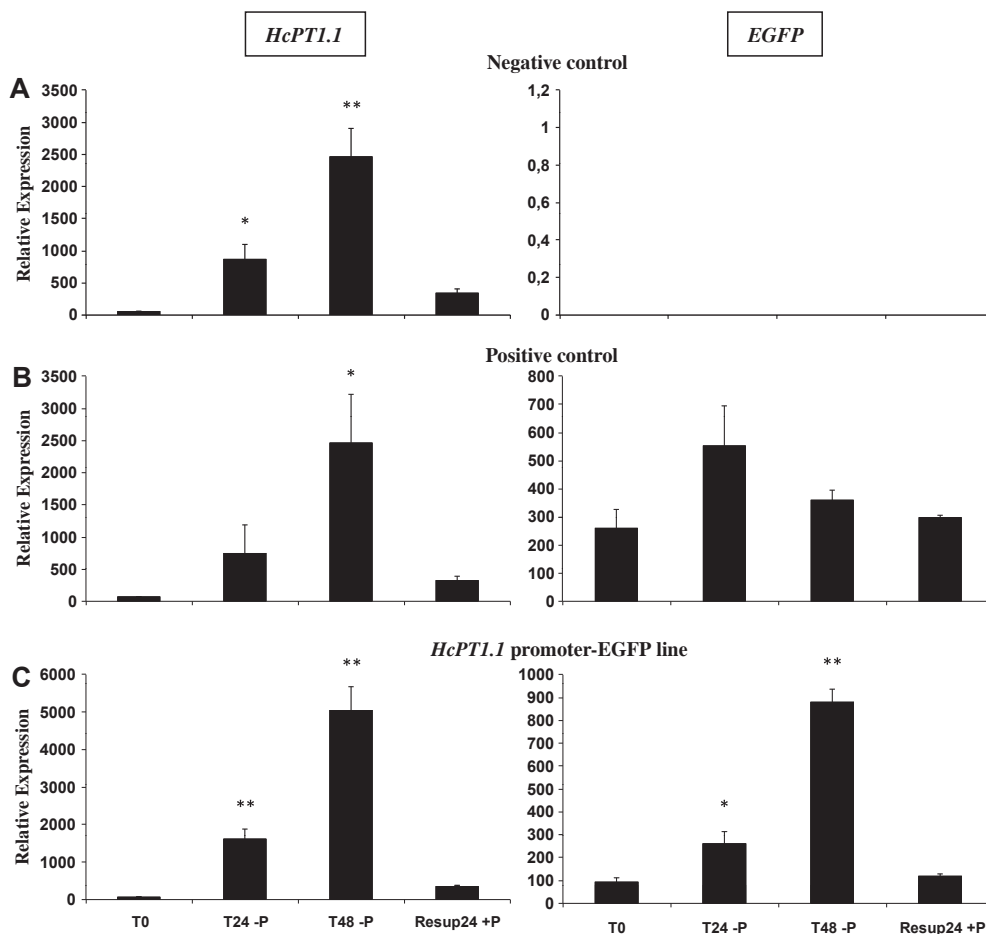


Fig. 3. *HcPT1.1* promoter driven expression of *EGFP* is sensitive to external Pi availability. Expression levels (transcript accumulation) of the endogenous *HcPT1.1* gene (left panel) and of the *EGFP* reporter (right panel) were quantified by qRT-PCR. Fungal isolates were grown in standard complete liquid medium. Then, at $t = 0$ (histogram bars labeled $t = 0$), they were transferred into Pi-free medium for 24 h or 48 h (bars labeled T24 -P and T48 -P, respectively) and re-supplied with 3 mM Pi for 24 h (Resup24 +P label). (A) Negative control of *EGFP* expression in a fungus isolate transformed with the empty vector pPZP-133. (B) Positive control of constitutive *EGFP* expression in a fungus isolate transformed with the pPZP-Pgpd-E vector. (C) Fungal line transformed with the pPZP-PPT1.1-E vector harboring *EGFP* under control of the *HcPT1.1* promoter. One transformed line out of three is shown as representative example. Gene expression levels (arbitrary units) were normalized as described by Vergne et al. (2007) using α tubulin from *H. cylindrosporium* as an internal reference. Statistic tests were made with Student's test with respect to T0 samples for ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

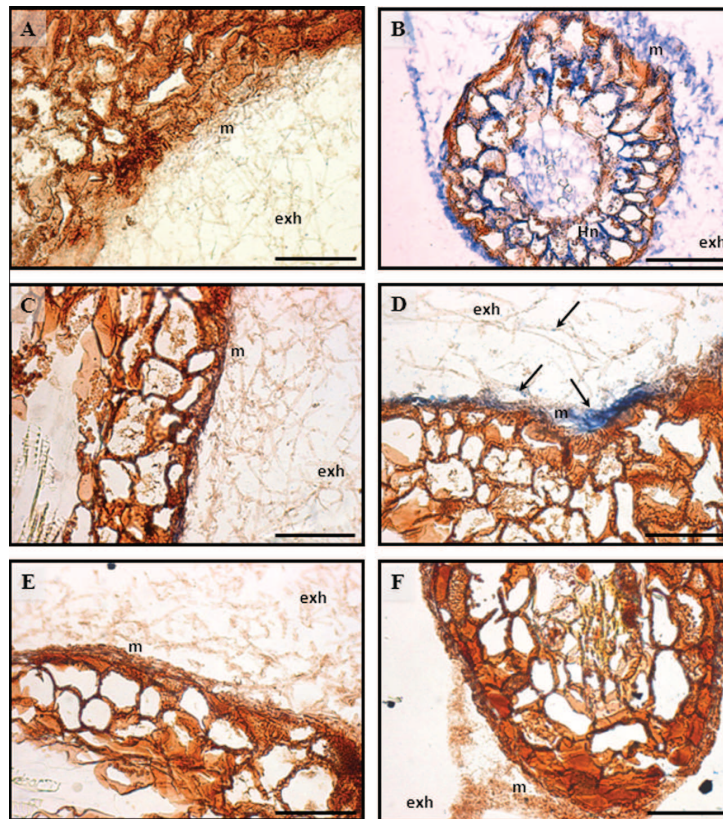


Fig. 4. Localization of *HcPT1.1* and up-regulation of its expression upon Pi shortage revealed by *in situ* hybridization. (A) Control of hybridization efficiency was made by sense and (B) antisense rRNA 18S probes. (C, E) Hybridization with *HcPT1.1* sense probe. (D, F) Hybridization with *HcPT1.1* antisense probe. The agarose-based culture medium contained (C, D) a low (0.05 mM) or (E, F) a high (1 mM) Pi concentration. (D) When mycorrhizae development occurred in low Pi medium, reporter signals were observed in mycelium mantle and external hyphae (arrows). No signal was detected in mycorrhizae grown on high Pi medium (F). exh: extraradical hyphae, m: hyphal mantle, Hn: Hartig net. Scale bar 50 μ m.

tial culture in complete medium for 7 days. The duration of five days of P starvation was chosen for complete *HcPT1.1* overexpression as shown in Tatry et al. (2009). Images showed slight fluorescent signals in hyphae in the presence of Pi (Fig. 5B). In contrast, 5 days of Pi shortage revealed a significant immunostaining of the *HcPT1.1* protein within the fungal hyphae (Fig. 5D). Incubation of control samples with secondary antibodies alone showed no signals (data not shown). These results indicating induction of *HcPT1.1* protein expression upon Pi deprivation were in agreement with transcript accumulation reported above (cf. Figs. 2–4).

Secondly, localization of *HcPT1.1* proteins by immunodetection was studied within ECM from *H. cylindrosporum* – *P. pinaster* co-cultures of about 2.5 months (Fig. 5E–J). Treatment of ECM cross-sections with the secondary antibodies alone did not display unspecific signals (Suppl. Fig. 4). Immunolocalization by the *HcPT1.1* specific antibodies showed that *HcPT1.1* transporter proteins were more abundantly found in ECM in dependence on Pi availability. Indeed, Pi limiting conditions led to an increase of the reporter signal (Fig. 5H) when compared to Pi-supplemented co-cultures (Fig. 5F). This result confirmed on the protein level the former observation of Pi-dependent accumulation of *HcPT1.1* transcripts in ECM (cf. Fig. 4C and D). Concerning the localization in ECM tissues, *HcPT1.1* could be detected in external hyphae and in the hyphal mantle surrounding the pine roots (Fig. 5H) as expected from the previously observed transcript localization (cf.

Fig. 4D). In addition, immunostaining of *HcPT1.1* proteins was found also within the Hartig net (Fig. 5H–J). This presence of *HcPT1.1* in the Hartig net was further analyzed by an increased magnification of ECM cross-sections (Fig. 5J).

4. Discussion

The phosphate transporter *HcPT1.1* from the ECM fungus *H. cylindrosporum* represents one of the so far identified fungal transport systems that might play an important role in symbiotic nutrient exchanges between the fungus and its host plant. In particular, global transcript analyses by Northern blot and RT-PCR have shown that *HcPT1.1* transcript levels are increased in response to Pi deprivation (Tatry et al., 2009), suggesting a specific role in phosphate uptake under low environmental Pi availability. To further investigate the role of *HcPT1.1* in symbiotic ECM roots, we have studied its expression regulation and localization by developing three approaches, cell imaging of transgenic fungal lines expressing promoter-reporter gene constructs, *in situ* hybridization and protein immunolocalization, which have provided consistent and complementary results.

Promoter-reporter experiments were established to assess whether the up-regulated accumulation of *HcPT1.1* transcripts upon Pi poverty involves increased promoter activity or results

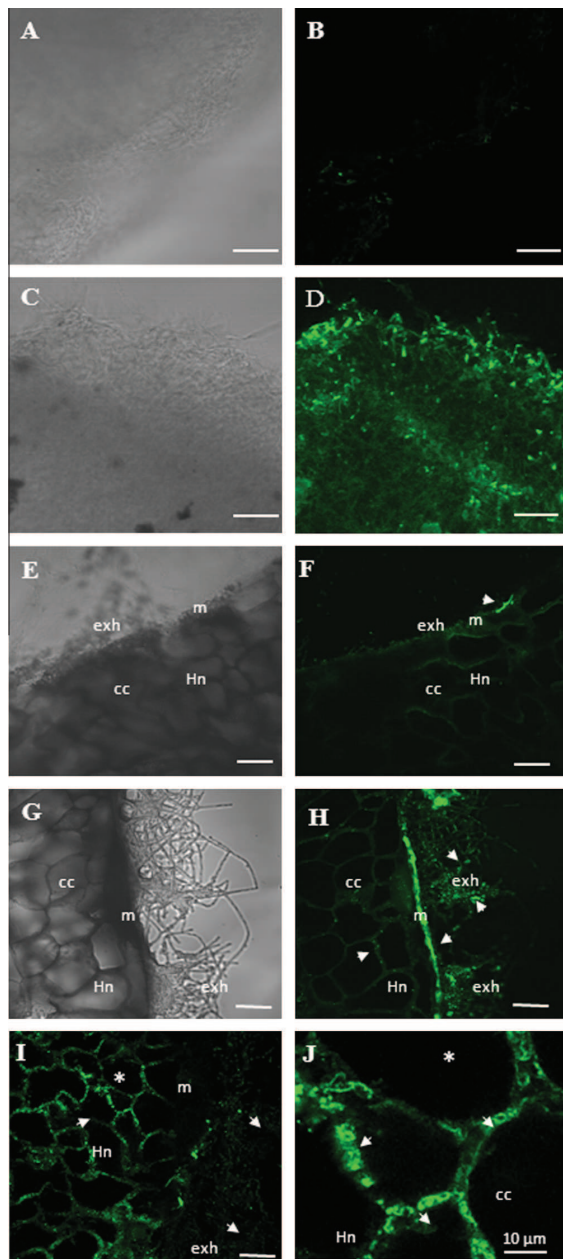


Fig. 5. Immunolocalization of HcPT1.1 in *H. cylindrosporum* mycelia grown in pure cultures or in ectomycorrhizae in dependence on external Pi supply. Laser confocal microscopy images of *H. cylindrosporum* hyphae (B, D) and ECM (F, H–J) probed with HcPT1.1 antibodies visualized with a secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488. Corresponding images in bright field (A, C, E, G). (A–D) Pure culture mycelia grown for 12 days in N6 medium containing 3 mM Pi (A, B) or in the same medium but not supplemented with Pi (C, D). (E–J) *H. cylindrosporum* – *P. pinaster* ECM from plants grown in rhizoboxes containing a thin layer of soil, which had been supplemented with Pi (E, F) or not supplemented (G–J); +P and –P ECM, respectively. In both pure fungal mycelia and ECM (arrowheads), fluorescence signals are significantly more intense in –P than in +P treatments. (I and J) Immunostaining of fungal hyphae between root cortical cells forming the Hartig net. Increased magnification of a detail from (I) marked by an asterisk to blow-up hyphal structures as indicated by the arrowheads (J). m: hyphal mantle; exh: extraradical hyphae; Hn: Hartig net; cc: cortical cell. Bars = 50 μm (A–I) or 10 μm as indicated in (J).

from post-transcriptional regulation mechanisms. For that purpose, suitable binary vectors harboring *EGFP* as functional reporter gene either under control of a constitutive promoter or of the *HcPT1.1* promoter were constructed based on the vectors recently used for efficient Agrobacterium transformation (Ngari et al., 2009). Successful transformation of *H. cylindrosporum* by *Agrobacterium* made possible the introduction of the different reporter gene constructs in the fungal genome and thus the production of several independent transformants in each case. Concerning the use of GFP type fluorescent proteins as reporter gene, previous analyses had already demonstrated that the genes coding for EGFP (Müller et al., 2006) or sGFP bordered by two introns (Rekangalt et al., 2007) could be efficiently expressed in the free living mycelia of *H. cylindrosporum* enabling detection of functional green fluorescent proteins. However, to our knowledge, no promoter analysis had been made so far by this method in any ECM fungus. In the present study, construction of new vectors together with efficient Agrobacterium transformation offered functional expression of EGFP in fungal cultures.

The promoter-EGFP reporter gene experiments demonstrated that the response of *HcPT1.1* transcript accumulation to changes in external Pi availability involves regulation of the *HcPT1.1* promoter activity. This raises the question of the nature of the signaling molecule(s), transduction pathway and mechanisms that control the activity of the *HcPT1.1* promoter in response to low or high Pi availability in the soil, allowing sustained up- or down-regulation of *HcPT1.1* expression. A further step towards elucidation of such mechanisms will be the identification of promoter cis-elements that are responsible for promoter activity control, using mutagenized or truncated promoter sequences fused to EGFP. The amplified promoter region of *HcPT1.1* was analyzed by searching for putative regulatory sequences in analogy to the yeast genome (*Saccharomyces cerevisiae*; www.yeasttract.com) as well as by comparison with known regulatory sequences in bacteria (*Streptomyces coelicolor*). Interestingly, two regulatory domains were found that might play a role in gene expression regulation upon phosphate availability, namely a Pho4p box (Secco et al., 2012) and a PHO box (Sola-Landa et al., 2005). Further analyses of these promoter elements could open the way to the uncovering of transcription factors targeting the corresponding cis-elements.

In addition to the promoter-reporter strategy, two other types of approaches have been developed in the present report to (i) further analyze Pi-dependent expression of the phosphate transporter as well as to (ii) get insight in the spatial expression pattern of this transporter within ECM. The *in situ* hybridization approach has already been adopted for analyses of endomycorrhizal symbiosis in order to investigate up-regulated genes in arbuscules in *Medicago truncatula* (Massoumou et al., 2007). Detection of signals in extramatrical mycelium by *in situ* hybridization is considered as very challenging due to the size of the hyphae. In the present report, both the *in situ* hybridization technique and the conditions of co-culture of the fungus with the host plant for production of ECM have been adapted and optimized for monitoring of transcripts with low accumulation levels, as predicted for membrane transporter genes. The developed protocol has indeed resulted in successful detection of transcripts from the *HcPT1.1* transporter gene. The herewith reported results are likely to represent the first RNA localization of a fungal transporter system from a Basidiomycota within ECM by *in situ* hybridization. They indicate that *HcPT1.1* is preferentially expressed in hyphae of the fungal mantle and hyphae exploring the soil and that its expression is up-regulated upon Pi shortage.

Moreover, immunolocalization of HcPT1.1 by specific antibodies provided evidence that increased activity of the *HcPT1.1* promoter and elevated *HcPT1.1* transcript accumulation upon Pi deprivation actually result in enhanced production of the HcPT1.1

transporter on the protein level. Concerning localization of HcPT1.1 in the ECM tissues, the immunolocalization observations indicate that the Pi transporter is present in external fungal hyphae exploring the soil and in the hyphal mantle, in agreement with the *in situ* hybridization data, but also within the Hartig net. Presence of the Pi transporter in external hyphae provide support to the hypothesis that HcPT1.1 plays a role in Pi uptake from the soil and thus in Pi nutrition of the two symbiotic partners. Protein detection within the Hartig net raises the question whether HcPT1.1 is also able to release Pi towards the plant cells. This transport activity could be tightly regulated by different Pi or pH gradients (Cairney and Burke, 1996). The fungus could also use HcPT1.1 to recycle Pi from the apoplasmic space and employ other transport systems for the release of Pi towards plant root cells.

The three types of approaches developed in the present report consistently evidenced that *HcPT1.1* expression is stimulated by Pi deprivation (or repressed by Pi availability), further supporting the hypothesis that this transporter is involved in Pi uptake from the soil by the fungus under low environmental Pi availability. In most natural ecosystems, bioavailability of Pi for plants and microorganisms is generally very low and limiting, due to binding to soil colloids and low solubility in presence of polyvalent cations (iron, zinc, calcium...). Furthermore, due to low phosphate mobility in the soil, Pi uptake by the root results in depletion in the surrounding rhizosphere (Bielecki, 1973; Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003). Mycorrhizal fungi allow soil exploration far from the root surface and improve Pi nutrition of their host plants (Torres Aquino and Plassard, 2004; Van Tichelen and Colpaert, 2000). Among mechanisms developed by mycorrhizal fungi to increase Pi uptake, up-regulation of phosphate transporters at low Pi concentrations has been described in the case of arbuscular mycorrhiza (Benedetto et al., 2005; Harrison and van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Olsson et al., 2006). In external hyphae of *H. cylindrosporum* in symbiotic conditions, the phosphate transporter gene *HcPT1.1* displays this property of tight regulation by Pi, suggesting a role in Pi nutrition of the fungus, as discussed above, and thereby in host plant phosphorus nutrition. Further studies will be carried out, using fungus transformation to develop overexpression and knock-down strategies (Kemppainen et al., 2009), in order to assess the actual role of HcPT1.1 in the fungus and the host plant Pi nutrition.

5. Conclusions

Taken together, introduction of promoter-EGFP reporter gene constructs in *H. cylindrosporum* lines by Agrobacterium transformation has allowed to unravel the involvement of the HcPT1.1 promoter in the expression regulation of the Pi transporter upon Pi availability. EGFP imaging as well as qRT-PCR analyses of transformed fungal lines indicated clearly an up-regulation of *HcPT1.1* upon Pi limitations. Furthermore, *in situ* hybridization experiments revealed *HcPT1.1* transcript accumulation upon Pi deprivation in external hyphae and fungal mantle. By providing results consistent with the *in situ* hybridization data, specific antibodies revealed the presence of the HcPT1.1 protein in external fungal hyphae and mantle upon Pi lack but in addition also within the Hartig net. Finally, the spatial pattern of transcripts and proteins as well as the promoter-driven up-regulation upon Pi shortage provide further support to the assumption that HcPT1.1 plays a role in Pi uptake from the soil solution, a crucial process in the symbiotic interaction and the improvement of the host plant phosphorus nutrition.

In addition, the methodological approaches we have developed are likely to provide strong support to unravel mechanisms underpinning specialization and polarization of the fungal membrane in conditions of ECM symbiosis. Such analyses could allow to further

understand not only the transport mechanisms responsible for the exchanges of solutes as e.g. mineral nutrients or sugars, likely to be of major importance in the symbiotic interaction, but also the signaling mechanisms responsible for the exchanges of information between the fungus and its host plant.

Acknowledgments

We like to thank the students Carole Martin, Pauline Carretier and Emeric Lecoer for participation during laboratory internships. The laboratory “*Ecologie Microbienne*” of Lyon kindly provided the plasmid pPZP-133 used for construction of promoter-reporter vectors, and LBA1126 *Agrobacterium* strain. Authors also like to thank Jeanne Doré, from the “*Ecologie Microbienne*” laboratory, for the transmission of the method of *Hebeloma* Agrobacterium transformation. KG was financially supported by a grant from the French Minister of Research and Technology, MZH by a scholarship from the Higher Education Commission (HEC) of Pakistan, AD by funding of the ANR project “TRANSMUT” 2010 BLAN 1604 03, and AB by a fellowship from INRA (Contrat Jeune Scientifique 2012–2017).

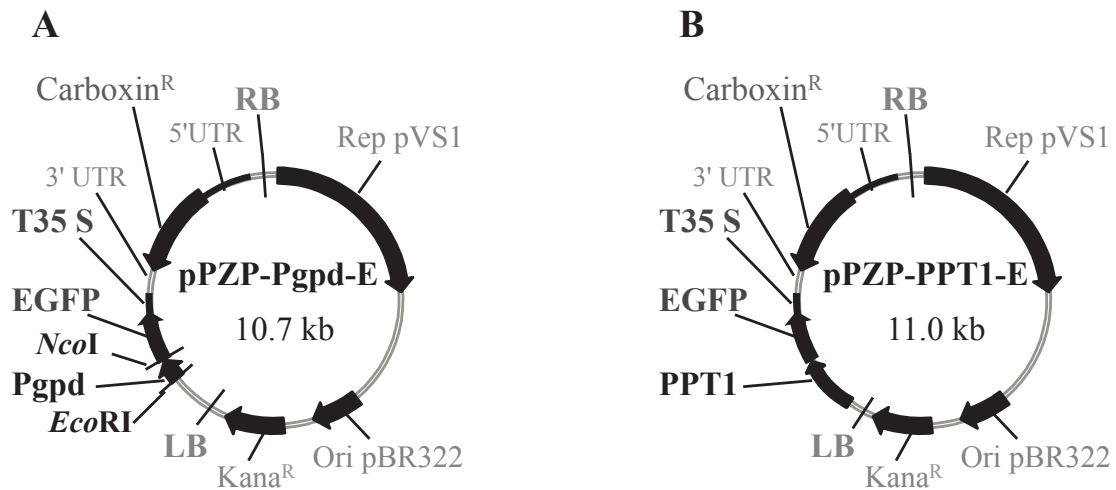
Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.06.007>.

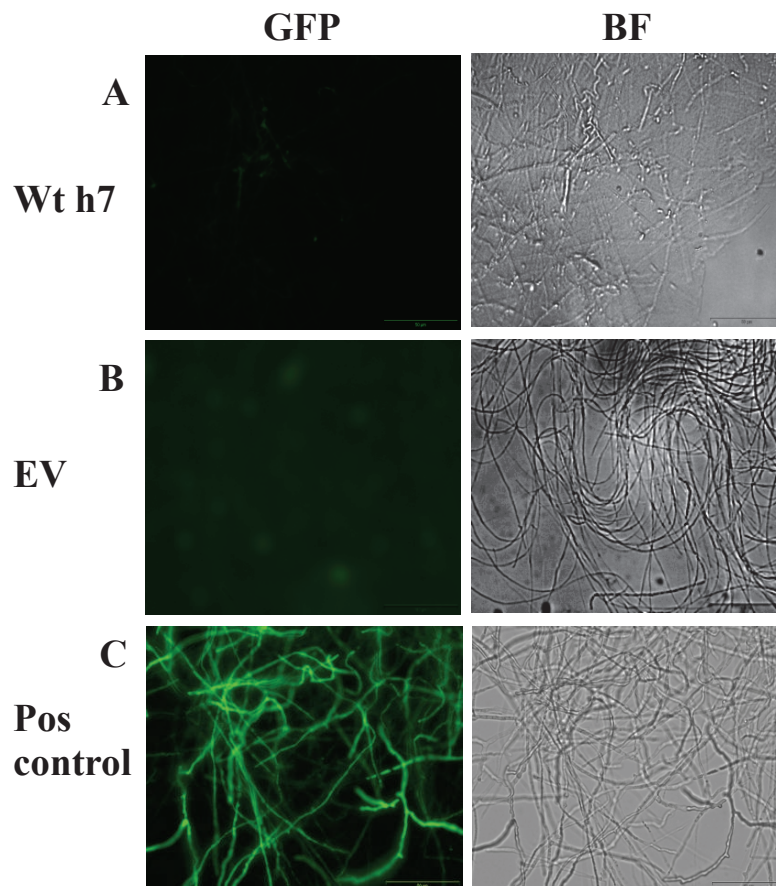
References

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Internat* 11, 36–42.
- Benedetto, A., Magurno, F., Bonfante, P., Lanfranco, L., 2005. Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15, 620–627.
- Bielecki, R.L., 1973. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24, 225–252.
- Burgess, T., Dell, B., Malajczuk, N., 1996. *In vitro* synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* 6, 189–196.
- Cairney, J.W.G., 2011. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant Soil* 344, 51–71.
- Cairney, J.W.G., Burke, R.M., 1996. Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 134, 685–695.
- Casarin, V., Plassard, C., Souche, G., Arvieu, J.-C., 2003. Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie* 23, 461–469.
- Casieri, L., Lahmidi, N.A., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., Courty, P.-E., Garcia, K., Charbonnier, M., Deltail, A., Brun, A., Zimmermann, S., Plassard, C., Wipf, D., 2013. Biotrophic transportome in mutualistic plant fungal interactions. *Mycorrhiza*, in press, <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-013-0496-9>.
- Chalot, M., Javelle, A., Blaudez, D., Lambilliotte, R., Cooke, R., Sentenac, H., Wipf, D., Botton, B., 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant Soil* 244, 165–175.
- Combiér, J.-P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G., Marmesse, R., 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 141–148.
- Corratgé, C., Zimmermann, S., Lambilliotte, R., Plassard, C., Marmesse, R., Thibaud, J.-B., Lacombe, B., Sentenac, H., 2007. Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *J. Biol. Chem.* 282, 26057–26066.
- Debaud, J.C., Gay, G., 1987. *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol.* 105, 429–435.
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L., Wipf, D., 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* 17, 413–422.
- Grimaldi, B., de Raaf, M.A., Filetici, P., Ottonello, S., Ballario, P., 2005. *Agrobacterium* mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. *Curr. Genet.* 48, 69–74.
- Harrison, M.J., van Buuren, M.L., 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378, 626–629.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 226, 275–295.

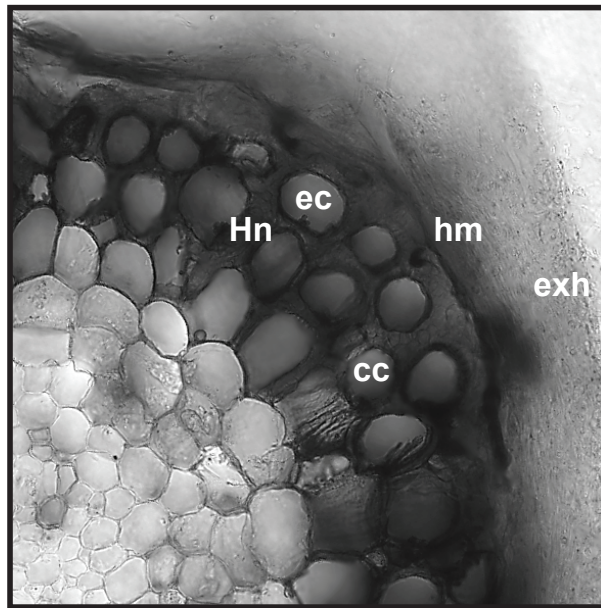
- Jabnoute, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.L., Conéjéro, G., Rodríguez-Navarro, A., Sentenac, H., Guiderdoni, E., Abdely, C., Véry, A.-A., 2009. Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol.* 150, 1955–1971.
- Jargeat, P., Rekangalt, D., Verner, M.C., Gay, G., Debaud, J.C., Marmeisse, R., Fraissinet-Tachet, L., 2003. Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporium*. *Curr. Genet.* 43, 199–205.
- Javelle, A., Rodríguez-Pastrana, B.R., Jacob, C., Botton, B., Brun, A., Andre, B., Marini, A.M., Chalot, M., 2001. Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium*. *FEBS Lett.* 505, 393–398.
- Kemppainen, M., Circosta, A., Tagu, D., Martin, F., Pardo, A.G., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 16, 19–22.
- Kemppainen, M., Duplessis, S., Martin, F., Pardo, A.G., 2009. RNA silencing in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. *Environ. Microbiol.* 11, 1878–1896.
- Lambilliotte, R., Cooke, R., Samson, D., Fizames, C., Gaymard, F., Plassard, C., Taty, M.-V., Berger, C., Laudie, M., Legeai, F., Karsenty, E., Delseny, M., Zimmermann, S., Sentenac, H., 2004. Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporium* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 164, 505–513.
- Louche, J., Ali, M.A., Cloutier-Hurteau, B., Sauvage, F.-X., Quiquampoix, H., Plassard, C., 2010. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 323–335.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Harrison, M.J., 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1140–1148.
- Marmeisse, R., Guidot, A., Gay, G., Lambilliotte, R., Sentenac, H., Combiér, J.-P., Melayah, D., Fraissinet-Tachet, L., Debaud, J.C., 2004. *Hebeloma cylindrosporium* – a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol.* 163, 481–498.
- Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D., Pisabarro, A., Spatafora, J.W., Baker, S.E., Grigoriev, I.V., 2011. Sequencing the fungal tree of life. *New Phytol.* 190, 818–821.
- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59, 159–163.
- Massoumou, M., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Brechenmacher, L., Sanchez, L., Selim, S., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., 2007. *Medicago truncatula* gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. *Mycorrhiza* 17, 223–234.
- Montanini, B., Moretto, N., Soragni, E., Percudani, R., Ottonello, S., 2002. A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genet. Biol.* 36, 22–34.
- Montanini, B., Viscomi, A.R., Bolchi, A., Martin, Y., Siverio, J.M., Balestrini, R., Bonfante, P., Ottonello, S., 2006. Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochem. J.* 394, 125–134.
- 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. Environ. Microbiol.* 71, 382–391.
- Müller, T., Benjdia, M., Avolio, M., Voigt, B., Menzel, D., Pardo, A., Frommer, W.B., Wipf, D., 2006. Functional expression of the green fluorescent protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *Mycorrhiza* 16, 437–442.
- Nehls, U., Wiese, J., Guttenberger, M., Hampp, R., 1998. Carbon allocation in ectomycorrhizas: Identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 167–176.
- Nehls, U., Bock, A., Ecke, M., Hampp, R., 2001. Differential expression of the hexose-regulated fungal genes AmPAL and Am Mst1 within *Amanita/Populus* ectomycorrhizas. *New Phytol.* 150, 583–589.
- Ngari, C., Combiér, J.-P., Doré, J., Marmeisse, R., Gay, G., Melayah, D., 2009. The dominant HcSdhR carboxin-resistance gene of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* as a selectable marker for transformation. *Curr. Genet.* 55, 223–231.
- Olsson, P.A., Hansson, M.C., Burleigh, S.H., 2006. Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4115–4120.
- Pardo, A.G., Hanif, M., Raudaskoski, M., Gorfer, M., 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycol. Res.* 106, 132–137.
- Rao, P.S., Niederpruem, D.J., 1969. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *J. Bacteriol.* 100, 1222–1228.
- Rekangalt, D., Verner, M.-C., Kües, U., Walsler, P.J., Marmeisse, R., Debaud, J.-C., Fraissinet-Tachet, L., 2007. Green fluorescent protein expression in the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 268, 67–72.
- Rodríguez-Tovar, A.V., Ruiz-Medrano, R., Herrera-Martínez, A., Barrera-Figueroa, B.E., Hidalgo-Lara, M.E., Reyes-Márquez, B.E., Cabrera-Ponce, J.L., Valdés, M., Xocostle-Cázares, B., 2005. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *J. Microbiol. Methods* 63, 45–54.
- Secco, D., Wang, C., Shou, H., Whelan, J., 2012. Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Lett.* 586, 289–295.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Academic Press, New York, NY, USA.
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250.
- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Franco-Dominguez, E., Martin, J.F., 2005. Binding of PhoP to promoters of phosphate regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol. Microbiol.* 56, 1373–1385.
- Taty, M.-V., El Kassis, E., Lambilliotte, R., Corratgé, C., Van Aarle, I., Amenc, L.K., Alary, R., Zimmermann, S., Sentenac, H., Plassard, C., 2009. Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporium* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J.* 57, 1092–1102.
- Torres Aquino, M., Plassard, C., 2004. Dynamics of ectomycorrhizal growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 149–156.
- Van Aarle, I.M., Viennois, G., Amenc, L.K., Taty, M.-V., Luu, D.T., Plassard, C., 2007. Fluorescent *in situ* RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* 17, 487–494.
- Van Kan, J.A., van den Ackerveken, G.F., de Wit, P.J., 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4, 52–59.
- Van Tichelen, K.K., Colpaert, J.V., 2000. Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings. *Physiol. Plantarum* 110, 96–103.
- Vance, C., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157, 423–447.
- Vergne, E., Ballini, E., Marques, S., Sidi Mammar, B., Droc, G., Gaillard, S., Bourot, S., DeRose, R., Tharreau, D., Nottéghem, J.L., Lebrun, M.H., Morel, J.B., 2007. Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene Pi33 in response to infection by ACE1 avirulent blast fungus. *New Phytol.* 174, 159–171.
- Wipf, D., Benjdia, M., Tegeder, M., Frommer, W.B., 2002. Characterization of a general amino acid permease from *Hebeloma cylindrosporium*. *FEBS Lett.* 528, 119–124.
- Wright, D.P., Johansson, T., Le Queré, A., Söderström, B., Tunlid, A., 2005. Spatial patterns of gene expression in the extramatrical mycelium and mycorrhizal root tips formed by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in association with birch (*Betula pendula*) seedlings in soil microcosms. *New Phytol.* 167, 579–596.



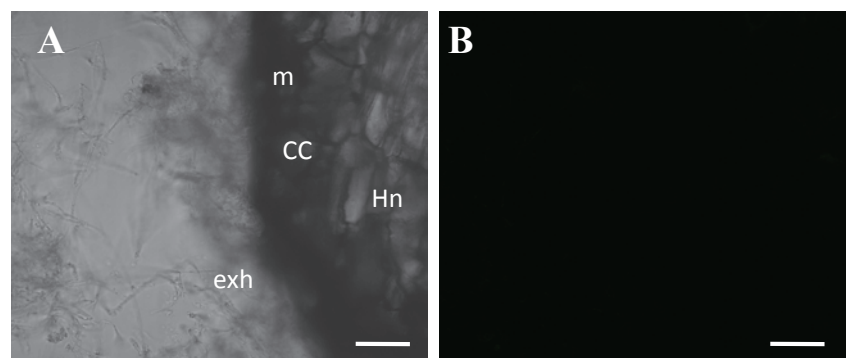
Suppl. Fig. 1. Binary vectors constructed for transformation of ectomycorrhizal fungi. (A) pPZP-Pgpd-E is derived from vector pPZP133 harboring the cassette *Hc.Sdh* that confers resistance to carboxin (Ngari et al., 2009). It contains the *EGFP* (enhanced green fluorescence protein) reporter sequence under control of the constitutive promoter of *gpd* (glyceraldehyde-3-phospho-dehydrogenase), which is cloned between *EcoRI* and *NcoI* restriction sites. (B) pPZP-PPT1.1-E is derived from pPZP-Pgpd-E by replacing the *gpd* promoter by the promoter region of the *Hebeloma* phosphate transporter *HcPT1.1* gene that will control expression of the *EGFP* reporter. LB and RB, left border and right border of the T-DNA, respectively; T35S, terminator; Carboxin, *Hc.Sdh* cassette; Rep pVS1 and Ori pBR322, sequences for plasmid replication; Kana, aminoglycoside phosphotransferase cassette conferring resistance to kanamycin.



Suppl. Fig. 2. EGFP fluorescence observed in fungal lines transformed with the positive control vector. The EGFP sequence is placed under control of the *gpd* promoter in pPZP-Pgpd-E. Explants from strain h7 or its transformed isolates were grown on YMG solid medium (rich medium) for 2-3 weeks before epifluorescence microscopy analysis. Left column: EGFP images. Right column: bright field images. Low background fluorescence was observed in (A) the untransformed wild-type fungus h7 or (B) in the pPZP-133 transformant (h7 transformed fungus with empty vector; isolate 28.2). (C) The fungus transformed with pPZP-Pgpd-E (positive control for EGFP expression under *gpd* promoter; isolate 5) shows functional EGFP expression in hyphae. Images are representative examples of independent isolates for each transformation including the isolates that were tested by PCR (Fig.-1). Scale bar: 50 μ m.



Suppl. Fig. 3. Cross-section of *Pinus pinaster* – *Hebeloma cylindrosporum* ectomycorrhiza. In presence of the plant root system, extraradical hyphae (exh) branch out to form the hyphal mantle (m) surrounding the root and the Hartig net (Hn) between plant epidermal (ec) and cortical cells (cc) allowing nutrient exchanges. Scale bar: 20 μ m.



Suppl. Fig. 4. Control of immunostaining of HcPT1.1 in *H. cylindrosporum* – *P. pinaster* ectomycorrhizae. Observation of ectomycorrhizal pine roots (sections 80 μ m) in (A) bright field or by laser confocal microscopy (B). Incubation with the secondary antibody showing no immunostaining. m: hyphal mantle; exh: extraradical hyphae; Hn: Hartig net; cc: cortical cell. Bars = 50 μ m.

Supplementary Methods

Promoter amplification and destination vector construction

The promoter region of *HcPT1.1* (around 1 kb) was initially deduced from the genomic sequence isolated from the *Hebeloma* strain h1 (EMBL database AJ970313.2; Tatry et al., 2009). Verification of this initial promoter region by comparison with the recently available *Hebeloma* genome (<http://genome.jgi-psf.org/Hebcy2/Hebcy2.home.html>) figured out an overlap with another coding sequence thus limiting the probable *HcPT1.1* promoter region to 629 bp. This region was amplified by PCR using primers pPT1.1-3/5-SpeI-For (5'-ACTAGTGAGACAGATTGCACGCGGA-3') and pPT1.1-SpeI-Rev (5'-ACTAGTTGGAAGACGAGGAGGATTGG-3') on the corresponding phage clone isolated from the gDNA library of h1, sub-cloned into topo vector (TOPO TA cloning® kit, Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>) and verified by sequencing (GATC Biotech, <http://www.gatc-biotech.com/fr/index.html>).

To construct the destination vector pPZP-PPT1.1-E (EGFP under control of *HcPT1.1* promoter), the vector pPZP-133 (Ngari et al., 2009), which confers carboxin resistance to transformants, was used. The vector pPZP-133 was originally derived from the backbone of pPZP-201BK that allows efficient T-DNA transfer into plant cells (Hajdukiewicz et al., 1994). pPZP-133 was first completed with the green fluorescence protein (EGFP) encoding sequence under control of the constitutive promoter *Pgpd* (glyceraldehyde-3-phospho-dehydrogenase) from *Agaricus bisporus* recovered from the pBGgHg vector (Chen et al., 2000; Hanif et al., 2002) by *EcoRI* and *XbaI* restriction and second with the T35S terminator (*XbaI* restriction), resulting in the control vector pPZP-Pgpd-E. For further use, the cloning vector pPZP-EGFP-T was prepared by elimination of the constitutive promoter *Pgpd* by *EcoRI* and *NcoI* restriction. The promoter region of *HcPT1.1* was recovered from the topo vector by digestion with *SpeI* restriction enzyme (Fast Digest, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA), gel purified (Gene Jet™ PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific), and inserted into the *SpeI* linearized pPZP-EGFP-T vector thereby obtaining finally pPZP-PPT1.1-E.

Agrobacterium-mediated fungal transformation

H. cylindrosporum was transformed by fungal Agrotransformation (Combiér et al., 2003; de Groot et al., 1998; Pardo et al., 2002) using the efficient strain LBA1126 of *Agrobacterium tumefaciens* as carrier (Bundock and Hooykaas, 1996; Ngari et al., 2009). *Agrobacteria* were transformed with pPZP-PPT1.1-E (EGFP under control of the *HcPT1.1* promoter), pPZP-133 (empty vector) or pPZP-Pgpd-E (EGFP positive control) and cultured in LB-mod medium

(LB without NaCl) under selection by kanamycin. Transformed *Agrobacteria* were grown before transformation of the fungus up to OD 0.3-0.4 at 28°C for 4 to 6 h under agitation in liquid induction medium (IM; Bundock et al., 1995) composed of 10 mM glucose, 0.5% glycerol (v/v), 40 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and 200 µM acetosyringone (AS) added to MM salts (minimal medium, modified from Hooykaas et al. (1979): 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.3 mM CaCl₂, 0.01 mM FeSO₄, 3.5 mM (NH₄)₂SO₄). Sterilized glass microfiber discs (100 or 50 discs / transformation; GF/D Whatman International Ltd., Maidstone England) were incubated with 50 µl of freshly macerated fungal mycelia together with 50 µl of transformed *Agrobacteria* on solid IM (see before, except 5 mM glucose instead of 10 mM) medium (Bundock et al., 1995; Mullins et al., 2001).

After 72 h of induction, the glass microfiber discs allowing co-culture of mycelia with *Agrobacteria* were transferred to solid selection media (YMG with carboxin (0.2 µg ml⁻¹)) supplemented with cefotaxime (200 µM) to eliminate the *Agrobacteria*. Within 10 to 20 days, the growing fungal hyphae were transferred to individual solid YMG (carboxin) Petri dishes (55 mm) to confirm obtainment of transformants. Stable T-DNA insertion was checked in randomly selected fungal transformants grown 5 times successively on non-selective media (YMG) before a final 6th culture on selective media (YMG supplemented with carboxin).

Primers

pPT1.1-3/5-SpeI-For	5'- <u>ACTAGTGAGACAGATTGCACGCGGA</u> -3'
EGFP-390-Rev	5'-GATGTTGCCGTCCTCCTTGAA-3'
pPZP-219-For	5'-TCATTAGGCACCCAGGCTTTAC-3'
pPZP-492-Rev	5'-ATTGTAAAGCGGGGTGCCTGA-3'
Pgpd-For	5'-GAGCTCGGTACCCGGGGATCAGCTTTA-3'
qPCR-PT1.1For	5'-CACAAATAAATTCGTCAAGCATATTCTCG-3'
qPCR-PT1.1Rev	5'-GCGTTCTCGCACACCTCTG-3'
qEGFPFor	5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3'
qEGFPRev	5'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3'
αTubFor	5'-GTCTTCAAGGCTTCTTCGTCTTC-3'
αTubRev	5'-ACAGTCAGAGTGCTCCAAGGTAGT-3'
F3ISdir	5'-CTTCATCATCATGGGTTTCGGATACG-3'
F3ISrev	5'-CTCGCACACCTCTGACGAAACCGTC-3'

Supplementary References

- Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., 1996. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 15272–15275.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P.J.J., 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14, 3206–3214.
- Chen, X., Stone, M., Schlaghaufer, C., Romaine, C.P., 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4510–4513.
- Combier, J.-P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G., Marmeisse, R., 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. FEMS Microbiol. Lett. 220, 141–148.
- de Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnol. 16, 839–842.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Mol. Biol. 25, 989–994.
- Hanif, M., Pardo, A. G., Gorfer, M., Raudaskoski, M., 2002. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. Curr. Genet. 4, 183–188.
- Hooykaas, P.J.J., Roobol, C., Schilperoort, R.A., 1979. Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Gen. Microbiol. 110, 99-109.
- Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, C.P., Raina, R., Geiser, D.M., Kang, S., 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathology 91, 173–180.
- Ngari, C., Combier, J.-P., Doré, J., Marmeisse, R., Gay, G., Melayah, D., 2009. The dominant Hc.SdhR carboxin-resistance gene of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* as a selectable marker for transformation. Curr. Genet. 55, 223–231.
- Pardo, A.G., Hanif, M., Raudaskoski, M., Gorfer, M., 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Mycol. Res. 106, 132–137.

4.2.2 Analyse du promoteur de *HcPT1.1*

L'article présenté au paragraphe 4.2.1 montre par une stratégie de fusion transcriptionnelle couplée à de l'analyse RT-qPCR que l'augmentation de l'expression de *HcPT1.1* en réponse à la carence en Pi est due à son promoteur et non à un mécanisme post-transcriptionnel. Une étude plus approfondie de ce promoteur s'avère donc nécessaire pour d'identifier les bases moléculaires responsables de la surexpression de *HcPT1.1* lorsque les ressources en Pi deviennent limitantes.

La première étape a été d'identifier des motifs dans la région promotrice de *HcPT1.1* potentiellement impliqués dans la réponse à la carence en Pi. Pour ce faire, la recherche de motifs dans le promoteur de 629 pb a été faite grâce à une banque de données de *S. cerevisiae*, YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>). Ainsi, 43 motifs ont été trouvés (données non montrées). Parmi ceux-ci, Pho4p situé à -597 pb de l'ATG de *HcPT1.1* a été identifié comme potentiellement impliqué dans la réponse à la concentration en Pi extérieure (Figure 41ab). En effet, le motif Pho4p est reconnu chez *S. cerevisiae* par le facteur de transcription PHO4 de type bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) appartenant à la grande famille des myc (Berben *et al.*, 1990). Ce facteur de transcription est intéressant dans notre cas, car il est capable de contrôler chez la levure l'activité de plusieurs gènes régulés par la concentration en Pi extérieur tel que PHO5 (Ogawa & Oshima, 1990). Par ailleurs, il a été décrit chez la levure que le facteur de transcription PHO4 peut être phosphorylé en plusieurs sites, permettant ainsi une régulation de sa localisation subcellulaire et de son activité (Komeili & O'Shea, 1999). De plus, une trop forte concentration en Pi extérieur entraîne une phosphorylation de PHO4, l'empêchant de réguler l'activité de gènes sensibles à la carence en Pi comme PHO5 (Kaffman *et al.*, 1998). Bien qu'aucun homologue du gène PHO4 ne soit présent dans le génome d'*H. cylindrosporum*, une douzaine de facteurs de transcription de type bHLH ont été identifiés (données non montrées).

Un second motif potentiellement lié à la réponse à la concentration en Pi, PHO-box, a été identifié à -394 pb de l'ATG (Figure 41ab). Il a été décrit chez plusieurs bactéries que la protéine PhoP se fixe à la PHO-box contenue dans le promoteur de gènes *pho* régulon lors d'une carence en Pi afin de réguler leur activité (Torriani-Gorini, 1994; Hulett, 1996; Sola-Landa *et al.*, 2005). Le motif PHO-box n'est que partiellement conservé dans le promoteur de *HcPT1.1* contrairement au promoteur de *HcPT1.2* (données non montrées).

Il se pourrait donc que ces modes de régulation conduisant à l'augmentation de l'expression de *HcPT1.1* à travers la reconnaissance des motifs Pho4p et/ou PHO-box soient

conservés chez *H. cylindrosporum*. Afin d'évaluer l'importance éventuelle de ces boîtes de régulation, une stratégie de délétion du promoteur de *HcPT1.1* est envisagée (Figure 41c). Elle consiste en l'obtention de fragments de promoteur de plus en plus courts qui seront fusionnés au gène marqueur EGFP. A l'heure actuelle, seul le vecteur contenant le promoteur entier a été construit et utilisé pour transformer le champignon (Garcia *et al.*, 2013a; Cf. 4.2.1). Une forte expression de la EGFP a été ainsi observée en culture pure lors de la carence en Pi et confirmée par des analyses RT-qPCR. Les deux autres vecteurs contenant le promoteur avec uniquement le motif PHO-box ou le promoteur sans aucun motif restent à construire. Une fois cela fait et les champignons transformés obtenus, la visualisation de l'EGFP confirmée par RT-qPCR permettra de savoir si la réponse à la carence en Pi est conservée avec les promoteurs plus courts. Enfin, une stratégie de simple hybride utilisant la banque ADNc d'*H. cylindrosporum* présente au laboratoire permettra d'identifier les facteurs de transcription impliqués dans cette réponse.

4.2.3 Localisation de *HcPT2* dans l'ectomycorhize

Concernant le transporteur *HcPT2*, la localisation des transcrits et des protéines dans l'ectomycorhize est également nécessaire afin de connaître son implication dans les échanges de Pi au cours de la mycorhization. La localisation des transcrits *HcPT2* a été faite par hybridation *in situ* sur des mycorhizes récoltées à partir de plantes ayant poussé dans du milieu riche (+P) ou pauvre (-P) en Pi (Figure 42). Une révélation bleue est observée au niveau des hyphes extra-matriciels et du manteau dans les deux conditions de culture. Cette observation montre que contrairement à *HcPT1.1*, l'expression de *HcPT2* n'est pas dépendante de la concentration en Pi extérieure, confirmant ce qui avait été observé précédemment par RT-PCR (Tatry *et al.*, 2009). En revanche, aucun signal n'a été détecté au niveau du réseau de Hartig. Or, la révélation bleue étant relativement faible au niveau des hyphes extérieurs, il se pourrait que les transcrits *HcPT2* soient également présents au niveau du réseau de Hartig mais non détectés. D'autres hybridations doivent donc être effectuées afin de confirmer ou d'infirmier ce résultat.

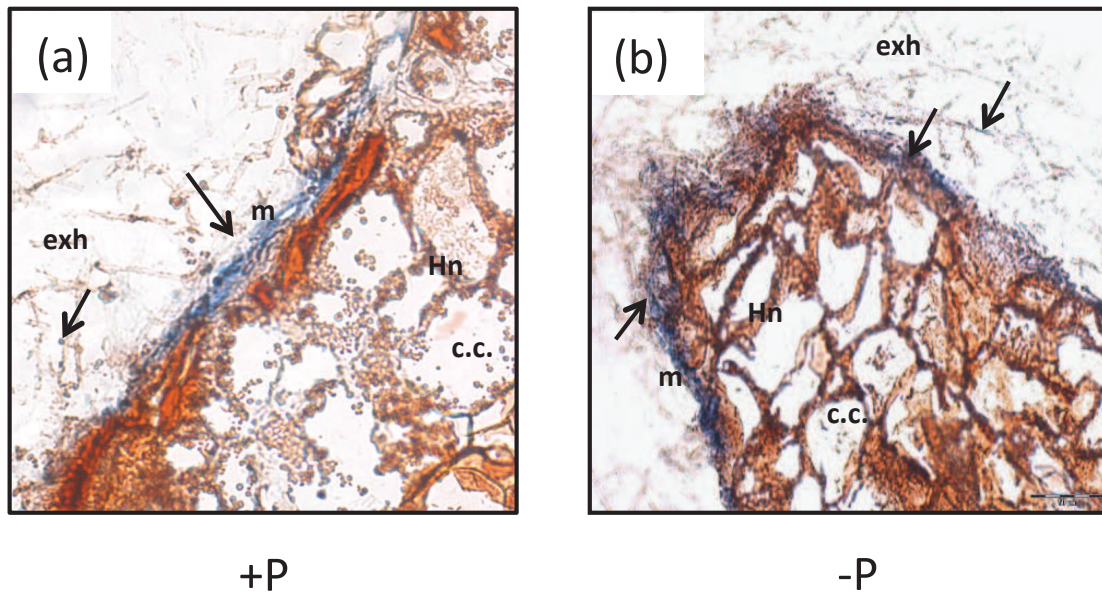


Figure 42: Localisation des transcrits *HcPT2* d'*Hebeloma cylindrosporum* dans l'ectomycorhize.

Les transcrits *HcPT2* ont été localisés (flèches) dans les hyphes du manteau mycélien (m) par hybridation *in situ* après deux mois de culture en présence de Pi (a) ou en carence (b). Grossissement x 20. exh: hyphes extra-racinaires; Hn: réseau de Hartig, c.c.: cellule corticale.

Pour ce qui est de la localisation des protéines *HcPT2*, une stratégie de fusion traductionnelle a été entreprise. Ainsi, un vecteur contenant le gène *HcPT2* fusionné au gène marqueur *EGFP* sous contrôle du promoteur de *HcPT2* a été construit et utilisé pour transformer *H. cylindrosporum*. Parmi les nombreux transformants obtenus, plusieurs ont été utilisés en co-culture avec *P. pinaster* afin de produire des mycorhizes. Celles-ci ont été récoltées, incluses en agarose et coupées au vibratome. Les coupes obtenues ont été traitées au WGA-Alexa-555 et observées au microscope confocal. Malheureusement, les images obtenues n'ayant pas été analysables, les résultats ne sont pas montrés ici.

Néanmoins, une autre stratégie a été utilisée, l'immunolocalisation (A. Becquer & C. Plassard, communication personnelle). Des anticorps ont donc été produits et utilisés sur des mycorhizes obtenues avec la souche sauvage h7. Les résultats préliminaires montrent une localisation des protéines *HcPT2* au niveau des hyphes du réseau de Hartig. Ces données semblent indiquer que *HcPT2* pourrait éventuellement intervenir dans le transfert de Pi des cellules fongiques aux cellules corticales de *P. pinaster* si la direction de transport de ces protéines le permet.

4.3 Rôle de *HcPT1.1* et *HcPT2* dans la nutrition phosphatée végétale ectomycorhize-dépendante

La détermination de l'implication éventuelle des transporteurs *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* d'*H. cylindrosporum* dans la récupération du Pi en condition symbiotique est indispensable pour comprendre les mécanismes moléculaires régissant la nutrition phosphatée ectomycorhize-dépendante des plantes ligneuses. Au cours de ce travail de doctorat, des outils moléculaires s'intégrant dans une stratégie de génétique inverse ont été élaborés et produits pour les transporteurs *HcPT1.1* et *HcPT2*. Des caractérisations phénotypiques préliminaires de ces souches transgéniques ont été réalisées. Ces outils vont ensuite permettre d'analyser l'effet de la modification de l'expression de ces gènes au sein de co-cultures avec la plante hôte *P. pinaster*. Par conséquent, les lignées présentées ci-après ont été transmises à l'étudiante en thèse Adeline Becquer et à sa directrice Claude Plassard qui prennent actuellement le relai pour mener à bien cet objectif.

4.3.1 Production de lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2 d'*Hebeloma cylindrosporum*

Afin d'étudier le rôle des transporteurs *HcPT1.1* et *HcPT2* dans le prélèvement du Pi, une stratégie RNAi a été réalisée. Des vecteurs contenant une cassette RNAi-PT1.1 ou RNAi-PT2 sous contrôle d'un promoteur fort ont donc été produits et utilisés pour transformer *H. cylindrosporum* par *A. tumefaciens*. Les lignées obtenues et confirmées par un test de stabilité ont été criblées par RT-qPCR afin de sélectionner celles qui présentaient une diminution de l'expression du gène candidat considéré.

Pour cette sélection, les lignées RNAi-PT1.1 ont poussé 12 jours dans du milieu N6 riche en P, puis deux jours en N6-P dépourvu de Pi afin d'induire l'expression de *HcPT1.1*. Ainsi, les lignées présentant une induction de *HcPT1.1* moins importante que chez les lignées contrôles h7 et E.V. ont été sélectionnées: RNAi-PT1.1-2, RNAi-PT1.1-3 et RNAi-PT1.1-5 (Figure 43a). Parmi celles-ci, seules les deux lignées RNAi-PT1.1-3 et RNAi-PT1.1-5 ont été utilisées par la suite.

Concernant le transporteur *HcPT2*, deux lignées ayant présenté une diminution significative de *HcPT2*, RNAi-PT2-6 et RNAi-PT2-9, ont été sélectionnées après 14 jours de culture dans du milieu N6 liquide renouvelé à 7 et 12 jours (Figure 43b).

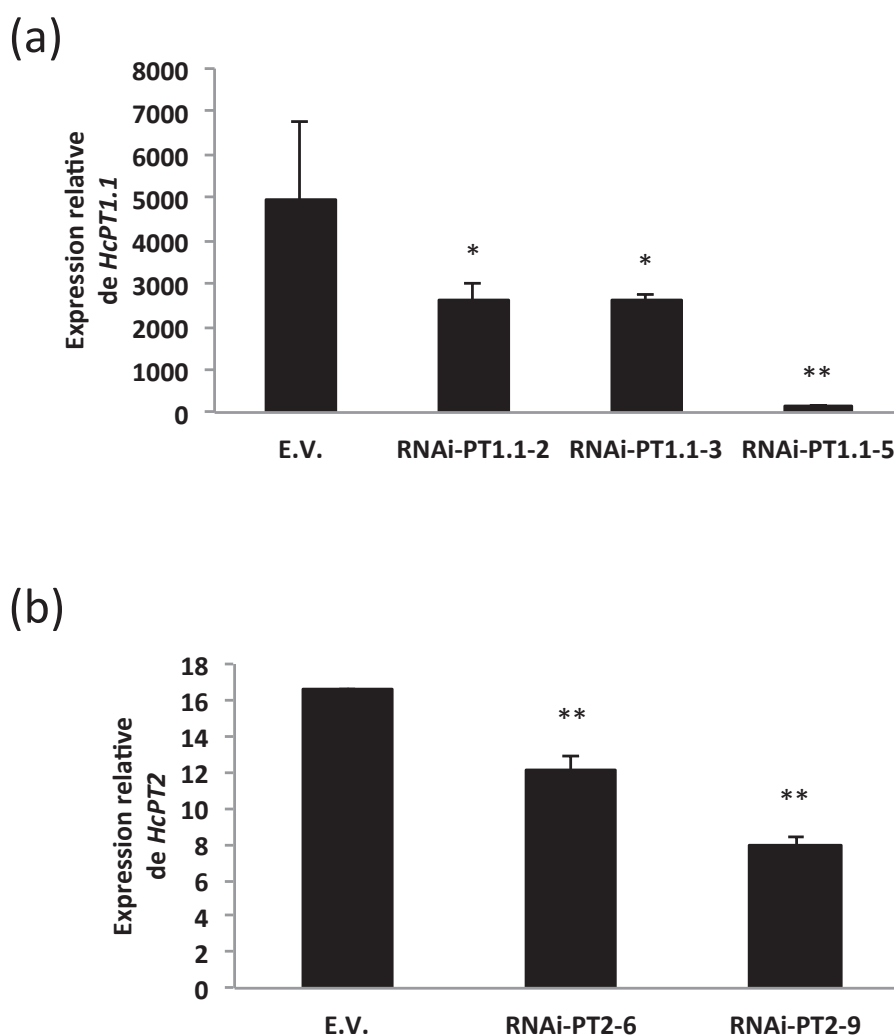


Figure 43: Obtention de lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2 d'*Hebeloma cylindrosporum*.

(a) Quantification du niveau d'expression de *HcPT1.1* par RT-qPCR dans les lignées vecteur vide (E.V.), RNAi-PT1.1-2, RNAi-PT1.1-3 et RNAi-PT1.1-5 d'*H. cylindrosporum*. (b) Quantification du niveau d'expression de *HcPT2* par RT-qPCR dans les lignées E.V., RNAi-PT2-6 et RNAi-PT2-9 d'*H. cylindrosporum*. L'expression relative a été normalisée par le gène de ménage codant pour l' α -tubuline. Les étoiles indiquent une différence significative avec la lignée vecteur vide (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; test de Student).

4.3.2 Analyse phénotypique préliminaire des lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2

Afin de voir si la modification de l'expression de *HcPT1.1* et *HcPT2* modifie la physiologie d'*H. cylindrosporum* en culture pure, plusieurs mesures ont été effectuées telles que la détermination de la matière sèche ou le dosage de différents éléments. Ainsi, la biomasse et la concentration en K^+ et en Na^+ de ces différentes lignées transgéniques ne diffèrent pas des lignées contrôles (données non montrées).

Après 14 jours de culture des lignées transgéniques en milieu N6 renouvelé deux fois, le dosage du P total a été réalisé (Figure 44). Bien que l'expression des transporteurs de Pi *HcPT1.1* et *HcPT2* ait été diminuée par RNAi, la teneur en P total dans le mycélium ne semble pas affectée. Ces données indiquent que soit la diminution de l'expression de *HcPT1.1* et *HcPT2* n'est pas suffisante pour affecter la récupération du Pi dans le milieu, soit ces transporteurs ne sont pas impliqués dans le prélèvement du Pi. Au vu de sa localisation dans l'ectomycorhize, il se pourrait que *HcPT2* participe au relargage du Pi à partir du réseau de Hartig. Ces données étant préliminaires, ces expériences doivent être reproduites avec un plus grand nombre de répétitions biologiques, et avec des milieux de cultures dont la concentration en Pi est modifiée. En effet, il se pourrait qu'une différence de concentration en P total soit détectable dans les lignées RNAi-PT1.1 en condition de carence en Pi.

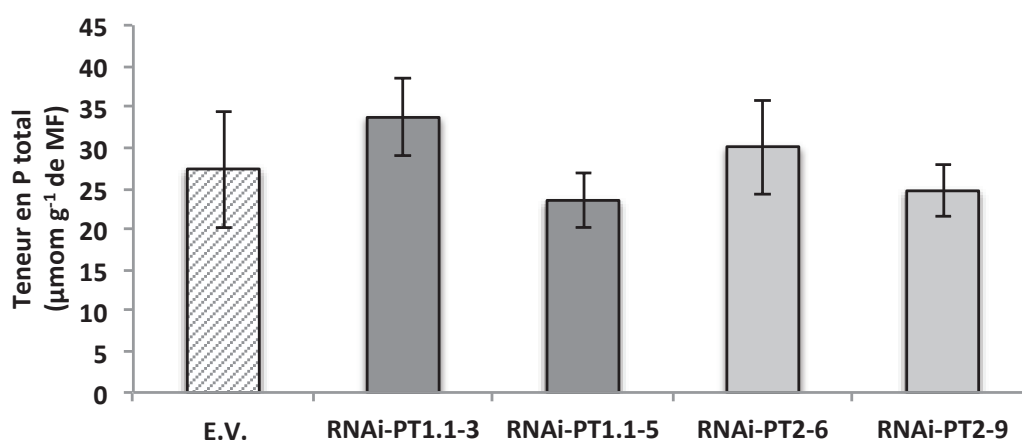


Figure 44: Concentration en P total des lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2 d'*Hebeloma cylindrosporum*.

Teneur en P total intracellulaire dans les lignées transgéniques vecteur vide (E.V.), RNAi-PT1.1-3, RNAi-PT1.1-5, RNAi-PT2-6 et RNAi-PT2-9 d'*H. cylindrosporum* après 14 jours de culture en milieu N6. n = 4 à 6.

Afin de voir si la diminution de l'expression de *HcPT1.1* et *HcPT2* modifie l'expression des autres transporteurs de Pi, la détermination du niveau d'expression de *HcPT1.2* et *HcPT2* ainsi que celle de *HcPT1.1* et *HcPT1.2* a été faite dans les lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2, respectivement (Figure 45). Chez les lignées RNAi-PT1.1, l'expression de *HcPT1.2* n'est pas affectée (Figure 45a). En revanche, l'expression de *HcPT2*

est diminuée de deux fois dans ces lignées en comparaison à la lignée E.V. Concernant les lignées RNAi-PT2, aucune différence significative n'est à noter dans l'expression de *HcPT1.1* et *HcPT1.2* par rapport à la lignée contrôle (Figure 45b).

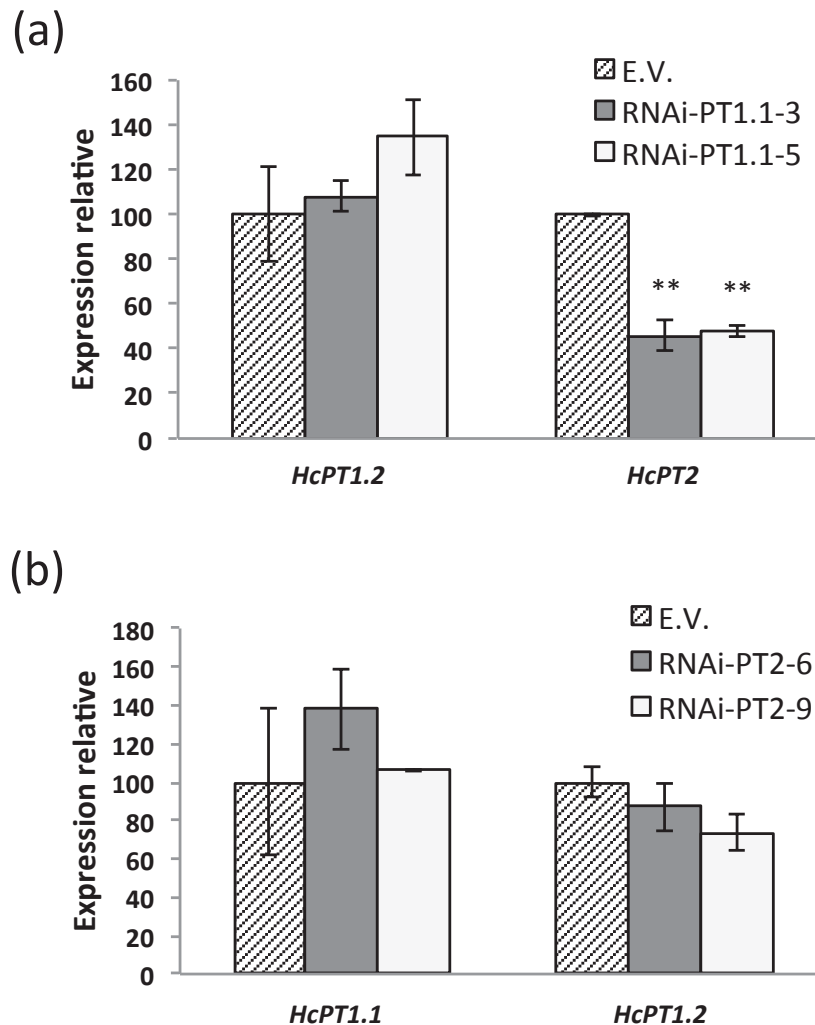


Figure 45: Niveau d'expression des systèmes de transport de phosphate inorganique d'*Hebeloma cylindrosporum* chez les lignées RNAi-PT1.1 et RNAi-PT2.

(a) Quantification par RT-qPCR du niveau d'expression des transporteurs de phosphate inorganique *HcPT1.2* et *HcPT2* dans lignées vecteur vide (E.V.), RNAi-PT1.1-3 et RNAi-PT1.1-5 d'*H. cylindrosporum* après 12 jours de culture en milieu N6, suivis de 2 jours en milieu N6-P. n = 4. (b) Quantification par RT-qPCR du niveau d'expression des transporteurs de phosphate inorganique *HcPT1.1* et *HcPT1.2* dans lignées vecteur vide (E.V.), RNAi-PT2-6 et RNAi-PT2-9 d'*H. cylindrosporum* après 14 jours de culture en milieu N6. n = 4. Les étoiles indiquent une différence significative avec le vecteur vide (**: $p < 0.01$; test de Student).

Chapitre V - Discussion générale et perspectives

5.1 Bilan général

Tout au long de ce travail de doctorat, des outils moléculaires ont été générés afin de permettre une analyse approfondie de candidats potentiellement impliqués dans les échanges de nutriments au cours de la symbiose ectomycorhizienne s'établissant entre *H. cylindrosporium* et *P. pinaster*. Des connaissances sur les systèmes de transport de K^+ et de Pi fongiques ont donc pu être fournis, et leur rôle putatif dans la nutrition potassique et phosphatée ectomycorhize-dépendante de la plante a été étudié. Comme on va le voir dans ce chapitre, la réponse aux questions posées est plus ou moins aboutie en fonction du système de transport considéré.

5.1.1 Implication de *HcTrk1* et *HcSKC* dans le transfert de potassium d'*Hebeloma cylindrosporium* à *Pinus pinaster*

L'importance de la symbiose mycorhizienne dans la nutrition potassique des végétaux est encore mal connue, et certainement sous-évaluée. Au cours de ce travail, il a pu être mis en évidence que l'apport de K^+ à la plante par le champignon était dépendant des ressources en K^+ disponibles dans le milieu extérieur. En effet, il a été décrit que 5 à 6 % du K^+ total de *Picea abies* mycorhizé par *P. involutus* provenait du champignon lorsque les plantes poussaient sur 230 μM de K^+ (Jentschke *et al.*, 2001). Dans nos conditions de culture (50 μM de K^+), la quantité de K^+ apportée par *H. cylindrosporium* à *P. pinaster* se situe plutôt autour de 35 % du K^+ total de la plante (Garcia *et al.*, 2013b). Ceci souligne l'importance des conditions de culture et du couple symbiotique qu'on utilise lors de telles mesures. Le transfert de K^+ du champignon à la plante ne peut pas être visualisé en utilisant des isotopes radioactifs du K^+ car ceux-ci ont une durée de vie trop courte. L'emploi du rubidium, analogue structural du K^+ , aurait également pu être envisagé. Cependant, la quantification de son transfert pouvait être biaisée car il n'est pas certain que les protéines laissant passer le K^+ soient capables d'assurer correctement le transport du rubidium. Ainsi, la mesure de la teneur en K^+ total des parties aériennes et racinaires des plantes mycorhizées, en comparaison aux plantes non-inoculées, a été préférée.

Nos recherches étant principalement focalisée du côté du symbionte fongique, la suite directe a donc été d'essayer de mettre en évidence les systèmes de transport du champignon nécessaires à la récupération du K^+ dans le milieu extérieur, et à son relargage au niveau de

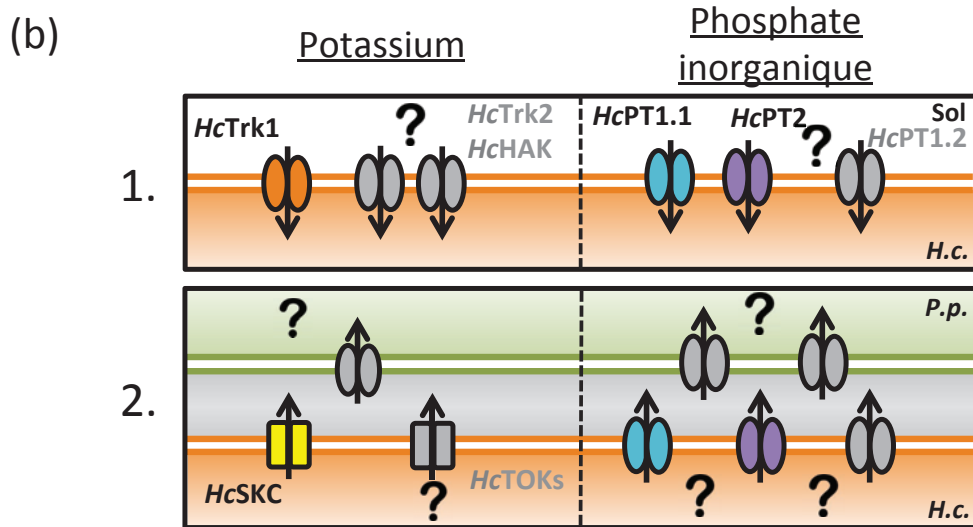
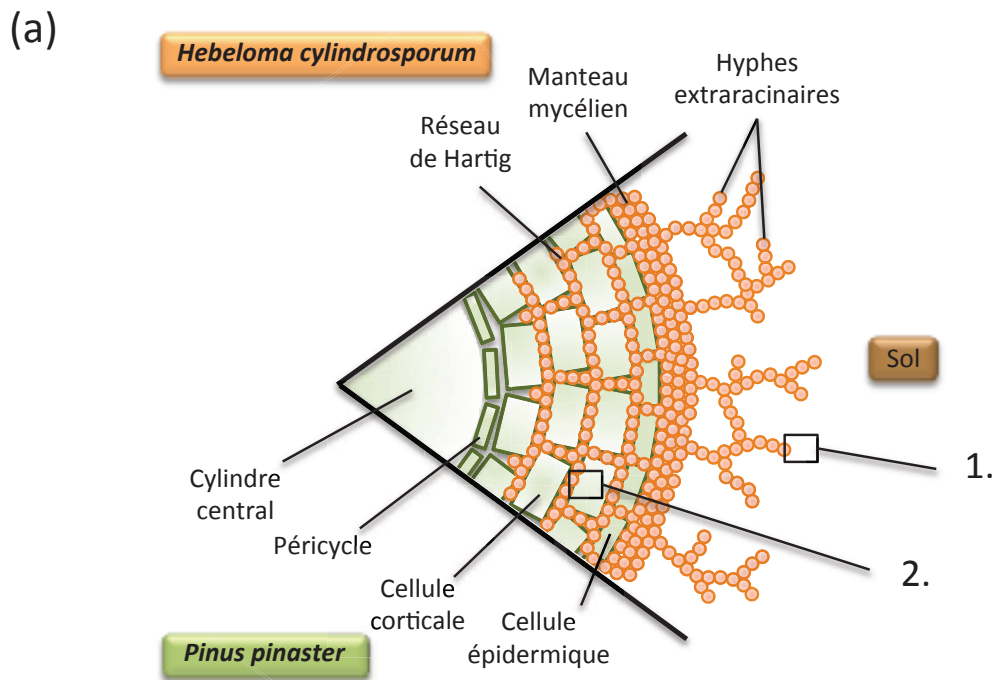


Figure 46: Schémas récapitulatifs du transport de potassium et de phosphate inorganique au sein de l'ectomycorhize formée entre *Pinus pinaster* et *Hebeloma cylindrosporium*.

(a) Schéma d'une section de coupe transversale de racine de *Pinus pinaster* mycorhizée par *Hebeloma cylindrosporium*. Le mycélium entoure la racine pour former le manteau puis forme le réseau de Hartig entre les cellules corticales. Les hyphes n'atteignent pas le péricycle, ni le cylindre central constitué des tissus vasculaires. (b) Détail des encadrés 1. et 2. de (a). La récupération du potassium du sol nécessite le transporteur *HcTrk1*, et son relargage dans l'apoplasme semble impliquer le canal *HcSKC*. *HcPT1.1* et *HcPT2* semblent impliqués dans la récupération du phosphate inorganique extérieur en condition carencée ou non, respectivement. Des études restent à mener pour déterminer l'implication des systèmes de transport fongique *HcTOK1/2/3*, *HcTrk2* et *HcHAK* dans le transport de potassium, ainsi que *HcPT1.2* dans le transport de phosphate inorganique. Il en va de même pour les systèmes de transport du côté de la plante hôte *Pinus pinaster*. *H.c.*: *Hebeloma cylindrosporium* ; *P.p.*: *Pinus pinaster*.

l'interface entre les deux partenaires. Les premiers systèmes de transport de K^+ identifiés chez *H. cylindrosporum* à partir d'une banque d'EST ont été le transporteur *HcTrk1* et le canal putatif *HcSKC* (Lambilliotte *et al.*, 2004; Corratgé *et al.*, 2007). Leur caractérisation fonctionnelle, toujours en cours pour *HcSKC*, leur localisation et leur fonction dans la symbiose par des stratégies de génétique inverse, ont permis d'établir que *HcTrk1* semblait être impliqué dans le prélèvement du K^+ extérieur, et *HcSKC* dans son transfert dans l'apoplasme (Figure 46). Les résultats obtenus à partir de la modification de l'expression de *HcTrk1* montrent cependant un impact mineur de cette protéine sur la nutrition potassique de la plante et suggèrent des mécanismes de régulation plus complexes. Plus précisément, sa surexpression entraîne probablement une expression ectopique de la protéine au niveau du réseau de Hartig qui va permettre à *H. cylindrosporum* de puiser le K^+ contenu dans l'apoplasme normalement dédié à la plante. *H. cylindrosporum* devient donc moins coopératif pour la plante lorsque le K^+ disponible est limitant. En utilisant des lignées RNAi pour *HcTrk1*, il s'est avéré qu'une plus grande concentration en K^+ était détectée dans le champignon en culture pure, mais que la nutrition potassique de la plante n'était pas affectée. Cette suraccumulation de K^+ dans le champignon peut en réalité être imputée à la forte surexpression d'un autre transporteur potassique putatif, *HcHAK*. L'expression de celui-ci est en effet fortement dépendante de la quantité de ressources en K^+ extérieure. Sa surexpression semble donc être la première adaptation moléculaire à la raréfaction du K^+ environnant. L'ensemble de ces données laisse donc penser que *HcTrk1* est bien impliqué dans la nutrition potassique d'*H. cylindrosporum*, mais que son action est étroitement liée à celle d'autres transporteurs d'absorption de K^+ tel que *HcHAK*.

Concernant *HcSKC*, sa caractérisation fonctionnelle n'est toujours pas effectuée malgré de nombreux essais en ovocytes et en levure. Les tentatives de caractérisation des deux protéines *HcSKC1* et *HcSKC2* de la souche h1 et de *LbSKC* de *L. bicolor* n'ont également pas abouti. Il a également été tenté en ovocyte une co-injection de *HcSKC* avec plusieurs protéines régulatrices de type sous-unités β d'*H. cylindrosporum*, sans succès. Enfin, l'ajout de protéine kinase A aux ovocytes n'a pas été plus concluant. A l'avenir, des tentatives de caractérisation fonctionnelle à l'aide d'autres systèmes hétérologues tels que *Escherichia coli*, des protoplastes de plantes ou des cellules animales pourraient être envisagées. Malgré cette absence de caractérisation de *HcSKC*, son homologie avec des canaux animaux sortants de type Shaker et sa localisation au niveau du réseau de Hartig dans la mycorhize laissent supposer que cette protéine pourrait être impliquée dans le relargage de K^+ dans l'apoplasme. De plus, les lignées RNAi présentent une concentration en K^+ plus

importante, indiquant une suraccumulation du K^+ à cause de la diminution de l'expression de *HcSKC*. De plus, ces lignées RNAi diminuent la teneur en K^+ dans les parties aériennes de *P. pinaster* en milieu riche, confortant le rôle possible de *HcSKC* dans le transfert du K^+ des cellules fongiques aux cellules végétales. Ce phénotype n'étant pas observé lorsque les plantes poussent en milieu carencé en K^+ , il se pourrait donc que d'autres canaux sortants soient impliqués dans le transfert de K^+ lorsque celui-ci devient limitant (Figure 46).

Bien qu'une étude approfondie ait été menée afin d'identifier le rôle potentiel des systèmes de transport *HcTrk1* et *HcSKC* dans la nutrition potassique ectomycorhize-dépendante de *P. pinaster*, leur contribution semble toute relative. L'analyse d'autres systèmes de transport d'*H. cylindrosporum* est donc nécessaire pour connaître l'ensemble de protéines régissant le transport du K^+ du sol au champignon, et du champignon à la plante lors de la symbiose ectomycorhizienne.

5.1.2 Implication de *HcPT1.1* et *HcPT2* dans le transfert de phosphore d'*Hebeloma cylindrosporum* à *Pinus pinaster*

La contribution de la symbiose mycorhizienne dans la nutrition phosphorée des plantes est très étudiée. Le P étant une ressource épuisable et à laquelle aucun substitut n'a été identifié, la nécessité d'économiser ce nutriment au cours de nos pratiques agricoles et agroforestières, notamment via l'utilisation de la symbiose mycorhizienne, est cruciale. Ainsi, la décortication des mécanismes de transport du P du sol aux végétaux en passant par les symbiontes fongiques est primordiale pour comprendre la nutrition phosphorée végétale mycorhize-dépendante.

Au cours de ce travail de doctorat, des outils moléculaires ont été générés afin d'étudier l'implication des transporteurs *HcPT1.1* et *HcPT2* d'*H. cylindrosporum* (Tatry *et al.*, 2009) dans la nutrition phosphatée de la plante hôte *P. pinaster*. Il a ainsi pu être montré que la surexpression de *HcPT1.1* observée en réponse à la carence en Pi était principalement liée à l'activité de son promoteur et non à des mécanismes post-transcriptionnels. De plus, les transcrits de ce transporteur ont été identifiés uniquement au niveau des hyphes extra-racinaires et du manteau mycélien. En revanche, la protéine a également été détectée au niveau du réseau de Hartig par immunolocalisation (Garcia *et al.*, 2013a). L'utilisation en co-cultures des lignées diminuant l'expression de *HcPT1.1*, ainsi que des lignées de surexpression obtenues (A. Becquer, communication personnelle), permettra d'évaluer l'importance de *HcPT1.1* dans la symbiose. Il se pourrait alors que le transporteur *HcPT1.1* intervienne dans la récupération du Pi en condition carencée, et éventuellement dans son

relargage dans l'apoplasme via une modification de son activité liée à un changement de gradient protonique (Cairney & Burke, 1996). Par ailleurs, l'analyse du promoteur de *HcPT1.1* est fortement envisagée afin de mettre en évidence les facteurs de transcription impliqués dans la surexpression de *HcPT1.1* lors d'une carence en Pi. Ceci permettra d'identifier les bases moléculaires nécessaires à *H. cylindrosporum* pour tolérer la raréfaction des ressources en Pi extérieures.

En ce qui concerne le transporteur *HcPT2*, il est possible que son implication dans la récupération du Pi contenu dans le milieu extérieur ne soit pas aussi importante que supposée par Tatry *et al.* (2009). En effet, des résultats préliminaires d'immunolocalisation concluent en la présence de la protéine *HcPT2* principalement dans le réseau de Hartig (A. Becquer résultats non publiés). De plus, la teneur en P total n'est pas modifiée chez des lignées RNAi dont l'expression de *HcPT2* est diminuée. Par dessus tout, l'utilisation de ces lignées RNAi en co-culture avec *P. pinaster*, mais sans contact physique, aboutit à une forte diminution (3,5 fois) de la quantité de Pi relargué dans le milieu en comparaison avec les lignées contrôles. L'ensemble de ces données laisse donc imaginer un rôle de *HcPT2* dans l'efflux de Pi vers la plante hôte. Des analyses complémentaires faisant intervenir la mesure de la quantité de P total dans les plantes mycorhizées avec ces lignées RNAi, ou la visualisation du transfert du P à l'aide de Pi marqué au ^{32}P sont nécessaires pour fournir des informations plus précises sur le rôle de *HcPT2* dans la symbiose. Par ailleurs, des champignons surexprimant *HcPT2* ont été récemment obtenus et sont également en cours d'analyse (A. Becquer, communication personnelle).

Des premiers éléments concernant l'implication des transporteurs *HcPT1.1* et *HcPT2* dans le transport de Pi dans le continuum sol-champignon-plante ont donc été fournis (Figure 46). Comme énoncé précédemment, des analyses plus approfondies sur leur implication réelle dans l'influx ou dans l'efflux de Pi sont à réaliser. Enfin, d'autres candidats potentiels devront également être étudiés afin d'apprécier l'éventail complet des systèmes de transport fongiques participant à la nutrition phosphatée de *P. pinaster*.

5.1.3 Interaction entre le potassium et le phosphore dans la symbiose ectomycorhizienne

Il a été décrit dans la littérature que le K^+ et le Pi semblent étroitement liés au cours de la symbiose ectomycorhizienne. Certains auteurs ont en effet décrit que ces deux nutriments pouvaient être co-localisés dans le mycélium (Wallander & Pallon, 2005). De plus, le K^+ est

considéré comme un contre-ion majeur des polyphosphates, assurant ainsi leur stabilité et contraignant le K^+ à se déplacer conjointement avec le Pi (Bücking & Heyser, 1999).

Au cours de ce travail, le lien entre le transport de K^+ et celui de Pi a aussi été souligné. En effet, la mycorhization de *P. pinaster* par des souches fongiques surexprimant le transporteur de K^+ *HcTrk1* conduit à une diminution de la teneur en K^+ et en P dans les parties aériennes des plantes poussant en milieu appauvri en K^+ . De plus, l'expression de *HcTrk1* est modifiée en milieu carencé en Pi. De la même manière, celle de *HcPT1.1* est affectée lorsque le champignon pousse en milieu pauvre en K^+ , soulignant d'un point de vue moléculaire l'interaction entre ces deux nutriments. Il semble donc s'avérer que le K^+ n'a pas seulement un rôle trophique dans la symbiose ectomycorhizienne, mais également une fonction dans la régulation du transfert du Pi, et pourquoi pas d'autres nutriments. Cela pourrait s'expliquer par l'action du K^+ sur l'équilibre du potentiel membranaire. Effectivement, son maintien est crucial pour l'activité des systèmes de transport afin de faire transiter les nutriments à travers la membrane plasmique. Des investigations futures portant sur la dissection précise des bases moléculaires responsables du transfert du Pi en relation avec le statut potassique du champignon pourraient être envisagées. En effet, il a été décrit que des espèces appartenant au genre *Rhizopogon* étaient hyper-accumulatrices de K^+ (Wallander & Pallon, 2005). Ainsi, l'étude de la nutrition potassique de *P. pinaster* et son impact sur la nutrition phosphorée pourrait aussi se faire grâce à l'utilisation d'un autre de ses symbiotes naturels, *R. roseolus*.

Ce qui serait également intéressant d'étudier à l'avenir, c'est l'expression de ces systèmes de transport de K^+ et de Pi en réponse à la disponibilité en carbone (C) provenant de la plante. Il pourrait alors être envisagé l'utilisation de plantes hôtes présentant un défaut d'éclaircissement afin d'altérer la nutrition carbonée du champignon. Ainsi, le niveau d'expression de ces systèmes de transport et la quantification du transfert des nutriments correspondants pourraient être déterminés, permettant ainsi de voir si la disponibilité en C impacte le transport de K^+ et de Pi du champignon à la plante.

5.2 De l'analyse génomique à l'identification de systèmes de transport de K^+ et de P chez *Hebeloma cylindrosporum*

Les progrès technologiques associés aux coûts de moins en moins élevés des techniques de séquençage ont permis ces dernières années l'obtention de génomes et de transcriptomes de plusieurs champignons mycorhiziens. Ces ressources disponibles pour la communauté scientifique concernée constituent un formidable outil pour l'identification de gènes impliqués dans la symbiose mycorhizienne. Ainsi, plusieurs gènes candidats pour le transport de K^+ et

de Pi ont été mis en évidence chez le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporum* et sont en cours d'analyse. Leur caractérisation fonctionnelle, leur localisation cellulaire et subcellulaire, et l'évaluation de leur implication dans la nutrition du champignon en culture pure, et de la plante hôte en condition symbiotique restent à réaliser. A terme, une vue d'ensemble des acteurs moléculaires fongiques nécessaires à la récupération de K⁺ et de Pi dans le sol, et à leur transfert aux cellules végétales sera alors possible (Figure 46).

5.2.1 Vers la caractérisation fonctionnelle de nouveaux systèmes de transport de potassium

5.2.1.1 Les transporteurs *HcTrk2* et *HcHAK*

L'annotation du génome d'*H. cylindrosporum* a permis de mettre en évidence deux nouveaux transporteurs putatifs de K⁺, *HcTrk2* et *HcHAK*. Les seules données présentées dans ce manuscrit concernent leur niveau d'expression chez les lignées transgéniques produites et le début de la caractérisation fonctionnelle d'*HcTrk2*. D'autres données préliminaires ont cependant été obtenues.

Bien que la protéine *HcTrk2* soit homologue à la protéine *HcTrk1*, elle ne partage que 35,7% d'identité en acides aminés. Ce pourcentage d'identité est beaucoup plus faible que celui existant entre *ScTrk1* et *ScTrk2* de *S. cerevisiae* (55%; Ko & Gaber, 1991). Ce faible pourcentage peut corroborer la différence d'activité observée chez chacun de ces transporteurs. En effet, *HcTrk1* a montré une plus forte affinité au Na⁺ qu'au K⁺ en système d'expression hétérologue, dans les ovocytes de xénope (Corratgé *et al.*, 2007), contrairement à *HcTrk2* qui serait plus perméable au K⁺. Cette perméabilité pour le K⁺ a été également observée chez des levures déficientes en systèmes de transport de K⁺ entrant (*Δtrk1Δtrk2*) complémentées par *HcTrk2* (A. Delteil, résultats non publiés). La poursuite de la caractérisation fonctionnelle de *HcTrk2* en ovocytes de xénopes est cependant nécessaire pour évaluer la sélectivité de ce transporteur. Des résultats préliminaires ont également été obtenus concernant la localisation des transcrits *HcTrk2* dans l'ectomycorhize par hybridation *in situ* (données non montrées). Ainsi, il apparaît que comme pour *HcTrk1*, les transcrits de *HcTrk2* ne présentent pas de localisation spécifique. Du signal est donc observé au niveau des hyphes extra-racinaires, du manteau mycélien et du réseau de Hartig de la mycorhize. Afin d'apprécier le rôle de *HcTrk2*, des vecteurs surexprimant ce gène ont été aussi obtenus et utilisés pour transformer *H. cylindrosporum*. Malheureusement, un seul transformant surexprimant moins de deux fois *HcTrk2* a été obtenu. Une autre transformation

d'*H. cylindrosporium* doit donc être réalisée pour augmenter le nombre de surexprimeurs, ce qui permettrait de commencer les analyses phénotypiques et les essais de mycorhization. Par ailleurs, le vecteur RNAi-Trk2 est toujours en cours de construction.

Concernant le transporteur putatif *HcHAK*, toutes les tentatives de caractérisation fonctionnelle en ovocyte de xénope et en levure ont échoué jusqu'à présent. Il est possible que *HcHAK* ne soit pas caractérisable dans ces organismes. En effet, plusieurs auteurs ont réussi la caractérisation de transporteurs de type KT/KUP/HAK de plantes dans des cellules d'*E. coli* déficientes en systèmes entrants de K^+ (Kim *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2004; Horie *et al.*, 2011). Il serait alors judicieux de tenter de caractériser *HcHAK* à l'aide d'*E. coli*. Comme précédemment énoncé dans le chapitre III, l'expression de *HcHAK* est induite dès 3 h de carence en K^+ . Ainsi, le transporteur putatif *HcHAK* est un candidat de choix dans l'étude de la réponse d'*H. cylindrosporium* à la carence en K^+ extérieur. Des vecteurs le surexprimant et le sous-exprimant (RNAi) ont donc été construits et le champignon a été transformé. Malheureusement, aucun transformant n'a poussé sur le milieu de sélection. On peut donc supposer que *HcHAK* est primordial dans l'homéostasie du K^+ chez *H. cylindrosporium*, et que la modification de son expression a un effet délétère sur la croissance du champignon. A l'avenir, il serait envisageable de faire de nouvelles Agrotransformations en utilisant un milieu de sélection plus ou moins riche en K^+ . Une autre solution encore plus intéressante serait de placer le gène *HcHAK* ou la cassette RNAi, non pas sous le contrôle d'un promoteur fort (*Pgpd*), mais sous le contrôle d'un promoteur inductible. Il faudrait alors chercher dans la littérature des promoteurs de ce type et les tester chez *H. cylindrosporium* en vérifiant que sa croissance n'est pas altérée par la molécule du milieu de culture qui servira d'inducteur. Si un tel système est généré, il sera judicieux à l'avenir d'utiliser uniquement des promoteurs inductibles afin d'éviter tout problème d'Agrotransformation. L'implication de *HcHAK* dans la nutrition potassique de la plante hôte *P. pinaster* sera également à investiguer une fois les transformants obtenus. Malgré le manque actuel d'outils moléculaires nécessaires à son étude approfondie, il apparaît que *HcHAK* semble jouer un rôle primordial dans l'adaptation d'*H. cylindrosporium* à la carence en K^+ et donc dans la tolérance de *P. pinaster* à ces conditions défavorables.

5.2.1.2 Les canaux *HcTOK1*, *HcTOK2.1* et *HcTOK2.2*

Trois nouveaux systèmes de transport du K^+ ont été identifiés à partir du génome d'*H. cylindrosporium*, les canaux *HcTOK1*, *HcTOK2.1* et *HcTOK2.2*. Ces trois protéines sont

apparentées aux canaux potassiques de type TOK identifiés pour la première fois chez la levure (Ketchum *et al.*, 1995). Plusieurs données ont d'ores et déjà été obtenues en ce qui concerne l'étude de ces trois canaux.

Leur caractérisation initiée dans l'équipe par expression en ovocytes de xénopes a montré que *HcTOK1* et *HcTOK2.1* sont perméables au K^+ (A. Delteil, résultats non publiés). D'importants courants potassiques sortants ont été observés pour ces deux canaux. Pour *HcTOK2.2*, sa fonctionnalité n'a pas encore été démontrée en système hétérologue. Au vu de leur fonction, il se pourrait qu'ils participent au relargage de K^+ dans l'apoplasme lors de l'interaction d'*H. cylindrosporum* avec la plante. Cependant, il se pourrait également qu'ils permettent le stockage de K^+ dans les vacuoles des cellules fongiques. Leur localisation subcellulaire par expression en levure permettrait de répondre à cette question. Des analyses du niveau d'expression de *HcTOK1* et *HcTOK2.1* en carence en K^+ ont montré qu'ils étaient induits après 24 h de culture du champignon en milieu pauvre (A. Delteil, résultats non publiés). Par ailleurs, la localisation des transcrits *HcTOK1* dans les hyphes extra-racinaires, le manteau mycélien et le réseau de Hartig de l'ectomycorhize formé par *P. pinaster* a été observé par hybridation *in situ* (encadrement d'un stagiaire; données non montrées). Nous avons également construit des vecteurs de fusion traductionnelle avec l'EGFP pour ces différents canaux, afin de localiser les protéines. Enfin, deux lignées d'*H. cylindrosporum* surexprimant *HcTOK1* et trois lignées RNAi ont été obtenues et vérifiées par RT-qPCR (données non montrées). Il va maintenant être nécessaire d'évaluer comment se comportent ces souches sous différentes conditions de culture, et déterminer leur teneur en K^+ afin de voir si la modification de l'expression de *HcTOK1* a une incidence sur la biologie du champignon. La mesure de la teneur en K^+ de plantes mycorhizées avec ces souches transgéniques nous donnera également des indications sur l'implication de ce canal sur la nutrition potassique de la plante à travers l'ectomycorhization. Enfin, des outils moléculaires restent à compléter pour l'ensemble de ces trois canaux. Ainsi, ces premières données laissent supposer que ces canaux pourraient être fortement impliqués dans le transfert de K^+ des cellules fongiques aux cellules végétales lors de la symbiose ectomycorhizienne.

5.2.2 Vers l'analyse des transporteurs de phosphore *HcPT1.2*, *HcSMT1* et *HcPTc*

Le séquençage du génome d'*H. cylindrosporum* nous a permis d'identifier trois transporteurs de P putatifs supplémentaires, *HcPT1.2*, *HcSMT1* et *HcPTc*. Tous les trois sont en cours de caractérisation fonctionnelle et leur rôle dans le transport de P en culture pure

d'*H. cylindrosporum* et en condition symbiotique avec *P. pinaster* est actuellement étudié (A. Becquer & C. Plassard, communication personnelle).

Comme énoncé au chapitre IV, le transporteur putatif *HcPT1.2* est un homologue de *HcPT1.1*. Contrairement à ce dernier dont l'expression est fortement induite lorsque le Pi devient limitant (Tatry *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013a), le niveau d'expression de *HcPT1.2* ne semble pas dépendant de la carence en Pi. Des analyses d'immunolocalisation dans l'ectomycorhize semblent même indiquer que les protéines *HcPT1.2* sont plus présentes dans les hyphes extra-racinaires et dans le manteau mycélien en présence de Pi plutôt qu'en absence (A. Becquer, résultats non publiés). Il se pourrait donc que le transporteur *HcPT1.2* participe au prélèvement de Pi du sol lorsque celui-ci est présent en plus forte concentration, et que *HcPT1.1* prenne le relai lorsque les ressources en Pi deviennent limitantes. Une stratégie susceptible d'affecter grandement la nutrition phosphatée du champignon par la diminution à la fois de l'expression de *HcPT1.1* et celle de *HcPT1.2*, est également en cours de production (A. Becquer, communication personnelle).

Le transporteur de Pi putatif *HcSMT1* nouvellement identifié présente des homologies avec la protéine *AtPHO1* d'*A. thaliana*. Cette dernière a été décrite pour la première fois comme étant un transporteur d'efflux de Pi (Poirier *et al.*, 1991). Il se pourrait donc qu'en condition symbiotique, *HcSMT1* soit impliqué dans le relargage de Pi dans l'apoplasme. La localisation est alors nécessaire afin de savoir si son expression dans l'ectomycorhize corrobore un éventuel rôle d'efflux de Pi vers la plante.

Le troisième système de transport putatif identifié est *HcPTc*. Ce dernier pourrait coder pour une protéine impliquée dans le transport de certaines formes de Po tel que le glycerophosphoinositol. De façon intéressante, Torres-Aquino (2003) a mesuré une grande quantité de glycerophosphoinositol dans le milieu de culture uniquement lorsque *H. cylindrosporum* est en condition symbiotique avec la plante. Il se pourrait donc que *HcPTc* participe à l'efflux de cette molécule et donc qu'une partie du P transféré dans l'apoplasme soit sous forme de Po qui sera ensuite converti en Pi par des phosphatases pariétales (A. Becquer & C. Plassard, communication personnelle). Une fois encore, l'obtention de données sur la localisation de *HcPTc* nous permettra d'aller dans le sens ou non cette hypothèse.

Pour résumer, il se pourrait donc que la nutrition phosphatée ectomycorhize-dépendante de *P. pinaster* fasse intervenir les transporteurs *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* pour le prélèvement de Pi en fonction de sa disponibilité, et les transporteurs *HcPT2*, *HcSMT1* et *HcPTc* pour le relargage de Pi et/ou de Po dans l'apoplasme. Des analyses plus poussées à travers la mise en œuvre de stratégies de génétique inverse, déjà commencés pour certains de

ces candidats, permettrait d'apporter une vue d'ensemble des acteurs moléculaires impliqués dans la nutrition phosphatée des plantes ligneuses ectomycorhizées.

5.3 Intégration du transportome ectomycorhizien dans l'adaptation des plantes aux stress environnementaux

Pour la plante, la conséquence principale de la symbiose mycorhizienne est l'amélioration de sa nutrition hydrominérale grâce à une plus grande accessibilité aux nutriments du sol. Cependant, de nombreux autres rôles de l'association mycorhizienne sur la résistance des végétaux aux stress biotiques ou abiotiques ont été décrits. Le pin maritime est principalement présent en France sur la côte Atlantique, dans la forêt des Landes. De par sa localisation géographique, *P. pinaster* est donc soumis à de nombreux stress environnementaux tels que la pauvreté en nutriment (Saur, 1989), la salinité des sols (Saur *et al.*, 1993) ou encore le manque d'eau (Guehl *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1999). L'impact de la symbiose ectomycorhizienne sur la tolérance à ces différentes formes de stress est encore mal connu, mais il est tout à fait concevable que l'amélioration de la nutrition de *P. pinaster* lui confère une meilleure résistance aux changements environnementaux. En effet, il a été décrit par exemple que l'amélioration de la nutrition potassique de la plante hôte, grâce à la symbiose mycorhizienne, a un effet bénéfique sur divers stress (Cf. 1.5). Ainsi, l'identification et la caractérisation du transportome favorisant le transfert de solutés du sol aux champignons ectomycorhiziens puis de ceux-ci aux plantes hôtes sont nécessaires pour appréhender ces questions.

Concernant la carence en ressources minérales, on a pu voir au cours de ce travail que la mycorhization de *P. pinaster* par *H. cylindrosporum* permettait à la plante une meilleure tolérance aux milieux pauvres en K^+ (Garcia *et al.*, 2013b). Plusieurs systèmes de transport potassiques candidats du champignon ont été identifiés par diverses analyses globales, et sont actuellement en cours d'étude. Des premières analyses ont montré que certains d'entre eux, notamment *HcHAK*, pourraient être impliqués dans la récupération du K^+ dans le sol lorsque celui-ci devient limitant. Par ailleurs, plusieurs transporteurs de phosphate ont aussi été identifiés chez *H. cylindrosporum*. Parmi ceux-ci, *HcPT1.1* est fortement induit en réponse à la carence en P_i externe (Tatry *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013a). Différents outils moléculaires ont été produits pour poursuivre son étude. Il se pourrait donc que ce transporteur soit fortement impliqué dans le prélèvement de P_i du sol en condition de carence. La mise en culture sur des milieux pauvres en K^+ ou en P_i de plantes inoculées par des souches transgéniques sur- ou sous-exprimant ces différentes protéines candidates permettrait

d'apporter de précieuses informations sur le rôle des ectomycorhizes dans l'apport de nutriments lorsque ceux-ci se raréfient. Plus généralement, ce type d'étude pourrait être appliqué à d'autres nutriments tel que l'azote, dont beaucoup de systèmes de transport ont déjà été décrits chez *H. cylindrosporum* (Müller *et al.*, 2007). La prochaine étape cruciale sera de mettre en évidence les systèmes de transport de *P. pinaster* nécessaires à la récupération du K^+ et du P_i , et d'identifier précisément ceux impliqués dans la symbiose ectomycorhizienne (Figure 46). Chez *P. sylvestris*, deux ESTs codant potentiellement pour des canaux de type GORK ou SKOR ont montré une forte surexpression en condition symbiotique avec divers champignons ectomycorhiziens (Martina Peter, communication personnelle). Des homologues de ces canaux chez *P. pinaster* pourrait donc être cherchés et étudiés afin de voir si leur expression est modifiée par la mycorhization avec *H. cylindrosporum*. Il serait également envisageable de changer de plante hôte et donc d'étudier ces protéines chez *P. sylvestris* au cours de l'inoculation par *H. cylindrosporum*. En outre, ces deux plantes hôtes présentent l'avantage d'être transformables génétiquement (Aronen *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2012), apportant ainsi des possibilités d'étude de protéines candidates par génétique inverse.

Plusieurs auteurs ont décrit une amélioration de la tolérance au stress salin lorsque les plantes étaient inoculées par des champignons endomycorhiziens à arbuscules (Cf. 1.5). Cette plus forte tolérance s'explique par le fait que l'apport en K^+ des champignons mycorhiziens va permettre au partenaire végétal une meilleure exclusion du Na^+ par rapport aux plantes non-inoculées. Ainsi la balance K^+ / Na^+ est modifiée et le Na^+ s'accumule moins dans les tissus de la plante mycorhizée. De plus, une équipe a montré chez le maïs que des protéines impliquées dans le transport de K^+ et dans le maintien de la balance K^+ / Na^+ étaient régulées au cours de la symbiose (Estrada *et al.*, 2013). Actuellement, très peu d'études portent sur le rôle la symbiose ectomycorhizienne dans l'adaptation des plantes ligneuses aux sols riches en sel (Bois *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant de voir si l'inoculation de *P. pinaster* par *H. cylindrosporum* améliore la tolérance de la plante à la salinité, et si les systèmes de transport fongiques de K^+ identifiés sont impliqués dans de tels mécanismes adaptatifs. Cela pourrait fournir les premières bases moléculaires expliquant le rôle de la symbiose ectomycorhizienne dans l'adaptation de *P. pinaster* au sol enrichi en sel par les embruns marins.

Le rôle de la nutrition potassique ectomycorhize-dépendante dans l'adaptation des plantes ligneuses aux contraintes hydriques est également inconnu à ce jour. Il a été montré chez des *Citrus tangerine* endomycorhizés que la tolérance au stress hydrique s'accompagnait d'une augmentation de la concentration en K^+ interne (Wu & Xia, 2006). Il serait donc

intéressant de voir si un tel phénomène est observable chez *P. pinaster* lorsqu'il est associé à *H. cylindrosporum* et si la mycorhization améliore son adaptation aux milieux pauvres en eau. Si tel est le cas, tout comme cité pour le stress salin, l'étude des systèmes de transport de K^+ potentiellement impliqués dans la résistance de *P. pinaster* serait alors envisageable. De plus, six gènes codant potentiellement pour des aquaporines ont été identifiés à partir du génome d'*H. cylindrosporum* (données non montrées). L'étude de leur expression en réponse à la disponibilité en K^+ , et de leur rôle dans le transfert d'eau du sol à la plante apporterait des données inédites sur la nutrition hydrique ectomycorhize-dépendante de *P. pinaster*.

Pour résumer, l'étude de la tolérance de *P. pinaster* aux sols riches en sels ou pauvres en nutriments et en eau, à travers l'intégration des systèmes de transport de K^+ et de P_i d'*H. cylindrosporum* décrits dans ce travail, pourrait apporter des perspectives nouvelles et pleinement intégrées dans les enjeux sociétaux actuels.

Bibliographie

A.

- Ahn SJ, Shin R, Schachtman DP. 2004.** Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiology* **134**: 1135-1145.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827.
- Ali MA, Louche J, Legname E, Duchemin M, Plassard C. 2009.** *Pinus pinaster* seedlings and their fungal symbionts show high plasticity in phosphorus acquisition in acidic soils. *Tree Physiology* **29**: 1587-1597.
- Alvarez JM, Cortizo M, Ordás RJ. 2012.** Characterization of a type-A response regulator differentially expressed during adventitious caulogenesis in *Pinus pinaster*. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1807-1814.
- Arino J, Ramos J, Sychrová H. 2010.** Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* **74**: 95-120.
- Aronen TS, Nikkanen TO, Häggman HM. 2003.** The production of transgenic Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) via the application of transformed pollen in controlled crossings. *Transgenic Research* **12**: 375-378.
- Arvieu JC, Leprince F, Plassard C. 2003.** Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Annals of Forest Science* **60**: 815-821.
- Ashford AE, Allaway WG. 2002.** The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* **244**: 177-187.

B.

- Balestrini R, Magurno F, Walker C, Lumini E, Bianciotto V. 2010.** Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 594-604.
- Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF. 2011.** The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1049-1060.
- Bañuelos MA, Madrid R, Rodríguez-Navarro A. 2000.** Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Molecular Microbiology* **37**: 671-679.
- Batjes NH. 1997.** A world data set of derived soil properties by FAO_UNESCO soil unit for global modeling. *Soil Use & Management* **13**: 9-16.
- Beimforde C, Schäfer N, Dörfelt H, Nascimbene PC, Singh H, Heinrichs J, Reitner J, Rana RS, Schmidt AR. 2011.** Ectomycorrhizas from a Lower Eocene angiosperm forest. *New Phytologist* **192**: 988-996.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Guinet F, Blaudez D, Chalot M. 2007.** Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytologist* **174**: 151-158.
- Berben G, Legrain M, Gilliquet V, Hilger F. 1990.** The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast* **6**: 451-454.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006.** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* **4**: e226.
- Bialeski RL. 1973.** Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology* **24**: 225-252.

- Bois G, Bigras FJ, Bertrand A, Piché Y, Fung MY, Khasa DP. 2006.** Ectomycorrhizal fungi affect the physiological responses of *Picea glauca* and *Pinus banksiana* seedlings exposed to a NaCl gradient. *Tree Physiology* **26**: 1185-1196.
- Bruns T, Shefferson RP. 2004.** Evolutionary studies of mycorrhizal fungi: milestones and future directions. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1122-1132.
- Bücking H, Heyser W. 1999.** Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi – an X-ray microanalytical study. *Mycological Research* **103**: 31-39.
- Bücking H, Kuhn AJ, Schröder WH, Heyser W. 2002.** The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *Journal of Experimental Botany* **53**: 1659-1669.
- Bücking H, Liepold E, Ambilwade P. 2012.** The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. In: Plant Science; Dhal NK and Sahu SC (eds.). Intech, ISBN 980-953-307-033-4.
- Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. 1991.** The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 3229-3238.

C.

- Cairney JWG, Burke RM. 1996.** Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **134**: 685–695.
- Casarin V, Plassard C, Hinsinger P, Arvieu JC. 2004.** Quantification of ectomycorrhizal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New Phytologist* **163**: 177-195.
- Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty PE, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, Brun A, Zimmermann S, Plassard C, Wipf D. 2013.** Biotrophic transportome in mutualistic plant fungal interactions. *Mycorrhiza* **23**: 597-625.
- Chakravarty P, Hwang SF. 1991.** Effects of ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*, on *Fusarium* damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. *European Journal of Forest Pathology* **21**: 97-106.
- Chen CR, Condrón LM, Davis MR, Sherlock RR. 2002.** Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology & Biochemistry* **34**: 487-499.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010.** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527-532.
- Chen X, Stone M, Schlagnhauser C, Romaine CP. 2000.** A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4510–4513.
- Clemmensen KE, Bahr A, Ovaskainen O, Dahlberg A, Ekblad A, Wallander H, Stenlid J, Finlay RD, Wardle DA, Lindahl BD. 2013.** Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* **339**: 1615-1618.
- Colpaert JV, van Assche JA. 1993.** The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* **123**: 325-333.
- Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Gay G, Marmeisse R. 2003.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the

symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters* **220**: 141-148.

- Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Pépin R, Marmeisse R, Gay G. 2004.** Nonmycorrhizal (myc-) mutants of *Hebeloma cylindrosporum* obtained through insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1029-1038.
- Corradi N, Bonfante P. 2012.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. *PLoS Pathogens* **8**: e1002600.
- Corratgé C. 2006.** Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'un transporteur de potassium chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. Thèse de doctorat, Université Montpellier II.
- Corratgé C, Zimmermann S, Lambilliotte R, Plassard C, Marmeisse R, Thibaud JB, Lacombe B, Sentenac H. 2007.** Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 26057-26066.
- Corratgé-Faillie C, Jabnour M, Zimmermann S, Véry AA, Fizames C, Sentenac H. 2010.** Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 2511-2532.
- Courty PE, Labbé J, Kohler A, Marçais B, Bastien C, Churin JL, Garbaye J, Le Tacon F. 2011.** Effect of poplar genotypes on mycorrhizal infection and secreted enzyme activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots. *Journal of Experimental Botany* **62**: 249-260.

D.

- Debaud JC, Gay G. 1987.** *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist* **105**: 429-435.
- Dennis RL. 1970.** A Middle Pennsylvanian basidiomycete mycelium with clamp connections. *Mycologia* **62**: 578-584.
- Devaraj S, Vega-López S, Kaul N, Schönlaue F, Rohdewald P, Jialal I. 2002.** Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* **37**: 931-934.
- Dreyer I, Uozumi N. 2011.** Potassium channels in plant cells. *The FEBS Journal* **278**: 4293-4303.
- Durell SR, Hao Y, Nakamura T, Bakker EP, Guy R. 1999.** Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. *Biophysical Journal* **77**: 775-788.

E.

- Estrada B, Aroca R, Maathuis FJ, Barea JM, Ruiz-Lozano JM. 2013.** Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. *Plant, Cell & Environment* **36**: 1771-1782.
- Ezawa T, Hayatsu M, Saito M. 2005.** A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1046-1053.

F.

- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Toby Kiers T, Bücking H. 2012.** Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **109**: 2666-2671.

- Fernandez M, Gil L, Pardos JA. 1999.** Response of *Pinus pinaster* Ait. provenances at early age to water supply. I. Water relation parameters. *Annals of Forest Science* **56**: 179-187.
- Finlay R, Read DJ. 1986.** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytologist* **103**: 157-165.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Górecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kües U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Dueñas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2012.** The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* **336**: 1715-1719.
- Formey D, Molès M, Haouy A, Savelli B, Bouchez O, Bécard G, Roux C. 2012.** Comparative analysis of mitochondrial genomes of *Rhizophagus irregularis* - syn. *Glomus irregulare* - reveals a polymorphism induced by variability generating elements. *New Phytologist* **196**: 1217-1227.
- G.**
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR. 1988.** *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **8**: 2848-2859.
- Garcia K, 2009.** Localisation des systèmes de transport membranaire impliqués dans la symbiose entre le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* et la plante hôte *Pinus pinaster*. Rapport de stage M1, Université Montpellier 2.
- Garcia K, Haider MZ, Delteil A, Corratgé-Faillie C, Conéjero G, Tatry MV, Becquer A, Amenc L, Sentenac H, Plassard C, Zimmermann S. 2013a.** Promoter-dependent expression of the fungal transporter HcPT1.1 under Pi shortage and its spatial localization in ectomycorrhiza. *Fungal Genetics and Biology* **58-59**: 53-61.
- Garcia K, Delteil A, Conéjero G, Becquer A, Plassard C, Sentenac H, Zimmermann S. 2013b.** Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of the *Hebeloma cylindrosporum* HcTrk1 transporter affects the translocation of both K⁺ and P in the host plant. *New Phytologist* (in press).
- Gobert A, Plassard C. 2007.** Kinetics of NO₃⁻ net fluxes in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association, as affected by the presence of NO₃⁻ and NH₄⁺. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1309-1319.
- Goto S, Sugiyama J, Hamamoto M, Komagata K. 1987.** *Saitoella*, a new anamorphic genus in the Cryptococcaceae to accommodate two Himalayan yeast isolates formerly identified as *Rhodotorula glutinis*. *The Journal of General & Applied Microbiology* **33**: 75-85.
- Gough C, Cullimore J. 2011.** Lipo-chitoooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 867-878.
- Gryta H, Debaud JC, Effosse A, Gay G, Marmeisse R. 1997.** Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology* **6**: 353-364.

Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P. 1994. Interactive effects of elevated CO₂ and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiology* **14**: 707-724.

H.

Haider MZ. 2011. Analysis of molecular mechanisms involved in exchange of nutrients between the fungus and the host plant within the ectomycorrhizal symbiosis. Thèse de doctorat, Montpellier SupAgro.

Haro R, Sainz L, Rubio F, Rodríguez-Navarro A. 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **31**: 511-520.

Harrison MJ, Van Buuren ML. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.

Hedrich R. 2012. Ion channels in plants. *Physiological Reviews* **92**: 1777-1811.

Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* **407**: 506-508.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547.

Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant & Soil* **237**: 173-195.

Horie T, Sugawara M, Okada T, Taira K, Kaothien-Nakayama P, Katsuhara M, Shinmyo A, Nakayama H. 2011. Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells. *Journal of Bioscience & Bioengineering*. **111**: 346-356.

Hulett FM. 1996. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **19**: 933-939.

J.

Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell & Environment* **30**: 310-322.

Jeanguenin. 2008. Rôle de la sous-unité Shaker AtKC1 dans le contrôle de la conductance potassique membranaire et dans la physiologie de la plante entière chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat, Montpellier SupAgro.

Jentschke G, Godbold DL. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* **109**: 107-116.

Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Godbold DL. 2001. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* **149**: 327-337.

Jones DL. 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant & Soil* **205**: 25-44.

K.

- Kaffman A, Rank NM, O'Neill EM, Huang LS, O'Shea EK. 1998.** The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**: 482-486.
- Kemppainen M, Circosta A, Tagu D, Martin F, Pardo AG. 2005.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* **16**: 19-22.
- Kemppainen M, Duplessis S, Martin F, Pardo AG. 2009.** RNA silencing in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. *Environmental Microbiology* **11**: 1878-1896.
- Kemppainen MJ, Pardo AG. 2010.** pHg/pSILBA γ vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: optimization of ihpRNA - triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology* **3**: 178-200.
- Kemppainen MJ, Pardo AG. 2011.** Transformation of the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioengineered Bugs* **2**: 38-44.
- Kemppainen MJ, Pardo, AG. 2013.** *LbNrt* RNA silencing in the mycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* reveals a nitrate-independent regulatory role for a eukaryotic NRT2-type nitrate transporter. *Environmental Microbiology Reports* **5**: 353-366.
- Kendrick B. 1991.** Fungal symbiosis and evolutionary innovations. In Margulis L, Fester R, (eds). *Symbiosis as a source of evolutionary innovations: Speciation and morphogenesis*. The MIT Press, Cambridge, USA, pp. 249-261.
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SAN. 1995.** A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**: 690-695.
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysse P, Jansa J, Bücking H. 2011.** Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* **333**: 880-882.
- Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, Schroeder JI. 1998.** AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *The Plant Cell* **10**: 51-62.
- Ko CH, Gaber, R.F. 1991.** *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **11**: 4266-4273.
- Komeili, O'Shea. 1999.** Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**: 977-980.

L.

- Lambers H, Shane MW. 2007.** Role of root clusters in phosphorus acquisition and increasing biological diversity in agriculture. In Spiertz JHJ, Struik PC, Van Laar HH, eds, *Scale and Complexity in Plant Systems Research: Gene-Plant-Crop Relations*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 237–250.
- Lambers H, Bishop JG, Hopper SD, Laliberté E, Zúñiga-Feest A. 2012.** Phosphorus-mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems. *Annals of Botany* **110**: 329-348.
- Lambilliotte R. 2004.** Développement d'outils et de ressources moléculaires pour l'utilisation de l'espèce *Hebeloma cylindrosporum* comme modèle d'étude de la symbiose ectomycorhizienne. Thèse de doctorat, Université Montpellier 2.
- Lambilliotte R, Cooke R, Samson D, Fizames C, Gaymard F, Plassard C, Tatry MV, Berger C, Laudie M, Legeai F, Karsenty E, Delseny M, Zimmermann S, Sentenac H. 2004.** Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum*

- paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **164**: 505-513.
- Lamhamedi MS, Fortin JA, Hope HH, Kropp BR. 1990.** Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus banksiana*. *New Phytologist* **115**: 689-697.
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N. 2001.** Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 248-254.
- Lee J, Young JP. 2009.** The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist* **183**: 200-211.
- LePage B, Currah R, Stockey R, Rothwell G. 1997.** Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. *American Journal of Botany* **84**: 410.
- LePage B, Beauchamp B, Pfefferkorn HW, Utting J. 2003.** Late early Permian plant fossils from the Canadian High Arctic: a rare paleoenvironmental/climatic window in northwest Pangea. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **191**: 345-372.
- LeTacon. 1985.** Les mycorhizes. *La Recherche* **166**.
- Li C, Gui S, Yang T, Walk T, Wang X, Liao H. 2012.** Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. *Annals of Botany* **109**: 275-285.
- Li J, Bao S, Zhang Y, Ma X, Mishra-Knyrim M, Sun J, Sa G, Shen X, Polle A, Chen S. 2012.** *Paxillus involutus* strains MAJ and NAU mediate K⁺/Na⁺ homeostasis in ectomycorrhizal *Populus x canescens* under sodium chloride stress. *Plant Physiology* **159**: 1771-1786.
- Lichtenberg-Frate H, Reid JD, Heyer M, Höfer M. 1996.** The *SpTRK* gene encodes a potassium-specific transport protein TKHp in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Membrane Biology* **152**: 169-181.
- López MF, Dietz S, Grunze N, Bloschies J, Weiss M, Nehls U. 2008.** The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae. *New Phytologist* **180**: 365-378.
- Loth-Pereda V, Orsini E, Courty PE, Lota F, Kohler A, Diss L, Blaudez D, Chalot M, Nehls U, Bucher M, Martin F. 2011.** Structure and expression profile of the phosphate Pht1 transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology* **156**: 2141-2154.
- Louche J, Ali MA, Cloutier-Hurteau B, Sauvage FX, Quiquampoix H, Plassard C. 2010.** Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 323-335.
- M.**
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martínez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J. 2011.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58-63.
- Maiti D, Toppo NN, Variar M. 2011.** Integration of crop rotation and arbuscular mycorrhiza (AM) inoculum application for enhancing AM activity to improve phosphorus nutrition and yield of upland rice (*Oryza sativa* L.). *Mycorrhiza* **21**: 659-667.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ. 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus*

- intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1140-1148.
- Mann BJ, Bowman BJ, Grotelueschen J, Metznerberg RL. 1989.** Nucleotide sequence of *pho-4+*, encoding a phosphate-repressible phosphate permease of *Neurospora crassa*. *Gene* **83**: 281-289.
- Mansouri-Bauly H, Sykorova Z, Scheerer U, Kopriva S. 2006.** Sulfur uptake in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* **16**: 421-427.
- Maresova L, Urbankova E, Gaskova D, Sychrova H. 2006.** Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Research* **6**: 1039-1046.
- Marmeisse R, Gay G, Debaud JC, Casselton LA. 1992.** Genetic transformation of the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *Current Genetics* **22**: 41-45.
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L, Debaud JC. 2004.** *Hebeloma cylindrosporium*—a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist* **163**: 481-498.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV. 2008.** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Martin F, Nehls U. 2009.** Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 508-515.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buee M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marcias B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P. 2010.** Périgord Black Truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**: 1033-1038.
- Martin F, Kohler. 2013.** The mycorrhizal symbiosis genomics. In: The ecological genomics of fungi; Marin F (ed). *John Wiley & Sons, Inc.* 168-189.
- Martinez P, Persson B. 1998.** Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* **258**: 628-638.
- Martinez-Garcia LB, Garcia K, Hammer EC, Vayssières A. 2013.** Mycorrhiza for all: an under-earth revolution. *New Phytologist* **198**: 652-655.

- Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo JM, Ge ZW, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ, Bougher NL, Hughes KW, Lodge DJ, Kerrigan RW, Seidl MT, Aanen DK, DeNitis M, Daniele GM, Desjardin DE, Kropp BR, Norvell LL, Parker A, Vellinga EC, Vilgalys R, Hibbett DS. 2006.** Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* **98**: 982-995.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R. 2009.** The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* **17**: 488-497.
- Melin E, Nilsson H. 1950.** Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiologia Plantarum* **3**: 88-92.
- Melville LH, Massicotte HB, Peterson RL. 1987.** Ontogeny of early stages of ectomycorrhizae synthesized between *Dryas integrifolia* and *Hebeloma cylindrosporum*. *Botanical Gazette* **148**: 332-341.
- Moukha S, Férandon C, Beroard E, Guinberteau J, Castandet B, Callac P, Creppy E, Barroso G. 2013.** A molecular contribution to the assessment of the *Tricholoma equestre* species complex. *Fungal Biology* **117**: 145-155.
- Mueller GM, Schmit JP, Leacock PR, Buyck B, Cifuentes J, Desjardin DE, Halling RE, Hjortstam K, Iturriaga T, Larsson KH, Lodge JD, May TW, Minter DW, Rajchenberg M, Redhead SA, Ryvardeen L, Trappe JM, Watling R, Wu Q. 2007.** Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation* **16**: 37-48.
- Müller T, Benjdia M, Avolio M, Voigt B, Menzel D, Pardo A, Frommer WB, Wipf D. 2006.** Functional expression of the green fluorescent protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* **16**: 437-442.
- Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M, Wipf D. 2007.** Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* **68**: 41-51.

N.

- Ngari C, Combier JP, Doré J, Marmeisse R, Gay G, Melayah D. 2009.** The dominant *Hc.SdhR* carboxin-resistance gene of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* as a selectable marker for transformation. *Current Genetics* **55**: 223-231.
- Nishida H, Hamamoto M, Sugiyama J. 2011.** Draft genome sequencing of the enigmatic yeast *Saitoella complicata*. *The Journal of General & Applied Microbiology* **57**: 243-246.
- Nishioka K, Hidaka T, Nakamura S, Umemura T, Jitsuiki D, Soga J, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. 2007.** Pycnogenol, French maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* **30**: 775-780.
- Nygren CM, Rosling A. 2009.** Localisation of phosphomonoesterase activity in ectomycorrhizal fungi grown on different phosphorus sources. *Mycorrhiza* **19**: 197-204.

O.

- Ogawa N, Oshima Y. 1990.** Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **10**: 2224-2236.

Oh KI, Melville LH, Peterson RL. 1995. Comparative structural study of *Quercus serrata* and *Q. acutissima* formed by *Pisolithus tinctorius* and *Hebeloma cylindrosporum*. *Trees* **3**: 171–179.

P.

Paiva JA, Garnier-Géré PH, Rodrigues JC, Alves A, Santos S, Graça J, Le Provost G, Chaumeil G, Da Silva-Perez D, Bosc A, Fevereiro P, Plomion C. 2008. Plasticity of maritime pine (*Pinus pinaster*) wood-forming tissues during a growing season. *New Phytologist* **179**: 1080-1094.

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

Paszkowski U, Jakovleva L, Boller T. 2006. Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Journal* **47**: 165-173.

Pelin A, Pombert JF, Salvioli A, Bonen L, Bonfante P, Corradi N. 2012. The mitochondrial genome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* reveals two unsuspected trans-splicing events of group I introns. *New Phytologist* **194**: 836-845.

Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* **16**: 442-450.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45.

Plassard C, Barry D, Eltrop L, Mousain D. 1994. Nitrate uptake in maritime pine (*Pinus pinaster*) and the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*: effect of ectomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* **72**: 189-197.

Plassard C, Dell B. 2010. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology* **30**: 1129-1139.

Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* **21**: 1197-1203.

Plett JM, Martin F. 2012. Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 12-15.

Porier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J. 1991. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology* **97**: 1087-1093.

Prista C, González-Hernández JC, Ramos J, Loureiro-Dias MC. 2007. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **153**: 3034-3043.

Prole DL, Taylor CW. 2012. Identification and analysis of cation channel homologues in human pathogenic fungi. *PLoS One* **7**: e42404.

R.

Rekangalt D, Verner MC, Kües U, Walser PJ, Marmeisse R, Debaud JC, Fraissinet-Tachet L. 2007. Green fluorescent protein expression in the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters* **268**: 67–72.

Remy E, Cabrito TR, Batista RA, Teixeira MC, Sá-Correia I, Duque P. 2012. The Pht1;9 and Pht1;8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the *Arabidopsis thaliana* root during phosphorus starvation. *New Phytologist* **195**: 356-371.

Rennenberg H, Herschbach C. 2013. Phosphorus nutrition of woody plants: many questions - few answers. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* **15**: 785-788.

- Rhodes CJ. 2013.** Peak phosphorus - peak food? The need to close the phosphorus cycle. *Science Progress* **96**: 109-152.
- Richardson AE, Simpson RJ. 2011.** Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology* **156**: 989-996.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. 2008.** Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* **33**: 1-45.
- Rineau F, Garbaye J, 2009.** Does forest liming impact the enzymatic profiles of ectomycorrhizal communities through specialized fungal symbionts? *Mycorrhiza* **19**: 493-500.
- Rineau F, Garbaye J. 2010.** Effects of liming on potential oxalate secretion and iron chelation of beech ectomycorrhizal root tips. *Microbial Ecology* **60**: 331-339.
- Rineau F, Rose C, Le Thiec D, Garbaye J. 2010.** Liming in a beech forest results in more mineral elements stored in the mantle of *Lactarius subdulcis* ectomycorrhizas. *Fungal Biology* **114**: 1007-1014.
- Rineau F, Roth D, Shah F, Smits M, Johansson T, Canbäck B, Olsen PB, Persson P, Grell MN, Lindquist E, Grigoriev IV, Lange L, Tunlid A. 2012.** The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. *Environmental Microbiology* **14**: 1477-1487.
- Roberts SK. 2003.** TOK homologue in *Neurospora crassa*: first cloning and functional characterization of an ion channel in a filamentous fungus. *Eukaryotic Cell* **2**: 181-190.
- Rubio F, Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V. 2008.** Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* **134**: 598-608.
- Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V. 2010.** Studies on *Arabidopsis athak5, atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K uptake. *Physiologia Plantarum* **139**: 220-228.

S.

- Sanchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodriguez N, Gonzalez-Murua C, Ortega U, Alonso-Graña M, Arana O, Duñabeitia MK. 2013.** Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza* doi: 10.1007/s00572-013-0500-4.
- Saur E. 1989.** Alimentation oligo-minérale du Pin maritime (*Pinus pinaster* Soland in Ait) en relation avec quelques caractéristiques physico-chimiques des sols sableux des Landes de Gascogne. *Annals of Forest Science* **46**: 119-129.
- Saur E, Rotival N, Lambrot C, Trichet P. 1993.** Dépérissement du pin maritime en Vendée. Résistance au chlorure de sodium de 3 provenances géographiques dans différentes conditions édaphiques. *Annals of Forest Science* **50**: 389-399.
- Selosse MA. 2000.** La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif. Vuibert, Paris: Academic Press.
- Sharma T, Dreyer I, Riedelsberger J. 2013.** The role of K⁺ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **4**: 224.
- Simard SW, Jones DM, Durall DM. 2002.** Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden MGA, Sanders I, (eds). *Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies. Vol 157.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 33-74.

- Smith SE, Read DJ. 2008.** Mycorrhizal symbiosis (3rd edition). New York, NY, USA: Academic Press.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. 2005.** Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Molecular Microbiology* **56**: 1373-1385.
- Soldatenkov VA, Velasco JA, Dritschilo A, Notario V. 1995.** Isolation and characterization of SpTRK, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K⁺ transporter protein. *Gene* **161**: 97-101.
- Ström L, Owen AG, Godbold DL, Jones DL. 2005.** Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 2046-2054.

T.

- Tatry MV, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, Van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H, Plassard C. 2009.** Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant Journal* **57**: 1092-1102.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010.** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**: 217-263.
- Tibbett M, Sanders FE, Cairney JWG. 1998.** The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma spp.* in axenic culture. *Mycological Research* **102**: 129-135.
- Tinker PB, Nye PH. 2000.** Solute movement in the rhizosphere. New York: Oxford University Press.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JP, Gianinazzi-Pearson V, Martin F. 2012.** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* **193**: 755-769.
- Torres YP, Morera FJ, Carvacho I, Latorre R. 2007.** A marriage of convenience: beta-subunits and voltage-dependent K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 24485-24489.
- Torres-Aquino. 2003.** Approches physiologiques du rôle du partenaire fongique sur l'accumulation et le transfert de P vers la plante hôte dans la symbiose ectomycorhizienne modèle *Hebeloma cylindrosporum/Pinus pinaster*. Thèse de doctorat, Université Montpellier II.
- Torriani-Gorini A. 1994.** Introduction: the Pho regulon of *Escherichia coli*. In Phosphate in Microorganisms. Torriani- Gorini, A., Yagil, E., and Silver, S. (eds). Washington: American Society for Microbiology Press, pp. 1-4.

V.

- Venkateshwaran M, Volkening JD, Sussman MR, Ané JM. 2013.** Symbiosis and the social network of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 118-127.

- Verbruggen E, van der Heijden MG, Rillig MC, Kiers ET. 2013.** Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytologist* **197**: 1104-1109.
- Versaw WK. 1995.** A phosphate-repressible, high-affinity phosphate permease is encoded by the *pho-5+* gene of *Neurospora crassa*. *Gene* **153**: 135-139.
- Villalobos DP, Díaz-Moreno SM, Said el-SS, Cañas RA, Osuna D, Van Kerckhoven SH, Bautista R, Claros MG, Cánovas FM, Cantón FR. 2012.** Reprogramming of gene expression during compression wood formation in pine: coordinated modulation of S-adenosylmethionine, lignin and lignan related genes. *BMC Plant Biology* **12**: 100.

W.

- Wallander H, Pallon J. 2005.** Temporal changes in the elemental composition of *Rhizopogon* rhizomorphs during colonization of patches with fresh organic matter or acid-washed sand. *Mycologia* **97**: 295-303.
- Wang B, Qiu YL. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299-363.
- Wardle DA, Walker LR, Bardgett RD. 2004.** Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. *Science* **305**: 509-513.
- Wipf D, Benjdia M, Rikirsch E, Zimmermann S, Tegeder M, Frommer WB. 2003.** An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Genome* **46**: 177-181.
- Wolfe BE, Kuo M, Pringle A. 2012.** *Amanita thiersii* is a saprotrophic fungus expanding its range in the United States. *Mycologia* **104**: 22-33.
- Wong KKY, Fortin JA. 1989.** A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* **67**: 1713-1716.
- Wu B, Maruyama H, Teramoto M, Hogetsu T. 2012.** Structural and functional interactions between extraradical mycelia of ectomycorrhizal *Pisolithus* isolates. *New Phytologist* **194**: 1070-1078.
- Wu QS, Xia RX. 2006.** Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology* **163**: 417-425.

Y.

- Yang SY, Paszkowski U. 2011.** Phosphate import at the arbuscule: just a nutrient? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 1296-1299.

Z.

- Zadworny M, Górski Z, Koczorowska E, Werner A. 2008.** Conidia of *Trichoderma virens* as a phosphorus source for mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* **19**: 61-66.

Annexes

Annexe 1: Rapport de congrès

Mycorrhiza for all: an under-earth revolution

Martinez-Garcia LB, Garcia K, Hammer EC, Vaissières A

New Phytologist (2013) 198: 652-655

Le rapport de congrès ci-après résume les principaux résultats présentés à la septième édition du cycle de conférences internationales portant sur les mycorhizes (International Conference On Mycorrhiza, ICOM7) qui s'est tenue du 6 au 11 janvier 2013 à New Delhi en Inde. A la suite de ce congrès au cours duquel j'ai pu exposer mon travail lors d'une présentation orale, j'ai été invité par Francis Martin (éditeur au *New Phytologist*) à participer à la rédaction du rapport officiel.



Meetings

Mycorrhiza for all: an under-earth revolution

7th International Conference on Mycorrhiza, in New Delhi, India, January 2013

In recent years, mycorrhizal research has undergone rapid expansion. Breakthroughs in genomics and other modern techniques have allowed us to break new ground in multiple domains, such as evolution, physiology, function, community patterns and biogeography of mycorrhizal fungi. The International Conference on Mycorrhiza (ICOM) is the most important platform for mycorrhizal scientists to present and discuss their work in both theoretical and applied areas of mycorrhizal symbiosis. ICOM 7 was held in New Delhi (India), January 6–11, 2013, and attracted over 400 participants from 48 countries. The theme of the conference was 'Mycorrhiza for All: An Under-Earth Revolution', stressing the importance of addressing scientific findings within an applied context to strengthen field implementations and improve sustainable agriculture (Fig. 1). It addressed the urgent need to apply mycorrhizal research to the environmental crises that threatens our planet.

From genomic to functional analysis

The last 10 yr have seen substantial increases in the genomic understanding of plants, including the pioneering full genomes of

Populus trichocarpa and *Medicago truncatula* (Tuskan *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2011). ICOM 7 highlighted parallel developments in the belowground partners in the mycorrhizal symbiosis. In particular, Francis Martin (INRA, France) accentuated the rapid expansion of complete genome decipherments for mycorrhizal fungi following the first genome sequences of *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008) and *Tuber melanosporum* (Martin *et al.*, 2010). Identification of the genomic features that distinguish ectomycorrhizal (ECM) fungi from other mycorrhizal associations, such as ericoid and orchid mycorrhizas, and from parasitic or saprotrophic fungi will help to shed light on the evolution of the mycorrhizal symbiosis.

'Reciprocal rewards stabilize the cooperation between plants and mycorrhizal fungi in order to avoid cheaters and less cooperative partners.'

These genomic data together with the recent transcriptomic analysis of *Glomus intraradices* (Tisserant *et al.*, 2012), provide fundamental resources for physiological and functional research on symbiotic developmental and metabolic pathways. Natalia Requena (KIT, Germany) presented recent research on the mechanisms influencing plant–fungus recognition. She showed how *G. intraradices* secretes a protein, SP7, which counteracts plant immune program, consequently benefiting arbuscular mycorrhizal (AM) fungi colonization (Kloppholz *et al.*, 2011). She also highlighted the role of the sugar transporter MST2 of *G. intraradices* in arbuscule formation (Helber *et al.*, 2011). Similarly, Luisa Lanfranco (University of Turin, Italy) explored the molecular signals controlling the fungal morphogenesis via the analysis of *G. intraradices* NOX NADPH oxidase genes. Regarding the ECM symbiosis, Anders Tunlid (Lund University, Sweden) used spectroscopic analyses and transcriptome profiling to examine the mechanism by which the ECM fungus *Paxillus involutus* degrades organic matter when acquiring nitrogen (N) from plant litter. He observed that this fungus secretes similar enzymes to those involved in brown-rot fungi Fenton oxidative degradation (Rineau *et al.*, 2012). Additionally, François Buscot (UFZ, Germany) investigated gene expression patterns linked to resources allocation processes in a multitrophic system formed by oak roots, the ECM fungus *Piloderma croceum* and the root pathogen *Phytophthora quercina*. This emerging knowledge emphasizes the power of genomic data for understanding the establishment, durability and functionality of mycorrhizal symbioses.



Fig. 1 ICOM 7 logo: 'Mycorrhiza for All: An Under-Earth Revolution.' It reflects the relevance of mycorrhizal research today. 'The banyan tree is of extreme importance to the cultural heritage and legacy of India for ages. Its roots are mycorrhized by golden honey dew drops resembling mycorrhizal spores ... prove to be the epicenter of a new revolution of which our planet is in dire need' (ICOM 7 organizers; TERI, New Delhi, India).

Nutrient trade terms

A central and re-occurring topic at ICOM 7 was the balance of reciprocal rewards ('tit for tat' principle) in mycorrhizal symbioses and the role of each partner in the establishment and transfer of nutrients across the soil–fungus–plant continuum. Recent research findings show that both-sided control of nutrient transfer exists between plant carbon (C) and fungal phosphorus (P; Lekberg *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2011; Kiers *et al.*, 2011) or N (Fellbaum *et al.*, 2012), regulating the choice of partner and maintenance of evolutionary stability in AM symbiosis. In accordance with these results, Toby Kiers (Institute of Ecological Science, the Netherlands) presented this 'fair trade' system as a key evolutionary element. Reciprocal rewards stabilize the cooperation between plants and mycorrhizal fungi in order to avoid cheaters and less cooperative partners. Opposing this general theory, Pierre-Emmanuel Courty (University of Basel, Switzerland) indicated that there might be situations where investment and rewards are not directly correlated (Walder *et al.*, 2012). Several presenters emphasized the additional complexity of reciprocal rewards in nutrient exchanges in natural communities connected by a common mycorrhizal network (CMN). Heike Bücking (South Dakota State University, Brookings, SD, USA) used shaded plants to manipulate the C strength, that is amount of C that is available to the plant for investments, while Edith Hammer (FU Berlin, Germany) used plants of different ages to measure nutrient allocation to CMN members investing different amounts of C into the mycelium network. Both conclude that C strength determines the plant's access to nutrients in the CMN. However, Hammer and Marcel van der Heijden (Agroscope, Switzerland) pointed out that health status of the older plant, different species identity and adult-seedling species combinations can lead to outcomes differing from growth enhancement to strong repression of young plants. A situation where the 'tit for tat' principle is clearly undermined is in mycoheterotrophy. Duncan Cameron (University of Sheffield, UK) and Lee Taylor (University of Alaska, Fairbanks, AL, USA) both presented evidence that the parasitic C transfer to heterotrophic orchids occurs via N-compounds, most likely glutamine.

Regarding nutrient exchange in the mycorrhizal symbiosis, it has been assumed that sucrose is released into the mycorrhizal apoplasm and converted into glucose and fructose that are in turn assimilated by the fungus via transporters. However most of the molecular mechanisms involved in nutrient exchange are yet to be elucidated. Philipp Franken (IGZ, Germany) presented P- and C-transporter mutants that can help to clarify these gaps. Examining ectomycorrhizas, Uwe Nehls (University of Bremen, Germany) showed that a family of plant glucose facilitator genes (coding for SWEET proteins: Chen *et al.*, 2010) is expressed during ECM formation. Consequently, it appears that this hexose could be the most important direct C source for the fungal partner in ECM. These findings support the concept that nutrients are main regulators of the mycorrhizal symbiosis in general, driving partner selection and the stability of the mutualism.

Population and community ecology

Identifying the drivers that structure mycorrhizal communities and populations was one of the hot topics during the conference. Many speakers highlighted the importance of biotic (host species) and abiotic (soil chemistry, rainfall, temperature) factors structuring mycorrhizal fungal communities. Nancy Johnson (North Arizona University, Flagstaff, AZ, USA) remarked that multiple-metrics experiments are necessary to characterize fungal communities. Further, Thorunn Helgason (University of York, UK) emphasized the need to consider temporal and environmental variation in designing sampling strategies for biogeography studies.

While several studies on fungal communities have rejected the Baas Becking hypothesis: 'Everything is everywhere, but the environment selects' (Taylor *et al.*, 2006; Peay *et al.*, 2007), Christina Hazard (University of Aberdeen, UK) presented results in an Ireland-based study suggesting that the Baas Becking hypothesis may be supported for AM fungi at a regional scale. From a broader scale, Leho Tedersoo (University of Tartu, Estonia) and Nadia Soudzilovskaia (VU-University of Amsterdam, the Netherlands) contributed to the mycorrhizal global distribution map (Read, 1991) forming novel hypotheses to explain mycorrhizal biogeography. From a community composition perspective, Tedersoo showed that host family strongly determines the phylogenetic structure of ECM fungi communities (Tedersoo *et al.*, 2012). Taking a morphological approach, Soudzilovskaia showed that soil fertility and pH determined mycorrhizal infection. She observed that harsh environment relates with major mycorrhizal infection.

Most of the studies focused on either AM or ECM fungi, however, the mycorrhizal dominant type in an ecosystem is not a static feature but one that changes with time. To understand mycorrhizal type transitions it is necessary to understand their ecosystem functions. Ian Dickie (Landcare Research, Lincoln, New Zealand) tested several accepted opinions on functional differences between ECM and AM fungi and he concluded that some major concepts need to be re-examined, such as differences in mineral weathering, belowground feedback and foliar traits (Koele *et al.*, 2012). Over a geological timescale, Jonathan Leake (University of Sheffield, UK) showed that from an evolutionary point of view the weathering function of mycorrhizas increases from AM to ECM and from gymnosperms to angiosperms, accelerating global biogeochemical cycles (Quirk *et al.*, 2012). Both speakers highlighted the important role of mycorrhiza on geochemical cycles as ecosystems drivers (Orwin *et al.*, 2011).

The use of high-throughput sequencing techniques was a common methodology in many community studies. Novel techniques such as restriction-site DNA (RDA) and molecule real-time (SMRT) sequencing will contribute to more detailed information on AM fungal assemblages. The use of such techniques in AM studies continues adding information to the knowledge of AM fungal genetic diversity and therefore the Glomeromycota taxonomy is in a continuous state of change. One example was the suggestion of a major revision of Oehl *et al.* (2011) taxonomy proposed by Arthur Schüßler (University Munich, Germany). At the same time, the increased use of the MaarjAM database for

AM fungi environmental studies brings an alternative to the traditional nomenclature using the virtual taxa (VT) nomenclature (Opik *et al.*, 2010), that could help to solve the controversy in the Glomeromycota taxonomy.

Human use of mycorrhiza

Over-exploitation of natural resources and misuse of technological development have caused an environmental crisis with serious consequences for agronomic services (Tilman *et al.*, 2002). ICOM 7 accentuated the applied aspects of mycorrhizal research. André Fortin (University of Laval, Quebec, Canada), Joyce M. Jefwa (CIAT, Nairobi, Kenya), and Alok Adholeya (TERI, New Delhi, India) presented progress in inoculum production and application that promote sustainable agriculture and rebuild soil biota. They highlighted the importance of isolating mycorrhizal strains with selected traits and functions, as well as the importance of producing inoculum compatible with conventional agricultural practices. Martina Janouskova (IEB, Prague, Czech Republic) emphasized the necessity to investigate the competitive performance and persistence of the inoculum, when applied to natural soils, with the existing AMF community. Presenters described current research programs that apply different types of mycorrhizal fungi; such as ECM fungi for forests conservation, AM fungi to tropical reforestation and Sebaciniales fungi, which also form orchid mycorrhiza, to increase switchgrass production. Another potential application presented by Mohamed Hijri (University of Montreal, Canada) was the use of AM inoculum as biological control organisms for pathogens. Speakers also highlighted the importance of considering the impact of agricultural practices on the native mycorrhizal community to achieve successful land management practices. In this context, Luise Olbrecht (Agroscope, Switzerland) showed that soil tillage drastically changes AM fungal communities with direct consequences on plant communities and nutrient leaching losses. Many speakers addressed environmental applications, looking at the effects of mycorrhizal fungi on plant growth under harsh conditions, and their utility in phytoremediation of polluted soils. Contributing to this research field, John Klironomos (University of Guelph, Canada) stressed that one of the major benefits of mycorrhizal symbiosis to plants is the increase of host niche size and therefore mycorrhizal fungi might favor plants growing under stressful conditions and in variable environments. Applied knowledge of mycorrhizas is of worldwide interest because it addresses the current urgency to develop methods that guarantee world food supply and ecosystems conservation.

Future directions

Mycorrhizal science is progressing quickly. When we look back at previous ICOMs, we observed that ICOM 5 (2006, Granada) represented a turning point, as Selosse & Duplessis (2006) highlighted in ICOM 5 report section titled 'The dawn of genomics in the mycorrhizal world'. It is encouraging to see how genomics has helped to clarify previous gaps, such as molecular mechanisms on the plant–fungal interface, evolution or biogeography.

New Phytologist (2013) 198: 652–655
www.newphytologist.com

Two of the emerging research areas from ICOM 7 were the functioning of mycorrhizas in biogeochemical cycles (cf. Näsholm *et al.*, 2013) and the complexity of multitrophic interactions in the rhizosphere. Addressing these questions requires an integration of disciplines such as chemistry, geology and pedobiology with more traditional mycorrhizal disciplines such as ecology, physiology and mycology. We believe that the theme of the next ICOM (ICOM 8) 'Mycorrhizal Integration across Continents and Scales', to be held in Flagstaff (Arizona, USA), August 26–31, 2015, will provide a perfect framework for discussions towards this end.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Energy and Resources Institute (TERI) and the International Mycorrhiza Society for organizing the conference. They also thank all the attendees who contributed with talks and posters and provided a stimulating forum including, and especially those whose names are not mentioned here due to space constraints. The authors thank F. Martin, I. Dickie and S. Hortal for helpful comments on the report. L.B.M.-G. acknowledges core funding for Crown Research Institutes from the New Zealand Ministry of Business, Innovation and Employment's Science and Innovation Group through the Landcare Research Hayward Post-doctoral Fellowship. E.C.H. acknowledges the Marie Curie post-doctoral fellowship NANOSOIL, and K.G., the French Minister of Research and Technology. A.V.'s laboratory is supported by the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01).

Laura B. Martinez-Garcia^{1*}, **Kevin Garcia**², **Edith C. Hammer**³
and **Alice Vayssières**⁴

¹Ecosystems and Global Change, Landcare Research, PO Box 40, Lincoln, 7608, New Zealand;

²Unité de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, SupAgro, IBIP – Bât. 7 – 2 place Pierre Viala, 34060, Montpellier, France;

³Plant Ecology, Freie Universität Berlin, Altensteinstr. 6, 14195, Berlin, Germany;

⁴Interactions Arbres/Micro-organismes, UMR 1136 INRA, Université de Lorraine, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre INRA de Nancy, 54280, Champenoux, France

(*Author for correspondence: tel +64 3 321 9999; email laurabeatrizmartinez@gmail.com)

References

- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B *et al.* 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527–532.
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bucking H. 2012. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: 2666–2671.
- Hammer EC, Pallon J, Wallander H, Olsson PA. 2011. Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability *FEMS Microbiology Ecology* 76: 236–244.

© 2013 The Authors
New Phytologist © 2013 New Phytologist Trust

- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23: 3812–3823.
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A *et al.* 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–882.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 21: 1204–1209.
- Koele N, Dickie IA, Oleksyn J, Richardson SJ, Reich PB. 2012. No globally consistent effect of ectomycorrhizal status on foliar traits. *New Phytologist* 196: 845–852.
- Lekberg Y, Hammer EC, Olsson PA. 2010. Plants as resource islands and storage units – adopting the myco-centric view of arbuscular mycorrhizal networks. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 336–345.
- Martin F, Aerts A, Ahren D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V *et al.* 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88–92.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R *et al.* 2010. Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033–1038.
- Näsholm T, Högborg P, Franklin O, Metcalfe D, Keel SG, Campbell C, Hurry V, Linder S, Högborg MN. 2013. Are ectomycorrhizal fungi alleviating or aggravating nitrogen limitation of tree growth in boreal forests? *New Phytologist* 198: 214–221.
- Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, Ineichen K, Alves da Silva G. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2: 191–199.
- Opik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U, Zobel M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188: 223–241.
- Orwin KH, Kirschbaum MUF, St John MG, Dickie IA. 2011. Organic nutrient uptake by mycorrhizal fungi enhances ecosystem carbon storage: a model-based assessment. *Ecology Letters* 14: 493–502.
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE, Garbelotto M. 2007. A strong species–area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 10: 470–480.
- Quirk J, Beerling DJ, Banwart SA, Kakonyi G, Romero-Gonzalez ME, Leake JR. 2012. Evolution of trees and mycorrhizal fungi intensifies silicate mineral weathering. *Biology Letters* 8: 1006–1011.
- Read DJ. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376–391.
- Rineau F, Roth D, Shah F, Smits M, Johansson T, Canbäck B, Olsen PB, Persson P, Grell MN, Lindquist E *et al.* 2012. The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. *Environmental Microbiology* 14: 1477–1487.
- Selosse M-A, Duplessis S. 2006. More complexity in the mycorrhizal world. *New Phytologist* 172: 600–604.
- Taylor JW, Turner E, Townsend JP, Dettman JR, Jacobson D. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 1947–1963.
- Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjoller R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG *et al.* 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 4160–4170.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671–677.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R *et al.* 2012. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193: 755–769.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A *et al.* 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604.
- Walder F, Niemann H, Natarajan M, Lehmann MF, Boller T, Wiemken A. 2012. Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiology* 159: 789–797.
- Young ND, Debelle F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H *et al.* 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520–524.

Key words: agriculture, biogeography, community ecology, evolution, genomics, inoculum, mycorrhizal fungi, physiology.

Annexe 2: Article de revue

Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions

Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty PE, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, Brun A, Zimmermann S, Plassard C, Wipf D

Mycorrhiza (2013) 23: 597-625

La revue présentée ci-après fait l'état de l'art des connaissances actuelles concernant le transportome végétal et fongique impliqué dans les échanges de nutriments au cours des symbioses endomycorhizienne à arbuscule et ectomycorhizienne. Le transport de sucre, d'azote, de phosphate, de sulfate, de potassium, de calcium, de manganèse, de zinc et d'eau, ainsi que les systèmes de transport de chacun des partenaires sont abordés.

Personnellement, je me suis principalement impliqué dans les parties portant sur le transport de potassium et d'eau.

Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions

Leonardo Casieri · Nassima Ait Lahmidi · Joan Doidy ·
Claire Veneault-Fourrey · Aude Migeon ·
Laurent Bonneau · Pierre-Emmanuel Courty ·
Kevin Garcia · Maryse Charbonnier ·
Amandine Delteil · Annick Brun ·
Sabine Zimmermann · Claude Plassard · Daniel Wipf

Received: 23 October 2012 / Accepted: 13 March 2013 / Published online: 10 April 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Understanding the mechanisms that underlie nutrient use efficiency and carbon allocation along with mycorrhizal interactions is critical for managing croplands and forests soundly. Indeed, nutrient availability, uptake and exchange in biotrophic interactions drive plant growth and modulate biomass allocation. These parameters are crucial for plant yield, a

Leonardo Casieri and Nassima Ait Lahmidi contributed equally to the work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00572-013-0496-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Casieri (✉) · N. Ait Lahmidi · J. Doidy · L. Bonneau ·
M. Charbonnier · D. Wipf
UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/Université de
Bourgogne, Pôle Interactions Plantes Microorganismes ERL 6300
CNRS, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France
e-mail: leonardo.casieri@dijon.inra.fr

C. Veneault-Fourrey · A. Migeon · A. Brun
UMR “Interaction Arbres Microorganismes”, Centre INRA Nancy,
54280 Champenoux, France

K. Garcia · A. Delteil · S. Zimmermann
UMR 5004 CNRS/INRA/SupAgro/UM2, Biochimie et
Physiologie Moléculaire des Plantes, Campus INRA/SupAgro, 2
Place Viala,
34060 Montpellier Cedex 2, France

P.-E. Courty
Zurich-Basel Plant Science Center, Botanical Institute, University
of Basel, Hebelstrasse 1,
4056 Basel, Switzerland

C. Plassard
UMR 1222 “Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols et
Agrosystèmes” Eco&Sols, INRA 2 Montpellier, Place Viala,
34060 Montpellier Cedex 2, France

major issue in the context of high biomass production. Transport processes across the polarized membrane interfaces are of major importance in the functioning of the established mycorrhizal association as the symbiotic relationship is based on a ‘fair trade’ between the fungus and the host plant. Nutrient and/or metabolite uptake and exchanges, at biotrophic interfaces, are controlled by membrane transporters whose regulation patterns are essential for determining the outcome of plant–fungus interactions and adapting to changes in soil nutrient quantity and/or quality. In the present review, we summarize the current state of the art regarding transport systems in the two major forms of mycorrhiza, namely ecto- and arbuscular mycorrhiza.

Keywords Mycorrhiza · Nutrient transport · Transporters

Abbreviations

AAP	Amino acid permeases
AAT	Amino acid transporters
ABA	Abscisic acid
AM	Arbuscular mycorrhiza
AMT	Ammonium transporter
APC	Amino acid/polyamine/organocation
AQP5	Aquaporins
AQR1	Acids quinidine resistance 1
ATPase	Adenosine triphosphate hydrolase
DP	Direct pathway
ECM	Ectomycorrhizal
ERM	Extraradical mycelium
EST	Expressed sequence tag
GUS	β-Glucuronidase gene
HAK	H ⁺ uptake permease
HIGS	Host-induced gene silencing

IRM	Intraradical mycelium
KUP	K ⁺ uptake permease
LPC	Lyso-phosphatidylcholine
MIP	Major intrinsic protein
MP	Mycorrhizal pathway
MSTs	Monosaccharide transporters
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIP	Nod 26-like intrinsic protein
NiR	Nitrite reductase
NNP	Nitrate/nitrite porter
NO ₃ ⁻	Nitrate
NR	Nitrate reductase
NT	Nitrate transporter
OPT	Oligopeptide transporter
P _i	Inorganic phosphate
PIPs	Plasma membrane intrinsic proteins
POT	Proton-coupled oligopeptide transporter
PTR	Peptide transporter
RNAi	RNA interference
SULTRs	Sulphate transporters
SUTs/ SUCs	Sucrose transporters
TCA	Trichloroacetic acid
TIPs	Tonoplast intrinsic proteins
WT	Wild type
YAT	Yeast amino acid transporter

The main resources acquired by plants in natural ecosystems are light and CO₂—through photosynthesis in the leaves—and mineral nutrients and water—through active and passive uptake into the roots. Mycorrhizal symbiosis plays a critical role for plant nutrient use efficiency in natural and cultivated ecosystems that are usually characterized by nutrient limitation, especially with regard to nitrogen and phosphate (Smith and Read 2008). Efficient mycorrhizal interactions depend on the ability of the mycobiont to take nutrients available under an inorganic and/or organic form in the soil and translocate them (as such or their corresponding metabolites) to the host plant. In turn, organic C derived from photosynthesis is transferred from the plant to the fungus, which acts as a sink site (Bago et al. 2003), and translocated to the growing margins of the extraradical mycelium and to developing spores. These exchanges mainly result in improved host plant growth through increased nutrient availability (Smith and Read 2008). There is substantial evidence that rational use of microsymbiont properties could significantly contribute to decreasing fertilizer and pesticide use in agriculture (Gianinazzi et al. 2010). The symbiotic relationship is based on a ‘fair trade’ between fungus and host plant. As a consequence, transport processes across the polarized membrane interfaces are of major

importance in the functioning of the established mycorrhizal association. Mineral nutrients are barely accessible to the host roots, but they are efficiently taken up by the extraradical hyphae that develop through the soil and transported to the exchange interfaces where they leave fungal cells for the host transport systems. This suggests a unique reorientation of the fungal ‘nutritional metabolism’ at the interface between the symbiotic partners: both plant and fungal cells are locally ‘reprogrammed’, including with regard to the differentiation and polarization of membrane transport functions, to fulfill the tasks of a massive nutrient transfer between the two partners. In arbuscular mycorrhiza (AM) and ectomycorrhiza (ECM), nutrients have to go through several membrane barriers at the apoplastic interface before being assimilated by the partner’s cells (Hahn and Mendgen 2001); proton ATPase activity on the two membranes of the symbiotic interface is a sign of active membrane transport (Gianinazzi-Pearson et al. 1991, 2000; Harrison 2005). Nutrient and/or metabolite uptake and exchanges at biotrophic interfaces are controlled by membrane transporters whose regulation patterns are essential for determining the outcome of plant–fungus interactions and adapting to changes in soil nutrient quantity and/or quality. Despite its importance, the release of nutrients taken up by the extraradical hyphae into the root apoplast occurs through widely unknown mechanisms. The aim of this review was to summarize current knowledge about macro- and micronutrient transport systems in plants in arbuscular and ectomycorrhizal interactions.

Sugar transporters

Mycorrhizal interactions involve a stable cooperation between plant and fungal partners. Besides stimulating host plant metabolism and photosynthetic activity, mycorrhizal fungi provide greater access to nutrients, which are not directly available for host roots (Bago et al. 2000; Selosse et al. 2006). As a reward, the plant redirects between 4 and 25 % of its photosynthates towards mycorrhized roots and exchanges them with the fungal partner (Graham 2000; Högberg and Högberg 2002; Hobbie 2006). For four decades, investigations into plant-to-fungus carbon flows have strongly suggested that sugars were transferred by means of either active or passive efflux mechanisms (Ho and Trappe 1973; Blee and Anderson 1998; Doidy et al. 2012a, b). Isotopic labelling and nuclear magnetic resonance spectroscopy using AM-colonized roots showed hexoses, i.e. glucose and, to a lesser extent, fructose, being taken up by the intraradical mycelium (Shachar-Hill et al. 1995; Solaiman and Saito 1997; Pfeffer et al. 1999). Boldt et al. (2011) monitored sucrose and fructose accumulation in tomato roots colonized by *Funneliformis mosseae* and confirmed previous evidence about invertase activity in the apoplast.

The two partners in mycorrhizal interactions seem able to detect whether the resource supply follows the ‘*do ut des*’ rule characteristic of mutualistic duties. The capability to adjust their own resource allocation according to variations in resource exchanges is thought to increase the stability of plant–fungal mutualistic interactions (Kiers et al. 2011), although the terms of trade between the partners are still under debate. Kiers et al. (2011), choosing fungal partners that interact differently with plants, showed that host plants could discriminate among fungi on the basis of the amounts of nutrients (e. g. inorganic phosphate, P_i) supplied by AM fungi, and they selectively reallocated higher amounts of photosynthates as a reward. Similarly, N uptake by AM fungi, and its transfer to the host plant, is triggered by C availability at the mycorrhizal interface (Fellbaum et al. 2012). Additionally, Walder et al. (2012) reported an unbalanced trade of C and nutrients when plants interact with different fungal partners. Their experiment showed that different plant species sharing a common mycorrhizal network benefited from increased nutrition. But the fungal partners *F. mosseae* and *Rhizophagus irregularis* showed different P and N supply patterns when interacting with plants that provided different amounts of photosynthates (Walder et al. 2012). Nowadays, the site for photosynthates exchange between mycorrhizal symbionts is commonly accepted to be at the arbuscular interface, as demonstrated for phosphate transport (Pumplin and Harrison 2009). Some authors also suggest that intercellular hyphae could also be an important C exchange site (Helber et al. 2011; Smith et al. 2001). Evidence of glucose and xylose uptake by the intra- or extraradical mycelium was reported more than a decade ago (Pfeffer et al. 1999; Bago et al. 2000; Helber et al. 2011). Although a few transport proteins have been identified at the plant–fungus interface (Fig. 1), the mechanisms that underlie sugar transport and partitioning towards the specialized interface membranes still remain largely unknown.

Sucrose partitioning in arbuscular mycorrhiza

In different plant species, the AM interaction generally augments photosynthetic activity to support the increased sink strength. In accordance with these observations, increased transcript amounts of *Medicago truncatula* sucrose synthase (*MtSucS2*) were observed during the interaction with the AM fungus *R. irregularis* (Corbière 2002); moreover, *MtSucS1* was shown to play an important role in arbuscule maturation and maintenance in *M. truncatula* roots mycorrhized by *F. mosseae* (Baier et al. 2010).

When sucrose reaches colonized roots, the phloem is unloaded by means of sucrose transporters via the apoplasmic pathway (Fig. 1), where SUT1-loading proteins (ZmSUT1; Carpaneto et al. 2005) are thought to unload the phloem towards arbusculated cortical cells; besides, sucrose is unloaded via the symplasmic pathway through cell

plasmodesmata (Doidy et al. 2012a). In addition, mechanisms of sucrose retrieval towards plant cells via SUT importers can also be assumed. Strikingly, in parallel to the previously described exchanges within host roots, extraradical hyphae have been shown to take up sugars (glucose (Glu) and xylose (Xyl)) in vitro through a proton-coupled mechanism; this opens a new path for the axenic culture of such fungi (Helber et al. 2011).

Higher transcript levels of sucrose transporters (SUTs), as well as accumulation of sucrose and monosaccharides in sink organs, were observed in mycorrhized roots of tomato (*Solanum lycopersicum*) and white clover (*Trifolium repens*) plants, indicating an increased movement of sucrose from photosynthesizing leaves (Wright et al. 1998; Boldt et al. 2011). Interestingly, overexpression of the phloem-loading *SoSUT1* in potato (*Solanum tuberosum*) increased *R. irregularis* colonization compared to WT plants when high-phosphate conditions were applied (Gabriel-Neumann et al. 2011). The absence of an effect on the mycorrhization rates in low- P_i conditions—even when antisense inhibition lines of *SoSUT1* were assessed—and previous evidence showing altered leaf and tuber C partitioning when the gene was overexpressed (Leggewie et al. 2003) suggest a non-direct effect of *SoSUT1* on the AM interaction. Additional evidence of the transcriptional regulation of genes involved in sucrose transport were reported in the AM interaction between tomato plants and *Rectipilus fasciculatus* (Tejeda-Sartorius et al. 2008), and more recently between *M. truncatula* and *R. irregularis* (Doidy et al. 2012b). Contrasting evidence on SUT regulation has also been reported for *LeSUT1* of tomato, which is downregulated in AM roots (Ge et al. 2008). Therefore, much work still has to be done to understand which plant SUTs or regulatory mechanisms play key roles in sucrose partitioning during mycorrhization.

Concerning the fungal partner in AM symbiosis, experiments on C fluxes support the hypothesis that sucrose is not taken up by the mycobiont in AM symbiosis (Solaiman and Saito 1997; Pfeffer et al. 1999; Bago et al. 2000). Nevertheless, a glomeromycotan sucrose transporter (*RiSUC1*) was identified from *R. irregularis* expressed sequence tag (EST) contigs by Helber et al. (2011). A full characterization and localization of this transporter will shed light onto sugar exchanges between arbuscular mycorrhizal partners.

Sucrose partitioning in ectomycorrhiza

Enhancement of host photosynthetic activity, sucrose synthesis and sugar transfer towards roots is also reported in ECM interactions (Nylund and Wallander 1989; Loewe et al. 2000; Corrêa et al. 2011). In particular, the estimated loss of carbon reaches 20–25 % of the total sugars fixed during photosynthesis when plants interact with ECM fungi (Hobbie 2006; Nehls et al. 2010), much higher than the 3–5 % loss measured for non-mycorrhized plants.

monosaccharide transporters (MSTs) are a vast group of transporters whose phylogenetic classification and clade nomenclature remain ambiguous (for a comprehensive review, see Doidy et al. 2012a). Although the roles of MSTs in hexose partitioning have been extensively studied, reports on AM-specific or induced/regulated MSTs are still scarce.

Mtst1 of *M. truncatula* encodes a transport protein with high affinity for glucose and fructose. It is regulated in response to colonization by *Diversispora epigaea* (Harrison 1996). Increased transcript levels were observed in *M. truncatula* and *Medicago sativa* following mycorrhizal colonization, but not in *myc* mutants of the two plants, suggesting that *Mtst1* upregulation is potentially linked with a functioning symbiosis. Greater differences in cell type-specific expression, particularly in arbusculated and adjacent cortical cells, suggest that *Mtst1* is involved in sugar supply to the AM interaction (Fig. 1; Harrison 1996). Moreover, the recently identified family of sucrose and monosaccharide uniporters defined as ‘SWEET transporters’ seems to play a role in mediating sugar efflux from plant cells in plant–microbe interactions (Baker et al. 2012; Chen et al. 2012; Fig. 1), so a role in mycorrhizal associations can be speculated.

The complex expression pattern of monosaccharide transporters in tomato was recently assessed by Ge et al. (2008): the hexose transporter *LeHT2* was downregulated in tomato roots colonized by the AM fungi *Glomus caledonium* or *R. irregularis*, whilst different responses of the putative MST *LeST3* were observed when plants were mycorrhized by different fungi (Garcia-Rodríguez et al. 2005; Ge et al. 2008). Interestingly, when plants were cultivated at high P_i (0.5 mM) levels, reduced transcript accumulation of *LeHT2* and *LeST3* was observed in the roots, whilst increased transcripts of *LeHT2* were measured in the leaves (Ge et al. 2008). Other results highlight the effect of human selection on crop plants; indeed, the maize transporter *ZmMST1* was found upregulated at sub-micromolar P concentrations in an African cultivar adapted to low nutrient, but not in the European cultivar usually grown in high-input agricultural systems (Wright et al. 2005b). MSTs were also found differentially regulated in the non-arbusculated cortical cells of colonized roots. Indeed, plasma membrane glucose transporters from the STP clade (MtHext1 and Mtst1) were activated in non-colonized cells neighbouring arbusculated cells (Gaude et al. 2012). The activation of the monosaccharide import pathway, coupled with the reallocation of sugars stored in vacuoles, may result in cytosolic sugar enrichment in non-arbusculated cells and, thus, indirectly feed arbusculated cells through symplasmic pathways (Fig. 1).

Interestingly, the monosaccharide transporter CAD31121, isolated in the detergent-resistant membrane fraction of *M. truncatula* roots, was downregulated upon mycorrhization (Lefebvre et al. 2007). Raft-associated proteins, and along with them the membrane dynamics, could therefore play a

role in the regulation of trophic exchanges during AM interaction. This opens new perspectives for future research.

The phylogenetic reconstruction of the invertase gene family in numerous fungal phyla highlighted a strong negative correlation between the presence of invertase genes and the degree of mutualism of the interaction (Parrent et al. 2009). AM fungi have a low cell wall-degrading activity compared to ECM and ericoid mycorrhizal fungi, and they lack invertase activity. Altogether, this makes them strongly dependent on their plant host (Smith and Read 2008). This could be a tool for the photobiont to control and tune this type of interaction. There are many demonstrations that AM fungi can take up glucose and fructose at the plant–fungus interface (Shachar-Hill et al. 1995; Solaiman and Saito 1997; Pfeffer et al. 1999). Within glomeromycotan fungal species, the first symbiosis-related glucose transporter was identified in *Geosiphon pyriformis* in interaction with *Nostoc punctiforme* (Kluge et al. 1991; Schüßler et al. 2002, 2006). This unique symbiotic model allowed for the isolation of *GpMST1* (Schüßler et al. 2006, 2007), characterized as an H^+ glucose transporter with highest affinity for glucose and mannose, followed by galactose and fructose. The information obtained from this model, together with the available glomeromycotan genomic data, recently led to the isolation of three MSTs (*RiMST2*, *RiMST3* and *RiMST4*; Fig. 1) from the widely used model species *R. irregularis* (Helber et al. 2011), which predominantly transports glucose and, to a lower extent, fructose (Shachar-Hill et al. 1995; Solaiman and Saito 1997; Pfeffer et al. 1999; Boldt et al. 2011). Therefore, the excess of fructose in colonized roots may be redirected towards other sink organs.

RiMST2 has been characterized as a high-affinity functional H^+ glucose transporter expressed in arbuscules and intraradical mycelium (Fig. 1). It is also present in intraradical hyphae, where it could mediate the uptake of monosaccharides (including Glu, Xyl, galactose and mannose) resulting from plant cell wall degradation (Schüßler et al. 2007; Helber et al. 2011). RNAi silencing of *RiMST2* by HIGS resulted in impaired mycorrhizal formation, malformed arbuscules and reduced *MiPT4* expression, suggesting that RiMST2 acts as the major component for hexose uptake by *R. irregularis* and seems indispensable for a functional AM symbiosis.

Monosaccharide partitioning in ectomycorrhiza

In ECM interactions, as in AM, the regulation of carbohydrate delivery via an apoplastic pathway and more specifically the regulation of cell wall-bound invertases provide an efficient, flexible and demand-oriented way to adjust C supply to the fungal partners (Roitsch et al. 2003; Roitsch and Gonzalez 2004). Controversial results were found about changes in invertase activity due to ECM interactions in birch (Wright et al. 2000) and Norway spruce (Schaeffer et al. 1995).

Interestingly, Schaeffer et al. (1995) reported changes in mycorrhized Norway spruce invertase activity mainly in the meristem and the elongation zone, whilst no difference was observed at the active symbiotic interface.

Enhanced expression of invertase genes and related enzymatic activities were also observed in ectomycorrhized *Populus trichocarpa* plants (Nehls et al. 2010). Unaffected glucose import capacity, coupled to increased invertase gene expression, was observed in ectomycorrhizal plants (Nehls et al. 2010). Repressed expression of hexose transporters, which can take up fructose, led to enrichment of the apoplast in fructose, and the apoplast in turn became a possible extra carbon source for the hyphae of the fungal sheath that surrounds the infected root tip. This hypothesis is consistent with the accumulation of glycogen in the fungal sheath of *Paxillus involutus* colonizing silver birch (Jordy et al. 1998).

In addition to the control of sucrose transporters and sucrose hydrolysis, the regulation of hexose transporter genes upon ECM formation enhances the competition for monosaccharides at the symbiotic interface. Such competition gives the plant an additional tool to control sugar supply at a local level (Nehls et al. 2010). Several observations point out how trees can restrict carbohydrate support when mineral nutrients are not sufficiently provided by the fungal partner (Nilsson and Wallander 2003; Nilsson et al. 2005; Hendricks et al. 2006). Moreover, the increase in transcript levels of hexose transporter genes in *Poplar* plants seems to corroborate this hypothesis (Grunze et al. 2004; Nehls et al. 2007). The impact of ECM formation on monosaccharide transporter genes has been investigated in different plant species. Compared to non-mycorrhized roots, the expression of hexose transporters from birch (*BpHEX1*, *BpHEX2*), poplar (*PttMST1.2*, *PttMST2.1*) and Norway spruce (*PaMST1*) was suppressed upon ECM establishment (Nehls et al. 2000; Wright et al. 2000; Grunze et al. 2004), whilst *PttMST3.1* from poplar was strongly upregulated. As a higher expression of *PttMST3.1* compared to the other hexose transporters was also observed in non-mycorrhized plants and the heterologous expression experiments failed to confirm its transporter activity, the authors argued about a direct regulation of this gene upon ECM interaction and suggested a posttranscriptional mechanism (Nehls et al. 2007). More recently, and in agreement with the general understanding of the biological basis for ECM interactions, Larsen et al. (2011) reported higher activity for the enzymes of the carbohydrate metabolic pathway in quaking aspen, including starch and sucrose degradation enzymes, during mycorrhizal interactions with *L. bicolor*.

A. muscaria protoplasts can take up glucose and fructose, with much higher affinity for glucose than for fructose. Although sucrose did not inhibit monosaccharide uptake, fructose uptake was strongly inhibited by glucose, but no effect on glucose uptake was observed when fructose was added to protoplasts (Chen and Hampp 1993). Similarly,

preferential uptake of glucose over fructose was observed in other ECM fungi such as *Cenococcum geophilum* and undefined mycorrhizal species associated to *Picea abies* (Salzer and Hager 1993; Stülten et al. 1995). Two MSTs from *A. muscaria* (*AmMST1* and *AmMST2*) and one from *Tuber borchii* (*Tbhxt1*) have been characterized as having a high affinity for glucose, but different regulatory systems and localizations among plant tissues (Nehls et al. 1998; Wiese et al. 2000; Nehls 2004; Polidori et al. 2007). Whilst *AmMST1* and *AmMST2* were stimulated by the extracellular monosaccharide concentration and putatively located at the plant–fungus interface, *Tbhxt1* expression was stimulated during carbohydrate starvation of fungal hyphae and is probably involved in supplying sugar to the soil-growing mycelium.

L. bicolor genome sequencing (Martin et al. 2008) allowed for the identification of 15 putative MSTs (Fajardo Lopez et al. 2008). Transport properties assessed through competition experiments showed that glucose was the choice monosaccharide taken up. Moreover, MST gene expression patterns confirmed a strong induction under carbon-limiting/starving conditions, most likely to allow the fungus to compete with the host for monosaccharide uptake from the plant–fungus interface.

Other works have investigated the ECM basidiomycete *L. bicolor* S238N-H82 (Deveau et al. 2008). The author attempted to construct a comprehensive inventory of pathways involved in primary carbohydrate metabolism, thus shedding light onto the steps following hexose assimilation at the plant–fungus interface. Several genes and gene families were annotated and the transcriptional regulation of the glycolysis, pentose phosphate, TCA, trehalose and mannitol metabolism pathways was studied using whole-genome expression oligoarrays and qPCR techniques in the *L. bicolor*/*Pseudotsuga menziesii* interaction. Differential transcript regulation of the glycolytic, mannitol and trehalose metabolisms was observed upon mycorrhizal and sporocarp development (Deveau et al. 2008).

More recently, *Tuber melanosporum* sequencing and comparison with other ECM fungi showed a lower dependency on the host for monosaccharides (Martin et al. 2010). In fact, the presence of an invertase-encoding gene suggests the capability for the mycobiont to hydrolyze the sucrose delivered by the plant at the apoplastic interface. This could represent an advantage compared to the mycorrhizal symbionts that lack invertase-encoding genes, such as *L. bicolor*.

Nitrogen transporters

Nitrogen transport in arbuscular mycorrhiza

Although the role of N in AM symbiosis is less clear than that of P, it is now established that AM can play a major role in N uptake (Smith et al. 2010). Although AM fungi can

take up both NO_3^- and NH_4^+ , a clear preference for NH_4^+ is at least partly explained by the extra energy the fungus has to spend to reduce NO_3^- to NH_4^+ before it can be incorporated into organic compounds (Marzluf 1997).

Molecular evidence for N uptake by AM fungi was obtained through the characterization of an ammonium transporter (AMT) in *R. irregularis* (Lopez-Pedrosa et al. 2006). *GintAMT1* encodes a functional, high-affinity NH_4^+ transporter that is expressed in the extraradical mycelium (ERM; Lopez-Pedrosa et al. 2006). *GintAMT1* transcription increased after adding 30 μM NH_4^+ , but decreased after adding 3 mM NH_4^+ . The authors therefore hypothesized that this gene played a key role in NH_4^+ acquisition by the ERM when the surrounding environment was characterized by ammonium-limiting conditions, such as in acid soils. A second *R. irregularis* AMT, functionally different from *GintAMT1*, has recently been isolated and characterized (Pérez-Tienda et al. 2011). *GintAMT1* and *GintAMT2* were differentially expressed during the fungal life cycle and in response to N. In contrast to *GintAMT1*, *GintAMT2* transcript levels were higher in the intraradical fungal structures than in the ERM (Fig. 2). However, transcripts of both genes were detected in arbuscule-colonized cortical cells. *GintAMT2* showed constitutive expression in N-limiting conditions and transitory induction after N resupply (either NO_3^- or NH_4^+). It was then suggested that *GintAMT2* could be involved in retrieving NH_4^+ leaked out along with fungal metabolism. Interestingly, the expression of both genes was downregulated after adding either glucose or acetate to the root or hyphal compartment of a split Petri dish, respectively, suggesting the existence of C-dependent mechanisms of gene regulation. Fellbaum et al. (2012) investigated whether or not a reward strategy existed for nitrogen delivery in the exchange for increased sugar supply, such as the one already described for P_i (Kiers et al. 2011). By manipulating carbon availability to host and fungus in root organ cultures, the authors showed that C supplied to the host induced changes in fungal gene expression that resulted in increased nitrogen uptake and transport. Interestingly, although genes involved in N assimilation or arginine biosynthesis were induced in the ERM in response to C supply to the root compartment, a fungus NT expressed in the ERM in response to exogenous NO_3^- supply (Tian et al. 2010) was downregulated, suggesting once again that AM fungi preferentially take up NH_4^+ , which is energetically less costly than NO_3^- .

Besides inorganic N uptake, AM fungi can obtain substantial amounts of N from decomposing organic materials, in particular amino acids, and that 3 % of plant N comes from that material (Hodge and Fitter 2010). Such a process could involve, among other transporters, amino acid permeases (AAP). A functional AAP from *F. mosseae* has been characterized. *GmosAAP1* expression was detected in the extraradical mycelium and its activity increased upon exposure to organic

nitrogen (Cappellazzo et al. 2008; Fig. 2). *GmosAAP1* can transport proline through a proton-coupled and pH- and energy-dependent process and displays a relatively specific substrate spectrum since it binds non-polar and hydrophobic amino acids. *GmosAAP1* may play a role in the first steps of amino acid acquisition, allowing direct amino acid uptake from the soil and extending the range of molecular tools AM fungi use to exploit soil resources.

In plants, several transcriptomic analyses reveal that AM establishment can induce the expression of plant N transporters, mainly in arbusculated cells. However, data relying on the functional validation of putative transporters are still scarce. The first evidence of a plant functional AMT involved in N uptake during AM symbiosis was provided in *Lotus japonicus* colonized with *Gigaspora margarita* by Guether et al. (2009a). *LjAMT2;2* is exclusively expressed in mycorrhizal roots, and its transcripts are preferentially located in arbusculated cells. Interestingly, transport experiments using *Xenopus laevis* oocytes indicate that, unlike other plant AMTs, *LjAMT2;2* transports NH_3 instead of NH_4^+ . The authors suggest that *LjAMT2;2* recruits NH_4^+ in the acidic peri-arbuscular space and releases the uncharged NH_3 into the cytoplasm of the arbuscule-containing root cortical cell. That way, protons coming from the deprotonation process remain in the peri-arbuscular space and reinforce the gradient for H^+ -dependent transport processes. Moreover, NH_4^+ sensing and NH_3 transport can avoid the accumulation of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ at potentially toxic levels. Transcript profiling revealed another AM-induced AMT (IMGAG|1723.m00046) detected exclusively in arbusculated cells (Gomez et al. 2009). Two putative ammonium transporters were identified in *M. truncatula* (Gaude et al. 2012). Interestingly, one (medtr7g075790.2) was induced in non-colonized cortical cells, whereas the other (medtr7g140920.1) was strongly induced in arbusculated cells (Fig. 2). This latter AMT sequence is different from that of the ammonium transporter expressed in arbuscule-containing cells described recently (Gomez et al. 2009), indicating that several transporter proteins of the same family may be involved in symbiotic ammonium transfer. In contrast to *L. japonicus* and *M. truncatula*, five AM-inducible AMTs were found in *Glycine max*, and one of them was downregulated (Kobae et al. 2010). In *Lotus*, the most abundantly transcribed AMT gene, *GmAMT4.1*, an ortholog of *LjAMT2;2*, is specifically expressed in arbusculated cells. Moreover, the protein was localized only on the peri-arbuscular membranes surrounding arbuscule branches, but not on the trunk regions, indicating that active ammonium transfer occurs around the arbuscule branches (Fig. 2).

Recently, two new AMTs were identified in tomato (*LeAMT4* and *LeAMT5*) and reported to be exclusively expressed in mycorrhizal roots, but not regulated by NH_4^+ , whilst the non-symbiosis-specific *LeAMT2* was induced by N treatment (Ruzicka et al. 2012). Interestingly, both *LeAMT4*

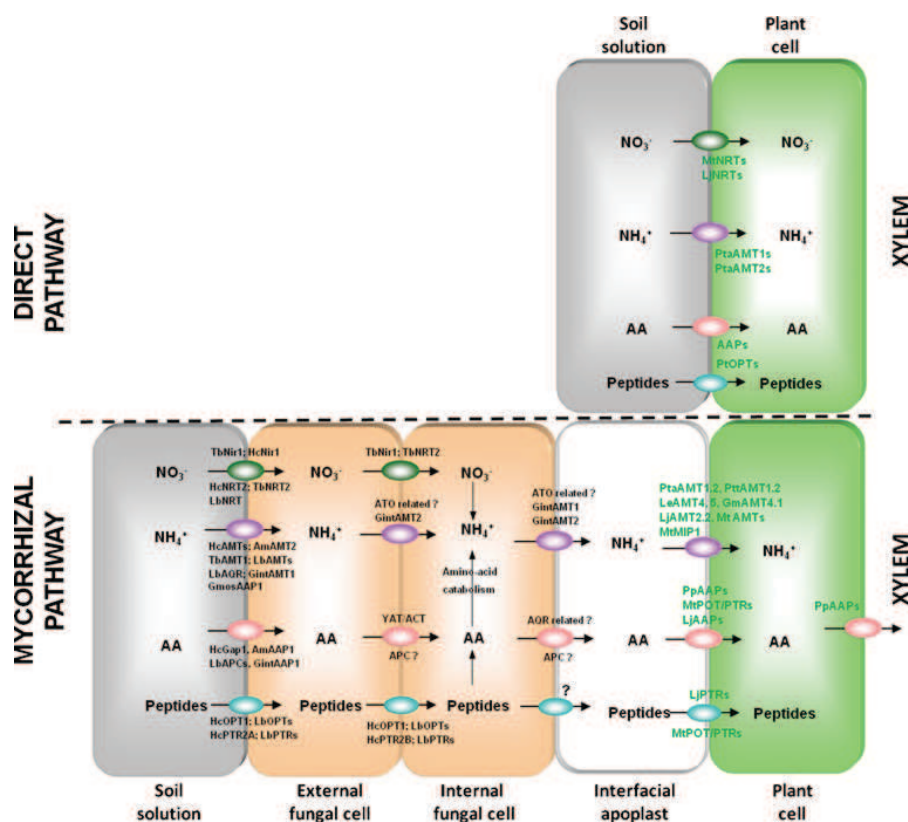


Fig. 2 Current knowledge about N transfer mechanisms in mycorrhizal interactions. Five compartments for N-compound transfer (ammonium, nitrate, amino acids and peptides) can be differentiated: the soil solution, external and internal fungal cells, the interfacial apoplast and the plant cell. The different molecules are reallocated across the different ECM compartments by several transporters that are not yet fully characterized. Hence, putative uncharacterized transporters are indicated by a *question mark*, fungal transporters in *black* and plant transporters in *green*, respectively. *NRT* nitrate transporter, *AMT* ammonium transporter, *AAP* amino

acid transporter, *OPT* oligopeptide transporter, *PTR* peptide transporter, *GAP1* general amino acid permease, *ATO* ammonia (ammonium) transport outward, *AQR* aquaporin, *APC* amino acid-polyamine-organocation, *Am Amanita muscaria*, *Gint Rhizophagus irregularis*, *Gm Glycine max*, *Hc Hebeloma cylindrosporum*, *Lb Laccaria bicolor*, *Le Solanum lycopersicum*, *Lj Lotus japonicus*, *Mt Medicago truncatula*, *Tb Tuber borchii*, *Pta Populus tremula × alba*, *Ptt Populus trichocarpa*, *Pp Pinus pinaster*

and *LeAMT5* are expressed in low-N conditions, concomitantly with the transcriptional repression of direct root N uptake pathways.

The AM-induced Nod 26-like intrinsic protein (MtNIP1), an aquaporin, was reported to act as a low-affinity ammonium transporter in AM instead of facilitating water uptake (Uehlein et al. 2007). Recently, *MtNIP1* was reported to be AM-activated exclusively in arbusculated cells, whilst another NIP was activated in hyphae-containing cortical cells, suggesting that fungal hyphae could also be involved in plant N uptake (Hogekamp et al. 2011).

Although nitrate is unlikely the main form in which N is supplied to the plant by AM fungi, the AM-induced upregulation of nitrate transporter genes in various systems suggests the presence of a mechanism that supports the assimilation of nitrate by AM. In addition to the AM-induced nitrate transporter reported in tomato (Hildebrandt

et al. 2002), four genes encoding nitrate transporters were also upregulated in *M. truncatula* and *L. japonicus* (Hohnjec et al. 2005; Guether et al. 2009b). However, transcriptional profiles of *M. truncatula* roots also revealed that two nitrate transporter genes were repressed (Hohnjec et al. 2005). This modulation of transporter gene expression is likely to be related to a switch in nutrient supply from direct root uptake to symbiotic uptake following changes in internal concentrations. Interestingly, in *M. truncatula*, one of the induced high-affinity nitrate transporter genes was also induced in response to high phosphate.

AM is also likely to modulate organic N transport. Among the metabolic changes observed in AM, high levels of certain amino acids (Glu, Asp, Asn) was reported in mycorrhizal roots (Schliemann et al. 2008). Three genes of the AAP family were upregulated in *L. japonicus* (Guether et al. 2009a, b). In *Lotus*, ten differentially expressed genes related to di-

tripeptide transporter (PTR) genes were detected (Guether et al. 2009a, b); nine were upregulated whilst one was downregulated in mycorrhized roots. Noteworthy is that the expression of the highest induced PTR gene was exclusively located in arbuscule-containing cells.

Peptide transporters belong either to the di- and tripeptide transporter (PTR) family, also named proton-coupled oligopeptide transporter family (POT; Paulsen and Skurray 1994), or to the oligopeptide transporter (OPT) family, which transports larger peptides (Hauser et al. 2001). AM induction of four putative proton-dependent oligopeptide transporter (POT/PTR) genes was also reported in *M. truncatula* (Gomez et al. 2009; Benedito et al. 2010; Hoge Kamp et al. 2011). Additionally, 11 POT genes were induced in roots colonized by either *R. irregularis* or *F. mosseae* (Hoge Kamp et al. 2011); two of them (Mtr.7741.1.S1_at and Mtr.4863.1.S1_at) were specifically expressed in arbusculated cells.

Nitrogen transport in ectomycorrhiza

In boreal and northern temperate forests, where plants interacting with ECM fungi dominate, nitrogen is the most important growth-limiting factor and is mainly present in an organic form (Read and Perez-Moreno 2003; Smith and Read 2008). The capacity of ECM fungi to mobilize polymeric N compounds as well as take up amino acids is well documented (Wallenda and Read 1999; Plassard et al. 2002). N compounds have to pass through three membrane barriers before being assimilated into the plant cells: the soil/fungus membrane, the fungus/apoplast membrane and the apoplast/plant root membrane (Chalot et al. 2006; Fig. 2). Despite a crucial role of ECM interaction in plant N nutrition, little is known about the molecular details and, in particular, about the regulation of nitrogen transporters of the two symbionts at the three interfaces. Analysis of the *L. bicolor* genome (Martin et al. 2008) uncovered the genetic repertoire of the transportome of an ECM fungus (Lucic et al. 2008; Chalot and Plassard 2011). The following paragraphs summarize the current data about the transporters involved in N uptake and the N compounds transferred among symbionts.

Peptide and amino acid transporters

Peptide transporters from ECM host plants are not yet functionally characterized. Nevertheless, a comprehensive genomic analysis shows that the *Populus* genome contains 20 OPT-encoding genes; several of them cluster together, but no expression data on mycorrhized root tips are yet available (Cao et al. 2011). Gene expression regulation and the uptake capacity of two PTR transporters of the ECM fungus *Hebeloma cylindrosporum* indicate that HcPtr2A is involved in high-efficiency peptide uptake under conditions of limited

N availability, whereas *HcPtr2B* is constitutively expressed (Benjdia et al. 2006; Fig. 2). The *L. bicolor* genome contains two PTR-encoding genes which are constitutively expressed in free-living tissues, one of them at a high level (Lucic et al. 2008). An oligopeptide transporter has also been isolated from an EST library of *H. cylindrosporum* mycelium (Lambilliotte et al. 2004), but has not been characterized yet (Müller et al. 2007). Nine putative OPT orthologs were identified in the *L. bicolor* genome, and expression analyses revealed different functional profiles. Four of them were constitutively expressed, two were highly and specifically upregulated in sporocarps, and two others were upregulated in sporocarps and ECM-involved mycelium. These genes could be involved in the constitutive uptake of peptides by the mycelium either in the free-living conditions or in ECM associations (Lucic et al. 2008; Fig. 2).

Amino acid uptake in mycorrhized root tips is improved, as demonstrated in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* ECM plants (Wallenda and Read 1999). Transcriptomic data analyses from root tips of aspen colonized by *L. bicolor* revealed that organic N compounds such as glycine, glutamate and, likely, allantoin could be the forms of exchange between ectomycorrhizal symbionts (Larsen et al. 2011).

Most of the fungal amino acid transporters (AAT) have been classified into the amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily (Saier et al. 1999). They mediate the transfer of a broad spectrum of amino acids with overlapping specificities. The *L. bicolor* APC superfamily includes a larger number of genes (29 members; Fig. 2) compared to saprophytic or parasitic fungi (Lucic et al. 2008). These differences could be related to the dual life-style (symbiotic and/or saprophytic) of this ECM fungus and to its higher capacity to use organic N resources (Martin et al. 2008). AATs with high affinity for basic amino acids and lower affinity for neutral and acidic amino acids were identified in *A. muscaria* (AmAAP1; Nehls et al. 1999) and *H. cylindrosporum* (HcGap1; Wipf et al. 2002). Furthermore, *HcGAP1* was undetectable in ECM, so the authors hypothesized that this minimized the reuptake of excreted amino acids, assuming that a competition for nitrogen-based nutrients exists at mycorrhized root tips. Lucic et al. (2008) pointed out the remarkable expansion of the YAT family in *L. bicolor* and, according to their expression analysis, suggested that several of these genes could be key determinants of ECM functioning.

The mechanisms of amino acid excretion in ECM remain to be elucidated. The process could be ensured by transporters homologous to yeast AQR1 (Acids Quinidine Resistance 1), which is involved in amino acid excretion (Chalot et al. 2006; Müller et al. 2007; Fig. 2). It is worth noting that *Aqr1* homologs have been identified in both *L. bicolor* and *H. cylindrosporum* genomes and appear to be expressed in colonized root tips.

Nitrate and ammonium transporters

Nitrate is internalized by specific plasma membrane transporters via an energy-dependent uptake process. A large group of nitrate transporters, from both prokaryotes and eukaryotes, belongs to the Major Facilitator Superfamily and specifically to the NNP family. The best-characterized members of this family in ECM fungi are NRT2 from *H. cylindrosporium* (Jargeat et al. 2003) and NRT2 from *T. borchii* (Montanini et al. 2006; Fig. 2). They are clustered with NR- and NiR-encoding genes (Jargeat et al. 2003; Guescini et al. 2003, 2007). *TbNRT2*, *HcNRT2*, *TbNir1* and *HcNir1* were all upregulated in the presence of NO_3^- as the sole N source and under N starvation, whereas *TbNir1* was only upregulated in the presence of NO_3^- (Jargeat et al. 2000; Guescini et al. 2007). *TbNir1* and *TbNrt2* were strongly expressed in the Hartig net and the mantle, but weakly expressed in the free-living mycelium (Guescini et al. 2003; Montanini et al. 2006). Gobert and Plassard (2002, 2007) showed that the ECM fungus *Rhizopogon roseolus* displayed only high-affinity NO_3^- uptake kinetics. A single nitrate transporter is probably responsible for nitrate uptake in ECM fungal species, in contrast to plants that exhibit several nitrate transporters (Lucic et al. 2008). As recently reviewed (Chalot and Plassard 2011), direct NO_3^- uptake and transfer in ECM is under debate since measurements in field experiments demonstrated that ECM communities discriminated against NO_3^- (Clemmensen et al. 2008), whilst microcosm experiments showed ammonium to be the preferred N form transferred (Chalot and Plassard 2011). Interestingly, all the fungi that possess a single nitrate permease have multiple AMTs.

Though the soil concentration of the poorly mobile ammonium ion is generally lower than that of nitrate, ammonium is often preferred as a nitrogen source because of its lower assimilation cost (Marschner 1995). ECM fungi indeed have a preference for ammonium over nitrate in vitro (Rangel-Castro et al. 2002; Guidot et al. 2005) and in field experiments (Clemmensen et al. 2008). In addition, ammonium was proposed as a good candidate for transfer between fungal and plant cells at the apoplast interface (Chalot et al. 2006). Ammonium transport is mediated by a family of ubiquitous membrane proteins, the Mep/Amt/Rh family, found throughout all kingdoms of life (Huang and Peng 2005) and subdivided into two subfamilies in plants, AMT1 and AMT2. Analysis of the poplar genome revealed the existence of 14 AMT genes, 6 AMT1 and 8 AMT2 genes, respectively (Couturier et al. 2007). Among all these transporters, PtaAMT1;2 is ammonium-specific, with high affinity, and is highly expressed in roots (Couturier et al. 2007). More interestingly, as also observed for its homolog gene *PttAMT1.2*, it was overexpressed in ectomycorrhized roots (Selle et al. 2005; Couturier et al. 2007). Three other poplar genes coding for

putative ammonium transporters were also overexpressed in ECM (Selle et al. 2005).

Three genes encoding ammonium transporters have been cloned from *H. cylindrosporium* (Javelle et al. 2001, 2003). HcAMT3 is a low-affinity AMT, whilst HcAMT1 and HcAMT2 are high-affinity ammonium transporters/sensors; the latter is induced by both N deficiency and NO_3^- supply and is repressed by glutamine. High-affinity AMTs isolated from *T. borchii* (*TbAMT1*) and *A. muscaria* (*AmAMT2*) were upregulated in N-deprived mycelium (Montanini et al. 2002) and strongly repressed when N was added (Willmann et al. 2007). The six *L. bicolor* AMT-encoding genes displayed various expression profiles (Lucic et al. 2008; Fig. 2). One was constitutively expressed in all tissues and did not respond to N starvation. It could therefore ensure a basal level of ammonium uptake independently of the external N status, as already demonstrated for the *H. cylindrosporium* ortholog *HcAMT3* (Javelle et al. 2003). Willmann et al. (2007) showed that in functional ECM, the transcript level of the high-affinity ammonium transporter *AmAMT2* of *A. muscaria* was reduced in both hyphal networks (sheath and Hartig net) and increased in the ERM. Furthermore, two genes homologous to a putative ammonium export protein of *Saccharomyces cerevisiae*, *Ato3*, are found in *A. muscaria* (Selle et al. 2005) and *L. bicolor* (Lucic et al. 2008). Such genes could be involved in the ammonium release from the fungal cells into the apoplast interface. Recently, a study highlighted the involvement of fungal aquaporins in ammonium transfer into ECM (Dietz et al. 2011). The authors described three *L. bicolor* aquaporins able to transport ammonium/ammonia—two of which are upregulated in ectomycorrhized root tips. Finally, in addition to specific AMTs, voltage-dependent cation channels such as those possibly involved in the export of fixed NH_4^+ from rhizobial bacteria to leguminous host plants (Roberts and Tyerman 2002) could be involved in the export of inorganic N to the apoplast (Chalot et al. 2006), as also supported by molecular data.

Phosphate transporters

ECM and AM fungi are known to take up P_i from the soil solution and to transfer P to the host plant. The first demonstration of P_i uptake by extramatrical hyphae and its subsequent transfer to the host plant was carried out using $^{32}\text{P}_i$ supplied to young *P. sylvestris* plants grown under sterile conditions (Melin and Nilsson 1950). Further experiments demonstrated that this P transport is unidirectional, from fungal cells to host root cells (Finlay and Read 1986). Recent results demonstrate that the so-called mycorrhizal pathway (MP), characterized by P_i transporters exclusively or predominantly induced during AM interaction (Harrison

et al. 2002), can contribute from 20 to 100 % of the plant P uptake, depending on the plant and fungal species involved and independently of the effect of fungal association on plant biomass (Smith et al. 2004, 2010; Facelli et al. 2010).

P_i transporters were first described in yeast (Persson et al. 2003), characterized as high-affinity P_i transporters encoded by the *PHO84* and *PHO89* genes (Bun-ya et al. 1991; Martinez and Persson 1998). Interestingly, *PHO84* and *PHO89* are respectively H⁺- and Na⁺-dependent transporters, a difference that is still used for classification purposes; indeed, the P_i:H⁺ transporters are associated with the Pht1 family and P_i:Na⁺ with the Pht2 family. High- and low-affinity transporters are found in the two families.

Phosphate transport in arbuscular mycorrhiza

AM-inducible plant P_i transporters have been identified in many monocot and dicot species, including perennial trees (Javot et al. 2007a; Loth-Pereda et al. 2011; Fig. 3 and Electronic supplementary material (ESM) Table S1). In dicots, the signal perception and the transduction pathway that mediate mycorrhiza-specific regulation of P_i transport have been described in several plant orders such as Solanales,

Apiales, Fabales (Karandashov et al. 2004) and Malpighiales (Loth-Pereda et al. 2011). They cluster in subfamilies I and III of the plant Pht1 family (Fig. 3). In situ hybridization and promoter:GUS fusion studies showed that some of these AM-inducible Pht1 transporters were predominantly or exclusively expressed in arbusculated cortical cells (Rausch et al. 2001; Harrison et al. 2002; Glassop et al. 2005; Nagy et al. 2005; Maeda et al. 2006). Subfamily I *Pht1* genes are only expressed in mycorrhizal cells in perennial and annual plants, whilst subfamily III *Pht1* genes, such as *MtPT3* in *M. truncatula* and *LjPT3* in *L. japonicus*, have a basal expression in non-mycorrhized roots, but are specifically induced in cortical cells during AM symbiosis (Maeda et al. 2006; Rausch et al. 2001; Fig. 5). Transporters from the two subfamilies were immunolocalized in the periarbuscular membrane at the branches of arbuscules in *M. truncatula* (*MtPT4*; Harrison et al. 2002; Pumplin and Harrison 2009) or *Oryza sativa* (*OsPT11*; Kobae and Hata 2010). Interestingly, in tobacco plants colonized by AM fungi, H⁺-ATPases and AM-induced P_i transporters (H⁺-P_i transporters) displayed arbuscule-specific expression and distinct localizations in the plant membrane around the arbuscules (Gianinazzi-Pearson et al. 2000; Krajinski et al. 2002). Moreover, polar targeting of AM-inducible Pht1 transporters, such as *MtPT4*, is mediated by precise temporal expression coupled with a transient reorientation of secretion (Pumplin et al. 2012).

Analysis of the promoter region revealed the presence of the highly conserved CTTC motif in AM-inducible Pht1 genes in dicots (Karandashov et al. 2004; Chen et al. 2011; Loth-Pereda et al. 2011). However, the attempt to characterize AM-inducible Pht1 transporters by heterologous expression in yeast or by overexpression in suspension-cultured tobacco cells did not yield a clear-cut picture: the *P. trichocarpa* PtPT10 mutant exhibits a growth defect at low-P_i conditions (Loth-Pereda et al. 2011), *M. truncatula* *MtPT4* is a low-affinity Pht1 transporter (668 μM; Harrison et al. 2002), and *S. tuberosum* StPT3 has a higher affinity (64 μM; Rausch et al. 2001) than *MtPT4*.

AM-induced Pht1 transporters are essential for P_i uptake via the mycorrhizal pathway. In a tomato mutant resistant to colonization by most AM fungi, *LePT3* and *LePT4* are only expressed when arbuscules are developing (Poulsen et al. 2005). The downregulation of *MtPT4* (subfamily I) caused premature arbuscule death, decreased colonization levels and ultimately led to the end of the AM relationship (Javot et al. 2007b), but also affected nitrogen metabolism (Javot et al. 2011). The mutants exhibited low total shoot P contents and an accumulation of poly-P in the arbuscules probably caused by the impairment of the symbiotic pathway. In contrast, knocking out the *LePT4* gene (subfamily III) in tomato did not inhibit arbuscule development or P_i uptake via the AM

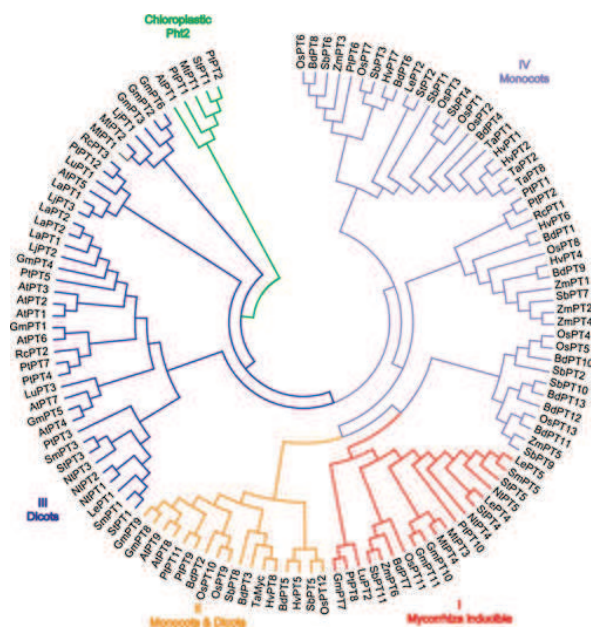


Fig. 3 Neighbour-joining tree of P_i:H⁺ symporters. Members of the Pht2 family were used as an outgroup. They share high similarity with mammalian P_i:Na⁺ co-transporters, but function as P_i:H⁺ co-transporters in plant plastids. Subfamily I clustered the AM-inducible P_i transporters from both monocot and dicot species, suggesting they evolved before dicots and monocots separated. Some proteins from both monocots and dicots fall into the highly divergent subfamily II. Genes from plant groups were found in subfamilies III and IV, indicating their evolutionary divergence after the separation of flowering plants from their common ancestor

pathway, probably due to a functional overlap with the other AM-induced Pht1 transporter *LePT3* from subfamily I (Nagy et al. 2005). The *LjPT3* knockdown mutant (subfamily III) showed reduced arbuscule development and AM-mediated P uptake (Maeda et al. 2006). Finally, mutant studies with reduced expression of the two types of AMF-inducible *Pht1* from subfamilies I and III reveal that the two subfamilies are important for AM symbiosis. However, in rice, Yang et al. (2012) showed that only *OsPT11* from subfamily I was necessary and sufficient for symbiotic P_i uptake.

In addition to the effect of AM symbiosis on gene expression, *Pht1* gene expression also depends on P status. Besides AM-inducible Pht1 transporters, some other *Pht1* are downregulated, in particular those thought to be involved in direct P_i uptake. This interplay between Pht1 transporters reflects the balance between the direct and symbiotic pathways of P_i uptake. P_i absorption by root hairs and epidermis is substantially reduced in AM plants, even if the AM fungus does not provide additional P_i to the plant (Smith et al. 2003). It is currently not clear yet whether downregulation (1) is a plant-only dependent process, (2) is a direct response of the plant to symbiosis or (3) indirectly results from the AM-induced improvement of plant P acquisition (Smith and Read 2008). In *M. truncatula*, the expression of *MtPT4* was induced by *Gigaspora rosea*, *F. mosseae* and *R. irregularis*, and the other five genes coding for Pht1 transporters showed different degrees of repression that mirrored the functional differences in P nutrition by the three fungi (Grünwald et al. 2009). Furthermore, the downregulation of AM symbiosis by P is accompanied by a systemic regulation of strigolactone production, which probably affects hyphopodia differentiation and subsequent arbuscule development (Balzergue et al. 2011). Moreover, posttranscriptional regulation appears to be an important control point in response to different P conditions, meaning that transcript abundance and protein accumulation are not necessarily related, as shown by the contradictory results in *M. truncatula* (Chiou et al. 2001) and *O. sativa* (Tran and Plaxton 2008).

A series of promoter truncation and mutation analyses combined with phylogenetic footprinting of Pht1 promoters revealed that at least two *cis*-regulatory elements—the mycorrhiza transcription factor-binding sequence (Chen et al. 2011) and P1BS (Rubio et al. 2001; Schünmann et al. 2004)—mediated the transcriptional activation of AM-mediated P_i transporter genes. Deletion or partial mutation of either of the two motifs in the promoters caused a remarkable decrease, or even complete absence, of promoter activity in solanaceous species (Chen et al. 2011). The requirement of P1BS for AM inducibility of P_i transporters could explain the absence of induction under high P supply in AM plants with low colonization levels (Nagy et al. 2009; Chen et al. 2011). But other mechanisms could sustain AM symbiosis at a high P status, such as PHO2 repression mediated by miR399 accumulation

in mycorrhized roots (Branscheid et al. 2010). Additionally, *Mt4*, a non-coding RNA homologous to *M. truncatula* IPS1, is rapidly downregulated in AM symbiosis (Burleigh and Harrison 1998). Therefore, components shared between P starvation signalling and AM signalling can also be differentially regulated due to AM interaction.

In AM fungi, the first $P_i:H^+$ transporter was described in *D. epigaea* (*DePT* on Fig. 4, subgroup III, and ESM Table S2) and had a K_m value of 18 μM P_i (Harrison and van Buuren 1995). Later, one partial cDNA (*FmPT*) and one full-length cDNA (*RiPT*) putatively coding for $P_i:H^+$ transporters were identified in *F. mosseae* and *R. irregularis*, respectively (Fig. 4, subgroup IV; Maldonado-Mendoza et al. 2001; Benedetto et al. 2005). The recent sequencing of the *R. irregularis* genome yielded three other genes. Two predicted polypeptides (*RiPT1* and *RiPT2*) cluster in the PHO89 subgroup (Fig 4, subgroup I), suggesting the putative presence of $P_i:Na^+$ transporters. However, their function is questionable as they are also very close to *ScPho86*, a protein involved in targeting and packaging *ScPho84* in yeast (Bun-Ya et al. 1996). The third predicted polypeptide (*RiPT3*) clusters with the PHO87 subgroup (Fig 4, subgroup IV). It can mediate P_i uptake when expressed in quadruple-mutant yeast (*pho84Δ*, *89Δ*, *90Δ*, *91Δ*) with low affinity

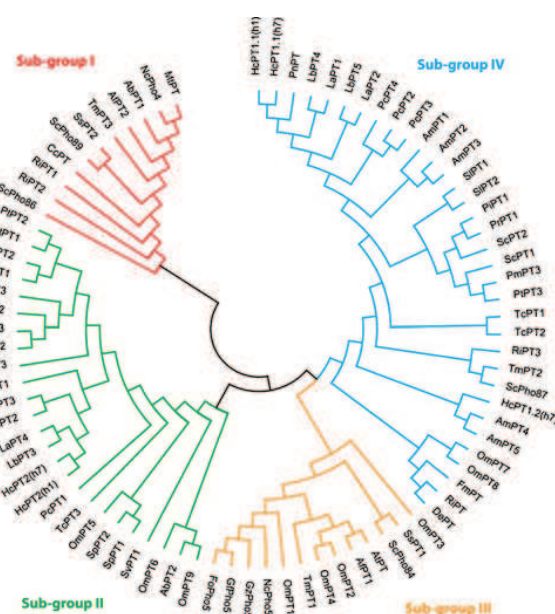


Fig. 4 Neighbour-joining tree of fungal $P_i:H^+$ and $P_i:Na^+$ transporters based on realigned amino acid sequences. Bootstrap values are from 1,000 replications. Sequence names consist of species code (first letter of the genus name and first letter of the species name, and gene name). Accession numbers of the predicted proteins are given as supporting information. The tree consists of five subgroups: subgroup I corresponds mainly to $P_i:Na^+$ transporters, whereas subgroups II–V correspond to $P_i:H^+$ transporters. Subgroup V mainly clusters $P_i:H^+$ transporters from ascomycetes

(216 μM ; Wykoff and O'Shea 2001), suggesting that RiPT3 could encode a low-affinity $\text{P}_i\text{:H}^+$ transporter.

Besides Glomeromycetes, an Ascomycete species, *Oidiodendron maius*, which forms AM symbiosis with ericaceous plants (Martino et al. 2007), showed the highest number of putative P_i transporters, (<http://genome.jgi.doe.gov/Oidma1/Oidma1.home.html>), with nine members (*OmPT1–OmPT9*; Fig. 4 and ESM Table S2) classified as $\text{P}_i\text{:H}^+$ transporters.

Most fungal transcripts were predominantly detected in ERM, with their expression levels enhanced by low P availability, as in *R. irregularis* (Maldonado-Mendoza et al. 2001; Olsson et al. 2006) and *F. mosseae* (Benedetto et al. 2005). As a whole, these data suggest a role in P_i acquisition from the soil solution. Yet, Benedetto et al. (2005) and Balestrini et al. (2007) report that *FmPT* transcripts are also detected in intraradical mycelium (IRM) and in cells containing arbuscules, suggesting that the regulation of P uptake and transfer from fungal cells to host cells is far more complex than previously expected. Transcript profiling using oligoarray revealed that *R. irregularis* $\text{P}_i\text{:H}^+$ and $\text{P}_i\text{:Na}^+$ transporters were not differentially expressed in germinating spores, in the extra- and intraradical mycelium (Tisserant et al. 2012). It also appears that P delivery from the AM fungus to the plant is highly dependent of the C pool delivered by the plant, as shown for *R. irregularis* associated with root organ cultures (Hammer et al. 2011). This is confirmed by the constitutive overexpression of a potato sucrose transporter (*SoSUT1*), which increases mycorrhizal root colonization under high P availability only (Gabriel-Neumann et al. 2011).

Phosphate transport in ectomycorrhiza

In ECM fungi, several genes putatively encoding P_i transporters have been identified (Fig. 4 and ESM Table S2; http://genome.jgi.doe.gov/Mycorrhizal_fungi/Mycorrhizal_fungi.info.html): three in *H. cylindrosporum* (*HcPT1.1*, *HcPT1.2* and *HcPT2*; Taty et al. 2009), in *P. involutus* (*PiPT1–PiPT3*), and in *T. melanosporum* (*TmPT1–TmPT3*; Martin et al. 2010) and five in *L. bicolor* (*LbPT1–LbPT5*; Martin et al. 2008) and in *A. muscaria* (*AmPT1–AmPT5*). Most of these transporters belong to the Pht1 subfamily ($\text{P}_i\text{:H}^+$ transporters), suggesting that the efficiency of P_i uptake by the fungus strongly relies on external pH values. Only *T. melanosporum* stands apart, with genes encoding P_i transporters that cluster with $\text{P}_i\text{:Na}^+$ transporters (*TmPT3*; subgroup I in Fig. 4). This specificity could be related to the ecology of this fungal species, which can live in soils with alkaline pH values and does not strictly depend upon proton gradients thanks to these P_i transporters.

Among all P_i transporters identified so far in ECM fungi, only HcPT1 (HcPT1.1 in Figs. 4 and 5) and HcPT2 have been

characterized by yeast complementation (Taty et al. 2009). HcPT1 and HcPT2 exhibited different affinities for P_i , with K_m values of 55 and 4 μM , respectively. The apparent K_m of HcPT2 was therefore comparable to that reported for ScPho84 and even lower than that of GvPT (18 μM). It is also close to the few apparent K_m values of P_i uptake measured in ectomycorrhized pines, which ranged between 2 and 13 μM depending on the fungal species (Van Tichelen and Colpaert 2000). These two transporters differ in their kinetics, but also in their regulation according to P_i availability; *H. cylindrosporum* could use HcPT1 to mediate P_i uptake when soil P availability is low and HcPT2 when soil P availability is high (Taty et al. 2009). The divergent phylogenetic relationships of HcPT1 and HcPT2, which cluster in subgroups II and IV (Fig. 4), respectively, and their differential transcriptional regulation suggest different functional characteristics (i.e. different affinities for P_i and/or to different regulation patterns of gene expression with P_i availability).

So far, only one study has reported the regulation of plant P_i transporters in ECM interactions. It was carried out in poplar (*P. trichocarpa*) associated with *L. bicolor* (Loth-Pereda et al. 2011). The authors showed that an alternative P_i uptake pathway distinct from AM-interacting plants allowed ectomycorrhized poplar to recruit *PtPT9* and *PtPT12* (both upregulated in poplar AM and ECM) to cope with limiting P concentrations in forest soils (Loth-Pereda et al. 2011; Fig. 5). Due to structural differences between AM and ECM roots, whether the direct and mycorrhizal uptake pathways work simultaneously in ECM has to be shown. Indeed, the presence of the fungal sheath may hinder P_i uptake by the root cells (Bücking et al. 2007), especially if the fungus is hydrophobic. However, to transfer P from the external solution to the xylem through ECM, P has to be taken up by cortical cells. That step could be mediated by specific plant Pht1 transporters such as *PtPT9* and *PtPT12* in poplar. On the other hand, the capacity of *Pinus pinaster* roots for P_i uptake strongly depends on whether ectomycorrhizae can take up P_i from the solution or not (Taty et al. 2009). Decreased and increased net P_i uptake was measured in root portions without any ECM tips and in root portions with ECM tips, respectively, and compared to non-mycorrhized roots. The decrease in P uptake capacity in *P. pinaster* root areas grown with the symbiotic fungus but without any ectomycorrhizae could be due to the downregulation of high-affinity plant P_i transporters in the cortical cells of the whole root system, as described previously in AM plants. This suggests the occurrence of a mycorrhizal uptake pathway in ECM plants (Fig. 5).

Overview of the phosphate transportome in mycorrhized roots

Finally, gathering the data published on AM symbiosis, a simplified diagram of the possible phosphate transportome

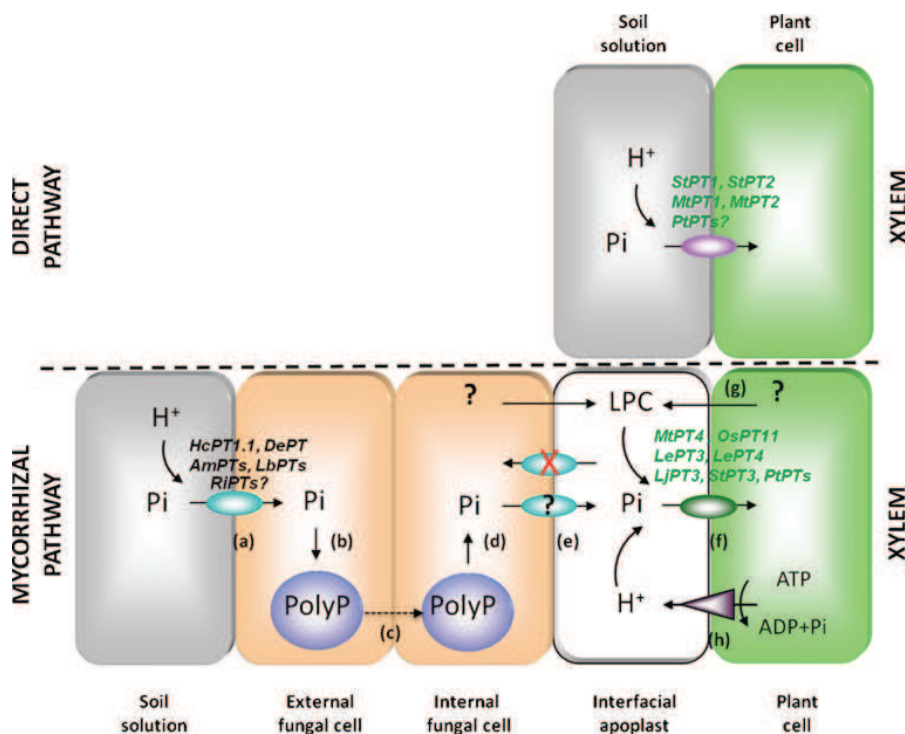


Fig. 5 Phosphate transportome during mycorrhizal interactions and P transfer mechanisms towards host cells. Expression of plant Pht1 transporters from the direct pathway could be strongly reduced in mycorrhizal plants compared to non-mycorrhizal plants, leading to the activation of the mycorrhizal P uptake pathway (Smith and Smith 2011). In the mycorrhizal pathway, after inorganic phosphate uptake from the soil solution through the plasma membrane, fungal Pht1 is energized by the H^+ symport (a), cytoplasmic P_i is accumulated in the vacuoles as polyphosphates (b) and transferred through hyphae via motile vacuoles (c) towards the intracellular fungal cells (d). PolyPs are probably degraded under the control of a plant signal to supply cytosol P_i which leaves the fungal cell through as yet unknown mechanisms (e). The mechanism could be the same fungal Pht1s whose activity is also regulated by

posttranscriptional modifications, leading to the lack of apoplasmic P_i reuptake by fungal cells (e) and leaving P_i available for plant P uptake (f) through mycorrhizal-inducible Pht1 transporters. These plant mycorrhizal-inducible Pht1 transporters could be induced by lyso-phosphatidylcholines of plant or fungal origin (g), as shown in tomato (Drissner et al. 2007). Plant P_i uptake is energized by the proton symport resulting from plant ATPase activity (h) (Smith et al. 2011). P_i inorganic phosphate, PolyP polyphosphates, LPC lyso-phosphatidylcholine, DP direct pathway, MP mycorrhizal P uptake pathway, *Am Amanita muscaria*, *De Diversispora epigaea*, *Hc Hebeloma cylindrosporium*, *Lb Laccaria bicolor*, *Le Solanum lycopersicum*, *Lj Lotus japonicus*, *Mt Medicago truncatula*, *Os Oryza sativa*, *Pt Populus tremula*, *St Solanum tuberosum*

of mycorrhizal roots is given in Fig. 5. The first impact of mycorrhizal symbiosis is the formation of a MP that can contribute to most of P uptake in mycorrhizal plants (Smith et al. 2003, 2004) at the expense of the direct pathway (DP). This first effect could be mediated through the downregulation of plant Pht1 transporters located in epidermal root cells, such as reported in *M. truncatula* (MtPT1 and MtPT2; Liu et al. 1998a, b) and potato (StPT1 and StPT2; Leggewie et al. 1997; Rausch et al. 2001; Nagy et al. 2005; Fig. 5). The MP pathway first involves the uptake of P_i from the soil solution by the ERM far away from the roots. In most cases, fungal P uptake is mediated by $P_i:H^+$ transporters. However, the exact role of the putative $P_i:Na^+$ transporters identified in the *R. irregularis* genome (*RiPT1* and *RiPT2*) remains to be established. After uptake, P_i is rapidly transferred to vacuoles under the form of polyphosphate chains. Vacuoles can move from cells to cells to reach the IRM. Javot et al. (2007b) showed that polyphosphates

did not accumulate in functional arbuscules, whereas they accumulated in the fungal hyphae that bear the arbuscules, suggesting that polyphosphates are degraded inside arbuscules. We can hypothesize that this recycling is under the control of plant cells, although the nature of the signals remains to be determined. This degradation of polyphosphates sustains the P_i flux delivered from the fungal cells towards the apoplasmic interface between the symbionts, through as yet unknown mechanisms (Smith and Smith 2011). The detection of fungal *Pht1* in mRNA extracted from arbusculated cortical cells (Balestrini et al. 2007) strongly suggests that *Pht1* plays a role in P_i delivery at the symbiotic interface. Moreover, as shown by Koegel et al. (2013), *SbPt11* from *Sorghum bicolor* was slightly but significantly and systemically induced, indicating that a signal could be transferred to the non-colonized roots and prepare the roots for potential future colonization, as described by Gaude et al. (2012). The activity of these

transporters could be regulated by posttranslational modifications leading to an absence of apoplastic P_i reuptake by the fungus and leaving P_i available for plant P uptake via mycorrhiza-inducible *Pht1* transporters (Fig. 5). Interestingly, the expression of plant mycorrhizal-inducible *Pht1* transporters was induced by lysophosphatidylcholine (LPC) from plant or fungal origin (Drissner et al. 2007). Due to the fact that LPCs are highly mobile within cells, these molecules could be the cytoplasmic messenger that activates downstream processes and gene expression in the nucleus (Bucher et al. 2009). However, roots from plants exhibiting a high P_i status are insensitive to LPC (Nagy et al. 2009), suggesting that P_i control is dominant over LPC signalling (Bucher et al. 2009). Overall, the P transportome from mycorrhizal plants appears to represent a rapid translocation system for delivering P taken up far away from roots by the external fungal cells directly into cortical cells. However, some decisive steps remain to be elucidated, especially the nature of the transport mechanisms that ensure the release of P_i from the fungal cells.

Sulphate transporters

Sulphur is a crucial macronutrient for photosynthetic organisms' growth, development and response to various abiotic and biotic stresses. It is needed to synthesize amino acids (cysteine and methionine); glutathione; thiols of proteins and peptides; membrane sulfolipids; cell walls; and secondary products like vitamins, cofactors and hormones (Foyer and Noctor 2009; Popper et al. 2011). Therefore, deficiency due to reduced S availability can have dramatic impacts on plant growth and development.

Sulphur is acquired from the soil in the form of sulphate, through an H^+ -dependent co-transport process (Davidian et al. 2000), and then transported towards the sink organs under the control of different sulphate transporters classified into four groups (Fig. 6 and ESM Table S3). Due to its

solubility in water, sulphate is commonly leached from soils by rainfalls (Eriksen and Askegaard 2000); as a consequence, 95 % of soil S is bound to organic compounds after being metabolized by soil microorganisms (Scherer 2001) and then no longer available for plants (Leustek 1996). S starvation or other nutrient starvation can have deleterious effects on plants, similarly to the use of increasing amounts of fertilizers on natural ecosystems (Foley et al. 2005). Therefore, different approaches to access the unavailable organic S pool present in the soil must be investigated, such

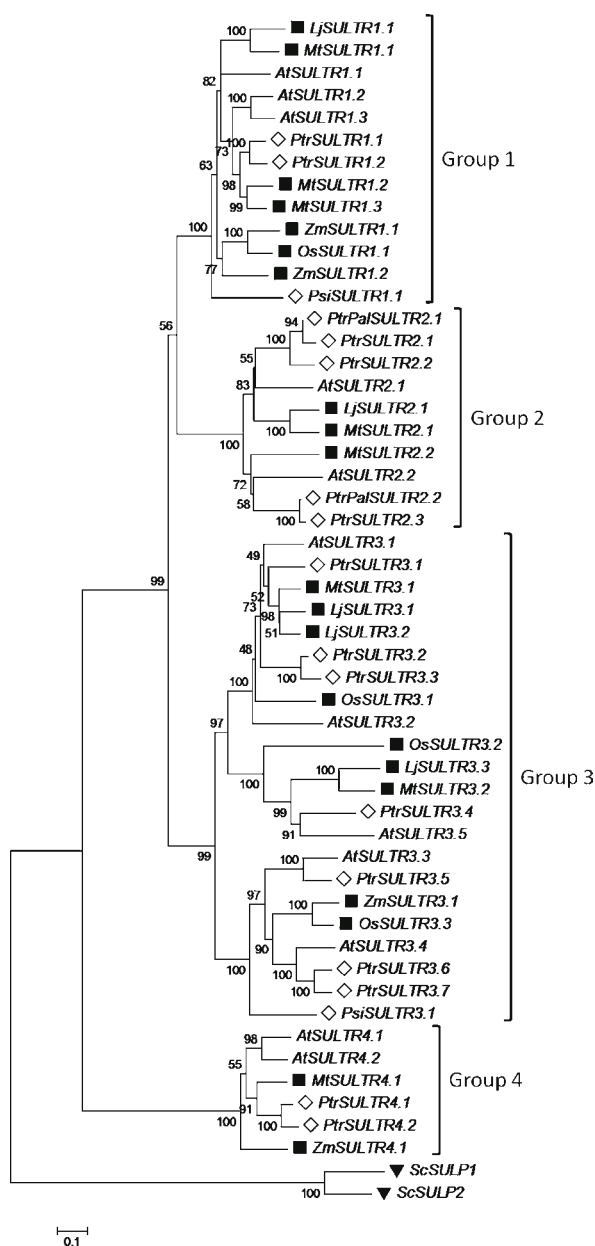


Fig. 6 Rooted phylogenetic tree of plant sulphate transporters (SULTRs), adapted from Casieri et al. (2012). The evolutionary history was inferred using maximum parsimony on 53 aligned amino acid sequences. Numbers next to branches represent the percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (3,000 replicates). The evolutionary distances were computed using the Jones et al. (1992) w/freq. method and are expressed as the number of amino acid substitutions per site. Rate variation among sites was modelled with a gamma distribution (shape parameter=2). A total of 586 parsimonious informative positions were considered in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura et al. 2011). Squares, AM host species; diamonds, ECM host species; inverted triangles, rooting outgroup of the tree, represented by *S. cerevisiae* sulphate permeases. Species code: *At Arabidopsis thaliana*, *Lj Lotus japonicas*, *Mt Medicago truncatula*, *Os Oryza sativa*, *Zm Zea mays*, *Ptr Populus tremula*, *Ptric Populus trichocarpa*, *Ptr-Pal Populus tremula* × *Populus alba*, *Psi Picea sitchensis*

as the use of symbiotic microorganisms (i.e. AM and ECM fungi) in interaction with plant roots.

Sulphate transport in arbuscular mycorrhiza

In plants, the cross talk with AM fungi and the increased amount of available nutrients trigger a series of events such as the activation of specific mycorrhizal uptake pathways; this affects already-expressed transporters of the direct uptake pathways and increases nutrient exchanges and reallocation (Javot et al. 2007a, b; Sawers et al. 2008; Smith and Smith 2011; Smith et al. 2011).

Noteworthy is that although several papers address the importance of S uptake and of the transport of its oxidized forms or metabolic derivatives inside the plant (Yoshimoto et al. 2007; Lewandowska and Sirko 2008), few studies on the effects of symbiotic interactions with AM fungi on the transcriptional regulation of plant SULTRs are reported. Growth parameters and element (C, N, S) contents of *M. truncatula* plants showed increasing S availability and starvation resistance in plants interacting with the AM fungus *R. irregularis* (Casieri et al. 2012). In the same study, transcript accumulation analysis of eight putative *M. truncatula* sulphate transporters (MtSULTRs) revealed differential regulation due to S starvation conditions ($\leq 10 \mu\text{M}$) and to AM interactions. It is noteworthy that the induced transcription of two transporters (*MtSULTR1.1* and *MtSULTR1.2* in Fig. 6), preferentially found in root tissues, was observed at all sulphate concentrations upon AM interaction. Similarly, other transporters (*MtSULTR2.1* and *MtSULTR2.2*) were also upregulated. Comparisons between mycorrhized and non-mycorrhized conditions, showing putative SULTRs in leguminous plants affected by AM interactions, highlighted their possible contribution to the direct or mycorrhizal-sulphate uptake pathways (Casieri et al. 2012). Although S uptake and assimilation pathways are repressed by normal or high sulphate concentrations (Vauclare et al. 2002; Buchner et al. 2004), contrasting evidence appears in mycorrhized plants where S content and uptake are enhanced whatever the sulphate concentration. Differences from the derepression mechanism observed at the transcriptional level, observed in *Arabidopsis* after supplying sulphate to S-deprived plants (Maruyama-Nakashita et al. 2003; Nikiforova et al. 2005), could suggest differences in the mechanisms that regulate plant S sensing, S assimilation and/or feedback repression due to S-containing compounds occurring in AM-interacting plants.

The ability of mycorrhizal fungi to transfer N and P from organic compounds has been shown by different authors (Banerjee et al. 2003; Guo et al. 2007). Recently, the possible S uptake from organic sources by mycorrhized plants was investigated by means of ^{35}S -labelling experiments performed on transformed carrot roots (*Daucus carota*) and monoxenically

grown *R. irregularis* (Allen and Shachar-Hill 2009). More generally, sulphate transfer through AM fungi was studied earlier, but different studies report contrasting results. In fact, the increase in $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ uptake in mycorrhized red clover and maize plants was shown by Gray and Gerdemann (1973) using the AM fungus *F. mosseae*. In agreement with their report, Rhodes and Gerdemann (1978) showed mycorrhizal induction of sulphate uptake by onion using *R. fasciculatus*. However, Cooper and Tinker (1978), using white clover and onion as model plants, failed to confirm *F. mosseae*-induced $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ transfer in two-compartment plates. The S uptake mechanisms used by the AM fungus and the specific compounds that are transferred through the fungal mycelium to allocate sulphur are still unknown. Another interesting aspect to address is how the mycobiont regulates the transfer of S-rich compounds at the plant–fungus interface. The future unraveling of the genome of the most studied AM fungus, *R. irregularis* DAOM-197198, will probably shed light on these questions and may open new perspectives regarding plant–fungus S-based nutrient exchanges.

Sulphate transport in ectomycorrhiza

Most works concerning plant nutrition and ECM interactions address the fundamental questions of how plant P and N uptake is improved thanks to the mycobiont and how much fixed C is given by the plant in return for these nutrients. Great efforts have been made to unravel the mechanisms of nutrient exchanges (see other chapters in this review), but sulphate and in general S-containing compounds have not been deeply investigated so far.

Figure 6 shows putative sulphate transporters (SULTRs) from ECM host plants and their phylogenetic relationships with AM hosts. Amino acid sequences from *Arabidopsis thaliana* SULTRs were aligned and used to construct a consensus sequence. Part of this consensus sequence, 131 amino acids with sequence identity ranging from 75 to 100 %, was blasted on the NCBI server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in order to retrieve amino acid sequences from the AM and ECM hosts most commonly used in mycorrhization experiments. The phylogenetic analysis included 61 aligned amino acid sequences, and evolutionary history was inferred using the maximum parsimony method out of a total of 785 parsimonious informative positions. In order to evaluate the number of replicate trees in which the associated taxa clustered together, bootstrap analysis (1,000 replicates) was performed. *S. cerevisiae* sulphate permeases (*ScSUL1* and *ScSUL2*; Cherest et al. 1997) were used as an outgroup to root the plants' SULTRs phylogenetic tree (Fig. 5).

ECM host SULTRs (diamonds in Fig. 6) were distributed among the four SULTR groups (as defined by Takahashi et al. 2011). *Populus tremula* interacts with different ECM fungi and, from our results, is the host species with the

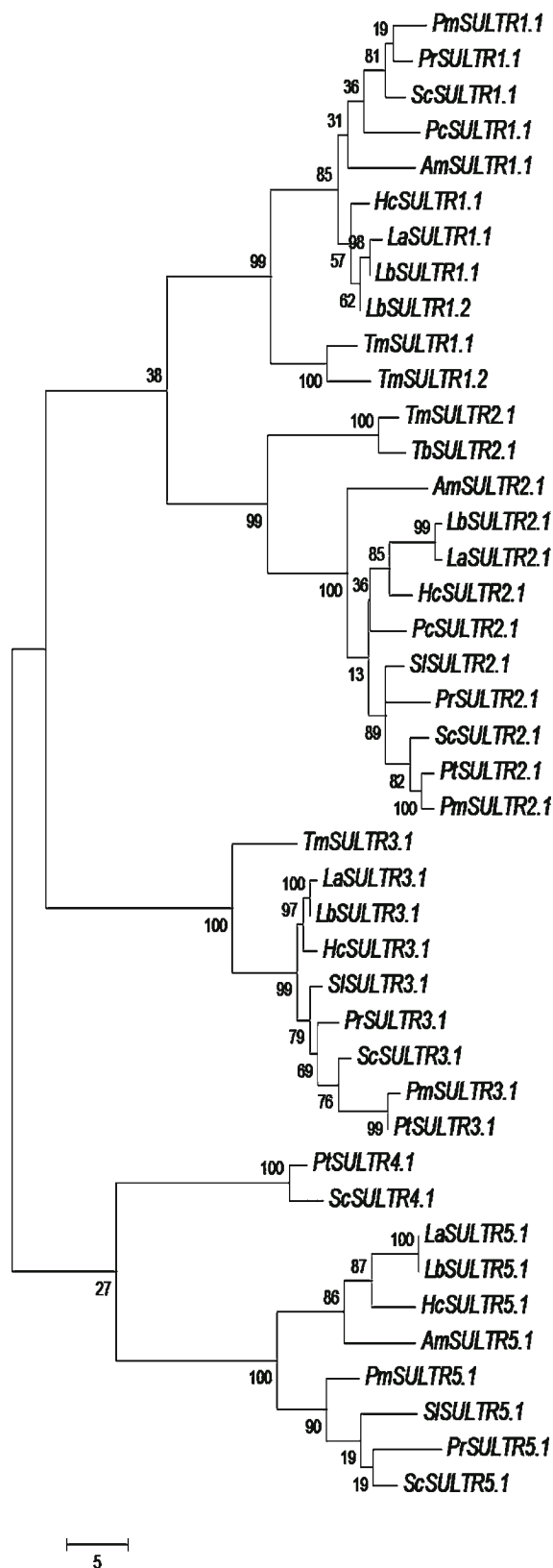
highest number of putative SULTRs: two candidates in groups 1 and 4, three candidates in group 2 and eight candidates in group 3. The close phylogenetic relationship with the group 1 and 2 SULTRs from *Medicago* and *Lotus* (*MtSULTR1.1*; *MtSULTR1.2*; *LjSULTR-p chr6.CM0314.360*; *MtSULTR2.1*; and *MtSULTR2.2*), which are differentially expressed during mycorrhizal interactions (Casieri et al. 2012; Guether et al. 2009b), could indicate putative Myc-inducible SULTR candidates that play a role in sulphate uptake during ECM interactions.

Although genome-wide approaches of some ECM fungal species have been carried out (i.e. *L. bicolor*; Martin et al. 2008), there is still a knowledge gap regarding genes that control S uptake. Unraveling the contribution of ECM fungi to plant S uptake would shed light onto the complexity of nutrient exchanges during ECM interactions. For this reason, the putative SULTRs of different ECM fungi were retrieved by blasting the most conserved part of the consensus sequence from *S. cerevisiae* sulphate permeases (ScSULP) against public databases. The coding sequences were aligned and the phylogenetic relationships between SULTRs of different ECM fungi were calculated (Fig. 7 and ESM Table S4). The characterization and localization of these putative SULTRs and the sequencing and annotation of new ECM fungal species could help understand whether sulphate is the exchange form of S during plant–fungus symbiosis and how the fungus senses S and manages its allocation.

Ion transport systems—channels and transporters

In addition to the extensively described improvement of plant N and P nutrition by symbiotic fungi, physiological studies also highlight an improvement of the absorption of other ions such as potassium or various secondary macro- and microelements (Marschner and Dell 1994; Buscot et al. 2000; Cairney 2005; Smith and Read 2008). Clearly, all these nutrient exchanges between the two partners require

Fig. 7 Unrooted phylogenetic tree of sulphate transporters (*SULTRs*) from ECM fungi. The evolutionary history was inferred using maximum parsimony (MP) on 42 aligned amino acid sequences. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (3,000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein 1985). The MP tree was obtained using the Subtree-Pruning-Regrafting algorithm (Nei and Kumar 2000), in which the initial trees were obtained by the random addition of sequences (100 replicates). The tree is drawn to scale, with branch lengths calculated using the average pathway method. A total of 352 parsimonious informative positions were considered in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura et al. 2011). Species code: *Am* *Amanita muscaria*, *Hc* *Hebeloma cylindrosporum*, *La* *Laccaria amethystina*, *Lb* *Laccaria bicolor*, *Pr* *Paxillus rubicundulus*, *Pc* *Piloderma croceum*, *Pm* *Pisolithus microcarpus*, *Pt* *Pisolithus tinctorius*, *Sc* *Scleroderma citrinum*, *Sl* *Suillus luteus*, *Tb* *Tuber borchii*, *Tm* *Tuber melanosporum*



a number of transport systems, both on the fungal membrane sites that take up mineral nutrients from the soil and deliver them to plant root cells and on the plant membrane interface (Smith et al. 1994; Hahn and Mendgen 2001). These membrane transport systems include ion channels and transporters that differ in their transport mechanism, selectivity, affinity and regulation. Such channels or transporters—especially for ECM fungi—have been identified (Chalot et al. 2002). In the last decade, identification has been faster thanks to the use of EST libraries from *H. cylindrosporium* (Lambilliotte et al. 2004; Wipf et al. 2003) or *P. involutus* (Morel et al. 2005; Wright et al. 2005a) and, more recently, of whole-genome sequencing data (Martin et al. 2008, 2010; Plett and Martin 2011). However, characterization of the various transport systems and assignment of their physiological roles within the symbiotic context is far from being completed. Interestingly, symbiotic ion transport has to be assessed not only in the context of nutrition but also in relation to signalling between fungi and host plants (Ramos et al. 2011a). More particularly, Ca^{2+} spiking and oscillations have been reported to be induced in host plant cells by AM fungi (Kosuta et al. 2008).

Potassium transport

Potassium, which represents the third primary mineral macronutrient and the most abundant cation in a plant cell, is pivotal for plant nutrition and growth. Its accumulation by plants is ensured by a whole set of different transport systems that contribute to maintaining cytosolic concentrations of 60–150 mM (Leigh and Jones 1984). K^+ plays a role at both cellular and whole plant levels. Potassium uptake by symbiotic fungi leading to increased plant K^+ absorption has been reported for both ECM and AM associations (Marschner and Dell 1994). However, putatively involved K channels and transporters have so far only been identified in ECM. Potassium transport has been rather well described on a molecular level in yeast and plants (Rodríguez-Navarro 2000; Ramos et al. 2011b).

Potassium transport in arbuscular mycorrhiza

Increases in potassium uptake in AM-interacting plants have been reported (Smith and Read 2008). For example, greater K^+ uptake has been shown in mycorrhizal plants upon interaction with *R. fasciculatus* (Huang et al. 1985). Up to 10 % of the K^+ uptake in mycorrhized couch grass (*Elymus repens*) was mediated by ERM uptake (Li et al. 1991a). Significant improvements of K^+ acquisition by olive trees upon AM interaction with *R. irregularis*, *Claroideoglomus claroideum* and *F. mosseae* were 3.4-, 3.7- and 6.4-fold, respectively, and contributed to enhanced resistance against salt stress (Porrás-Soriano et al. 2009). The interaction between plant K^+ status

and hydraulic properties was recently studied in the AM between *Zea mays* and *R. irregularis* (El-Mesbahi et al. 2012). The authors showed that K^+ supply caused an increase in hydraulic conductivity, indicating K^+ uptake only in AM-mycorrhized plants. A specific co-localization and similar K^+/P_i ratios between in *R. irregularis* spores, hyphae (Olsson et al. 2008) and vesicles (Olsson et al. 2011) suggest an interaction between these elements and therefore a tight regulation of transport processes.

Improvement of K^+ nutrition upon AM interaction could be due to enhanced expression and activity of plant K^+ transport systems and/or the presence of efficient K^+ transporters in the ERM that extends through the soil. Indeed, a plant K^+ transporter belonging to the K^+ uptake permease (KUP) family was found 44-fold upregulated in mycorrhizal roots of *L. japonicus* (Guether et al. 2009b), whereas in *M. truncatula* a K^+ transporter from the same KUP family (Mtr. 32208.S1_at) was 28-fold induced by nodulation, but not by AM (Benedito et al. 2010).

However, direct molecular identification and characterization of K^+ transport systems for AM fungi is as yet missing. The available EST sequences from *R. irregularis* (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/GlomusGenome>) allow for the identification of seven short sequences related to K^+ transport systems. The BlastX on the ECM fungus *H. cylindrosporium* genome database suggests that four sequences could belong to the voltage-gated K^+ channels of the *Shaker*-like family, two sequences are probably related to β -subunits that putatively interact with K^+ channels of the *Shaker* family, and one sequence seems to be close to the KUP/HAK transporter family. Complete full-length cloning is necessary to unravel the mechanisms of K^+ transport systems in *R. irregularis*.

Potassium transport in ectomycorrhiza

The beneficial effects of ECM symbiosis for plant K nutrition are widely described (Rygiewicz and Bledsoe 1984; Smith and Read 2008). Net K^+ uptake was measured for three different ECM fungi to determine their kinetic parameters and their interaction with NH_4^+ (Jongbloed et al. 1991). Potassium uptake by the fungus was also shown using ^{86}Rb as the tracer (Finlay 1992). Jentschke et al. (2001) reported that at least 5–6 % of total K^+ in Norway spruce seedlings is provided by the ECM fungus. Improvement of K^+ homeostasis by *P. involutus* in mycorrhized poplar under salt stress has also been reported recently (Li et al. 2012). Mobilization of K^+ (and other minerals) by ECM fungi represents a possible mechanism involved in the observed improvement of K^+ nutrition (Jongmans et al. 1997; Wallander and Wickman 1999; Landeweert et al. 2001). Expression regulation of plant K^+ transport systems upon ECM interaction can be assumed, but has not been reported so far. In addition, the presence of

high-capacity K^+ absorption transporters in fungi can be assumed too.

Recent sequencing data confirm the presence of a whole set of K^+ transporters in ECM fungi. Members of the K^+ transporter families Trk/Ktr/HKT (Corratgé et al. 2007; Corratgé-Faillie et al. 2010) previously identified in yeast (Gaber et al. 1988; Ko and Gaber 1991), KUP/HAK described in *Neurospora crassa*, yeast and plants (Haro et al. 1999; Grabov 2007), as well as K^+ channels from the TOK family or from the *Shaker*-like family (Lambilliotte et al. 2004) were identified partly from EST libraries and are represented in the sequenced genomes of ECM fungi. Both K^+ channel families are structurally distinct from each other. Members of the *Shaker*-like family are characterized by the presence of six transmembrane domains including a K^+ -selective pore, whereas members of the TOK family harbor eight transmembrane domains and two K^+ -selective pore domains. Interestingly, voltage-dependent K^+ channels from the *Shaker*-like family, originally described in animals (Papazian et al. 1987; Jan and Jan 1997) and later in plants (Sentenac et al. 1992; Gambale and Uozumi 2006), have, to our knowledge, not been found in yeast or in higher fungi.

In contrast, the TOK family was first reported in yeast (Ketchum et al. 1995), but never in animals or plants, and seems to be specific for yeast and higher fungi. Nevertheless, functional characterization has so far only been achieved for *H. cylindrosporium* K^+ transporter Trk1 (Corratgé et al. 2007). HcTrk1 complemented a K^+ -deficient yeast mutant and transported K^+ and Na^+ when expressed in *Xenopus* oocytes. Functional characterization of fungal members of the *Shaker*-like family has failed so far, but functional expression of members of the TOK family is currently under investigation (Zimmermann, unpublished data). Further studies are needed to understand the localization and physiological function of these K^+ transporters in the context of symbiotic interactions. The identification of this set of K^+ transporters and channels allows us to state that Trk and KUP transporters could be involved in K^+ absorption from the soil and K^+ channels from the TOK and the *Shaker*-like family for its secretion towards the host plant.

Transport of other ions

Ca and Mg absorption and transport has been shown, e.g. for ECM mycelium (Jentschke et al. 2000, 2001). Ca accumulation as Ca-oxalate was observed in ERM from ectomycorrhized roots of *Pinus radiata* and *Eucalyptus marginata* (Malajczuk and Cromack 1982). Using a vibrating probe to measure net fluxes along non-mycorrhized and mycorrhized roots of *Eucalyptus globulus* colonized by *Pisolithus* sp, Ramos et al. (2009) found that colonized roots had a higher capacity for Ca^{2+} uptake. In addition, Ca^{2+} oscillations, which are generally involved in signalling

during plant–microbe interactions, have been described as part of the signalling between symbiotic partners of the AM symbiosis between *M. truncatula* and *R. irregularis* (Kosuta et al. 2008). Copper and zinc uptake was also increased in AM-interacting plants (Manjunath and Habte 1988). Li et al. (1991b), using *T. repens*, estimated that the AM interaction accounted for up to 62 % of the total Cu uptake. Transcriptional analysis of *M. truncatula* mycorrhiza-induced transporters revealed the upregulation of a zinc–iron permease and of a Ca^{2+} channel from the TRP-CC family (Benedito et al. 2010). Besides the increased Zn uptake in deficient conditions, increased protection against toxicity was also demonstrated (Li and Christie 2001; Zhu et al. 2001). Burleigh et al. (2003) suggested that one protection mechanism could be the downregulation of the plant Zn transporter (in *M. truncatula*) when the root is colonized by AM fungi. Less is known about anion transport. Among the few pieces of evidence available, a chloride channel, belonging to the CIC family, was upregulated upon mycorrhization in *M. truncatula* (Benedito et al. 2010).

The first Zn transporters from the cation diffusion facilitator family were identified in AM fungi (*R. irregularis*; Gonzalez-Guerrero et al. 2005) and ECM fungi (*H. cylindrosporium*; Blaudez and Chalot 2011). The *H. cylindrosporium* transporter HcZnT1 is localized on ER membranes when expressed in yeast and mediates Zn storage in intracellular vesicles. These transporters could play a role in Zn homeostasis, protecting both mycobiont and host plant from Zn stress. Analysis of the *T. melanosporum* genome recently allowed for the identification of 58 metal transporters (Bolchi et al. 2011).

Water channels

Water uptake improvement is a crucial benefit for mycorrhized plants, mainly because it increases their drought resistance (Lehto and Zwiazek 2010; El-Mesbahi et al. 2012). Aquaporins (AQPs) represent a family of channel proteins that mediate the selective movement of water, but also a wide range of small neutral solutes, across the membrane of plants, animals and microbes. Presently, plant AQPs are classified into seven subfamilies, namely plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), NOD26-like intrinsic proteins (NIPs), small basic intrinsic proteins, x intrinsic proteins, hybrid intrinsic proteins and GlpF-like intrinsic proteins (Johanson and Gustavsson 2002; Wallace and Roberts 2004; Danielson and Johanson 2008; Gupta and Sankararamakrishnan 2009). Mycorrhization could stimulate the expression and/or activity of plant aquaporins (Dodd and Ruiz-Lozano 2012), but fungal aquaporins could also directly contribute to a more efficient water transfer from the soil to the host tissues.

So far, scarce data have been available about the identification and the characterization of these water channels in the mycorrhizal context and on their implication in water and solute exchanges between fungi and plants. The movement of water through ERM and between mycorrhizal symbionts is still little understood.

Water transport in arbuscular mycorrhiza

First evidence of the involvement of plant aquaporins in the altered water uptake and transport capacities of mycorrhized plants was reported by Roussel et al. (1997) and Krajinski et al. (2000), who found mycorrhiza-induced expression of TIP aquaporins in parsley and *M. truncatula*. Uehlein et al. (2007) also found that PIP and NIP aquaporin gene expression was upregulated by AM symbiosis in *M. truncatula*. In contrast to the reports of Krajinski et al. (2000) and Uehlein et al. (2007), who used well-watered conditions, several studies deal with the combined influence of AM symbiosis and abiotic stresses on aquaporin gene expression. The effect of reduced expression of the tobacco PIP gene (NtAQP1) was investigated in mycorrhized *NtAQP1*-antisense tobacco plants under drought stress and well-watered conditions (Porcel et al. 2005). Reduction of *NtAQP1* expression had no effect on the colonization by AM fungi. However, under drought stress, the shoot dry weight and the root fresh weight of the wild-type tobacco plants were higher than in the *NtAQP1*-antisense plants. Therefore, NtAQP1-mediated water transport seems to be important for the efficiency of symbiosis under drought conditions. Data from Ouziad et al. (2005) indicate a decrease in the expression of PIP and TIP aquaporins induced by AM colonization and salt stress in tomato. Porcel et al. (2006) observed decreased aquaporin expression in both non-mycorrhized and mycorrhized soybean and lettuce plants under drought stress conditions. In common bean (*Phaseolus vulgaris*), AM symbiosis interfered with aquaporin expression under drought, cold and salinity stresses and prevented stress-induced inhibition of root hydraulic conductance (Aroca et al. 2007). Under drought stress conditions, Ruiz-Lozano et al. (2009) showed that some PIP genes were upregulated by ABA in non-AM maize plants and downregulated in AM plants. However, the downregulation of another PIP gene by ABA was observed in AM plants, whilst in non-AM plants no significant changes were observed for that same gene. In contrast to the results regarding the regulation of host aquaporin expression by AM symbiosis, very few reports describe fungal aquaporins. Aroca et al. (2009) cloned the first aquaporin (GintAQP1) of the AM fungus *R. irregularis*. Its expression was increased in the ERM from the root compartment of root organ cultures when an osmotic NaCl

stress was applied to the hyphal compartment. Furthermore, plant aquaporin gene expression increased when the ERM was stressed by NaCl. The authors assume that there is a communication mechanism between the extra- and intraradical mycelia and even between symbiotic partners, suggesting that a fine dialogue takes place at the plant–fungus interface to determine the water transport of the two partners (Maurel and Plassard, 2011). The recent accession of the *R. irregularis* transcriptome had allowed for the identification of two new aquaporin genes (Tisserant et al. 2012).

Water transport in ectomycorrhiza

Although plant AQPs have been extensively studied so far (Maurel et al. 2008, 2009; Wudick et al. 2009), their implication in ECM interactions is poorly understood. In a *P. tremula* × *tremuloides* cDNA library, seven aquaporin genes were identified, and functional expression in *Xenopus* oocytes confirmed their water permeability (Marjanovic et al. 2005a). The transcripts of two of them (*PttPIP1.1* and *PttPIP2.5*) were increased during symbiosis, suggesting a putative role in water uptake in symbiotic conditions. In addition, a higher transcript level of *PttPIP2.2* and *PttPIP2.4* poplar genes was described in mycorrhized plants under drought stress (Marjanovic et al. 2005b). In contrast, two *Betula pendula* major intrinsic protein (MIP) drought markers were downregulated during *P. involutus* early mantle development and Hartig net formation (Le Quéré et al. 2005). However, the expression level of these two genes became equivalent between non-mycorrhized plants and mycorrhized plants at later stages. Thus, the drought resistance mechanism that occurs during the early stage of symbiosis establishment and is characterized by the downregulation of these two MIPs was reversed. These data suggest that the protection of plants from drought stress by mycorrhization is partially mediated by a reorganization of plant aquaporin expression.

On the fungal side, a recent study deals with the role of fungal AQPs during the ECM interaction between *P. tremula* × *tremuloides* and *L. bicolor* (Dietz et al. 2011). Gene expression, protein function and the putative roles in symbiosis of several genes (one classical aquaporin, three Fps-like aquaglyceroporins and two other aquaglyceroporins) were investigated. Five of these six fungal proteins were water-permeable during heterologous expression in *Xenopus* oocytes, whereas the two Fps-like aquaglyceroporins, Lacbi1:317173 and Lacbi1:391485, which were upregulated during symbiosis, were permeable to $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ in yeast cells; these data suggest an implication of the fungal N transport towards the plant. This kind of protein was already considered as part of an alternative N transport system to the host plant (Chalot et al. 2006). However, this was the first evidence of N export out of fungal cells by AQPs, confirming the capacity of these water channels to transport not only water but also low-

molecular-weight compounds (Wudick et al. 2009). To carry on with the study of higher fungi AQPs, analyses of their membrane localization, posttranslational regulation and of their exact role in mycorrhization remain to be performed (Maurel and Plassard 2011). Recently, access to the ECM fungus *H. cylindrosporum* genome showed a panel of six AQP-like members, similar to *L. bicolor* (personal communication).

In the coming years, it will be critical to study the localization of plant and fungal AQPs in the context of mycorrhizal symbiosis to better understand their role in soil–fungus–plant water continuum fluxes.

Future challenges

Mycorrhizal fungi render a wide range of ecosystem services. Unraveling the mechanisms that underlie high nutrient use efficiency by mycorrhizal plants and carbon allocation in a context of mutualistic biotrophic interactions is therefore critical for managing croplands and forests soundly. Indeed, nutrient availability, uptake and exchange in biotrophic interactions drive plant growth and modulate biomass allocation. These parameters are central for plant yield, a major issue in the context of high biomass production. Substantial evidence on how the rational use of mycobiont properties could significantly contribute to decreasing fertilizer and pesticide use in agriculture and forestry has accumulated. Interestingly, as highlighted in the present review, in the last decade, several studies focusing on mycorrhizal interactions have identified some key transporters for nutrient uptake or metabolite transfer at the biotrophic interface. Knowledge about the transportome blueprint at the biotrophic interface has drastically increased. For example, huge progress has been made in the understanding of the P transportome of mycorrhizal plants, especially in AM symbiosis, with the evidencing of a mycorrhizal pathway (MP) different from the direct plant pathway (DP). The MP is mediated by AM-inducible plant Pht1 transporters whose deletion or impaired expression dramatically reduces arbuscule formation and plant P accumulation. In the same trend of thought, it is important to mention that although several nitrogen (ammonium, nitrate, amino acid, peptide) transporters are now identified and characterized for both plant and fungal partners, the nature of the nitrogen compounds exchanged between fungi and plant cells is still unclear. We can also note that in *Medicago*, for example, the sucrose transporter family has been identified, but no study has yet focused on the 50-odd putative monosaccharide transporters, let alone on their role in mycorrhizal association.

The transportome map with its highways and crossroads is still far from complete. Major actors of the mycorrhizal

transportome of nutrient efflux at biotrophic interfaces are still missing, and the regulation of nutrient exchanges inside and between organisms is still poorly understood. However, recent advances are going to help identify and characterize the key transporters of mycorrhizal interactions. Transcriptomic and metabolomic analyses at the different interfaces (soil–fungi versus fungi/plant cells) using laser capture microdissection will be essential for determining the functional polarization of transporters at the two interfaces. New studies focusing on (1) the functional polarization of transporters at the biotrophic interfaces and (2) the understanding of how plant and fungal partners regulate reciprocal nutrient exchanges are highly required.

Acknowledgments All the authors of this work are thankful for the support of the ANR TRANSMUT (ANR-10-BLAN-1604-0). LC, NAL, JD, LB, MC and DW received financial support from the Burgundy Regional Council (PARI Agrale 8); NAL and DW received financial support from the Université Franco Italienne/Università Italo Francese. PEC received financial support from the Swiss National Science Foundation (grant no. PZ00P3_136651).

References

- Allen JW, Shachar-Hill Y (2009) Sulfur transfer through an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 149:549–560
- Aroca R, Bago A, Sutka M, Paz JA, Cano C, Amodeo G, Ruiz-Lozano JM (2009) Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Mol Plant Microbe Interact* 22(9):1169–1178
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytol* 173:808–816
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol* 131:1496–1507
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* 124:949–957
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H, Hohnjec N (2010) Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 152(2):1000–1014
- Baker FR, Leach KA, Braun DM (2012) SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Mol Plant* 5:766–768. doi:10.1093/mp/SSS054
- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Mol Plant Microbe Interact* 20(9):1055–1062
- Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF (2011) The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* 62:1049–1060
- Banerjee R, Evande R, Kabil O, Ojha S, Taoka S (2003) Reaction mechanism and regulation of cystathionine beta-synthase. *Biochim Biophys Acta* 1647:30–35

- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15:620–627
- Benedito VA, Li H, Dai X, Wandrey M, He J, Kaundal R, Torres-Jerez I, Gomez SK, Harrison MJ, Tang Y, Zhao PX, Udvardi MK (2010) Genomic inventory and transcriptional analysis of *Medicago truncatula* transporters. *Plant Physiol* 152:1716–1730
- Benjdia M, Rikirsch E, Müller T, Morel M, Corratgé C, Zimmermann S, Chalot M, Frommer WB, Wipf D (2006) Peptide uptake in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*: characterization of two di- and tripeptide transporters (HcPTR2A and B). *New Phytol* 170(2):401–410
- Blaudez D, Chalot M (2011) Characterization of the ER-located zinc transporter ZnT1 and identification of a vesicular zinc storage compartment in *Hebeloma cylindrosporium*. *Fungal Genet Biol* 48:496–503
- Blee KA, Anderson AJ (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Mol Biol* 50(2):197–211
- Blee KA, Anderson AJ (1998) Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant J* 16(5):523–530
- Bolchi A, Ruotolo R, Marchini G, Vurro E, di Toppi LS, Kohler A, Tisserant E, Martin F, Ottonello S (2011) Genome-wide inventory of metal homeostasis-related gene products including a functional phytochelatin synthase in the hypogeous mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Fungal Genet Biol* 48:573–584
- Boldt K, Pörs Y, Haupt B, Bitterlich M, Kühn C, Grimm B, Franken P (2011) Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *J Plant Physiol* 168(11):1256–1263
- Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, Elkrog A, Schauer L, Scheible WR, Krajinski F (2010) Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 23(7):915–926
- Bucher M, Wegmüller S, Drissner D (2009) Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Curr Opin Plant Biol* 12:500–507
- Buchner P, Stuiver CE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ (2004) Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiol* 136:3396–3408
- Bücking H, Hans R, Heysler W (2007) The apoplast of ectomycorrhizal roots-site of nutrient uptake and nutrient exchange between the symbiotic partners. In: Sattelmacher B, Horst WJ (eds) *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions*, Springer, Dordrecht, pp 97–108
- Bun-ya N, Shikata K, Nakade S, Yompakdee S, Harashima S, Oshima Y (1996) Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29:344–351
- Bun-ya N, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y (1991) The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* 11:3229–3238
- Burleigh SM, Harrison MJ (1998) Characterization of the *Mt4* gene from *Medicago truncatula*. *Gene* 216:47–53
- Burleigh SH, Kristensen BK, Bechmann IE (2003) A plasma membrane zinc transporter from *Medicago truncatula* is up-regulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization. *Plant Mol Biol* 52:1077–1088
- Buscot A, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R (2000) Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 24:601–614
- Cairney JWG (2005) Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycol Res* 109:7–20
- Cao J, Huang J, Yang Y, Hu X (2011) Analyses of the oligopeptide transporter gene family in poplar and grape. *BMC Genomics* 12:465
- Cappellazzo G, Lanfranco G, Fitz M, Wipf D, Bonfante P (2008) Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol* 147:429–437
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* 280(22):21437–21443
- Casieri L, Gallardo K, Wipf D (2012) Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulfate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. *Planta* 235:1431–1447
- Chalot M, Plassard C (2011) Ectomycorrhiza and nitrogen provision to the host tree. In: Polacco JC, Todd CD (eds) *Ecological aspects of nitrogen metabolism in plants*. Wiley, Hoboken, NJ. doi:10.1002/9780470959404.ch4
- Chalot M, Blaudez D, Brun A (2006) Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends Plant Sci* 11:263–266
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D, Botton B (2002) An update on nutrient transport process in ectomycorrhizas. *Plant Soil* 244:165–175
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335(6065):207–211
- Chen AQ, Gu MA, Sun SB, Zhu LL, Hong SA, Xu GH (2011) Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and PIBS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytol* 189:1157–1169
- Chen XY, Hampp R (1993) Sugar uptake by protoplasts of the ectomycorrhizal fungus, *Amanita muscaria* (L. ex fr.) Hooker. *New Phytol* 125:601–608
- Cherest H, Davidian JC, Thomas D, Benes V, Ansoorge W, Surdin-Kerjan Y (1997) Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145:627–635
- Chiou TJ, Liu H, Harrison MJ (2001) The spatial expression patterns of a phosphate transporter (*MtPT1*) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant J* 25:281–293
- Clemmensen KE, Sorensen PL, Michelsen A, Jonasson S, Ström L (2008) Site-dependent N uptake from N-form mixtures by arctic plants, soil microbes and ectomycorrhizal fungi. *Oecologia* 155(4):771–783
- Cooper KM, Tinker PB (1978) Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. 2. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulfur. *New Phytol* 81:43–52
- Corbière HLF (2002) The importance of sucrose synthase for AM symbiosis in maize, in pea and in *Medicago*. PhD thesis, University of Basel Doctoral Program. http://edoc.unibas.ch/120/1/DissB_6835.pdf. Accessed 10 July 2002
- Corratgé-Faillie C, Jabnoun M, Zimmermann S, Véry AA, Fizames C, Sentenac H (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci* 67:2511–2532
- Corratgé C, Zimmermann S, Lambilliotte R, Plassard C, Marmeisse R, Thibaud JB, Lacombe B, Sentenac H (2007) Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *J Biol Chem* 282:26057–26066
- Corrêa A, Hampp R, Magel E, Martins-Loução M-A (2011) Carbon allocation in ectomycorrhizal plants at limited and optimal N

- supply: an attempt at unraveling conflicting theories. *Mycorrhiza* 21:35–51
- Couturier J, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D, Chalot M (2007) The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytol* 174:137–150
- Danielson JA, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8:45
- Davidian J-C, Hatzfeld Y, Cathala N, Tagmount A, Vidmar JJ (2000) Sulfate uptake and transport in plants. In: Brunold C, Rennenberg H, De Kok LJ, Stulen I, Davidian J-C (eds) Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: molecular, biochemical and physiological aspects. Paul Haupt, Bern, pp 19–40
- Daza A, Manjón JL, Camacho M, Romero de la Osa L, Aguilar A, Santamaría C (2006) Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro culture of several isolates of *A. muscaria caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. *Mycorrhiza* 16:133–136
- Deveau A, Kohler A, Frey-Klett P, Martin F (2008) The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytol* 180:379–390
- Dietz S, von Bülow J, Beitz E, Nehls U (2011) The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *New Phytol* 190:927–940
- Dodd IC, Ruiz-Lozano M (2012) Microbial enhancement of crop resource use efficiency. *Curr Opin Biotechnol* 23:236–242
- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D (2012a) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci* 17(7):413–422
- Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, Corneillat M, Alcaraz G, Wipf D (2012b) The *Medicago truncatula* sucrose transporter family. Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Plant* 5(6):1346–1358
- Drissner D, Kunze G, Callewaert N, Gehrig P, Tamasloukht MB, Boller T, Felix G, Amrhein N, Bucher M (2007) Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* 318:265–268
- El-Mesbahi MN, Azcón R, Ruiz-Lozano JM, Aroca R (2012) Plant potassium content modifies the effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on root hydraulic properties in maize plants. *Mycorrhiza* 22:555–564. doi:10.1007/s00572-012-0433-3
- Eriksen J, Askegaard M (2000) Sulphate leaching in an organic crop rotation on sandy soil in Denmark. *Agric Ecosyst Environ* 78:107–114
- Facelli E, Smith SE, Facelli JM, Christophersen HM, Smith FA (2010) Underground friends or enemies: model plants help to unravel direct and indirect effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant competition. *New Phytol* 185:1050–1061
- Fajardo Lopez M, Dietz S, Grunze N, Bloschies J, Weiss M, Nehls U (2008) The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soilgrowing hyphae. *New Phytol* 180:365–378
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H (2012) Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2666–2671
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Finlay R (1992) Uptake and translocation of nutrients by ectomycorrhizal fungal mycelia. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds) Mycorrhizas in ecosystems. CAB International, Wallingford, UK, pp 91–97
- Finlay R, Read DJ (1986) The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytol* 103:157–165
- Foley JA, DeFries R, Asner JP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N, Snyder PK (2005) Global consequences of land use. *Science* 209:570–574
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* 11:861–905
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8:2848–2859
- Gabriel-Neumann E, Neumann G, Leggewie G, George E (2011) Constitutive overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato plants increases arbuscular mycorrhiza fungal root colonization under high, but not under low, soil phosphorus availability. *J Plant Physiol* 168(9):911–919
- Gambale F, Uozumi N (2006) Properties of *Shaker*-type potassium channels in higher plants. *J Membr Biol* 210:1–19
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2007) Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Phys Plant* 129(4):737–746
- García-Rodríguez S, Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2005) Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza* 15:489–496
- Gaude NS, Bortfeld DN, Lohse M, Krajinski F (2012) Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *Plant J* 69(3):510–528
- Ge L, Sun S, Chen A, Kapulnik Y, Xu G (2008) Tomato sugar transporter genes associated with mycorrhiza and phosphate. *Plant Growth Regul* 55:115–123
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20(8):519–530
- Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M, Gianinazzi S (2000) Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211:609–613
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA (1991) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular–arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* 117(1):61–74
- Glassop D, Smith SE, Smith FWQ (2005) Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta* 222:688–698
- Gobert A, Plassard C (2007) Kinetics of NO₃⁻ net fluxes in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association, as affected by the presence of NO₃⁻ and NH₄⁺. *Plant Cell Environ* 30:1309–1319
- Gobert A, Plassard C (2002) Differential NO₃⁻ dependent patterns of NO₃⁻ uptake in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association. *New Phytol* 154:509–516
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ (2009) *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biol* 9:10
- Gonzalez-Guerrero M, Azcon-Aguilar C, Mooney M, Valderas A, MacDiarmid CW, Eide DJ, Ferrol N (2005) Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genet Biol* 42:130–140
- Grabov A (2007) Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family—multiple functions. *Ann Bot* 99:1035–1041
- Graham JH (2000) Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. In: Podila GK, Douds DD Jr (eds) Current advances in mycorrhizae research. APS Press, St. Paul, pp 127–140

- Gray LE, Gerdemann JW (1973) Uptake of sulphur-35 by vesicular arbuscular mycorrhizae. *Plant Soil* 39:687–689
- Grünwald U, Guo W, Fischer K, Isayenkov S, Ludwig-Müller J, Hause B, Yan X, Küster H, Franken P (2009) Overlapping expression patterns and differential transcript levels of phosphate transporter genes in arbuscular mycorrhizal, Pi-fertilised and phytohormone-treated *Medicago truncatula* roots. *Planta* 229:1023–1034
- Grunze N, Willmann M, Nehls U (2004) The impact of ectomycorrhizal formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytol* 164:147–155
- Guescini M, Zeppa S, Pierleoni R, Sisti D, Stocchi L, Stocchi V (2007) The expression profile of the *Tuber borchii* nitrite reductase suggests its positive contribution to host plant nitrogen nutrition. *Curr Genet* 51:31–41
- Guescini M, Pierleoni R, Palma F, Zeppa S, Vallorani L, Potenza L, Sacconi P, Giomaro G, Stocchi V (2003) Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. *Mol Gen Genom* 269:807–816
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P (2009a) A Mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* 150:73–83
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, Bonfante P (2009b) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytol* 182:200–212
- Guidot A, Verner MC, Debaud JC, Marmeisse R (2005) Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* 15:167–177
- Guo T, Zhang JL, Christie P, Li XL (2007) Pungency of spring onion as affected by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulfur supply. *J Plant Nutr* 30:1023–1034
- Gupta AB, Sankaramakrishnan R (2009) Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol* 9:134
- Hahn M, Mendgen K (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 4:322–327
- Hammer EC, Pallon J, Wallander H, Olsson PA (2011) Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *FEMS Microbiol Ecol* 76:236–244
- Haro R, Sainz L, Rubio F, Rodríguez-Navarro A (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 31:511–520
- Harrison MJ (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 59:19–42
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14:2413–2429
- Harrison MJ (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular–arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J* 9:491–503
- Harrison MJ, Van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378:626–629
- Hatakeyama T, Ohmasa M (2004) Mycelial growth of strains of the genera *Suillus* and *Boletinus* in media with a wide range of concentrations of carbon and nitrogen sources. *Mycoscience* 45:169–176
- Hauser M, Narita V, Donhardt AM, Naider F, Becker JM (2001) Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol* 18:105–112
- Helber N, Wipfel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011) A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23:3812–3823
- Hendricks JJ, Mitchell RJ, Kuehn KA, Pecot SD, Sims SE (2006) Measuring external mycelia production of ectomycorrhizal fungi in the field: the soil matrix matters. *New Phytol* 171:179–186
- Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H (2002) Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Physiol Plant* 115:125–136
- Ho I, Trappe JM (1973) Translocation of ^{14}C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 224:30–31
- Hobbie EA (2006) Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with below-ground allocation in culture studies. *Ecology* 87:563–569
- Hodge A, Fitter AH (2010) Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13754–13759
- Högberg MN, Högberg P (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytol* 154:791–795
- Hogekamp C, Arndt D, Pereira PA, Becker JD, Hohnjec N, Kuster H (2011) Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-Box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiol* 157(4):2023–2043
- Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different glomus fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 137(4):1283–1301
- Hohnjec N, Perlick AM, Pühler A, Küster H (2003) The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 16(10):903–915
- Huang CH, Peng J (2005) Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15512–15517
- Huang RS, Smith WK, Yost RS (1985) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth, water relations, and leaf orientation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *New Phytol* 99:229–243
- Jan LY, Jan YN (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* 20:91–123
- Jargeat P, Rekanalt D, Verner MC, Gay G, Debaud JC, Marmeisse R, Fraissinet-Tachet L (2003) Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Curr Genet* 43:199–205
- Jargeat P, Gay G, Debaud JC, Marmeisse R (2000) Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. *Mol Gen Genet* 263:948–956
- Javelle A, Morel M, Rodríguez-Pastrana BR, Botton B, André B, Marini AM, Brun A, Chalot M (2003) Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mol Microbiol* 47:411–430
- Javelle A, Rodríguez-Pastrana BR, Jacob C, Botton B, Brun A, André B, Marini AM, Chalot M (2001) Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Lett* 505:393–398
- Javot H, Penmetsa RV, Breuille F, Bhattarai KK, Noar RD, Gomez SK, Zhang Q, Cook DR, Harrison MJ (2011) *Medicago truncatula* MtPT4 mutants reveal a role for nitrogen in the

- regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J* 68(6):954–965
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007a) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1720–1725
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ (2007b) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ* 30:310–322
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Godbold DL (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* 149:327–338
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Becker JS, Godbold DL (2000) The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant Soil* 220:243–246
- Johanson U, Gustavsson S (2002) A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol* 19:456–461
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275–282
- Jongbloed RH, Clement JMAM, Borst-Pauwels GWFH (1991) Kinetics of NH_4^+ and K^+ uptake by ectomycorrhizal fungi. Effect of NH_4^+ on K^+ uptake. *Physiol Plant* 83:427–432
- Jongmans AG, Van Breemen N, Lundström U, Finlay RD, van Hees PAW, Giesler R, Melkerud PA, Olsson M, Srinivasan M, Unestam T (1997) Rock eating fungi. *Nature* 389:682–683
- Jordy MN, Azemar LS, Brun A, Botton B, Pargney J-C (1998) Cytolocalization of glycogen, starch, and other insoluble polysaccharides during ontogeny of *Paxillus involutus/Betula pendula* ectomycorrhizas. *New Phytol* 140:331–341
- Karandashov V, Nagy R, Wegmuller S, Amrhein N, Bucher M (2004) Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6285–6290
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SAN (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376:690–695
- Kiers ET, Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuise P, Jansa J, Bücking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333:880–882
- Kluge M, Mollenhauer D, Mollenhauer R (1991) Photosynthetic carbon assimilation in *Geosiphon pyriforme* (Kützing) F.v. Wettstein, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacterium. *Planta* 185:311–315
- Ko CH, Gaber RF (1991) TRK1 and TRK2 encode structurally related K^+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11:4266–4273
- Kobae Y, Hata S (2010) Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiol* 51:341–353
- Kobae Y, Tamura Y, Takai S, Banba M, Hata S (2010) Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. *Plant Cell Physiol* 51(9):1411–1415
- Koegel S, Ait Lahmidi N, Arnould C, Chatagnier O, Walder F, Ineichen K, Boller T, Wipf D, Wiemken A, Courty P-E (2013) The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* doi:10.1111/nph.12199
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9823–9828
- Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V, Franken P (2002) *Mth1*, a plasma membrane H^+ -ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biol* 4(6):754–761
- Krajinski F, Biela A, Schubert D, Gianinazzi-Pearson V, Kaldenhoff R, Franken P (2000) Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211:85–90
- Lambilliotte R, Cooke R, Samson D, Fizames C, Gaymard F, Plassard C, Taty MV, Berger C, Laudie M, Legeai F, Karsenty E, Delseny M, Zimmermann S, Sentenac H (2004) Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 164:505–513
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuypers TW, van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* 16(5):248–254
- Larsen PE, Sreedasyam A, Trivedi G, Podila GK, Cseke LJ, Collart FR (2011) Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Syst Biol* 5:70
- 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 Microbe Interact* 18(7):659–673
- Lefebvre B, Furt F, Hartmann MA, Michaelson LV, Carde JP, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule JJ, Mongrand S (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* 144(1):402–418
- Leggiew G, Kolbe A, Lemoine R, Roessner U, Lytovchenko A, Zuther E, Kehr J, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, Fernie AR (2003) Overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* 217:158–167
- Leggiew G, Willmitzer L, Riesmier JW (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9:381–392
- Lehto T, Zwiazek JJ (2010) Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21:71–90
- Leigh RA, Jones RGW (1984) A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and function of this ion in the plant cell. *New Phytol* 97:1–13
- Leustek T (1996) Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. *Physiol Plant* 97:411–419
- Lewandowska M, Sirko A (2008) Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochim Pol* 55:457–471
- Li J, Bao S, Zhang Y, Ma X, Mishra-Knyrim M, Sun J, Sa G, Shen X, Polle A, Chen S (2012) *Paxillus involutus* strains MAJ and NAU mediate K^+/Na^+ homeostasis in ectomycorrhizal *Populus × canadensis* under NaCl stress. *Plant Physiol* 159:1771–1786. doi:10.1104/pp.112.195370
- Li XL, Christie P (2001) Changes in soil solution Zn and pH uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn-contaminated soil. *Chemosphere* 42:201–207
- Li XL, George E, Marschner H (1991a) Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in calcareous soil. *Plant Soil* 136:41–48
- Li XL, Marschner H, George E (1991b) Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant Soil* 136:49–57
- Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG (1998a) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116:91–99

- Liu H, Trieu AT, Blaylock LA, Harrison M (1998b) Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 11(1):14–22
- Loewe A, Einig W, Shi L, Dizengremel P, Hampp R (2000) Mycorrhiza formation and elevated CO₂ both increase the capacity for sucrose synthesis in source leaves of spruce and aspen. *New Phytol* 145:565–574
- Lopez-Pedrosa A, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, Azcon-Aguilar C, Ferrol N (2006) *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet Biol* 43(2):102–110
- Loth-Pereda V, Orsini E, Courty PE, Lota F, Kohler A, Diss L, Blaudez D, Chalot M, Nehls U, Bucher M, Martin F (2011) Structure and expression profile of the phosphate *Phl1* transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiol* 156:2141–2154
- Lucic E, Fourrey C, Kohler A, Martin F, Chalot M, Brun-Jacob A (2008) A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytol* 180:343–364
- Maeda D, Ashida K, Iguchi K, Chechetka SA, Hijikata A, Okusako Y, Deguchi Y, Izui K, Hata S (2006) Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant Cell Physiol* 47:807–817
- Malajczuk N, Cromack K Jr (1982) Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhizal roots of *Pinus radiata* and *Eucalyptus marginata*. *New Phytol* 92:527–531
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant Microbe Interact* 14(10):1140–1148
- Manjunath A, Habte M (1988) Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. *Plant Soil* 106:97–103
- Marjanovic Z, Uehlein N, Kaldenhoff R, Zwiazek JJ, Weis M, Hampp R, Nehls U (2005a) Aquaporins in poplar: what a difference a symbiont makes! *Planta* 222:258–268
- Marjanovic Z, Nehls U, Hampp R (2005b) Mycorrhiza formation enhanced adaptive response of hybrid poplar to drought. *Ann NY Acad Sci* 1048:496–499
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. Academic, London
- Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159(1):89–102
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buee M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeuf F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marcais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splanvallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolucci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464:1033–1038
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Duchaussoy F, Kohler A, Lindquist E, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Danchin EGJ, Delaruelle C, Dettler JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Gibon J, Grimwood J, Hoegger P, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin Y, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-L
- Secq MP, Pereda VP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila G, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders I, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev I (2008) The genome sequence of the basidiomycete fungus *Laccaria bicolor* provides insights into the mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452:88–92
- Martinez P, Persson B (1998) Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258:628–638
- Martino E, Murat C, Vallino M, Bena A, Perotto S, Spanu P (2007) Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. *Curr Genet* 52:65–75
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol* 132:597–605
- Marzluf GA (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:17–32
- Maurel C, Plassard C (2011) Aquaporins: for more than water at the plant–fungus interface? *New Phytol* 190:815–817
- Maurel C, Santoni V, Luu D-T, Wudick MM, Verdoucq L (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expressions and functions. *Curr Opin Plant Biol* 12:690–698
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595–624
- Melin E, Nilsson H (1950) Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiol Plant* 3:88–92
- Montanini B, Viscomi AR, Bolchi A, Martin Y, Siverio JM, Balestrini R, Bonfante P, Ottonello S (2006) Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochem J* 394:125–134
- Montanini B, Moretto N, Soragni E, Percudani R, Ottonello S (2002) A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genet Biol* 36(1):22–34
- 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 Environ Microbiol* 71:382–391
- Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M, Wipf D (2007) Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum*–*Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 68:41–51
- Nagy R, Drissner D, Amrhein N, Jakobsen I, Bucher M (2009) Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. *New Phytol* 181:950–959
- Nagy F, Karandashov V, Chague W, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu GH, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant J* 42:236–250
- Nehls U, Göhringer F, Wittlusk S, Dietz S (2010) Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol* 12:292–301
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Küster H (2007) Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 86:82–91
- Nehls U (2004) Carbohydrates and nitrogen: nutrients and signals in ectomycorrhizas. In: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R (eds) *Plant surface microbiology*. Springer, Berlin, pp 373–392
- Nehls U, Wiese J, Hampp R (2000) Cloning of a *Picea abies* monosaccharide transporter gene and expression—analysis in plant tissues and ectomycorrhizas. *Trees* 14:334–338

- Nehls U, Kleber R, Wiese J, Hampp R (1999) Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytol* 144:343–349
- Nehls U, Wiese J, Guttenberger M, Hampp R (1998) Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol Plant Microbe Interact* 11:167–176
- Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 138:304–318
- Nilsson LO, Giesler R, Baath E, Wallander H (2005) Growth and biomass of mycorrhizal mycelia in coniferous forests along short natural nutrient gradients. *New Phytol* 165:613–622
- Nilsson LO, Wallander H (2003) Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. *New Phytol* 158:409–416
- Nylund JE, Wallander H (1989) Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytol* 112:389–398
- Olsson PA, Hammer EC, Pallon J, van Aarle IM, Wallander H (2011) Elemental composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. *Fungal Biol* 115:643–648
- Olsson PA, Hammer EC, Wallander H, Pallon J (2008) Phosphorus availability influences elemental uptake in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, as revealed by particle-induced X-ray emission analysis. *Appl Environ Microbiol* 74:4144–4148
- Olsson PA, Hansson MC, Burleigh SH (2006) Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. *Appl Environ Microbiol* 72:4115–4120
- 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
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY (1987) Cloning of the genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237:749–753
- Parrent JL, Ty J, Vasaitis R, Taylor AFS (2009) Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sacrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC Evol Biol* 9:148
- Paulsen IT, Skurray RA (1994) The POT family of transport proteins. *Trends Biochem Sci* 19(10):404
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2011) *GintAMT2*, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genet Biol* 48(11):1044–1055
- Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh K, Lundh F (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43:225–244
- Pfeffer PE, Douds DDJ, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120(2):587–598
- Plassard C, Bonafos B, Touraine B (2002) Differential effects of mineral and organic N, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporium* on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. *Plant Cell Env* 23:1195–1205
- Plett JM, Martin F (2011) Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends Genet* 27:14–22
- Polidori E, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guescini M, Menotta M, Agostini D, Palma F, Stocchi V (2007) Hexose uptake in the plant symbiotic ascomycete *Tuber borchii* Vittadini: biochemical features and expression pattern of the transporter TBHXT1. *Fungal Genet Biol* 44:187–198
- Popper Z, Michel G, Herve C, Domozych D, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:567–590
- Porcel R, Aroca R, Azcon R, Ruiz-Lozano JM (2006) PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Mol Biol* 60:389–404
- Porcel R, Gomez M, Kaldenhoff R, Ruiz-Lozano JM (2005) Impairment of *NtAQPI* gene expression in tobacco plants does not affect root colonisation pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decreases their symbiotic efficiency under drought. *Mycorrhiza* 15:417–423
- Porrás-Soriano A, Soriano-Martin ML, Porrás-Piedra A, Azcón R (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *J Plant Physiol* 166:1350–1359
- Poulsen KH, Nagy R, Gao LL, Smith SE, Bucher M, Smith FA, Jakobsen I (2005) Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus. *New Phytol* 168:445–453
- Pumplin N, Zhang X, Noar RD, Harrison MJ (2012) Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E665–E672. doi:10.1073/pnas.1110215109
- Pumplin N, Harrison MJ (2009) Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* 151:809–819
- Ramos AC, Façanha AR, Palma LM, Okorokov LA, Cruz ZMA, Silva AG, Siqueira AF, Bertolazi AA, Canton GC, Melo J, Santos WO, Schmitberger VMB, Okorokova-Façanha AL (2011a) An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Braz J Plant Physiol* 23:79–89
- Ramos J, Ariño J, Sychrová H (2011b) Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 317:1–8
- Ramos AC, Lima PT, Dias PN, Catarina M, Kasuya M, Feijó JA (2009) A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytol* 181:448–462
- Rangel-Castro JI, Danell E, Taylor F (2002) Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 12:131–137
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414:462–466
- Ravnkov S, Wu Y, Graham JH (2003) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytol* 157(3):539–545
- Read DJ, Perez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytol* 157:475–492
- Rhodes LH, Gerdemann JW (1978) Hyphal translocation and uptake of sulfur by vesicular–arbuscular mycorrhizae of onion. *Soil Biol Biochem* 10:355–360
- Roberts DM, Tyerman SD (2002) Voltage-dependent cation channels permeable to NH_4^+ , K^+ , and Ca^{2+} in the symbiosome membrane of the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 128:370–378
- Rodríguez-Navarro A (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469:1–30
- Roitsch T, Gonzalez MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* 9:606–613
- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* 54:513–524

- Roussel H, Bruns S, Gianinazzi-Pearson V, Hahlbrock K, Franken P (1997) Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Sci* 126:203–210
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* 15:2122–2133
- Ruiz-Lozano JM, del Mar AM, Bárzana G, Vernieri P, Aroca R (2009) Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. *Plant Mol Biol* 70:565–579
- Ruzicka DR, Barrios-Masias PH, Jackson LE, Schachtman DP (2012) Transcriptomic and metabolic responses of mycorrhizal roots to nitrogen patches under field conditions. *Plant Soil* 350:145–162
- Rygiewicz PT, Bledsoe CS (1984) Mycorrhizal effects on potassium fluxes by northwest coniferous seedlings. *Plant Physiol* 76:918–923
- Saier MH Jr, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS (1999) The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:257–279
- Salzer P, Hager A (1993) Characterization of wall-bound invertase isoforms of *Picea abies* cells and regulation by ectomycorrhizal fungi. *Physiol Plant* 88:52–59
- Salzer P, Hager A (1991) Sucrose utilization of the ectomycorrhizal fungi *Amantia muscaria* and *Hebeloma rustuliniforme* depends on the cell-wall bound invertase activity of their host *Picea abies*. *Bot Acta* 104:439–445
- Sawers RJH, Yang S-Y, Gutjahr C, Paszkowsky U (2008) The molecular components of nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal interactions. In: Siddiqui ZA, Sayeed M, Futai K (eds) *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. Springer Science-Business Media BV, Dordrecht, pp 37–59
- Schaarschmidt S, González M-C, Roitsch T, Strack D, Sonnwald U, Hause B (2007a) Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiol* 143:1827–1840
- Schaarschmidt S, Kopka J, Ludwig-Müller J, Hause B (2007b) Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases: enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *Plant J* 51:390–405
- Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J Exp Bot* 57(15):4015–4023
- Schaeffer C, Wallenda T, Guttenberger M, Hampp R (1995) Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings. *New Phytol* 129:417–424
- Scherer HW (2001) Sulphur in crop production. *Eur J Agron* 14:81–111
- Schliemann W, Ammer C, Strack D (2008) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69(1):112–146
- Schubert A, Allara P, Morte A (2004) Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 161(2):495–501
- Schünmann PHD, Richardson AE, Vickers CE, Delhaize E (2004) Promoter analysis of the barley *Pht1;1* phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiol* 136:4205–4214
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D (2007) Arbuscular mycorrhiza—studies on the *Geosiphon* symbiosis lead to the characterization of the first Glomeromycotan sugar transporter. *Plant Signal Behav* 2(5):431–434
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D (2006) Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444:933–936
- Schüßler A (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244:75–83
- Selle A, Willmann M, Grunze N, Gessler A, Weiss M, Nehls U (2005) The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 168:697–706
- Selosse M-A, Richard F, He X, Simard SW (2006) Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends Ecol Evol* 21:621–628
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663–665
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular–arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol* 108(1):7–15
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 156:1050–1057
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol* 62:227–250
- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA (2010) Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326:3–20
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic, London
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162:511–524
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* 133:16–20
- Smith SE, Dickson S, Smith FA (2001) Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Austr J Plant Physiol* 28(7):685–696
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V, Koide R, Cairney JWG (1994) Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant Soil* 159:103–113
- Solaiman Z, Saito M (1997) Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol* 136(3):533–538
- Stülten CH, Kong FX, Hampp R (1995) Isolation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum* Fr. *Mycorrhiza* 5:259–266
- Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R (2011) Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu Rev Plant Biol* 62:157–184
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* doi:10.1093/molbev/msr121
- Tatry MV, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H, Plassard C (2009) Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* 57:1092–1102
- Tejeda-Sartorius M, de la Vega OM, Délano-Frier JP (2008) Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by

- modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiol Plant* 133(2):339–353
- Tian CB, Kasiborski KR, Lammers PJ, Bucking H, Shachar-Hill Y (2010) Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiol* 153:1175–1187
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JP, Gianinazzi-Pearson V, Martin F (2012) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol* 193:755–769
- Tran HT, Plaxton WC (2008) Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics* 8:4317–4326
- Uehlein N, Fileschi K, Eckert M, Bienert G, Bertl A, Kaldenhoff R (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68:122–129
- van Tichelen KK, Colpaert JV (2000) Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings. *Physiol Plant* 110:96–103
- Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos P, Krähenbühl U, Op den Camp R, Brunold C (2002) Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 59-phosphosulphate reductase is more susceptible to negative control by thiols than ATP sulphurylase. *Plant J* 31:729–740
- Walder F, Niemann H, Natarajan M, Lehmann MF, Boller T, Wiemken A (2012) Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Phys* 159:789–797
- Wallace IS, Roberts DM (2004) Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol* 135:1059–1068
- Wallander H, Wickman T (1999) Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 9:25–32
- Wallenda T, Read DJ (1999) Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. *Plant Cell Env* 22:179–187
- Wiese J, Kleber R, Hampp R, Nehls U (2000) Functional characterization of the *Amanita muscaria* monosaccharide transporter Am Mst1. *Plant Biol* 2:1–5
- Willmann A, Weiss M, Nehls U (2007) Ectomycorrhiza-mediated repression of the high-affinity ammonium importer gene AmAMT2 in *Amanita muscaria*. *Curr Genet* 51:71–78
- Wipf D, Benjdia M, Rikirsch E, Zimmermann S, Tegeder M, Frommer WB (2003) An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast his4 mutant and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Genome* 46:177–181
- Wipf D, Benjdia M, Tegeder M, Frommer WB (2002) Characterization of a general amino acid permease from *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Lett* 528:119–124
- Wright DP, Johansson T, Le Quéré A, Söderström B, Tunlid A (2005a) Spatial patterns of gene expression in the extramatrical mycelium and mycorrhizal root tips formed by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in association with birch (*Betula pendula*) seedlings in soil microcosms. *New Phytol* 167:579–596
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2005b) European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytol* 167:881–896
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2000) Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant Cell Environ* 23:39–49
- Wright DP, Read DJ, Scholes JD (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ* 21:881–891
- Wudick MM, Luu DT, Maurel C (2009) A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol* 184:289–302
- Wykoff DD, O’Shea EK (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159:1491–1499
- Yang SY, Grönlund M, Jakobsen I, Grotemeyer MS, Rentsch D, Miyao A, Hirochika H, Kumar CS, Sundaresan V, Salamin N, Catausan S, Mattes N, Heuer S, Paszkowski U (2012) Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the phosphate transporter1 gene family. *Plant Cell* 24(10):4236–4251
- Yoshimoto N, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Saito K, Takahashi H (2007) Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiol* 145:378–388
- Zhu YG, Christie P, Laidlaw AS (2001) Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. *Chemosphere* 42:193–199

Annexe 3: Agrotransformation de *Laccaria bicolor* S238N

Un autre champignon modèle est très utilisé dans l'étude de la symbiose ectomycorhizienne. Il s'agit du premier symbionte ectomycorhizien séquencé, *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008). Contrairement à *H. cylindrosporium*, seule les souches dicaryotiques de *L. bicolor* sont capables de produire des mycorhizes. Ainsi, la maîtrise de la technique de transformation génétique par *A. tumefaciens* est primordiale pour mener à bien des projets de biologie fonctionnelle sur des gènes d'intérêts. Jusqu'à présent, une seule équipe dans le monde était capable de transformer génétiquement des souches mono- et dicaryotiques de *L. bicolor* (Kemppainen *et al.*, 2005; Kemppainen & Pardo, 2011). Très récemment, il a été possible d'obtenir des transformants de *L. bicolor* par Agrotransformation de souches monocaryotiques, servant ensuite à produire des souches dicaryotiques (U. Nehls, communication personnelle).

Au cours d'un séjour de cinq semaines au sein de l'UMR IaM de l'INRA de Nancy, une Agrotransformation de la souche dicaryotique S238N de *L. bicolor* a été réalisée en utilisant les souches AGL1 et LBA1126 d'*A. tumefaciens*. Le vecteur utilisé a été publié par Kemppainen & Pardo (2010) et confère la résistance à l'hygromycine (Annexe 3a). La cassette de résistance à la carboxine utilisée pour transformer *H. cylindrosporium* n'a pas été employée ici. En effet, cette cassette étant issue d'une mutation ponctuelle de la sous-unité Fe-S de la succinate déshydrogénase d'*H. cylindrosporium* (Ngari *et al.*, 2009), il est peu probable qu'elle confère une résistance à la carboxine à d'autres organismes tels que *L. bicolor*.

Après Agrotransformation à l'aide du protocole utilisé en routine pour *H. cylindrosporium* et une culture d'une vingtaine de jours sur du milieu sélectif (YMG + 100 µg mL⁻¹ d'hygromycine), une très faible quantité de transformants a été obtenue (Annexe 3b, 4% avec AGL1 et 1% avec LBA1126). Les quelques transformants obtenus ont été vérifiés par PCR sur ADNg (données non montrées) et en microscopie (Annexe 3c).

La conclusion de ce travail est qu'il est possible de transférer chez *L. bicolor* la méthodologie de transformation génétique utilisée en routine chez *H. cylindrosporium*. Bien que les rendements soient encore faibles, des transformants stables ont été obtenus. Ainsi, un travail de mise au point s'avère nécessaire afin de rendre cette technique routinière chez *L. bicolor*, et ainsi permettre l'obtention de transformants utilisables pour des analyses fonctionnelles de gènes candidats impliqués dans la symbiose ectomycorhizienne.

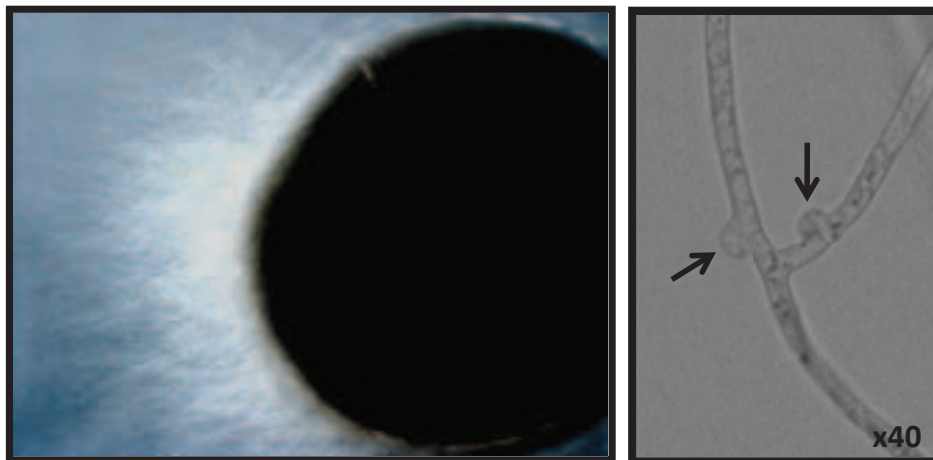
(a)



(b)

Souche bactérienne	Taux de transformation
AGL1	4 %
LBA1126	1 %

(c)



Annexe 3: Agrotransformation de *Laccaria bicolor* S238N.

(a) Carte de l'ADN-T du vecteur utilisé lors de l'Agrotransformation de *Laccaria bicolor* S238N. D'après Kempainen & Pardo (2010). (b) Pourcentage de transformants résistants à l'hygromycine obtenus après 20 jours de croissance sur milieu de sélection. Tous ont été validés par PCR sur ADNg en utilisant des amorces ciblant l'hygromycine. (c) Exemple d'un champignon transformé poussant à partir d'un filtre de co-culture (gauche) et vérification de la souche S238N par la présence des anses d'anastomoses (flèches) caractéristiques des souches dikaryotiques (droite).

Annexe 4: Milieux de cultures utilisés pour l'Agrotransformation

Milieu d'induction (IM) liquide

Sels MM: 40 mL de solution 2,5 X

Glucose: 0,18 g

Glycerol: 0,5 mL

H₂O: qsp à 94 mL

Autoclaver à 110°C, 30 min

Ajouter stérilement:

MES: 4 mL de solution 1 M -> 40 mM

AS: 2 mL de solution 10mM -> 200 μ M

Milieu d'induction (IM) solide

Sels MM: 400 mL de solution 2,5 X

Glucose: 0,9 g

Glycérol: 5 mL

Gélose: 8,5 g

H₂O: qsp à 940 mL

Autoclaver à 110°C, 30 min

Ajouter stérilement:

MES: 40 mL de solution 1 M -> 40 mM

AS : 20 mL de solution 10mM -> 200 μ M

MES 1 M

Dissoudre 19,52 g de MES dans 70 mL H₂O

Ajuster le pH à 5,3 avec du KOH (1M)

Compléter à 100 mL H₂O

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,2 μ

Acetosyringone (AS) 10 mM

Ajouter 19,62 mg AS à 10 mL H₂O

Agiter 2 h (emballé dans de l'aluminium)

Ajuster le pH à 8 avec du KOH 1 M
Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,2 µm
Stocker à 4°C, emballé dans de l'aluminium

Milieu minimum (MM) - solution mère de sels 2,5 X

Dissoudre les sels suivants un à un:

KH₂PO₄: 3,625 g
K₂HPO₄: 5,125 g
NaCl: 0,375 g
MgSO₄.7H₂O: 1,250 g
CaCl₂: 0,125 g
FeSO₄.7H₂O: 0,0062 g
(NH₄)₂SO₄: 1,250 g
H₂O: qsp à 1 L

Milieu LBmod

Hydrolysate de caséine: 10 g l⁻¹
Yeast extract: 5 g l⁻¹
Agar-Agar: 8.5 g l⁻¹
Ajuster le pH à 7 avec du KOH 1M

Echanges trophiques entre *Hebeloma cylindrosporum* et *Pinus pinaster*: analyse de systèmes de transport fongiques de potassium et de phosphate inorganique impliqués dans la symbiose ectomycorhizienne

Résumé: La symbiose ectomycorhizienne se définit comme une association mutualiste entre les racines des plantes ligneuses et le mycélium de champignons du sol. Elle est majoritaire dans les écosystèmes forestiers de l'hémisphère nord et permet l'amélioration de la nutrition hydrominérale des plantes ligneuses, notamment lorsque la disponibilité en ressources se fait rare. Des données transcriptomiques et génomiques du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* ont permis d'identifier différents gènes codant pour des protéines capables de transporter des nutriments. L'implication éventuelle de ces systèmes de transport dans la nutrition potassique et phosphatée ectomycorhize-dépendante de la plante hôte *Pinus pinaster* reste à évaluer. Dans cette étude, deux gènes candidats codant pour des systèmes de transport de potassium (K^+), *HcTrk1* et *HcSKC*, et deux autres pour des transporteurs de phosphate inorganique (Pi), *HcPT1.1* et *HcPT2*, ont été analysés. Des approches permettant la localisation dans l'ectomycorhize des transcrits (hybridation *in situ*) et des protéines (fusion traductionnelle) de ces candidats ont été générés. Ces différents outils ont permis de montrer que le transporteur *HcTrk1* et le canal *HcSKC* étaient respectivement localisés dans l'ectomycorhize au niveau des sites de prélèvement et de relargage du K^+ . D'autre part, des lignées transgéniques d'*H. cylindrosporum* sur- et/ou sous-exprimant ces gènes ont été produites afin de voir si la nutrition végétale en K^+ et en Pi était impactée. Ainsi, l'utilisation en mycorrhization de lignées surexprimant *HcTrk1* et sous-exprimant *HcSKC* ont montré une diminution de la nutrition potassique et de l'homéostasie du phosphore de la plante hôte. Les mêmes types d'approches ont été utilisés avec les transporteurs de Pi *HcPT1.1* et *HcPT2*. En utilisant des lignées transgéniques, il a ainsi pu être montré que la surexpression de *HcPT1.1* en condition carencée décrite précédemment était liée à l'activité de son promoteur. Quant au transporteur *HcPT2*, des analyses préliminaires de localisation suggèrent qu'il pourrait être impliqué dans le prélèvement de Pi du sol et dans son relargage au niveau du réseau de Hartig. Des études complémentaires restent cependant à mener. Enfin, cinq autres systèmes de transport de K^+ et trois de phosphate ont été récemment identifiés à partir du génome d'*H. cylindrosporum*, ouvrant la voie à la dissection fine des mécanismes moléculaires régissant la nutrition potassique et phosphatée ectomycorhize dépendante de *P. pinaster*.

Mots clefs: Symbiose ectomycorhizienne, *Hebeloma cylindrosporum*, *Pinus pinaster*, systèmes de transport, potassium, phosphate inorganique

Trophic exchanges between *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*: analysis of fungal potassium and inorganic phosphate transport systems involved in ectomycorrhizal symbiosis

Abstract: Ectomycorrhizal symbiosis is defined as a mutual association between the roots of woody plants and the mycelium of soil fungi. This symbiosis is widespread in northern forests and plays a major role in nutrient and water uptake of woody plants, especially when resources become scarce. Transcriptomic and genomic data of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* allowed the identification of several genes coding for nutrient transport proteins. Their putative involvement in ectomycorrhiza-dependent potassium and phosphate nutrition of the host plant *Pinus pinaster* needs to be assessed. In this study, two candidate genes coding for potassium (K^+) transport systems, *HcTrk1* and *HcSKC*, and two other genes coding for inorganic phosphate (Pi) transporters, *HcPT1.1* and *HcPT2*, were analyzed. Molecular approaches allowing the localization of transcripts (*in situ* hybridization) and proteins (translational fusion) of these candidates in ectomycorrhiza were obtained. These tools allowed us to show that the *HcTrk1* transporter and the *HcSKC* channel were localized in K^+ uptake and release sites of the ectomycorrhiza, respectively. In order to know whether these proteins play a role in plant K^+ and Pi nutrition, *H. cylindrosporum* transgenic lines with up- and/or down-regulated expression of candidate genes were produced. In mycorrhizal assays, the use of fungal strains with up- or down-regulated expression of *HcTrk1* and *HcSKC*, respectively, affects the K^+ nutrition and phosphorus homeostasis of the host plant. The same approaches were used for *HcPT1.1* and *HcPT2* Pi transporters. Therefore, using transgenic strategies, we demonstrated that the previously shown up-regulation of *HcPT1.1* expression under Pi shortage is related to its promoter activity. Concerning *HcPT2*, preliminary localization analysis suggested that this transporter might be involved in Pi uptake from soil and in release in the Hartig net. However, complementary studies are needed. Five and three novel K^+ and Pi transport systems, respectively, were identified from the recent genome accession of *H. cylindrosporum*, opening the way to a fine dissection of molecular mechanisms controlling the ectomycorrhiza-dependent K^+ and phosphate nutrition of *Pinus pinaster*.

Keywords: Ectomycorrhizal symbiosis, *Hebeloma cylindrosporum*, *Pinus pinaster*, transport systems, potassium, inorganic phosphate