

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**  
**PREPARÉE À L'INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET**  
**L'ENVIRONNEMENT**

École doctorale n°554

Environnement - Santé

Doctorat de Physiologie végétale

Par

Monsieur Noceto Pierre-Antoine

Étude de l'impact des pratiques viticoles  
sur les champignons mycorhiziens à arbuscules associés à la vigne

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 15 Décembre 2021

Composition du Jury :

Pr. JEANDROZ Sylvain  
Pr. COUTOS-THEVENOT Pierre  
Dr. LAUVERGEAT Virginie  
Dr. CLEMENT Mathilde  
Pr. WIPF Daniel

Professeur des universités, AgroSup Dijon  
Professeur des universités, Université de Poitiers  
Maître de conférence, Université de Bordeaux  
Responsable Recherche et Développement, MycoPhyto  
Professeur des universités, Université de Bourgogne

Président  
Rapporteur  
Rapporteuse  
Examinatrice  
Directeur de thèse

**Titre :** Étude de l'impact des pratiques viticoles sur les champignons mycorhiziens à arbuscules associés à la vigne

**Mots clés :** Vigne, Couvert végétal, Mycorhize à arbuscules, diversité taxonomique, cycle des nutriments

**Résumé :**

La mycorhize à arbuscules, symbiose mutualiste établie entre les plantes et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), apporte de nombreux services écosystémiques comme l'amélioration de la structure des sols, l'augmentation de la croissance et de la nutrition des plantes ainsi qu'une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Cependant, les pratiques agricoles intensives et l'utilisation de produits phytosanitaires ont un impact fort sur les communautés de microorganismes telluriques dont les CMA, ainsi que sur les mécanismes biologiques au sein de l'écosystème. Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet européen Biovine soutenu par la Commission Européenne à travers le fond européen de soutien à la recherche transnationale : CORE Organic Cofund. Ce travail de recherche a eu pour objectif de déterminer l'influence de la diversité végétale,

au sein d'un couvert, sur la structure des communautés de CMA associés à la vigne mais également sur le fonctionnement biologique des sols (activités enzymatiques microbiennes).

Nos recherches nous ont également amené à étudier l'effet de la variabilité génétique de la vigne dans la structuration des communautés de CMA. Sur ce point, un effet du porte-greffe et du cépage sur la composition de la communauté de CMA a pu être montré. Néanmoins sans pour autant modifier les indices de diversité.

L'influence de l'âge des vignes sur l'organisation des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules a également fait l'objet d'une étude. Sur un vignoble de Champagne, nous avons pu montrer un changement important dans la composition des communautés de CMA entre un vignoble récemment planté et des vignes anciennes suggérant un rôle de la vigueur de la vigne, l'allocation en carbone et sur le recrutement des communautés de CMA.

**Title:** Study of the impact of viticultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi associated with grapevine

**Keywords:** Grapevine, Cover crops, Arbuscular mycorrhiza, Taxonomic diversity, Nutrients cycle

**Abstract:** Arbuscular mycorrhiza, a mutualistic symbiosis established between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), provides many ecosystem services such as improved soil structure, increased plant growth and nutrition, and improved tolerance to biotic and abiotic stresses. However, intensive agricultural practices and the use of phytosanitary products as for example herbicide and fungicides, have a strong impact on communities of soil microorganisms, including arbuscular mycorrhizal fungi, as well as on biological mechanisms within the ecosystem. This thesis work is part of the European Biovine project supported by the European Commission through the CORE Organic Cofund.

The aim of this research work was to determine the influence of plant diversity, within a cover, on the structure of arbuscular mycorrhizal fungi communities

associated with grapevine, but also on the biological functioning of the soil (microbial enzymatic activities). Our research also led us to study the effect of the genetic variability of grapevine in the structuring of arbuscular mycorrhizal fungi communities. On this point, an effect of rootstock and grape variety on the composition of the arbuscular mycorrhizal fungi community was shown. However, this did not modify the Shannon diversity indices. The influence of grapevine age on the organisation of arbuscular mycorrhizal fungi communities was also studied. In a Champagne vineyard, we were able to show a significant change in the composition of arbuscular mycorrhizal fungi communities between a recently planted vineyard and old grapevines, suggesting a role for grapevine vigour, carbon allocation on the recruitment of arbuscular mycorrhizal fungi communities.

## *Avant-propos*

En guise d'avant-propos, je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Ces trois années n'ont pas été de tout repos. Entre stress et papillonnage, ces trois dernières années ont été, pour beaucoup, semées de quelques embûches et parmi elles, la Covid-19 qui aura fortement impacté l'ensemble de nos expérimentations et nos moments de convivialité. Avec cette entraide qui nous caractérise, je pense que notre équipe a su avancer et cet évènement ne nous aura pas empêcher d'avancer personnellement ou professionnellement.

Je tenais aussi à remercier les membres du jury pour avoir accepté de participer à la soutenance de cette thèse et particulièrement les deux rapporteurs, Pr. Pierre Coutos-Thévenot et Dr. Virginie Lauvergeat, qui ont accepté d'évaluer le travail présenté dans ce manuscrit.

Je souhaite également remercier le fond européen Core Organic, les membres du projet Biovine ainsi que la Région Bourgogne Franche-Comté qui m'ont permis de réaliser ces travaux.

Je remercie également très chaleureusement Pr. Daniel Wipf et Dr. Diederik van Tuinen, mes deux co-directeurs ainsi que Dr. Pierre-Emmanuel Courty. Comme tous les doctorants, nous avons toujours pu compter sur votre soutien, jour après jour et même dans les derniers. Pour cela, un grand merci !

Un seul remerciement ne sera jamais suffisant envers l'ensemble de l'équipe mycorhize. Stagiaires de passage ou de longue durée, doctorants, techniciens ou chercheurs, votre aide a toujours été apprécié à sa juste valeur et pour cela, je vous en serai toujours reconnaissant.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour ma famille qui a, je n'en doute pas, su apprécier mes longues envolées lyriques sur mes travaux de thèse pendant le repas dominical à la campagne.

## Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>6</b>
<b>DE LA TERRE AU VERRE : UNE HISTOIRE DE LA VIGNE .....</b>	<b>7</b>
I) LA VIGNE : UNE PLANTE AU CŒUR DES CIVILISATIONS.....	7
II) LA VIGNE EUROPEENNE FACE AUX FLEAUX AGRICOLES DU XIX <sup>E</sup> SIECLE .....	8
III) LA CULTURE MODERNE DE LA VIGNE .....	9
a) <i>L'encépagement en France et dans le monde .....</i>	<i>9</i>
b) <i>La variabilité génétique chez la vigne : rôle du greffon et du porte-greffe.....</i>	<i>10</i>
IV) ET APRES ? LA VITICULTURE FACE AUX ENJEUX CONTEMPORAINS.....	12
<b>UNE SYMBIOSE UNIQUE : LA MYCORHIZE A ARBUSCULES.....</b>	<b>17</b>
I) QUELQUES GENERALITES SUR LES MYCORHIZES.....	17
II) LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE A ARBUSCULES .....	18
a) <i>Le cycle de vie de la symbiose mycorhizienne à arbuscules.....</i>	<i>18</i>
b) <i>L'évolution de la phylogénie des champignons mycorhiziens à arbuscules.....</i>	<i>20</i>
III) LES SERVICES ECOSYSTEMIQUES RENDUS PAR LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES.....	23
a) <i>Amélioration de la nutrition des plantes par les champignons mycorhiziens à arbuscules .....</i>	<i>24</i>
b) <i>Amélioration du rendement et de la qualité des cultures par les champignons mycorhiziens à arbuscules.....</i>	<i>27</i>
c) <i>Stabilisation des sols par les champignons mycorhiziens à arbuscules.....</i>	<i>43</i>
d) <i>Effet protecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules face aux stress biotiques.....</i>	<i>44</i>
e) <i>Effet protecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules face aux stress abiotiques.....</i>	<i>46</i>
<b>OBJECTIFS DE THESE .....</b>	<b>48</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>50</b>
<b>CHAPITRE 1 - IMPACT DU GENOTYPE DE LA VIGNE SUR LA DIVERSITE ET LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE CMA : ETUDE DU CAS D'UN CONSERVATOIRE REGIONAL .....</b>	<b>57</b>
I) INTRODUCTION.....	57
a) <i>La variabilité génétique des plantes cultivées.....</i>	<i>57</i>
b) <i>La variabilité génétique des plantes dans le cadre des interactions plantes-microorganismes .....</i>	<i>58</i>
c) <i>Variabilité génétique de la vigne : impact du greffage sur les communautés de microorganismes associées .....</i>	<i>61</i>
II) OBJECTIFS ABORDES DANS LE CHAPITRE .....	63

III)	DESCRIPTION DU SITE D'ESSAI.....	63
IV)	RESULTATS.....	66
	a) <i>Analyse des paramètres physico-chimiques du sol.....</i>	66
	b) <i>Qualité de l'amplification et identification taxonomique des OTU.....</i>	67
	c) <i>Effet du génotype du porte-greffe sur les communautés de CMA associées aux racines.....</i>	68
	d) <i>Effet du génotype du cépage sur les communautés de CMA associées aux racines du porte-greffe.....</i>	71
V)	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	76
<b>CHAPITRE 2 - IMPACT D'UN COUVERT VEGETAL SUR LES COMMUNAUTES DE CMA AU VIGNOBLE.....</b>		<b>79</b>
I)	INTRODUCTION.....	79
	a) <i>Impact du travail du sol sur les communautés de microorganismes.....</i>	79
	b) <i>Impact des produits phytosanitaires sur les communautés de microorganismes.....</i>	80
	c) <i>Rôle de la diversité végétale sur les communautés microbiennes.....</i>	81
	d) <i>La pratique du couvert végétal en viticulture.....</i>	82
II)	OBJECTIF DU CHAPITRE.....	87
III)	DESCRIPTION DES ESSAIS AU VIGNOBLE.....	88
IV)	RESULTATS.....	90
	a) <i>Détermination de la mycorrhizotrophie des plantes de couvert.....</i>	90
	b) <i>Étude au vignoble du couvert végétal sur les populations de CMA endogènes.....</i>	93
V)	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	93
<b>CHAPITRE 3 – IMPACT D'UN COUVERT VEGETAL SUR L'ACTIVITE.....</b>		<b>95</b>
<b>BIOLOGIQUE DES SOLS VITICOLES.....</b>		<b>95</b>
I)	INTRODUCTION.....	95
II)	DESCRIPTION DE L'ESSAI.....	96
III)	RESULTATS.....	97
IV)	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	104
<b>CHAPITRE 4 – LE VIEILLISSEMENT DES VIGNES INFLUENCE-T-IL LES COMMUNAUTES DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DES VIGNOBLES : ÉTUDE DE CAS D'UN PARCELLAIRE CHAMPENOIS.....</b>		<b>106</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>119</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>123</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>146</b>

## Liste des abréviations

AEC : Avant l'Ère Commune	OTU : Operationnal Taxonomic Unit
OIV : Organisation Internationale de la Vigne et du Vin	ARL : Arylamidase
AOC : Appellation d'Origine Contrôlée	ARS : Arylsulfatase
PNDV : Plan National du Dépérissement de la Vigne	LAP : Leucine Amino-Peptidase
IFT : Indice de Fréquence de Traitements	NAG : N-acetylglucosaminidase
SMA : Symbiose Mycorhizienne à Arbuscules	PAC : Phosphatase Acide
CMA : Champignons mycorhiziens à arbuscules	PAL : Phosphatase Alcaline
PPA : Pre-Penetration Apparatus	PRO : Protéase
PCR : Polymerase Chain Reaction	URE : Uréase
NGS : New Generation Sequencing	XYL : Xylosidase
SSU : Small SubUnit	GLU : $\beta$ -glucosidase
LSU : Large SubUnit	ATVB : Association Technique Viticole de Bourgogne
ITS : Internal Transcribed Spacer	GEST : Groupement d'Étude et de Suivi des Terroirs
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	BIVB : Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne
ARN : Acide RiboNucléique	CA : Chambre d'Agriculture
RPB1 : RNA Polymerase II subunit	CGRB : Center for Genome Research and Biocomputing
MIR : Mycorrhiza-Induced Resistance	ACP : Analyse en Composante Principale
GFLV : Grapevine Fan Leaf Virus	NMDS : Non-metric MultiDimensional Sacling
PR : Pathogenic-Related	UMR : Unité Mixte de Recherche
SA : Acide Salicylique	
JA : Acide Jasmonique	
ET : Ethylène	
KOH : Hydroxyde de potassium	

## Liste des figures

Introduction générale

**Figure 1 : A)** Individu de *Dactyloshpaera vitifoliae* adulte ; **B)** Symptômes foliaires (galles) provoqués par le phylloxéra gallicole ; **C)** larves de *Dactyloshpaera vitifoliae* sur des racines déformées de vigne (Ephytia-Inra).

**Figure 2 :** Diagramme des principaux porte-greffes utilisés en France issus des croisements entre les deux espèces majeures de *Vitis* : *V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris* (source : vignevin-charentes.com).

**Figure 3 :** Modifications phénologiques de quatre cépages Pinot Gris, Pinot Noir, Riesling et Muller Thurgau cultivés en Allemagne (modifié à partir de Venios et al. 2020).

**Figure 4 :** Principaux paramètres affectés par une élévation des températures (TSS : Total Soluble Sugar) (modifié à partir de Venios et al. 2020).

**Figure 5 :** Schéma présentant les principaux types de mycorhizes (modifié à partir de Lheureux and Courty 2020).

**Figure 6 :** Schéma des étapes de la colonisation racinaire par les CMA (modifié à partir de Bonfante and Genre 2010).

**Figure 7 :** Colonisation des racines de *Medicago lupulina* par *Rhizoglyphus irregularis*. Après décoloration des racines, les structures fongiques présentes sont observables par coloration au bleu trypan.

**Figure 8 :** Classification phylogénétique des CMA faisant consensus depuis 2013 (issu de Redecker et al. 2013).

**Figure 9 :** Schéma représentant une portion de l'ADN ribosomique. Les triangles noirs représentent la position et l'orientation des différentes amorces utilisées pour l'identification phylogénétique des CMA.

**Figure 10 :** Les différentes voies d'absorption des nutriments par les plantes (modifié à partir de Smith et al. 2011).

**Figure 11 :** Différentes familles de transporteurs impliqués dans les échanges de nutriments et d'eau chez les CMA (à gauche) et chez les plantes (à droite) (issu de Wipf et al. 2019).

**Figure 12 :** Production des complexes protéiques du sol liés à la glomaline par les CMA (modifié à partir de Agnihotri et al. 2022).

Matériel et méthodes

**Figure 13 :** Méthode de prélèvements de racines (adapté de Drain et al. 2019).

**Figure 14 :** Pipeline bio-informatique permettant le traitement des données issues du séquençage (Escudie 2018).

Chapitre 1

**Figure 15 :** Processus de sélections des porte-greffes chez les plantes pérennes (modifié à partir de Warschefsky et al. 2016).

**Figure 16 :** Plan du conservatoire du GEST à Beaune (21).

**Figure 17 :** Répartition des séquences de CMA (exprimée en pourcentage) détectées dans l'ensemble des échantillons en fonction des familles (anneau intérieur) et des genres (anneau extérieur).

**Figure 18 :** Abondance relative des espèces de CMA détectées dans les échantillons racinaires des porte-greffes de la collection. Pour chaque identifiant, la moyenne des abondances de trois réplicas biologiques a été utilisée pour réaliser l'histogramme. Les espèces qui n'ont pas pu être identifiées sont indiquées par « sp. ».

**Figure 19 :** Comparaison des indices de diversité alpha (Shannon-Weaver) des échantillons de racines prélevés dans la collection de porte-greffes. Les lettres correspondent aux groupes statistiquement différents (test de Tukey ; p-value<0,05).

**Figure 20 :** Mesure de la diversité beta (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) dans les échantillons de racines prélevées dans la collection de porte-greffes. L'analyse NMDS est réalisée sur une matrice de dissimilarités de Bray-Curtis, calculée à partir de la table des OTU.

**Figure 21 :** Abondance relative des séquences de CMA détectées dans les échantillons racinaires des porte-greffes et des cépages associés avec les porte-greffes **A)** SO4, **B)** Teleki 5C, **C)** Fercal. Pour chaque identifiant, la moyenne des abondances de trois réplicas biologiques a été utilisée pour réaliser l'histogramme.

**Figure 22 :** Comparaison des indices de diversité alpha (Shannon-Weaver) mesuré sur la table des OTU détectés dans les racines prélevées chez les greffés-soudés avec **A)** le porte-greffe SO4, **B)** 5C Teleki, **C)** Fercal. Les lettres correspondent aux groupes statistiquement différents (test de Tukey ; p-value<0,05).

**Figure 23 :** Mesure de la diversité beta (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) dans les échantillons de racines prélevées dans la collection de cépages ainsi que les porte-greffes SO4, Teleki 5C et Fercal. L'analyse NMDS est réalisée sur une matrice de dissimilarités de Bray-Curtis, calculée à partir de la table d'OTU.

## Chapitre 2

**Figure 24 :** Groupes de travail mis en place dans le cadre du projet Biovine.

## Chapitre 3

**Figure 25 :** **A)** Analyse de la colonisation de plantes de couverture sélectionnées après huit semaines de culture avec *R. irregularis*. N.B. pour la signification des codes EPP0, voir le tableau 1 ; **B)** Analyse de la colonisation des plantes de couverture groupées par cycle de développement. Les %A et %M représentent la proportion d'arbuscules et de mycorhization observée dans le système racinaire de chaque espèce végétale.

## Chapitre 4

**Figure 26 :** Mesures des activités enzymatiques en fonction du temps et des mélanges végétaux semés.

**Figure 27 :** Analyse en composante principale (ACP) de la variation des activités enzymatiques en fonction **A)** des mélanges de couvert et **B)** de la date de prélèvement.



## Liste des tableaux

Matériel et Méthodes

**Tableau 1** : Liste des espèces végétales testées pour évaluer leur capacité de mycorhization

**Tableau 2** : Activités enzymatiques mesurées dans le chapitre 3

Chapitre 1

**Tableau 3** : Quelques exemples issus de la littérature rapportant un effet de la diversité des cultivars sur les communautés de bactéries ou de champignons présents dans les différents compartiments des plantes.

**Tableau 4** : Porte-greffes présents sur le Conservatoire du Mont Battois.

**Tableau 5** : Cépages présents sur le Conservatoire du Mont Battois.

**Tableau 6** : Paramètres physico-chimiques mesurés sur la parcelle conservatoire.

**Tableau 7** : Analyse statistiques des similarités (ANOSIM) et analyse MANOVA de permutations (ADONIS) sur une matrice de dissimilarités, calculée à partir de la table des OTU détectés dans les racines des porte-greffes.

**Tableau 8** : Analyse statistiques des similarités (ANOSIM) et analyse MANOVA de permutations (ADONIS) sur une matrice de dissimilarités, calculée à partir de la table des OTU détectés dans les racines des porte-greffes SO4, 5C et Fercal et les greffés-soudés correspondants.

Chapitre 2

**Tableau 9** : Description du site d'essai de Prémieux-Prissey

**Tableau 10** : Liste des mélanges semés par le Domaine Dubois et la CA21 sur la parcelle d'essai de Prémieux-Prissey

**Tableau 11** : Plan de prélèvements sur l'essai de Prémieux-Prissey

**Tableau 12** : Description des parcelles et des conditions de couvert végétal semées dans le cadre des essais du projet Biovine.

Chapitre 3

**Tableau 10** : Analyse de variance (ANOVA) à partir des mesures des activités enzymatiques sur le sol dans les différentes conditions de couverture végétale.

Chapitre 4

**Tableau 13** : Description des parcelles utilisées pour cette étude.

# De la Terre au verre : une histoire de la vigne

## I) La vigne : une plante au cœur des civilisations

Depuis l'apparition de l'Homme, la très grande majorité des espèces végétales a, à un moment donné de l'Histoire, croisée la route de cette espèce animale si particulière qui va révolutionner la vie de cette planète. Parmi elles, la vigne est devenue au fil des Âges une plante sauvage puis domestiquée qui a pris une place centrale dans nos cultures et nos modes de vie jusqu'à devenir un des piliers de notre agriculture moderne.

L'ensemble des espèces de vigne cultivées aujourd'hui appartiennent au genre *Vitis*, qui regroupe environ une soixantaine d'espèces. L'observation de la répartition des zones de cultures modernes de la vigne n'est finalement pas si éloignée de ses origines puisque l'on retrouve trois foyers principaux entre le sud de l'Europe et le Moyen-Orient, en Asie Orientale et en Amérique du Nord et Centrale. L'apparition de ces différents foyers trouve une explication dans l'explosion de la diversité des espèces végétales et l'apparition des Angiospermes, ainsi qu'à la dérive des continents au cours des temps géologiques. Cependant, il semble évident que les Hommes du Paléolithique, considérés comme des « chasseurs-cueilleurs », ont côtoyé au gré de leurs déplacements, ces différentes espèces de vigne et goûté aux fruits qu'elles produisaient. C'est au Néolithique, entre 10000 et 9000 Avant l'Ère Commune (AEC), que les choses vont radicalement changer avec la « révolution néolithique » qui marque les premières domestications des espèces animales et végétales par les Hommes qui deviennent des agriculteurs (Hole 1984; Gopher et al. 2001). La vigne ne fait pas exception à ce phénomène et comme pour beaucoup d'autres espèces cultivées, l'histoire de la vigne domestiquée débute dans le Croissant Fertile, entre les bords de la Mer Noire et les frontières de l'Iran. Des traces archéologiques datées entre 7000 et 4000 AEC ont par ailleurs mis en évidence les premières vinifications montrant l'évolution des consommations des produits agricoles, non plus seulement en raisins de table (suivant les dénominations modernes) mais également en raisin de cuve (Garnier and Valamoti 2016). De très nombreuses études archéologiques ont ainsi identifié plusieurs sites d'expansion de la viticulture, principalement en Europe : en Grèce, en Crète, en Italie et en Espagne.

En Gaule, la culture de la vigne est corrélée avec la création de la ville de Phocée (aujourd'hui Marseille) par les Grecs phocéens en 600 AEC, mais c'est avec la conquête de la Gaule par l'Empire romain que la viticulture va s'étendre dans le sud de la France puis remonter le long des voies romaines et des fleuves (Vidal 2001). Les vignobles gaulois et la production vinicole vont au fur et à mesure prendre de l'ampleur jusqu'à contrarier l'empereur Domitien qui va interdire la production de vin en Gaule en 92 et forcer l'arrachage des vignes cultivées. Cette période marque une nouvelle étape dans l'hybridation des premières vignes cultivées issues du Moyen-Orient avec les vignes sauvages européennes. Après le sac de Rome et la chute de l'Empire romain (en 410) qui marquent la transition entre l'Antiquité et le Moyen-Âge, la culture de la vigne et son commerce sont considérablement réduits. La vigne retrouvera un second souffle

vers le V<sup>e</sup> siècle, grâce à l'Église qui y verra à la fois un objet de croyance mais aussi un objet de luxe dont le commerce avec les seigneurs garantira de nombreux revenus. Le vignoble bourguignon n'y fera pas exception et sous l'impulsion des moines bénédictins de l'Abbaye de Cluny, il deviendra au fil des siècles un vignoble prestigieux s'étendant du Chablisien jusqu'au Mâconnais en passant par les Côtes de Nuits et de Beaune et fournissant encore aujourd'hui les meilleurs crus (Bazin 2002). L'agriculture monastique permet l'innovation : les meilleures terres sont choisies pour cultiver la vigne, différents modes de conduite de la vigne sont adaptés en fonction des régions et les techniques de vinification s'améliorent pour une meilleure conservation. Autour du XI<sup>e</sup> siècle, on va pour la première fois classer et recenser les différents cépages et leur adaptation aux vignobles (Pelsy and Merdinoglu 2021). La culture de la vigne va ainsi traverser les siècles et les viticulteurs vont faire face à toujours plus de défis. Aujourd'hui, la filière viticole est mondialisée et cette mondialisation a permis la production de raisins, de vins et de produits issus de cette filière quasiment partout dans le monde.

## II) La vigne européenne face aux fléaux agricoles du XIX<sup>e</sup> siècle

La vigne eurasiatique, *Vitis vinifera*, est l'espèce principalement cultivée depuis sa domestication. En fonction des régions où elles sont plantées, les Hommes ont sélectionné les raisins les plus adaptés aux conditions pédoclimatiques particulières et aux propriétés organoleptiques des raisins. Cette sélection lente a permis d'obtenir une très grande diversité de variétés cultivées qu'on appelle « cépage ». Historiquement, la culture de ces cépages s'est faite en « pied franc » ou « franc de pied » c'est-à-dire que le cépage était directement planté en terre. Or, ce type de culture va être bouleversé au cours du XIX<sup>e</sup> siècle avec l'apparition de nouvelles maladies en provenance du continent américain.

L'oïdium est observé pour la première fois en Angleterre en 1845 puis en France en 1847 avant de toucher la totalité du vignoble français en 1851. Cette maladie cryptogamique due à un champignon maintenant bien connu, *Erysiphe necator*, va faire chuter les productions de raisins. Deux solutions sont alors mises en place pour contrer ce champignon : un traitement au soufre qui montre de bons résultats et l'importation de vignes issues d'Amérique du Nord qui présentent des niveaux élevés de résistance à l'oïdium. Alors que de nos jours, une attention particulière est portée sur les importations de végétaux, via la mise en quarantaine et la création de passeports sanitaires pour les plantes, au XIX<sup>e</sup> aucune réglementation ne contrôle la présence de parasites. Cette importation de vignes américaines va être à l'origine d'un cataclysme dans les vignobles européens, qui reste encore aujourd'hui l'une des crises les plus graves de l'agriculture mondiale avec la famine de 1845 en Irlande (Powell 2008). Le *Dactylophaera vitifoliae* (**Figure 1A**) ou plus communément appelé phylloxéra est un petit puceron originaire d'Amérique du Nord. Cet insecte piqueur induit, au niveau des feuilles, la production de galles (phylloxéra gallicole, **Figure 1B**) qui ne sont pas forcément létales pour la plante mais qui provoquent une sérieuse réduction de la croissance des ceps. En revanche, la forme racinaire du phylloxéra (phylloxéra radicole, **Figure 1C**) est beaucoup plus

problématique pour les *Vitis vinifera* sensibles d'origine européenne. L'insecte induit là aussi par ses piqûres des nodosités, une déformation des tissus racinaires qui vont par la suite se nécroser. Ces dernières vont alors se propager jusqu'aux tissus vasculaires et provoquer un arrêt des flux de nutriments qui conduit en quelques années la mort du cep (source : [Ephytia-Inra](#)).



**Figure 1 :** **A)** Individu de *Dactylosphaera vitifoliae* adulte ; **B)** Symptômes foliaires (galles) provoqués par le phylloxéra gallicole ; **C)** larves de *Dactylosphaera vitifoliae* sur des racines déformées de vigne ([Ephytia-Inra](#)).

Cette crise importante décima une très grande majorité des vignobles français et européens en quelques années, et a mis plus de 30 ans à être surmontée. Malgré l'emploi important de produits chimiques, la sauvegarde de la vigne et des vignobles européens est due à une technique maintenant indispensable en viticulture : le greffage. En effet, les espèces de *Vitis* originaires d'Amérique du Nord ne semblaient pas être impactées par la crise phylloxérique qui faisait d'importants dégâts en Europe. Le greffage des cépages européens sur ces porte-greffes américains permit à la profession de renaître et à la filière d'évoluer vers la viticulture moderne telle que nous la connaissons aujourd'hui.

### III) La culture moderne de la vigne

#### a) L'encépagement en France et dans le monde

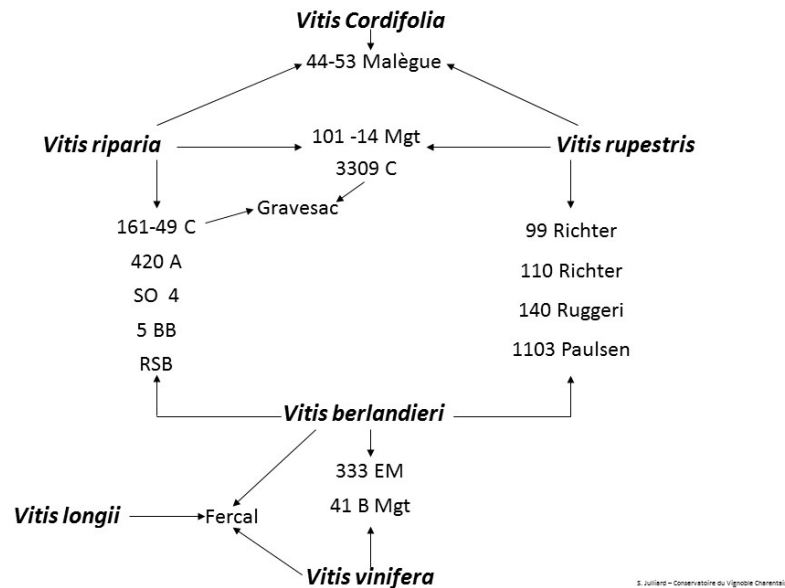
À travers le monde et depuis plusieurs siècles, la viticulture est très diversifiée aussi bien en termes de climats, de sols, de pratiques culturales et de matériel végétal. Sur ce dernier point, le rapport de l'OIV publié en 2017, met en lumière cette très grande hétérogénéité géographique. La production mondiale est dominée par la Chine qui produit 15% des raisins mondiaux, essentiellement centrée sur la production de raisins de table (84% de la production chinoise). L'Italie est le deuxième producteur mondial (11%) dont la production est à l'opposé des objectifs chinois : 86% des raisins sont à destination de la cuve. Les États-Unis complètent le podium avec 9% de la production mondiale. Du point de vue de la plantation de la vigne, plus de 10 000 variétés sont référencées dans le monde quelle que soit la finalité de la production (cuve, table, séchage ou autres). Cependant, une faible proportion de variétés est fortement distribuée sur les continents. On compte un peu plus de 30 cépages couvrant 50% de la superficie viticole mondiale dont 13 d'entre elles représentent 1/3 de la superficie viticole mondiale. Le trio des cépages les plus plantés à

travers le monde est composé du Kyoho, originaire du Japon avec 365 000 hectares suivi du Cabernet-Sauvignon (341 000 hectares) et le Sultanina (273 000 hectares).

De nos jours, la France est le 3<sup>ème</sup> plus grand vignoble et le 5<sup>ème</sup> pays producteur de raisins. Cette production française de raisins est en quasi-totalité destinée à la production de vins avec 99,6% de raisins de cuve. Le vignoble français s'étend sur près de 800 000 hectares distribués autour d'une quinzaine de régions viticoles. On va retrouver les vins du Val de Loire de l'Auvergne jusqu'à l'Océan Atlantique, puis à l'Est, la Champagne, l'Alsace, le Jura, la Savoie et la Bourgogne jusqu'au Beaujolais. Au sud de Lyon, le vignoble de la Vallée du Rhône débute pour rejoindre ceux du Languedoc-Roussillon et de la Provence. La situation insulaire de la Corse en fait un vignoble particulier et les climats océaniques à l'Ouest façonnent les vignobles de Charentes, de Cognac, du Bordelais, et du Sud-Ouest. Certaines régions produisent différents types de vins, rouges, blancs ou rosés, répertoriés selon une liste d'AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) et une classification en crus comme c'est le cas pour la Bourgogne ou Bordeaux. Au contraire, d'autres régions sont plus centrées sur un type de production, comme la Champagne qui va produire essentiellement des vins pétillants du même nom ou encore le Cognac, célèbre eau-de-vie produite dans l'Ouest de la France. L'encépagement des vignobles français est dominé par trois cépages qui représentent 33% de la surface implantée : l'Ugni Blanc (40%), le Merlot (33%) et le Grenache Noir (25%). Ensuite, les cépages Syrah, Chardonnay Blanc, Cabernet-Sauvignon, Cabernet Franc, Carignan Noir, Pinot Noir et Sauvignon Blanc couvrent 40% de la surface viticole française. Les derniers 25% sont implantés avec d'autres variétés.

#### **b) La variabilité génétique chez la vigne : rôle du greffon et du porte-greffe**

Avant la plantation, le viticulteur doit déterminer quelles vignes vont être plantées sur sa parcelle et donc une association entre un porte-greffe et un greffon. Suite à la crise phylloxérique, l'ensemble des porte-greffes produits aujourd'hui proviennent de croisements entre l'espèce européenne : *Vitis vinifera*, et des porte-greffes américains. Les portes-greffes « modernes » les plus couramment utilisés sont issus de croisements avec les génotypes *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis cordifolia*, *Vitis longii* (**Figure 2**). Actuellement, une trentaine de porte-greffes sont autorisés à la culture en France et la généralisation du greffage comme solution de lutte contre le phylloxéra, a intensifié la sélection variétale de nouveaux porte-greffes et de nouveaux cépages. Qu'il s'agisse du porte-greffe ou du greffon, plusieurs choix s'offrent à lui.



**Figure 2** : Diagramme des principaux porte-greffes utilisés en France issus des croisements entre les deux espèces majeures de *Vitis* : *V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris* (source : [vignevin-charentes.com](http://vignevin-charentes.com)).

Pour le greffon ou le cépage, le choix est déterminé par les objectifs de production du viticulteur (raisin de cuve, de table, ou autres productions) et les propriétés organoleptiques développées par les baies. Outre les réglementations par pays qui peuvent influencer l'obtention d'AOC, les critères dus au terroir restent prépondérants dans le choix de l'encépagement. En effet, les conditions climatiques de la parcelle tel que l'exposition, l'altitude, les températures ou encore la présence de gelées tardives sont à mettre en adéquation avec le caractère de précocité des cépages. Enfin, la tolérance aux pathogènes de la vigne est également un critère important aussi bien dans le choix du cépage que du porte-greffe (Dry et al. 2019).

Du côté du porte-greffe, plusieurs éléments vont guider le viticulteur dans son choix. La résistance au phylloxéra radicicole est maintenant acquise pour l'ensemble des porte-greffes mis sur le marché. Cependant, il subsiste encore une hétérogénéité de résistance face à d'autres parasites de la vigne comme les nématodes, vecteurs du virus du court-noué ou contre les champignons responsables de l'esca ou d'autres maladies du bois (Alaniz et al. 2010; Gramaje et al. 2010; Brown et al. 2013). L'apparition de ces nouvelles maladies liées au dépérissement des vignobles accentue les recherches sur des porte-greffes résistants. Il est également intéressant de souligner que l'identité du porte-greffe peut être déterminant dans la résistance du greffon à certains pathogènes foliaires (Chitarra et al. 2017). Additionnée aux résistances face à des pathogènes, la variabilité génotypique des porte-greffes mise à la disposition des viticulteurs offre des solutions pour l'adaptation de la vigne aux caractéristiques pédologiques des vignobles et une tolérance aux stress abiotiques que la vigne peut rencontrer dans certaines régions viticoles (Keller et al. 2012; Ollat et al. 2016; Zhang et al. 2016a; Romero et al. 2018).

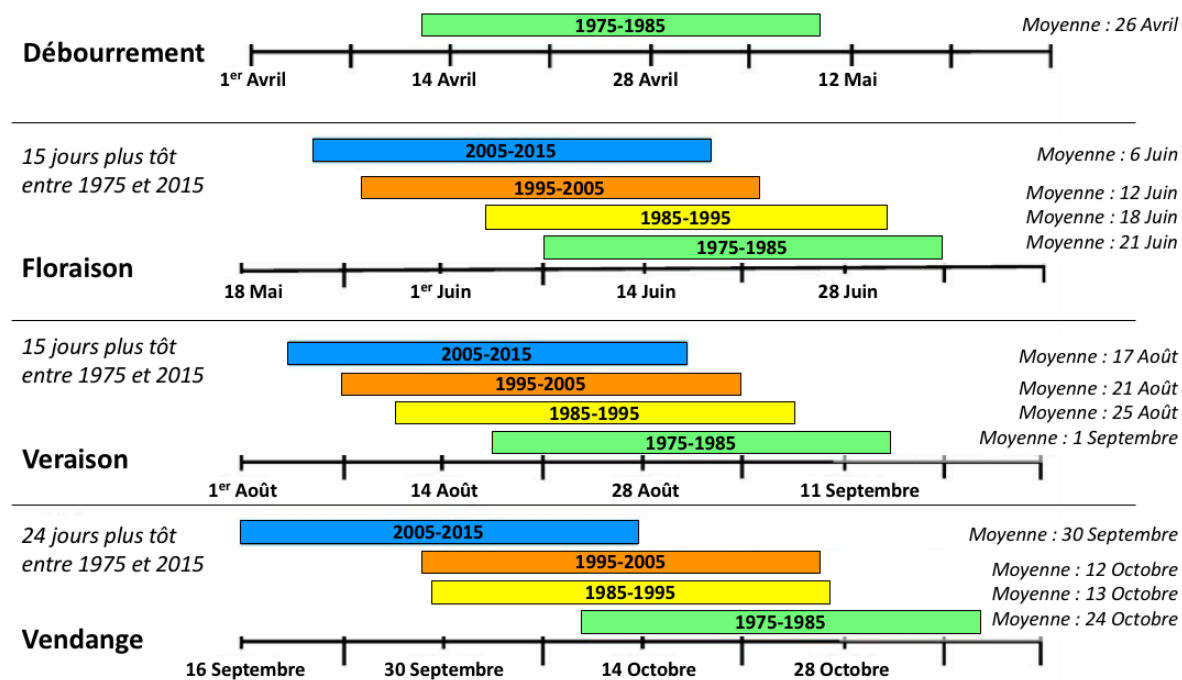
Enfin, le porte-greffe se situant à l'interface entre le cépage et le sol, il participe activement à la nutrition hydrique et minérale du greffon et à la résistance de la plante aux stress abiotiques de la parcelle (Serra et al. 2014; Meggio et al. 2014). Un autre élément lié aux échanges entre le porte-greffe et le greffon est scruté par les viticulteurs : la vigueur conférée (Vila et al. 2016). En effet, le porte-greffe, par sa vigueur propre est en mesure de moduler la croissance végétative du greffon en limitant ou bien en promouvant sa croissance et participe à l'élaboration du rendement (Jones et al. 2009). Or, un mauvais assemblage greffon-porte-greffe ou une mauvaise gestion de cette vigueur se traduit généralement par un déséquilibre de la croissance végétative par rapport à la floraison et à la formation des baies, aboutissant à la baisse du rendement du greffon.

La vigne est une plante cultivée en hétérogreffe, cela implique deux génotypes différents et il est donc nécessaire non seulement de travailler sur la sélection de résistances aux contraintes biotiques et abiotiques des deux parties de la plante mais également sur les bonnes associations cépage-porte-greffe. Les traits fonctionnels du porte-greffe et du greffon sont essentiels, notamment en ce qui concerne les flux d'éléments et l'allocation en carbone entre les deux parties de la plante (Rossdeutsch et al. 2021). Ces flux ne sont pas équivalents au cours du cycle de développement de la vigne et une mobilisation des réserves carbonées et minérales détermine la bonne croissance de la plante entière. Le cépage, comme puit important de nutriments, contrôle l'allocation de la biomasse et les échanges de nutriments entre le lieu d'absorption (les racines du porte-greffe) et le lieu d'utilisation (les parties aériennes du greffon) (Tandonnet et al. 2009). Par ailleurs, il a été récemment montré que le greffon était capable de moduler les réponses de la plante entière à des déficits de phosphate (Gautier et al. 2020). Pour le viticulteur, le choix de la meilleure association pour sa parcelle est multifactoriel afin d'assurer dans un premier temps une plantation réussie puis d'établir un rendement maximal et une récolte de qualité. Un compromis est alors établi entre les traits de croissance végétative du porte-greffe et les performances du cépage liées au développement des baies et aux qualités organoleptiques.

#### **IV) Et après ? La viticulture face aux enjeux contemporains**

Aujourd'hui, la viticulture française et mondiale fait face à de nombreux défis majeurs de différentes natures. Parmi eux, le défi principal de ces dernières décennies mais également de celles à venir, est l'évolution rapide et brutale du climat. Ces changements se traduisent notamment par une élévation des concentrations en gaz à effet de serre dans l'atmosphère ainsi qu'une augmentation des températures et une réduction de la pluviométrie au cours de la saison. La fréquence d'apparition d'évènements climatiques extrêmes comme les gels hivernaux et tardifs ainsi que les orages de grêle estivaux, est également en augmentation, ce qui rend encore plus incertain les rendements et la qualité des vendanges.

Au vignoble, les premiers impacts de la hausse des températures et du nombre de degrés-jours se font ressentir sur la phénologie de la vigne avec une précocité des principaux stades de développement (**Figure 3**). Un des indicateurs souvent montré en exemple de ces changements est la date d'ouverture des vendanges. Malgré les différences de précocité, et de maturité des cépages, il est à retenir qu'au XX<sup>e</sup> siècle, les vendanges débutent généralement entre 15 jours et un mois par rapport aux siècles précédents qui étaient plus froids.



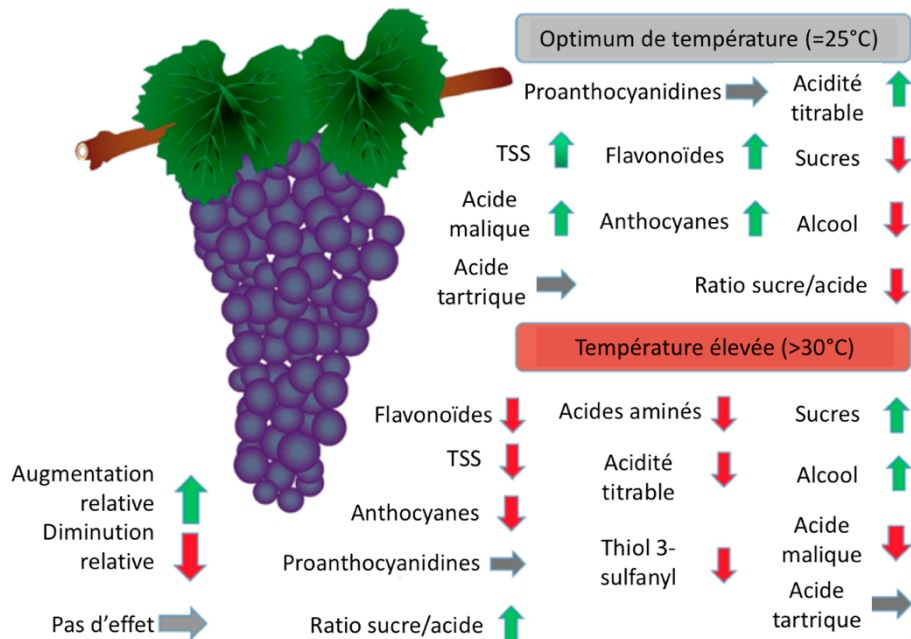
**Figure 3** : Modifications phénologiques de quatre cépages Pinot Gris, Pinot Noir, Riesling et Muller Thurgau cultivés en Allemagne (modifié à partir de Venios et al. 2020).

À la cave, les enjeux climatiques sont également bien présents puisque la qualité des vendanges produites au cours de la saison détermine la qualité de la vinification et du produit final. Là aussi, les effets du changement climatique et la hausse des températures se font ressentir sur la qualité des baies (Ferrandino and Lovisolo 2014; Drappier et al. 2019). Les traits de qualité des raisins sont complexes et différents en fonction de la destination de ces raisins. Cependant, on peut noter qu'une hausse prolongée de températures altère le fonctionnement de plusieurs voies métaboliques et la biosynthèse de molécules intervenant dans la qualité de la baie (**Figure 4**). Parmi ces modifications, on peut noter une augmentation de la concentration en sucres dans les baies et une diminution des concentrations en acides organiques (Blancquaert et al. 2018). Ces changements induisent un déséquilibre dans le rapport sucre/acide ce qui aboutit automatiquement à une augmentation du degré d'alcool des vins et une réduction du potentiel aromatique de ces derniers (Van Leeuwen and Destrac-Irvine 2017).

Associé au stress de température, le stress hydrique induit par la réduction des précipitations renforce l'altération de la qualité des raisins. Tandis que la vigne est capable de résister face à des stress hydriques faibles et courts, un stress hydrique plus fort et continu, comme on peut l'observer depuis plusieurs années,



modifie radicalement la composition des baies. Comme pour le stress de températures hautes, le stress hydrique modifie le métabolisme des polyphénols et induit l'accumulation de métabolites en réponse aux stress (Hochberg et al. 2015). Un déficit hydrique entraîne également une diminution de la production d'anthocyanes chez le Cabernet-Sauvignon et le Chardonnay (Cook et al. 2015). Ces modifications métaboliques à l'échelle de la plante et de la baie peuvent altérer les arômes et les propriétés organoleptiques des raisins et des vins (Mirás-Avalos and Intrigliolo 2017).



**Figure 4** : Principaux paramètres affectés par une élévation des températures (TSS : Total Soluble Sugar) (modifié à partir de Venios et al. 2020).

Les changements climatiques des régions viticoles représentent une problématique d'envergure pour les prochaines décennies, mais on identifie également de nouvelles menaces sur la vigne. L'oïdium et le mildiou restent bien évidemment les maladies principales de la vigne qui sont encore largement traitées avec des produits chimiques à base de soufre ou de sulfate de cuivre. Cependant, d'autres pathogènes ou parasites font leur apparition depuis les années 1950 et s'attaquent à la vigne (Caudwell et al. 1994). La flavescence dorée, le court-noué, l'esca, le bois noir ou l'eutypiose sont autant de maladies dont les solutions restent fortement limitées. Ces maladies sont dues à différents parasites : la flavescence dorée est une maladie causée par un phytoplasme transmis par *Scaphoideus titanus*, tandis que le court-noué est un virus transmis par les nématodes présents dans le sol. Les maladies du bois comme l'esca, l'eutypiose et le bois noir semblent eux être dus à des champignons saprotrophes opportunistes qui profitent d'un affaiblissement de la vigne ou de certaines pratiques viticoles pour proliférer et détruire les vignes. C'est dans ce contexte notamment que le

Plan National du Dépérissement de la Vigne (PNDV) a été créé afin de concentrer les recherches à l'étude de ces maladies émergentes et la mise au point de nouvelles solutions (site web du [PNDV](#)).

Enfin, il est très important de ne pas omettre les problématiques sanitaires et environnementales liées à l'emploi des produits phytosanitaires utilisés dans la lutte contre les parasites ou le désherbage des vignes. La viticulture est une agriculture parmi les plus consommatrices en produits phytosanitaires avec près de 20% du poids total des traitements, concentrés sur 5% de la surface agricole utile française. De plus, depuis 2010, l'indice de fréquence de traitements (IFT) augmente dans toutes les zones viticoles avec un IFT total moyen de 15,3 qui peut même monter à 23,4 en Champagne. Les conditions climatiques de ces dernières saisons impactent bien évidemment la répétition des traitements avec une part très importante des fongicides (Agreste Les Dossier n°2019-2 Février 2019). Même s'ils représentent 5% de l'IFT total, les herbicides sont aussi massivement utilisés par les viticulteurs pour le désherbage des parcelles et l'épamprage (étape de suppression des gourmands). L'utilisation de ces produits a un impact négatif important sur la santé des agriculteurs. Plusieurs études ont ainsi recensé l'apparition de pathologies très diverses dans leurs symptômes et leur gravité allant de l'irritation de la peau à l'apparition de carcinomes et de cancers du poumon (Spiewak 2001; Kergresse et al. 2011). D'autres effets reprotoxiques et d'atteintes neurologiques sont également rapportés (Garrigou et al. 2011). De nombreuses études ont également mis en avant des effets négatifs y compris à long terme sur les écosystèmes agricoles et viticoles ainsi que sur leur fonctionnement (Geiger et al. 2010). Les fongicides sont généralement des molécules qui n'ont pas d'action ciblée et qui affectent donc plusieurs groupes d'organismes. Certains fongicides vont montrer une action négative sur les champignons souhaités comme le mildiou mais également sur des microorganismes que les viticulteurs souhaitent préserver comme les levures essentielles pour la vinification (Cordero-Bueso et al. 2014). Les herbicides présentent les mêmes problèmes de cible que les fongicides et de la même manière vont affecter les faunes du sol et les microorganismes du sol, comme les bactéries ou les champignons symbiotiques.

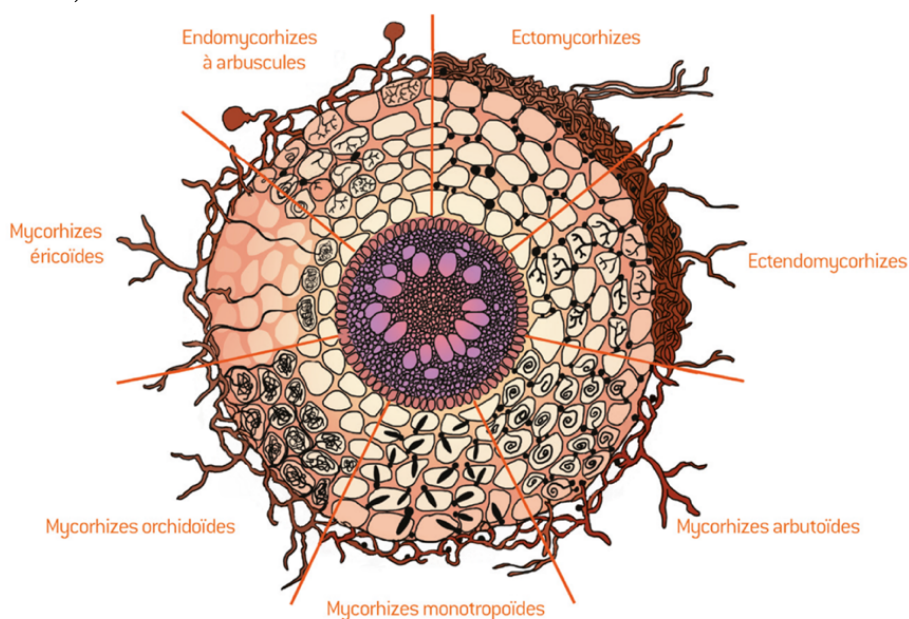
Face à aux problématiques et aux enjeux qui frappent l'agriculture en général, plusieurs leviers sont développés et évalués. La création variétale est une piste qui est développée de manière continue pour permettre l'élaboration de nouveaux cépages et porte-greffes avec des caractéristiques de résistance aux nouvelles maladies ou de meilleures tolérances aux contraintes climatiques (Jones et al. 2009; Zombardo et al. 2020a). Le deuxième levier concerne les pratiques viticoles et l'évolution de la viticulture dans son ensemble. À travers différents labels et techniques, la viticulture tend à se transformer. Qu'il s'agisse de la biodynamie, de la viticulture raisonnée ou biologique, toutes rompent avec la viticulture conventionnelle, gourmande en intrants chimiques avec de nombreux effets indésirables. Ces différents types de viticulture intègrent l'ensemble des paramètres de la parcelle, du climat au sol, en passant par les interactions avec la biodiversité du vignoble. Ainsi, l'agroécologie fait son entrée en viticulture et un panel de solutions est proposé. Certaines pratiques comme l'agroforesterie ou l'agropastoralisme reviennent également sur le

devant de la scène comme solution de désherbage ou pour la diversification des productions. L'augmentation de la diversité végétale grâce à l'agroforesterie ou à l'implantation de couverts végétaux dans les inter-rangs favorise également la biodiversité des vignobles, booste les services écosystémiques rendus par l'ensemble des organismes présents, fixe la matière organique dans les sols et diminue les phénomènes d'érosion. Une meilleure gestion des ressources en eau est également souhaitée afin de limiter l'impact du stress hydrique (Komárek et al. 2010). Enfin, l'agriculture de précision tend à développer de nouveaux outils grâce à l'ingénierie, la robotique ou encore l'intelligence artificielle pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires et optimiser les traitements réalisés sur les parcelles. Toutes ces techniques offrent un espoir pour la viticulture future même si ces dernières nécessitent d'être optimisées et adaptées à la grande diversité des vignobles du monde.

# Une symbiose unique : la mycorhize à arbuscules

## I) Quelques généralités sur les mycorhizes

Dans leur environnement, les plantes sont en contact avec un très large éventail d'organismes présents autour d'elles, dans l'air, sur et dans le sol, comme par exemple les insectes, les nématodes, les champignons, les bactéries ou encore les virus. Ces derniers influencent de manière positive ou négative la physiologie de la plante tout au long de son cycle de développement. C'est entre le XIX<sup>e</sup> et le XX<sup>e</sup> siècle que les recherches vont mettre en évidence que les plantes vivent en symbiose avec des champignons du sol. Parmi eux, les champignons mycorhiziens, du grec « *mukés* » le champignon et « *rhiza* » la racine, établissent la symbiose mycorhizienne qui est une relation mutualiste (=à bénéfices réciproques) entre les racines d'une plante et ces champignons. La symbiose mycorhizienne, au sens large, est partagée par une très grande majorité des plantes terrestres (>90%). Sous le terme de symbiose mycorhizienne, on distingue en réalité au moins sept types de mycorhizes (**Figure 5**). Les endomycorhizes du type orchidoïdes, monotropides, arbutoïdes ou encore les ectendomycorhize, sont très spécifiques à quelques biomes et sont peu étudiées. En revanche, les formes les plus abondantes dans l'environnement sont l'ectomycorhize et l'endomycorhize à arbuscules. L'ectomycorhize concerne 5 à 10 % des plantes vasculaires, principalement les arbres forestiers ligneux (*Coniferales* et *Rosopsidales*) comme le pin, le sapin, le chêne, le hêtre. L'endomycorhize à arbuscules (ou mycorhize à arbuscules) est un type d'endomycorhize beaucoup plus universel. Elle est présente chez près de 80 % des plantes terrestres, y compris les plantes cultivées annuelles comme le blé, le maïs ou le riz, et pérennes comme certains arbres fruitiers ou encore la vigne (Brundrett and Tedersoo 2018).



**Figure 5** : Schéma présentant les principaux types de mycorhizes (modifié à partir de Lheureux and Courty 2020).

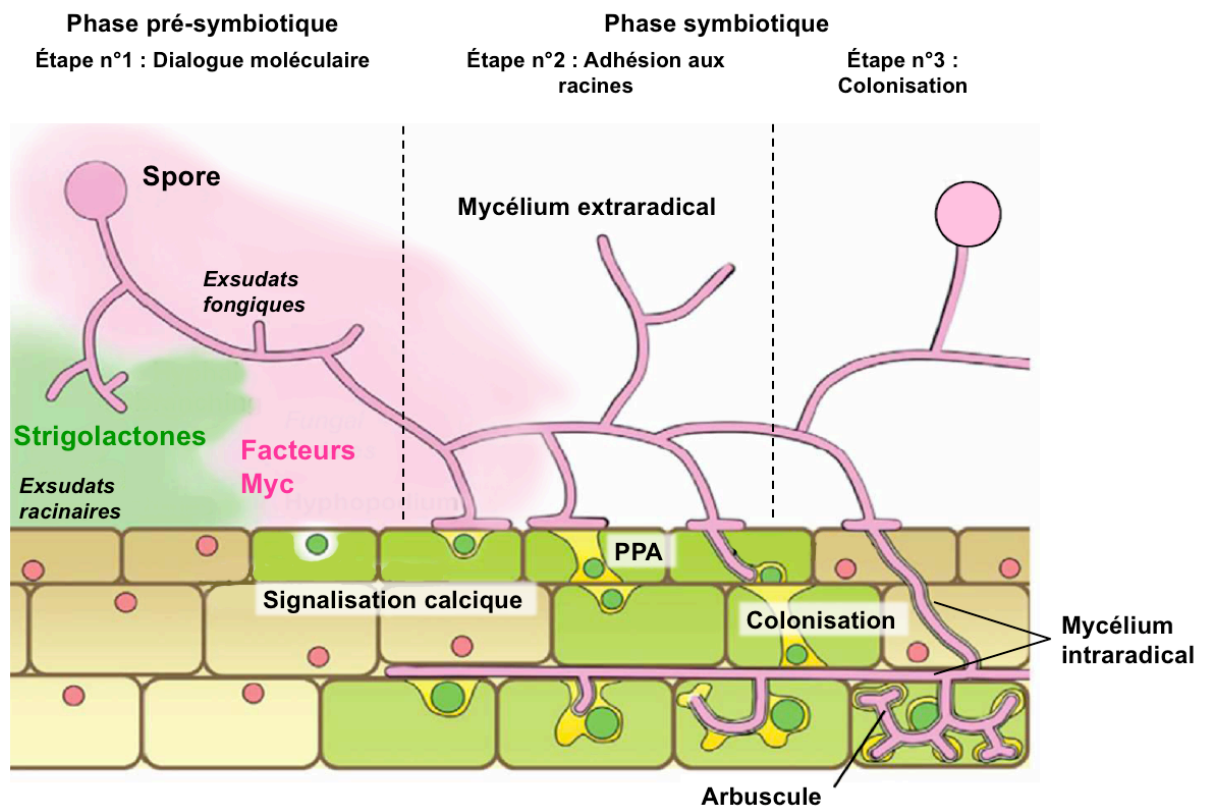
## II) La symbiose mycorhizienne à arbuscules

Notre équipe a réalisé un article de revue sur l'histoire de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Cet article a été récemment accepté pour publication dans la revue *Mycorrhiza* en 2021 (Annexe). Cet article, auquel j'ai contribué, développe notamment l'évolution des pensées et des connaissances sur la mycorhize à arbuscules ainsi que les différentes méthodologies d'identification et de visualisation des champignons mycorhiziens à arbuscules et de l'interaction.

La symbiose mycorhizienne à arbuscules (SMA) représente une interaction essentielle pour les plantes. La SMA est une symbiose mutualiste à bénéfices réciproques entre une plante hôte et un partenaire fongique : les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Il s'agit également d'une des plus anciennes symbioses du règne végétal puisque selon certaines hypothèses, la SMA, dans son état primitif, a contribué à la colonisation des terres émergées par les plantes aquatiques, il y a 450 millions d'années, puis a co-évolué avec les plantes terrestres (Redecker et al. 2000; Brundrett 2002).

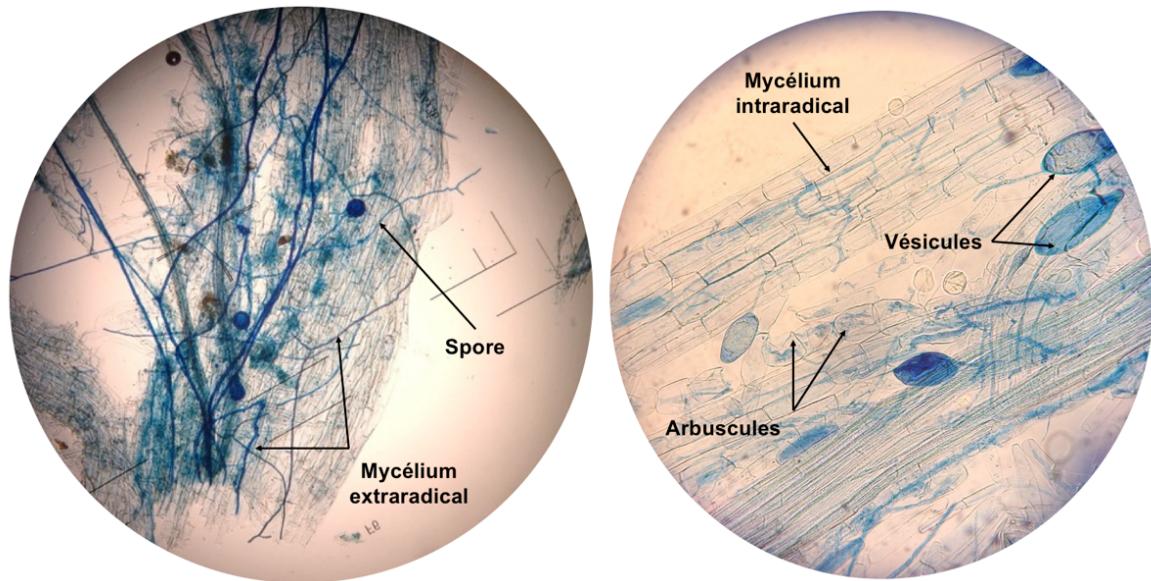
### a) Le cycle de vie de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

La colonisation d'un hôte par un organisme n'est pas sans conséquence pour les deux individus qui vont réagir et adapter leur métabolisme et leur physiologie pour mettre en place cette interaction. Dans le cas de la SMA, le champignon pénètre à l'intérieur des racines des plantes. Différentes analyses morphologiques ont montré que le partenaire fongique se développe préférentiellement dans les cellules corticales des racines après avoir traversé les structures parenchymateuses (Bonfante and Genre 2010). Cependant, avant même la mise en place de cette interaction, un dialogue moléculaire et chimique permanent existe entre la plante et les microorganismes permettant la détection de leur environnement biologique. La plante va être en capacité de sécréter des signaux chimiques, au niveau de ses racines, et notamment des strigolactones qui ont un rôle essentiel à la fois dans la germination des spores de CMA, le développement des structures fongiques et la fixation des hyphes sur les racines (Akiyama et al. 2005; Bouwmeester et al. 2007). D'autres facteurs influencent le développement des CMA et la formation de la SMA comme l'auxine produite par les plantes (Gutjahr 2014). La demande en nutriments par les plantes, en phosphate notamment, et la disponibilité de ceux-ci, favorisent la production des strigolactones de manière à induire la mise en place de la symbiose avec les CMA à proximité (Carbonnel and Gutjahr 2014). Dans cette phase dite pré-symbiotique (**Figure 6 étape 1**), la plante reçoit également des signaux émis, de la part des CMA à proximité appelés facteur Myc (Maillet et al. 2011). Différentes études ont montré l'émission de ces facteurs Myc sous forme de chitoooligosaccharides et de lipo-chito-oligosaccharides par les CMA (Genre Andrea et al. 2013). Ces polysaccharides permettent notamment l'induction des réponses de la plante et favorisent la reconnaissance des CMA (Sun et al. 2015).



**Figure 6** : Schéma des étapes de la colonisation racinaire par les CMA (modifié à partir de Bonfante and Genre 2010). La colonisation se déroule en trois étapes principales. **Étape n°1** : dialogue moléculaire entre la plante et le CMA (reconnaissance des facteurs Myc par la plante et des strigolactones par les CMA). **Étape n°2** : adhésion des hyphes à la racine et formation d'un appareil de pré-pénétration (PPA). **Étape n°3** : pénétration des hyphes jusqu'au cellules corticales des racines et formation des arbuscules.

Structurellement, le CMA va former plusieurs éléments au cours de la symbiose, lui permettant d'assurer l'ensemble de son cycle de développement (**Figure 7**). À l'image d'une graine, la spore du champignon va pouvoir germer puis former un mycélium extraradical dans le sol qui sera appelé intraradical une fois à l'intérieur des racines. Ces structures sont connectées et permettent la formation d'un réseau d'hyphes à l'intérieur des plantes comme à l'extérieur. Le mycélium extraradical permettra l'exploration du sol pour la recherche et l'assimilation des nutriments et de l'eau. Du côté racinaire, le mycélium intraradical colonisera les espaces intercellulaires. La pénétration des hyphes au sein des cellules corticales donnera lieu à la formation d'une structure spécifique à ce type de mycorhize : l'arbuscule. Cet arbuscule est le lieu d'échange entre la plante et les CMA. Le CMA étant un organisme biotrophe obligatoire, il est dépendant d'une ou plusieurs plantes hôtes qui vont lui fournir une source de carbone. En contrepartie, le CMA peut apporter à la plante les nutriments nécessaires ainsi que de l'eau, issus du sol et qui vont transiter par le mycélium extraradical puis intraradical. Au cours des échanges, le CMA absorbe une partie du carbone qui va servir au développement du mycélium et des spores, mais il va pouvoir également le mettre en réserve dans des vésicules de stockage.



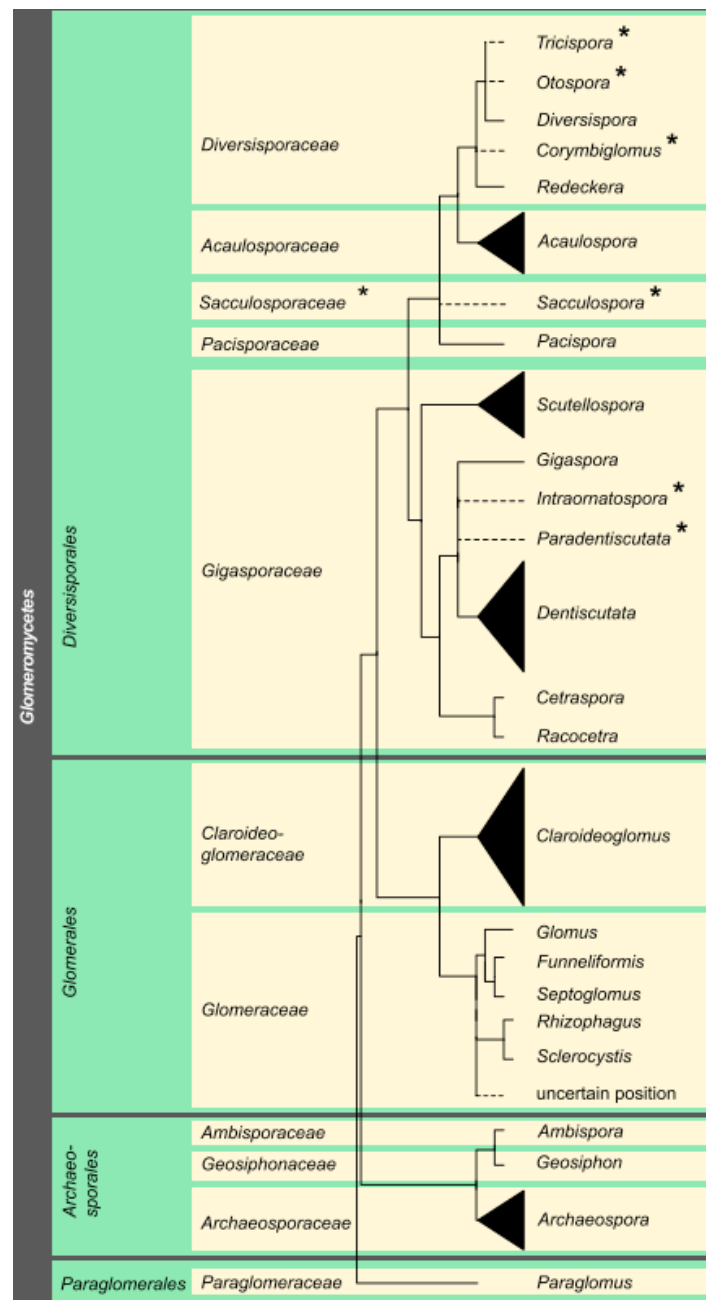
**Figure 7** : Colonisation de racines de *Medicago lupulina* par *Rhizoglyphus irregularis*. Après décoloration des racines, les structures fongiques présentes sont observables par coloration au bleu trypan.

La mise en place de la SMA est un processus long, évalué à plusieurs dizaines de jours, et passe par plusieurs phases (Rich et al. 2017). Après la reconnaissance et le contact avec les racines des plantes, le CMA va produire un appareil de pré-pénétration (PPA, pre-penetration apparatus). Du côté de la plante, une reprogrammation cellulaire et une réorganisation du cytoplasme et du cytosquelette des cellules vont permettre au PPA de rentrer et de se développer dans les tissus racinaires (**Figure 6 étape 2**). Dans la suite de la symbiose, les hyphes vont parcourir l'apoplasme jusqu'à atteindre les cellules corticales où les hyphes vont rentrer à l'intérieur et former des arbuscules (**Figure 6 étape 3**). Après la formation des arbuscules, un échange de nutriments se met en place entre la plante et le CMA. Le CMA est en mesure de coloniser l'ensemble d'une racine et de former de nombreux arbuscules afin de renforcer les échanges entre les deux partenaires (Chaudhary et al. 2019).

### b) L'évolution de la phylogénie des champignons mycorhiziens à arbuscules

Actuellement, l'ensemble des espèces de CMA qui participent à la SMA font exclusivement partie des *Glomeromycetes*, division taxonomique des *Mucoromycota* qui regroupe plusieurs centaines d'espèces. Malgré la présence de controverses importantes sur l'identification précises des CMA, la dernière classification des CMA montre que ces organismes sont regroupés en quatre ordres : *Glomerales*, *Diversisporales*, *Archaeosporales*, *Paraglomerales* ; et 11 familles : *Glomeraceae*, *Claroidoglomeraceae*, *Diversisporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Sacculosporaceae*, *Pacisporaceae*, *Gigasporaceae*, *Ambisporaceae*, *Geosiphonaceae*, *Archaeosporaceae* et *Paraglomeraceae* (**Figure 8**, Schüßler and Walker 2011; Redecker et al. 2013). Parmi cette grande famille d'organismes, une espèce ressort en tant que modèle d'étude sur la mycorhize : *Rhizoglyphus irregularis*. Anciennement appelé *Glomus intraradices*, ce

champignon a été un des premiers à être cultivé in vitro (Pawlowska et al. 1999). Plus récemment, le génome de *R. irregularis* a été séquencé et annoté (Tisserant et al. 2013).

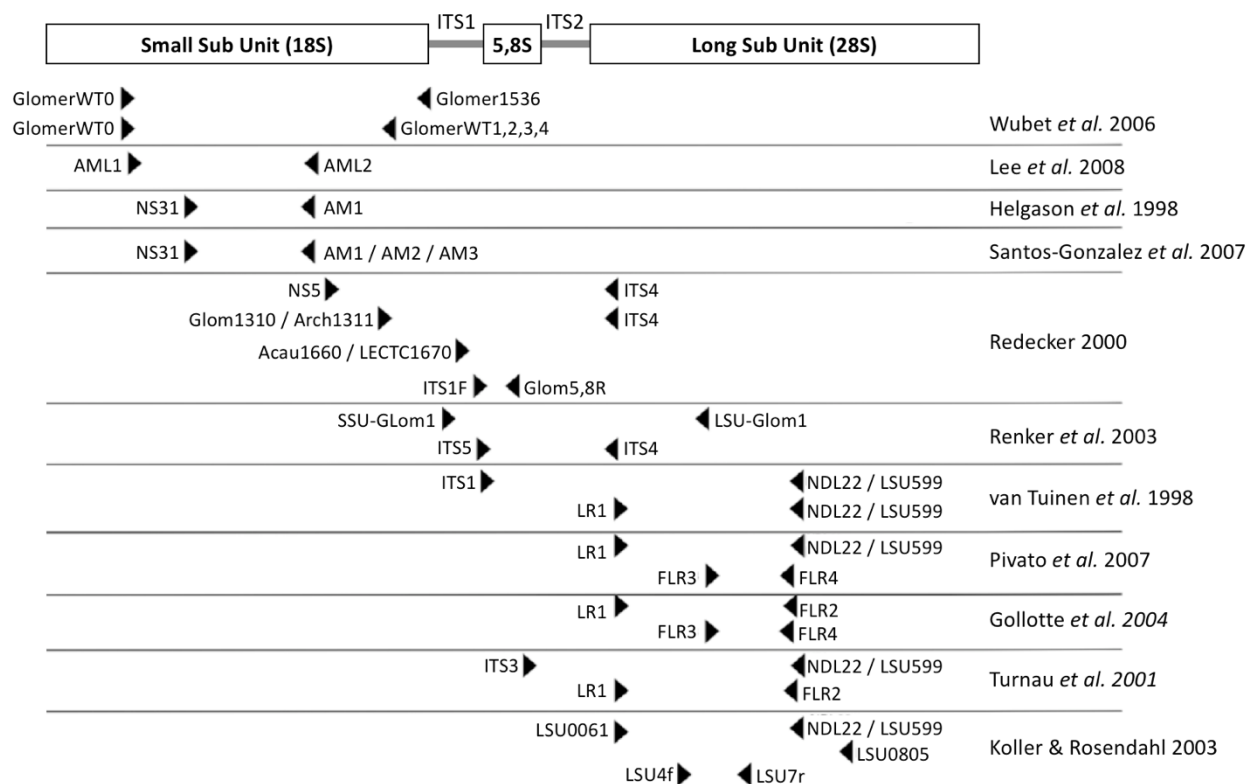


**Figure 8** : Classification phylogénétique des CMA faisant consensus depuis 2013. Cette classification est basée sur l'alignement des séquences de la petite sous-unité du ribosome (SSU). Les astérisques représentent la famille ou les genres dont les preuves ne sont pas suffisantes pour pouvoir les exclure (issu de Redecker et al. 2013).

Historiquement, la classification des CMA s'est faite en fonction des caractéristiques morphologiques des spores comme la taille et la couleur (Mosse and Bowen 1968). Au fur et à mesure des connaissances, il est apparu que certaines espèces, notamment celles issues des genres *Glomus* et *Acaulospora*, présentaient un fort dimorphisme des spores remettant en cause les premiers critères d'identification (Taylor et al. 2014).



D'autres études ont par ailleurs mis en avant d'autres biais comme l'âge des spores (Rosendahl 2008). Les techniques moléculaires développées ces dernières décennies comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, Polymerase Chain Reaction) et les nouvelles technologies de séquençage à haut débit (NGS, New Generation Sequencing) ont permis de faire évoluer la classification des CMA. De manière similaire à l'identification d'une communauté de bactéries ou de champignons dans un échantillon, les séquences de l'ADN ribosomique ont été ciblées de manière à dessiner des couples d'amorces universelles pour les différentes familles de CMA (**Figure 9**). Les premières amorces VANS1 ont permis d'amplifier une région variable de la petite sous-unité du ribosome (SSU, Small SubUnit) (Simon et al. 1993). Par la suite, d'autres amorces ont été développées ciblant la petite (Öpik et al. 2006) ou la grande sous-unité du ribosome (Van Tuinen et al. 1998), ainsi que la région de l'espaceur interne transcrit (ITS, Internal transcribed spacer) (Krüger et al. 2009). Cependant la génétique des CMA reste encore mal comprise et de nombreux verrous persistent. En effet, les CMA possèdent des hyphes non septés (non fragmentés) et coenocytiques c'est-à-dire qu'ils sont multi-nucléés. À cela s'ajoute plusieurs centaines de noyaux dans les spores des CMA avec un polymorphisme génétique très élevé (Sanders et al. 1995; Pawlowska and Taylor 2004). Enfin, des phénomènes de fusions d'hyphes que l'on appelle « anastomose » ont pu être observé entre individus génétiquement proches compliquant encore plus l'identification génétique (Giovannetti et al. 2001; Croll et al. 2009).



**Figure 9** : Schéma représentant une portion de l'ADN ribosomique. Les triangles noirs représentent la position et l'orientation des différentes amorces utilisées pour l'identification phylogénétique des CMA.

La classification des CMA a été très récemment actualisée suite à l'analyse des génomes des CMA. Plusieurs hypothèses proposent de placer les CMA un sous-phylum des *Glomeromycotina* intégré au phylum des *Mucoromycotina* (Spatafora et al. 2016; Tedersoo et al. 2018). Cependant, aucun consensus n'a été trouvé au sein de la communauté des mycorhizologues pour identifier des amorces PCR universelles. Les amorces ciblant l'ITS des CMA sont aujourd'hui peu utilisées car elles sont peu spécifiques et ne permettent pas de distinguer les groupes d'espèces liées au genre *Glomus* (Stockinger et al. 2010). Il a également été montré l'amplification de ces séquences ITS produisaient un grand nombre de séquences chimériques (Kohout et al. 2014). Au contraire, la majorité des études utilise aujourd'hui des amorces ciblant des régions hypervariables de la SSU ou de la LSU. Plusieurs études récentes conduites par le laboratoire ont permis d'identifier des amorces (FLR3 et FLR4) sur la région hypervariable du domaine D2 de la LSU (Van Tuinen et al. 1998; Gollotte et al. 2004). Ces amorces ont par ailleurs été utilisées avec succès dans différentes études au champ pour identifier différentes communautés de CMA (Gollotte et al. 2004; Pivato et al. 2007; Brígido et al. 2017; Binet et al. 2020). Même si ces amorces sont capables d'amplifier l'ensemble du phylum des *Glomeromycota*, une amplification de la LSU d'autres phyla de champignons peut se produire (Sánchez-Castro et al. 2017). D'autres cibles sont également à l'étude pour identifier les communautés de CMA, comme par exemple l'utilisation d'amorces dirigées sur la grande sous-unité du gène de l'ARN polymérase II (RPB1) (Redecker and Raab 2006). Des études récentes ont permis de montrer la grande spécificité de ces amorces sur l'identification des communautés de CMA (Stockinger et al. 2014) qui ont ensuite pu être utilisées dans des expérimentations sur le terrain (Peyret-Guzzon et al. 2016; Thioye et al. 2020).

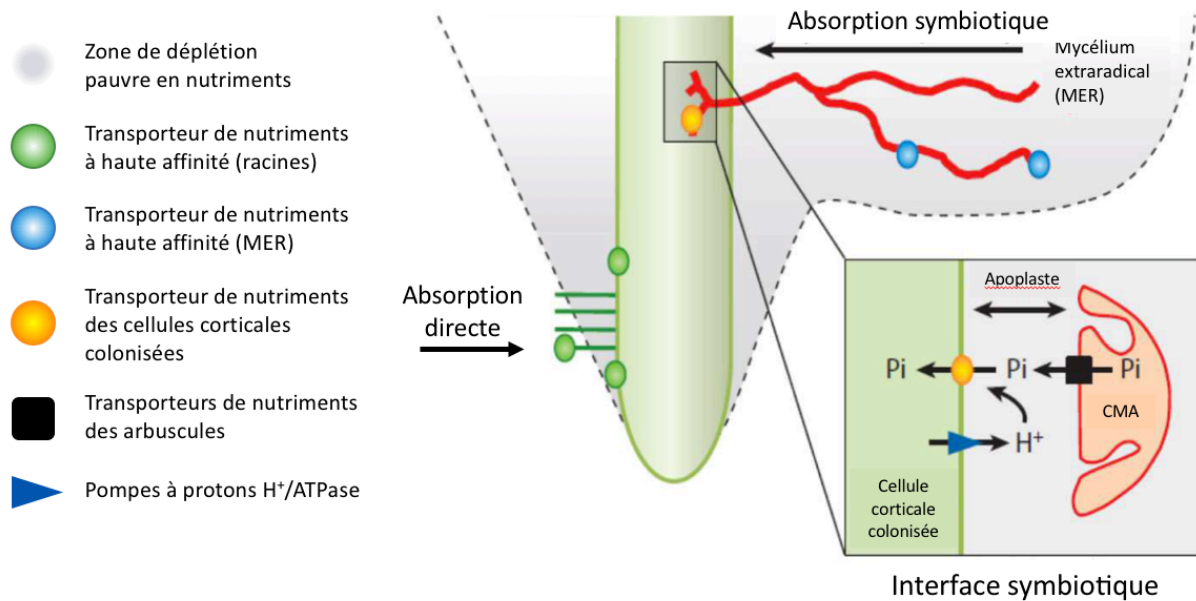
### III) Les services écosystémiques rendus par les champignons mycorhiziens à arbuscules

Les CMA sont des organismes symbiotiques clés des plantes au sein des écosystèmes et vont fournir ce qu'on appelle des services écosystémiques. Ce concept de « service écosystémique » regroupe un certain nombre de fonctions dans l'écosystème, de mécanismes biologiques et des ressources des écosystèmes, qu'ils soient naturels ou agricoles (Costanza et al. 1997). Ainsi, la mycorhize à arbuscules apporte à l'écosystème différents services écosystémiques que l'on peut diviser en deux types (Gianinazzi et al. 2010). Tout d'abord, les CMA fournissent des services liés aux cultures et à leur productivité comme l'amélioration de la nutrition des plantes, l'augmentation des rendements et de la qualité des cultures. D'autre part, les CMA fournissent des services à part de la productivité directe des cultures et plutôt liés à l'écosystème dans sa globalité. Sur ce point, les CMA participent à une meilleure stabilité et structure des sols et à l'amélioration de la protection des cultures face à des ravageurs ainsi qu'à la tolérance aux stress abiotiques.

### a) Amélioration de la nutrition des plantes par les champignons mycorhiziens à arbuscules

La SMA est maintenant reconnue pour l'amélioration de la nutrition des plantes qui est le principal service écosystémique rendu. En effet, lorsque la SMA devient fonctionnelle, un échange important d'eau et de nutriments est mis en place au niveau des arbuscules entre le CMA et la plante. Les CMA sont tous des organismes biotrophes obligatoires qui les rendent entièrement dépendants de la plante qu'ils colonisent. Comme beaucoup de champignons, les CMA sont des organismes hétérotrophes au carbone et c'est donc la plante qui va leur fournir une source de carbone nécessaire à leur développement. En échange, les CMA sont capables de fournir à la plante de l'eau et les éléments nutritifs d'origine tellurique nécessaires à son développement.

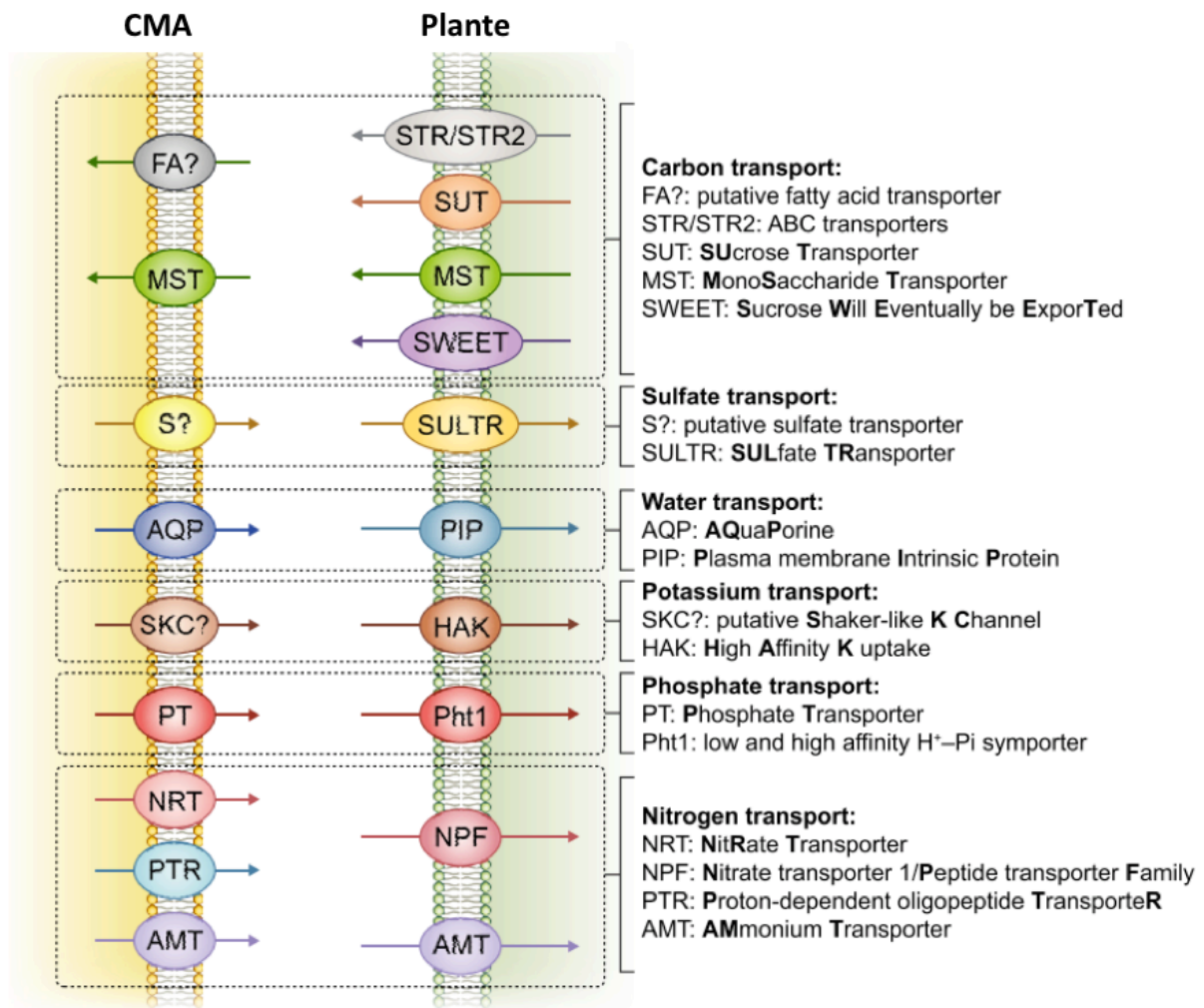
Sans symbiose, les plantes sont capables d'absorber directement les nutriments présents dans le sol à proximité des racines. Cette voie directe d'absorption des nutriments repose sur la présence, au niveau des poils absorbants, de transporteurs à haute affinité. En revanche, l'absorption rapide de certains nutriments comme le phosphore, qui est très peu mobile dans le sol, crée autour du système racinaire une zone de déplétion importante, appauvrie en nutriments (Marschner and Dell 1994). C'est là qu'une deuxième voie d'absorption, cette fois symbiotique est nécessaire (Casieri et al. 2013) (**Figure 10**). Grâce aux hyphes mycorhiziens qui permettent l'exploration d'un volume de sol beaucoup plus important, qui peut atteindre 40 fois plus que l'exploration racinaire, les CMA sont capables d'aller puiser des nutriments au-delà de cette zone de déplétion (Wipf et al. 2019). Le phosphate et l'azote sont des éléments préférentiellement échangés lors de la symbiose mycorhizienne. Ces deux macroéléments sont essentiels pour tous les organismes vivants car ils sont impliqués dans la structure des molécules fondamentales et dans de nombreuses fonctions métaboliques. De plus, il a été montré que la concentration en phosphore dans le sol était corrélée à l'abondance et au développement des CMA (Bucher 2007). Ainsi, plus la concentration en phosphore est réduite, plus le CMA va se développer de manière à combler le déficit nutritif de la plante. Toutefois, dans le cas du phosphore, les CMA sont appuyés dans leur tâche par d'autres microorganismes du sol comme les bactéries solubilisatrices de phosphate (Zhang et al. 2016b; Ordoñez et al. 2016). Les bactéries solubilisatrices de phosphate produisent et libèrent dans le sol des enzymes capables de dégrader les résidus de phosphate organiques et inorganiques en plus petites molécules (Koide and Kabir 2000). Ce phosphate va ensuite être transporté à travers les hyphes puis libéré dans l'espace péri-arbusculaire des cellules colonisées (**Figure 10**). De manière similaire, les CMA vont capter les différentes formes d'azote présentes dans le sol (l'ammonium  $\text{NH}_4^+$ , et le nitrate  $\text{NO}_3^-$ ), le transformer en acides aminés de manière à le transporter jusqu'à la plante (Wipf et al. 2019).



**Figure 10** : Les différentes voies d'absorption des nutriments par les plantes (modifié à partir de Smith et al. 2011).

Comme il est indiqué précédemment, les CMA fournissent un meilleur accès aux ressources nutritives du sol. Cependant, les CMA sont des organismes hétérotrophes qui nécessitent une source de carbone extérieure pour assurer leur développement. Cet apport de carbone est fourni par la plante via les arbuscules en mobilisant une partie des sucres issus de la photosynthèse. Ainsi, la plante est capable de transférer au champignon jusqu'à 20% des photosynthétats produits (Hobbie 2006). De plus, la formation de cette symbiose et ce transfert de composés carbonés des cellules racinaires vers le CMA renforcent la force du puits de carbone que constituent les racines. Les lipides de réserves fournissent ainsi une deuxième source de carbone qui est mobilisé par la plante à destination du champignon (Bago et al. 2000). Ce point sera d'ailleurs confirmé par la production de plantes mutées sur plusieurs gènes des voies de biosynthèse des lipides (*FatM* et *RAM2*) qui exprimeront un phénotype de symbiose fortement réduit (Bravo et al. 2017; Keymer and Gutjahr 2018).

La SMA permet à la plante d'augmenter l'accessibilité des nutriments. Lorsque la symbiose se met en place, de nombreuses modifications physiologiques, hormonales, métaboliques et moléculaires ont lieu chez la plante et une modification de l'expression de certains transporteurs de nutriments (ex. sucres, phosphate azote, potassium, soufre) est primordiale pour améliorer l'efficacité de l'échange entre la plante et le CMA au niveau de l'arbuscule (Wipf et al. 2019) (**Figure 11**).



**Figure 11** : Différentes familles de transporteurs impliqués dans les échanges de nutriments et d'eau chez les CMA (à gauche) et chez les plantes (à droite) (issu de Wipf et al. 2019).

En résumé, la SMA permet aux plantes d'accéder à une quantité plus importante de nutriments via l'exploration du sol par les CMA. Il en résulte une amélioration du fitness et du développement des plantes colonisées ce qui présente un avantage non-négligeable dans la production végétale, en serres comme aux champs, du point de vue de la réduction et de l'optimisation de la fertilisation. La SMA permet d'augmenter significativement différents paramètres agronomiques liés au rendement des cultures. De plus, les CMA participent à augmenter le métabolisme des plantes et à produire différents métabolites intéressants du point de vue de la qualité technique et organoleptique des récoltes.

## **b) Amélioration du rendement et de la qualité des cultures par les champignons mycorhiziens à arbuscules**

*Cette partie a fait l'objet d'une revue bibliographique intitulée « Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the development of quality traits in crop production, alone or combined with Plant Growth Promoting Bacteria ». Cette revue a été récemment acceptée pour publication dans la revue Mycorrhiza (Noceto et al. 2021).*

L'agriculture moderne connaît actuellement des changements rapides face à la croissance continue de la population mondiale et aux nombreux défis environnementaux qui en découlent. La qualité des cultures devient aussi importante que leur rendement et peut être caractérisée par plusieurs paramètres. Pour les fruits et légumes, les descripteurs de la qualité peuvent concerner le cycle de production (par exemple, agriculture conventionnelle ou biologique), les qualités organoleptiques (par exemple, le goût sucré, la teneur en sucre, l'acidité) et les qualités nutritionnelles (par exemple, la teneur en minéraux, les vitamines). Cependant, pour d'autres cultures, la présence de métabolites secondaires tels que les anthocyanes ou certains terpènes dans les tissus ciblés est également intéressante, notamment pour leurs propriétés en matière de santé humaine.

Toutes les plantes sont en interaction constante avec des micro-organismes. Ces microorganismes comprennent les CMA ainsi que certaines bactéries du sol qui fournissent des services écosystémiques liés aux paramètres de croissance, de nutrition et de qualité des plantes. Cette revue est une mise à jour de la recherche actuelle sur l'utilisation simple et combinée (co-inoculation) des CMA et des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes dans la production agricole, en mettant l'accent sur leurs impacts positifs sur les caractéristiques de qualité des cultures (par exemple, la valeur nutritionnelle, les propriétés organoleptiques). Dans cette revue, nous soulignons également la nécessité de disséquer les mécanismes régulant les interactions plante-symbiote et symbiote-symbiote, de développer des pratiques agricoles et d'étudier un large éventail de cultures.



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

Pierre-Antoine Noceto<sup>1</sup> · Pauline Bettenfeld<sup>1,2</sup> · Raphael Bousageon<sup>1</sup> · Mathilde Hériché<sup>1</sup> · Antoine Sportes<sup>1</sup> · Diederik van Tuinen<sup>1</sup> · Pierre-Emmanuel Courty<sup>1</sup> · Daniel Wipf<sup>1</sup>

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

## Abstract

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

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

## Introduction

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

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

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

✉ Daniel Wipf  
daniel.wipf@inrae.fr

<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, Université de Bourgogne, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

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

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

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

## AM symbiosis improves the nutritional value of crops

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

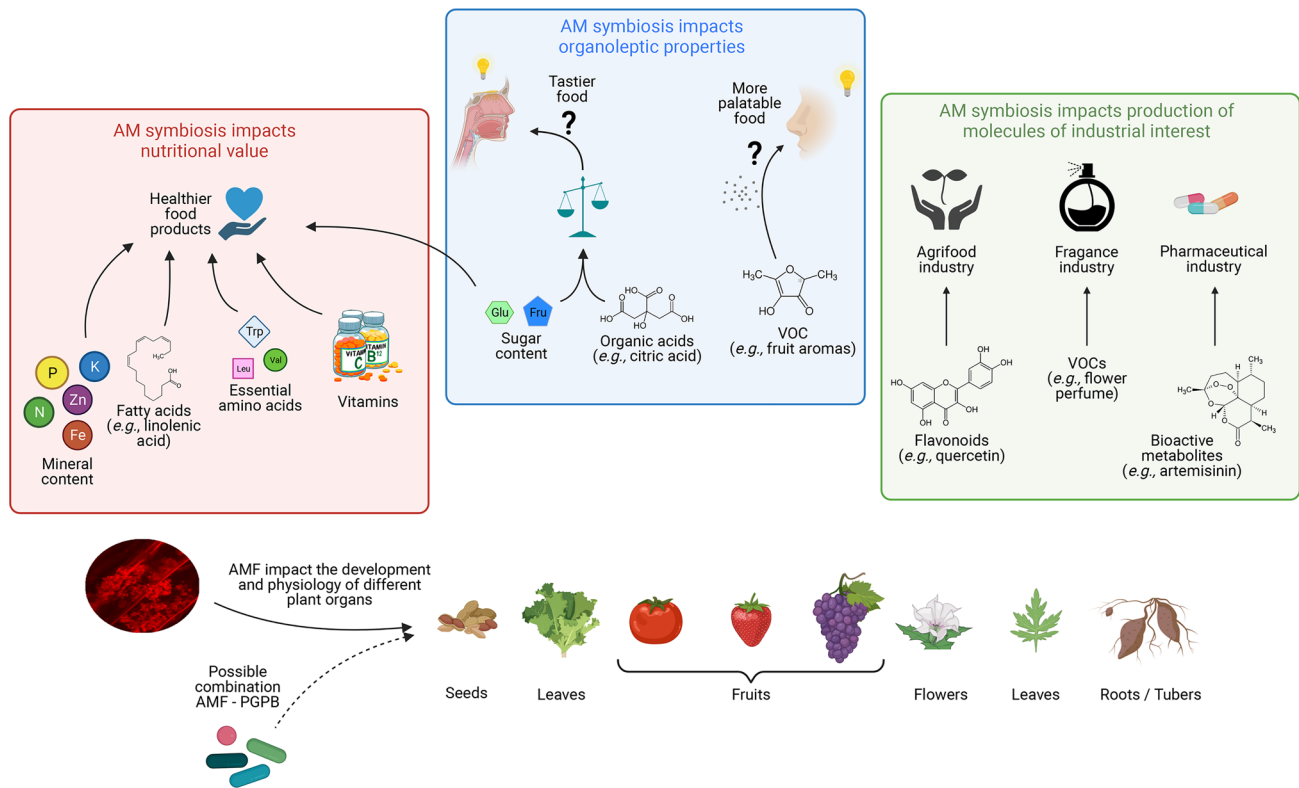
management of AM symbiosis in agroecosystems can be of importance for high-nutritional-value food production (Fig. 1).

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

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

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





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

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

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

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

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

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

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

## AM symbiosis influences the organoleptic properties of fruit

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## AM symbiosis: a tool for producing compounds of industrial interest

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

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

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

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

**Table 1** (continued)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Reference	Cultivars	AMF inoculation	Co-inoculation	Effect on plant parameters
<i>Fragaria X ananassa</i>				
Lingua et al. 2013	Selva	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (5V m1K; Pf4)	Increased anthocyanins concentrations in + AMF or + AMF/+ bacteria conditions compared to – AMF/– bacteria conditions AMF Mix inoculation: Increased sucrose and ascorbic acid concentrations No effect on glucose, fructose, total sugar, folic acid concentration and titratable acidity Co-inoculation: Increased sucrose, ascorbic acid, folic acid concentrations and titratable acidity No effect on glucose, fructose and total sugar concentrations
Bona et al. 2015	Selva	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (5V m1K; Pf4)	
<i>Solanum lycopersicum</i>				
Todeschini et al. 2018	Elyana F1	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Septoglomus viscosum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (19Fv1t; 5V m1K; Pf4)	Shoot and root biomass, flowers per plant, fruit size are affected by AMF and AMF + bacteria No effect on total sugars pH, titratable acidity and organic acid production are affected by AMF and bacteria Anthocyanidins production is affected by co-inoculation AMF + bacteria Fruit mineral composition and volatiles production: affected by both organisms
<i>Solanum lycopersicum</i>				
Ordookhani et al. 2010	F1 Hybrid, GS-15	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Glomus etunicatum</i>	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i>	Increased lycopene concentration, antioxidant activity, potassium content in fruits in AMF and co-inoculation conditions
Nzanza et al. 2012	Nemo-Netta	<i>Funneliformis mosseae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Increased fruit size and yield No effect on fruit P content, flavonoids, vitamins, antioxidant activity
Bona et al. 2017	TC2000	Mybasol s.r.l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. C7, <i>Pseudomonas</i> sp. 19Fv1T	Increased yield parameters (fruit size and weight), sugars concentrations No effect on total carotenoids content Decreased ascorbic acid and nitrate concentration

Table 2 (continued)

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

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

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

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

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

## Concluding remarks and further prospects

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

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

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

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

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

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

**Author contribution** Not applicable.

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

**Availability of data and material** Not applicable.

**Code availability** Not applicable.

## Declarations

**Competing interests** The authors declare no competing interests

**Ethics approval** Not applicable.

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



**Consent to participate** Not applicable.

**Consent for publication** Not applicable.

## References

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

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

- Gholinezhad E, Darvishzadeh R (2021) Influence of arbuscular mycorrhiza fungi and drought stress on fatty acids profile of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Field Crops Research* 262:108035. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.108035>
- Gianinazzi S, Golotte A, Binet M-N et al (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti M, Avio L, Barale R et al (2012) Nutraceutical value and safety of tomato fruits produced by mycorrhizal plants. *Br J Nutr* 107:242–251. <https://doi.org/10.1017/S000711451100290X>
- Giovannucci E (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Cancer Spectrum Knowledge Environment* 94:391–398. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.5.391>
- Goff HD, Repin N, Fabek H et al (2018) Dietary fibre for glycaemia control: towards a mechanistic understanding. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 14:39–53. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.07.005>
- Gruda N (2008) Do soilless culture systems have an influence on product quality of vegetables? <https://doi.org/10.18452/9433>
- Grunert KG (2005) Food quality and safety: consumer perception and demand. *Eur Rev Agric Econ* 32:369–391. <https://doi.org/10.1093/eurag/jbi011>
- Guerrieri E, Lingua G, Digilio MC et al (2004) Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? *Ecol Entomol* 29:753–756. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2004.00644.x>
- Gupta S, Thokchom SD, Kapoor R (2021) Arbuscular mycorrhiza improves photosynthesis and restores alteration in sugar metabolism in *Triticum aestivum* L. grown in arsenic contaminated soil. *Front Plant Sci* 12:640379. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640379>
- Hadian-Deljou M, Esna-Ashari M, Mirzaie-asl A (2020) Alleviation of salt stress and expression of stress-responsive gene through the symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi with sour orange seedlings. *Sci Hortic* 268:109373. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109373>
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 95:853–860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x>
- Hart M, Ehret DL, Krumbein A et al (2015) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves the nutritional value of tomatoes. *Mycorrhiza* 25:359–376. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0617-0>
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.025>
- Hijri M (2016) Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza* 26:209–214. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4>
- Holt-Giménez E, Altieri MA (2012) Agroecology, Food Sovereignty and the New Green Revolution *J Sustain Agric* 120904081412003 <https://doi.org/10.1080/10440046.2012.716388>
- Huang D, Ma M, Wang Q et al (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced drought resistance in apple by regulating genes in the MAPK pathway. *Plant Physiol Biochem* 149:245–255. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.020>
- Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C et al (2012) The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- $\beta$ -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol* 193:997–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04001.x>
- Jacquier C, Bonthoux F, Baciu M, Ruffieux B (2012) Improving the effectiveness of nutritional information policies: assessment of unconscious pleasure mechanisms involved in food-choice decisions. *Nutr Rev* 70:118–131. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00447.x>
- Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F et al (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Aust J Crop Sci* 5:726–734
- Jayasena V, Cameron I (2008) °BRIX/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of crimson seedless table grapes. *J Food Qual* 31:736–750. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00231.x>
- Jogawat A, Yadav B, Chhaya, et al (2021) Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review. *Physiol Plant* 172:1106–1132. <https://doi.org/10.1111/pp1.13328>
- Joner EJ, Jakobsen I (1995) Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biol Biochem* 27:1153–1159. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00047-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00047-1)
- Jurkiewicz A, Ryszcza P, Anielska T et al (2010) Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: effects of mycorrhizal fungi and competing plants. *Mycorrhiza* 20:293–306. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0280-z>
- Kaldorf M, Kuhn AJ, Schröder WH et al (1999) Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J Plant Physiol* 154:718–728. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80250-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80250-8)
- Kapoor R, Anand G, Gupta P, Mandal S (2017) Insight into the mechanisms of enhanced production of valuable terpenoids by arbuscular mycorrhiza. *Phytochem Rev* 16:677–692. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9486-9>
- Kessler A (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141–2144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>
- Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M et al (2006) Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16:443–446. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0062-9>
- Kigathi RN, Weisser WW, Reichelt M et al (2019) Plant volatile emission depends on the species composition of the neighboring plant community. *BMC Plant Biol* 19:58. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1541-9>
- Kumar A, Maurya BR, Raghuwanshi R (2014) Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatal Agric Biotechnol* 3:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.08.003>
- Lemfack MC, Gohlke B-O, Toguem SMT et al (2018) mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 46:D1261–D1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>
- Li H, Chen XW, Wong MH (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi reduced the ratios of inorganic/organic arsenic in rice grains. *Chemosphere* 145:224–230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.067>
- Lingua G, Bona E, Manassero P et al (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization. *IJMS* 14:16207–16225. <https://doi.org/10.3390/ijms140816207>
- Ludwig-Müller J (2000) Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. In: Kapulnik Y, Douds DD (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp 263–285

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

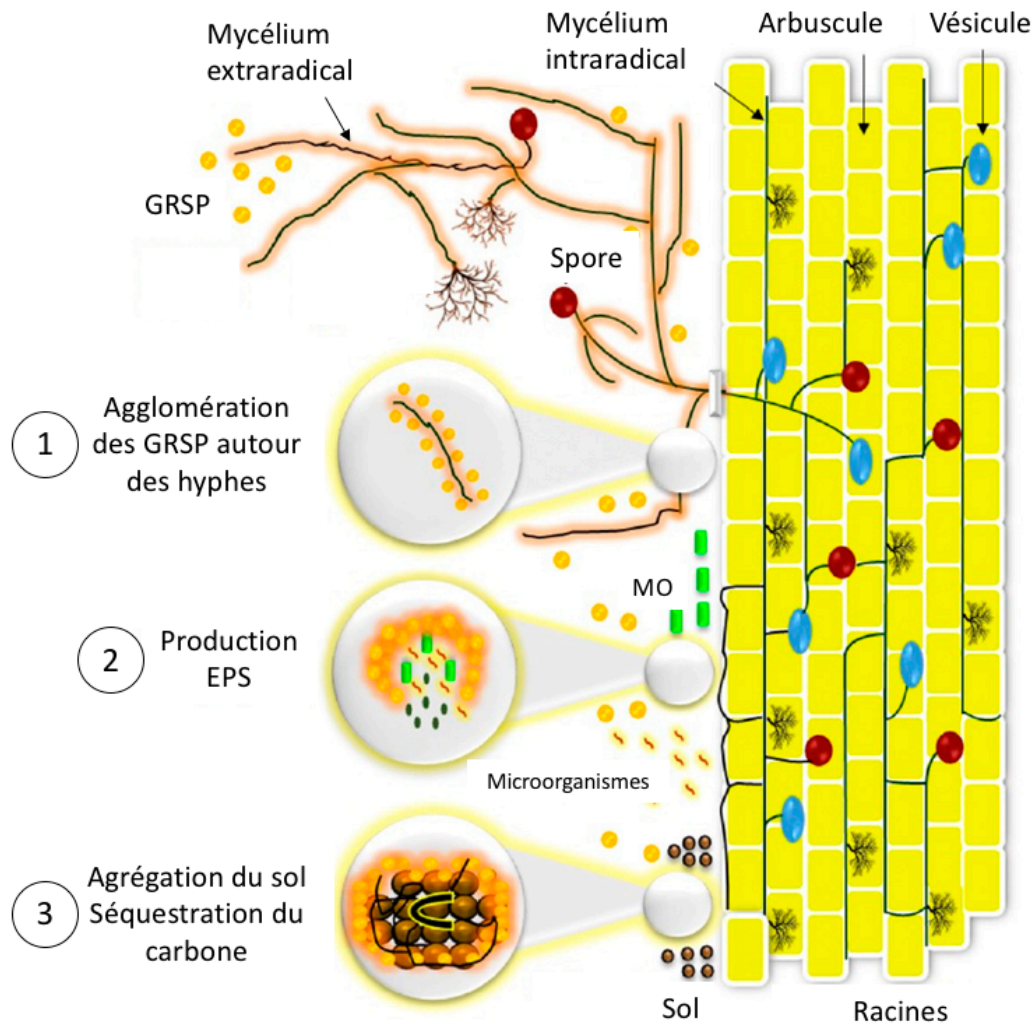
- in *Pogostemon cablin* (patchouli) Benth. *World J Microbiol Biotechnol* 28:323–333. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0823-2>
- Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 23:136–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>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

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

### c) Stabilisation des sols par les champignons mycorhiziens à arbuscules

Le sol a longtemps été considéré comme un matériau sur lequel nous marchons, qui sert de base aux constructions que l'Homme mettaient en place mais également de support de développement des végétaux. Or, il s'avère que le sol est un extraordinaire réservoir du vivant en abritant une très grande diversité d'organismes et de microorganismes avec des fonctions différentes. La stabilité et la structure des sols favorisent les échanges gazeux et nutritifs et participent au bon développement des végétaux et des organismes qui l'abritent. Parmi tous les organismes du sol, les microorganismes et les CMA prennent une part très importante de par leurs effets positifs sur les plantes mais également sur la nature même du sol (Lynch and Bragg 1985; Amézketa 1999; Welbaum et al. 2004). Les CMA agissent fortement sur la structuration et l'amélioration de la stabilité des sols selon deux mécanismes. D'une part, la présence des structures fongiques regroupées en un réseau d'hyphes qui parcourent l'horizon supérieur du sol jusqu'à 30 m par gramme de sol, forment une maille solide qui agit comme un filet retenant les particules de sol de la même manière que le système racinaire des plantes (Cavagnaro et al. 2005; Zou et al. 2015). L'effet de cette structuration « physique » est essentiel mais reste cependant plus faible que la structuration « chimique » due aux CMA. En effet, il a été montré que les CMA étaient capables de produire et de sécréter une molécule bien particulière : la glomaline (Rillig et al. 2002; Wilson et al. 2009). Cette molécule est une glycoprotéine qui agit comme une colle autour des particules de sol renforçant l'agrégation de ces dernières. Au fur et à mesure des études, on parle maintenant plutôt de protéines du sol liées à la glomaline (GRSP, Glomalin-Related Soil Protein) de manière à rassembler les complexes protéiques (Rillig 2004). Ces actions combinées, prennent une part très importante sur la stabilité des sols et donc sur leurs propriétés physiques de portance et chimiques sur le maintien des nutriments et de l'eau dans les macro- et micro-agrégats maintenant une meilleure durabilité des sols (**Figure 12**) (Agnihotri et al. 2022).

De nombreux paramètres influencent positivement et négativement la qualité des sols. En premier lieu, l'Homme qui par ses pratiques agricoles et l'urbanisation dégrade les sols et favorise l'érosion et la battance des sols (Martens 2000; Paul et al. 2013). Certaines pratiques comme le labour profond et répété affectent le développement des CMA, détruisent le réseau mycélien et augmentent le risque d'érosion. Ces pratiques influencent également la biomasse microbienne dans son ensemble limitant les mécanismes biologiques et les interactions multi-trophiques (Brussaard et al. 2007).



**Figure 12 :** Production des complexes protéiques du sol liés à la glomaline par les CMA (modifié à partir de Agnihotri et al. 2022). Les trois fonctions principales des GRSP sont i) la formation d'une couche protectrice autour des hyphes ; ii) la production d'exo-polysaccharides (EPS) ; iii) l'agrégation des particules de sol et la séquestration du carbone (MO = matière organique).

#### d) Effet protecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules face aux stress biotiques

Les plantes ne font pas simplement face à des organismes bénéfiques mais aussi à toute une diversité d'organismes macro- et microscopiques qui leur sont néfastes. Les organismes parasites et pathogènes (herbivores, insectes, champignons, bactéries, virus ...) sont fortement présents dans l'environnement. Ils sont responsables de dégâts parfois considérables sur certaines espèces et notamment en agriculture où leur contrôle est nécessaire au prix d'un rendement fortement réduit. Face aux problématiques sanitaires et environnementales que pose l'utilisation massive de pesticides en production végétale, l'utilisation et l'optimisation des services rendus par les CMA est une des solutions agroécologiques futures. En effet, l'apport des CMA ne se limite pas à une meilleure nutrition et la symbiose établie entre les CMA et les plantes se révèle plutôt multifonctionnelle. Les CMA participent à une meilleure protection des plantes et

des cultures selon plusieurs modes d'actions (Whipps 2004). Tout d'abord, la présence d'autres microorganismes comme les CMA entraîne une compétition avec les organismes pathogènes notamment pour les composés carbonés de la plante nécessaire à leur développement (Morandi et al. 2002). De plus, et comme chez l'humain, une plante en bonne santé est plus à même de se défendre face à des organismes pathogènes. L'un des principaux effets de la SMA sur la plante est l'augmentation de la nutrition et de la croissance. Ainsi, en augmentant le fitness général de la plante, les CMA permettent d'améliorer la résistance des plantes de manière indirecte. Enfin, une action directe et plus importante des CMA sur la régulation des gènes de défense permet à la plante de se protéger face aux organismes pathogènes (Yu et al. 2019). Cet effet maintenant bien connu est communément appelé « résistance induite par la mycorhize » (MIR, Mycorrhiza-Induced Resistance) (Pozo and Azcón-Aguilar 2007).

Lors des premières étapes de la colonisation racinaire par les CMA, il a pu être observé une diminution transitoire de cette colonisation montrant que la plante réagit et contrôle la prolifération du symbionte racinaire. À plus long terme, la mycorhization prend le dessus sur la plante. Les CMA sont capables d'activer et de désactiver certaines réponses de défense de la plante. De nombreuses études ont montré le rôle des CMA dans la résistance à différents organismes (Campos-Soriano et al. 2012). La colonisation des racines de *Oryza sativa* par *Rhizophagus irregularis* induit des mécanismes de signalisation locale et systémique comme la signalisation calcique, la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique, d'autres gènes de défense conduisant à une réduction des symptômes foliaires et une augmentation de la résistance du riz au pathogène foliaire *Magnaporthe oryzae* (Campos-Soriano et al. 2012). Ces phénomènes ont pu être établis chez d'autres plantes comme *Medicago truncatula*, *Solanum tuberosum* ou *Triticum aestivum* ainsi que dans d'autres interactions pathogènes (Alaux et al. 2018; Liu et al. 2018; Fiorilli et al. 2018). Chez la vigne, Li et al. ont montré que l'espèce de nématode *Meloidogyne incognita* n'avait pas d'impact sur la colonisation racinaire de *Vitis amurensis* par *Glomus versiforme*. Au contraire, la présence de ce CMA induit une augmentation des transcrits de *VCH3* associée à une réduction de l'infection par le nématode (Li et al. 2006). Ce gène codant une chitinase est impliqué dans les réponses de défense de la plante par des mécanismes de dégradation de la chitine présente dans la paroi des champignons ou dans les tissus des nématodes (Bézier et al. 2002). De plus, Hao et al. (2012) ont montré des effets similaires vis-vis du nématode *Xiphinema index*. La présence de ce nématode est très préoccupante pour les viticulteurs car il s'agit du vecteur principal du virus du court-noué (GFLV, Grapevine Fan Leaf Virus) qui provoque chez la vigne un affaiblissement des ceps et un dépérissement précoce du vignoble. Grâce à des systèmes à double compartiment, Hao et al. (2012) ont permis de déterminer que la colonisation du système racinaire par *Rhizophagus irregularis* augmentait la résistance locale lorsque le CMA et le nématode sont dans un même compartiment, et systémique lorsque les deux organismes sont dans des compartiments séparés (Hao et al. 2012). En revanche, même si les populations de *Xiphinema index* sont faibles, la présence des CMA ne permet pas de réduire le transfert et le développement du virus du court-noué dans les ceps (Hao et al. 2018). Chez la tomate, qui est également une culture d'importance économique, d'autres gènes homologues ainsi que des enzymes de voies



métaboliques comme la chorismate synthase ou la flavonol synthase sont régulés par la mycorhization (Vos et al. 2013). Récemment, des analyses transcriptomiques de type RNA-seq et protéomiques chez le blé ont permis d'évaluer les proportions et l'identité des gènes régulés positivement et négativement lors de l'interaction avec *Xanthomonas translucens* en présence ou non de *Funneliformis mosseae* (Fiorilli et al. 2018). On retrouve ainsi, à l'échelle locale et systémique, la production des protéines liées à la pathogénicité (PR, Pathogenic-related), des modifications des voies métaboliques et une augmentation de l'expression des gènes codant pour des transporteurs ou impliqués dans les voies hormonales de l'acide salicylique (SA), jasmonique (JA) ou de l'éthylène (ET) (Nair et al. 2015; Fiorilli et al. 2018).

Tous ces éléments mettent en lumière le rôle important des CMA dans la protection des cultures face à différents agents pathogènes mais également à des herbivores (Dabré et al. 2021). Il semble que cet effet protecteur de la mycorhize ne soit pas lié à l'organe infecté. La mycorhization montre des effets semblables entre des pathogènes racinaires, en contact avec les CMA, ou des pathogènes foliaires (Lanfranco et al. 2011; Campos-Soriano et al. 2012). Cependant, l'efficacité de cette protection reste sensible à d'autres facteurs. Il a pu être montré que cette résistance induite par la mycorhization était affectée par les stratégies d'infection des agents pathogènes. Dans le cas d'organismes biotrophes, il semblerait que la MIR réduit la résistance à ces pathogènes (Pozo and Azcón-Aguilar 2007) tandis que pour des organismes avec des stratégies hémibiotrophes ou nécrotrophes, la mycorhization des plantes augmenterait la résistance face à ces organismes (Fritz et al. 2006; Campos-Soriano et al. 2012). Enfin, l'effet de la souche de CMA employée en fonction des patho-systèmes est encore peu mis en avant. La grande majorité des études portant sur deux souches de CMA les plus communément utilisées : *Rhizophagus irregularis* et *Funneliformis mosseae*. Or, dans un écosystème, une plante est colonisée par plusieurs souches de CMA formant une communauté symbiotique. Peu d'études intègrent cet élément et il est donc nécessaire d'évaluer l'effet de souches isolées et leur mise en communauté dans les relations plante-pathogène pour identifier d'éventuelles synergies entre les différentes souches (Malik et al. 2016).

#### **e) Effet protecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules face aux stress abiotiques**

De plus en plus régulièrement, les plantes sont confrontées à différents stress environnementaux dont les origines sont diverses et qui causent des pertes importantes de rendement (Gianinazzi et al. 2010). Les changements climatiques de ces dernières décennies augmentent l'apparition de stress hydrique et de température. De plus, les activités humaines déstructurent les sols et accumulent les pollutions des eaux et des sols.

Les CMA sont des organismes clés par la fourniture des services écosystémiques détaillés précédemment mais également pour permettre une meilleure tolérance des plantes à ces stress abiotiques. Plusieurs études ont rapporté des effets positifs de la SMA sur la croissance des plantes dans des conditions particulièrement

stressantes (Abdel Latef and Chaoxing 2011; Nadeem et al. 2014). Les CMA participent directement à augmenter la tolérance des plantes au stress hydrique en augmentant l'apport d'eau. De plus, l'augmentation du fitness des plantes et des apports de nutriments par les CMA, rendent les plantes plus aptes à combattre ces différents stress. Les CMA induisent différentes modifications métaboliques et la production de molécules osmo-protectrices permettent à la plante de mieux résister face aux stress salin (Chandrasekaran et al. 2014; Hashem et al. 2016). Il a également été montré que la SMA induisait la production de tréhalose qui est un sucre non-réducteur impliqué dans la stabilisation des structures cellulaires et la résistance aux stress abiotiques (Ocón et al. 2007).

Enfin, il est intéressant de noter que la présence de ces stress peut affecter la diversité des CMA présents dans le sol et associés aux plantes et ainsi les services qu'ils fournissent à l'écosystème. En réponse, les CMA sont capables d'adapter leur développement et leur métabolisme selon différents mécanismes : en modifiant le métabolisme des lipides, par la production d'antioxydants, la décomposition de molécules polluantes. Enfin, grâce à l'étendue des réseaux mycéliens dans le sol, les CMA ont la capacité de séquestrer des molécules toxiques dans les structures fongiques et donc de diluer et diminuer la pollution dans les sols (Miransari 2011).

## Objectifs de thèse

L'agriculture en général et la viticulture en particulier font face à de nombreux défis. Parmi eux, le changement climatique qui s'accélère crée un environnement et des contraintes de plus en plus fortes avec l'apparition toujours plus fréquente d'évènements climatiques extrêmes. Les épisodes orageux intenses et les cumuls de pluies importants sur des temps courts augmentent les phénomènes de ruissellement et d'inondations, et déstructurent les sols. Les températures toujours plus importantes pendant les périodes estivales et les périodes de sécheresse intense tout au long de la saison accentuent les stress hydriques. De plus, la société et les filières concernées prennent conscience des limites des systèmes agricoles actuels basés essentiellement sur l'utilisation importante d'intrants de synthèse et leurs conséquences, sur la santé humaine et sur l'environnement. La viticulture n'y échappe pas et s'engage depuis plusieurs années dans un changement de paradigme au sein de la profession. Ainsi, de plus en plus de domaines viticoles passent d'un modèle conventionnel à un modèle d'agriculture biologique avec une utilisation raisonnée des produits phytosanitaires tandis que d'autres préfèrent se tourner vers la biodynamie. Cependant, tous prennent en considération l'influence positive que peut avoir une augmentation ou juste un maintien de la biodiversité des écosystèmes viticoles, qu'il s'agisse d'animaux, de végétaux ou de microorganismes.

La stimulation de la vie biologique des sols et des interactions entre les plantes et les microorganismes fait l'objet d'une attention particulière. En effet, la santé d'un écosystème est fortement liée aux interactions multi-trophiques présentes au sein de l'écosystème. Parmi ces interactions, les CMA sont des organismes clés de l'écosystème qui fournissent de nombreux services écosystémiques. Ils participent notamment à la stabilisation des sols et améliorent la nutrition des plantes. Cependant les pratiques agricoles ont un impact sur ces communautés de microorganismes. Par exemple, la pratique du labour profond et répété détruit les réseaux mycéliens et limite la croissance des CMA. L'utilisation de fongicides pour lutter contre les ravageurs des cultures ont également une action négative sur la germination des spores de CMA, de même que les herbicides en limitant la présence de plantes hôtes. Pour dynamiser la croissance et le développement des CMA et des autres microorganismes, il est essentiel de limiter les pratiques néfastes et promouvoir les pratiques positives.

C'est dans le cadre des changements importants des itinéraires techniques que s'inscrit ce projet de thèse qui vise à contribuer à l'étude et à l'identification de pratiques viticoles quant à leurs impacts vis-à-vis de la stimulation de la croissance et du développement des CMA ainsi que les services rendus par ces derniers. En s'appuyant sur des techniques communes en grandes cultures, différentes pratiques sont mises en place dans les parcelles. Parmi elles, la pratique du couvert en viticulture devient de plus en plus courante. Le développement d'une couverture végétale en vignoble permet de stabiliser les sols et de réduire l'érosion. De plus, le couvert végétal permet aussi de diminuer l'utilisation de certains produits phytosanitaires

(herbicides, insecticides, etc.). En revanche, de nombreuses études techniques sur le couvert ont permis d'identifier certains avantages et contraintes de cette pratique en vignoble, mais peu s'intéressent au potentiel stimulateur du couvert vis-à-vis de la biologie du sol et des microorganismes comme les CMA.

Cette thèse s'inscrit dans le projet Biovine, financé par le fond européen Core Organic, qui vise à exploiter le potentiel de la diversité végétale dans la réduction de l'utilisation des pesticides et l'optimisation des services écosystémiques. Les différents partenaires du projet se sont attardés à sélectionner puis à évaluer différentes couvertures végétales vis-vis de la présence de parasites, d'insectes bénéfiques et d'auxiliaires.

Le travail développé dans chaque chapitre de ce manuscrit s'intéresse à l'effet de plusieurs pratiques sur la diversité des CMA associés à la vigne. Ainsi, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'effet de la variabilité génétique de la vigne au sein d'un conservatoire régional de ressources génétiques, sur la composition des communautés de CMA (Chapitre 1). Dans un deuxième temps, nous avons souhaité étudier le potentiel stimulateur des couverts végétaux sur les communautés de CMA et le fonctionnement biologique des sols par des essais au vignoble (Chapitre 2-3). Enfin, nous avons voulu évaluer l'influence de l'âge des ceps sur la diversité et la structure des communautés de CMA (Chapitre 4).

En résumé, les principaux axes de recherches suivis et développés au cours de la thèse portent sur :

- L'impact de la variabilité génétique du porte-greffe et du cépage sur la diversité et la structure des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules
- L'impact du couvert végétal sur la diversité et la structure des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules associées à la vigne et aux plantes de couvert
- L'impact du couvert végétal sur le fonctionnement biologique des sols
- L'influence de l'âge des ceps sur la diversité et la structure des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules

## Matériel et Méthodes

*Cette partie développe une méthodologie commune aux différents chapitres. Les différentes conditions expérimentales et le détail des vignobles seront détaillés dans chaque chapitre.*

*Détermination des plantes de couvert :*

À la suite de recherches bibliographiques scientifiques et commerciales, nous avons établi une liste d'espèces végétales utilisées comme couvert végétal. Cette liste contient 64 espèces regroupant 21 familles végétales et comprenant des plantes soit couramment semées comme couvert végétal soit considérées comme des adventices. Cependant, ces adventices sont naturellement présentes dans les systèmes de culture et sont en général adaptées aux conditions pédoclimatiques. Les graines ont été fournies par Éric Vieren (Pôle Gestad, UMR Agroécologie, INRAE Dijon), et les sociétés Otto Hausteil Semence et Sonofep (**Tableau 1**).

**Tableau 1 :** Liste des espèces végétales testées pour évaluer leur capacité de mycorhization

Famille végétale	Taxonomie	Cycle de développement	Code EPPO
Amaranthaceae *	Amaranthus retroflexus	Annuelle	AMARE
Amaranthaceae *	Chenopodium album	Annuelle	CHEAL
Apiaceae	Aethusa cynapium	Annuelle	AETCY
Apiaceae	Daucus carota	Annuelle	DAUCA
Apiaceae	Pimpinella saxifraga **	Pérenne	PIMSA
Asteraceae	Achillea millefolium	Pérenne	ACHMI
Asteraceae	Bellis perennis	Pérenne	BELPE
Asteraceae	Senecio vulgaris	Annuelle	SENVU
Asteraceae	Taraxacum officinale	Pérenne	TAROF
Asteraceae	Cirsium arvense **	Pérenne	CIRAR
Asteraceae	Lapsana communis **	Annuelle	LAPCO
Boraginaceae *	Phacelia tanacetifolia	Annuelle	PHCTA
Brassicaceae *	Brassica juncea	Annuelle	BRSJU
Brassicaceae *	Raphanus sativus	Annuelle	RAPSR
Brassicaceae *	Sinapis arvensis	Annuelle	SINAR
Brassicaceae *	Capsella bursa-pastoris **	Annuelle	CAPBP
Caryophyllaceae	Stellaria media	Annuelle	STEME
Convolvulaceae	Convolvulus arvensis **	Pérenne	CONAR
Euphorbiaceae	Euphorbia exigua **	Annuelle	EPHEX
Euphorbiaceae	Euphorbia helioscopia **	Annuelle	EPHHE
Fabaceae	Medicago sativa	Pérenne	MEDSA
Fabaceae	Onobrychis viciifolia	Pérenne	ONBVI
Fabaceae	Pisum sativum	Annuelle	PIBSX
Fabaceae	Trifolium fragiferum	Pérenne	TRFFR
Fabaceae	Trifolium pratense	Pérenne	TRFPR
Fabaceae	Vicia villosa	Annuelle	VICVI
Fabaceae	Trifolium subterraneum	Pérenne	TRFSU
Fabaceae	Vicia faba	Annuelle	VICFX
Fabaceae	Lotus corniculatus	Pérenne	LOTCO
Fabaceae	Medicago lupulina	Annuelle	MEDLU
Geraniaceae	Geranium dissectum	Annuelle	GERDI
Lamiaceae	Prunella vulgaris **	Pérenne	PRUVU
Lamiaceae	Thymus pulegioides **	Pérenne	THYPU
Lamiaceae	Origanum vulgare **	Pérenne	ORIVU
Linaceae	Linum usitatissimum	Annuelle	LIUUT

Malvaceae	Abutilon theophrasti	Annuelle	ABUTH
Papaveraceae	Papaver rhoeas **	Annuelle	PAPRH
Plantaginaceae	Veronica hederifolia	Annuelle	VERHE
Plantaginaceae	Kickxia spuria **	Annuelle	KICSP
Plantaginaceae	Veronica persica **	Annuelle	VERPE
Plantaginaceae	Veronica chamaedrys **	Pérenne	VERCH
Poaceae	Alopecurus myosuroides	Annuelle	ALOMY
Poaceae	Avena fatua	Annuelle	AVEFA
Poaceae	Digitaria sanguinalis	Annuelle	DIGSA
Poaceae	Festuca arundinacea	Pérenne	FESAR
Poaceae	Poa compressa	Pérenne	POACO
Poaceae	Secale montanum	Annuelle	SECMO
Poaceae	Setaria viridis	Annuelle	SETVI
Poaceae	Elymus repens	Pérenne	AGRRE
Poaceae	Avena strigosa	Annuelle	AVESG
Poaceae	Agrostis capillaris	Pérenne	AGSTE
Poaceae	Bromus sterilis	Annuelle	BROST
Poaceae	Bromus tectorum	Annuelle	BROTE
Poaceae	Echinochloa crus-galli **	Annuelle	ECHCG
Poaceae	Lolium rigidum **	Annuelle	LOLRI
Poaceae	Vulpia myuros **	Annuelle	VLPMY
Polygonaceae	Rumex obtusifolius	Pérenne	RUMOB
Polygonaceae	Polygonum aviculare **	Annuelle	POLAV
Polygonaceae	Fallopia convolvulus **	Annuelle	POLCO
Primulaceae	Anagallis arvensis **	Annuelle	ANGAR
Rosaceae	Potentilla neumaniana	Pérenne	PTLNM
Rosaceae	Sanguisorba minor	Pérenne	SANMI
Rubiaceae	Galium aparine **	Annuelle	GALAP
Solanaceae	Solanum nigrum	Annuelle	SOLNI

\* Famille végétale comprenant uniquement des plantes non-mycorhizotrophes

\*\* Espèces végétales qui n'ont pas pu être évaluées à cause de taux de germination très faible

#### *Culture en conditions contrôlées des plantes de couvert :*

Les graines sont désinfectées dans de l'eau de javel 1%. Pour l'évaluation de la mycorhizotrophie des plantes de couvert, les plantes sont cultivées en serre et maintenue à une température de 24 °C le jour et 18 °C la nuit. La photopériode est fixée à 16h. Pour permettre un bon développement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, nous avons utilisé un substrat composite inerte : billes d'argile / attapulгите (50/50 v/v).

Deux inoculations sont réalisées au moment du repiquage des plantes par l'ajout de 200 spores de *R. irregularis* de la souche DAOM197198 mis en suspension dans de l'eau osmosée. La solution initiale de spores nous est fournie par l'entreprise Premier Tech. Pendant les 60 jours de culture après inoculation, chaque plante est arrosée deux fois par semaine avec 20 mL d'une solution de Hoagland 10 mM de phosphore.

### *Quantification de la colonisation racinaire des plantes de couvert :*

Pour visualiser et quantifier la mycorhization du système racinaire, une coloration préalable des structures fongiques est réalisée sur quelques fragments de racines (Biermann and Linderman 1981). Les racines fines sont tout d'abord décolorées dans une solution de KOH 10%. Si les racines contiennent beaucoup d'anthocyanes, il est possible d'ajouter du peroxyde d'hydrogène pour les éliminer. Cette opération doit se faire à chaud pour une plus grande efficacité et rapidité. Les racines sont ensuite colorées au bleu trypan avant de pouvoir être observées au microscope photonique. La mycorhization est ensuite évaluée selon la méthode de calcul de Trouvelot (Trouvelot et al. 1986).

### *Prélèvements sur les parcelles d'essais :*

Les prélèvements de racines de vignes et de couvert ont été réalisés selon le protocole publié par le laboratoire (Drain et al. 2019). Jusqu'à présent, les études sur les communautés de CMA dans les vignobles, ont été réalisées sur des échantillons de sol (Lumini et al. 2009; Holland et al. 2014). Dans le but d'évaluer les partenaires fongiques de la vigne, nous avons échantillonné les racines de la vigne, ce dernier contenant probablement des hyphes et des spores fongiques interagissant avec les racines des plantes de couverture au lieu de la vigne, ainsi que des spores CMA présentes dans un état quiescent.

Les parcelles viticoles sont généralement étendues et peuvent présenter des paramètres de sol divers. De plus, au fil des saisons, certains pieds de vigne peuvent mourir et sont remplacés par les viticulteurs. Pour limiter l'incidence de ces paramètres, nous avons prélevés les racines de vignes sur trois plants consécutifs, non complantés et d'apparence identique. De plus, les CMA interagissent au niveau des racines les plus fines de la vigne, pour les prélever, nous avons déterrées les racines sur 20 cm de profondeur à la base de chaque pied sélectionné (**Figure 13**).



**Figure 13** : Méthode de prélèvements de racines (adapté de Drain et al. 2019).

À proximité immédiate des vignes prélevées, les plantes de couvert ont été déterrées et cinq individus par espèce ont été prélevés. Les systèmes racinaires étant fragile et peu développés, nous avons veillé à préserver au maximum le système racinaire. Les racines ont été nettoyées à l'eau claire au laboratoire puis lyophilisées avant d'extraire l'ADN total.

#### *Extraction d'ADN à partir d'échantillons de racines :*

Après chaque échantillonnage et quel que soit les plantes étudiées, les racines fraîchement prélevées sont lavées à l'eau du robinet de manière à retirer un maximum de sol collé aux racines. Les racines les plus fines sont ensuite lyophilisées puis finement broyées à l'aide d'un broyeur à billes Retsch MM200.

Les extractions d'ADN à partir des racines de vigne selon le protocole établi par le laboratoire et publié (Drain et al. 2019). Une première étape de lyse chimique est réalisée en ajoutant à 400 mg de racines broyées, 6 mL de tampon d'extraction (100 mM Tris-EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 2 % SDS). Cette solution de lyse est incubée pendant 1h à 70°C. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et les protéines solubles sont précipitées grâce à l'ajout de 0,1 volume d'acétate de potassium (3 M, pH 5.5). Les acides nucléiques sont ensuite purifiés en utilisant le kit Turbo Kit GeneClean® (MPBio™) selon les recommandations du fabricant.

Pour les racines de plantes non-ligneuses, l'ADN est extrait avec le kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen™) selon les recommandations du fabricant. La qualité et la quantité des ADN extraits de l'ensemble des échantillons ont été évaluées au NanoDrop™ 2000 (ThermoFischer™).

#### *Amplification de l'ADN ribosomique :*

Parmi l'ADN total extrait de chaque échantillon, il est possible d'amplifier des marqueurs moléculaires spécifiques des *Glomeromycota* (cf. Introduction sur les champignons mycorhiziens à arbuscules). Comme la proportion de l'ADN des *Glomeromycota* est plus faible par rapport aux autres ADN appartenant à la plante et aux autres microorganismes, une PCR nichée est effectuée de manière à cibler dans un premier temps la LSU de tous les eucaryotes. Pour cela, les amorces LR1 (GCATATCAATAAGCGGAGGA) et NDL22 (TGGTCCGTGTTTCAAGACG) (Van Tuinen et al. 1998) sont utilisées pour la PCR n°1. Dans un volume de réaction de 20 µL, 50 ng d'ADN sont utilisés comme matrice et additionnés de 3 U de Taq polymérase (MPBio), 200 µM de dNTP et 0,25 µM de chacune des deux amorces.



Le programme de la PCR n°1 est le suivant :

	Étape	Température	Durée	Répétition
1	Dénaturation initiale	95°C	300 sec	1
2	Dénaturation	95°C	30 sec	30 cycles
3	Hybridation	58°C	30 sec	
4	Élongation	72°C	30 sec	
5	Élongation finale	72°C	300 sec	1

Pour amplifier spécifiquement la LSU des CMA, nous avons utilisé les amorces FLR3 (TTGAAAGGGAAACGATTGA AG) et FLR4 (TACGTCAGCATCCTTAACGAA) dessinées par le laboratoire (Gollotte et al. 2004). Ces amorces sont rallongées avec une étiquette Illumina spécifique à la société de séquençage destinataire des échantillons. Les ADN de la PCR n°1 sont dilués au 1/100<sup>e</sup> et 5 µL est ajouté dans un volume de réaction de 55 µL. Au mélange réactionnel est ajouté 200 µM de dNTP et 10 µM de chacune des deux amorces.

Le programme de la PCR n°2 est le suivant :

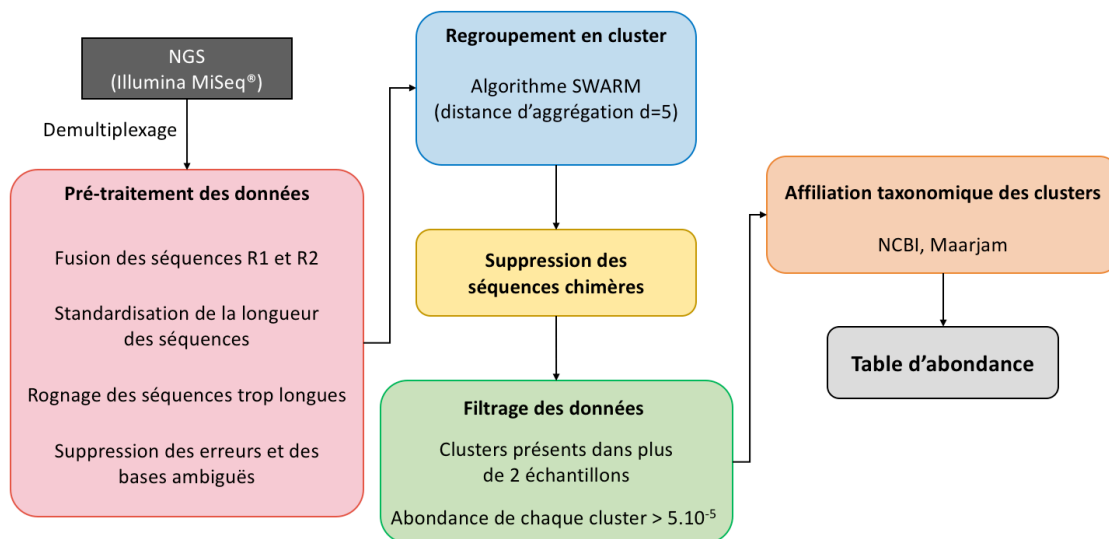
	Étape	Température	Durée	Répétition
1	Dénaturation initiale	98°C	30 sec	1
2	Dénaturation	98°C	10 sec	28 cycles
3	Hybridation	60°C	20 sec	
4	Élongation	72°C	20 sec	
5	Élongation finale	72°C	300 sec	1

Suite à l'amplification des séquences des CMA, les amplicons sont envoyés dans deux sociétés spécialisées dans le séquençage avec la technologie Illumina : Microsynth (Suisse) ou le Center for Genome Research & Biocomputing (CGRB, Etats-Unis).

#### *Analyses bio-informatiques des données Illumina :*

À partir des fichiers de séquençage, les données subissent un traitement bio-informatique permettant d'une part de nettoyer les séquences non-désirées et d'effectuer un regroupement en unités taxonomiques opérationnelles (OTU, Operational Taxonomic Unit) qui représentent des espèces différentes. Ce traitement est effectué grâce au pipeline FROGS (Escudé et al. 2018) présent sur le serveur **Galaxy** (<https://galaxy.migale.inra.fr>, **Figure 14**). La première étape de ce traitement consiste à combiner les deux lectures de séquençage faites dans les sens 5'-3' et 3'-5', couramment appelées « read1 » (R1) et « read2 » (R2), en utilisant l'algorithme Flash. La deuxième étape de ce pipeline consiste à effectuer un regroupement en OTU avec l'algorithme SWARM et une distance d'agrégation de 5. Cependant, tous les OTU formés ne correspondent pas à des séquences véritables et des chimères peuvent être présentes dans les échantillons. Ces chimères sont des séquences artefacts qui apparaissent au cours des réactions de PCR, et se présentent sous la forme de séquences généralement trop courtes ou trop longues. Enfin, un filtre est appliqué

permettant de sélectionner uniquement les OTU présents dans au moins deux échantillons et obtenir une table d'abondance globale pour tous les échantillons.



**Figure 14** : Pipeline bio-informatique permettant le traitement des données issues du séquençage (Escudé et al. 2018).

#### *Analyse des activités enzymatiques du sol :*

Dans le but d'évaluer l'effet du couvert végétal sur le fonctionnement biologique des sols, plusieurs activités enzymatiques ont été mesurées sur des échantillons de sols. Dans chaque condition et après avoir prélevé les plantes de couvert, le sol rhizosphérique a été prélevé et maintenu à 4°C dans des glacières. De retour au laboratoire, le sol a été tamisé à 4 mm puis « aliquoté ». Ces échantillons ont été maintenus avant et après le tamisage dans des sacs hermétiques placés à 4°C. Les échantillons de sols ont été envoyés à Séverine Piutti du Laboratoire Agronomie et Environnement (Université de Lorraine) afin de réaliser les analyses (Philippot et al. 2002; Gaba et al. 2020). Au total dix activités enzymatiques ont été mesurées permettant d'évaluer le fonctionnement des cycles de l'azote, du carbone, du phosphore et du soufre (**Tableau 2**) (Makoi and Ndakidemi 2008; Floch et al. 2011; Zhang et al. 2017)

**Tableau 2** : Activités enzymatiques mesurées dans le chapitre 3

Activité enzymatiques mesurée		Méthode	Cycle bio-géochimique
Arylamidase	ARL	Colorimétrie	azote
Arylsulfatase	ARS	Fluorimétrie	soufre
Leucine amino-peptidase	LAP	Fluorimétrie	azote
N-acetylglucosaminidase	NAG	Fluorimétrie	carbone
Phosphatase acide	PAC	Fluorimétrie	phosphore
Phosphatase alcaline	PAL	Fluorimétrie	phosphore
Protéase	PRO	Colorimétrie	azote et carbone
Uréase	URE	Colorimétrie	azote
Xylosidase	XYL	Fluorimétrie	carbone
$\beta$ -glucosidase	GLU	Fluorimétrie	carbone

*Analyse statistique :*

L'ensemble des données obtenues est traité sur le logiciel R (R Core team). Pour les analyses des tables d'abondance, le package « vegan » a été utilisé.

# Chapitre 1 - Impact du génotype de la vigne sur la diversité et la structure des communautés de CMA : étude du cas d'un conservatoire régional

## I) Introduction

### a) La variabilité génétique des plantes cultivées

La variabilité ou la diversité génétique est une composante de la biodiversité qui, comme le rappelle Fu en 2015, est parfois mal définie. La diversité génétique se caractérise par la variabilité des gènes, des allèles ou du génome, chez des individus au sein d'une population, d'une espèce ou d'un écosystème. Vellend and Geber, en 2005, indiquent également que cette diversité génétique est contrôlée par différents mécanismes :

- Mutation/spéciation : création de nouveaux allèles/espèces.
- Dérive : changements aléatoires dans les fréquences relatives des allèles/espèces.
- Migration : mouvements d'allèles/espèces entre les populations/communautés.
- Sélection : processus qui favorise certains allèles/espèces par rapport à d'autres.

Dans le cas des plantes cultivées, les mécanismes de sélection que l'Homme a appliqué au cours des années ont permis l'apparition de traits fonctionnels spécifiques. Ainsi, l'Homme a sélectionné des espèces végétales pertinentes, tout d'abord vis-à-vis de son alimentation avec des rendements élevés, avec des traits de qualité organoleptiques (*e.g.* taux de sucres, concentration en acides organiques, ratio sucre/acide) ou nutritionnels (*e.g.* microéléments, vitamines, acides aminés essentiels) intéressants. C'est notamment au cours de la sédentarisation des populations et du développement de l'Agriculture, que l'Homme a sélectionné des traits de croissance des plantes comme par exemple, une production et une capacité de germination élevée des graines permettant une meilleure levée des semis. Au fur et à mesure, et encore aujourd'hui, dans un contexte de changements climatiques, d'autres traits sont sélectionnés pour faire face aux différents stress biotiques et abiotiques que les cultures peuvent rencontrer. Ce processus a permis d'aboutir à la création de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, de génotypes en fonction des espèces cultivées. Ces génotypes sont désignés par le terme « cultivar » qui est l'assemblage des deux mots anglais « cultivated » et « variety ». La sélection forte de certaines espèces cultivées, l'optimisation des variétés et l'évolution des consommations a pour conséquence une uniformisation des cultures et la réduction de la diversité génétique réellement cultivée. Or des recherches détaillées ont montré qu'une plus grande diversité génétique, cultivée dans un espace donné, conduit à une augmentation des niveaux de productivité des plantes (Tilman et al. 1997; Hoisington et al. 1999; Carvalheiro et al. 2011; Twerski et al. 2021). Comme indiqué précédemment, la diversité génétique peut s'exprimer à différents niveaux et peut donc aboutir à une augmentation des traits fonctionnels présents dans l'écosystème (Hajjar et al. 2008). Cette augmentation de la diversité fonctionnelle permet ainsi la fourniture de services écosystémiques complémentaires et le maintien d'un écosystème stable (Dwivedi et al. 2016)

Aussi, il est important de considérer les différents niveaux de diversité dans les systèmes de production, la diversité interspécifique, c'est-à-dire le nombre d'espèces présentes, et la diversité intraspécifique, c'est-à-dire la variabilité au sein d'une même espèce (Bommarco et al. 2013). La culture commune de cultivars différents, anciens et/ou plus fortement sélectionnés permet notamment de réduire la pression de certaines maladies comme le montre Mundt (2002). La méta-analyse menée par Reiss & Drinkwater a par ailleurs montré l'impact positif de la diversité intraspécifique dans la stabilité du rendement notamment lorsque les conditions deviennent stressantes (Reiss and Drinkwater 2018 et références à l'intérieur). La diversité génétique intraspécifique joue également un rôle dans les relations plantes-microorganismes, mutualistes ou antagonistes et donc les services écosystémiques rendus par ces derniers. Face à l'uniformisation des terres cultivées, apporter de la diversité dans ces agroécosystèmes est une approche future pour dynamiser les services écosystémiques.

### b) La variabilité génétique des plantes dans le cadre des interactions plantes-microorganismes

La variabilité intraspécifique est un des facteurs déterminant des communautés microbiennes de la plante, et cela quel que soit le compartiment étudié. Par le biais de différentes méthodes, plusieurs études ont montré que la composition des communautés bactériennes et fongiques présentes au niveau de la phyllosphère ou bien de la rhizosphère était impactée par le génotype de la plante (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** Quelques exemples issus de la littérature rapportant un effet de la diversité des cultivars sur les communautés de bactéries ou de champignons présents dans les différents compartiments des plantes.

Références	Espèces étudiées	Compartiment	Effets observés
Van Overbeek and Van Elsas 2008	<i>Solanum tuberosum</i> L. (4 cultivars)	Sol Sol rhizosphérique Endosphère (tiges)	Modification des communautés bactériennes dans les différents compartiments. La lignée DL12 qui exprime le lysozyme T4 (biocide) modifie peu les communautés bactériennes endophytes.
Aira et al. 2010	<i>Zea mays</i> (2 hybrides)	Sol rhizosphérique	Pas d'effet du génotype sur l'abondance des principaux groupes bactériens et fongiques
Zancarini et al. 2013	<i>Medicago</i> sp.	Sol rhizosphérique Endosphère (racines)	Différence de structure des communautés bactériennes de la rhizosphère et à l'intérieur des racines. Les communautés de la rhizosphère sont principalement constituées des groupes <i>Acidobacteria</i> et <i>Proteobacteria</i> .
Sasaki et al. 2013	<i>Oryza</i> sp. (16 cultivars)	Phyllosphère Rhizosphère	Influence du fond génétique ( <i>O. indica</i> ou <i>O. japonica</i> ) et des croisements sur les communautés bactériennes présentes dans les racines et les feuilles.
Hunter et al. 2015	<i>Lactuca</i> sp.	Phyllosphère	Les indices de Shannon et les abondances des groupes fongiques identifiés sont différents entre les cultivars de laitues.

Poli et al. 2016	<i>Solanum lycopersicum</i> L. (2 cultivars)	Sol rhizosphérique Endosphère (racines)	Abondance et composition des communautés de champignons cultivables différentes entre les génotypes étudiés.
Brown et al. 2020	<i>Medicago truncatula</i>	Sol rhizosphérique Endosphère (racines, nodules, feuilles)	Composition des communautés différentes entre les quatre compartiments. Effet significatif du génotype sur la diversité associée aux endophytes racinaires. Effet significatif du sol sur la diversité issue de la rhizosphère.
Hernández-Terán et al. 2020	Populations sauvages de <i>Gossypium hirsutum</i> L.	Rhizosphère	La majorité des espèces bactériennes sont communes entre les génotypes mais l'assemblage des communautés est différent.
Koczorski et al. 2021)	<i>Salix</i> sp.	Sol Rhizosphère	Composition des communautés différentes entre les deux compartiments. Familles spécifiques de la rhizosphère

Les processus de sélection variétale ont permis de sélectionner des génotypes permettant un contrôle de certaines interactions plantes-microorganismes. Ceux-ci ont été essentiellement centré sur les variétés résistantes aux pathogènes et aux parasites. La variabilité génétique et les processus de sélection appliqués aux plantes cultivées ont souvent mis de côté les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes du sol. Parmi eux, les CMA sont des organismes qui établissent une symbiose mutualiste chez la grande majorité des espèces végétales. Ils sont particulièrement reconnus pour les services écosystémiques qu'ils rendent sur le sol mais également pour les plantes (cf. Introduction générale sur la mycorhize à arbuscules). Tandis que plusieurs études ont montré l'influence des communautés végétales et de leur diversité sur l'abondance des CMA dans différents écosystèmes, peu se sont intéressées à l'effet de la variabilité génétique des plantes sur la SMA.

La variabilité intraspécifique des plantes est un facteur qui peut influencer la réponse globale des plantes et les bénéfices apportés par la SMA, notamment vis-à-vis de la croissance des plantes et des échanges de nutriments entre les deux partenaires (Kaepler et al. 2000; Lehnert et al. 2018). Même si les études se sont souvent restreintes à des plantes annuelles, à quelques cultivars et quelques espèces de CMA, certaines études ont montré des différences dans la réponse à la SMA en fonction des génotypes étudiés (Linderman and Davis 2004; Ortas and Akpinar 2011; Taylor et al. 2015). Ces observations peuvent s'expliquer par des fonds génétiques différents qui se traduisent physiologiquement par des besoins en nutriments ou un afflux de carbone modifié. Cet échange, entre les deux partenaires est essentiel à la mise en place de la symbiose et différentes stratégies d'échange peuvent se mettre en place. La mycorhization modifie notamment les relations source-puits au sein de la plante et les flux de carbone sont alors fortement redirigés des feuilles vers les racines et le sol où il sera transféré au CMA (Konvalinková et al. 2017). La stratégie de fourniture en nutriments par le partenaire fongique est également à prendre en compte dans la mise en place de la symbiose.

Outre la réponse globale de la plante, la diversité intraspécifique influence dès le départ la colonisation des racines par les CMA. L'observation de la colonisation racinaire et l'abondance des structures fongiques dans les racines, sans distinction d'espèce, est un outil qui a été longuement utilisé pour évaluer la capacité d'une plante à établir cette symbiose. Il ne fait aucun doute maintenant que la variabilité génétique entre les espèces et au sein d'une même espèce aboutit à une différence de colonisation racinaire par les CMA. Déjà en 1985, Krishna et al. avaient pu mettre en évidence que la colonisation des racines variaient en fonction des différents génotypes de millet étudiés (Krishna et al. 1985). Par la suite, Estaun et al. (1987) ont nuancé l'observation précédente en ajoutant que chez le pois, l'identité du CMA était également un facteur de variation du taux de colonisation racinaire. Ces résultats suggérant déjà à cette époque que les différentes souches de CMA connues pouvaient établir une symbiose plus ou moins spécifique en fonction des espèces mais également en fonction des génotypes (Estaún et al. 1987). Encore aujourd'hui, les études sur différents cultivars montrent l'effet de la variabilité intraspécifique sur la colonisation racinaire (Wilson and Hartnett 1998; Kumar et al. 2015; Mikiciuk et al. 2018). Avec la mise en place de critères d'identification visuelle des spores, il a été possible de montrer que la présence et l'abondance des spores de CMA présents dans la rhizosphère étaient différentes selon les cultivars (Aguilera et al. 2014). En parallèle de ces méthodes d'observation visuelle qui présentent certaines imprécisions, de nombreuses recherches ont été menées pour identifier grâce à la biologie moléculaire, les différentes espèces de CMA qui colonisent le sol et les racines des plantes. Plusieurs marqueurs d'identification génétique sont encore aujourd'hui discutés (Van Tuinen et al. 1998; Krüger et al. 2012; Redecker et al. 2013). Tandis qu'il a pu être montré une variabilité de communauté au sein du genre *Medicago* (Pivato et al. 2007), aucune étude ne s'est attachée à comparer les communautés de CMA associées à différents cultivars.

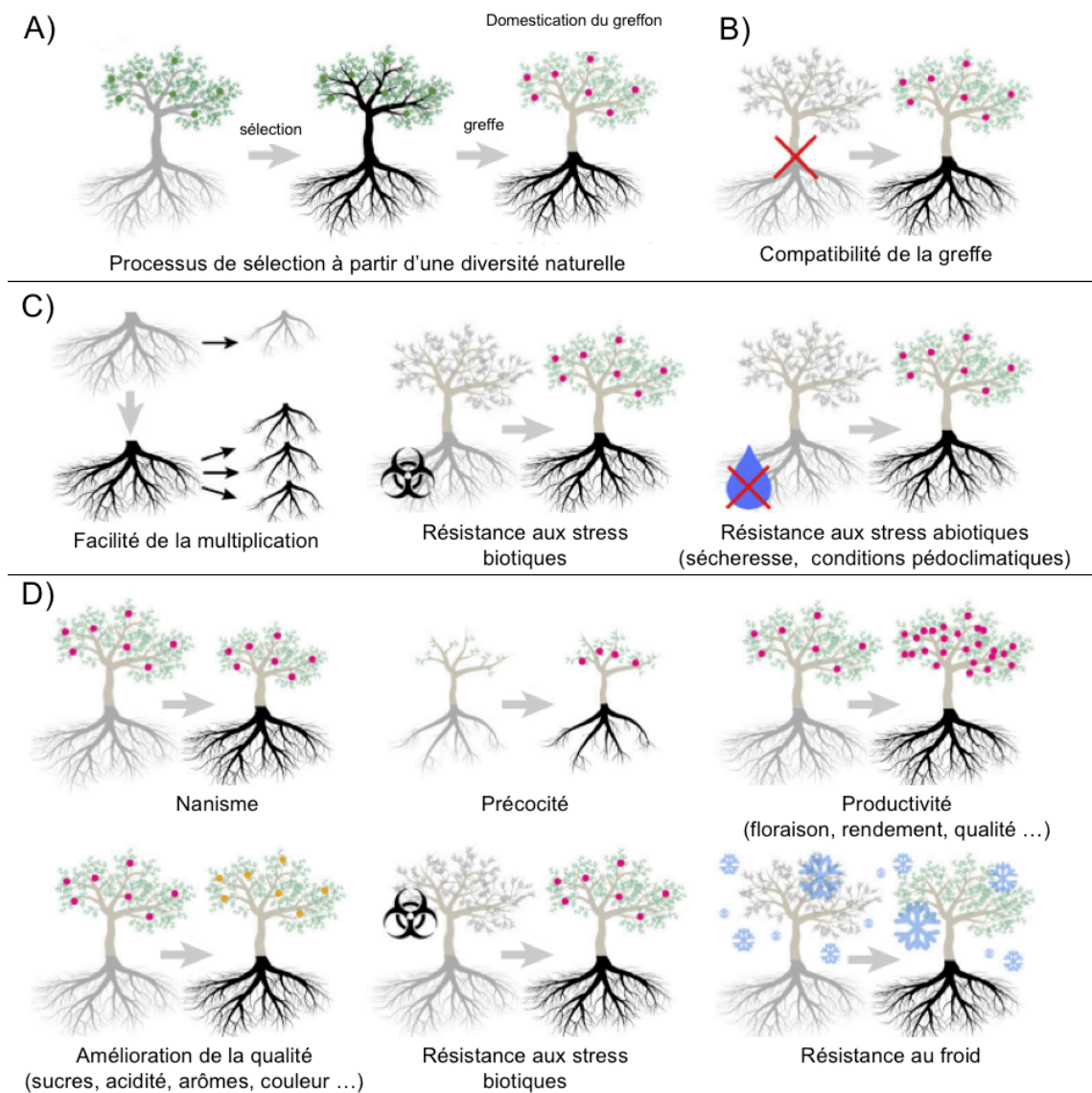
L'effet de la diversité génétique intraspécifique est bien rapporté par rapport aux études sur les communautés bactériennes et fongiques en interaction avec les plantes. Les études portant sur les communautés de CMA sont quant à elles très rares mis à part un effet sur la colonisation racinaire. De plus, l'effet du génotype sur la SMA s'est exclusivement intéressé aux cultures annuelles, essentiellement les plantes les plus cultivées à travers le monde et les plantes pérennes comme la vigne qui a une variabilité génétique très importante est peu étudiée.

### c) Variabilité génétique de la vigne : impact du greffage sur les communautés de microorganismes associées

La vigne est une culture pérenne qui est installée sur une parcelle pour plusieurs dizaines d'années et qui présente différentes particularités en lien avec la variabilité génétique des cultivars sélectionnés. Lorsque l'on regarde différents vignobles, ce qui retient notre attention c'est la grande diversité phénotypique de la vigne due notamment à la sélection des cépages. L'étude et l'identification de cette diversité chez la vigne a par ailleurs fait l'objet d'un traité au début du XX<sup>e</sup> siècle qui a été la base d'une discipline associée à la botanique et encore aujourd'hui étudiée et enseignée : l'ampélographie (Viala and Vermorel 1905). Plusieurs critères ont permis de sélectionner ces cépages dont la finalité de production des raisins a déterminé différentes caractéristiques organoleptiques mais aussi des traits de débourrement, de croissance et de maturité de la vigne (cf. introduction générale).

La variabilité génétique des cépages est renforcée par l'utilisation du greffage comme méthode de propagation (Goldschmidt 2014). Le greffage est une méthode ancienne de reproduction végétative en associant deux parties de plantes, généralement une partie « haute » le greffon qui va, lui, développer des parties aériennes et une partie « basse », et le porte-greffe qui va développer le système racinaire de la plante. La sélection des porte-greffes permet notamment d'apporter des fonctions intéressantes que l'on ne retrouve pas chez le porte-greffe comme une tolérance aux conditions pédoclimatiques, à la présence de pathogènes ou de réguler la croissance et la maturité du greffon (**Figure 15**).





**Figure 15** : Processus de sélections des porte-greffes chez les plantes pérennes. **A)** Sélection à partir d'une diversité génétique naturelle pour **B)** leur capacité à se greffer, **C)** les traits phénotypiques développés par le porte-greffe, **D)** les traits phénotypiques induits chez le greffon (modifié à partir de Warschefsky et al. 2016).

Chez la vigne, cette étape de greffage fut la solution adoptée par les viticulteurs européens dans la lutte contre le phylloxéra radicole au XX<sup>e</sup> siècle. Comme pour la sélection des autres plantes cultivées et les cépages, les porte-greffes ont eux aussi connu une sélection importante, afin d'établir la meilleure association cépage-porte-greffe et d'obtenir une croissance optimale. Le porte-greffe et le cépage établissent une relation intime et s'influencent l'un et l'autre. Le greffon, grâce aux échanges de nutriments, d'eau et des signaux hormonaux influence la croissance du porte-greffe (Tandonnet et al. 2009). Du côté du porte-greffe, les études sur le greffage de la vigne ont notamment mis en évidence un rôle important dans la croissance, la nutrition du greffon (Lecourt et al. 2015), la maturation des grappes (Corso et al. 2016), le rendement et la composition métabolique des baies (Zombardo et al. 2020a, b). Le fond génétique du porte-greffe joue

également dans la résistance de la plante entière aux stress biotiques et abiotiques (Tramontini et al. 2013; Chitarra et al. 2017).

La diversité génétique du cépage et du porte-greffe sont deux facteurs qui déterminent les interactions entre la vigne et les microorganismes de la phyllosphère ou de la rhizosphère. Différentes études ont ainsi montré un effet des fonds génétiques de la vigne sur l'organisation des microbiotes de la vigne (Bettenfeld et al. 2021). Récemment, il a été montré que la composition du microbiote de la rhizosphère variait en fonction des génotypes de porte-greffes (Berlanas et al. 2019). Cette étude a ensuite été confirmée en étudiant les communautés bactériennes et fongiques de la rhizosphère. En comparant des fonds génétiques différents, il a pu être montré un effet significatif de l'identité du porte-greffe sur les communautés de la rhizosphère (Dries et al. 2021). Dans le même temps, un effet dû au cépage a pu être observé (Vink et al. 2021). Bien que les CMA n'ont pas été étudiés, ces recherches nous laissent penser que ces symbiotes peuvent eux-aussi être influencés par le génotype.

## **II) Objectifs abordés dans le chapitre**

Le greffage est une étape primordiale en viticulture vis-à-vis du risque phylloxérique. Ainsi, au moins deux fonds génétiques différents sont associés sur une parcelle pour permettre la culture de la vigne moderne. Les éléments détaillés précédemment, nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les traits fonctionnels des différents génotypes de la vigne, tant du côté du cépage que du porte-greffe, permettent la sélection des communautés microbiennes avec lesquelles la vigne interagit. De plus, les différents niveaux de diversité génétique de la vigne nous interrogent quant à leur impact sur les communautés fongiques associées aux vignes cultivés. Aucune étude n'a comparé les communautés de CMA présentes au niveau des racines, en fonction des porte-greffes et des différentes associations cépage/porte-greffe. Ce chapitre vise donc à étudier l'impact du génotype de la vigne sur la structure des communautés de CMA associées aux racines.

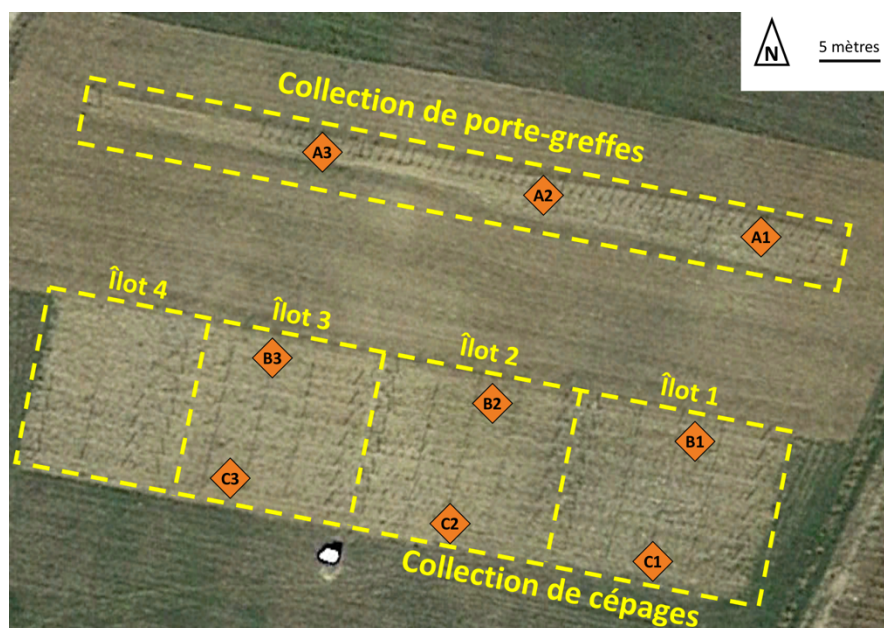
## **III) Description du site d'essai**

### *Site expérimental :*

Pour étudier la structure des communautés de CMA parmi différents porte-greffes de vigne, mais aussi évaluer l'effet du cépage sur la communauté associée aux racines du porte-greffe, nous avons contacté l'Association Technique Viticole de Bourgogne (ATVB) et le Groupement d'Étude et de Suivi des Terroirs (GEST). Cette dernière association, regroupe plus d'une centaine de viticulteurs bourguignons, et cherche à comprendre et préserver les spécificités des terroirs de la région dans le contexte général d'une viticulture en pleine transformation. Les thématiques abordées par le GEST sont notamment celle du matériel végétal

(cépages et porte-greffes) et de leur adaptation aux évolutions climatiques, les systèmes de taille respectueux de la vigne, les pratiques culturales permettant la réduction des intrants et l'intégration de la biodiversité dans le vignoble.

Soutenu par de nombreux partenaires régionaux et nationaux, le GEST a décidé la mise en place d'un conservatoire de porte-greffes et de cépages, dont la plantation s'est étalée sur la période 2016-2018. Ce conservatoire est implanté sur une parcelle du Mont Battois (Beaune, France) (**Figure 16**). Ce site regroupe une collection de porte-greffes parmi les plus couramment utilisés en France (**Tableau 4**), ainsi qu'une collection de cépages (**Tableau 5**). Au sein de cette collection, quatre îlots ont été séparés en fonction des croisements ayant permis l'obtention de chaque cépage. Ainsi, l'îlot 1 regroupe les cépages issus du Pinot Noir et du Gamay Noir ; l'îlot 2, les cépages issus du Gouais Blanc et du Tressot Noir ; l'îlot 3, les cépages cultivés en Bourgogne mais ayant une origine extérieure à la région ou issus de croisement avec des cépages bourguignons. Enfin, l'îlot 4 se compose de quelques cépages hybrides qui ont été cultivés ponctuellement en Bourgogne (**Tableau 5**). Pour chacun des cultivars présents, huit individus ont été plantés sur la parcelle. Pour limiter l'impact éventuel du phylloxéra et la perte de la collection, un greffage sur des porte-greffes d'origine américaine a été réalisé pour chacun des cépages. Compte tenu de leur résistance naturelle à ce parasite, les porte-greffes ont été plantés en « francs de pied ».



**Figure 16** : Plan du conservatoire du GEST. La collection de cépages est divisée en quatre îlots. Les losanges orange représentent les points d'échantillonnage du sol.

**Tableau 4** : Porte-greffes présents sur le Conservatoire du Mont Battois.

<i>Vitis riparia</i> (Riparia)	41 B Millardet et de Grasset (41B)	Gravesac	161-49 Couderc (161-49C)	Riparia Gloire de Montpellier (RGM)
<i>Vitis rupestris</i> (Rupestris)	3309 Couderc (3309C)	Selection Oppenheim 4 (SO4)	34 Ecole de Montpellier (34EM)	
Fercal	110 Richter (110R)	420 A Millardet et de Grasset (420A)	1103 Paulsen (1103P)	
Kober 5 BB (5BB)	101-14 Millardet et de Grasset (101-14)	Rességuier Sélection Birolleau 1 (RSB1)	Teleki 5C (5C)	

**Tableau 5** : Cépages présents sur le Conservatoire du Mont Battois. En vert sont indiqués les cépages greffés sur le porte-greffe Teleki 5C ; en rouge, les cépages greffés sur le porte-greffe SO4 ; en bleu, les cépages greffés sur le porte-greffe Fercal ; en noir, les cépages dont le porte-greffe doit être déterminé. Les plants qui sont absents et/ou n'ont pas été prélevés sont mentionnés par \*.

Ilot 1		Ilot 2	
Noirien	Noirien x Gouais	Gouais	Tressot (Pinot x Gamay)
<b>Pinot Noir et mutations</b>	<b>Gamay Noir et mutations</b>	<b>Gouais Blanc et descendants</b>	<b>Tressot Noir et descendants</b>
Cesar Meunier Pinot noir Mourot Pinot noir précoce Pinot blanc * Pinot gris Pinot noir	Gamay gris Gamay de Bouze Gamay Fréaux Gamay de Chaudenay Gamay Castille Gamay précoce Gamay noir	Melon Auxerrois Sacy Chardonnay muscaté Chardonnay rose Chardonnay blanc Aligoté Gouais	Petit Meslier Meslier Saint-François Peurion Arbane Troyen Plant vert Tressot noir *
Ilot 3		Ilot 4	
Cépages hors Bourgogne	Croisements entre cépages bourguignons et cépages d'autres régions	Hybrides	
Sauvignonasse Corbeau Trousseau Gascon Sauvignon gris Sauvignon blanc * Côt	Enfariné noir Gewürztraminer Savagnin rose Savagnin blanc Joubertin Geuche noir Chasselas doré	Ravat 6 * Maréchal Foch * Oberlin noir *	

#### *Échantillonnage et identification des communautés de CMA :*

Pour répondre à notre objectif, nous avons réalisé plusieurs prélèvements sur le conservatoire en suivant une méthode développée au laboratoire (Drain et al. 2019). Tout d'abord, neuf prélèvements de sol ont été réalisés au niveau des collections pour mesurer les propriétés physico-chimiques du sol et identifier les espèces de CMA présentes pouvant potentiellement interagir avec les racines. Le sol prélevé entre 5 et 25 cm a été tamisé à 4 mm de manière à éliminer un maximum de fragments de roches et de résidus de végétaux. Une partie des échantillons de sol a été envoyés au laboratoire CESAR (Ceyzeriat, France) pour réaliser les mesures des propriétés physico-chimiques tandis qu'une seconde partie a été conservée pour identifier les communautés de CMA présentes dans le sol du conservatoire.

Concernant les prélèvements de racines, trois échantillons par génotype ont été prélevés. En tenant compte du fait que le conservatoire soit toujours en phase de développement, certains cépages n'ont pas fait l'objet de prélèvements (indiqués par \* dans la **Tableau 5**). Au total, 17 porte-greffes et 40 cépages ont été prélevés pour un total de 171 échantillons. Une fois au laboratoire, l'ensemble des racines a été soigneusement lavé

à l'eau du robinet pour éliminer les résidus de sol avant d'être congelé, lyophilisé puis broyé. Suite à l'échantillonnage et au conditionnement des échantillons, l'ADN total a été extrait de chacun d'entre eux selon les protocoles indiqués dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». L'identification des communautés de CMA présents dans les échantillons de sol et de racines a été basée sur la diversité des séquences d'un marqueur moléculaire de la grande sous-unité de l'ADNr (domaine variable D2) et suit la méthode développée et publiée par le laboratoire (Drain et al. 2019).

#### IV) Résultats

##### a) Analyse des paramètres physico-chimiques du sol

Les analyses de sol révèlent une terre argileuse ou argile-limono-sableuse, stable. Le pH du sol est alcalin, légèrement supérieur à 8, ce qui peut être expliqué par la présence importante de calcaire actif. Le risque de chlorose est estimé faible par la présence importante de matière organique et d'éléments nutritifs comme le potassium, le calcium, le magnésium. En revanche, la quantité d'azote est très limitée de même que le rapport C/N est faible. Enfin, il est important de noter que la quantité de phosphate est fortement inférieure à la valeur de 0,030 g/kg qui détermine un niveau faible de phosphate dans un sol. L'analyse de l'ensemble des mesures ne révèle aucune différence significative entre les échantillons prélevés dans la collection des porte-greffes et des cépages. Le site du conservatoire présente une forte homogénéité des paramètres physico-chimique du sol (**Tableau 6**).

**Tableau 6** : Paramètres physico-chimiques mesurés sur la parcelle conservatoire. Un test de Student a été réalisé pour évaluer les différences significatives entre les échantillons.

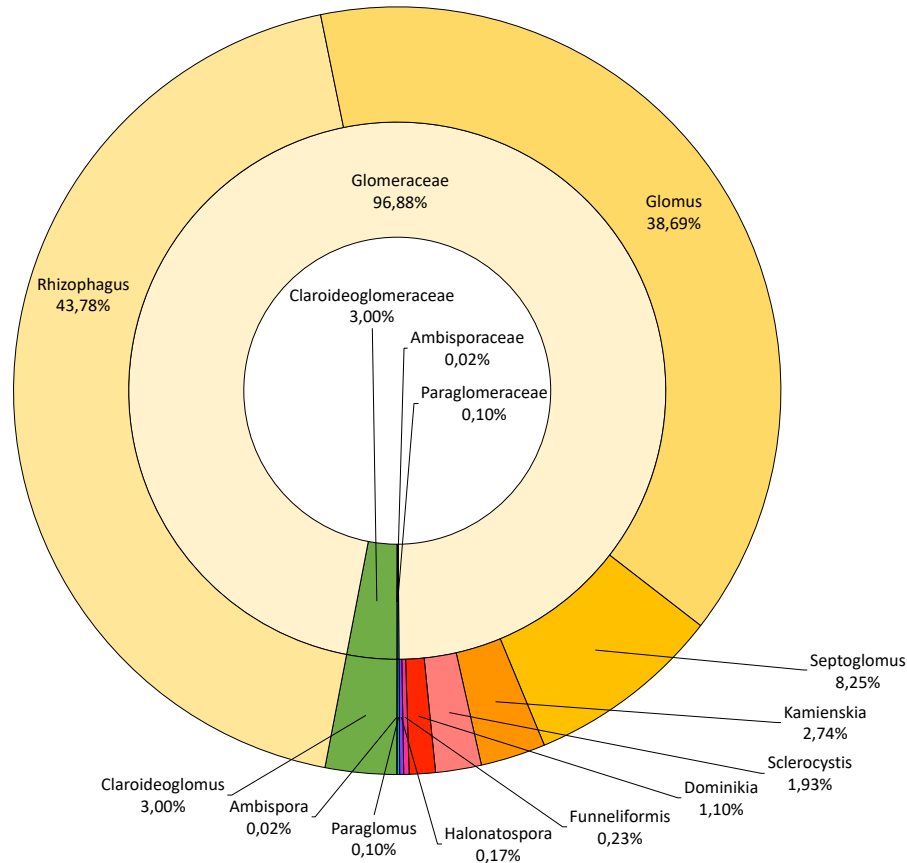
Mesures	A (n=3)	B (n=3)	C (n=3)	Significativité
Argiles (g/kg)	436,3 ± 66,6	355,7 ± 13,8	381,7 ± 43,6	n.s
Limons fins (g/kg)	285,0 ± 18,2	355,0 ± 71,0	307,7 ± 30,1	n.s
Limons grossiers (g/kg)	119,3 ± 8,3	129,0 ± 6,9	123,7 ± 11,7	n.s
Sables fins (g/kg)	59,3 ± 28,1	67,0 ± 40,0	81,7 ± 27,5	n.s
Sables grossiers (g/kg)	100,3 ± 19,1	93,3 ± 45,5	105,7 ± 35,9	n.s
pH eau	8,1 ± 0,0	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,0	n.s
pH KCl	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,5 ± 0,0	n.s
Matière organique (g/kg)	33,4 ± 4,6	29,3 ± 6,3	30,4 ± 4,5	n.s
Carbone (g/kg)	19,4 ± 2,7	17,0 ± 3,7	17,7 ± 2,6	n.s
Azote total Dumas (g/kg)	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,3	n.s
Carbone/Azote (C/N)	8,7 ± 0,6	9,3 ± 0,6	9,0 ± 1,0	n.s
Calcaire total (g/kg)	302,0 ± 84,6	362,7 ± 141,4	403,7 ± 85,6	n.s
Calcaire actif (g/kg)	96,7 ± 36,4	112,5 ± 47,9	130,8 ± 15,3	n.s
Fer oxalique (mg/kg)	251,2 ± 76,0	217,5 ± 54,0	195,8 ± 26,6	n.s

Capacité d'échange cationique Metson (mécq/kg)	200,0 ± 29,9	173,8 ± 40,7	164,4 ± 21,4	n.s
Calcium (g/kg)	12,7 ± 0,8	11,9 ± 0,4	12,2 ± 0,9	n.s
Potassium (g/kg)	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	n.s
Magnésium (g/kg)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	n.s
Phosphore Olsen (g/kg)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	n.s
Cuivre EDTA (mg/kg)	8,5 ± 8,4	9,9 ± 5,8	18,7 ± 9,1	n.s

## b) Qualité de l'amplification et identification taxonomique des OTU

Les données de séquençage brutes ont subi un traitement bio-informatique avec le pipeline FROGS permettant de regrouper les séquences en OTU et d'obtenir une table d'abondance de chaque OTU par échantillon. Suite à ce traitement bioinformatique, il est important de déterminer la qualité des échantillons et du séquençage pour limiter les biais lors de l'interprétation des résultats. Dans notre jeu de données, nous avons récupéré après la formation des clusters 3 823 807 séquences et 26 820 OTU. Après l'application des filtres, 247 OTU (0,91%) ont été gardées correspondant à 3 754 537 séquences représentant 98,19% du total des séquences amplifiées. Pour avoir une estimation précise de la diversité au sein d'un échantillon et limiter la perte d'information, nous avons fixé à 5 000 le nombre minimum de séquences par échantillon. Dans notre jeu de données, nous avons en moyenne 21 093 séquences par échantillon ce qui confirme la qualité de notre séquençage. À partir des séquences OTU, une identification taxonomique a été réalisée grâce à l'alignement de ces séquences avec les bases de données du NCBI et de Maarjam (<http://maarjam.botany.ut.ee>) (Õpik et al. 2010). L'affiliation taxonomique montre que 28 OTU sur 247 ne correspondent pas à des séquences LSU de CMA. Ces séquences correspondent en réalité à des séquences LSU du phylum des *Ascomycota* comme par exemple *Theλονectria* sp., *Dactylonectria* sp., *Fusarium* sp.. Comme il est rapporté dans la littérature, il est courant d'amplifier des séquences LSU d'autres phylum de champignons (Sánchez-Castro et al. 2017). En moyenne, ces OTU représentent 1% des séquences et ces abondances sont retirées pour l'analyse.

À partir des tables d'OTU correspondant à des CMA, 27 espèces ou groupes taxonomiques ont été identifiés avec un pourcentage d'identité allant de 83% à 100%. Les espèces identifiées sont issues de quatre familles : *Ambisporaceae* (1 OTU ; 0,02%), *Claroideoglomeraceae* (16 OTU ; 3,00%), *Glomeraceae* (197 OTU ; 96,88%) et *Paraglomeraceae* (3 OTU ; 0,10%) (**Figure 17**). La quasi-totalité des séquences font partie de la famille des *Glomeraceae* abondamment représentée par les genres *Rhizopbagus* et *Glomus* qui cumulent respectivement 43,78% (78 OTU) et 38,69% (64 OTU) des séquences. Les genres *Septoglomus* (21 OTU ; 8,25%), *Kamienskia* (11 OTU ; 2,74%), *Sclerocystis* (9 OTU ; 1,93%\*), *Dominikia* (8 OTU ; 1,10%), *Funneliformis* (3 OTU ; 0,23%), *Halonatospora* (3 OTU ; 0,17%), complètent les membres des *Glomeraceae* détectés (**Figure 17**).

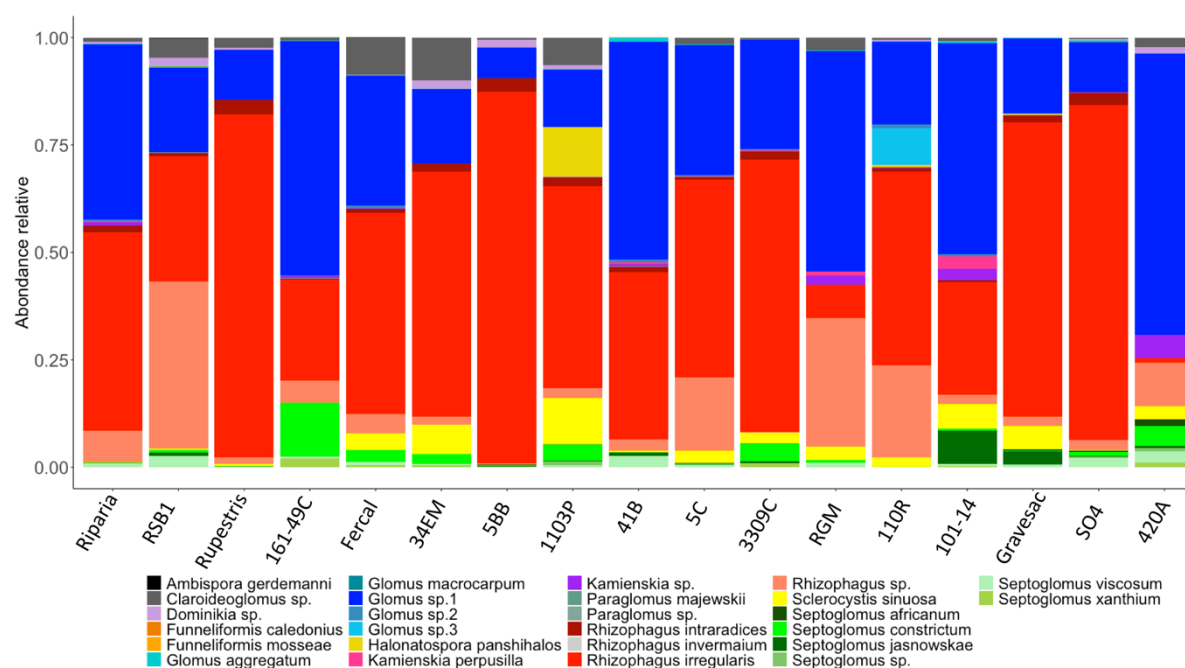


**Figure 17** : Répartition des séquences de CMA (exprimée en pourcentage) détectées dans l'ensemble des échantillons en fonction des familles (anneau intérieur) et des genres (anneau extérieur).

### c) Effet du génotype du porte-greffe sur les communautés de CMA associées aux racines

L'analyse de la structure des communautés révèle une très forte domination du genre *Glomus* sp.1 et *R. irregularis* dans les racines des porte-greffes (**Figure 18**). Trois scénarii sont alors observables : (i) par exemple chez le porte-greffe *Vitis riparia* où les abondances relatives de *Glomus* sp.1 et *R. irregularis* sont similaires, avec 40,76% et 46,26% respectivement ; (ii) chez les porte-greffes SO4 ou 5BB, c'est *R. irregularis* qui est très majoritaire et représente respectivement 77,94% et 86,51% de l'abondance totale ; (iii) dans les échantillons des porte-greffes 420A et 161-49C, *Glomus* sp.1 est dominant avec 65,45% des séquences par rapport à *R. irregularis* qui regroupent 54,58% des séquences. En parallèle de ces espèces très dominantes, l'espèce *Sclerocystis sinuosa* et le genre *Septoglomus* sont les plus abondants (**Figure 18**). En plus de ces scénarii, certaines différences marquées peuvent être observées pour certains porte-greffes, comme par exemple le 1103P dont 10,8% des séquences correspondent à l'espèce *S. sinuosa* alors qu'il représente 2,82% des séquences en moyenne chez les porte-greffes et moins de 0,001% chez le Kober 5BB. De la même manière, on retrouve plus le genre *Septoglomus* dans les porte-greffes 161-49C (15,04%) et 420A (11,09%) tandis qu'en moyenne, il représente environ 4% des séquences. On peut également noter la présence exclusive de l'espèce

*Halonatospora pansihalos* dans le porte-greffe 1103P et l'absence totale de *Rhizophagus invermaium* des porte-greffes (**Figure 18**).

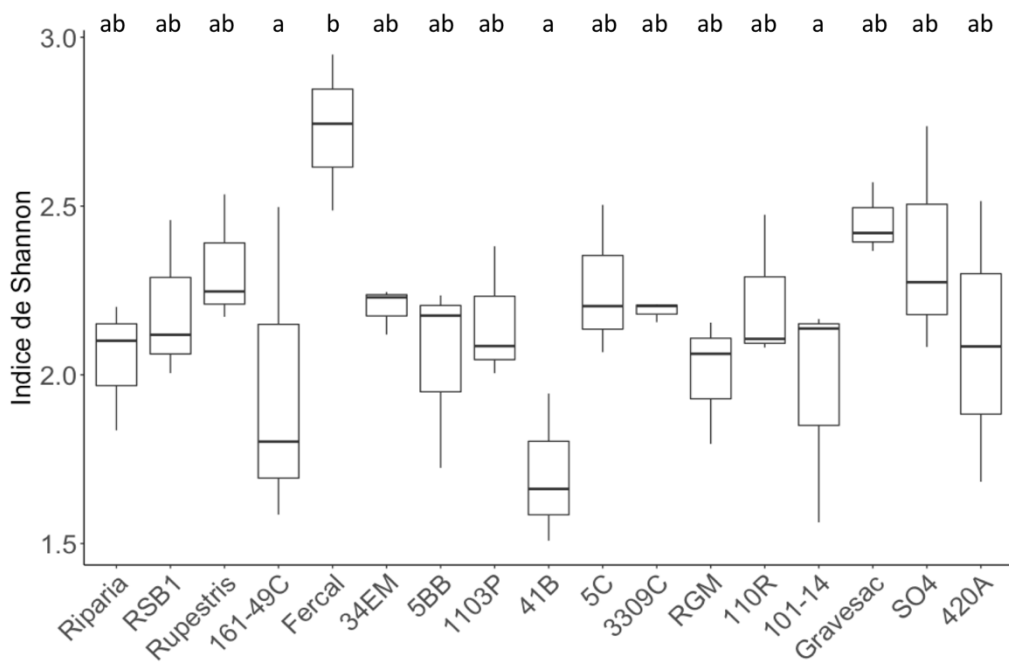


**Figure 18** : Abondance relative des espèces de CMA détectées dans les échantillons racinaires des porte-greffes de la collection. Pour chaque identifiant, la moyenne des abondances de trois répliques biologiques a été utilisée pour réaliser l'histogramme. Les espèces qui n'ont pas pu être identifiées sont indiquées par « sp. ».

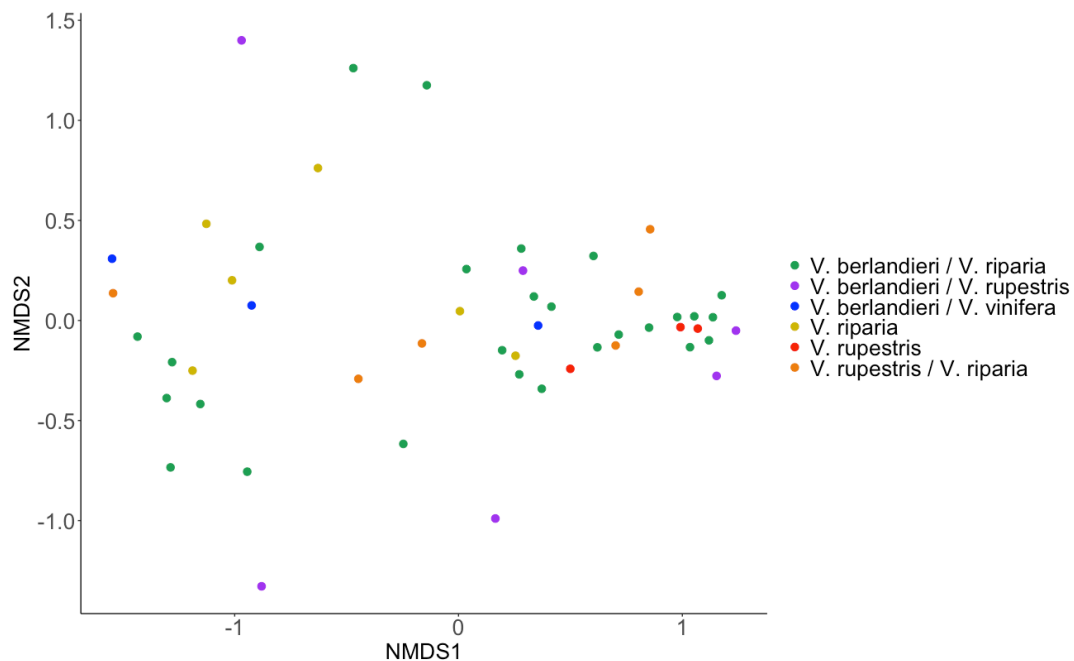
Malgré ces différences dans les abondances des espèces de CMA dans les racines des porte-greffes, le calcul des indices de diversité pour chaque échantillon montre un effet subtil du porte-greffe sur l'indice de diversité de Shannon. Dans nos analyses, le porte-greffe Fercal présente la diversité la plus élevée tandis que le 41B et le 101-14 sont significativement plus faibles (**Figure 19**).

L'analyse de la diversité beta permettant de comparer les communautés entre elles, nous indique cependant un effet plus net de l'identité du porte-greffe sur les communautés de CMA dans les racines (**Tableau 7**). Les porte-greffes sont issus de croisements entre les trois principales vignes d'origine américaine que sont *V. riparia*, *V. rupestris* et *V. berlandieri*. Nous avons donc cherché à savoir si l'identité des parents pouvaient influencer la communauté de CMA dans les racines de la descendance. Ici, l'analyse de la dissimilarité des échantillons nous indique un effet faible ou absent du croisement sur les communautés de CMA (**Figure 20, Tableau 7**).





**Figure 19 :** Comparaison des indices de diversité alpha (Shannon-Weaver) des échantillons de racines prélevés dans la collection de porte-greffes. Les lettres correspondent aux groupes statistiquement différents (test de Tukey ;  $p$ -value $<0,05$ ).



**Figure 20 :** Mesure de la diversité beta (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) dans les échantillons de racines prélevées dans la collection de porte-greffes. L'analyse NMDS est réalisée sur une matrice de dissimilarités de Bray-Curtis, calculée à partir de la table des OTU.

**Tableau 7 :** Analyses statistiques des similarités (ANOSIM) et MANOVA de permutations (ADONIS) sur une matrice de dissimilarités, calculée à partir de la table des OTU détectés dans les racines des porte-greffes.

Groupe	ANOSIM		ADONIS	
	R	P	R <sup>2</sup>	P
Porte-greffe	0,2464	$p < 0,001$	0,47452	$p < 0,001$
Croisement	0,06845	0,17778	0,15881	0,0299

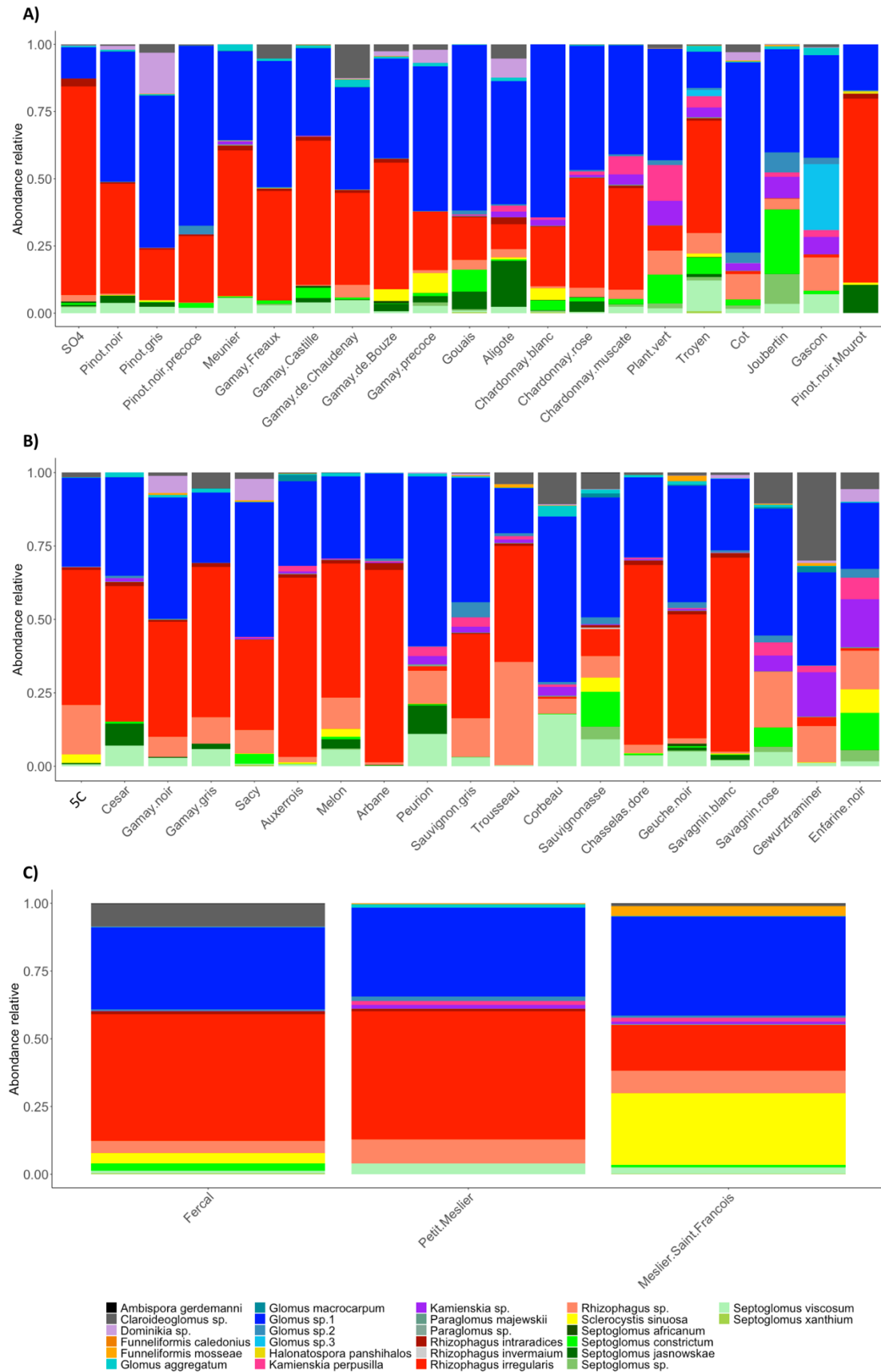
#### d) Effet du génotype du cépage sur les communautés de CMA associées aux racines du porte-greffe

Comme la quasi-totalité des vignes en production dans le monde, les cépages du conservatoire sont implantés dans une configuration dite « greffé-soudé », c'est-à-dire que le cépage voulu est greffé sur un porte-greffe résistant au phylloxéra avant que l'ensemble ne soit planté. Sur le conservatoire, une seule combinaison cépage/porte-greffe est implantée pour chacun des cépages. Ainsi, 20 cépages sont greffés sur le porte-greffe SO4, 18 cépages sur le porte-greffe Teleki 5C et deux cépages (Petit Meslier et Meslier Saint François) sur le porte-greffe Fercal.

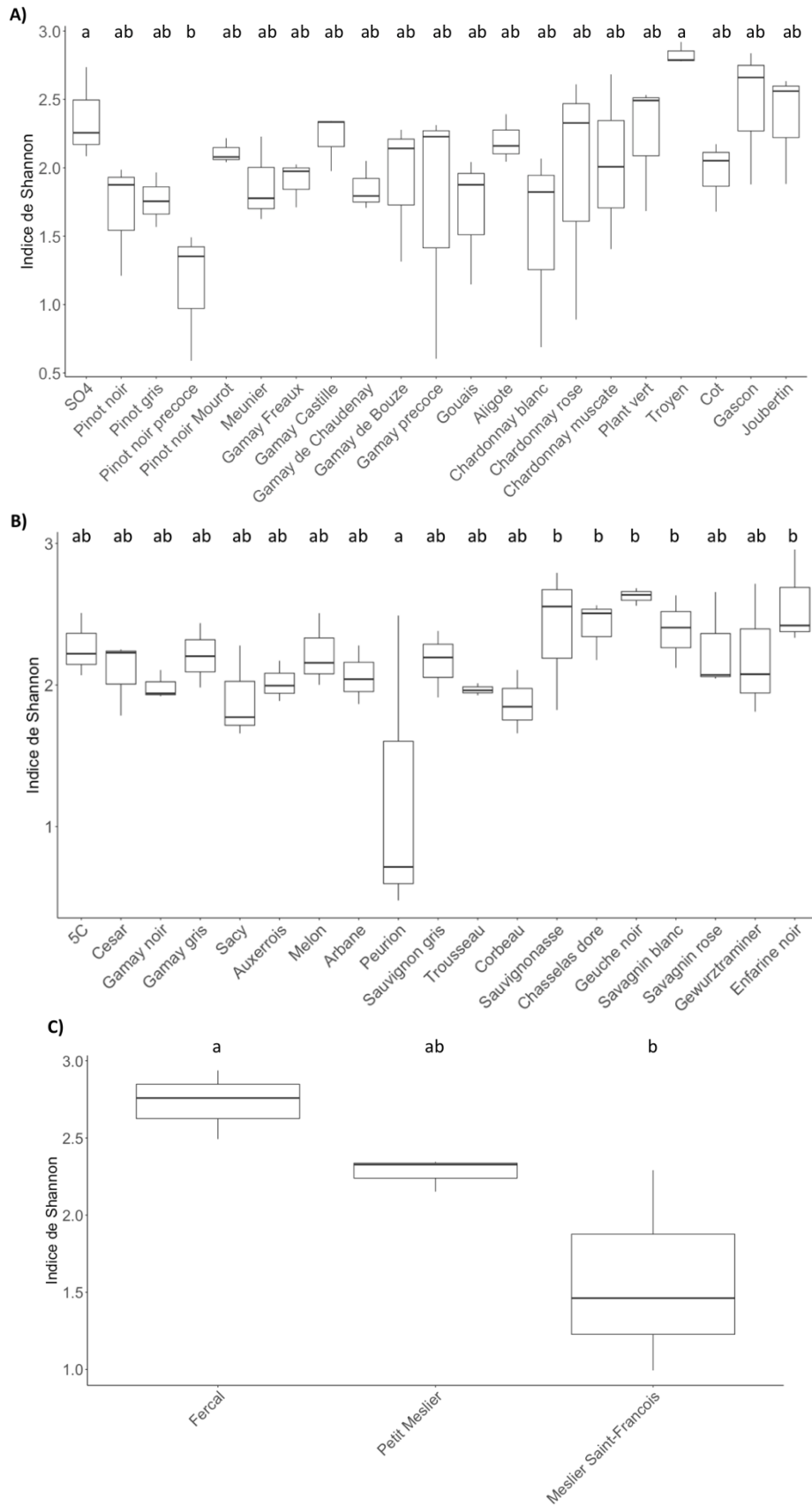
De manière identique à la collection de porte-greffes, les deux groupes de CMA identifiés comme dominants sont *Glomus* sp.1 et *R. irregularis*, et ce quel que soit le porte-greffe et la combinaison cépage/porte-greffe plantés. On peut observer les mêmes compensations entre ces deux groupes que dans les échantillons des porte-greffes. Toutefois, de plus grandes différences peuvent être observées vis-à-vis des espèces de CMA qui étaient minoritaires dans la collection de porte-greffes. En comparant les greffés-soudés avec le porte-greffe SO4, l'abondance de *R. irregularis* est diminuée en présence d'un greffon (**Figure 21A**). Cette diminution est principalement compensée par l'augmentation du genre *Glomus* mais également par des espèces précédemment considérées comme minoritaires. On observe par exemple une augmentation du genre *Septoglomus* notamment pour les cépages Gouais, Aligoté, Plant vert, Troyen et surtout Joubertin qui cumule plus de 40% de *Septoglomus* (**Figure 21A**). On observe aussi une augmentation de *Dominikia* sp. chez le Pinot gris, le Gamay précoce et l'Aligoté (**Figure 21A**). Dans les associations avec le Teleki 5C, la présence de *R. irregularis* est encore forte chez les greffés-soudés. Au contraire, quelques cépages présentent une diversité plutôt dominée par *Glomus* sp.1 comme pour les cépages Peurion et Corbeau (**Figure 21B**). On peut également noter chez les cépages Savagnin rose, Gewürztraminer et Enfariné noir, une présence fortement limitée de *R. irregularis* et dans le même temps, une plus forte abondance des genres *Claroideoglomus* ainsi que *Kamienskia* (**Figure 21B**). Concernant les associations avec le porte-greffe Fercal, seulement deux cépages ont fait l'objet d'une greffe sur ce génotype et on observe des profils de diversité différents par rapport au porte-greffe « franc de pied ». On peut remarquer la présence très importante de *Glomus* sp.1 dans les deux associations et le porte-greffe tandis que *R. irregularis* est lui très abondant dans les racines du Fercal et du greffé-soudé Petit Meslier/Fercal. Au contraire, chez le Meslier Saint-François, *R. irregularis* est

moins important mais on observe une augmentation de l'abondance de *Funneliformis mosseae* et une part très importante de *S. sinuosa*. En revanche, lorsque le Fercal est associé avec l'un ou l'autre des cépages, la part de *Claroideoglossus* chute.

L'effet du porte-greffe et du cépage sur la composition de la communauté racinaire de CMA est aussi visible en analysant les indices de diversité de Shannon pour chaque groupe d'échantillons (**Figure 22**). Cependant cet effet est limité chez le porte-greffe SO4 (**Figure 22A**) mais aussi pour le porte-greffe 5C (**Figure 22B**). En revanche, l'effet est plus net pour les associations sur Fercal, où les cépages Petit Meslier et Meslier Saint-François induisent une diminution de l'indice de diversité de Shannon (**Figure 22C**).

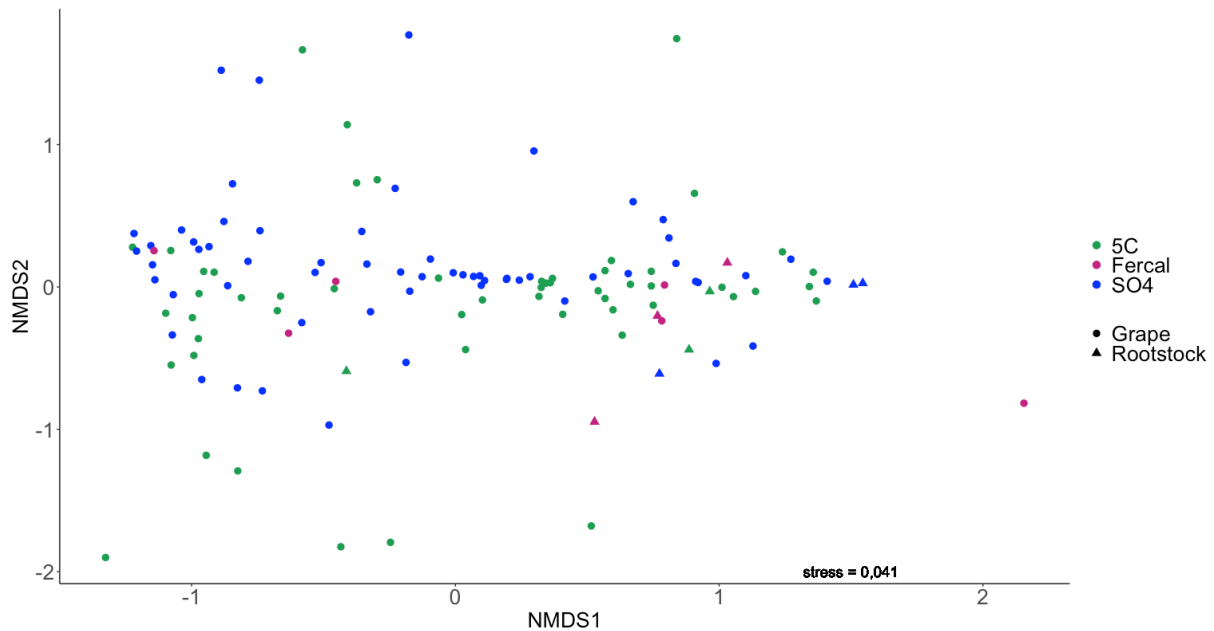


**Figure 21** : Abondance relative des séquences de CMA détectées dans les échantillons racinaires des porte-greffes et des cépages associés avec les porte-greffes **A)** SO4, **B)** Teleki 5C, **C)** Fercal. Pour chaque identifiant, la moyenne des abondances de trois répliques biologiques a été utilisée pour réaliser l'histogramme.



**Figure 22** : Comparaison des indices de diversité alpha (Shannon-Weaver) mesuré sur la table des OTU détectées dans les racines prélevées chez les greffés-soudés avec **A)** le porte-greffe SO4, **B)** 5C Teleki, **C)** Fercal. Les lettres correspondent aux groupes statistiquement différents (test de Tukey ; p-value<0,05).

L'observation de la composition des différentes communautés de CMA et l'analyse de la diversité beta de l'ensemble des données de cette seconde partie nous indique que l'identité du cépage a un effet significatif sur la structure des communautés de CMA (**Tableau 8**). En revanche, la part du porte-greffe dans la composition se révèle peu significative (**Figure 23, Tableau 8**).



**Figure 23** : Mesure de la diversité beta (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) dans les échantillons de racines prélevées dans la collection de cépages ainsi que les porte-greffes SO4, Teleki 5C et Fercal. L'analyse NMDS est réalisée sur une matrice de dissimilarités de Bray-Curtis, calculée à partir de la table d'OTU.

**Tableau 8** : Analyse statistiques des similarités (ANOSIM) et analyse MANOVA de permutations (ADONIS) sur une matrice de dissimilarités, calculée à partir de la table des OTU détectés dans les racines des porte-greffes SO4, 5C et Fercal et les greffés-soudés correspondants.

Groupe	ANOSIM		ADONIS	
	R	P	R <sup>2</sup>	P
Porte-greffe	0,04342	0,038096	0,02829	0,0427
Cépage	0,2975	$p < 0,001$	0,52294	$p < 0,001$
Porte-greffe * Cépage	0,1086	0,12409	0,04305	$p < 0,001$

## V) Discussion et conclusion

Dans les racines des plants prélevés sur le conservatoire du GEST, nous avons pu déterminer la présence de 247 OTU représentant 27 espèces de CMA selon les bases de données Maarjam et NCBI (**Figure 17**). Parmi elles deux groupes taxonomiques, représentant en moyenne 82,47% des séquences sont dominants dans la totalité des échantillons : *Glomus* sp. 1 et *R. irregularis*. Toutefois, dans certains échantillons, lorsque l'abondance de *Glomus* sp. 1 est très élevée, l'abondance de *R. irregularis* est très bas et inversement. Malgré l'utilisation des différents marqueurs moléculaires (SSU, ITS ou LSU), des études précédentes réalisées en vignoble montrent également la présence très importante des *Glomeraceae* dans le sol des vignobles (Massa et al. 2020; Betancur-Agudelo et al. 2021; Moukarzel et al. 2021) mais aussi en interaction dans les racines de vignes (Nogales et al. 2021).

Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, des études précédentes ont montré que la colonisation racinaire et la structure des communautés de CMA du sol pouvaient être impactées par la variabilité intraspécifique étudiée (Aguilera et al. 2014; Koczorski et al. 2021). Dans notre étude, la comparaison des communautés de CMA en association avec les racines montre, à la fois un effet du génotype du porte-greffe mais aussi du greffon sur la structure de ces communautés (**Figure 18 et 21**). De manière identique à ce qui a été constaté lors d'une étude menée sur le citronnier (Song et al. 2015), le greffon semble jouer un rôle plus important dans l'organisation des communautés microbiennes sans toutefois connaître les mécanismes sous-jacents (**Figure 23**). On peut cependant émettre des hypothèses quant à l'interaction entre le porte-greffe et le greffon. Il est communément admis que l'utilisation d'un porte-greffe peut conférer une tolérance à un stress environnemental (Tramontini et al. 2013; Serra et al. 2014; Zhang et al. 2016a) ou bien modifier la qualité des fruits (Zombardo et al. 2020a). Les connaissances sur la part du greffon dans l'interaction avec le porte-greffe et son rôle dans l'établissement du microbiote de la vigne sont encore limités. Cependant, on suppose que la production de composés carbonés liée à la photosynthèse du greffon influence le métabolisme général de la vigne greffée (Tandonnet et al. 2009). Plusieurs études ont montré ce lien étroit entre les besoins en nutriments du greffon et la régulation transcriptomique des transporteurs de nutriments chez le porte-greffe (Gautier et al. 2021). Ainsi, la variabilité génétique du greffon peut modifier la physiologie et l'absorption racinaire du porte-greffe en fonction des besoins du greffon (Gautier et al. 2020). Cette hypothèse prend un sens particulier dans le cadre de la SMA où l'échange de nutriments avec les CMA est primordial. L'efficacité de la SMA a été en grande partie définie par les bénéfices qu'elle apporte à la plante en termes de croissance et de nutrition (cf. Partie 2). Les plantes et les CMA se partagent les mêmes nutriments, comme le carbone, l'azote et le phosphore qui sont essentiels dans les processus biologiques des organismes. Or, l'établissement de la SMA est fortement dépendant de ces échanges de nutriments et de leur disponibilité dans le sol qui va définir la stratégie adoptée par chacun des partenaires (Ryan et al. 2000; Konvalinková et al. 2017). En fonction des individus, espèces végétales ou des associations plante/CMA, des stratégies d'échange différentes peuvent être mise en place. Ainsi, une plante peut établir

un échange équitable entre le carbone fourni au CMA et les nutriments reçus par ce dernier. Dans d'autres cas, des stratégies plus déséquilibrées peuvent apparaître au profit soit de la plante, soit du CMA. Enfin, la plante peut recevoir plus de nutriments qu'elle ne fournit de carbone au CMA et inversement (Aira et al. 2010). Du côté des CMA, peu de connaissances établissent des stratégies différentes entre les espèces de CMA. Néanmoins, il est rapporté que *R. irregularis* apporte davantage de nutriments à la plante en comparaison à *F. mosseae* (Hart and Reader 2002), *Glomus claroideum* ou *Gigaspora margarita* (Thonar et al. 2011).

Enfin, il est important de noter que d'autres paramètres peuvent affecter la composition du microbiote de la vigne et des communautés de CMA associées aux plantes (Borriello et al. 2012; Bettenfeld et al. 2021). Chez la vigne, la sélection des cépages et des porte-greffes suit deux méthodes : la sélection massale qui consiste à sélectionner au vignoble les sarments avec des caractères intéressants (qualité des baies, production, etc ...) qui vont ensuite être cultivés pour produire les futures greffons. L'autre méthode est la sélection clonale qui vise à sélectionner des clones intéressants. L'objectif de cette méthode est notamment d'assurer la traçabilité des plants de vigne mais également leur état sanitaire ainsi que les traits fonctionnels liés à la production des baies, aux qualités organoleptiques développées et à la croissance de la vigne. Dans le cas du conservatoire, ce niveau de variabilité génétique n'a pas pu être étudié. En effet les trois porte-greffes utilisés pour la collection de cépages sont issus du même clone que les porte-greffes plantés en « francs de pied » dans la collection de porte-greffes. Cependant, il reste peu probable que ce niveau de variabilité puisse impacter fortement les communautés symbiotiques des racines.

Les pratiques agricoles peuvent également modifier les communautés de CMA présentes dans un écosystème (Alguacil et al. 2016; Van Geel et al. 2017). La pratique du désherbage et du labour présente notamment un effet destructurant sur le sol et cassent les réseaux mycéliens des CMA ce qui limite la croissance et le développement des communautés (Brito et al. 2012). Au contraire la présence d'une diversité végétale à travers la pratique du couvert semble favoriser les interactions avec les CMA (Njeru et al. 2014; Higo et al. 2015; Cloutier et al. 2020).

Les caractéristiques géographiques et les paramètres pédologiques sont également des facteurs importants et modifie l'abondance de certaines espèces de CMA comme *F. mosseae* et *R. irregularis* (Jansa et al. 2014). Dans le cas du conservatoire, les paramètres physico-chimiques du sol montre une homogénéité limitant l'impact des paramètres du sol sur le développement des communautés de CMA. De plus, des analyses sont en cours sur les échantillons de sols prélevés afin de déterminer le réservoir potentiel de CMA présent et ainsi évaluer si des différences de réservoir au sein du conservatoire peuvent expliquer les différences observées.



En conclusion, nos travaux montrent que la diversité génétique du porte-greffe et du cépage, est un facteur déterminant des communautés de CMA pouvant interagir avec la vigne au niveau de ses racines. Cependant, des analyses plus approfondies seront nécessaires dans les prochaines études afin de mieux comprendre l'interaction entre les CMA et la vigne greffée. Le porte-greffe joue-t-il uniquement un rôle de plateforme de régulation des échanges ? Ce dernier étant pris entre la demande en nutriments du greffon et leur disponibilité, dans le sol ou bien via l'intermédiaire des CMA.

Les hypothèses formulées précédemment soulignent l'importance de mieux évaluer chez les plantes, le déterminisme génétique qui aboutit au recrutement de communautés de CMA différentes et plus largement au développement des microbiotes des cultures. A plus long terme, une amélioration des connaissances sera nécessaire, sur les mécanismes physiologiques et les différentes capacités d'échange de nutriments par les CMA pouvant expliquer l'interaction avec une ou plusieurs espèces privilégiées (Heijden et al. 2015). Le rôle écologique des CMA et les facteurs permettant la mise en place d'interaction avec les plantes restent à explorer. Aller plus loin dans la recherche des mécanismes sous-jacents permettra de mieux prendre en compte l'influence des interactions bénéfiques avec les microorganismes, dont les CMA, dans le processus de sélection variétale et l'adaptation des génotypes aux microorganismes présents dans les écosystèmes cultivés

## **Chapitre 2 - Impact d'un couvert végétal sur les communautés de CMA au vignoble**

### **I) Introduction**

De manière générale, la diminution rapide de la biodiversité observée depuis plusieurs décennies reste la principale menace sur la durabilité des écosystèmes (Butchart et al. 2010). Cette biodiversité est directement liée à l'écosystème à travers l'ensemble des fonctions établies par les organismes présents au sein de cette biodiversité et notamment les microorganismes présents dans le sol. La diversité microbienne du sol est essentielle à l'écosystème ainsi qu'à son fonctionnement et sa productivité en participant activement aux processus biologiques du sol. Ces processus comprennent le recyclage des nutriments et la mise à disposition de ces derniers pour les plantes mais également pour les autres organismes du sol. Les microbes du sol participent également au maintien de la structure du sol (Li et al. 2020) et à la dégradation de certains polluants (Lupwayi et al. 1998). Cependant, dans le cas des écosystèmes agricoles qui sont fortement anthropisés, cette diversité microbienne est fortement mise à mal par l'intensification des pratiques agricoles.

#### **a) Impact du travail du sol sur les communautés de microorganismes**

Le travail du sol ou plus communément appelé le labour, est une pratique agricole ancienne basée sur l'élimination de la flore adventice. Ces plantes non désirées dans la parcelle sont éliminées car elles peuvent générer des compétitions avec les plantes cultivées à certains moments de la saison, notamment lors de stress environnementaux forts comme les stress hydriques pendant l'été. Bien que l'on imagine que le labour favorise l'aération du sol et la pénétration de l'eau dans le sol, il est indéniable que cette pratique modifie la structure du sol et favorise par conséquent l'érosion et les phénomènes de lixiviation des nutriments (Randall and Iragavarapu 1995; Addiscott and Thomas 2000). Ce mécanisme est en partie à l'origine de la contamination des eaux de surface et souterraines par des produits phytosanitaires et des polluants (Christensen et al. 1983; Busari et al. 2015).

La pratique du labour impacte également la biodiversité des sols, et notamment les organismes les plus connus que sont les vers de terre (Fragoso et al. 1997; Chan 2001). De nombreuses études ont également montré un impact fort du travail du sol sur les communautés microbiennes (bactériennes et fongiques). En modifiant sa structure, le labour modifie les propriétés du sol, proche des microorganismes et diminue alors fortement leur développement (Sessitsch et al. 2012). Les CMA sont des microorganismes clés de par les nombreux services qu'ils fournissent aux écosystèmes. L'effet direct du travail du sol sur les CMA est double. D'une part, la destruction physique de la structure du sol entraîne la destruction du réseau

mycélien qui parcourt le sol. Cela se traduit par une forte baisse de l'efficacité des CMA (Kabir 2005), avec notamment moins de structures fongiques et une colonisation réduite des racines des plantes (Goss and de Varennes 2002). D'autre part, le labour régulier entraîne un fractionnement régulier des réseaux mycéliens et favorise la sélection de CMA avec une sporulation forte et des cycles de vie très court (Oehl et al. 2003; Verbruggen and Toby Kiers 2010). Il est intéressant de noter que la diversité des CMA semble être améliorée avec un travail du sol par rapport à un système agricole avec un labour réduit bien que les mécanismes ne soient pas encore élucidés (Lumini et al. 2009). Au contraire, Brito et al. (2012) ont montré que le travail diminuait la diversité des CMA dans le sol (Brito et al. 2012).

Pour de très nombreuses études, la diminution du recours au labour par les agriculteurs est un élément clé pour maintenir et optimiser les mécanismes biologiques. Des systèmes agricoles avec un labour réduit peut réduire les risques d'érosion, améliorer la structure des sols, maintenir les nutriments et l'eau au sein des agrégats du sol (Laudicina et al. 2015; Wang et al. 2018) et augmenter les rendements des cultures (Zhao et al. 2017). Ces mécanismes impliquent aussi les communautés microbiennes du sol.

## **b) Impact des produits phytosanitaires sur les communautés de microorganismes**

Face aux nombreuses menaces auxquels font face les cultures, les produits sanitaires sont encore largement utilisés en agriculture. La grande majorité de ces produits (fongicides, insecticides ou herbicides) sont généralement très peu spécifiques et ont un impact sur l'ensemble de l'écosystème. Par définition, les fongicides ont pour objectif de limiter le développement des champignons. Du fait de leur faible spécificité, plusieurs études ont montré qu'ils impactaient négativement le développement des CMA. Ainsi, Kjoller et Rosendahl ont montré que l'application de fongicides limitait l'activité des CMA (Kjoller and Rosendahl 2000). Plus largement, les fongicides impactent le développement des communautés microbiennes (Mackie et al. 2012).

Du côté des herbicides, le glyphosate est la molécule la plus utilisée. Bien que ces herbicides ne soient pas directement dirigés contre eux, les molécules utilisées impactent négativement les communautés microbiennes (Bending et al. 2007). C'est justement cet effet indirect des herbicides qui limite la croissance des CMA ; ils privent les CMA d'une plante hôte ce qui empêche leur développement. De plus, et bien que les doses testées soient supérieures aux doses recommandées, il a pu être montré que le glyphosate avait un impact sur la germination des spores de *Funneliformis mosseae* (Ronco et al. 2008). En 2018, Zaller et al. ont testés quatre herbicides dont le glyphosate et ont montré une diminution de la colonisation des racines de la vigne en présence de ces molécules (Zaller et al. 2018).

En fonction des doses utilisées, ces produits peuvent présenter des impacts négatifs directs ou indirects sur la diversité microbienne. Or, l'accumulation de ces produits dans les sols est un facteur aggravant et pose un véritable problème éco-toxicologique dû à la contamination des sols et des eaux (Karimi et al. 2020).

### c) Rôle de la diversité végétale sur les communautés microbiennes

La diversité végétale au sens large apporte de nombreux services écosystémiques dont la stimulation des communautés microbiennes de la rhizosphère. La diversité végétale peut se caractériser par l'identité et l'abondance des espèces présentes dans un écosystème mais également la présence de traits fonctionnels représentatifs d'une espèce ou d'un groupe d'espèces (Hugoni et al. 2018). Les traits fonctionnels développés par une communauté végétale modifient la composition des communautés de la rhizosphère (Samad et al. 2017). Par exemple, la composition des exsudats racinaires varie entre les espèces ce qui modifie les communautés microbiennes dans la rhizosphère (Haichar et al. 2008). Ces traits fonctionnels sont généralement liés à des mécanismes d'adaptation des plantes à leur environnement. Un des traits fonctionnels les plus connus est certainement la capacité d'établir une symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote qui vont permettre d'améliorer la nutrition azotée des plantes et d'augmenter le contenu en azote dans le sol (Mbuthia et al. 2015). La production d'exo-polysaccharides et de facteurs Nod par les racines vont favoriser la croissance de ces bactéries et la formation de la symbiose (Kawaguchi et al. 2002; Jones et al. 2007). Les *Brassicaceae* sont également reconnus pour leur impact sur la composition des communautés de la rhizosphère (Zhang et al. 2020). Là aussi, les exsudats racinaires des *Brassicaceae* sont riches en glucosinolates, qui, après transformation, forment des produits biocides. Ces molécules réduisent alors le développement des champignons et certains pathogènes (Hu et al. 2015).

D'autres études ont mis en avant cette interaction forte entre la diversité végétale et la structure des communautés des microorganismes du sol (Mitchell et al. 2010; Hiiesalu et al. 2014; Prober et al. 2015). Cependant la composition spécifique des couverts peut aussi largement affecter les communautés microbiennes (Carney and Matson 2006). Toutefois, il existe peu d'étude sur l'effet des couverts végétaux et le développement des communautés de CMA (Bowles et al. 2017). On suppose que l'introduction d'une diversité végétale importante favorise le développement des CMA, en augmentant l'abondance et la diversité des plantes hôtes. Ces dernières années, la mise en place de plantes de couvert dans des systèmes de culture a permis de montrer une augmentation de la colonisation racinaire par les CMA (Isobe et al. 2014) puis une modification de la composition de la communauté de CMA associée au soja (Higo et al. 2018, 2019). Des résultats similaires ont été observés chez le maïs sans pour autant affecter la diversité des CMA présents dans les racines (Hontoria et al. 2019).

À travers ces quelques exemples, on comprend aisément que la présence et le développement des plantes influencent le développement des microorganismes tels que les CMA. En revanche, les pratiques agricoles intensives et l'utilisation d'herbicides limitent fortement cette diversité végétale. Ainsi, pour stimuler la croissance des communautés microbiennes et optimiser les services écosystémiques rendus, il est nécessaire de repenser les systèmes agricoles en tenant compte de la diversité végétale.

#### **d) La pratique du couvert végétal en viticulture**

*Cette partie a fait l'objet d'une article « Les couverts végétaux : un atout majeur pour réduire les intrants de synthèse et augmenter les services écosystémiques au vignoble ». Cet article a été publié en 2019, dans le numéro 175 de la Revue des Œnologues. Cet article, à destination des professionnels de la filière viticole vise à résumer les principes de l'utilisation des couverts en viticultures ainsi qu'à présenter le projet Biovine*

# Les couverts végétaux

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

Pierre-Antoine Noceto<sup>1</sup>, Mathilde Hériché<sup>1</sup>, Jérôme Fromentin<sup>1</sup>, Vittorio Rossi<sup>2</sup>, Širca Saša<sup>3</sup>, Aurora Ranca<sup>4</sup>, Kehrlí Patrik<sup>5</sup>, Josep Armengol<sup>6</sup>, Sophie Trouvelot<sup>1</sup>, Diederik van Tuinen<sup>1</sup>, Pierre-Emmanuel Courty<sup>1</sup>, Daniel Wipf<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Univ. Bourgogne – Univ. Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

<sup>2</sup> Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza – Italie.

<sup>3</sup> Plant Protection Department, Agricultural Institute of Slovenia – Ljubljana – Slovénie.

<sup>4</sup> S.C.D.V.V. Murfatlar – Murfatlar – Constanta – Roumanie.

<sup>5</sup> Agroscope – Nyon – Suisse.

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

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

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

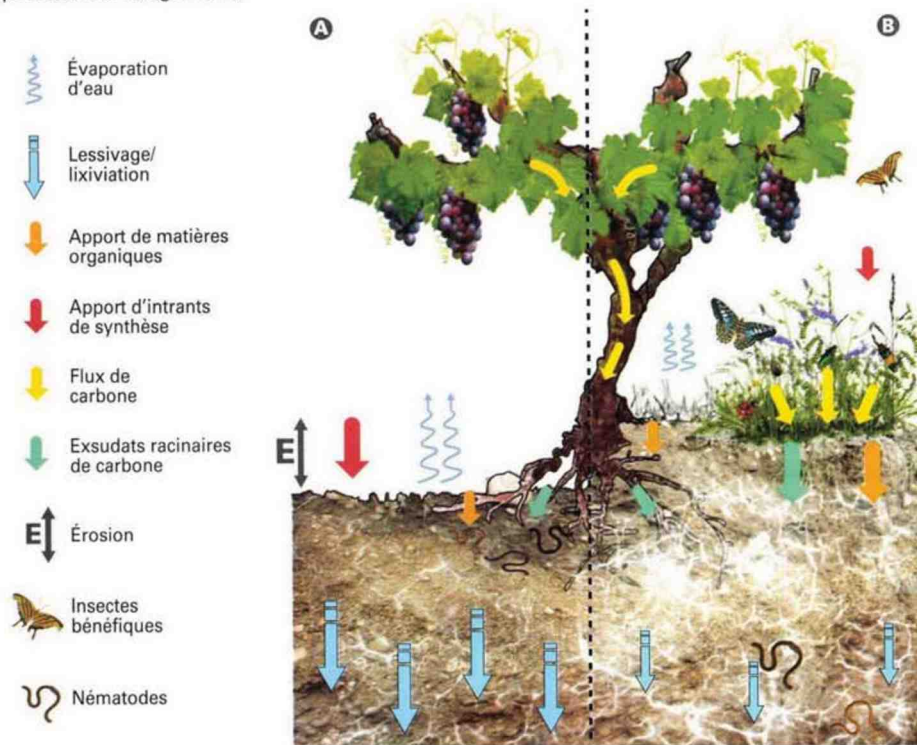
parcelle, en détruisant et en enfouissant les résidus du couvert qui libèrent ainsi de la matière organique plus ou moins rapidement, qui servira à alimenter la plante au cycle suivant, après des étapes de minéralisation ;

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

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

### Les couverts et leurs intérêts en production végétale

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



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

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

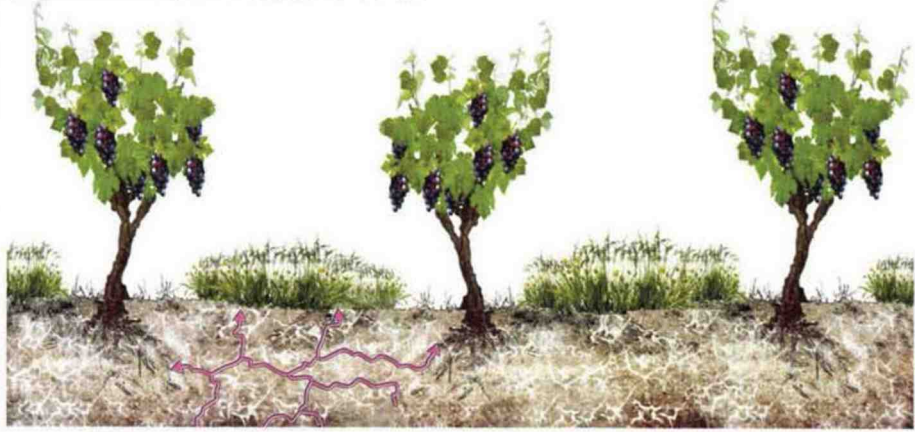
bactéries du sol, leur permettant ainsi de fixer le diazote atmosphérique. Avec un rapport C/N alors très faible, le relargage de l'azote assimilé et des nutriments se fait très rapidement, et ceux-ci deviennent donc disponibles pour la culture.

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

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

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

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



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

### Quelles stratégies de couverture sont adaptées à la viticulture ?

Dans les vignobles français, la pratique d'un enherbement des parcelles même temporaire, est moins répandue qu'en grandes cultures. Toutefois, en 2010, près de 50 % des surfaces viticoles étaient enherbées (source : Agreste), ce qui révèle l'intérêt grandissant des viticulteurs pour cette pratique. L'Alsace et le Sud-Ouest sont les deux vignobles français où l'enherbement est courant (plus de 80 % des surfaces plantées sont enherbées). En revanche, les vignes de Champagne et du Sud-Est de la France (Provence et Languedoc-Roussillon) sont les moins concernées avec moins de ¼ des parcelles enherbées. Les vignobles convertis en agriculture biologique prennent une part importante des exploitations utilisant les plantes de couvert. La couverture végétale d'une

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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





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

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

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

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

**Approches et impacts attendus**

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

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

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

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

**Les couverts végétaux utilisés dans le projet Biovine**

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

## II) Objectif du chapitre

La diversité végétale est un facteur important de l'écosystème. En effet, la diversité végétale influence les processus physiques et biologiques du sol, et participe à la stimulation des communautés microbiennes. Pourtant, la diversité végétale est souvent réduite volontairement au vignoble, afin de limiter les concurrences pour l'eau et les nutriments avec la vigne. De plus, l'utilisation d'herbicides ou bien le travail du sol, impacte encore plus la diversité des microorganismes présents et limite l'efficacité des services écosystémiques rendus par ces derniers.

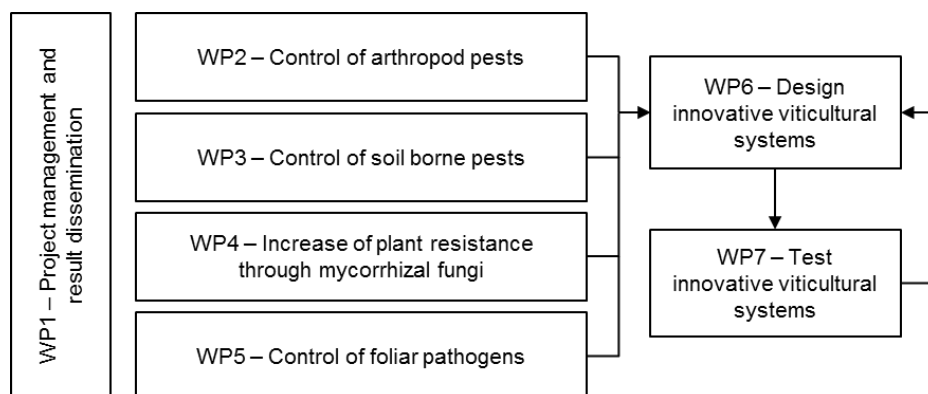
C'est partant de ce constat que le projet Biovine a été développé puis lauréat, en 2017, de l'appel à projet lancé par le fond « CORE Organic Cofund » et appuyé par l'Union Européenne (programme de recherche Horizon 2020). Ce projet vise à exploiter le potentiel de la diversité végétale dans la réduction de l'utilisation des pesticides grâce à la fourniture par les plantes de couvert de plusieurs services écosystémiques. Pour atteindre cet objectif, le projet regroupe six partenaires européens répartis en sept groupes de travail (WP, work-package) en fonction des thématiques abordées et des services écosystémiques étudiés (**Figure 24**). Le projet Biovine vise notamment à étudier l'impact d'une couverture végétale sur i) la répulsion d'arthropodes nuisibles, ii) l'attraction et le maintien d'insectes auxiliaires, iii) la réduction de l'inoculum de pathogènes foliaires et telluriques et iv) la stimulation des communautés de CMA. À terme, ce projet permettra d'apporter des outils et des pistes aux viticulteurs quant à l'utilisation des couverts en fonction de leurs objectifs.

Notre travail dans ce projet porte sur deux points :

- définir et tester, en conditions contrôlées, la capacité des plantes de couvert à mettre en place et développer la SMA.

- la mise en place de plusieurs mélanges de couverts végétaux en vignoble afin d'évaluer l'impact du couvert sur les communautés de CMA associées à la fois à la vigne et au couvert.

Enfin, plusieurs séries de prélèvements ont été réalisées au cours de la saison dans le but d'étudier l'évolution saisonnière des communautés de CMA associées à la vigne et au couvert.



**Figure 24** : Groupes de travail mis en place dans le cadre du projet Biovine.

### III) Description des essais au vignoble

Pour étudier l'impact d'un couvert végétal sur la structure des communautés de CMA au vignoble, nous avons menés plusieurs essais en France entre 2018 et 2021. Comme de nombreux viticulteurs, nous avons été confrontés à des difficultés de levée des semis en raison des conditions défavorables de climat et de sol. De plus, il était nécessaire d'avoir des parcelles où peu d'essais avait été menés de manière à limiter la confusion avec le nouvel essai. Ces conditions n'étaient pas réunies sur les deux premières parcelles. En 2020, nous avons mis en place une collaboration avec la Chambre d'Agriculture de Côte d'Or (CA21) qui travaille depuis quelques années sur l'utilisation des couverts végétaux dans le cas particulier du vignoble bourguignon. La parcelle d'essai, qui appartient au Domaine Dubois, est localisée sur la commune de Prémieux-Prissey (21) (**Tableau 9**). Sur cette parcelle, huit mélanges multi-espèces ont été semés après chaque vendange depuis quatre ans (**Tableau 10**). Ils sont détruits au cours de la saison pour limiter la concurrence avec la vigne. Cependant, la condition M7, composée uniquement de trèfle est maintenue toute au long de la saison car ce mélange présente l'avantage de rester proche du sol malgré un développement annuel faible. Enfin, en plus de ces mélanges, une condition (M9) de travail du sol avec un désherbage mécanique est intégré à l'essai. Chaque mélange est semé sur quatre inter-rangs consécutifs. Les prélèvements sont donc réalisés dans les deux inter-rangs centraux et le rang de vigne au milieu.

Sur cette parcelle, un suivi chronologique des communautés de CMA a été réalisé à partir de Juillet 2020 de manière à évaluer l'importance de l'effet saisonnier sur les communautés de CMA associés à la vigne et aux plantes de couvert. Cinq périodes de prélèvements ont donc été planifiés : Juillet 2020, Novembre 2020, Février 2021, Avril 2021 et Juillet 2021 (**Tableau 11**). Pour chaque condition et chaque période de prélèvement, les racines de neuf vignes réparties en trois blocs ont été prélevées selon la méthode développés au laboratoire (Drain et al. 2019). De la même manière, les plantes de couverts qui se sont développées à proximité des ceps prélevés ont été échantillonnées en récupérant entre cinq et dix individus par espèce (**Figure 24**). Au total, nous avons effectué au cours de la saison, 135 prélèvements de racines de vigne et 209 prélèvements de plantes de couvert.

**Tableau 9** : Description du site d'essai de Prémieux-Prissey

Pays	Localisation	Cépage	Porte-greffe	Age (années)	Nombre de cep par rang	Irrigation
France	Prémieux-Prissey (Bourgogne)	Pinot Noir	Teleki 5C	20	100-120	Absent

**Tableau 10** : Liste des mélanges semés par le Domaine Dubois et la CA21 sur la parcelle d'essai de Prêmeaux-Prissey

M1	M2	M3	M4 (Vitimax Biomasse)
Radis chinois	Radis chinois	Radis chinois	Vesce velue
Moutarde d'Abyssinie	Lin cultivé	Lin cultivé	Gesse commune
Lentille noire	Pois fourrager	Phacélie	Radis chinois
Trèfle d'Alexandrie	Féverole	Pois fourrager	Seigle de printemps
Avoine rude	Phacélie	Trèfle d'Alexandrie	Seigle d'hiver
		Avoine rude	Triticale
M5 (Chlorofiltre Elite)	M6 (Vamagro)	M7 (Ferticover)	M8
Vesce commune	Vesce Velue	Trèfle souterrain	Pois fourrager
Trèfle d'Alexandrie	Trèfle d'Alexandrie		Féverole
Moutarde d'Abyssinie	Moutarde d'Abyssinie		Avoine rude
	Lin cultivé		Seigle Multicaule

**Tableau 11** : Plan de prélèvements sur l'essai de Prêmeaux-Prissey

	T0	T1	T2	T3	T4
Date d'échantillonnage	Juillet 2020	Novembre 2020	Février 2021	Avril 2021	Juillet 2021
Stade phénologiques de la vigne	(M) Veraison	(O) Chute des feuilles	(A) Dormance	(C-D) Floraison	(I) Veraison
Développement du couvert	Avant semis	Semis + 2 mois	Semis + 5 mois	Avant destruction	Avant semis

Dans le cadre du projet Biovine, chaque partenaire a également mis en place des parcelles d'essai spécifiques à leurs objectifs (attraction de d'auxiliaires, biocontrôle des ravageurs de la vigne etc.). Nous avons ainsi profité de la mise en place de ces essais pour évaluer l'impact du couvert végétal sur les communautés de CMA dans plusieurs vignobles européens. Les caractéristiques de chaque parcelle sont à retrouver dans le **Tableau 12**. Conformément à notre protocole d'échantillonnage, chaque partenaire a donc prélevé et nettoyé des racines de vigne et de couvert. Pour limiter l'ampleur des échantillonnages, seulement deux dates ont été prélevées : au printemps 2020 et à l'automne 2020. Dès la réception des échantillons, nous avons procédé à l'extraction des ADN totaux puis à l'amplification des marqueurs moléculaires des CMA, FLR3-FLR4.

**Tableau 12 :** Description des parcelles et des conditions de couvert végétal semées dans le cadre des essais du projet Biovine.

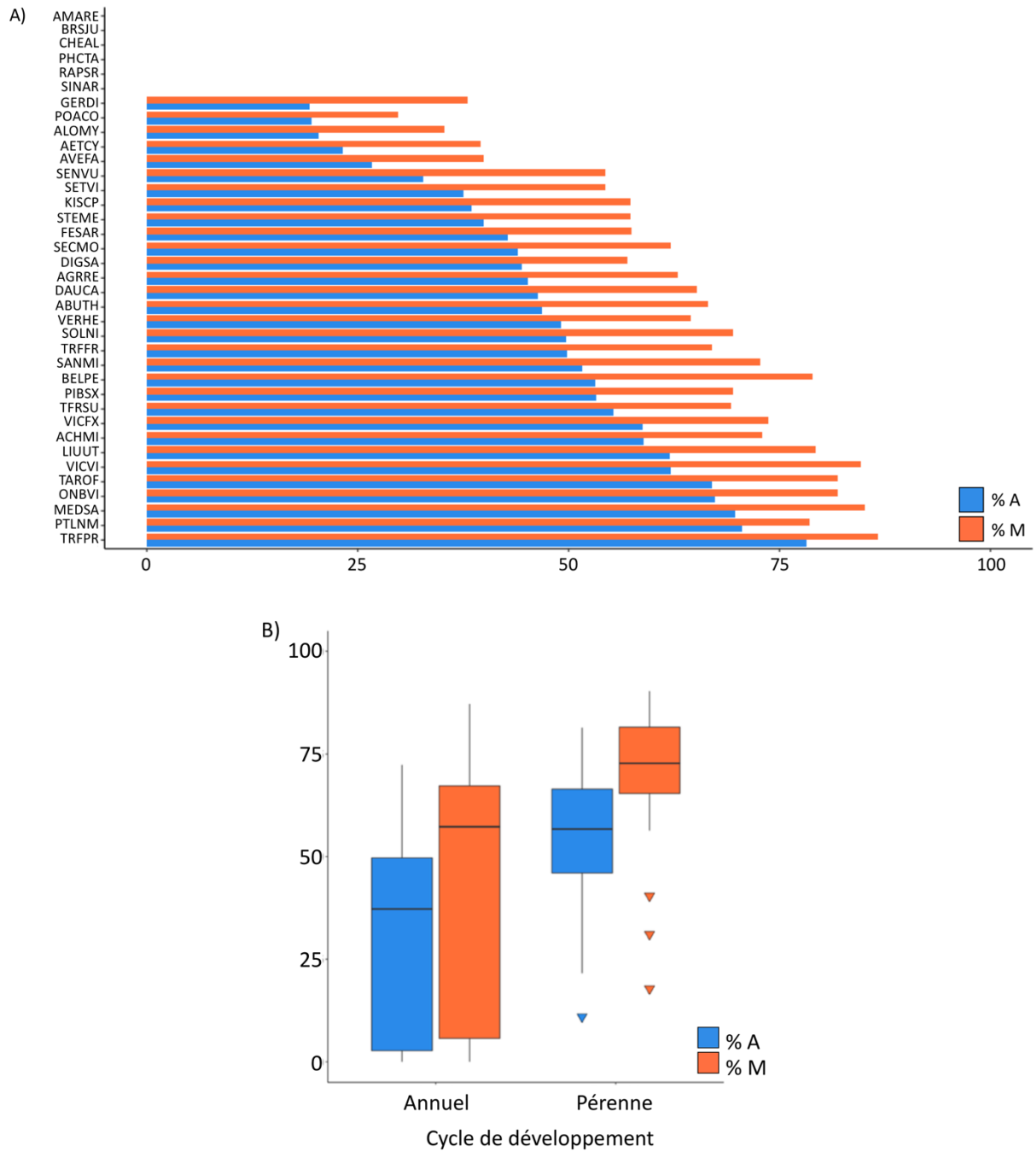
Pays	Localisation	Cépage	Porte-greffe	Age (années)	Conditions de couvert végétal	
France	Premeaux-Prissey	Pinot noir	Teleki 5C	20	Cf. <b>Tableau 10</b>	
Italie	Castell'Arquato (Piacenza)	Croatina	Kober 5BB	20	V1	50% <i>Lolium perenne</i> ; 25% <i>Onobrychis viciifolia</i> ; 25% <i>Trifolium repens</i>
					V2	50% <i>Vicia sativa</i> ; 50% <i>Sinapsis sp.</i>
					V3	Végétation spontanée
Suisse	Agroscope (Nyon)	Chasselas	3309C	23	V1	Mélange commercial MSC4B ( <i>Bromus tectorum</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Medicago lupulina</i> , <i>Poa compressa</i> , <i>Prunella vulgaris</i> , <i>Sanguisorba minor</i> )
					V2	Végétation spontanée
Roumanie	Murfatlar (Dobrodgea)	Feteasca neagra	SO4	18	V1	50% <i>Lolium perenne</i> ; 25% <i>Onobrychis viciifolia</i> ; 25% <i>Trifolium repens</i>
					V2	50% <i>Vicia sativa</i> ; 50% <i>Sinapsis sp.</i>
					V3	Végétation spontanée
					V4	Travail du sol
Espagne	Villar del Arzobispo (Valencia)	Cabernet-Sauvignon	110R	10	V1	Végétation spontanée
					V2	Travail du sol

#### IV) Résultats

##### a) Détermination de la mycorhizotrophie des plantes de couvert

Afin d'évaluer les plantes de couvert les plus mycorhizotrophes, des expérimentations ont été menées en conditions contrôlées. À partir de la liste d'espèces fournie dans le **tableau 1**, 37 espèces végétales ont été mises en culture. Les plantes ont été cultivées en serre en présence de la souche de CMA *R. irregularis* DAOM197198 (Premier Tech®). Après deux mois de culture, les racines de toutes les plantes ont été récoltées et la méthode de Trouvelot a été utilisée pour colorer les structures fongiques (Trouvelot et al. 1986). La colonisation racinaire par *R. irregularis* a été observée et quantifiée au microscope optique selon la méthode de quantification de Newman (Newman 1966).

Selon les résultats obtenus, une majorité d'espèces (26/37) présente une colonisation racinaire (%M) supérieure à 50%, mais un peu moins de la moitié de la liste (13/37) présente un pourcentage d'arbuscules (%A) supérieur à 50% (**Figure 25A**). La proportion d'arbuscules représente mieux l'interaction et les échanges potentiels entre la plante et les partenaires fongiques que la colonisation racinaire. Sur ce point, si l'on compare les deux familles de plantes généralement utilisées dans les mélanges de plantes de couvert, on constate que pour les *Fabaceae*, le %A est plus élevé que pour les *Poaceae*. Dans nos essais, *Trifolium pratense* (TRFPR) présente un pourcentage de mycorhization et d'arbuscules plus important que les autres espèces évaluées. Au contraire, *Amaranthus retroflexus* (AMARE), *Chenopodium album* (CHEAL), *Phacelia tanacetifolia* (PHCTA), *Raphanus sativus* (RASPR) et *Sinapsis arvensis* (SINAR) font partie des familles végétales qui ne permettent pas la mise en place de la symbiose mycorhizienne ce qui est confirmé par l'absence de structure fongique. En revanche, *Poa compressa* (POACO) présente un pourcentage de mycorhization le plus faible parmi les plantes capables de développer une symbiose mycorhizienne. De la même manière, les plantes pérennes sont plus colonisées par *R. irregularis* par rapport aux plantes annuelles (**Figure 25B**). Cette expérience à grande échelle avec plus de 30 espèces végétales montre que toutes les plantes n'ont pas la même capacité à s'associer avec *R. irregularis* et certainement avec d'autres souches de CMA. Il semble également que les caractéristiques des plantes telles que la famille ou le cycle de développement influencent la mise en place de la SMA. En conclusion, une des clés du choix des plantes de couvert, par les viticulteurs, sera non seulement la mycorhizotrophie des espèces utilisées mais aussi leur relation avec la vigne à travers les réseaux mycéliens communs. Notre équipe étudie actuellement ces relations dans des microcosmes spécialement développés.



**Figure 25 :** **A)** Analyse de la colonisation de plantes de couverture sélectionnées après huit semaines de culture avec *R. irregularis*. N.B. pour la signification des codes EPP0, voir le tableau 1 ; **B)** Analyse de la colonisation des plantes de couverture groupées par cycle de développement. Les %A et %M représentent la proportion d'arbuscules et de mycorrhization observée dans le système racinaire de chaque espèce végétale.

## b) Étude au vignoble du couvert végétal sur les populations de CMA endogènes

En parallèle de ces expérimentations en serre, plusieurs essais ont été mis en place en France et chez les partenaires du projet Biovine, dans le but de déterminer l'impact de la diversité végétale sur les communautés de CMA associées à la vigne et au couvert. En ce qui concerne les essais en Europe, tous les partenaires du projet ont envoyé des échantillons de racines et un total de 88 échantillons a été reçu. Pour notre essai mené en France, les cinq points de prélèvements ont pu être réalisés et un total de 135 échantillons de racines de vigne et 209 échantillons de racines de plantes de couvert a été prélevé. Pour l'ensemble des 432 échantillons, l'ADN total a été extrait et les marqueurs moléculaires FLR3-FLR4 ont été amplifiés. Les amplicons ont ensuite été envoyés au CGRB aux États-Unis ainsi que dans la société MicroSynth en Suisse pour effectuer le séquençage.

En raison de la crise sanitaire, de nombreux retards ont été accumulés de la part les sociétés de séquençage et la majorité des données ne nous ont pas encore été communiquées. Les résultats obtenus seront présentés lors de la soutenance puis publiés dans un article.

## V) Discussion et conclusion

La mycorhizotrophie des plantes de couvert, en présence de *R. irregularis*, est différente entre les espèces. Tandis que certaines plantes sont fortement colonisées, d'autres espèces vont plus difficilement l'être. Cependant, il ne suffit pas d'intégrer à la parcelle un mélange avec les plantes les plus mycorhizotrophes. Au sein de n'importe quel écosystème, la diversité végétale apporte des services écosystémiques importants et joue un rôle majeur dans la formation et le développement des communautés microbiennes. L'identité des plantes, qu'il s'agisse de l'espèce ou de la famille, peut avoir un impact important (positif ou négatif) sur la diversité microbienne en général, et en particulier sur les CMA. Même si la majorité des espèces végétales sont des hôtes capables d'interagir avec les CMA, certaines ne le sont pas. Les *Brassicaceae* font partie de ces familles de plantes non-mycorhizotrophes qui inhibent la croissance et le développement des CMA par le biais des exsudats racinaires. Malgré cet effet négatif sur les CMA, les *Brassicaceae* pourraient être utilisées comme plante de biofumigation contre les ravageurs de la vigne ou comme plante décompactante (Morris et al. 2020). La réflexion autour de la présence des *Brassicaceae* dans un mélange de couvert est intéressante et l'aspect de la proportion optimale à intégrer au mélange reste encore à définir pour bénéficier du rôle biofumigateur sans pour autant impacter le développement des CMA ni l'efficacité de la SMA.

Le choix des mélanges de couvert doit être également réfléchi à des échelles plus larges (espèce, communauté végétale, parcelle). De nombreux viticulteurs sont réticents à la mise en place d'un couvert végétal dans leur vignoble car il peut entraîner une compétition forte pour l'eau et les nutriments. Cette compétition entre les plantes est un facteur déterminant de la structure des communautés végétales mais également du rendement



des cultures (Lin et al. 2015). Cependant, ces mécanismes peuvent être atténués par les CMA qui participent via les réseaux mycéliens à équilibrer les échanges de nutriments (van der Heijden and Horton 2009). Scheublin et al. ont par ailleurs montré que les CMA étaient en mesure de diminuer la compétition entre les graminées et les légumineuses en diminuant la croissance des premières (Scheublin et al. 2007). Par la suite, Wagg et al. ont mis en avant l'importance de l'identité du champignon dans cette modération de la compétition entre plantes (Wagg et al. 2011).

Du fait de retards importants dans le séquençage des échantillons, nous avons partiellement reçu les données de séquençage et il est impossible d'analyser les résultats dans ce manuscrit. Nous devrions être en mesure de présenter les analyses des données le jour de la soutenance

Deux questions seront alors traitées :

- Quel est effet du couvert végétal sur les communautés de CMA associées à la vigne ? à l'échelle européenne et dans notre essai en France ?
- Existe-t-il un effet saisonnier sur les communautés de CMA présentes dans les racines de vigne et de couvert ?

## **Chapitre 3 – Impact d’un couvert végétal sur l’activité biologique des sols viticoles**

### **I) Introduction**

De manière générale, la diminution rapide de la biodiversité observée depuis plusieurs décennies reste la principale menace sur la durabilité des écosystèmes (Butchart et al. 2010). Ces écosystèmes sont fortement dégradés à cause des pratiques agricoles intensives qui affectent fortement la qualité des sols et les processus biologiques (Lane et al. 2012; Haney et al. 2018). La qualité d’un sol est notamment définie comme la capacité d’un sol à développer des fonctions permettant de maintenir la productivité des cultures, de préserver les mécanismes biologiques et promouvoir la santé des plantes et des organismes (Doran and Parkin 2015).

Au sein d’un écosystème, cette biodiversité représente un réservoir de fonctions potentielles portées par les organismes présents, et ce notamment par les microorganismes telluriques (bactéries et champignons). Ces derniers participent à de nombreuses fonctions de l’écosystème, telles que le cycle des nutriments et la dégradation de la matière organique. Ainsi, certains microorganismes sécrètent des enzymes extracellulaires qui participent à la dégradation de la matière organique et à la libération de nutriments, qui seront ensuite disponibles pour les plantes et pour les autres microorganismes (Morrison et al. 1994; Burns et al. 2013). Ces activités enzymatiques microbiennes modulent indirectement la croissance et la nutrition des plantes ainsi que leur développement (Weidner et al. 2015; Jakobsen et al. 2015). Dans un sol, les activités enzymatiques microbiennes sont dynamiques et sont généralement utilisées comme des indicateurs de la qualité des sols pouvant affecter la productivité des cultures (Badiane et al. 2001; Balota et al. 2011).

Des pratiques agricoles alternatives, comme la réduction du labour, favorisent ces mécanismes biologiques (Mangalassery et al. 2015; Schofield et al. 2019). La mise en place d’un couvert d’interculture dans les cultures annuelles ou dans les inter-rangs pour la viticulture et l’arboriculture améliore l’activité biologique du sol en apportant de la matière organique. L’influence de la diversité végétale sur l’activité biologique du sol a ainsi été démontrée dans de nombreux écosystèmes (Rodríguez-Loinaz et al. 2008; Steinauer et al. 2015). Par exemple, les légumineuses permettent, via les nodules, d’incorporer de l’azote minéral dans les sols, ce qui augmente les activités enzymatiques liées au cycle de l’azote (Mbuthia et al. 2015).

Parmi les cycles biochimiques, ceux du carbone (C) et de l’azote (N) sont étroitement liés aux activités des organismes du sol (Buée et al. 2007). Les bactéries et les champignons sont les acteurs majeurs de ces mécanismes et participent aux différents cycles en produisant différentes enzymes. Par exemple, la  $\beta$ -glucosidase est une enzyme produite par les microorganismes qui catalyse la dégradation des composés carbonés et est sensible aux pratiques culturales ce qui en fait un marqueur de la qualité des sols (Knight and Dick 2004). Les enzymes microbiennes interviennent dans les cycles du soufre comme l’arylsulfatase

qui est produite par plusieurs genres bactériens et fongiques et permet la mobilisation des sulfates (Gahan and Schmalenberger 2014). Certaines sont plus largement étudiées comme les phosphatases puisqu'elles permettent la minéralisation du phosphore organique en phosphore inorganique essentiel pour le fonctionnement métabolique des plantes (Nannipieri et al. 2011). Cependant il est difficile de distinguer dans le sol rhizosphérique, les enzymes produites par les microorganismes de celles produites par les plantes comme pour les phosphatases. Ces mesures d'activités enzymatiques correspondent à une activité globale du sol.

## II) Description de l'essai

Ici, des activités enzymatiques ont été mesurées sur des échantillons de sol provenant de la parcelle d'essai présentée dans le chapitre 2. Cette parcelle a été semée avec huit mélanges de plantes de couvert et une condition de travail du sol (désherbage mécanique) (**Tableau 7**). Pour étudier le fonctionnement biologique des sols, nous avons prélevé trois échantillons de sol (0-20cm) par condition au niveau des inter-rangs. Un suivi chronologique a été également réalisé aux mêmes dates que les analyses de diversité. Une fois au laboratoire, les sols (environ 200g) ont été tamisés à 4 mm pour éliminer les racines et les cailloux. Ces échantillons ont ensuite été maintenus à 4°C jusqu'à la mesure de dix activités enzymatiques :

- N-acetylglucosaminidase (NAG), hydrolyse les polymères de chitine (Kang et al. 2005)
- $\beta$ -glucosidase (GLU), hydrolyse les polymères de cellulose (Floch et al. 2011)
- Leucine aminopeptidase (LAP), activité protéolytique qui relargue spécifiquement la leucine (Chen et al. 2018)
- Phosphatase acide (PAC), hydrolyse les esters de l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ) ; activité majoritaire dans des sols acides (Nannipieri et al. 2011)
- Phosphatase alcaline (PAL), hydrolyse les esters de l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ), activité majoritaire dans des sols neutres et alcalins (Nannipieri et al. 2011)
- Xylosidase (XYL), hydrolyse l'hémicellulose et relargue des sucres (xylose) (DeForest 2009)
- Arylsulfatase (ARS), hydrolyse les composés organiques soufrés (ester de sulfates) et libère des ions sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) (Salazar et al. 2011)
- Protéases (PRO), activité protéolytique non-spécifique (Chen et al. 2018)
- Uréase (URE), hydrolyse l'urée et forme des ions ammonium ( $NH_4^+$ ) (Tabatabai and Bremner 1972)
- Arylamidase (ARL), hydrolyse les extrémités N-terminale des acides aminés (Acosta-Martinez and Tabatabai 2000; Floch et al. 2011)

Les analyses enzymatiques ont été menées par Séverine Piutti du Laboratoire Agronomie et Environnement (LAE) (UMR 1121, INRAE, Université de Lorraine).

### III) Résultats

Les pratiques agricoles comme le labour ou les traitements phytosanitaires, diminuent sur l'abondance des microorganismes du sol mais également sur leurs activités. Au contraire, la présence d'un couvert végétal participe à améliorer la croissance des communautés microbiennes. Dans notre essai, nous avons comparé l'effet de huit couverts végétaux sur les activités enzymatiques du sol. L'analyse des données montre tout d'abord une variabilité saisonnière des activités enzymatiques (**Figure 26**). On observe une diminution de l'activité phosphatase alcaline en hiver (**Figure 26**) et une augmentation de l'activité phosphatase acide sur cette même période (**Figure 26**). On peut alors supposer un effet des températures et de l'humidité sur la production des enzymes et leur activité. De plus, on observe une augmentation de l'activité uréase à partir de T3 (**Figure 26**). Les mêmes observations sont faites pour la N-acétylglucosaminidase (**Figure 26**), la  $\beta$ -glucosidase (**Figure 26**), la xylosidase (**Figure 26**) et les protéases (**Figure 26**). Ces augmentations sont liées à la destruction du couvert qui est intervenus plusieurs jours avant les prélèvements.

Enfin, la mesure des activités phosphatases du sol montre qu'elles ne sont pas actives dans les mêmes périodes : plutôt printemps-été (T0/T1/T4) pour la phosphatase alcaline et plutôt en automne-hiver pour la phosphatase acide (T2/T3) (**Figure 26**).

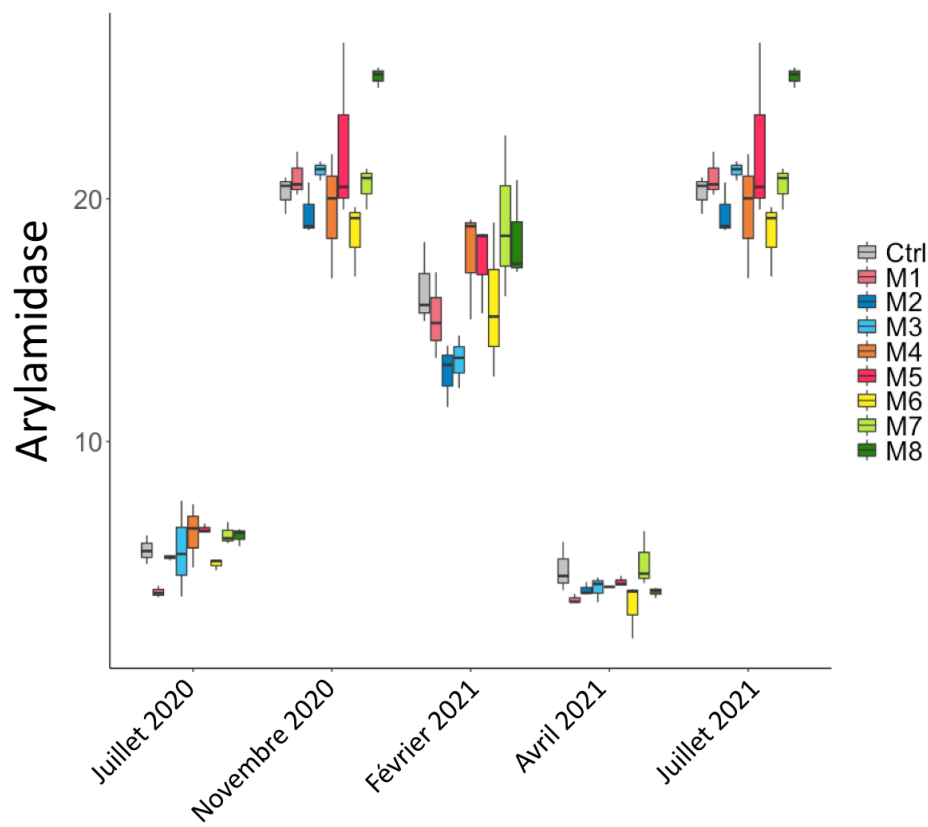
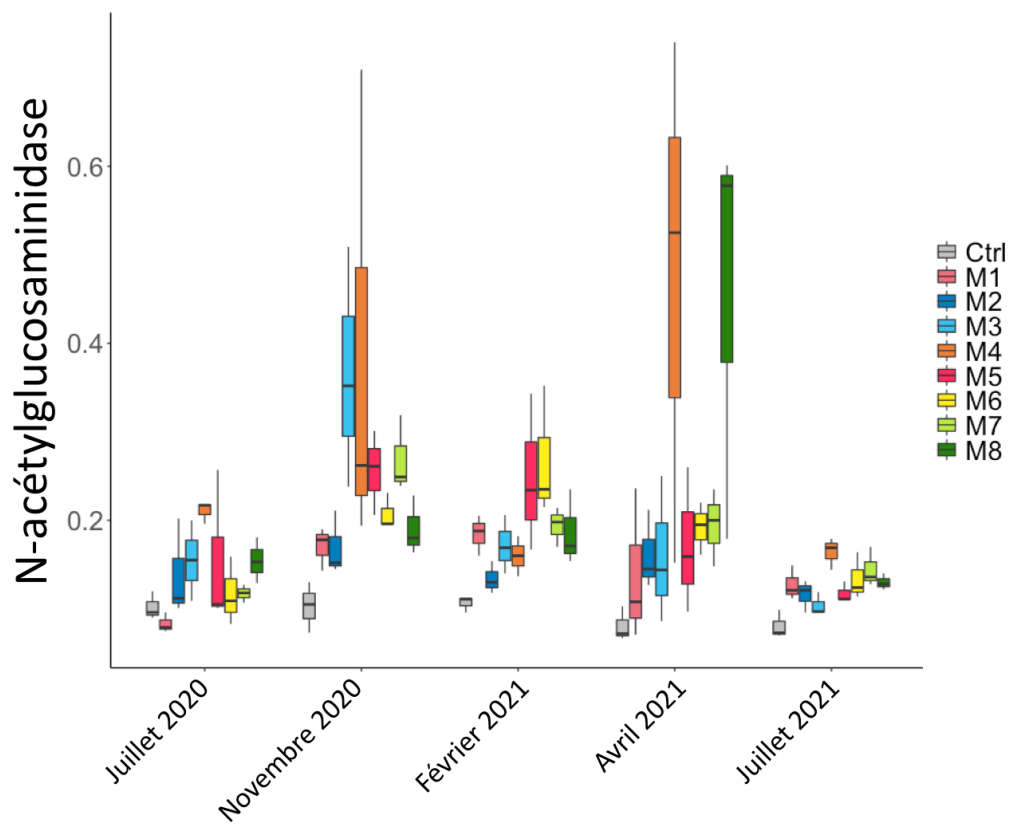


Figure 26 : Mesures des activités enzymatiques en fonction du temps et des mélanges végétaux semés.

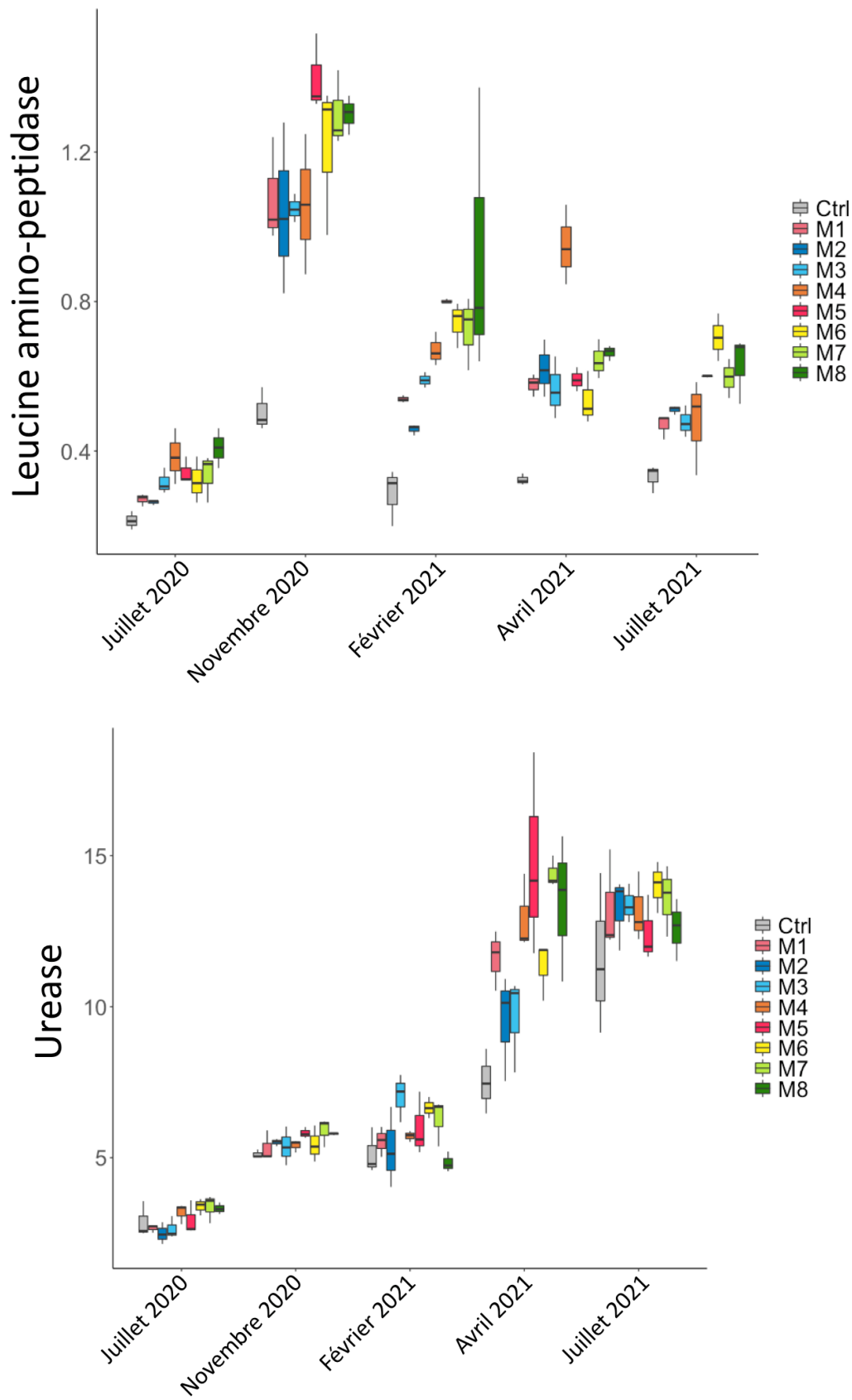


Figure 26 (suite) : Mesures des activités enzymatiques en fonction du temps et des mélanges végétaux semés.

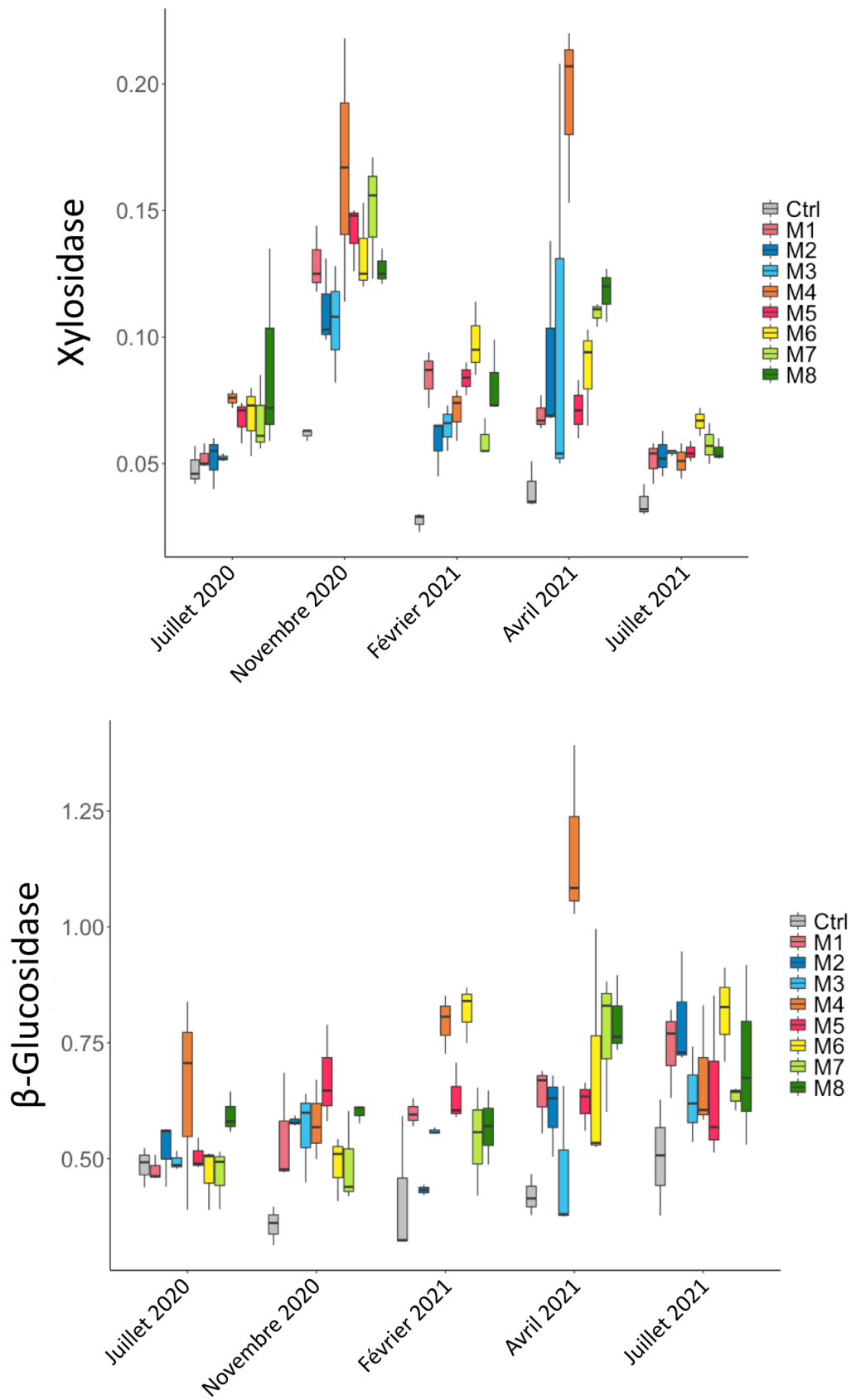


Figure 26 (suite) : Mesures des activités enzymatiques en fonction du temps et des mélanges végétaux semés.

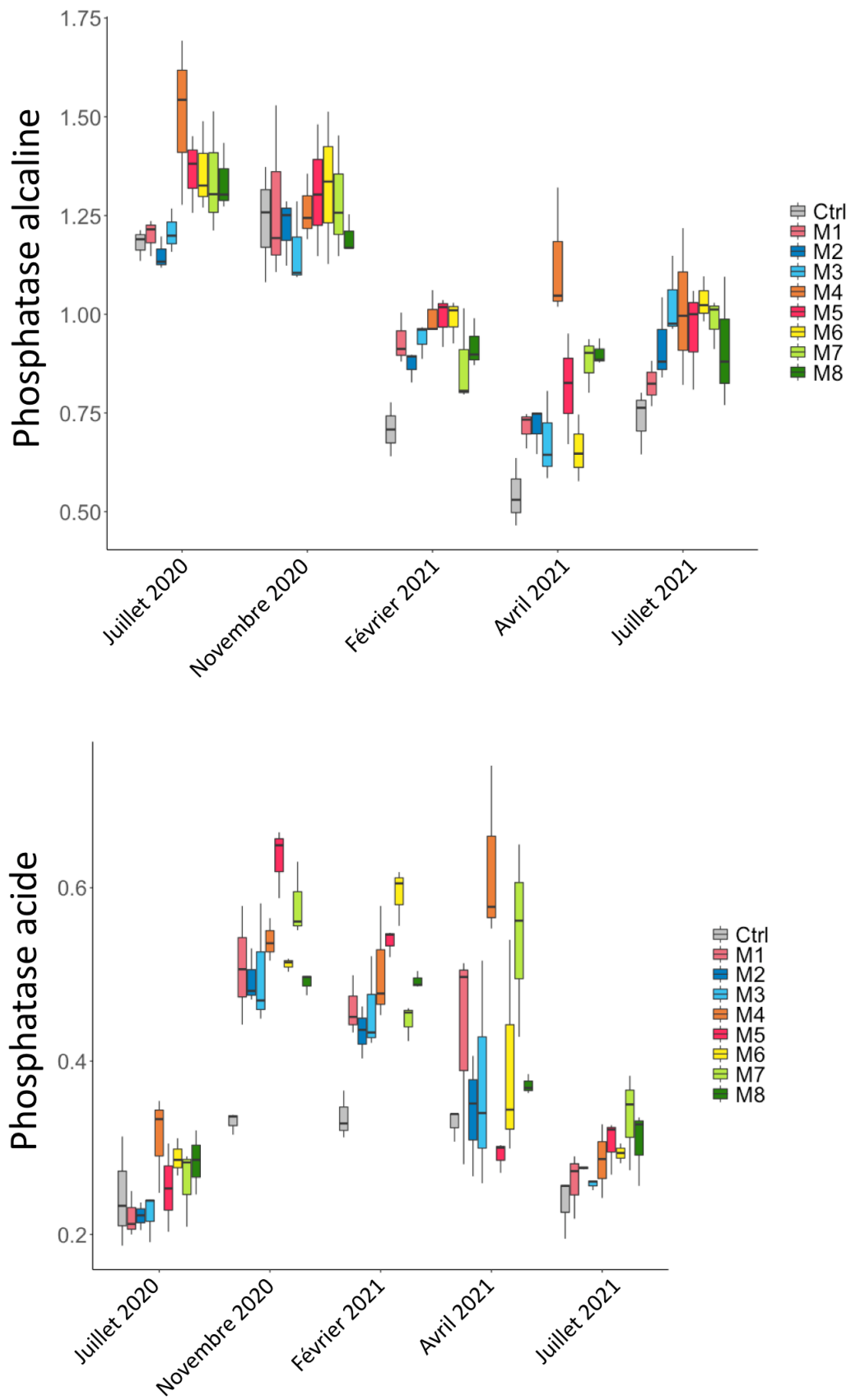


Figure 26 (suite) : Mesures des activités enzymatiques en fonction du temps et des mélanges végétaux semés.



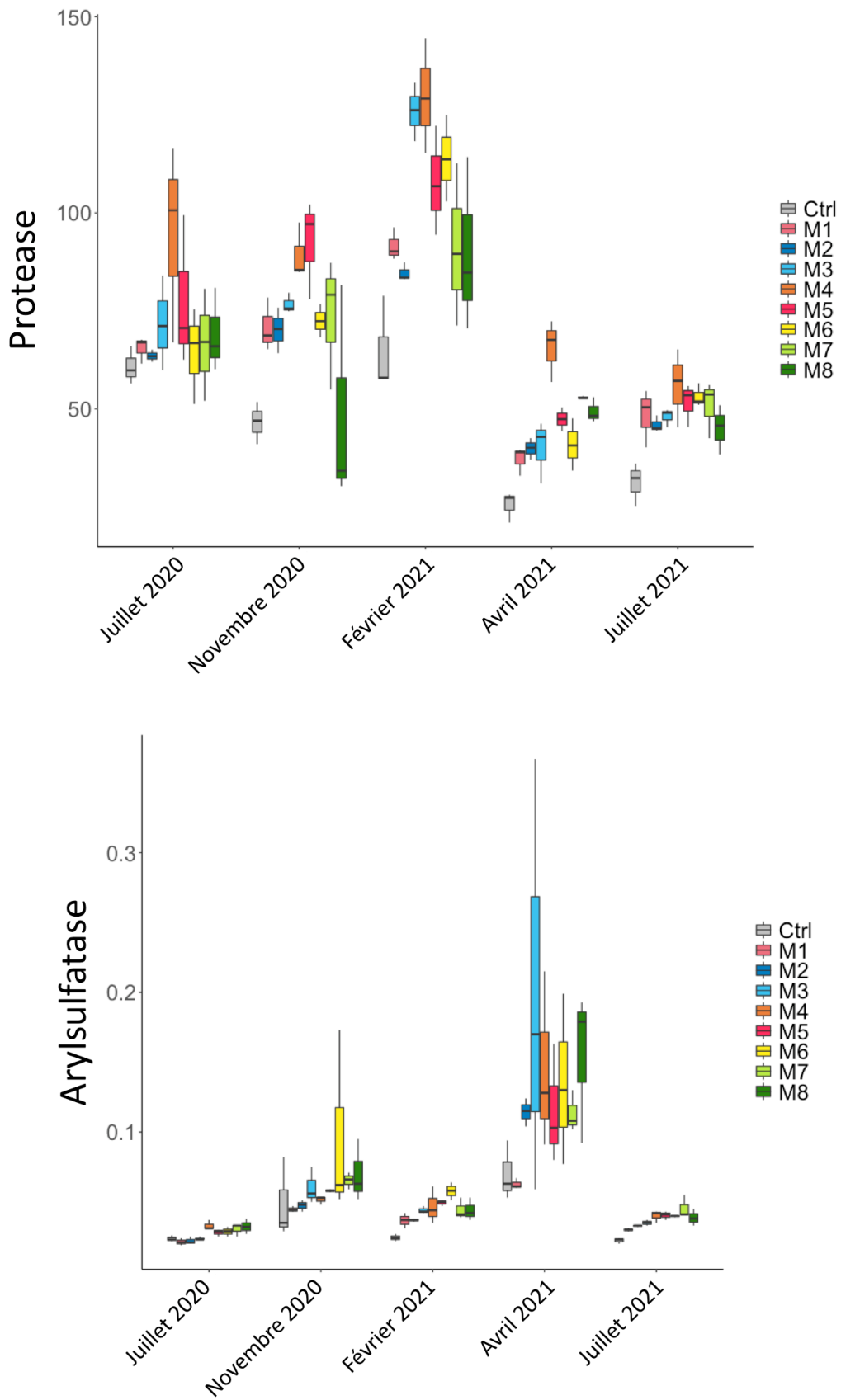
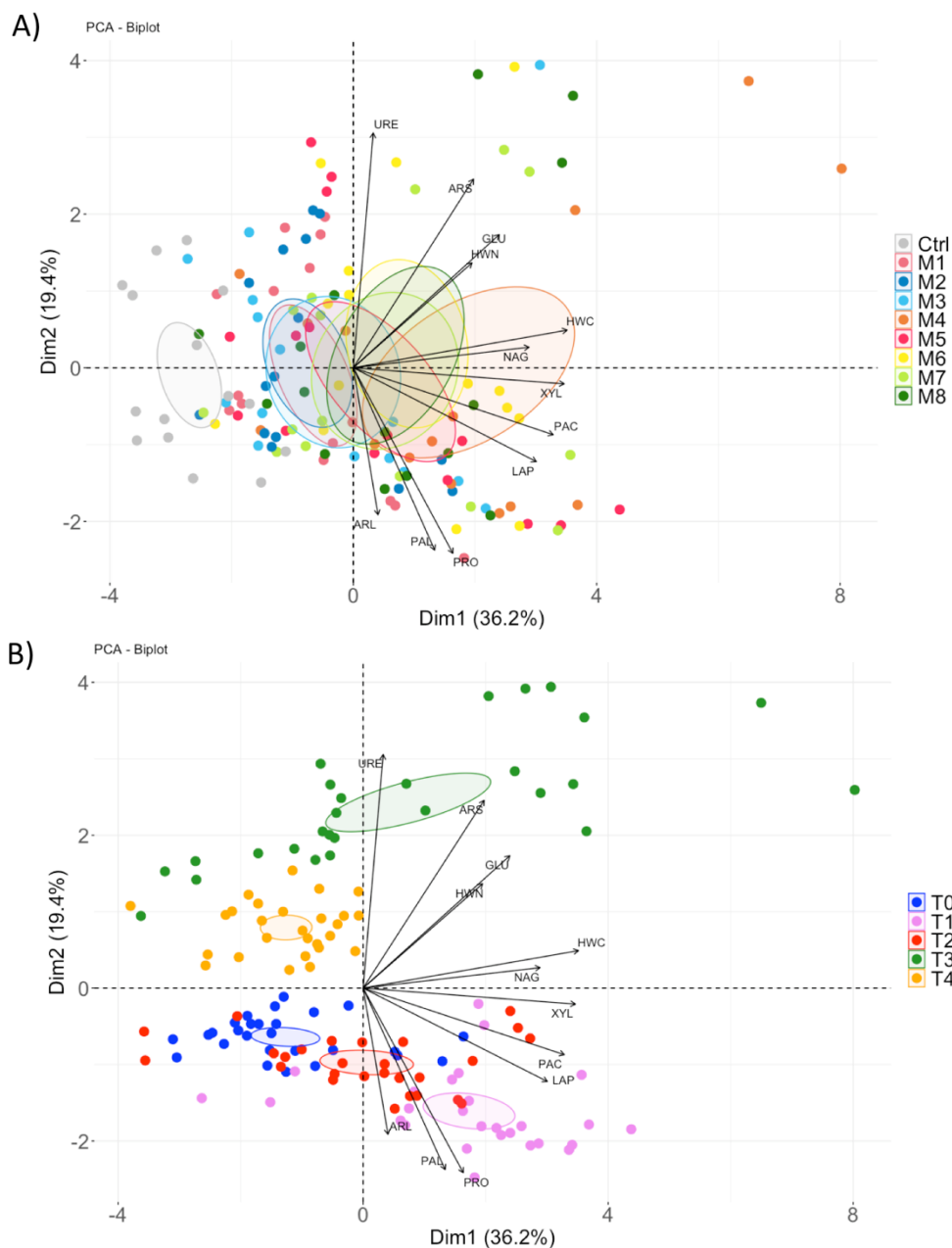


Figure 26 (suite) : Mesures des activités enzymatiques en fonction du temps et des mélanges végétaux semés.

L'analyse multivariée réalisée à partir des activités enzymatiques mesurées dans le sol montre un effet net de la couverture végétale sur l'activité biologique des sols viticoles (**Tableau 13**). Les huit conditions de couvert sont séparées de la condition contrôle « Ctrl » avec un travail du sol (**Figure 27A**). Pour l'ensemble des activités enzymatiques, la présence d'un couvert végétal quel qu'il soit puis de sa destruction augmente nettement les activités biologiques. De plus, ces activités varient de manière significative au cours de la saison d'essai (**Tableau 13**). Deux groupes de dates d'échantillonnage peuvent être distingués : les points T0/T1/T2 et T3/T4 (**Figure 27B**).



**Figure 27** : Analyse en composante principale (ACP) de la variation des activités enzymatiques en fonction **A)** des mélanges de couvert et **B)** de la date de prélèvement.

**Tableau 13** : Analyse de variance (ANOVA) à partir des mesures des activités enzymatiques sur le sol dans les différentes conditions de couverture végétale. ns: non significatif ; les symboles \*, \*\*, \*\*\* indiquent les niveaux de significativité suivants : 0,05 ; 0,01 ; 0,001.

	GLU	XYL	NAG	LAP	URE	ARS	PAC	PAL	PRO	ARL	HWC	HWN	HUM
Couverture végétal (CV)	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***
Saison (S)	ns	ns	ns	*	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	*	**
CV x S	***	***	**	***	***	ns	***	**	**	***	***	***	**

#### IV) Discussion et conclusion

L'agriculture de conservation vise à promouvoir les services écosystémiques rendus par les organismes tel que les microorganismes du sol et à dynamiser le fonctionnement des écosystèmes (Hobbs et al. 2008). Les microbes du sol jouent un rôle central dans les écosystèmes terrestres et sont reconnus comme des acteurs majeurs de la formation des communautés végétales et dans le fonctionnement des écosystèmes (van der Heijden et al. 2008). En effet, les microorganismes produisent en permanence des enzymes qui sont relâchées dans le sol. Ces enzymes participent aux réactions chimiques importantes du sol et jouent un rôle majeur dans les processus biologiques comme par exemple la stabilisation des sols et la séquestration du carbone, ou encore la décomposition de la matière organique (Makoi and Ndakidemi 2008). Les activités enzymatiques produites par les bactéries ou les champignons sont variables en fonction des conditions pédoclimatiques et des pratiques culturales ce qui en fait des marqueurs communs du fonctionnement et de la qualité des sols (Mendes et al. 1999).

Les données correspondant aux mesures des activités enzymatiques de notre essai ont été reçues récemment. Cependant, les premières analyses nous montrent que la mise en place d'un couvert végétal permet dans toutes les conditions d'augmenter les activités enzymatiques du sol, confirmant les données de la bibliographie (Mendes et al. 1999; Hamido and Kpombrekou-A 2009; Chavarría et al. 2016; Thapa et al. 2017). Pour toutes les enzymes, les activités mesurées sont plus élevées dans les conditions de couvert par rapport à la condition contrôle avec désherbage mécanique. De plus, cette augmentation de l'activité du sol résulte probablement une disponibilité en nutriments plus importante pour les plantes et pour la vigne. Le pic de biomasse apportée par le couvert est rapidement utilisé et minéralisé par les enzymes impliquées dans les cycles du carbone et de l'azote. Les activités phosphatases du sol sont aussi fortement régulées par le pH du sol, les différences temporelles observées dans notre essai montre un changement de pH au cours de la saison (Nannipieri et al. 2011; Han et al. 2021).

D'autres analyses devront être menées afin d'évaluer le lien entre les activités enzymatiques et la diversité des CMA. Plusieurs hypothèses suggèrent que les CMA produise et participe au cycle des nutriments et non pas uniquement au recyclage et au transport des nutriments du sol vers la plante. Les CMA pourraient avoir

un meilleur accès aux sources de nutriments comme l'azote et le phosphore grâce à l'interaction les communautés bactériennes du sol actives dans la dégradation de la matière organique (Read et Perez-Moreno 2003). En effet, même si aucune enzyme extracellulaire n'a été mise en évidence chez les CMA, il a pu être montré une corrélation entre les activités leucine-aminopeptidase et uréase et la présence de CMA (Burke et al. 2011). Les analyses futures s'attacheront à confirmer ces hypothèses.

Enfin, les activités enzymatiques sont aussi impactées par d'autres facteurs. La fertilisation azotée appliquée par les agriculteurs affecte négativement les activités de minéralisation de l'azote (Yanling et al. 2018). Un effet « saison » a plusieurs fois été démontré (Nautiyal et al. 2010; Nannipieri et al. 2011; Mangalassery et al. 2015). Les conditions estivales et la diminution de l'humidité du sol est responsable d'une baisse du niveau et de l'efficacité de certaines activités enzymatiques. La hausse des températures et la sécheresse sont notamment des facteurs importants de réduction des activités enzymatiques mais aussi de la biomasse microbienne (Sardans and Peñuelas 2005; Sardans et al. 2008; Sierra 2012). Toutefois, il est important de noter que la présence des plantes permet de maintenir une humidité plus importante par rapport à un sol nu et donc de maintenir une meilleure activité du sol (Yates et al. 2008).

En conclusion, la présence d'une diversité végétale participe à augmenter la diversité des microorganismes et les activités enzymatiques. Les couverts végétaux apparaissent donc comme un outil pour augmenter le fonctionnement des agroécosystèmes et les services écosystémiques rendus par les microorganismes (Finney et al. 2017; Isbell et al. 2017; Reiss and Drinkwater 2022). Cependant, le lien entre diversité taxonomique des microorganismes et diversité fonctionnelle du sol est encore peu étayé. Les connaissances restent limitées sur les organismes, bactériens ou fongiques, et les gènes impliqués dans ces mécanismes et d'avantage d'études seront nécessaires de manière à lever ces verrous et mieux comprendre les organismes mis en jeu et les mécanismes biologiques associés.

## **Chapitre 4 – Le vieillissement des vignes influence-t-il les communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules des vignobles : Étude de cas d’un parcellaire champenois**

*Ce chapitre a fait l’objet d’un article de recherche sous le format d’une communication courte intitulée « Does the ageing vineyards (from 8 to 107 years) alter communities of arbuscular mycorrhizal fungi ? ». Cet article co-écrit avec Céline Durney a été soumis dans la revue *Mycorrhiza* (Durney et al. 2022)*

La vigne est une plante pérenne qui, comme les arbres fruitiers, persiste dans son environnement grâce à des réserves nutritives accumulées pendant la saison (ex. survie hivernale). Ces réserves sont ensuite remobilisées à la sortie de l’hiver pour que la vigne redémarre sa croissance. Un pied de vigne peut donc être cultivé pendant plusieurs décennies et on observe un démarrage de la production de raisin entre trois et cinq ans après la plantation. Cette culture peut alors s’étendre sur plusieurs décennies et se poursuivre pendant 25 à 30 ans. Des spécificités peuvent toutefois apparaître dans les régions viticoles où les viticulteurs conservent des parcelles pendant plus de 40 ans et former une nouvelle appellation dites « vieilles vignes ». Toutefois, ce type de production reste peu répandue.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) sont des organismes clés dans les écosystèmes viticoles car ils fournissent de nombreux services écosystémiques à la fois au sol et aux plantes. La notion de persistance et de dynamique des communautés de CMA dans l’environnement a longtemps fait face à la difficulté de quantifier la présence des CMA dans le sol mais également dans les racines des plantes. Toutefois, plusieurs études tentent de comprendre comment les changements saisonniers influencent les communautés de CMA. La majorité de ces études concerne des plantes annuelles (Lutgen et al. 2003; Mandyam and Jumpponen 2008) et mettent en avant de nombreux facteurs influençant les communautés de CMA comme les pratiques agricoles. L’ensemble des pratiques culturales tel que le labour profond et régulier, ou encore l’utilisation de fongicides et d’herbicides modifie de manière directe et indirect les communautés de CMA (Brito et al. 2012; Zaller et al. 2018). Les conditions pédoclimatiques de l’écosystème étudié sont également des facteurs déterminants pour le développement des communautés de CMA. Cependant, les informations concernant la dynamique des communautés de CMA à travers le temps sont relativement limitées et se concentrent sur des échelles de temps courtes, inférieures à 15 ans. Tandis que l’influence des facteurs pédoclimatiques et agricoles, sur la dynamique des communautés microbiennes, sont régulièrement rapportées dans la littérature, le rôle de la physiologie des plantes sur ces communautés est peu discuté. Dans cet article, nous avons analysé la diversité des CMA dans trois vignobles aux paramètres pédologiques identiques, géographiquement proches, mais dont la date de plantation diffère (8, 33 et 107 ans). Les analyses de diversité ont révélé une différence dans la communauté de CMA présente dans le sol et en association avec les racines de la vigne. Nous avons également pu mettre en évidence un effet de l’âge

de la plante sur la communauté des CMA associés aux racines de la vigne. Plus précisément, nous avons observé une disparition de certaines espèces de CMA au cours du vieillissement de la vigne, ce qui implique une réduction de la diversité des CMA. Plusieurs hypothèses ont été établis autour de la physiologie de la vigne et des plantes en général. Une baisse de l'efficacité de la photosynthèse est notamment

Tous les éléments, détaillés dans l'article, suggèrent l'importance dans les futures recherches de mieux comprendre les fonctions des CMA et les différentes stratégies de symbiose en fonction des plantes et des conditions environnementales. La dynamique à court ou long terme des communautés microbiennes pourrait être le résultat d'une stratégie d'adaptation aux changements environnementaux et aux pratiques agricoles.

[Click here to view linked References](#)

1 **Does the ageing vineyards (from 8 to 107 years) alter communities of arbuscular mycorrhizal fungi?**

2  
3 Célien Durney<sup>1,\*</sup>, Pierre-Antoine Noceto<sup>1,\*</sup>, Diederik van Tuinen<sup>1</sup>, Julie de Sousa<sup>2</sup>, Daniel Wipf<sup>1</sup>, Pierre-Emmanuel  
4 Courty<sup>1</sup>

5 <sup>1</sup> Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon,  
6 France

7 <sup>2</sup> Champagne de Sousa, F-51190 Avize, France

8 \* Both authors contributed equally to the work

9  
10 **Corresponding Author:** Pierre-Emmanuel Courty; Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne, Univ.  
11 Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; Tel: + 33 3 80 69 33 55; Fax: + 03 80 69 37 44.

12  
13 **E-mail addresses of authors:** Pierre-Emmanuel Courty (pierre-emmanuel.courty@inrae.fr), Célien Durney  
14 (celien.durney@inrae.fr), Pierre-Antoine Noceto (pierreantoine.noceto@inrae.fr), Diederik van Tuinen  
15 (diederik.van-tuinen@inrae.fr), Daniel Wipf (daniel.wipf@inrae.fr), Julie de Sousa (desousa.julie@gmail.com).

16  
17 **Abstract:**

18 Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are key organisms in viticultural ecosystems as they provide numerous  
19 ecosystem services to both soil and plants. Information about AMF community dynamics over time are relatively  
20 limited and focused on short time scales. Many factors such as soil, climate and agricultural practices could have  
21 strong effects on microbial community dynamics, whereas the role of evolution of plant physiology is little  
22 discussed. We analysed the diversity of AMF in three vineyards with identical soil parameters, geographically  
23 close, but of different ages (8, 33 and 107 years). Diversity analyses revealed a difference in AMF community  
24 between soil and grapevine roots, and highlighted an effect of plant age on AMF community associated to  
25 grapevine roots. More precisely, we observed a disappearance of certain AMF strains during grapevine ageing,  
26 meaning a reduction of AMF diversity. It suggests the importance in future projects to take care of the functions  
27 and differences between AMF species strategy. Microbial community short- or long-term dynamics could be the  
28 result of adaptive strategy to environmental changes and agricultural practices.

29  
30 **Keywords:** old and young vineyards, arbuscular mycorrhizal fungi, mycorrhizal communities, plant ageing

31  
32 **Statement & Declarations:**

33 **Competing Interests:** Authors declare no conflict of interest

34 **Authors Orcid numbers:**

35 Durney C.: 0000-0001-7880-4023

36 Noceto PA.: 0000-0002-7347-5336

37 van Tuinen D.: 0000-0002-1723-3164

38 de Sousa J.: no Orcid number

39 Wipf D.: 0000-0001-7197-5612

40 Courty PE.: 0000-0003-2789-7818

41

42 **Acknowledgements:**

43 This research was financially supported by H2020 ERA-net project, CORE Organic Cofund and cofunds from the

44 European Commission (BIOVINE project) and the Bourgogne Franche-Comté Regional Council (France).

45

46



## 47 **Introduction**

48 Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is a plant cultivated by human for thousands of years. Since the phylloxera  
49 epidemic of the 19th century, almost all cultivated grapevines have been grafted, consisting of the association of  
50 a scion (*i.e.* the traditional cultivated grape variety) and a rootstock (*i.e.* a phylloxera-resistant grapevine). These  
51 rootstocks are generally chosen according to soil and climate conditions (Ollat et al. 2016). Despite the grafting  
52 step, grapevine remains a crop subject to many environmental stresses, both biotic (*e.g.* insect pests (Reineke and  
53 Thiéry 2016), fungal pathogens (Gessler et al. 2011) or viruses (Meng 2017), and abiotic (Duchêne et al. 2010;  
54 Bernardo et al. 2018). Several viticultural practices (*e.g.* deep and regular tillage, application of insecticides,  
55 fungicides and pesticides) impact the functioning of vineyard ecosystem including in particular soil microbial  
56 communities (Köhl et al. 2014; Palomo-Campesino et al. 2018; Tamburini et al. 2020). These communities  
57 influence both the grapevine and associated microbes (Gilbert et al. 2014; Bettenfeld et al. 2021), and characterize  
58 the microbiological “terroir” (Bokulich et al. 2014). In soils, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), belonging to  
59 the subphylum *Glomeromycota* (Tedersoo et al. 2018), form a mutualistic symbiosis, the arbuscular mycorrhiza  
60 (AM), with about 80% of land plants. AMF provide a multitude of ecosystem services, including tolerance to  
61 various environmental stresses and nutritional benefits related to plant growth (Gianinazzi et al. 2010) and crop  
62 quality traits (*e.g.* nutritional value, organoleptic properties and secondary metabolism) (Noceto et al. 2021). In  
63 AM symbiosis, AMF transfer mineral nutrients and water from the soil to the host plant, in exchange for carbon  
64 compounds provided by the host (Garcia et al. 2016; Wipf et al. 2019). In vineyards, AM symbiosis represents an  
65 agronomical support (Trouvelot et al. 2015), especially in the development of new viticultural practices regarding  
66 climate change and grapevine decline, and to ensure environmental sustainability (Bettenfeld et al. 2020, 2021).

67 Grapevine is a perennial crop grown for several decades. In some wine-producing regions, vineyards are  
68 sometimes cultivated and harvested beyond 30 or even 50 years. Wines produced from these vineyards, usually  
69 referred to as “old vines”, develop different flavours and aromas (Reynolds et al. 2007; Du et al. 2012). The  
70 putative role of the microbiota associated to grapevine in these modifications of quality traits needs to be explored.  
71 Moreover, current knowledge on microbial communities and their dynamics over time is relatively limited but  
72 tends to grow, particularly on AMF communities. Multiple environmental factors influence intra-annual variation  
73 of AMF communities, including temperature (Davison et al. 2021), soil type and pH (Coughlan et al. 2000; Oehl  
74 et al. 2010), and rainfall (Cuenca and Lovera 2010; Zhang et al. 2017). Regarding inter-annual variation of AMF  
75 communities, agricultural practices as tillage (Jansa et al. 2002; Säle et al. 2015), and the use of chemical fertilizers  
76 (Williams et al. 2017; Liu et al. 2020) and biocides (Gosling et al. 2006), but also cultural systems (Noelia Cofré  
77 et al. 2017; Higo et al. 2019; Dietrich et al. 2020) exert selective pressure on AMF communities (Berruti et al.  
78 2014). Thus, some studies have highlighted a shift in AMF communities, either in soils or associated with roots,  
79 as the presence of some phylotypes could be associated to vineyard age (Schreiner and Mihara 2009). Similar  
80 shifts were observed in plantation of *Panax ginseng* (Kil et al. 2014), *Artocarpus altilis* (Hart et al. 2014) and  
81 *Hevea brasiliensis* (Herrmann et al. 2016). Interestingly, changes in diversity over time have also been observed  
82 for ectomycorrhizal fungi associated with forest tree roots in boreal and temperate forest ecosystems (Twieg et al.  
83 2007; Courty et al. 2008).

84 AMF are key microorganisms in terrestrial ecosystems, but to our knowledge, studies of AMF diversity  
85 dynamic over time are limited. In this study, we investigated the potential effect of grapevine ageing on AMF  
86 communities associated to roots and present in soil of vineyards. The fact that the three plots are geographically

87 close (less than 800 metres between the two most distant plots) and therefore have identical pedo-climatic  
88 conditions, and the use of identical viticultural practices strongly limit the effects of environmental variation on  
89 AMF communities.

90

## 91 **Material and methods**

### 92 *Experimental site*

93 We analysed the AMF communities associated with roots or present in the soil as reservoir from three  
94 neighbouring plots in the Champagne Region: young grapevines (YG; planted in 2011), intermediate grapevines  
95 (IG; planted in 1986) and old grapevines (OG; planted in 1912). The three vineyards, belonging to the same owner  
96 (Champagne de Sousa), have similar pedoclimatic conditions (analysis performed by CESAR laboratory,  
97 Ceyzeriat, **Table S1**), were planted with the same grapevine association (rootstock: "41B Millardet et de Grasset;  
98 scion: "Chardonnay Blanc") and subjected to the same agricultural system. The forest floor is flat, with scarce  
99 weed plants (*Stellaria media* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Mercurialis annua* L., *Convolvulus arvensis* L.,  
100 *Solanum nigrum* L.). The maximum distance between two plots is 500 m. The winemaker used organic techniques.  
101 Moreover, as the repeated use of heavy machinery causes soil compaction and disruption of the mycorrhizal  
102 network (Jansa et al. 2002; Rydberg and Jansén 2002; Brito et al. 2012; García-Tomillo et al. 2017), the winemaker  
103 used animal traction for light mechanical work (horse-drawn tillage between grapevines rows) that can limit the  
104 negative effects on AMF community previously mentioned. Over the years, if a grapevine plant died, it was never  
105 replaced, thus excluding the possible addition of new microbes through a root system in more recent times.

106

### 107 *Sampling, DNA extraction and amplification*

108 Thirty grapevine root samples (n=10 per plot) and nine soil samples (n=3 per plot) were collected from  
109 the three plots at ripening stage, in July 2019. Each root sample was carefully cleaned with tap water to remove  
110 soil particles and then sorted to keep only the finest and youngest roots (about 200 mg fresh weight). Total DNA  
111 was extracted from roots following the in-house procedure (Drain et al. 2019) and from soil using Fast DNA kit  
112 spin for soil (MPBio®). To assess AMF diversity, we performed a nested PCR. The first primer pair LR1-NDL22  
113 was used in the first PCR reaction that targets the D2 variable region of the large ribosomal subunit (LSU) of all  
114 eukaryotes (van Tuinen et al. 1998). The second PCR reaction was performed using the FLR3-FLR4 primer pair  
115 (Pivato et al. 2007) with appropriate Illumina Miseq adaptors.

116

### 117 *Diversity analyses*

118 Once amplicons sequencing performed (Illumina Miseq, Center for Genome Research and Biocomputing,  
119 Oregon state, USA), sequences were sorted and clustered forming OTU (Operational Taxonomic Unit) using the  
120 FROGS pipeline available at Galaxy server (Escudie et al. 2018). The clustering step was performed with an  
121 aggregation distance of five and an abundance threshold of  $5 \cdot 10^{-4}$ . Next, taxonomic identification of each OTU  
122 was performed using the laboratory's internal database build from NCBI and Maarjam databases (Öpik et al. 2010).  
123 When specie level identification was impossible, they were named "sp.". Different analyses were performed on R  
124 software (R Core Team 2021) with vegan and ggplot2 packages (Oksanen 2013; Wickham 2009).

125

## 126 **Results and discussion**

127 In total, we identified 88 OTUs, grouped in 12 species (*Claroideoglosum sp.*, *Dominikia aurea*,  
128 *Dominikia iranica*, *Funneliformis caledonius*, *F. coronatum*, *F. mosseae*, *Glomus sp.*, *Rhizophagus irregularis*,  
129 *Rhizophagus sp.*, *Sclerocystis sinuosa*, *Septoglosum viscosum* and *Septoglosum sp.*) (**Fig. 1**).

130 The AMF soil reservoir was identical among the three plots and was composed of all the 12 species  
131 mentioned above. However, we observed a change in the AMF diversity patterns between soils and grapevine  
132 roots (**Fig. 1A**). In soil samples, the majority of sequences are belonging to the genus *Funneliformis* whereas it  
133 represents less than 0.5% in roots of young (YG) and intermediate grapevine (IG), and is absent in old grapevine  
134 (OG) roots (**Fig. 1A**). Apart from the presence of latent spores or hyphae in soil, this observation may be related  
135 to functional aspects of AMF species. Compared to *R. intraradices*, newly named *R. irregularis*, *F. mosseae* seems  
136 to have the same colonization rate (Hart and Reader 2002). However, it has been shown that *R. irregularis* delivers  
137 more nutrients (*i.e.* phosphorus) than *F. mosseae* (Walder et al. 2012, 2015), whereas *F. mosseae* seems to provide  
138 more protection against biotic stresses (Mustafa et al. 2016). We can hypothesize that, in these vineyards, *F.*  
139 *mosseae* is less competitive for symbiosis establishment than other AMF species, thus interacting rarely with  
140 grapevine without being able to maintain its interaction over time. Furthermore, the presence of *F. mosseae* in the  
141 soil could be the result of abundant fungal structure due to a privileged interaction with spontaneous annual plants  
142 in vineyards. Indeed, plant species can differently host AMF community and is strongly dependent on plot history  
143 (Horn et al. 2017; Hontoria et al. 2019).

144 Among the 12 species identified in the soil, only seven were found in grapevine roots compare to soil  
145 samples. Also, grapevine roots were colonised differently by AMF species depending on the age of grapevine  
146 plants. Four species (*Glomus sp.*, *R. irregularis*, *Rhizophagus sp.* and *S. sinuosa*) were detected in grapevine roots  
147 of the three plots, whereas three (*F. mosseae*, *Claroideoglosum sp.* and *S. viscosum*) were only found in grapevine  
148 roots of YG and IG (**Fig. 1B**). It is interesting to note that among these three species, *S. viscosum*, absent from  
149 OG, is already less abundant in the IG roots (**Fig. 1B**). Moreover, for the four species present in all vineyards,  
150 differences can be observed. The relative abundance of *Glomus sp.* (>5%), *R. irregularis* (25.4%) and *Rhizophagus*  
151 *sp.* (>5%) increased over the years, whereas *S. sinuosa* abundance is already high in YG (~59%), and is still the  
152 majority in IG (~43%) and OG (~65%) (**Fig. 1B**). In order to identify the dissimilarities between root samples, a  
153 Bray-Curtis dissimilarity matrix was constructed from all detected OTUs. The NMDS plot of this Bray Curtis  
154 matrix and its statistical analysis (Anosim) both highlight an "age effect" (**Fig. 2**). From the plant side, age is an  
155 important parameter that affects development, physiology and metabolism (Thomas 2002; Wells and Eissenstat  
156 2002). Like all perennial plants, grapevine show strong modifications of plant physiology and a decrease in vigour  
157 over long cultivating periods (Considine 2004; Grigg et al. 2018). Depending on the plant material and  
158 environmental variables, this generally results in both a reduction of the biomass produced during the season and  
159 yields, as it was true for our three studied plots. Indeed, de Sousa winemaker noted a yield of 10950, 12000 and  
160 6671 kg/ha for YG, IG and OG respectively. This point is physiologically linked to a decrease in the efficiency of  
161 photosynthesis rate over time (Düring 1994; Bond 2000), which leads to a decrease in the production of carbon  
162 compounds by the plant and thus potentially to a reduction of carbon partitioning between source and sink organs.  
163 Whereas, the roots' mycorrhization status enhances the strength of the sink organ, but the plant may limit its carbon  
164 supply in the trade-off with AMF (García-Rodríguez et al. 2007; Lekberg et al. 2013).

165  
166

167 **Conclusion**

168 AMF diversity analysis performed on soil and grapevine roots of three geographically close plots with  
169 identical viticultural practices and reduce tillage for several years, but with grapevine planted 107, 33 and 8 years  
170 ago respectively, highlighted a clear “plant age effect” on AMF communities associated with grapevine roots but  
171 not in soil. These results also point the importance of long-term changes in plant physiology on AMF communities  
172 present in roots. Even though AMF is described as non-specific symbiont, the differences observed between root  
173 and soil samples can be explained the presence of latent AMF structures or a natural cover plants that could  
174 maintain a greater diversity compared to a grapevine monoculture. These fine changes in AMF diversity may  
175 reflect different functional aspect of AMF species. Nowadays, there is a significant literature gap which limits the  
176 understanding of long-term AM symbiosis dynamics and community structuring. It will therefore be interesting in  
177 future projects to study the functions and differences between AMF species strategy. Microbial community short-  
178 or long-term dynamics could be the result of adaptive strategy to environmental changes and agricultural practices.  
179 Further research on agroecological practices, including increased plant diversity, should be explored given the  
180 strong relationship between plant and microbial communities.

181

182 **References:**

- 183 Bernardo S, Dinis L-T, Machado N, Moutinho-Pereira J (2018) Grapevine abiotic stress assessment and search for  
184 sustainable adaptation strategies in Mediterranean-like climates. A review. *Agron Sustain Dev* 38:66.  
185 <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0544-0>
- 186 Berruti A, Borriello R, Orgiazzi A, et al (2014) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their Value for Ecosystem  
187 Management. In: Grillo O (ed) *Biodiversity - The Dynamic Balance of the Planet*. InTech
- 188 Bettenfeld P, Cadena i Canals J, Jacquens L, et al (2021) The microbiota of the grapevine holobiont: a key  
189 component of plant health. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.008>
- 190 Bettenfeld P, Fontaine F, Trouvelot S, et al (2020) Woody Plant Declines. What’s Wrong with the Microbiome?  
191 *Trends in Plant Science* 25:381–394. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.12.024>
- 192 Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA (2014) Microbial biogeography of wine grapes is  
193 conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
194 *United States of America* 111:139–148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- 195 Bond BJ (2000) Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science* 5:349–353.  
196 [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01691-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01691-5)
- 197 Brito I, Goss MJ, de Carvalho M (2012) Effect of tillage and crop on arbuscular mycorrhiza colonization of winter  
198 wheat and triticale under Mediterranean conditions. *Soil Use and Management* 28:202–208.  
199 <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2012.00404.x>
- 200 Considine JA (2004) Grapevine productivity and yield components: A case study using field vines of Zante  
201 currant. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10:108–115. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00013.x>
- 203 Coughlan AP, Dalpé Y, Lapointe L, Piché Y (2000) Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and  
204 reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. *Can J For*  
205 *Res* 30:1543–1554. <https://doi.org/10.1139/x00-090>

206 Courty PE, Franc A, Pierrat JC, Garbaye J (2008) Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two  
207 soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5792–5801.  
208 <https://doi.org/10.1128/AEM.01592-08>

209 Cuenca G, Lovera M (2010) Seasonal variation and distribution at different soil depths of arbuscular mycorrhizal  
210 fungi spores in a tropical sclerophyllous shrubland. *Botany* 88:54–64. <https://doi.org/10.1139/B09-100>

211 Davison J, Moora M, Semchenko M, et al (2021) Temperature and pH define the realised niche space of arbuscular  
212 mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 231:763–776. <https://doi.org/10.1111/nph.17240>

213 Dietrich P, Roscher C, Clark AT, et al (2020) Diverse plant mixtures sustain a greater arbuscular mycorrhizal  
214 fungi spore viability than monocultures after 12 years. *Journal of Plant Ecology* 13:478–488.  
215 <https://doi.org/10.1093/jpe/rtaa037>

216 Drain A, Bonneau L, Recorbet G, et al (2019) Characterization of Arbuscular Mycorrhizal Communities in Roots  
217 of Vineyard Plants. 27–34. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1_3)

218 Du G, Zhan J, Li J, et al (2012) Effect of grapevine age on the aroma compounds in “beihong” wine. *South African*  
219 *Journal of Enology and Viticulture* 33:7–13. <https://doi.org/10.21548/33-1-1300>

220 Duchêne E, Huard F, Dumas V, et al (2010) The challenge of adapting grapevine varieties to climate change. *Clim*  
221 *Res* 41:193–204. <https://doi.org/10.3354/cr00850>

222 Düring H (1994) Photosynthesis of Ungrafted and Grafted Grapevines: Effects of Rootstock Genotype and Plant  
223 Age. *Am J Enol Vitic* 45:297

224 Escudé F, Auer L, Bernard M, et al (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*  
225 34:1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

226 Garcia K, Doidy J, Zimmermann SD, et al (2016) Take a Trip Through the Plant and Fungal Transportome of  
227 Mycorrhiza. *Trends in Plant Science* 21:937–950. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.010>

228 García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2007) Transcriptional regulation of host enzymes involved in  
229 the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiol Plant* 129:737–746.  
230 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00873.x>

231 García-Tomillo A, Figueiredo T de, Almeida A, et al (2017) Comparing effects of tillage treatments performed  
232 with animal traction on soil physical properties and soil electrical resistivity: preliminary experimental  
233 results. *Open Agriculture* 2:. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0036>

234 Gessler C, Pertot I, Perazzolli M (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of  
235 grapevine and effective disease management. *PHYTOPATHOL MEDITERR* 50:3–44

236 Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, et al (2010) Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in  
237 ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>

238 Gilbert JA, van der Lelie D, Zarraonaindia I (2014) Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National*  
239 *Academy of Sciences of the United States of America* 111:5–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110>

240 Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming.  
241 *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113:17–35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009>

242 Grigg D, Methven D, de Bei R, et al (2018) Effect of vine age on vine performance of Shiraz in the Barossa Valley,  
243 Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24:75–87. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12312>

244 Hart MM, Gorzelak M, Ragone D, Murch SJ (2014) Arbuscular mycorrhizal fungal succession in a long-lived  
245 perennial. *Botany* 92:313–320. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0185>

246 Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal  
247 fungi. *New Phytol* 153:335–344. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x>

248 Herrmann L, Lesueur D, Bräu L, et al (2016) Diversity of root-associated arbuscular mycorrhizal fungal  
249 communities in a rubber tree plantation chronosequence in Northeast Thailand. *Mycorrhiza* 26:863–877.  
250 <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00572-016-0720-5>

251 Higo M, Tatewaki Y, Gunji K, et al (2019) Cover cropping can be a stronger determinant than host crop identity  
252 for arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize and soybean. *PeerJ* 7:e6403.  
253 <https://doi.org/10.7717/peerj.6403>

254 Hontoria C, García-González I, Quemada M, et al (2019) The cover crop determines the AMF community  
255 composition in soil and in roots of maize after a ten-year continuous crop rotation. *Science of the Total*  
256 *Environment* 660:913–922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.095>

257 Horn S, Hempel S, Verbruggen E, et al (2017) Linking the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi  
258 and plants: A story of interdependence? *ISME Journal* 11:1400–1411. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.5>

259 Jansa J, Mozafar A, Anken T, et al (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a  
260 temperate soil. *Mycorrhiza* 12:225–234. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0163-z>

261 Kil YJ, Eo JK, Lee EH, Eom AH (2014) Root age-dependent changes in arbuscular mycorrhizal fungal  
262 communities colonizing roots of *Panax ginseng*. *Mycobiology* 42:416–421.  
263 <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.416>

264 Köhl L, Oehl F, van der Heijden MGA (2014) Agricultural practices indirectly influence plant productivity and  
265 ecosystem services through effects on soil biota. *Ecological Applications* 24:1842–1853.  
266 <https://doi.org/10.1890/13-1821.1>

267 Lekberg Y, Rosendahl S, Michelsen A, Olsson PA (2013) Seasonal carbon allocation to arbuscular mycorrhizal  
268 fungi assessed by microscopic examination, stable isotope probing and fatty acid analysis. *Plant and Soil*  
269 368:547–555. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1534-7>

270 Liu J, Zhang J, Li D, et al (2020) Differential responses of arbuscular mycorrhizal fungal communities to mineral  
271 and organic fertilization. *MicrobiologyOpen* 9:e920. <https://doi.org/10.1002/mbo3.920>

272 Meng B (2017) *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*. Springer Berlin Heidelberg,  
273 New York, NY

274 Mustafa G, Randoux B, Tisserant B, et al (2016) Phosphorus supply, arbuscular mycorrhizal fungal species, and  
275 plant genotype impact on the protective efficacy of mycorrhizal inoculation against wheat powdery mildew.  
276 *Mycorrhiza* 26:685–697. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0698-z>

277 Noceto P-A, Bettenfeld P, Bousageon R, et al (2021) Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the  
278 development of quality traits in crop production, alone or combined with plant growth-promoting bacteria.  
279 *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01054-1>

280 Noelia Cofré M, Ferrari AE, Becerra A, et al (2017) Effects of cropping systems under no-till agriculture on  
281 arbuscular mycorrhizal fungi in Argentinean Pampas. *Soil Use Manage* 33:364–378.  
282 <https://doi.org/10.1111/sum.12349>

283 Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, et al (2010) Soil type and land use intensity determine the composition of  
284 arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42:724–738.  
285 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.01.006>

286 Oksanen J (2013) *Multivariate Analysis of Ecological Communities in R : vegan tutorial*

287 Ollat N, Peccoux A, Papura D, et al (2016) Rootstocks as a component of adaptation to environment. *Grapevine*

288 *in a Changing Environment: A Molecular and Ecophysiological Perspective* 68–108.

289 <https://doi.org/10.1002/9781118735985.ch4>

290 Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, et al (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic

291 distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188:223–241.

292 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>

293 Palomo-Campesino S, González J, García-Llorente M (2018) Exploring the Connections between Agroecological

294 Practices and Ecosystem Services: A Systematic Literature Review. *Sustainability* 10:4339.

295 <https://doi.org/10.3390/su10124339>

296 Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, et al (2007) *Medicago* species affect the community composition of

297 arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176:197–210.

298 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02151.x>

299 R Core Team (2021) *R: A language and environment for statistical computing*. In: R Foundation for Statistical

300 Computing. <https://www.r-project.org/>

301 Reineke A, Thiéry D (2016) Grapevine insect pests and their natural enemies in the age of global warming. *J Pest*

302 *Sci* 89:313–328. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0761-8>

303 Reynolds AG, Pearson EG, de Savigny C, et al (2007) Interactions of vine age and reflective mulch upon berry,

304 must, and wine composition of five *Vitis vinifera* cultivars. *International Journal of Fruit Science* 7:85–119.

305 <https://doi.org/10.1080/15538360802003381>

306 Rydberg T, Jansén J (2002) Comparison of horse and tractor traction using energy analysis. *Ecological*

307 *Engineering* 19:13–28. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(02\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(02)00015-0)

308 Säle V, Aguilera P, Laczko E, et al (2015) Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity

309 of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 84:38–52.

310 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.005>

311 Schreiner RP, Mihara KL (2009) The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots

312 (*Vitis vinifera* L.) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia*

313 101:599–611. <https://doi.org/10.3852/08-169>

314 Tamburini G, Bommarco R, Wanger TC, et al (2020) Agricultural diversification promotes multiple ecosystem

315 services without compromising yield. *Sci Adv* 6:eaba1715. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1715>

316 Tedersoo L, Sánchez-Ramírez S, Kõljalg U, et al (2018) High-level classification of the Fungi and a tool for

317 evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* 90:135–159. [https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-](https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0)

318 [0](https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0)

319 Thomas H (2002) Ageing in plants. *Mechanisms of Ageing and Development* 123:747–753.

320 [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00420-1](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00420-1)

321 Trouvelot S, Bonneau L, Redecker D, et al (2015) Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron*

322 *Sustain Dev* 35:1449–1467. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0329-7>

323 Twieg BD, Durall DM, Simard SW (2007) Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New*

324 *Phytologist* 176:437–447. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02173.x>

325 van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V (1998) PCR in Studies of AM Fungi: from Primers to Application.  
 326 In: Varma A (ed) Mycorrhiza Manual. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 387–400  
 327 Walder F, Brulé D, Koegel S, et al (2015) Plant phosphorus acquisition in a common mycorrhizal network:  
 328 Regulation of phosphate transporter genes of the Pht1 family in sorghum and flax. *New Phytologist*  
 329 205:1632–1645. <https://doi.org/10.1111/nph.13292>  
 330 Walder F, Niemann H, Natarajan M, et al (2012) Mycorrhizal networks: Common goods of plants shared under  
 331 unequal terms of trade. *Plant Physiology* 159:789–797. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195727>  
 332 Wells CE, Eissenstat DM (2002) Beyond the roots of young seedlings: The influence of age and order on fine root  
 333 physiology. *Journal of Plant Growth Regulation* 21:324–334. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0011-1>  
 334 Williams A, Manoharan L, Rosenstock NP, et al (2017) Long-term agricultural fertilization alters arbuscular  
 335 mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and  
 336 phosphorus exchange. *New Phytol* 213:874–885. <https://doi.org/10.1111/nph.14196>  
 337 Wipf D, Krajinski F, Tuinen D, et al (2019) Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to  
 338 common mycorrhizal networks. *New Phytol* 223:1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>  
 339 Zhang M, Wang W, Zhang Y, et al (2017) Effects of fungicide iprodione and nitrification inhibitor 3, 4-  
 340 dimethylpyrazole phosphate on soil enzyme and bacterial properties. *Science of The Total Environment*  
 341 599–600:254–263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.011>

342

343 **Figures and tables caption:**

344 **Figure 1:** Mean of relative abundance of AMF species identified in A) each soil and B) root samples. YG: young  
 345 Grapevines (8 years); IG: Intermediate Grapevines (33 years); OG: Old Grapevines (107 years).

346

347 **Figure 2:** NMDS plot based on Bray Curtis dissimilarity matrix showing the variability of the samples according  
 348 to the treatment applied and the plot studied. Each point represents the ordination of each sample. Each sample is  
 349 symbolised by a form, which corresponds to the sampled plot. YG: young Grapevines (8 years); IG: Intermediate  
 350 Grapevines (33 years); OG: Old Grapevines (107 years).

351

352 **Table S1:** Physico-chemical analyses of the soils of the three plots studied (n=3). Different letters represent  
 353 significant differences between groups. YG: young Grapevines (8 years); IG: Intermediate Grapevines (33 years);  
 354 OG: Old Grapevines (107 years).



## Supplementary information

Does the ageing vineyards (from 8 to 107 years) alter communities of arbuscular mycorrhizal fungi?

Mycorrhiza

Célien Durney, Pierre-Antoine Noceto, Diederik van Tuinen, Julie de Sousa, Daniel Wipf, Pierre-Emmanuel Courty

Corresponding Author: Pierre-Emmanuel Courty ([pierre-emmanuel.courty@inrae.fr](mailto:pierre-emmanuel.courty@inrae.fr)) ; Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France;

Condition	YG (8 Years old)	IG (33 Years old)	OG (107 Years old)
Localisation	48°58'56.1"N 3°59'43.4"E	48°58'55.9"N 4°00'12.0"E	48°58'58.2"N 4°00'19.4"E
Clay (g/kg)	377a	264.6b	244.6b
Fine silt (g/kg)	211.7b	298.3a	200.7b
Coarse silt (g/kg)	196a	235a	200.6a
Fine sands (g/kg)	131a	128.7a	192a
Coarse sands (g/kg)	83.3a	73.3a	162a
Organic matter (g/kg)	46.4a	48.8a	52.5a
Carbone (g/kg)	26.9a	28.4a	30.5a
N total (g/kg)	2.2a	2.2a	2.6a
CN ratio	12a	12.7a	11.3a
Total Carbonate (g/kg)	244.3b	236.3b	338.3a
Active carbonate (g/kg)	107.5a	106.6a	120a
Oxalic iron (g/kg)	47.8a	65.8a	71.5a
Cation exchange capacity (meq/kg)	158.7a	141.4a	124.2a
pH	7.8a	7.9a	7.8a
CaO (g/kg)	14.4a	13.5a	11.8a
K <sub>2</sub> O (g/kg)	0.65a	0.53a	0.54a
MgO (g/kg)	0.26a	0.23a	0.27a
P (g/kg)	0.17a	0.16a	0.21a
Cu (g/kg)	163.8a	191.5a	239.4a

## Conclusion générale et perspectives

Cette thèse a été consacrée à l'étude de l'impact sur de pratiques viticoles (présence d'un couvert, choix du porte-greffe, âge de la vigne, ...) sur les communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) associées à la vigne. Ces recherches s'intègrent dans les études menées depuis plusieurs dizaines d'années par l'équipe « Santé des plantes : défense et mycorhize » de l'UMR Agroécologie pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au fonctionnement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules sur des modèles végétaux divers, ainsi que l'intégration et l'optimisation de cette symbiose dans les écosystèmes agricoles.

Depuis maintenant plusieurs années on sait que les pratiques agricoles ont une influence importante sur la structuration du sol, mais également sur les processus biologiques liés au développement des communautés de microorganismes du sol. Parmi eux, les CMA sont des organismes clés car ils fournissent à l'écosystème de nombreux services et permettent notamment d'améliorer la nutrition des plantes et leur tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Ces organismes sont fortement impactés par différentes pratiques agricoles comme le labour qui déstructure le réseau mycélien ou encore l'application d'herbicides qui limitent la présence de plantes hôtes pour ces organismes. Néanmoins, dans le cadre d'une gestion plus agroécologique des écosystèmes cultivés, de plus en plus d'attention est portée aux CMA et aux services qu'ils rendent.

Au vignoble, l'utilisation de plantes de couvert tend à se répandre. L'implantation d'une couverture végétale dans les inter-rangs du vignoble offre de nombreux services écosystémiques tels que l'attraction d'insectes auxiliaires ou l'augmentation de la matière organique dans les sols. Mais il est important de noter que cette augmentation de la diversité végétale contribue également à dynamiser la diversité microbienne présente dans les sols, et notamment les CMA. Les travaux menés pendant cette thèse visaient à étudier l'interaction entre les plantes de couvert et les CMA afin d'identifier des espèces végétales ou des groupes d'espèces végétales qui peuvent stimuler la croissance des CMA et permettre la conservation de la diversité dans le vignoble et son transfert vers les vignes. L'objectif à long terme est de fournir des conseils aux viticulteurs pour l'utilisation des plantes de couvert en intégrant la diversité microbienne du sol au sein des itinéraires de culture. Grâce au projet Biovine, nous avons identifié et testé la capacité de mycorhization d'une large liste de plantes de couvert. Nous avons inclus à la fois des familles de plantes couramment utilisées comme couvert végétal d'interculture et des espèces souvent considérées comme des adventices. Au final, nous avons montré que toutes les espèces et familles de plantes n'ont pas la même mycorhizotrophie. Les légumineuses présentent généralement une mycorhization plus élevée que les autres familles de plantes. Nous avons ainsi pu identifier des plantes de couvert qui seraient favorable à la mycorhization du vignoble. Cependant, les viticulteurs sont limités dans la palette végétale utilisable de par la présence de compétition entre le couvert et la vigne. Ces problématiques doivent faire l'objet d'études approfondies qui pourront être menées au laboratoire. Nous pourrions par exemple suivre les échanges

d'eau et de nutriments entre la vigne et le couvert grâce à des substrats marquées ( $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}_2\text{O}$ ). Nous utilisons régulièrement au laboratoire des microcosmes permettant d'isoler les systèmes racinaires des plantes. Les plantes inoculées sont connectées par le réseau mycélien du CMA. En apportant nos substrats marqués, le champignon va transmettre les nutriments à une ou bien à l'autres. La quantification de ces éléments marqués permet d'établir si la plante de couvert va préférentiellement absorber les nutriments par rapport à la vigne.

L'objectif étant de mieux comprendre le rôle des CMA dans les échanges de nutriments au sein des communautés végétales. Il sera ainsi possible d'identifier des espèces végétales présentant peu de concurrence ou encore des plantes inadaptées en raison d'une forte compétition nutritive avec la vigne.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu évaluer l'effet de différents mélanges de plantes de couvert sur la diversité des CMA associés aux racines de la vigne et du couvert végétal. Pour cela, nous avons donc démarré un essai en juillet 2020 sur une parcelle en Bourgogne. Nous nous sommes également intéressés à l'évolution saisonnière de la diversité associée à ces communautés végétales. Ainsi, cinq points d'échantillonnage ont été fixés au cours de la saison en fonction du stade phénologique de la vigne et du développement du couvert. Tous les échantillons ont été traités et nous attendons actuellement les dernières données de séquençage.

D'autre part, il est important d'identifier les protagonistes de la symbiose mycorhizienne à travers l'étude de la diversité taxonomique mais il est primordial d'étudier l'aspect fonctionnel de l'écosystème. Tous les organismes, aussi bien les plantes que les micro-organismes, interagissent et s'influencent mutuellement à travers leur cycle de développement et leur activité métabolique. Les microorganismes participent aux processus biologiques de mobilisation ou de minéralisation de la matière organique présente dans le sol. Cependant, on constate un manque de connaissances pour relier l'étude de la diversité microbienne et le fonctionnement biologique des écosystèmes. Bien que les AMF ne soient pas les seuls acteurs microbiens, nous avons souhaité évaluer le fonctionnement biologique du sol en présence de nos mélanges de couverts sélectionnés. Pour cela, des mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées sur le sol rhizosphérique avec la même chronologie que notre étude taxonomique. Sur les premières analyses, il apparaît que les couverts végétaux permettent d'augmenter les activités enzymatiques étudiées au niveau du sol. Ceci suggère une amélioration des processus biologiques et du fonctionnement de l'écosystème.

Même si la pandémie de Covid-19 et l'échec des premiers essais dans le vignoble ont retardé la réalisation de ces travaux, la majorité des résultats souhaités ont été obtenus. En revanche, les données étant arrivées très récemment, des analyses complémentaires seront réalisées dans les semaines à venir et d'ici à la soutenance orale de ma thèse de manière à identifier des corrélations entre l'abondance des CMA et les activités enzymatiques. Nous analyserons également l'effet de cette pratique sur les rendements et la qualité des baies.

D'autres pratiques viticoles ont été étudiées au cours de ces travaux. La vigne présente de nombreuses particularités comme le fait qu'elle soit cultivée en hétérogrefe. On sait de par la bibliographie que la variabilité génétique intraspécifique influence la réponse de la plante à la symbiose mycorhizienne. Or aucune étude ne s'était jusque-là attachée à comparer les communautés de CMA associées à différents cultivars. Pour répondre à cette question nous avons menés une campagne de prélèvement au sein d'un conservatoire régional des cépages et des porte-greffes, situé en Bourgogne. Nos résultats ont montré que les porte-greffes abritent des communautés de CMA différentes du point de vue de leur composition. En revanche, cet effet est peu visible sur les indices de diversité. Nos résultats confirment donc des observations réalisées dans d'autres études où la composition des communautés fongiques au niveau du sol sont modifiées par le génotype des plantes. De plus, depuis la crise du phylloxera, les vignes en production présentent deux fonds génétiques différents qui cohabitent au sein d'une même plante : le greffon et le porte-greffe. Là aussi, l'étude des communautés de CMA révèle l'influence des cépages sur les communautés recrutées au niveau des racines du porte-greffe. On peut trouver une explication à ce phénomène par des différences de vigueur et de croissance entre les génotypes des cépages mais également des porte-greffes. Plusieurs études ont montré que les deux entités modifiaient l'allocation en nutriments au sein de la plante entière et donc probablement l'allocation de nutriments vers les partenaires symbiotiques. Le greffon et le porte-greffe s'influencent mutuellement soit au niveau de la remontée des nutriments du sol vers les parties aériennes ou la descente des sucres des feuilles aux racines. Ces régulations de l'allocation des ressources au sein de la plante, ajouté à la symbiose mycorhizienne qui exerce une demande importante en carbone au niveau des racines, peuvent expliquer nos observations. Des études complémentaires sur les échanges de nutriments dans différentes associations cépage/porte-greffe en lien avec les stratégies d'échange potentiellement différentes entre les espèces de CMA pourront être menées afin de soutenir ces hypothèses. Nous cultivons depuis quelques années une collection de porte-greffes et de cépages au sein de l'institut et nous avons également accès à des collections de CMA avec une grande diversité d'isolats. Dans un premier temps, nous pouvons évaluer les stratégies d'échanges de carbone et d'azote entre les porte-greffes et les CMA, grâce là aussi à des substrats marqués ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{CO}_2$ ). Dans un second temps, nous pourrions comparer l'impact du greffage sur ces échanges avec plusieurs cépages. Ces études physiologiques pourraient s'accompagner d'analyses transcriptomiques de manière à identifier les acteurs de ces échanges à l'échelle de la plante entière. Des transporteurs de nutriments sont notamment spécifiques de la symbiose mycorhizienne à arbuscules.

Enfin, notre étude sur la diversité des CMA en lien avec l'ancienneté des parcelles viticoles a permis de mettre en évidence des évolutions dans les communautés de CMA recrutées par les ceps au cours du temps. L'abondance de certaines espèces comme *Septoglonus* sp. diminue en fonction du temps, tandis que d'autres espèces majoritaires (*R. irregularis* et *Sclerocystis sinuosa*) se développent au cours du temps et deviennent quasiment exclusives chez des pieds plus âgés. Ces recherches ont soulevé plusieurs questions quant à l'effet

de l'âge de la plante sur la structuration des communautés de CMA. Une hypothèse pourrait être la diminution de l'efficacité de la photosynthèse en fonction de l'âge de la plante qui a déjà pu être observé chez les arbres mais pas chez la vigne. Toutefois on sait que les transferts de nutriments entre les plantes et les CMA sont variables dans le temps et différentes stratégies d'échange peuvent se mettre en place. Des expérimentations sur les échanges de carbone entre différentes espèces de CMA devront être menées pour mieux comprendre les différentes stratégies d'échange mises place par la plante hôte et par les CMA. On peut également s'interroger sur l'impact de l'âge de la plante sur l'ensemble des communautés de microorganismes quel que soit le compartiment de l'écosystème étudié. Peut-on observer des différences sur les communautés endophytes autres que les CMA ou bien est-ce que la physiologie d'une plante plus avancée détermine la composition des communautés de microorganismes de la rhizosphère ? Pour cela, nous pouvons reprendre nos échantillons et amplifier les marqueurs moléculaires bactériens et fongiques pour identifier les communautés endophytes. Pour les communautés de la rhizosphère et de la phyllosphère, il sera nécessaire de refaire une campagne de prélèvement.

Du fait de la baisse de productivité des parcelles anciennes, toutes ces questions susciteront peut-être moins d'intérêt pour les viticulteurs mais permettront à la communauté scientifique de mieux comprendre et d'évaluer la capacité d'une plante à se maintenir dans un écosystème au fil des années.

L'ensemble des résultats obtenus, ainsi que les données issues de la bibliographie souligne la complexité des interactions entre la vigne et les microorganismes du sol. D'autres études menées par notre équipe visent notamment à mieux comprendre l'influence de la symbiose mycorhizienne et des CMA sur la physiologie de la vigne. Ces éléments sont également intégrés dans des thématiques de recherche, de notre laboratoire, liées à la résistance de la vigne aux ravageurs dans un contexte de dépérissement.

## Références bibliographiques

- Abdel Latef AAH, Chaoxing H (2011) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae* 127:228–233. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.020>
- Acosta-Martinez V, Tabatabai MA (2000) Arylamidase Activity of Soils. *Soil Sci Soc Am J* 64:215–221. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.641215x>
- Addiscott TM, Thomas D (2000) Tillage, mineralization and leaching: phosphate. *Soil and Tillage Research* 53:255–273. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00110-5](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00110-5)
- Agnihotri R, Sharma MP, Prakash A, et al (2022) Glycoproteins of arbuscular mycorrhiza for soil carbon sequestration: Review of mechanisms and controls. *Science of The Total Environment* 806:150571. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150571>
- Aguilera P, Cornejo P, Borie F, et al (2014) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Triticum aestivum* L. plants growing in an Andosol with high aluminum level. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 186:178–184. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.01.029>
- Aira M, Gómez-Brandón M, Lazcano C, et al (2010) Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42:2276–2281. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.029>
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Alaniz S, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J (2010) Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpum liriodendri* and *C. macrodidymum*. *Scientia Horticulturae* 125:305–308. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.009>
- Alaux P-L, César V, Naveau F, et al (2018) Impact of *Rhizoglyphus irregularis* MUCL 41833 on disease symptoms caused by *Phytophthora infestans* in potato grown under field conditions. *Crop Protection* 107:26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.01.003>
- Alguacil M del M, Torres MP, Montesinos-Navarro A, Roldán A (2016) Soil Characteristics Driving Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Semiarid Mediterranean Soils. *Appl Environ Microbiol* 82:3348–3356. <https://doi.org/10.1128/AEM.03982-15>
- Amézqueta E (1999) Soil Aggregate Stability: A Review. *Journal of Sustainable Agriculture* 14:83–151. [https://doi.org/10.1300/J064v14n02\\_08](https://doi.org/10.1300/J064v14n02_08)
- Badiane NNY, Chotte JL, Pate E, et al (2001) Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Applied Soil Ecology* 18:229–238. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00159-7)
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology* 124:949–958. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.949>
- Balota EL, Machineski O, Viviane Truber P, et al (2011) Physic nut plants present high mycorrhizal

- dependency under conditions of low phosphate availability. *Braz J Plant Physiol* 23:33–44.  
<https://doi.org/10.1590/S1677-04202011000100006>
- Bazin J-F (2002) *Histoire du vin de Bourgogne*. J.-P. Gisserot, Paris
- Bending GD, Rodríguez-Cruz MS, Lincoln SD (2007) Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69:82–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.042>
- Berlanas C, Berbegal M, Elena G, et al (2019) The Fungal and Bacterial Rhizosphere Microbiome Associated With Grapevine Rootstock Genotypes in Mature and Young Vineyards. *Front Microbiol* 10:1142.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01142>
- Betancur-Agudelo M, Meyer E, Lovato PE (2021) Arbuscular mycorrhizal fungus richness in the soil and root colonization in vineyards of different ages. *Rhizosphere* 17:100307.  
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100307>
- Bettenfeld P, Cadena i Canals J, Jacquens L, et al (2021) The microbiota of the grapevine holobiont: a key component of plant health. *Journal of Advanced Research*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.008>
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 108:111–120.  
<https://doi.org/10.1023/A:1015061108045>
- Biermann B, Linderman RG (1981) QUANTIFYING VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAE: A PROPOSED METHOD TOWARDS STANDARDIZATION \*. *New Phytol* 87:63–67.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01690.x>
- Binet M-N, Marchal C, Lipuma J, et al (2020) Plant health status effects on arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Lavandula angustifolia* and *Lavandula intermedia* infected by *Phytoplasma* in France. *Sci Rep* 10:20305. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77240-6>
- Blancquaert EH, Oberholster A, Ricardo-da-Silva JM, Deloire AJ (2018) Effects of Abiotic Factors on Phenolic Compounds in the Grape Berry – A Review. *SAJEV* 40:. <https://doi.org/10.21548/40-1-3060>
- Bommarco R, Kleijn D, Potts SG (2013) Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends in Ecology & Evolution* 28:230–238. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.012>
- Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1:48. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, et al (2012) Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biol Fertil Soils* 48:911–922.  
<https://doi.org/10.1007/s00374-012-0683-4>
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12:224–230.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.009>

- Bowles TM, Jackson LE, Loehrer M, Cavagnaro TR (2017) Ecological intensification and arbuscular mycorrhizas: a meta-analysis of tillage and cover crop effects. *J Appl Ecol* 54:1785–1793. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12815>
- Bravo A, Brands M, Wewer V, et al (2017) Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM 2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytol* 214:1631–1645. <https://doi.org/10.1111/nph.14533>
- Brígido C, van Tuinen D, Brito I, et al (2017) Management of the biological diversity of AM fungi by combination of host plant succession and integrity of extraradical mycelium. *Soil Biology and Biochemistry* 112:237–247. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.05.018>
- Brito I, Goss MJ, de Carvalho M, et al (2012) Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 121:63–67. <https://doi.org/10.1016/j.still.2012.01.012>
- Brown DS, Jaspers MV, Ridgway HJ, et al (2013) Susceptibility of four grapevine rootstocks to *Cylindrocladiella parva*. *NZPP* 66:249–253. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2013.66.5675>
- Brown SP, Grillo MA, Podowski JC, Heath KD (2020) Soil origin and plant genotype structure distinct microbiome compartments in the model legume *Medicago truncatula*. *Microbiome* 8:139. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00915-9>
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154:275–304. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x>
- Brundrett MC, Tedersoo L (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol* 220:1108–1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Brussaard L, de Ruiter PC, Brown GG (2007) Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121:233–244. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.12.013>
- Bucher M (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173:11–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x>
- Buée M, Courty PE, Mignot D, Garbaye J (2007) Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 39:1947–1955. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.016>
- Burke DJ, Weintraub MN, Hewins CR, Kalisz S (2011) Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry* 43:795–803. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.014>
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, et al (2013) Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58:216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
- Busari MA, Kukal SS, Kaur A, et al (2015) Conservation tillage impacts on soil, crop and the environment. *International Soil and Water Conservation Research* 3:119–129. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.05.002>



- Butchart SHM, Walpole M, Collen B, et al (2010) Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science* 328:1164–1168. <https://doi.org/10.1126/science.1187512>
- Campos-Soriano L, García-Martínez J, Segundo BS (2012) The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection: Resistance to *M. oryzae* in mycorrhizal rice. *Molecular Plant Pathology* 13:579–592. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00773.x>
- Carbonnel S, Gutjahr C (2014) Control of arbuscular mycorrhiza development by nutrient signals. *Front Plant Sci* 5:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00462>
- Carney KM, Matson PA (2006) The Influence of Tropical Plant Diversity and Composition on Soil Microbial Communities. *Microb Ecol* 52:226–238. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9115-z>
- Carvalho LG, Veldtman R, Shenkute AG, et al (2011) Natural and within-farmland biodiversity enhances crop productivity: Weeds maximize nature benefits to crops. *Ecology Letters* 14:251–259. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01579.x>
- Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, et al (2013) Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. *Mycorrhiza* 23:597–625. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0496-9>
- Caudwell A, Larrue J, Tassart V, et al (1994) Caractère « porteur de la flavescence dorée » chez les vignes porte-greffes, en particulier le 3309 Couderc et le Fercal. *Agronomie* 14:83–94. <https://doi.org/10.1051/agro:19940203>
- Cavagnaro TR, Smith FA, Smith SE, Jakobsen I (2005) Functional diversity in arbuscular mycorrhizas: exploitation of soil patches with different phosphate enrichment differs among fungal species. *Plant Cell Environ* 28:642–650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01310.x>
- Chan KY (2001) An overview of some tillage impacts on earthworm population abundance and diversity — implications for functioning in soils. *Soil and Tillage Research* 57:179–191. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(00\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(00)00173-2)
- Chandrasekaran M, Boughattas S, Hu S, et al (2014) A meta-analysis of arbuscular mycorrhizal effects on plants grown under salt stress. *Mycorrhiza* 24:611–625. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0582-7>
- Chaudhary S, Gupta P, Srivastava S, Adholeya A (2019) Understanding dynamics of *Rhizophagus irregularis* ontogenesis in axenically developed coculture through basic and advanced microscopic techniques: CHAUDHARY ET AL. *J Basic Microbiol* 59:767–774. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900138>
- Chavarría DN, Verdenelli RA, Serri DL, et al (2016) Effect of cover crops on microbial community structure and related enzyme activities and macronutrient availability. *European Journal of Soil Biology* 76:74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.07.002>
- Chen H, Li D, Zhao J, et al (2018) Effects of nitrogen addition on activities of soil nitrogen acquisition enzymes : A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 252:126–131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.032>

- Chitarra W, Perrone I, Avanzato CG, et al (2017) Grapevine Grafting: Scion Transcript Profiling and Defense-Related Metabolites Induced by Rootstocks. *Front Plant Sci* 8:654. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00654>
- Christensen LA, Norris PE, Christensen LA, Norris PE (1983) A Comparison of Tillage Systems: For Reducing Soil Erosion and Water Pollution. <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.307928>
- Cloutier ML, Murrell E, Barbercheck M, et al (2020) Fungal community shifts in soils with varied cover crop treatments and edaphic properties. *Scientific Reports* 10:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63173-7>
- Cook MG, Zhang Y, Nelson CJ, et al (2015) Anthocyanin Composition of Merlot is Ameliorated by Light Microclimate and Irrigation in Central California. *American Journal of Enology and Viticulture* 66:266–278. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15006>
- Cordero-Bueso G, Arroyo T, Valero E (2014) A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 189:189–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.013>
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, et al (1998) Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *MPMI* 11:1017–1028. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.10.1017>
- Corso M, Vannozzi A, Ziliotto F, et al (2016) Grapevine Rootstocks Differentially Affect the Rate of Ripening and Modulate Auxin-Related Genes in Cabernet Sauvignon Berries. *Front Plant Sci* 7: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00069>
- Costanza R, d'Arge R, de Groot R, et al (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>
- Croll D, Giovannetti M, Koch AM, et al (2009) Nonsel self vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 181:924–937. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x>
- Dabré ÉE, Lee S-J, Hijri M, Favret C (2021) The effects of mycorrhizal colonization on phytophagous insects and their natural enemies in soybean fields. *PLoS ONE* 16:e0257712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257712>
- DeForest JL (2009) The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and l-DOPA. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1180–1186. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.029>
- Doran JW, Parkin TB (2015) Defining and Assessing Soil Quality. In: Doran JW, Coleman DC, Bezdicek DF, Stewart BA (eds) *SSSA Special Publications*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 1–21
- Drain A, Bonneau L, Recorbet G, et al (2019) Characterization of Arbuscular Mycorrhizal Communities in Roots of Vineyard Plants. In: Reinhardt D, Sharma AK (eds) *Methods in Rhizosphere Biology Research*. Springer Singapore, Singapore, pp 27–34

- Drappier J, Thibon C, Rabot A, Geny-Denis L (2019) Relationship between wine composition and temperature: Impact on Bordeaux wine typicity in the context of global warming—Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59:14–30. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1355776>
- Dries L, Bussotti S, Pozzi C, et al (2021) Rootstocks Shape Their Microbiome—Bacterial Communities in the Rhizosphere of Different Grapevine Rootstocks. *Microorganisms* 9:822. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040822>
- Dry I, Riaz S, Fuchs M, et al (2019) Scion Breeding for Resistance to Biotic Stresses. In: Cantu D, Walker MA (eds) *The Grape Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 319–347
- Dwivedi SL, Ceccarelli S, Blair MW, et al (2016) Landrace Germplasm for Improving Yield and Abiotic Stress Adaptation. *Trends in Plant Science* 21:31–42. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.012>
- Escudié F, Auer L, Bernard M, et al (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Estaún V, Calvet C, Hayman DS (1987) Influence of plant genotype on mycorrhizal infection: Response of three pea cultivars. *Plant Soil* 103:295–298. <https://doi.org/10.1007/BF02370406>
- Ferrandino A, Lovisolo C (2014) Abiotic stress effects on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Focus on abscisic acid-mediated consequences on secondary metabolism and berry quality. *Environmental and Experimental Botany* 103:138–147. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.012>
- Finney DM, Buyer JS, Kaye JP (2017) Living cover crops have immediate impacts on soil microbial community structure and function. *Journal of Soil and Water Conservation* 72:361–373. <https://doi.org/10.2489/jswc.72.4.361>
- Fiorilli V, Vannini C, Ortolani F, et al (2018) Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat. *Sci Rep* 8:9625. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27622-8>
- Floch C, Chevremont A-C, Joanico K, et al (2011) Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. *European Journal of Soil Biology* 47:256–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.05.007>
- Fragoso C, Brown GG, Patrón JC, et al (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of earthworms. *Applied Soil Ecology* 6:17–35. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00154-0)
- Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjær MF, et al (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16:413–419. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0051-z>
- Gaba S, Cheviron N, Perrot T, et al (2020) Weeds Enhance Multifunctionality in Arable Lands in South-West of France. *Front Sustain Food Syst* 4:71. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00071>
- Gahan J, Schmalenberger A (2014) The role of bacteria and mycorrhiza in plant sulfur supply. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00723>

- Garnier N, Valamoti SM (2016) Prehistoric wine-making at Dikili Tash (Northern Greece): Integrating residue analysis and archaeobotany. *Journal of Archaeological Science* 74:195–206. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.003>
- Garrigou A, Baldi I, Le Frious P, et al (2011) Ergonomics contribution to chemical risks prevention: An ergotoxicological investigation of the effectiveness of coverall against plant pest risk in viticulture. *Applied Ergonomics* 42:321–330. <https://doi.org/10.1016/j.apergo.2010.08.001>
- Gautier AT, Cochetel N, Merlin I, et al (2020) Scion genotypes exert long distance control over rootstock transcriptome responses to low phosphate in grafted grapevine. *BMC Plant Biol* 20:367. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02578-y>
- Gautier AT, Merlin I, Doumas P, et al (2021) Identifying roles of the scion and the rootstock in regulating plant development and functioning under different phosphorus supplies in grapevine. *Environmental and Experimental Botany* 185:104405. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104405>
- Geiger F, Bengtsson J, Berendse F, et al (2010) Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology* 11:97–105. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.12.001>
- Genre Andrea, Chabaud Mireille, Balzergue Coline, et al (2013) Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* 198:190–202. <https://doi.org/10.1111/nph.12146>
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M-N, et al (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernes AS, et al (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol* 151:717–724. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00216.x>
- Goldschmidt EE (2014) Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00727>
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14:111–117. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0244-7>
- Gopher A, Abbo S, Yadun SL (2001) The “when”, the “where” and the “why” of the Neolithic revolution in the Levant. *Doc praeh* 28:49–62. <https://doi.org/10.4312/dp.28.3>
- Goss MJ, de Varennes A (2002) Soil disturbance reduces the efficacy of mycorrhizal associations for early soybean growth and N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1167–1173. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00053-6)
- Gramaje D, García-Jiménez J, Armengol J (2010) Field Evaluation of Grapevine Rootstocks Inoculated with Fungi Associated with Petri Disease and Esca. *Am J Enol Vitic* 61:512–520.

<https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10021>

- Gutjahr C (2014) Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Current Opinion in Plant Biology* 20:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.003>
- Haichar F el Z, Marol C, Berge O, et al (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J* 2:1221–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Hajjar R, Jarvis DI, Gemmill-Herren B (2008) The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 123:261–270. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.08.003>
- Hamido SA, Kpombrekou-A K (2009) Cover crop and tillage effects on soil enzyme activities following tomato. *Soil and Tillage Research* 105:269–274. <https://doi.org/10.1016/j.still.2009.09.007>
- Han W, Wang G, Liu J, Ni J (2021) Effects of vegetation type, season, and soil properties on soil microbial community in subtropical forests. *Applied Soil Ecology* 158:103813. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103813>
- Haney RL, Haney EB, Smith DR, et al (2018) The soil health tool—Theory and initial broad-scale application. *Applied Soil Ecology* 125:162–168. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.035>
- Hao Z, Fayolle L, van Tuinen D, et al (2012) Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 63:3657–3672. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers046>
- Hao Z, van Tuinen D, Fayolle L, et al (2018) Arbuscular mycorrhiza affects grapevine fanleaf virus transmission by the nematode vector *Xiphinema index*. *Applied Soil Ecology* 129:107–111. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.007>
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 153:335–344. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x>
- Hashem A, Abd\_Allah EF, Alqarawi AA, et al (2016) Induction of Osmoregulation and Modulation of Salt Stress in *Acacia gerrardii* Benth. by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Bacillus subtilis* (BERA 71). *BioMed Research International* 2016:1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6294098>
- Heijden MGA, Martin FM, Selosse M, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* 205:1406–1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Hernández-Terán A, Navarro-Díaz M, Benítez M, et al (2020) Host genotype explains rhizospheric microbial community composition: the case of wild cotton metapopulations (*Gossypium hirsutum* L.) in Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* 96:faa109. <https://doi.org/10.1093/femsec/faa109>
- Higo M, Isobe K, Kondo T, et al (2015) Temporal variation of the molecular diversity of arbuscular mycorrhizal communities in three different winter cover crop rotational systems. *Biology and Fertility of Soils* 51:21–32. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0945-4>
- Higo M, Sato R, Serizawa A, et al (2018) Can phosphorus application and cover cropping alter arbuscular mycorrhizal fungal communities and soybean performance after a five-year phosphorus-

- unfertilized crop rotational system? *PeerJ* 6:e4606. <https://doi.org/10.7717/peerj.4606>
- Higo M, Tatewaki Y, Gunji K, et al (2019) Cover cropping can be a stronger determinant than host crop identity for arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize and soybean. *PeerJ* 7:e6403. <https://doi.org/10.7717/peerj.6403>
- Hiiesalu I, Pärtel M, Davison J, et al (2014) Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi: associations with grassland plant richness and biomass. *New Phytol* 203:233–244. <https://doi.org/10.1111/nph.12765>
- Hobbie EA (2006) CARBON ALLOCATION TO ECTOMYCORRHIZAL FUNGI CORRELATES WITH BELOWGROUND ALLOCATION IN CULTURE STUDIES. *Ecology* 87:563–569. <https://doi.org/10.1890/05-0755>
- Hobbs PR, Sayre K, Gupta R (2008) The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Phil Trans R Soc B* 363:543–555. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2169>
- Hochberg U, Degu A, Cramer GR, et al (2015) Cultivar specific metabolic changes in grapevines berry skins in relation to deficit irrigation and hydraulic behavior. *Plant Physiology and Biochemistry* 88:42–52. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.01.006>
- Hoisington D, Khairallah M, Reeves T, et al (1999) Plant genetic resources: What can they contribute toward increased crop productivity? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:5937–5943. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5937>
- Hole F (1984) A reassessment of the neolithic revolution. *Paléorient* 10:49–60. <http://www.jstor.org/stable/41489605>
- Holland TC, Bowen P, Bogdanoff C, Hart M (2014) Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities Associated with *Vitis vinifera* Vines under Different Frequencies of Irrigation. *American Journal of Enology and Viticulture* 65:222–229. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13101>
- Hontoria C, García-González I, Quemada M, et al (2019) The cover crop determines the AMF community composition in soil and in roots of maize after a ten-year continuous crop rotation. *Science of The Total Environment* 660:913–922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.095>
- Hu P, Hollister EB, Somenahally AC, et al (2015) Soil bacterial and fungal communities respond differently to various isothiocyanates added for biofumigation. *Front Microbiol* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00729>
- Hugoni M, Luis P, Guyonnet J, Haichar F el Z (2018) Plant host habitat and root exudates shape fungal diversity. *Mycorrhiza* 28:451–463. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0857-5>
- Hunter PJ, Pink DAC, Bending GD (2015) Cultivar-level genotype differences influence diversity and composition of lettuce (*Lactuca* sp.) phyllosphere fungal communities. *Fungal Ecology* 17:183–186. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.007>
- Isbell F, Adler PR, Eisenhauer N, et al (2017) Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. *J Ecol* 105:871–879. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12789>
- Isobe K, Higo M, Kondo T, et al (2014) Effect of Winter Crop Species on Arbuscular Mycorrhizal Fungal

- Colonization and Subsequent Soybean Yields. *Plant Production Science* 17:260–267. <https://doi.org/10.1626/pps.17.260>
- Jakobsen I, Leggett ME, Richardson AE (2015) Rhizosphere Microorganisms and Plant Phosphorus Uptake. In: Thomas Sims J, Sharpley AN (eds) *Agronomy Monographs*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp 437–494
- Jansa J, Erb A, Oberholzer H-R, et al (2014) Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Mol Ecol* 23:2118–2135. <https://doi.org/10.1111/mec.12706>
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, et al (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5:619–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>
- Jones TH, Cullis BR, Clingeleffer PR, Rühl EH (2009) Effects of novel hybrid and traditional rootstocks on vigour and yield components of Shiraz grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15:284–292. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00061.x>
- Kabir Z (2005) Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. *Can J Plant Sci* 85:23–29. <https://doi.org/10.4141/P03-160>
- Kaeppler SM, Parke JL, Mueller SM, et al (2000) Variation among Maize Inbred Lines and Detection of Quantitative Trait Loci for Growth at Low Phosphorus and Responsiveness to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Crop Science* 40:358–364. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.402358x>
- Kang H, Freeman C, Soon park S, Chun J (2005) N-Acetylglucosaminidase activities in wetlands: a global survey. *Hydrobiologia* 532:103–110. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-9450-3>
- Karimi B, Cahurel J-Y, Gontier L, et al (2020) A meta-analysis of the ecotoxicological impact of viticultural practices on soil biodiversity. *Environ Chem Lett* 18:1947–1966. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01050-5>
- Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Koiwa H, et al (2002) Root, Root Hair, and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicus*. *MPMI* 15:17–26. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.1.17>
- Keller M, Mills LJ, Harbertson JF (2012) Rootstock Effects on Deficit-Irrigated Winegrapes in a Dry Climate: Vigor, Yield Formation, and Fruit Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 63:29–39. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11078>
- Kergresse M, Rucay P, Pajot C, et al (2011) Cancers cutanés et bronchopulmonaire chez un viticulteur après expositions répétées à l'arsénite de soude. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 72:281–284. <https://doi.org/10.1016/j.admp.2011.04.007>
- Keymer A, Gutjahr C (2018) Cross-kingdom lipid transfer in arbuscular mycorrhiza symbiosis and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 44:137–144. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.005>
- Kjøller R, Rosendahl S (2000) Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soils*

31:361–365. <https://doi.org/10.1007/s003749900180>

- Knight TR, Dick RP (2004) Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 36:2089–2096. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.06.007>
- Koczorski P, Furtado BU, Gołębiewski M, et al (2021) The Effects of Host Plant Genotype and Environmental Conditions on Fungal Community Composition and Phosphorus Solubilization in Willow Short Rotation Coppice. *Front Plant Sci* 12:647709. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.647709>
- Kohout P, Sudová R, Janoušková M, et al (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry* 68:482–493. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.027>
- Koide RT, Kabir Z (2000) Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate: RESEARCH *Glomus intraradices* and organic P. *New Phytologist* 148:511–517. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00776.x>
- Komárek M, Čadková E, Chrastný V, et al (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* 36:138–151. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005>
- Konvalinková T, Püschel D, Řezáčová V, et al (2017) Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. *Plant Soil* 419:319–333. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3350-6>
- Krishna KR, Shetty KG, Dart PJ, Andrews DJ (1985) Genotype dependent variation in mycorrhizal colonization and response to inoculation of pearl millet. *Plant Soil* 86:113–125. <https://doi.org/10.1007/BF02185031>
- Krüger M, Krüger C, Walker C, et al (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193:970–984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x>
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A (2009) DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183:212–223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x>
- Kumar P, Lucini L, Roupheal Y, et al (2015) Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. *Front Plant Sci* 6:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00477>
- Lane M, Lorenz N, Saxena J, et al (2012) The effect of glyphosate on soil microbial activity, microbial community structure, and soil potassium. *Pedobiologia* 55:335–342. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2012.08.001>
- Lanfranco L, Cardinale F, Francia D, et al (2011) The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Reduces Disease Severity in Tomato Plants Infected by *Botrytis Cinerea*. *Journal of plant pathology = Rivista di patologia vegetale : an international journal of the Italian society of plant pathology* : 93, 1, 2011.



<https://doi.org/10.1400/169610>

- Laudicina VA, Novara A, Barbera V, et al (2015) Long-Term Tillage and Cropping System Effects on Chemical and Biochemical Characteristics of Soil Organic Matter in a Mediterranean Semiarid Environment: MANAGEMENT EFFECTS ON SOIL ORGANIC MATTER CHARACTERISTICS. *Land Degrad Develop* 26:45–53. <https://doi.org/10.1002/ldr.2293>
- Lecourt J, Lauvergeat V, Ollat N, et al (2015) Shoot and root ionome responses to nitrate supply in grafted grapevines are rootstock genotype dependent: Rootstock and nitrogen supply affect grapevine ionome. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21:311–318. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12136>
- Lehnert H, Serfling A, Friedt W, Ordon F (2018) Genome-Wide Association Studies Reveal Genomic Regions Associated With the Response of Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Mycorrhizae Under Drought Stress Conditions. *Front Plant Sci* 9:1728. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01728>
- Lheureux F Wipf, Daniel, Courty P-E (2020) Mycorrhizes à arbuscules
- Li H-Y, Yang G-D, Shu H-R, et al (2006) Colonization by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus versiforme* Induces a Defense Response Against the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* in the Grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), Which Includes Transcriptional Activation of the Class III Chitinase Gene VCH3. *Plant and Cell Physiology* 47:154–163. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci231>
- Li Y, Song D, Liang S, et al (2020) Effect of no-tillage on soil bacterial and fungal community diversity: A meta-analysis. *Soil and Tillage Research* 204:104721. <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104721>
- Lin G, McCormack ML, Guo D (2015) Arbuscular mycorrhizal fungal effects on plant competition and community structure. *J Ecol* 103:1224–1232. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12429>
- Linderman RG, Davis EA (2004) Varied response of marigold (*Tagetes* spp.) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 99:67–78. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00081-5)
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, et al (2018) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50:529–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03069.x>
- Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, et al (2009) Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02099.x>
- Lupwayi NZ, Rice WA, Clayton GW (1998) Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1733–1741. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00025-X)
- Lutgen ER, Muir-Clairmont D, Graham J, Rillig MC (2003) Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. *Plant and Soil* 257:71–83.

<https://doi.org/10.1023/A:1026224209597>

- Lynch JM, Bragg E (1985) Microorganisms and Soil Aggregate Stability. In: Lal R, Stewart BA (eds) Soil Restoration. Springer New York, New York, NY, pp 133–171
- Mackie KA, Müller T, Kandeler E (2012) Remediation of copper in vineyards – A mini review. *Environmental Pollution* 167:16–26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.023>
- Maillet F, Poinso V, André O, et al (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58–63. <https://doi.org/10.1038/nature09622>
- Makoi JHJR, Ndakidemi PA (2008) Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* 7:181–191
- Malik RJ, Dixon MH, Bever JD (2016) Mycorrhizal composition can predict foliar pathogen colonization in soybean. *Biological Control* 103:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.08.004>
- Mandyam K, Jumpponen A (2008) Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. *Mycorrhiza* 18:145–155. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0165-6>
- Mangalassery S, Mooney SJ, Sparkes DL, et al (2015) Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *European Journal of Soil Biology* 68:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.03.001>
- Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159:89–102. <https://doi.org/10.1007/BF00000098>
- Martens DA (2000) Management and Crop Residue Influence Soil Aggregate Stability. *J environ qual* 29:723–727. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900030006x>
- Massa N, Bona E, Novello G, et al (2020) AMF communities associated to *Vitis vinifera* in an Italian vineyard subjected to integrated pest management at two different phenological stages. *Scientific Reports* 10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66067-w>
- Mbuthia LW, Acosta-Martínez V, DeBruyn J, et al (2015) Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 89:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.016>
- Meggio F, Prinsi B, Negri AS, et al (2014) Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments: Response of two genotypes to drought and salinity. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20:310–323. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12071>
- Mendes IC, Bandick AK, Dick RP, Bottomley PJ (1999) Microbial Biomass and Activities in Soil Aggregates Affected by Winter Cover Crops. *Soil Sci Soc Am j* 63:873–881. <https://doi.org/10.2136/sssaj1999.634873x>
- Mikiciuk G, Sas-Paszt L, Mikiciuk M, et al (2018) Physiological Response of Three Grapevine Cultivars Grown In North-Western Poland to Mycorrhizal Fungi. *SAJEV* 40: <https://doi.org/10.21548/40-1-3086>

- Miransari M (2011) Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances* 29:645–653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006>
- Mirás-Avalos JM, Intrigliolo DS (2017) Grape Composition under Abiotic Constraints: Water Stress and Salinity. *Front Plant Sci* 8:851. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00851>
- Mitchell RJ, Hester AJ, Campbell CD, et al (2010) Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community? *Plant Soil* 333:417–430. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0357-7>
- Morandi D, Gollotte A, Camporota P (2002) Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus on the interaction of a binucleate *Rhizoctonia* species with Myc+ and Myc– pea roots. *Mycorrhiza* 12:97–102. <https://doi.org/10.1007/s00572-001-0154-5>
- Morris EK, Fletcher R, Veresoglou SD (2020) Effective methods of biofumigation: a meta-analysis. *Plant Soil* 446:379–392. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04352-y>
- Morrison TA, Kessler JR, Hatfield RD, Buxton DR (1994) Activity of two lignin biosynthesis enzymes during development of a maize internode. *J Sci Food Agric* 65:133–139. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650202>
- Mosse B, Bowen GD (1968) The distribution of *Endogone* spores in some Australian and New Zealand soils, and in an experimental field soil at Rothamsted. *Transactions of the British Mycological Society* 51:485–492. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(68\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(68)80015-4)
- Moukarzel R, Ridgway HJ, Guerin-Laguette A, Jones EE (2021) Grapevine rootstocks drive the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in New Zealand vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 131:2941–2956. <https://doi.org/10.1111/jam.15160>
- Mundt CC (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annu Rev Phytopathol* 40:381–410. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.011402.113723>
- Nadeem SM, Ahmad M, Zahir ZA, et al (2014) The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32:429–448. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
- Nair A, Kolet SP, Thulasiram HV, Bhargava S (2015) Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternata*. *Plant Biol J* 17:625–631. <https://doi.org/10.1111/plb.12277>
- Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G (2011) Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Bünemann E, Oberson A, Frossard E (eds) *Phosphorus in Action*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 215–243
- Nautiyal CS, Chauhan PS, Bhatia CR (2010) Changes in soil physico-chemical properties and microbial functional diversity due to 14 years of conversion of grassland to organic agriculture in semi-arid agroecosystem. *Soil and Tillage Research* 109:55–60. <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.04.008>
- Newman EI (1966) A Method of Estimating the Total Length of Root in a Sample. *The Journal of Applied Ecology* 3:139. <https://doi.org/10.2307/2401670>

- Njeru EM, Avio L, Sbrana C, et al (2014) First evidence for a major cover crop effect on arbuscular mycorrhizal fungi and organic maize growth. *Agronomy for Sustainable Development* 34:841–848. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0197-y>
- Noceto P-A, Bettenfeld P, Boussageon R, et al (2021) Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the development of quality traits in crop production, alone or combined with plant growth-promoting bacteria. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01054-1>
- Nogales A, Rottier E, Campos C, et al (2021) The effects of field inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi through rye donor plants on grapevine performance and soil properties. *Agriculture , Ecosystems and Environment* 313:. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107369>
- Ocón A, Hampp R, Requena N (2007) Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 174:879–891. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02048.x>
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, et al (2003) Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 69:2816–2824. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003>
- Ollat N, Peccoux A, Papura D, et al (2016) Rootstocks as a component of adaptation to environment. In: Gerós H, Chaves MM, Gil HM, Delrot S (eds) *Grapevine in a Changing Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 68–108
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe: *Arbuscular mycorrhizal fungal communities around the globe*. *Journal of Ecology* 94:778–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x>
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, et al (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188:223–241. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>
- Ordoñez YM, Fernandez BR, Lara LS, et al (2016) Bacteria with Phosphate Solubilizing Capacity Alter Mycorrhizal Fungal Growth Both Inside and Outside the Root and in the Presence of Native Microbial Communities. *PLoS ONE* 11:e0154438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154438>
- Ortas I, Akpınar Ç (2011) RESPONSE OF MAIZE GENOTYPES TO SEVERAL MYCORRHIZAL INOCULUMS IN TERMS OF PLANT GROWTH, NUTRIENT UPTAKE AND SPORE PRODUCTION. *Journal of Plant Nutrition* 34:970–987. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.555580>
- Paul BK, Vanlauwe B, Ayuke F, et al (2013) Medium-term impact of tillage and residue management on soil aggregate stability, soil carbon and crop productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 164:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.10.003>
- Pawlowska TE, Douds DD, Charvat I (1999) In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycological Research* 103:1549–1556.

<https://doi.org/10.1017/S0953756299008801>

- Pawlowska TE, Taylor JW (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427:733–737. <https://doi.org/10.1038/nature02290>
- Pelsy édérique, Merdinoglu D (2021) *La Vigne, Miracle de la Nature ? 70 Clés Pour Comprendre la Viticulture*. Quae, Versailles
- Peyret-Guzzon M, Stockinger H, Bouffaud M-L, et al (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations shift in response to short-term ploughing and fertilisation in a buffer strip. *Mycorrhiza* 26:33–46. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0644-5>
- Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, et al (2002) Molecular Analysis of the Nitrate-Reducing Community from Unplanted and Maize-Planted Soils. *Appl Environ Microbiol* 68:6121–6128. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6121-6128.2002>
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, et al (2007) Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176:197–210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02151.x>
- Poli A, Lazzari A, Prigione V, et al (2016) Influence of plant genotype on the cultivable fungi associated to tomato rhizosphere and roots in different soils. *Fungal Biology* 120:862–872. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.03.008>
- Powell KS (2008) Grape phylloxera: an overview. In: Johnson SN, Murray PJ (eds) *Root feeders: an ecosystem approach*. CABI, Wallingford, pp 96–114
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393–398. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>
- Prober SM, Leff JW, Bates ST, et al (2015) Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecol Lett* 18:85–95. <https://doi.org/10.1111/ele.12381>
- Randall GW, Iragavarapu TK (1995) Impact of Long-Term Tillage Systems for Continuous Corn on Nitrate Leaching to Tile Drainage. *Journal of Environmental Quality* 24:360–366. <https://doi.org/10.2134/jeq1995.00472425002400020020x>
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920–1921. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920>
- Redecker D, Raab P (2006) Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98:885–895. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832618>
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, et al (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23:515–531. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0486-y>
- Reiss ER, Drinkwater LE (2018) Cultivar mixtures: a meta-analysis of the effect of intraspecific diversity on crop yield. *Ecol Appl* 28:62–77. <https://doi.org/10.1002/eap.1629>
- Reiss ER, Drinkwater LE (2022) Promoting enhanced ecosystem services from cover crops using intra- and

- interspecific diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 323:107586. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107586>
- Rich MK, Courty P-E, Roux C, Reinhardt D (2017) Role of the GRAS transcription factor ATA/RAM1 in the transcriptional reprogramming of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida*. *BMC Genomics* 18:589. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3988-8>
- Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J Soil Sci* 84:355–363. <https://doi.org/10.4141/S04-003>
- Rillig MC, Wright SF, Eviner VT (2002) The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238:325–333. <https://doi.org/10.1023/A:1014483303813>
- Rodríguez-Loinaz G, Onaindia M, Amezaga I, et al (2008) Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry* 40:49–60. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.015>
- Romero P, Botía P, Navarro JM (2018) Selecting rootstocks to improve vine performance and vineyard sustainability in deficit irrigated Monastrell grapevines under semiarid conditions. *Agricultural Water Management* 209:73–93. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.07.012>
- Ronco MG, Ruscitti MF, Arango MC, Beltrano J (2008) Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83:497–505. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512413>
- Rosendahl S (2008) Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178:253–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02378.x>
- Rossdeutsch L, Schreiner RP, Skinkis PA, Deluc L (2021) Nitrate Uptake and Transport Properties of Two Grapevine Rootstocks With Varying Vigor. *Front Plant Sci* 11:608813. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608813>
- Ryan MH, Small DR, Ash JE (2000) Phosphorus controls the level of colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi in conventional and biodynamic irrigated dairy pastures. *Aust J Exp Agric* 40:663. <https://doi.org/10.1071/EA99005>
- Salazar S, Sánchez LE, Alvarez J, et al (2011) Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering* 37:1123–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.02.007>
- Samad A, Trognitz F, Compant S, et al (2017) Shared and host-specific microbiome diversity and functioning of grapevine and accompanying weed plants: Microbial communities associated with grapevine and vineyard weeds. *Environ Microbiol* 19:1407–1424. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13618>
- Sánchez-Castro I, Gianinazzi-Pearson V, Cleyet-Marel JC, et al (2017) Glomeromycota communities survive extreme levels of metal toxicity in an orphan mining site. *Science of The Total Environment*

598:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.084>

- Sanders IR, Alt M, Groppe K, et al (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130:419–427. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb01836.x>
- Sardans J, Peñuelas J (2005) Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry* 37:455–461. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.004>
- Sardans J, Peñuelas J, Estiarte M (2008) Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology* 39:223–235. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.011>
- Sasaki K, Ikeda S, Ohkubo T, et al (2013) Effects of Plant Genotype and Nitrogen Level on Bacterial Communities in Rice Shoots and Roots. *Microb Environ* 28:391–395. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12212>
- Scheublin TR, Van Logtestijn RSP, Van Der Heijden MGA (2007) Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *J Ecology* 95:631–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01244.x>
- Schofield EJ, Brooker RW, Rowntree JK, et al (2019) Plant-plant competition influences temporal dynamism of soil microbial enzyme activity. *Soil Biology and Biochemistry* 139:107615. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107615>
- Schüßler A, Walker C (2011) 7 Evolution of the ‘Plant-Symbiotic’ Fungal Phylum, Glomeromycota. In: Pöggeler S, Wöstemeyer J (eds) *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 163–185
- Serra I, Strever A, Myburgh PA, Deloire A (2014) Review: the interaction between rootstocks and cultivars (*Vitis vinifera* L.) to enhance drought tolerance in grapevine: Rootstocks to enhance drought tolerance in grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20:1–14. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12054>
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, et al (2012) Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *MPMI* 25:28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>
- Sierra CA (2012) Temperature sensitivity of organic matter decomposition in the Arrhenius equation: some theoretical considerations. *Biogeochemistry* 108:1–15. <https://doi.org/10.1007/s10533-011-9596-9>
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59:4211–4215. <https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4211-4215.1993>
- 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 Physiology* 156:1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
- Song F, Pan Z, Bai F, et al (2015) The Scion/Rootstock Genotypes and Habitats Affect Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community in Citrus. *Front Microbiol* 6: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01372>
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108:1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Spiewak R (2001) Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann Agric Environ Med* 8:1–5
- Steinauer K, Tilman D, Wragg PD, et al (2015) Plant diversity effects on soil microbial functions and enzymes are stronger than warming in a grassland experiment. *Ecology* 96:99–112. <https://doi.org/10.1890/14-0088.1>
- Stockinger H, Krüger M, Schübler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:461–474. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x>
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, et al (2014) The Largest Subunit of RNA Polymerase II as a New Marker Gene to Study Assemblages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Field. *PLoS ONE* 9:e107783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107783>
- Sun J, Miller JB, Granqvist E, et al (2015) Activation of Symbiosis Signaling by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Legumes and Rice. *The Plant Cell* 27:823–838. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131326>
- Tabatabai MA, Bremner JM (1972) Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 4:479–487. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90064-8)
- Tandonnet J-P, Cookson SJ, Vivin P, Ollat N (2009) Scion genotype controls biomass allocation and root development in grafted grapevine: Scion/rootstock interactions in grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16:290–300. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00090.x>
- Taylor A, Pereira N, Thomas B, et al (2015) Growth and nutritional responses to arbuscular mycorrhizal fungi are dependent on onion genotype and fungal species. *Biol Fertil Soils* 51:801–813. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1027-y>
- Taylor A, Walker C, Bending GD (2014) Dimorphic spore production in the genus *Acaulospora*. *Mycoscience* 55:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.03.001>
- Tedersoo L, Sánchez-Ramírez S, Kõljalg U, et al (2018) High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* 90:135–159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Thapa S, Prasanna R, Ranjan K, et al (2017) Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiological Research* 204:55–64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.07.007>
- Thioye B, Redecker D, van Tuinen D, et al (2020) Correction to: Tracing *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 in *Ziziphus mauritiana* roots under field conditions. *Mycorrhiza* 30:171–171.



<https://doi.org/10.1007/s00572-020-00935-1>

- Thonar C, Schnepf A, Frossard E, et al (2011) Traits related to differences in function among three arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 339:231–245. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0571-3>
- Tilman D, Lehman CL, Thomson KT (1997) Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:1857–1861. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1857>
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, et al (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:20117–20122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110>
- Tramontini S, Vitali M, Centioni L, et al (2013) Rootstock control of scion response to water stress in grapevine. *Environmental and Experimental Botany* 93:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.04.001>
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae = Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes : proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985
- Twerski A, Fischer C, Albrecht H (2021) Effects of rare arable plants on plant diversity, productivity and soil fertility in agricultural fields. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 307:107237. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107237>
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Letters* 11:296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- van der Heijden MGA, Horton TR (2009) Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97:1139–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01570.x>
- Van Geel M, Verbruggen E, De Beenhouwer M, et al (2017) High soil phosphorus levels overrule the potential benefits of organic farming on arbuscular mycorrhizal diversity in northern vineyards. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 248:144–152. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.017>
- Van Leeuwen C, Destrac-Irvine A (2017) Modified grape composition under climate change conditions requires adaptations in the vineyard. *OENO One* 51:147–154. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.2.1647>
- Van Overbeek L, Van Elsas JD (2008) Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.): Effects on bacterial communities associated with potato. *FEMS Microbiology Ecology* 64:283–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00469.x>

- Van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V (1998) PCR in Studies of AM Fungi: from Primers to Application. In: Varma A (ed) Mycorrhiza Manual. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 387–400
- Vellend M, Geber MA (2005) Connections between species diversity and genetic diversity: Species diversity and genetic diversity. *Ecology Letters* 8:767–781. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00775.x>
- Venios X, Korkas E, Nisiotou A, Banilas G (2020) Grapevine Responses to Heat Stress and Global Warming. *Plants* 9:1754. <https://doi.org/10.3390/plants9121754>
- Verbruggen E, Toby Kiers E (2010) Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems: AMF in agriculture. *Evolutionary Applications* 3:547–560. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00145.x>
- Viala P, Vermorel V (1905) *Traité Général de la Viticulture*, Masson et Cie. Paris
- Vidal M (2001) *Histoire de la vigne et des vins dans le monde: XIXe - XXe siècle*. Éd. Féret, Bordeaux
- Vila HF, Di Filippo ML, Venier M, Filippini MF (2016) How rootstocks influence salt tolerance in grapevine? The roles of conferred vigor and ionic exclusion. *Acta Hort* 145–154. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1136.20>
- Vink SN, Dini-Andreote F, Höfle R, et al (2021) Interactive Effects of Scion and Rootstock Genotypes on the Root Microbiome of Grapevines (*Vitis* spp. L.). *Applied Sciences* 11:1615. <https://doi.org/10.3390/app11041615>
- Vos CM, Tesfahun AN, Panis B, et al (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Applied Soil Ecology* 61:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.04.007>
- Wagg C, Jansa J, Stadler M, et al (2011) Mycorrhizal fungal identity and diversity relaxes plant–plant competition. *Ecology* 92:1303–1313. <https://doi.org/10.1890/10-1915.1>
- Wang Y, Zhang Y, Zhou S, Wang Z (2018) Meta-analysis of no-tillage effect on wheat and maize water use efficiency in China. *Science of The Total Environment* 635:1372–1382. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.202>
- Warschefsky EJ, Klein LL, Frank MH, et al (2016) Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes. *Trends in Plant Science* 21:418–437. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>
- Weidner S, Koller R, Latz E, et al (2015) Bacterial diversity amplifies nutrient-based plant–soil feedbacks. *Funct Ecol* 29:1341–1349. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12445>
- Welbaum GE, Sturz AV, Dong Z, Nowak J (2004) Managing Soil Microorganisms to Improve Productivity of Agro-Ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:175–193. <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>
- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot*

82:1198–1227. <https://doi.org/10.1139/b04-082>

- Wilson GWT, Hartnett DC (1998) Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *Am J Bot* 85:1732–1738. <https://doi.org/10.2307/2446507>
- Wilson GWT, Rice CW, Rillig MC, et al (2009) Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecology Letters* 12:452–461. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01303.x>
- Wipf D, Krajinski F, Tuinen D, et al (2019) Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytol* 223:1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>
- Yanling C, Jintao L, Shutang L (2018) Effect of long-term mineral fertilizer application on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Plant Soil Environ* 64:571–577. <https://doi.org/10.17221/658/2018-PSE>
- Yates CJ, Norton DA, Hobbs RJ (2008) Grazing effects on plant cover, soil and microclimate in fragmented woodlands in south-western Australia: implications for restoration: GRAZING EFFECTS IN FRAGMENTED WOODLANDS. *Austral Ecology* 25:36–47. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9993.2000.01030.x>
- Yu K, Pieterse CMJ, Bakker PAHM, Berendsen RL (2019) Beneficial microbes going underground of root immunity. *Plant Cell Environ* pce.13632. <https://doi.org/10.1111/pce.13632>
- Zaller JG, Cantelmo C, Santos GD, et al (2018) Herbicides in vineyards reduce grapevine root mycorrhization and alter soil microorganisms and the nutrient composition in grapevine roots, leaves, xylem sap and grape juice. *Environ Sci Pollut Res* 25:23215–23226. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2422-3>
- Zancarini A, Mougel C, Terrat S, et al (2013) Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant Soil* 365:183–199. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1364-7>
- Zhang D, Yan D, Cheng H, et al (2020) Effects of multi-year biofumigation on soil bacterial and fungal communities and strawberry yield. *Environmental Pollution* 256:113415. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113415>
- Zhang L, Marguerit E, Rossdeutsch L, et al (2016a) The influence of grapevine rootstocks on scion growth and drought resistance. *Theor Exp Plant Physiol* 28:143–157. <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0070-x>
- Zhang L, Xu M, Liu Y, et al (2016b) Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol* 210:1022–1032. <https://doi.org/10.1111/nph.13838>
- Zhang M, Wang W, Zhang Y, et al (2017) Effects of fungicide iprodione and nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate on soil enzyme and bacterial properties. *Science of The Total*

- Environment 599–600:254–263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.011>
- Zhao X, Liu S-L, Pu C, et al (2017) Crop yields under no-till farming in China: A meta-analysis. *European Journal of Agronomy* 84:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.11.009>
- Zombardo A, Crosatti C, Bagnaresi P, et al (2020a) Transcriptomic and biochemical investigations support the role of rootstock-scion interaction in grapevine berry quality. *BMC Genomics* 21:468. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06795-5>
- Zombardo A, Mica E, Puccioni S, et al (2020b) Berry Quality of Grapevine under Water Stress as Affected by Rootstock–Scion Interactions through Gene Expression Regulation. *Agronomy* 10:680. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050680>
- Zou Y-N, Srivastava AK, Ni Q-D, Wu Q-S (2015) Disruption of mycorrhizal extraradical mycelium and changes in leaf water status and soil aggregate stability in rootbox-grown trifoliate orange. *Front Microbiol* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00203>

## **Annexes**

### **Annexe 1 :**

Sportes et al. (2021). A historical perspective on mycorrhizal mutualism emphasizing arbuscular mycorrhizas and their emerging challenges. *Mycorrhiza*.

### **Annexe 2 :**

Leon et al. (2021). Evaluation of sown cover crops and spontaneous weed flora as a potential reservoir of black-foot pathogens in organic viticulture. *Biology*.

### **Annexe 3 :**

Gontier et al. (2021). Les couverts végétaux. Partie 2/2 : engrais verts en viticulture. *Revue des Œnologues* n°179.

### **Annexe 4 :**

Noceto et al. (2020). Les couverts végétaux. Partie 1/2 : Une pratique agroécologique au service de la vigne. *Revue des Œnologues* n°178.

### **Annexe 5 :**

Courty et al. (2020). L'agroforesterie, le futur de la viticulture ? *Revue des Œnologues* n°177.

### **Annexe 6 :**

Noceto et al. (2020). Les couverts végétaux. Un atout majeur pour réduire les intrants de synthèse et augmenter les services écosystémiques au vignoble. *Revue Viticulture Arboriculture Horticulture* vol. 52.



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

Sportes Antoine<sup>1</sup> · Mathilde Hériché<sup>1</sup> · Raphaël Boussageon<sup>1</sup> · Pierre-Antoine Noceto<sup>1</sup> · Diederik van Tuinen<sup>1</sup> · Daniel Wipf<sup>1</sup> · Pierre Emmanuel Courty<sup>1</sup>

Received: 24 June 2021 / Accepted: 15 September 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

## Abstract

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

**Keywords** Mycorrhiza · History · Functional analysis · Field management

## Introduction

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

---

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

Sportes Antoine  
antoine.sportes@inrae.fr

Mathilde Hériché  
mathilde.heriche@inrae.fr

Raphaël Boussageon  
raphael.boussageon@inrae.fr

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

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

Daniel Wipf  
daniel.wipf@inrae.fr

<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, Université de Bourgogne, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

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

## The nineteenth century: the "roots" of mycorrhiza

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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



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

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

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

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

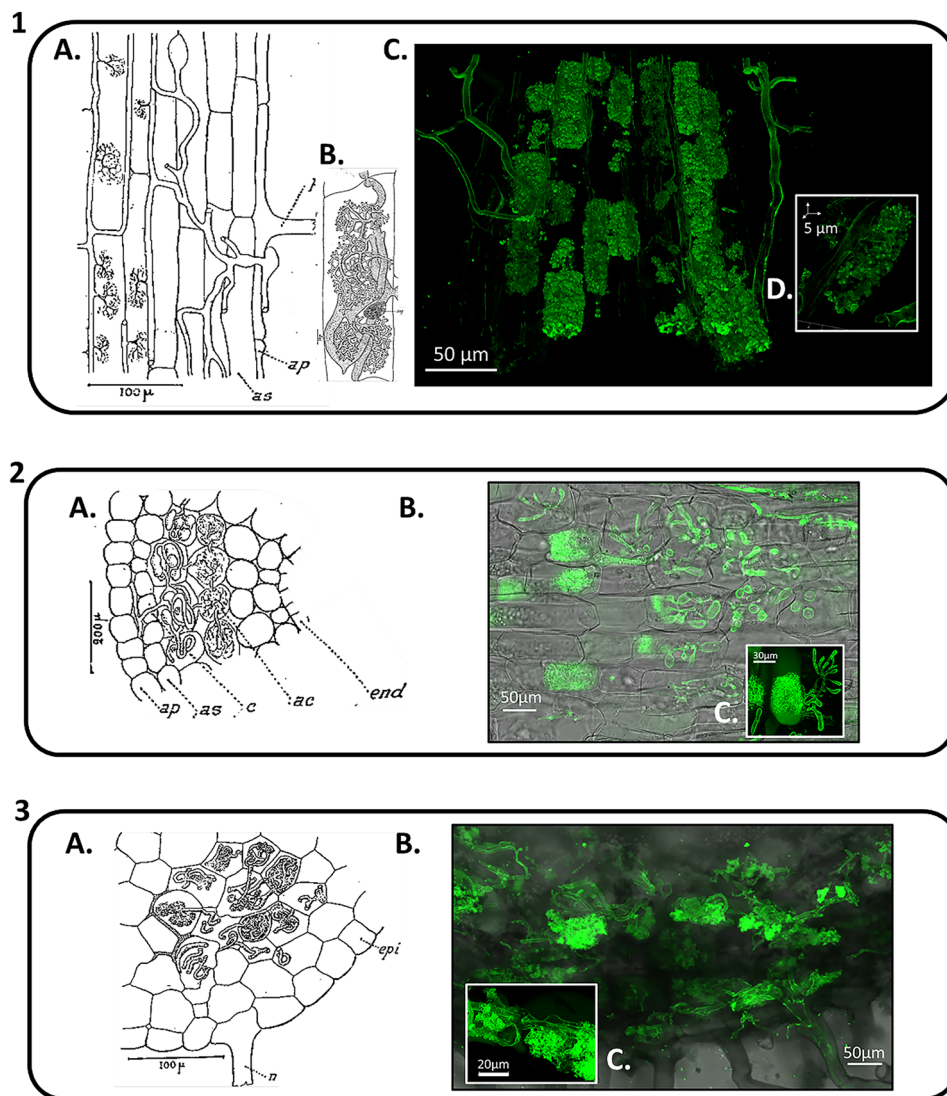
Despite the two World Wars, major advances occurred during the twentieth century. In 1904, Ernest Isidore Gallaud (1904) initially described fungal structures within plant roots, such as arbuscules (Fig. 2), previously named “undefined structures” by Janse (1897). Arbuscules are fungal extensions that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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

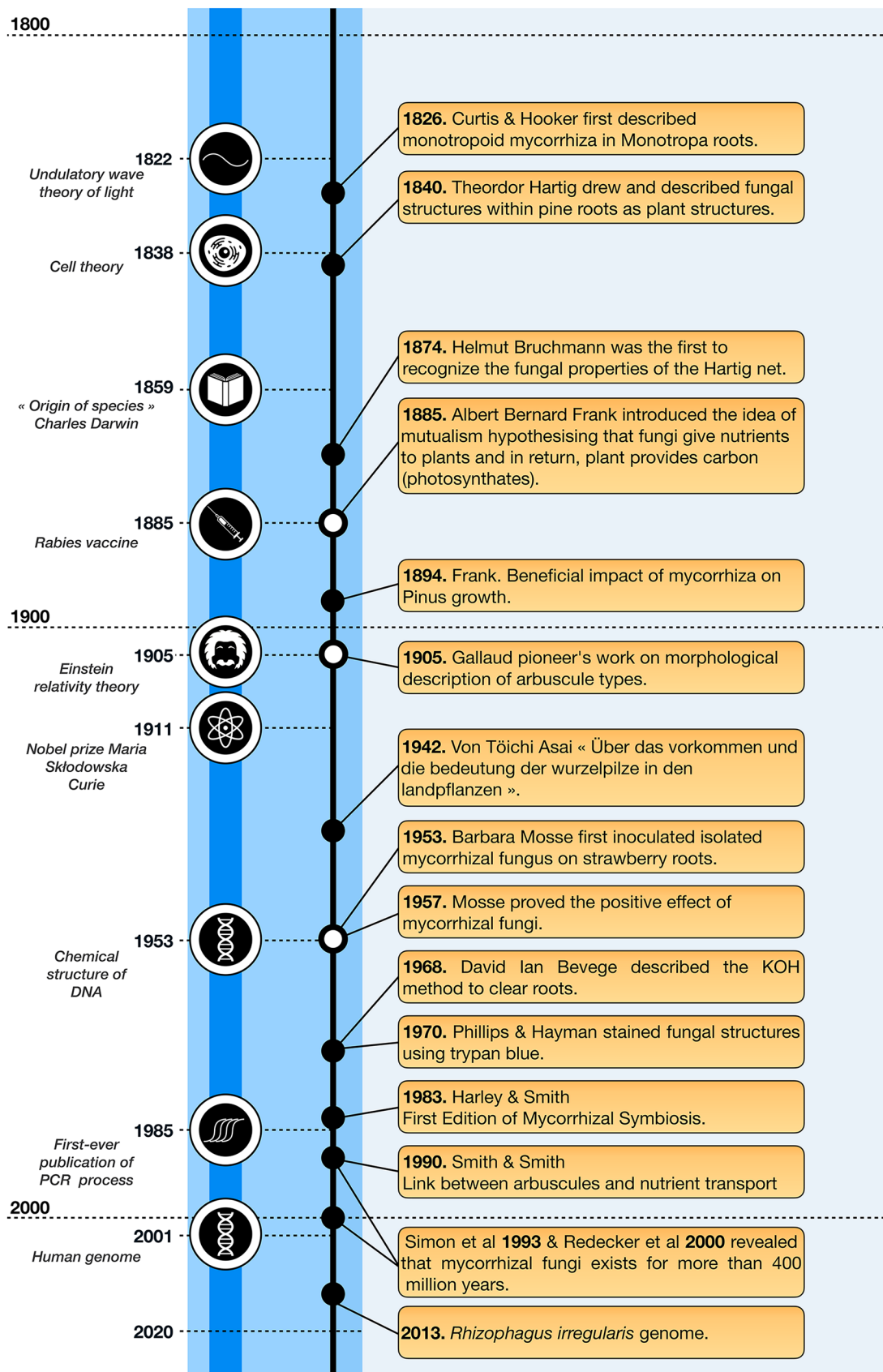


Fig. 3 Chronology, with key dates of the history of arbuscular mycorrhizal symbiosis

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

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

### Visual detection of arbuscular mycorrhiza

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

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

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

### Estimation of mycorrhizal colonization

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Place of arbuscular mycorrhiza among plant–microbe association concepts

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

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

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

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

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

### Toward successful management of arbuscular mycorrhiza in the field

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

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

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

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



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

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

## References

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

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

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

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

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

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

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

## Article

# Evaluation of Sown Cover Crops and Spontaneous Weed Flora as a Potential Reservoir of Black-Foot Pathogens in Organic Viticulture

Maela León <sup>1</sup>, Mónica Berbegal <sup>1</sup>, Paloma Abad-Campos <sup>1</sup>, Antonio Ramón-Albalat <sup>1</sup>, Tito Caffi <sup>2</sup>, Vittorio Rossi <sup>2</sup>, Gultakin Hasanaliyeva <sup>2</sup>, Pierre Antoine Noceto <sup>3</sup>, Daniel Wipf <sup>3</sup>, Saša Širca <sup>4</sup>, Jaka Razinger <sup>4</sup>, Anne-Laure Fragnière <sup>5</sup>, Patrik Kehrli <sup>5</sup>, Aurora Ranca <sup>6</sup>, Anamaria Petrescu <sup>6</sup> and Josep Armengol <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia, Spain; maela.leon@uv.es (M.L.); mobermar@etsia.upv.es (M.B.); pabadcam@eaf.upv.es (P.A.-C.); anraal@etsmre.upv.es (A.R.-A.)
  - <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili, Università Cattolica del Sacro Cuore, DIPROVES—Crop Protection Area, Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italy; tito.caffi@unicatt.it (T.C.); vittorio.rossi@unicatt.it (V.R.); gultakin.hasanaliyeva@unicatt.it (G.H.)
  - <sup>3</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Pôle IPM-ERL CNRS 6300, BP 86510, 17 rue Sully, CEDEX, 21065 Dijon, France; PierreAntoine.Noceto@inrae.fr (P.A.N.); daniel.wipf@inrae.fr (D.W.)
  - <sup>4</sup> Plant Protection Department, Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, Slovenia; sasa.sirca@kis.si (S.Š.); Jaka.Razinger@kis.si (J.R.)
  - <sup>5</sup> Agroscope, Route de Duillier 50, P.O. Box 1012, 1260 Nyon 1, Switzerland; anne-laure.fragniere@agroscope.admin.ch (A.-L.F.); patrik.kehrli@agroscope.admin.ch (P.K.)
  - <sup>6</sup> Calea Bucuresti, No.2, Murfatlar, 905100 Constanta, Romania; director@statiuneamurfatlar.ro (A.R.); cercetare@statiuneamurfatlar.ro (A.P.)
- \* Correspondence: jarmengo@eaf.upv.es; Tel.: +34-963879254



**Citation:** León, M.; Berbegal, M.; Abad-Campos, P.; Ramón-Albalat, A.; Caffi, T.; Rossi, V.; Hasanaliyeva, G.; Noceto, P.A.; Wipf, D.; Širca, S.; et al. Evaluation of Sown Cover Crops and Spontaneous Weed Flora as a Potential Reservoir of Black-Foot Pathogens in Organic Viticulture. *Biology* **2021**, *10*, 498. <https://doi.org/10.3390/biology10060498>

Academic Editors: Nic Pacini and Gustavo Caetano-Anollés

Received: 27 March 2021  
Accepted: 31 May 2021  
Published: 3 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Black-foot is an important grapevine disease caused by a soil-borne fungal pathogens complex, which are collectively known as *Cylindrocarpon*-like asexual morphs. In organic viticulture, both sown and native cover crop species can act as potential reservoirs of black-foot associated fungi. In our study a wide survey of cover crops grown in organic vineyards was conducted over a diverse range of climatic zones in six different European countries to acquire information about the presence of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs on their roots. Several fungal species associated with black-foot disease were found on some of the cover crops evaluated in all the countries. These results provide valuable information for a reasoned choice of cover crop species, or a species mix, that can be used in organic viticulture. This is particularly important for maximizing their benefits and reducing potential problems in vineyards.

**Abstract:** (1) Background. An extensive survey of grapevine-sown cover crops and spontaneous weed flora was conducted from 2019 to 2020 in organic vineyards in six European countries (France, Italy, Romania, Slovenia, Spain, Switzerland). Our main objective was to detect and identify the presence of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs species associated with black-foot disease on their roots. (2) Methods. Fungal isolations from root fragments were performed on culture media. *Cylindrocarpon*-like asexual morph species were identified by analyzing the DNA sequence data of the histone H3 (*his3*) gene region. In all, 685 plants belonging to different botanical families and genera were analyzed. *Cylindrocarpon*-like asexual morphs were recovered from 68 plants (9.9% of the total) and approximately 0.97% of the plated root fragments. (3) Results. Three fungal species (*Dactylonectria alcaerensis*, *Dactylonectria torresensis*, *Ilyonectria robusta*) were identified. *Dactylonectria torresensis* was the most frequent, and was isolated from many cover crop species in all six countries. A principal component analysis with the vineyard variables showed that seasonal temperatures and organic matter soil content correlated positively with *Cylindrocarpon*-like asexual morphs incidence. (4) Conclusions. The presence of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs on roots of cover crops suggests that they can potentially act as alternative hosts for long-term survival or to increase inoculum levels in vineyard soils.

**Keywords:** *Dactylonectria*; *Ilyonectria*; soil-borne fungi

## 1. Introduction

Black-foot is an important grapevine disease caused by a complex of soil-borne fungal pathogens belonging to different genera: *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria*, *Pleiocarpon*, and *Thelonectria*, which are collectively known today as *Cylindrocarpon*-like asexual morphs [1–4]. They are considered the commonest pathogenic fungi associated with young nursery vines/vineyards in many viticultural areas around the world [1,5]. Black-foot significantly impacts grapevine production by compromising the phytosanitary quality of the planting material produced in grapevine nurseries, and the performance of new plantations associated with the young vine decline syndrome [1].

The young vines affected by black-foot disease generally appear normal upon planting, but progressively develop a smaller rootstock diameter, reduced foliage with interveinal chlorosis, and a smaller leaf area over the next 3–5 years. Removing the bark off affected plants reveals black discoloration and necrosis of the basal wood tissues of rootstocks. Below-ground symptoms include low total root biomass, only a few feeder roots, and abundant necrotic root lesions [1,3].

Cover crops can be defined as managed vegetation grown between crop plant rows, including annual and perennial grass species [6]. A recent meta-analysis conducted by Winter et al. [7] concluded that intensive vegetation management in vineyards significantly contributed to providing multiple ecosystem services (ES), such as excellent habitats for pests' natural enemies, improved carbon sequestration, etc. The planting of cover crops in vineyards might, thus, enhance the soil structure, improve nutrient retention and provision, and increase soil microbial diversity and populations of beneficial microbes [8]. A 3 year study conducted by Diti et al. [9] showed an 85% reduction in soil erosion, a 55% increase in ground water retention, and a 15% improvement in soil carbon sequestration while applying innovative (e.g., cover cropping) soil management in vineyards compared to the traditional system.

Soil-borne fungi and nematodes are relevant damaging agents of grapevines, whose management has been indicated as one of today's major challenges for a more sustainable viticulture [10,11]. Many publications have reported the beneficial effects of cover crops for controlling nematodes and soil-borne pathogens in vineyards. Diverse cover crop species, either with or without biofumigation properties, have been used to suppress the plant-parasitic nematodes that affect grapevines, such as *Meloidogyne* spp. (root-knot nematode) and *Xiphinema* spp. (dagger nematode) [12–14].

Research into soil-borne fungal pathogens has focused on the black-foot disease of grapevines. *Brassica* biofumigation has given promising results in both in vitro and in planta to control black-foot disease pathogens in Australia and New Zealand [15,16]. Berlanas et al. [5] evaluated the effect of white mustard (*Sinapis alba* L.) cover crop residue treatment on controlling black-foot disease in grapevines. These authors found that white mustard biofumigation not only lowered the inoculum of *Dactylonectria torresensis*, but also the incidence and severity of black-foot disease. Vukicevich et al. [17] sampled vineyard sites located in the southern Okanagan Valley (British Columbia, Canada) with different groundcover vegetation and irrigation management systems to investigate effects on *Ilyonectria* spp. abundance. The results showed that *Ilyonectria* spp. increased with the abundance of forbs and exotic species, although only the relation with forbs was consistent across sampling periods. Later, Richards et al. [18] conducted greenhouse experiments to evaluate whether cover crop diversity was able to reduce black-foot disease symptoms and *Ilyonectria liriodendri* abundance in soil by using different combinations of native and common cover crops. When grown alone, white mustard was the only cover crop associated with reduced necrotic root damage in grapevine cuttings cv. Chardonnay and



*Ilyonectria* abundance. The suppressive effects of white mustard largely disappeared when paired with other cover crops.

Some of these results indicate that the inoculum of generalist soil-borne plant pathogens, such as *Cylindrocarpon*-like asexual morphs, could build up on certain alternate host plants. Agustí-Brisach et al. [19] isolated black-foot pathogens from the roots of 26 weed species collected in grapevine rootstock mother fields, open-root field nurseries, and commercial vineyards in Spain. Indeed, a reasoned choice of cover crop species or species mix is particularly important in maximizing their benefits and reducing potential problems in vineyards.

Based on these findings, it is necessary to collect further information about the potential of grapevine cover crops, both sown and native species, as alternative hosts for black-foot disease. The present work conducted an extensive survey of grapevine-sown cover crops and spontaneous weed flora from 2019 to 2020 in organic vineyards in six European countries (France, Italy, Romania, Slovenia, Spain, and Switzerland). Our main objective was to detect and identify the presence of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs species associated with black-foot disease on their roots. This research work is one of the objectives of the European CORE Organic Cofund BIOVINE project (2018–2021, <https://www.biovine.eu> (accessed on 1 June 2021)). The strategies developed in the BIOVINE project exploit plant diversity in and around vineyards (e.g., cover, hedges) by planting selected plant species to control pests and to promote mycorrhization by, thus, providing organic winegrowers with alternative solutions to pesticides. Our main objective was to acquire new information about the presence of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs on the roots of cover crops by accurately identifying them using suitable molecular tools, and to look for potential new fungal species/host combinations and fungal species/country records.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Plots and Vineyards

Experimental plots were set up in organically managed vineyards in 2019 and 2020 in six European countries (France, Italy, Romania, Slovenia, Spain, and Switzerland) in which diverse sown or native cover crop species were grown according to the project objectives, to investigate pest control improvement, and to evaluate functional biodiversity and the provision of ES. The location and characteristics of these vineyards are shown in Table 1.

**Table 1.** Characteristics of the experimental vineyards from which the sown or native cover crop species samples were collected.

Country	Location	Cultivar	Rootstock	Age (Years)	Soil Texture	Soil pH	Organic Matter	Rainfall Jan–Oct (mm)		Mean Temperature Jan–Oct (°C)	
								2019	2020	2019	2020
France	Premeaux-Prissey (Burgundy)	Pinot Noir	Teleki 5C	20	silty-clay	5.8	3.0%	–	1060	–	10.1
Italy	Res Uvea farm in Castell'Arquato (Piacenza)	Croatina	Kober 5BB	20	silty-clay-loam	6.9	1.3%	1422	921	10.0	9.8
Romania	Murfatlar vineyard, (Dobrodgea region)	Feteasca neagra	SO4	18	loam	7.9	2.3%	354	400	9.7	9.5
Slovenia	Hruševica, Vinakras (Primorska region)	Refošk	SO4	2	loam	5.3	2.8%	1352	1358	10.0	9.6
Spain	Villar del Arzobispo (Valencia province)	Cabernet Sauvignon	110 Richter	10	clay-loam	8.3	2.6%	223	444	14.1	14.1
Switzerland	Nyon	Chasselas	Rootstock 3309	23	loam	7.8	2.4%	1075	1025	7.5	8.2

## 2.2. Sampling and Fungal Isolation

In each experimental vineyard, the selected cover crop species samples (five plants per sample grown for at least 1.5 months) were collected in summer or autumn (Tables 2 and 3). For some species, several samples were collected from different subplots in the same experimental vineyards. In 2019, 56 samples were examined (France  $n = 0$ ; Italy  $n = 20$ ; Romania  $n = 12$ ; Slovenia  $n = 4$ ; Spain  $n = 3$ ; Switzerland  $n = 17$ ), as were 81 samples in 2020 (France  $n = 23$ ; Italy  $n = 14$ ; Romania  $n = 8$ ; Slovenia  $n = 4$ ; Spain  $n = 7$ ; Switzerland  $n = 25$ ). This resulted in 137 samples. In the laboratory, the roots of each plant were carefully washed under running tap water to rinse away soil, to then be visually inspected to find evidence of root lesions with necrosis.

**Table 2.** Fifty-six samples of the planted and native cover crop species collected in experimental vineyards in six European countries in 2019, with indications of the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs isolated from their roots.

France	Romania (Summer)	Spain (Autumn)	
Not evaluated	1. <i>Lolium perenne</i> 2. <i>Lolium perenne</i> 3. <i>Onobrychis</i> sp. 4. <i>Onobrychis</i> sp. 5. <i>Sinapis</i> sp. 6. <i>Sinapis</i> sp. 7. <i>Tagetes erecta</i> L. 8. <i>Tagetes erecta</i> <b>9. <i>Trifolium repens</i> DT (P1/1; P2/1)</b> <b>10. <i>Trifolium repens</i> DT (P4/1)</b> 11. <i>Vicia faba</i> L. 12. <i>Vicia faba</i>	1. <i>Cyperus rotundus</i> L. 2. <i>Diplotaxis eruroides</i> (L.) DC. <b>3. <i>Salsola kali</i> L. DT (P1/1)</b>	
Italy (Summer)	Slovenia (Summer)	Switzerland (Summer)	Switzerland (Autumn)
1. <i>Armoracia rusticana</i> G. Gaertn., B. Mey. & Scherb. <b>2. <i>Armoracia rusticana</i> DT (P2/1) <sup>a</sup></b> 3. <i>Armoracia rusticana</i> 4. <i>Lolium perenne</i> L. 5. <i>Lolium perenne</i> 6. <i>Lolium perenne</i> 7. <i>Onobrychis viciifolia</i> Scop 8. <i>Onobrychis viciifolia</i> 9. <i>Onobrychis viciifolia</i> 10. <i>Sinapis</i> sp. 11. <i>Sinapis</i> sp. 12. <i>Sinapis</i> sp. 13. <i>Trifolium repens</i> L. 14. <i>Trifolium repens</i> <b>15. <i>Trifolium repens</i> DT (P1/1)</b> 16. <i>Trifolium repens</i> 17. <i>Trifolium repens</i> 18. <i>Vicia sativa</i> L. 19. <i>Vicia sativa</i> 20. <i>Vicia sativa</i>	<b>1. <i>Phacelia</i> sp. DT (P2/1)</b> 2. <i>Sinapis alba</i> L. 3. <i>Trifolium incarnatum</i> L. 4. <i>Vicia pannonica</i> Crantz	1. <i>Bromus tectorum</i> L. <b>2. <i>Geranium columbinum</i> L. DT (P1/1; P2/1)</b> 3. <i>Hordeum murinum</i> L. 4. <i>Lolium perenne</i> <b>5. <i>Plantago lanceolata</i> L. DT (P1/2; P4/1)</b> <b>6. <i>Trifolium repens</i> DT (P1/1)</b>	1. <i>Bromus tectorum</i> <b>2. <i>Hordeum murinum</i> DT (P1/2)</b> <b>3. <i>Lolium perenne</i> DT (P4/1; P5/1)</b> 4. <i>Lolium perenne</i> <b>5. <i>Medicago maculata</i> Willd. DT (P3/1; P5/2)</b> <b>6. <i>Plantago lanceolata</i> DT (P2/1; P4/1; P5/3)</b> 7. <i>Plantago lanceolata</i> DT (P1/2) 8. <i>Sanguisorba minor</i> Scop. <b>9. <i>Trifolium repens</i> DT (P1/5; P2/1)</b> <b>10. <i>Trifolium repens</i> DT (P3/1)</b> 11. <i>Veronica persica</i> Poir.

<sup>a</sup> The cover crop species in bold indicate a positive isolation of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs, which are indicated as follows: DT = *Dactylonectria torresensis* (infected plant number from 5 evaluated plants/number of obtained isolates).

**Table 3.** Eighty-one samples of the planted and native cover crop species collected in experimental vineyards in six European countries in 2020, with indications of the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs isolated from their roots.

France (Autumn)	Romania (Summer)	Spain (Summer)	Italy (Summer)	Slovenia (Autumn)	Switzerland (Summer)	Switzerland (Autumn)
1. <i>Arenaria serpyllifolia</i> L. 2. <i>Avena strigosa</i> Schreb. <b>3. <i>Brassica carinata</i> L. DT (P4/1) <sup>a</sup></b> 4. <i>Brassica carinata</i> 5. <i>Geranium</i> sp. 6. <i>Lathyrus sativus</i> L. 7. <i>Lens culinaris</i> Medik. 8. <i>Linum usitatissimum</i> L. 9. <i>Pisum sativum</i> L. 10. <i>Pisum sativum</i> <b>11. <i>Pisum sativum</i> IR (P1/1)</b> 12. <i>Raphanus sativus</i> L. <i>longipinnatus</i> Bailey <b>13. <i>Raphanus sativus longipinnatus</i> DT (P2/1; P4/1)</b> 14. <i>Secale cereale</i> L. <b>15. <i>Trifolium alexandrinum</i> DT (P4/2)</b> <b>16. <i>Trifolium alexandrinum</i> DT (P1/1; P4/3)</b> <b>17. <i>Trifolium alexandrinum</i> DT (P1/1; P4/1)</b> <b>18. <i>Trifolium subterraneum</i> L. DT (P3/1; P5/1)</b> 19. <i>Vicia faba</i> 20. <i>Vicia faba</i> <b>21. <i>Vicia villosa</i> DT (P5/1)</b> <b>22. <i>Vicia villosa</i> DT (P2/1; P4/1)</b> 23. <i>Vicia villosa</i>	1. <i>Lolium perenne</i> 2. <i>Lolium perenne</i> 3. <i>Onobrychis</i> sp. 4. <i>Onobrychis</i> sp. 5. <i>Sinapis</i> sp. 6. <i>Sinapis</i> sp. 7. <i>Tagetes erecta</i> 8. <i>Tagetes erecta</i>	1. <i>Anacyclus clavatus</i> (Desf.) Pers. 2. <i>Avena sterilis</i> L. <b>3. <i>Cichorium intybus</i> L. DT (P5/1)</b> 4. <i>Conyza sumatrensis</i> (Retz.) E. Walker 5. <i>Plantago albicans</i> L. <b>6. <i>Sonchus oleraceus</i> L. DT (P3/1)</b> 7. <i>Xanthium orientale</i> L. <i>subsp. italicum</i> (Moretti) Greuter	1. <i>Armoracia rusticana</i> 2. <i>Armoracia rusticana</i> 3. <i>Armoracia rusticana</i> 4. <i>Lolium perenne</i> 5. <i>Lolium perenne</i> 6. <i>Onobrychis viciifolia</i> 7. <i>Sinapis</i> sp 8. <i>Sinapis</i> sp <b>9. <i>Trifolium repens</i> DT (P4/1)</b> 10. <i>Trifolium repens</i> 11. <i>Trifolium repens</i> 12. <i>Vicia sativa</i> 13. <i>Vicia sativa</i> 14. <i>Vicia sativa</i>	1. <i>Raphanus sativus</i> L. 2. <i>Raphanus</i> sp. <b>3. <i>Rorippa sylvestris</i> (L.) Bess. DT (P3/7; P5/1)</b> <b>4. <i>Sinapis alba</i> DT (P5/1)</b>	1. <i>Lolium perenne</i> <b>2. <i>Lolium perenne</i> DT (P3/1; P4/1; P5/1)</b> 3. <i>Lolium perenne</i> 4. <i>Lolium perenne</i> 5. <i>Plantago lanceolata</i> 6. <i>Plantago lanceolata</i> 7. <i>Plantago lanceolata</i> 8. <i>Plantago lanceolata</i> <b>9. <i>Prunella vulgaris</i> L. DT (P1/1; P4/1; P5/1)</b> 10. <i>Trifolium repens</i> <b>11. <i>Trifolium repens</i> DT (P1/1)</b> 12. <i>Trifolium repens</i> 13. <i>Trifolium repens</i>	1. <i>Lolium perenne</i> <b>2. <i>Lolium perenne</i> DT (P1/1; P5/1)</b> 3. <i>Lolium perenne</i> 4. <i>Lolium perenne</i> <b>5. <i>Plantago lanceolata</i> DT (P4/1; P5/2)</b> 6. <i>Plantago lanceolata</i> <b>7. <i>Plantago lanceolata</i> DT (P1/1; P3/1; P4/2)</b> <b>8. <i>Plantago lanceolata</i> DA (P4/1) and DT (P1/1)</b> <b>9. <i>Taraxacum officinale</i> Weber et Wiggers DT (P2/1; P3/1; P4/1; P5/1) and IR (P3/1)</b> <b>10. <i>Taraxacum officinale</i> DT (P1/2; P2/3; P4/1)</b> <b>11. <i>Trifolium repens</i> DT (P2/1)</b> 12. <i>Trifolium repens</i>

<sup>a</sup> The cover crop species in bold indicate the positive isolation of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs, which are indicated as follows: DA = *Dactylonectria alcaerensis*, DT = *D. torresensis*, IR = *Ilyonectria robusta* (infected plant number from 5 evaluated plants/number of obtained isolates).

In order to isolate *Cylindrocarpon*-like asexual morphs, root fragments were cut only from necrotic areas, which were surface-disinfested for 1 min in 1.5% sodium hypochlorite solution, and washed twice with sterile distilled water. Then, 14 small root pieces were plated per plant on malt extract agar (MEA) supplemented with 0.5 g L<sup>-1</sup> of streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (MEAS) (7 fragments for every 2 Petri plates). Plates were incubated for 7–10 days at 25 °C in the dark, and all emerging colonies were transferred to potato dextrose agar (PDA) (Biokar-Diagnostics, Zac de Ther, France).

The preliminary morphological identification of the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs colonies was conducted by observing the cultural and microscope characters (mycelium aspect, colony color, conidia type) of the isolates grown on PDA and synthetic nutrient-poor agar (SNA), with or without the addition of two 1 cm<sup>2</sup> pieces of sterile filter paper on the medium. Petri plates were incubated at 25 °C for 3 weeks under mixed white and near-UV light and with a 12 h photoperiod [1,4].

Then, 93 isolates of the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs were selected for the molecular analyses and characterization (Tables 2 and 3). For this purpose, these isolates were firstly single-spored by the serial dilution method [20]. For long-term storage, the agar plugs with mycelium and the conidia from these cultures were stored in 15% glycerol solution at –80 °C in 1.5 mL cryovials at the fungal collection of the Instituto Agroforestal Mediterráneo of the Universitat Politècnica de València (Spain).

### 2.3. DNA Isolation, Sequencing and Phylogenetic Analyses

For DNA extraction, the fungal mycelium and conidia from the pure cultures grown on PDA for 2–3 weeks at 25 °C in the dark were scraped and transferred to a 2 mL screw-capped conical tube (Thermo Scientific, San Diego, CA, USA) containing four metal 2.38 mm beads (Qiagen, Hilden, Germany) and two tungsten carbide 3 mm beads (Qiagen Hilden, Germany). Total genomic DNA was extracted with the E.Z.N.A. Plant Miniprep Kit (Omega Bio-tek, Doraville, GA, USA) following the manufacturer's instructions. The homogenization step was performed twice at 5 m/s for 20 s using FastPrep-245G (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). DNA was visualized by electrophoresis on 1% agarose gels stained with REALSAFE (REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution 20,000×, Durviz S. L., Valencia, Spain) and stored at –20 °C.

In order to identify the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs species, partial sequences of the histone H3 (*his3*) gene region, which is a very informative locus [21], was amplified. PCR amplifications were carried out using 1× PCR buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer, 1 U of Taq polymerase (Canvac Biotech, S.L., Córdoba, Spain), and 1 µL of template DNA (20 ng/µL). The PCR reaction mix was adjusted to a final volume of 25 µL with ultrapure sterile water (Chromasolv Plus<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research) cycle conditions were: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. The primers used for *his3* were CYLH3F and CYLH3R [22]. After confirmation by agarose gel electrophoresis, PCR products were sequenced in both directions by the MacroGen Inc., Sequencing Center (The Netherlands, Europe).

### 2.4. Principal Component Analysis

Experimental vineyards and soil characteristics variables (Table 1), including the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs incidence, were subjected to a principal component analysis (PCA) to group the different tested fields and to reduce the observed variables to a smaller number of principal components (artificial variables) to account for most of the variance in the observed variables. The PCA analysis was performed with the Statgraphics Centurion XV (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA).

Sequences were assembled and edited to resolve ambiguities, and the consensus sequences for all the isolates were compiled in a single file (Fasta format) with the Sequencher software v. 5.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), and were compared

to those in the NCBI Genbank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and a phylogenetic analysis. The GenBank his3 sequences from *Dactylonectria* and *Ilyonectria* reference species were selected based on their high similarity to our query sequences with MegaBLAST. They were added to the sequences obtained and aligned using ClustalW [23]. A maximum parsimony analysis was performed by MEGA X [24] with the tree bisection and reconnection (TBR) algorithm, where gaps were processed as missing data.

### 3. Results

#### 3.1. *Cylindrocarpon*-Like Asexual Morphs Detection and Identification

*Cylindrocarpon*-like asexual morphs were obtained from the roots of the cover crop samples in the vineyards of all the surveyed countries. The isolations on culture media yielded 93 isolates: 34 isolates were obtained in 2019, and 59 in 2020 (Tables 2 and 3). In all, 685 plants were analyzed, and 9590 root fragments were plated on MEAS. *Cylindrocarpon*-like asexual morphs were recovered from 68 plants (9.9% of the total) and from approximately 0.97% of the plated root fragments.

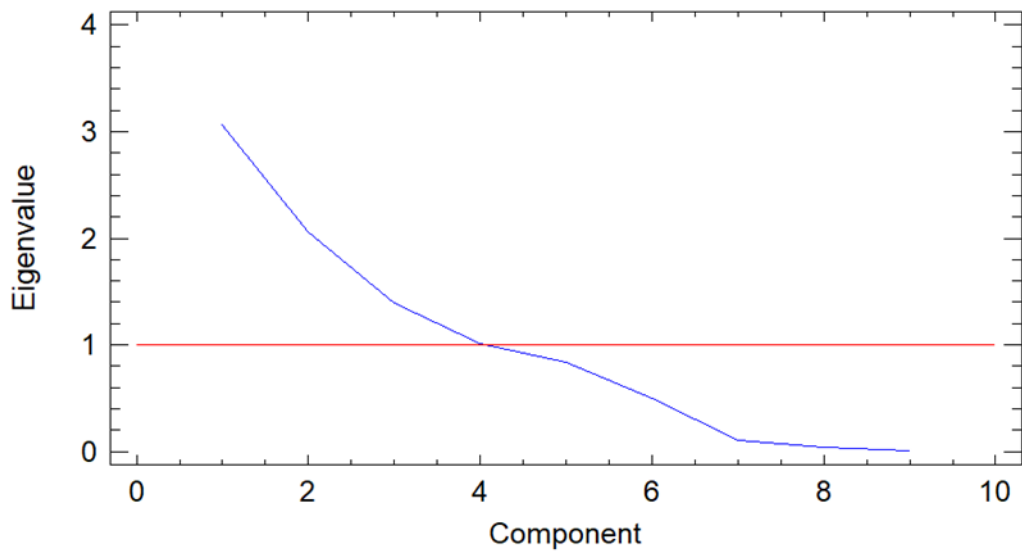
The color of the colonies of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs on PDA varied from white to yellow, or from light to dark brown, with a cottony mycelium. Based on the microscopic observations, all the isolates produced macroconidia and microconidia, as described by Cabral et al. [25], and Agustí-Brisach and Armengol [1]. The DNA sequence data using primers CYLH3F and CYLH3R showed high homologies ( $\geq 99\%$ ) to the reference sequences in the NCBI Genbank database, which confirmed the identification of the 93 isolates as belonging to species *Dactylonectria alcacerensis* (one isolate), *Dactylonectria torresensis* (90 isolates), and *Ilyonectria robusta* (two isolates) (Tables 2 and 3).

The fungal species identified in this study were found to be associated with diverse cover and typical vineyard weeds, and also with grass-cover crop genera and species, the most frequent being *Plantago lanceolata* (13 infected plants), *Trifolium repens* (11), *Lolium perenne* (seven), *Taraxacum officinale* (seven), and *Trifolium alexandrinum* (seven). In general, the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs isolation showed some preference for plants belonging to the family *Fabaceae*, as 24 isolates (=26%) were recovered in this taxon and several species were infected: *Medicago maculata*, *Pisum sativum*, *Trifolium alexandrinum*, *Trifolium repens*, and *Vicia villosa*. However, they were also quite frequent on *Asteraceae*, *Plantaginaceae* and *Poaceae* species.

Regarding the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs, the species *Dactylonectria alcacerensis* was recovered only from *Plantago lanceolata*, *Ilyonectria robusta* from *Pisum sativum* and *Taraxacum officinale*, and *Dactylonectria torresensis*, the most frequent fungal species, from the other infected cover crops.

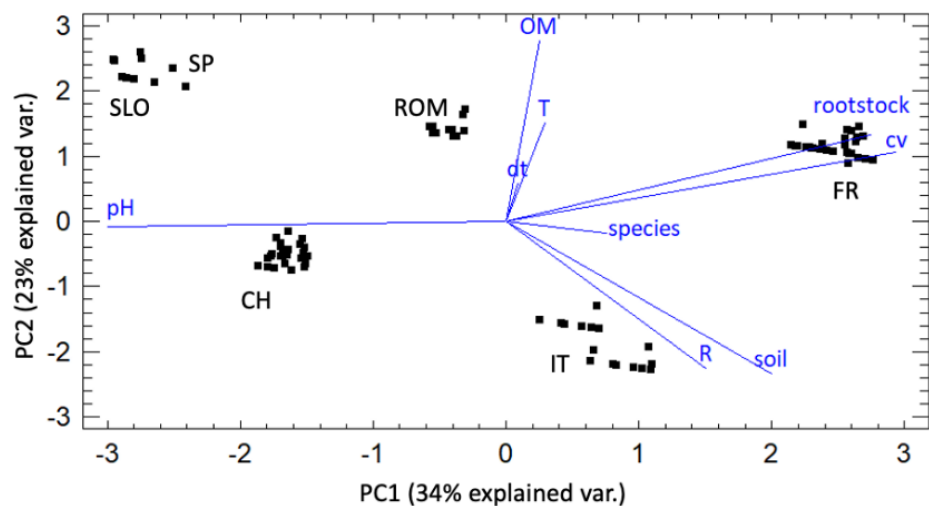
#### 3.2. Principal Component Analysis

The purpose of the PCA was to obtain a few linear combinations of the original variables that account for most data variability. In this case, four components were extracted as four components had eigenvalues over or equaling 1.0. Together they accounted for 83.65% of the variability in the original data (Figure 1).



**Figure 1.** Screen plot of the principal component analysis (PCA) of soil characteristics between eigenvalues and principal components.

The obtained biplot (Figure 2) shows the data grouped for sampling country, and the effect of the different variables on the first two components selected in the PCA, which together explained 57% of data variability. Seasonal temperatures (T) and organic matter soil content (OM) correlated positively with the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs incidence (dt) and strongly affected PC2, while total season rainfall (R) was negatively correlated and affected PC1. The silty-clay loam soils (as characterized in France and Italy) correlated negatively with dt. The rootstocks and cultivar characteristics of the observed vineyards, as well as soil pH did not correlate with the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs incidence, despite them strongly impacting PC1.



**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) of the six studied vineyards in 2019 and 2020. The percentage values in parentheses correspond to the variance explained by each principal component (dt = *Cylindrocarpon*-like asexual morphs incidence; OM = organic matter soil content; R = total season rainfall; T = seasonal temperatures).

#### 4. Discussion

The present study characterized a large collection of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs collected from the roots of cover crop species grown in organic vineyards in different European countries for the first time. Although the percentages of isolation from

plants were low, it was not generally difficult to obtain the fungal colonies of the black-foot-associated pathogens from the roots of the diverse cover crop species belonging to the different botanical families and genera included in this study. This confirms current knowledge about these fungal pathogens being ubiquitous because they have been reported in most world grapevine-producing regions, as well as them being saprobes in soil, occurring on dead plant substrates, or acting as latent pathogens or endophytic organisms [1,26]. Black-foot disease caused by *Cylindrocarpon*-like asexual morphs is considered one of the most destructive grapevine diseases in newly established vineyards, mainly due to early infections in grapevine propagation material during the grafting process performed in grapevine nurseries [1,3].

An analysis of DNA sequences allowed three species to be identified, which belong to two genera, namely, *Dactylonectria alcacerensis*, *Dactylonectria torresensis*, and *Ilyonectria robusta*. *Dactylonectria torresensis* was the most frequent species, being isolated from many cover crop species in all six countries. This corroborates previous research findings which have indicated that *Dactylonectria torresensis* is currently considered the most frequent pathogen associated with black-foot disease of grapevine, and has been described in important wine-producing countries, like Australia, Italy, New Zealand, Portugal, Spain, South Africa, and the United States [4,27]. As far as we know, our study is the first report of *Dactylonectria torresensis* in Romania, Slovenia, and Switzerland, and on most of the hosts where this species was found.

Regarding the other less frequent *Cylindrocarpon*-like asexual morph species found in our study, *Dactylonectria alcacerensis* and *Ilyonectria robusta* are also well-known grapevine pathogens associated with black-foot disease of grapevines [28,29]. To the best of our knowledge, our study is the first to report *Dactylonectria alcacerensis* on *Plantago lanceolata*, and of *Ilyonectria robusta* on *Pisum sativum* and *Taraxacum officinale*.

Our study has certain similarities to the previous research carried out by Agustí-Brisach et al. [19], who sampled weeds in grapevine rootstock mother fields, open-root field nurseries, and commercial vineyards in Spain to evaluate them as potential hosts of black-foot pathogens. These authors successfully isolated the species *Cylindrocarpon macrodidymum* from the roots of 15 out of 19 evaluated weed families, and from 26 of 52 weed species. We cannot directly compare our results to those obtained by Agustí-Brisach et al. [19] because the taxonomy of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs has been revised several times since its publication. Studies based on multigene phylogeny and morphological comparisons have contributed to describing new genera and species in this group of pathogens [21,25,30], which are currently included in the following genera: *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria*, *Pleiocarpon*, *Thelonectria* [2–4].

A more recent study from Canada has assessed the effect of groundcover vegetation on entomopathogenic fungi (represented by *Beauveria bassiana*) abundance and *Ilyonectria* spp. in vineyards [17]. These authors found that plant community characteristics were related to the fungal abundance for both studied fungi groups. Specifically, *Ilyonectria* spp. increased with the abundance of forbs and exotic species with increasing OM and the use of dual/sprinkler irrigation systems. It is worth pointing out here that, in their study, *Beauveria bassiana* increased with the presence of *Fabaceae* species, similarly to what occurred in our study, with a high isolation rate for the *Cylindrocarpon*-like asexual morphs from the plants belonging to this botanical family, and also with the isolation of *Ilyonectria robusta* from *Pisum sativum*.

The presence of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs on roots of cover crops, and spontaneously found weeds and grasses, suggested that they could potentially act as alternative hosts for long-term inoculum survival or to increase inoculum levels in vineyard soils. Work on invasive plant species has evidenced that generalist pathogens, such as *Cylindrocarpon*-like asexual morphs, can build up on exotic species with negligible effects on these plants [31]. Agustí-Brisach et al. [32] detected the presence of *Ilyonectria* spp. and quantified its inoculum on the soil samples collected from commercial nurseries located in the Valencian region (central-eastern Spain) using multiplex nested PCR and

quantitative PCR. These authors concluded that the ability to detect and quantify *Ilyonectria* spp. genomic DNA in grapevine nursery soils confirmed that they were important sources of inoculum for black-foot pathogens. More recent research, in which the presence of inoculum of *Cylindrocarpon*-like anamorphs on vineyard soil samples has been evaluated by using semiselective culture media [27] and high-throughput amplicon sequencing and a quantitative PCR approach [33,34], also revealed the abundance of viable propagules of black-foot pathogens in vineyard soils, and the prevalence of *Dactylonectria* and *Ilyonectria* species in the grapevine soil microbiome, respectively.

*Cylindrocarpon*-like asexual morphs readily produce conidia, and some species also produce chlamydospores on culture, which indicates that these propagules are likely to be produced on the diseased roots and stem bases of infected vines. Conidia are dispersed in soil water and chlamydospores can allow these fungi to survive in soil for extended time periods [1,26,27]. Berlanas et al. [27] quantified viable propagules of black-foot disease pathogens in a diverse range of grapevine-cultivated soils and investigated their relation to soil properties. In their study, tested soil physicochemical variables from different fields were subjected to a PCA. The results showed that the inocula of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs was present in all soil types, and only a relation was found between calcium carbonate and the colony-forming units of these fungi in soil. Our PCA results fall in line with those obtained by Berlanas et al. [27]. Moreover, an interesting outcome was about the organic matter content in soil, which has not been previously highlighted, and could represent a new factor to be considered when evaluating the risk of black-foot agents in vineyards. This specific aspect should be deeply further investigated to be confirmed. Our results also agree with a previous study that demonstrated that *Cylindrocarpon*-like asexual morphs have abilities to be active in soil over wide pH, temperature, and water potential ranges [35]. These pathogens infect grapevines through natural openings or wounds, such as the non-callused parts of lower trunks. Infection can also occur through wounds in canes, such as disbudding wounds, from which infection progresses downwardly to the base of trunks [26]. In fact, pathogenicity tests conducted by Agustí-Brisach et al. [19] already showed that the black-foot isolates obtained from weeds were able to induce typical black-foot disease symptoms when they were inoculated on grapevine cuttings and could, thus, be a source of inoculum for grapevine infections.

## 5. Conclusions

The results obtained in our study emphasize the importance of selecting the best suited cover crop species for their use in organic viticulture. They can also have implications for previous land use, nursery soil management, or weed management practices in both grapevine nurseries and vineyards. It still remains unclear if the ES provided by cover crop species are not hampered by the promotion of negative plant–soil feedback.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.L., M.B., P.A.-C., and J.A.; methodology, M.L., M.B., P.A.-C., A.R.-A., J.A., T.C., V.R., G.H., P.A.N., D.W., S.Š., J.R., A.-L.F., P.K., A.R., and A.P.; formal analysis, M.L., M.B., P.A.-C., A.R.-A., and J.A.; investigation, M.L., M.B., P.A.-C., A.R.-A., J.A., T.C., V.R., G.H., P.A.N., D.W., S.Š., J.R., A.-L.F., P.K., A.R., and A.P.; data curation, M.L., A.R.-A., and J.A.; writing—original draft preparation, M.L. and J.A.; writing—review and editing, M.L., M.B., P.A.-C., A.R.-A., J.A., T.C., V.R., G.H., P.A.N., D.W., S.Š., J.R., A.-L.F., P.K., A.R., and A.P.; visualization, M.L. and J.A.; supervision, M.L. and J.A.; project administration, M.L., M.B., P.A.-C., and J.A.; funding acquisition, J.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Financial support for carrying out this research was provided by the transnational funding bodies that are partners of the H2020 ERA-net project, CORE Organic Cofund, and the cofund from the European Commission (PCI2018-093015/Project BIOVINE).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank J.M. Rodríguez-Reina for his technical support and H.L. Warburton for English language revision.



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Agustí-Brisach, C.; Armengol, J. Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathol. Mediterr.* **2013**, *52*, 245–261.
- Carlucci, A.; Francesco, L.; Mostert, L.; Halleen, F.; Raimondo, M.L. Occurrence fungi causing black-foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. *Phytopathol. Mediterr.* **2017**, *56*, 10–39.
- Gramaje, D.; Urbez-Torres, J.R.; Sosnowski, M.R. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 12–39. [[CrossRef](#)]
- Aigoun-Mouhous, W.; Elena, G.; Cabral, A.; León, M.; Sabaou, N.; Armengol, J.; Chaouia, C.; Mahamedi, A.E.; Berraf-Tebbal, A. Characterization and pathogenicity of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs associated with black-foot disease in Algerian grapevine nurseries, with the description of *Pleioicarpion algeriense* sp. nov. *Eur. J. Plant Pathol.* **2019**, *154*, 887–901. [[CrossRef](#)]
- Berlanas, C.; Andrés-Sodupe, M.; López-Manzanares, B.; Maldonado-González, M.M.; Gramaje, D. Effect of white mustard cover crop residue, soil chemical fumigation and *Trichoderma* spp. root treatment on black-foot disease control in grapevine. *Pest. Manag. Sci.* **2018**, *74*, 2864–2873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vukicevich, E.; Lowery, T.; Bowen, P.; Urbez-Torres, J.R.; Hart, M. Cover crops to increase soil microbial diversity and decline in perennial agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 48. [[CrossRef](#)]
- Winter, S.; Bauer, T.; Strauss, P.; Kratschmer, S.; Paredes, D.; Popescu, D.; Landa, B.; Guzmán, G.; Gómez, J.A.; Guernion, M.; et al. Effects of vegetation management intensity on biodiversity and ecosystem services in vineyards: A meta-analysis. *J. Appl. Ecol.* **2018**, *55*, 2484–2495. [[CrossRef](#)]
- Finney, D.M.; Buyer, J.S.; Kayne, J.P. Living cover crops have immediate impacts on soil microbial community structure and function. *J. Soil Water Conserv.* **2017**, *72*. [[CrossRef](#)]
- Diti, I.; Legler, S.E.; Caffi, T.; Rossi, V.; Canali, G.; Bosso, A.; Cancila, E.; Anelli, S.; Trioli, G.; Kleshcheva, E.; et al. A new integrated approach for management of soil threats in the vineyard ecosystem. *Catena* **2020**, *195*, 104788. [[CrossRef](#)]
- Pertot, I.; Caffi, T.; Rossi, V.; Mugnai, L.; Hoffmann, C.; Grando, M.S.; Gary, C.; Lafond, D.; Duso, C.; Thiery, D.; et al. A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Prot.* **2017**, *97*, 70–84. [[CrossRef](#)]
- Marín, D.; Armengol, J.; Carbonell-Bejerano, P.; Escalona, J.M.; Gramaje, D.; Hernández-Montes, E.; Intrigliolo, D.S.; Martínez-Zapater, J.M.; Medrano, H.; Miras-Ávalos, J.M.; et al. Challenges of viticulture adaptation to global change: Tackling the issue from the roots. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2021**, *27*, 8–25. [[CrossRef](#)]
- Walker, G.E.; Stirling, G.R. Plant-parasitic nematodes in Australian viticulture: Key pests, current management practices and opportunities for future improvements. *Australas. Plant. Pathol.* **2008**, *37*, 268–278. [[CrossRef](#)]
- Baginsky, C.; Contreras, A.; Covarrubias, J.I.; Seguel, O.; Aballay, E. Control of plant-parasitic nematodes using cover crops in table grape cultivation in Chile. *Cienc. Investig. Agrar.* **2013**, *40*, 547–557. [[CrossRef](#)]
- Kruger, D.H.M.; Fourie, J.C.; Malan, A.P. Cover crops with biofumigation properties for the suppression of plant-parasitic nematodes: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2013**, *34*, 287–295. [[CrossRef](#)]
- Barbour, J.E.; Ridgway, H.J.; Jones, E.E. Influence of mustard biofumigation on growth, conidial germination and propagule recovery of *Ilyonectria macrodidyma*-complex species. *Phytopathol. Mediterr.* **2014**, *53*, 582–583.
- Withelaw-Weckert, M.; Rahman, M.; Capello, J.; Bartrop, K. Preliminary findings on the grapevine yield response to *Brassica* biofumigation soil. *Phytopathol. Mediterr.* **2014**, *53*, 587.
- Vukicevich, E.; Lowery, D.T.; Bennet, J.A.; Hart, M. Influence of ground cover vegetation, soil physicochemical properties, and irrigation practices on soil fungi in semi-arid vineyards. *Front. Ecol. Evol.* **2019**, *7*, 118. [[CrossRef](#)]
- Richards, A.; Estaki, M.; Urbez-Torres, J.R.; Bowen, P.; Lowery, T.; Hart, M. Cover crop diversity as a tool to mitigate vine decline and reduce pathogens in vineyard soils. *Diversity* **2020**, *12*, 128. [[CrossRef](#)]
- Agustí-Brisach, C.; Gramaje, D.; León, M.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and petri disease pathogens. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 803–810. [[CrossRef](#)]
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. *Basic Plant Pathology Methods*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1995; 448p.
- Cabral, A.; Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black-foot disease of grapevines. *Fungal Biol.* **2012**, *116*, 62–80. [[CrossRef](#)]
- Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Risède, J.M.; Simoneau, P.; Hywel-Jones, N.L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: Species with sphaeropedunculate vesicles. *Stud. Mycol.* **2004**, *50*, 415–430.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680. [[CrossRef](#)]
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
- Cabral, A.; Groenewald, J.Z.; Rego, C.; Oliveira, H.; Crous, P.W. *Cylindrocarpon* root rot: Multi-gene analysis reveals novel species within *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycol. Prog.* **2012**, *11*, 655–688. [[CrossRef](#)]
- Halleen, F.; Fourie, P.H.; Crous, P.W. A review of black-foot disease of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* **2006**, *45*, S55–S67.

27. Berlanas, C.; López-Manzanares, B.; Gramaje, D. Estimation of viable propagules of black-foot disease pathogens in grapevine cultivated soils and their relation to production systems and soil properties. *Plant Soil*. **2017**, *417*, 467–479. [[CrossRef](#)]
28. Cabral, A.; Rego, C.; Crous, P.W.; Oliveira, H. Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* **2012**, *51*, 340–354. [[CrossRef](#)]
29. Berlanas, C.; Ojeda, S.; López-Manzanares, B.; André-Sodupe, M.; Bujanda, R.; Martínez-Diz, M.P.; Díaz-Losada, E.; Gramaje, D. Occurrence and diversity of black-foot disease fungi in symptomless grapevine nursery stock in Spain. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 94–104. [[CrossRef](#)]
30. Lombard, L.; Van Der Merwe, A.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. Lineages in Nectriaceae: Re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathol. Mediterr.* **2014**, *53*, 515–532.
31. Mangla, S.; Callaway, R.M. Exotic invasive plant accumulates native soil pathogens which inhibit native plants. *J. Ecol.* **2008**, *96*, 58–67. [[CrossRef](#)]
32. Agustí-Brisach, C.; Mostert, L.; Armengol, J. Detection and quantification of *Ilyonectria* spp. associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex nested PCR and quantitative PCR. *Plant Path.* **2014**, *63*, 316–322. [[CrossRef](#)]
33. Berlanas, C.; Berbegal, C.; Elena, G.; Laidani, M.; Cibriain, J.F.; Sagües, A.; Gramaje, D. The fungal and bacterial rhizosphere microbiome associated with grapevine rootstock genotypes in mature and young vineyards. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nerva, L.; Moffa, L.; Giudice, G.; Giorgianni, A.; Tomasi, D.; Chitarra, W. Microscale analysis of soil characteristics and microbiomes reveals potential impacts on plants and fruit: Vineyard as a model case study. *Plant Soil* **2021**, *462*, 525–541. [[CrossRef](#)]
35. Agustí-Brisach, C.; Armengol, J. Effects of temperature, pH and water potential on mycelial growth, sporulation and chlamydospore production in culture of *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot of grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* **2012**, *51*, 37–50.

# Les couverts végétaux

## Partie 2/2: Engrais verts en viticulture

Laure Gontier<sup>1</sup>, Mathilde Hériché<sup>2</sup>, Pierre-Antoine Noceto<sup>2</sup>, Daniel Wipf<sup>2</sup>, Pierre-Emmanuel Courty<sup>2</sup>, Jean-Yves Cahurel<sup>3</sup>, Benoît Bazerolle<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Université de Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Le cycle de l'azote

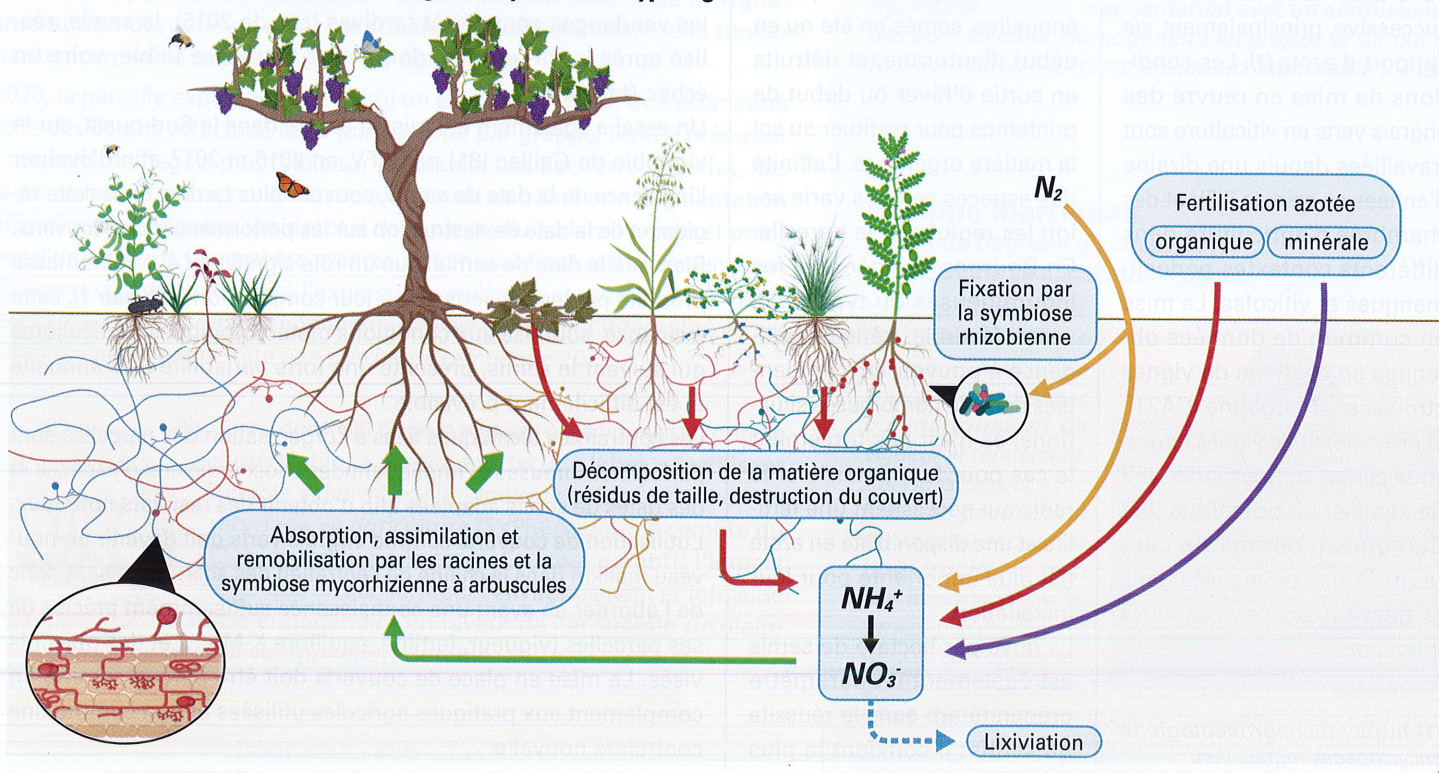
L'enjeu consiste à optimiser la gestion de l'azote (N) disponible pour la vigne par la maîtrise du couvert à la fois en termes d'espèces présentes et de chronologie des pratiques. L'azote est l'élément le plus abondant dans l'atmosphère. C'est également un élément crucial de la vie en tant que composant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

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

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

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

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



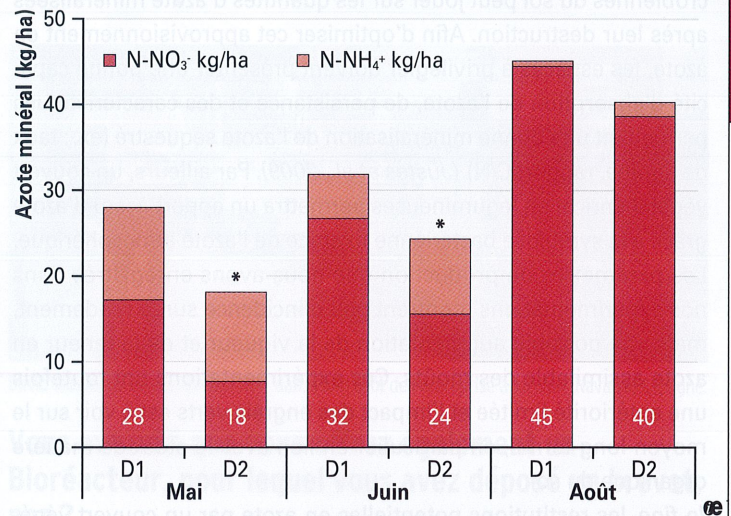
Dans presque tous les écosystèmes des climats tempérés et dans les sols cultivés, les plantes, mais aussi les champignons et les bactéries associées, absorbent préférentiellement le  $\text{NH}_4^+$  et le  $\text{NO}_3^-$  plutôt que les acides aminés ou d'autres molécules organiques azotées (Courty *et al.*, 2015). Le  $\text{NO}_3^-$  est la source d'azote la plus importante et la plus disponible pour les cultures; il est présent à des concentrations de l'ordre du milli-molaire (mM) dans les sols et il est bien plus mobile (plusieurs mm par jour) que le  $\text{NH}_4^+$  (adsorbé sur les sites d'échange de cations du sol).

L'azote organique présent dans l'humus, les matières organiques labiles (ex. : effluents d'élevage) et d'autres sous-produits de l'activité humaine constitue une source d'azote importante pour la fertilisation des sols. La majeure partie de cet azote organique n'est pas directement assimilable par les plantes. Deux processus liés principalement à l'activité bactérienne du sol permettent de rendre l'azote assimilable par les plantes: la minéralisation (qui produit du  $\text{NH}_4^+$ ) et la nitrification (transformation du  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NO}_3^-$ ). La nitrification ainsi que la minéralisation sont des processus pouvant aller de quelques jours à quelques semaines en fonction de la qualité et de la quantité de matière organique, et des conditions pédo-climatiques. Enfin, le  $\text{NO}_3^-$ , plus mobile, peut être entraîné par les eaux de surface et de ruissellement hors

de portée des racines: c'est la lixiviation.

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

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



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

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

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

## VITICULTURE

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

### BIODYNAMIE : tradition et savoir-faire

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

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

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

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

collection  
**Avenir Œnologie**

Livres de la collection Avenir Œnologie disponibles sur [www.oeno.tm.fr](http://www.oeno.tm.fr)  
Bulletin de commande en page 1 de la revue.

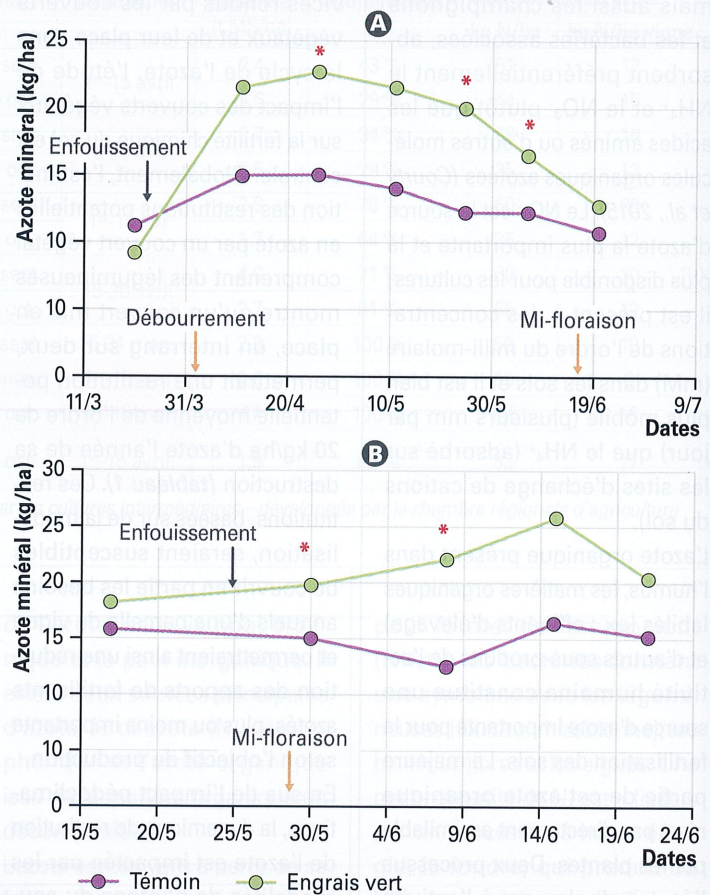
nitrique, ou nitrate, résiduel dans le sol, et ainsi d'en réduire les pertes par lixiviation et de limiter la contamination des eaux souterraines. De par leur action de piégeage de l'azote durant leur croissance, la dégradation des couverts intercalaires par les communautés microbiennes du sol peut jouer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

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

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

**NDLR** : Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur le site internet de la Revue des Œnologues : [search.oeno.tm.fr](http://search.oeno.tm.fr)

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

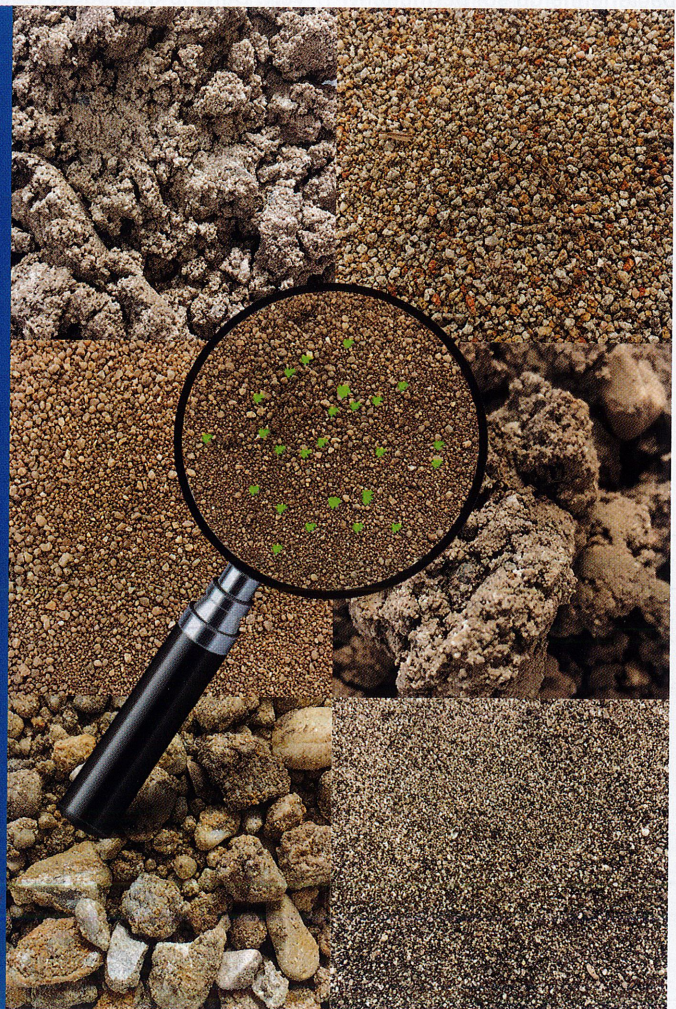


## LES ANALYSES AGRONOMIQUES EXCELL

Apprenez de la vitalité biologique de vos sols

**excell**  
L'EXPERTISE ANALYTIQUE

Pour plus de renseignements  
[secretariat@labexcell.com](mailto:secretariat@labexcell.com)



# Les couverts végétaux

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

Pierre-Antoine Noceto<sup>1</sup>, Mathilde Hériché<sup>1</sup>, Laure Gontier<sup>2</sup>, Daniel Wipf<sup>1</sup>, Benoît Bazerolle<sup>3</sup>, Jean-Yves Cahurel<sup>4</sup>, Pierre-Emmanuel Courty<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Université de Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

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

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

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

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

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

### Valorisation des services écosystémiques et de la biodiversité

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

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

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

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

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

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

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

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

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

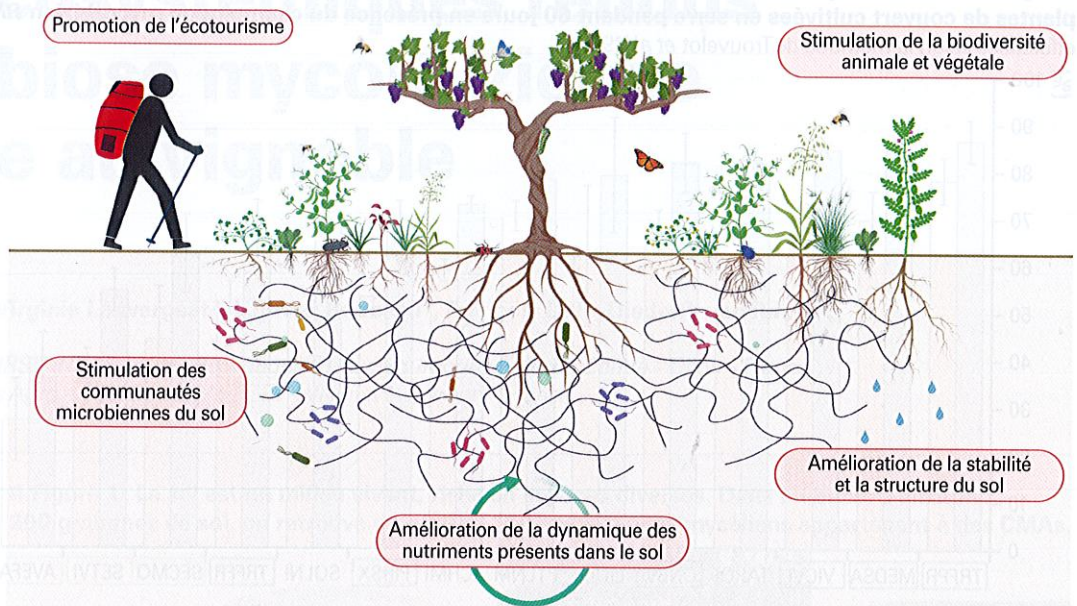
– **l'enherbement temporaire semé** permet l'installation d'un panel choisi d'espèces végétales adaptées aux objectifs du viticulteur ; la sélection des plantes de couvert se faisant sur les paramètres pédoclimatiques du vignoble et les services apportés par les plantes. Il est par exemple possible d'installer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

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

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

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

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



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

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

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

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

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



**Château Pontus de Tyard**  
ses vignes conservatoires, son vin

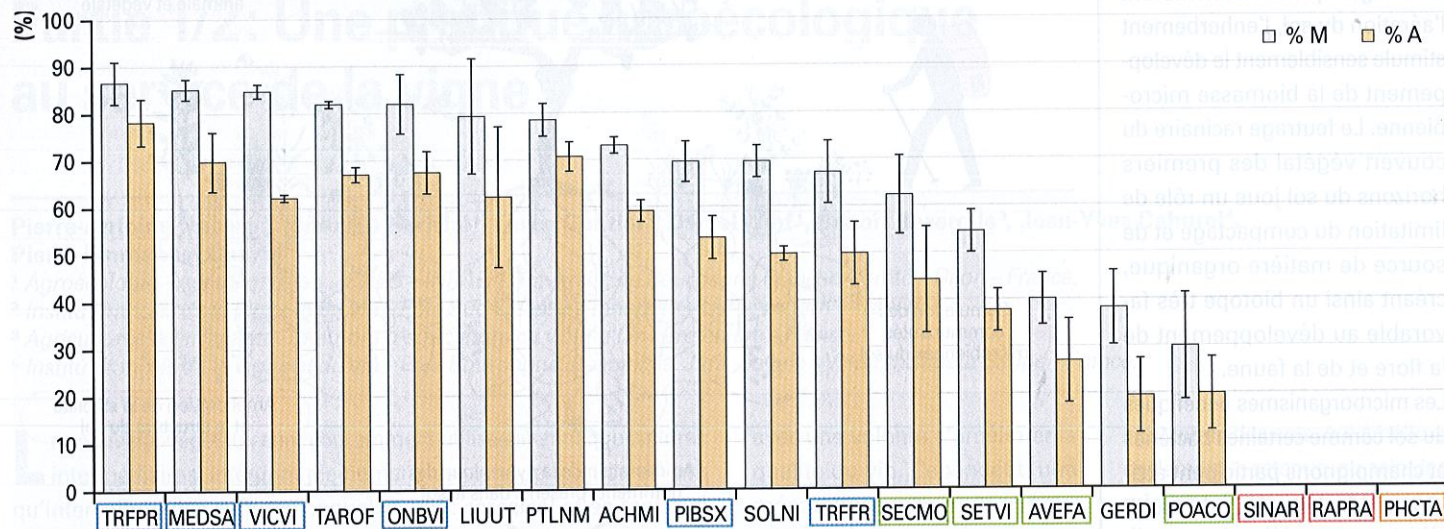
Les actes des Journées Pontus de Tyard\*  
« Biodiversité et patrimoine viticoles »  
de 2012 à 2019 sont disponibles

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

Pour les éditions papier ou téléchargeables, consulter :  
[www.pontus-de-tyard.com](http://www.pontus-de-tyard.com)



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



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

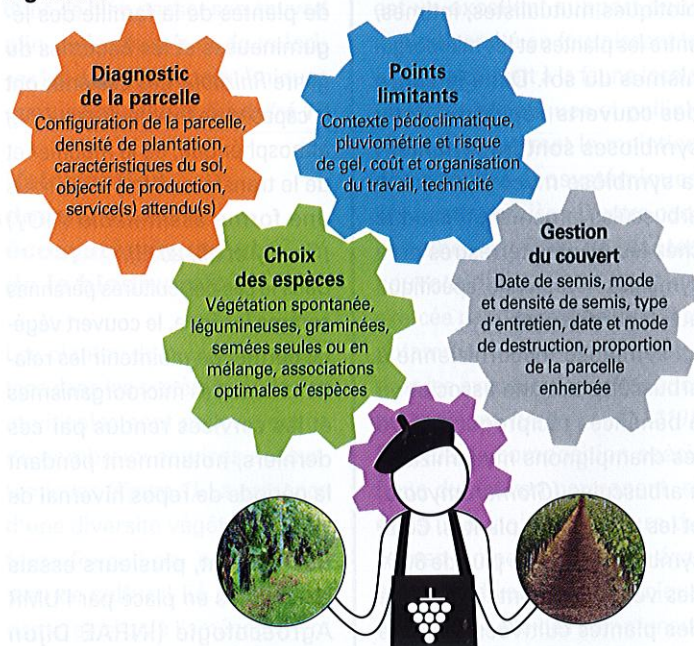
bourache officinale) ne forment aucune structure mycorhizienne (figure 2). Chez les plantes communément classées comme adventices en agronomie, nous observons que plusieurs d'entre elles (ex. : pissenlit, achillée) sont capables d'interagir fortement avec les champignons mycorhiziens, parfois même plus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

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

## Conclusion

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

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



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

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

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

**NDLR:** Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur le site internet de la Revue des Enologues: [search.oeno.tm.fr](http://search.oeno.tm.fr)

# L'agroforesterie, le futur de la viticulture ?

Pierre-Emmanuel Courty<sup>1</sup>, Christine Lobry<sup>2</sup>, Pierre-Antoine Noceto<sup>1</sup>, Alexandre Parizel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie – AgroSup Dijon – CNRS – INRAE – Université de Bourgogne Franche-Comté – Dijon – France.

<sup>2</sup> Filières et productions végétales – Chambre d'agriculture de la Dordogne – Périgueux – France.

<sup>3</sup> Association française d'Agroforesterie – Auch – France.

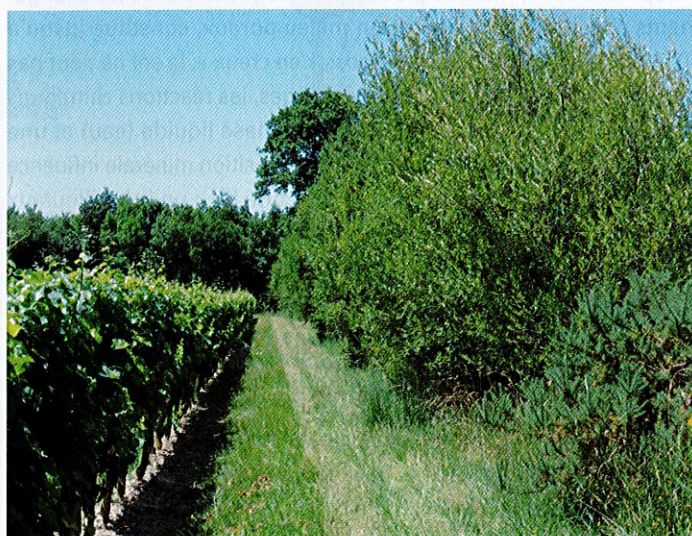
« L'agroforesterie est l'association sur une même parcelle d'une végétation arborée et/ou arbustive, et d'une production végétale, animale ou mixte. Les espèces ligneuses peuvent être réparties uniformément, inégalement ou en bordure de parcelle. Les systèmes agroforestiers fournissent des services écosystémiques et des produits et ce à différentes échelles ; parcelle, exploitation agricole, unité paysagère » (RRAF, 2018). La productivité de ces systèmes dépend de la différence nette entre les avantages et les coûts, entre les utilisations et les composantes biophysiques de l'agroenvironnement. Dans les systèmes de cultures intercalaires, les avantages des arbres sont à la fois économiques et écologiques : (i) ils produisent du bois, (ii) préservent les sols en améliorant leur structure et favorisent la biodiversité, (iii) réduisent la vitesse du vent et l'évaporation du sol, (iv) augmentent le stockage du carbone dans les parties aériennes (tronc, houppier) et dans le sol (transfert à des microorganismes telluriques), (v) améliorent les taux de matières organiques contenus dans les sols, (vi) ils recyclent les éléments nutritifs lessivés grâce à leur système racinaire et (vii) favorisent la résilience du système agricole face au changement climatique. Un système agroforestier bien dimensionné est compatible avec le matériel agricole standard. En revanche, dans des conditions limitantes, il est très important

de définir la bonne combinaison arbre/culture et de prendre en compte les contraintes de la station pour placer le bon arbre au bon endroit.

L'agroforesterie n'est pas une « nouvelle » technique, mais une redécouverte des atouts de l'arbre pour les cultures et notamment pour la vigne. Depuis l'antiquité, les Grecs et les Romains associaient les arbres avec la vigne. Au Moyen Âge, plusieurs techniques telles que les oullières (ex. : culture intercalée d'oliviers entre les rangs de vigne en Provence), les hautains (ex. : vigne sur un saule comme tuteur) et les joualles (ex. : vignes conduites sous des fruitiers dans le Périgord) étaient utilisées en zone viticole.

Actuellement, les associations arbres-vignes sont extrêmement différentes : arbres dispersés, en îlots, alignés entre les rangs de vigne, avec des écartements variables, ou plantés en bordure de parcelle (photos 1). Les essences d'arbres ou d'arbustes qui peuvent être implantées sont elles aussi très diverses : arbres fruitiers à coque (ex. : amandier, noyer), à pépins (ex. : pommier, figuier) et à noyaux (ex. : abricotier, pêcher) mais aussi les espèces champêtres (ex. : peuplier, mûrier). Les espèces d'arbres peuvent également être reliées au travail du viticulteur comme le saule qui produit de l'osier utile pour lier les sarments. Dans les systèmes arbres-vignes et outre la strate arborée/arbustive, on peut également trouver une

■ Photos 1 : Haie en bordure de parcelle viticole et alignement d'arbres au sein d'une parcelle viticole.



SOURCE : © ASSOCIATION FRANÇAISE D'AGROFORESTERIE

strate herbacée composée de plantes maraîchères, d'un enherbement permanent ou temporaire.

Ces différents systèmes observés en agroforesterie viticole sont encore rares. Les plus vieilles vignes conduites en agroforesterie intraparcélaire, connues à ce jour en France et faisant l'objet d'évaluations, ont été plantées à la fin des années 1990. L'impact de l'arbre agroforestier en contexte viticole sur certains paramètres physiologiques et édaphiques a été analysé sur six parcelles dans un projet pionnier (Vitiforest; Bourgade et al., 2020). Mais, la place de l'arbre dans un contexte actuel de changement climatique et de restructuration du

vignoble (ex. : réduction des produits phytosanitaires, modifications des pratiques culturales, gestion différente des sols, image positive du vignoble véhiculée par l'arbre) associé à des dépérissements liés à des maladies du bois de la vigne devient centrale.

### Les flux de nutriments

Les intérêts des arbres de haute tige, à proximité des parcelles viticoles et des haies de bordure, sont reconnus et communément admis pour leurs rôles dans la protection contre les vents et la création de microclimats (ex. : ombre, hygrométrie plus forte grâce à l'évapotranspiration des feuilles, protection contre les gelées « noires » par rayonnement infrarouge à proximité des arbres) (*figure 1*).

D'autres effets bénéfiques des arbres sur les sols sont moins connus. En effet, les arbres permettent aux plantes « compagnes » de mieux résister aux périodes extrêmes, qu'elles soient « trop sèches » ou « trop humides », mais de plus en plus fréquentes avec les changements climatiques. Le sol est un milieu poreux, constitué jusqu'à 50 % d'eau et d'air. Sans ces espaces « en creux », le sol ne peut pas fonctionner correctement, car les échanges, les réactions chimiques et l'activité biologique nécessitent une phase liquide (eau) et une phase gazeuse (ex. : dioxygène). Si la composition minérale influence la texture du sol et une partie de sa structure (ex. : un sol caillouteux aura une plus forte porosité « naturelle »), cette dernière est aussi liée à la quantité de matière organique et à l'activité biologique des organismes vivants (microfaune/flore : bactéries, champignons, nématodes, protozoaires ; mésofaune : acariens, collembolles ; macrofaune : cloportes, fourmis, vers de terres). Les arbres, grâce à leurs racines explorant différentes profondeurs du sol, facilitent les échanges et les transferts de matières. Ils participent également, avec les autres organismes vivants du sol, à maintenir une certaine porosité du sol afin de tamponner les excès d'eau (en favorisant l'infiltration en profondeur plutôt que le ruissellement) et ainsi réduire le dessèchement (capillarité connue aussi sous le nom d'ascenseur hydraulique, rétention de l'eau dans les matières organiques, racines pouvant capter l'eau en profondeur...). Le rôle des arbres et des couverts végétaux dans la structuration du sol est largement démontré par des expérimentations et des essais en parcelles agricoles et viticoles. Dans un contexte de changement climatique, la raréfaction des ressources en eau et son utilisation par les plantes en systèmes agroforestiers ont soulevé plusieurs interrogations. Deux études ont été menées afin d'évaluer l'impact des associations vigne-arbre sur la potentielle concurrence hydrique. Une première étude d'INRAE Occitanie a observé les interactions dans un système vigne-résineux. Une seconde étude s'est intéressée aux échanges, au sein des systèmes vigne-peupliers et vigne-chênes. Les deux études ont mis en évidence une amélioration des bilans hydriques dans les systèmes associant vigne et arbre. Par ailleurs, ces études ont mis en évidence une disponibilité en azote non contrainte dans un système associant la vigne à des feuillus comme le chêne et le peuplier (*Lang et al., 2018*), alors que dans ce même système, le bilan était négatif et défavorable pour la vigne lorsqu'elle est associée à des résineux (*Grimaldi, 2020*).

La présence d'arbres dans un vignoble va modifier les flux d'énergie (rayonnement lumineux, turbulence des vents, cycle de l'eau et des nutriments). La vitiforestierie participe, à son échelle, au stockage de carbone dans les sols et dans les éléments ligneux (*figure 1*). Une expérience, menée au champ par l'Association française d'Agroforesterie auprès de viticulteurs du sud-ouest de la France de 2014 à 2019, a comparé le stockage du carbone dans des sols viticoles

(conditions pédoclimatiques et édaphiques identiques) avec et sans couverts végétaux, avec et sans travail du sol superficiel. La modélisation de la dynamique du carbone a mis en évidence un stockage du carbone dans les sols couverts non travaillés de 0,74 t C/ha/an les 10 premières années contre 0,2 t C/ha/an en système travaillé en surface (10 cm de profondeur) avec un enherbement spontané (*AFAF, 2020*). Cette étude, menée sur un territoire spécifique, n'a pas intégré le stock de carbone de la partie aérienne des éléments ligneux. La dégradation des feuilles et des racines des arbres en composés carbonés stables n'a également pas été prise en compte. Or, il est désormais communément admis que ces deux facteurs modifient la dynamique de stockage du carbone.

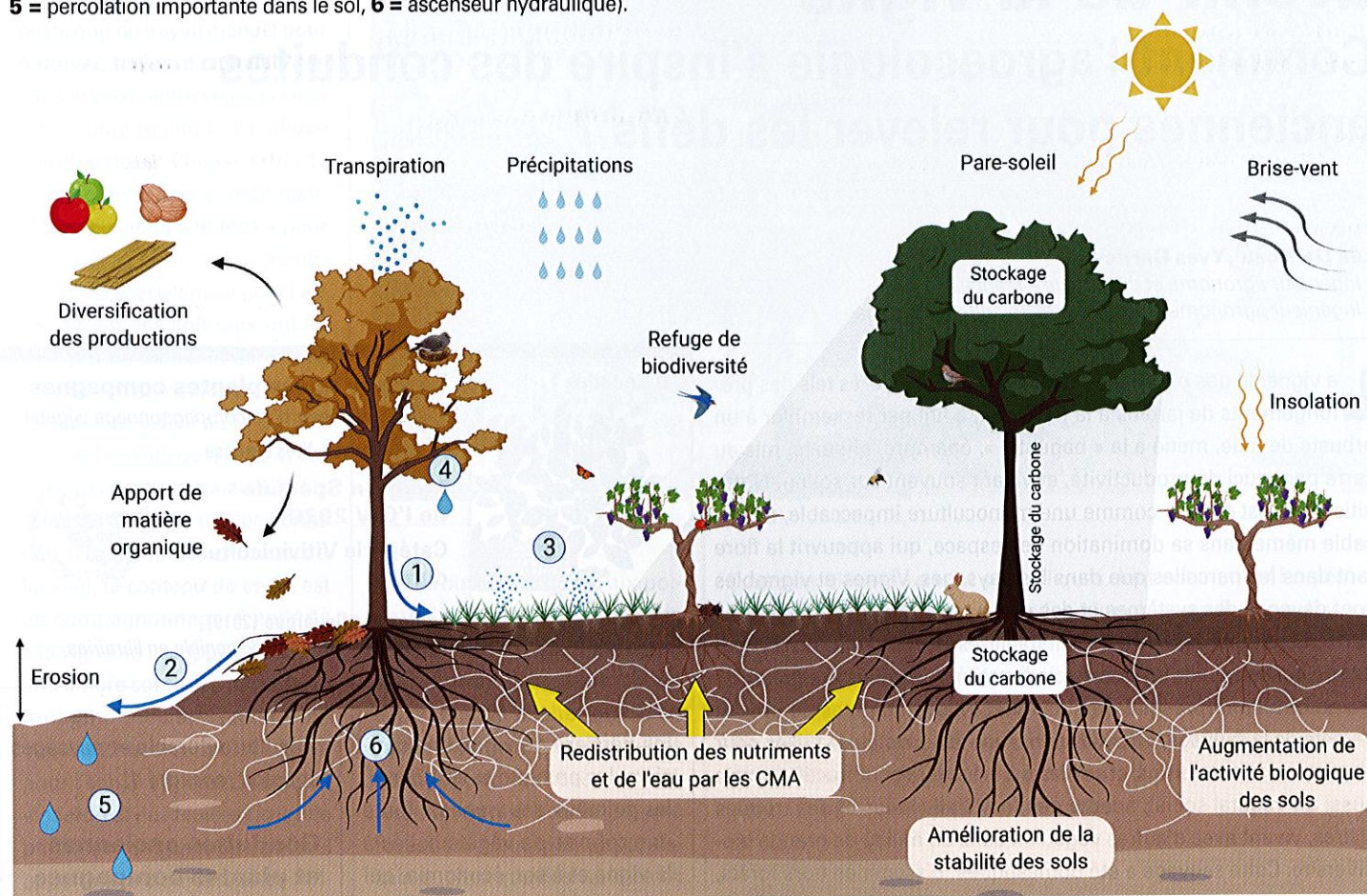
### Les microorganismes du sol

Le fonctionnement des sols et les interactions vignes-champignons-arbres jouent également un rôle important dans le cycle de l'eau et dans l'adaptation des systèmes agroforestiers viticoles au changement climatique. En effet, dans les systèmes agroforestiers, les racines des arbres et des cultures sont entremêlées, et leur interaction peut influencer les microorganismes du sol (*Olsson et al., 1999*), dont le rôle pour la fourniture de services écosystémiques est central. Il s'agit notamment des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), qui vivent en symbiose mutualiste avec la majorité des racines des plantes terrestres. Les CMA appartiennent au phylum *Glomeromycota*, avec plus de 300 espèces décrites à ce jour. Les observations ont confirmé que la très grande majorité des essences utilisées en agroforesterie forment des mycorhizes à arbuscules.

Les CMA reçoivent des quantités importantes de carbone fixé

(photosynthèse) par la plante hôte. En retour, le mycélium extraradical explore le sol et fournit à la plante hôte des nutriments minéraux et de l'eau. Le mycélium extraradical des CMA peut coloniser et relier simultanément plusieurs plantes de la même espèce ou d'espèces différentes, formant un réseau mycorhizien commun (RMC), permettant de transférer, d'échanger et de redistribuer des nutriments et des signaux entre les plantes (*Wipf et al., 2019*). Dans les agroécosystèmes tempérés, l'abondance et la composition des communautés de CMA ainsi que le fonctionnement du RMC sont fortement et négativement influencés par le travail du sol et la fertilisation inorganique. Une gestion du sol plus durable peut avoir une influence positive sur la composition, la richesse et l'abondance des communautés de CMA. En outre, les systèmes de cultures intercalaires avec des arbres et des haies peuvent conduire au maintien du RMC en ce qui concerne la faible perturbation du sol et l'établissement plus rapide de la colonisation des racines par les RMC lors du passage d'une culture à une autre. Cependant, l'influence des systèmes de cultures intercalaires sur la diversité des communautés de CMA, à la fois sur les racines des arbres et des cultures, et sur le fonctionnement du RMC, est mal comprise dans les régions tempérées par rapport aux régions tropicales. Il est à noter que les études portant sur la colonisation par des CMA dans un système agroforestier complet (et non pas avec une seule espèce d'arbre) sont rares (*Pande et Tarafdar, 2004*). Cependant, ces études nous montrent déjà que cette association culturelle permet, entre autres, d'augmenter l'abondance des spores de CMA ainsi que la colonisation racinaire des plantes. La richesse et la diversité des communautés de CMA qui se développent sont aussi plus importantes avec une diversité d'espèces végétales

■ **Figure 1 : Agroforesterie viticole : microclimats et services écosystémiques.** L'implantation d'arbres au sein d'une parcelle de vigne a un impact sur les services écosystémiques rendus (ex. : production, stockage du carbone, biodiversité) mais également sur le microclimat : circulation de l'air, ensoleillement/ombrage et cycle de l'eau (1 = ruissellement intercepté par la strate végétale inférieure, 2 = ruissellement non contrôlé conduisant à une érosion accrue, 3 = évaporation limitée par les strates herbacées, 4 = écoulement foliaire, 5 = percolation importante dans le sol, 6 = ascenseur hydraulique).



comparée avec une monoculture. Du point de vue de la gestion des systèmes agroforestiers, l'augmentation de la richesse en espèces de CMA n'est pertinente que si les espèces fongiques associées aux arbres s'associent également aux cultures agricoles dans un RMC. L'agroforesterie est une pratique agricole où le sol subit de faibles perturbations. Ceci permet donc de favoriser le développement d'un RMC entre les individus qui composent l'agroécosystème. Associée à du semis direct ou à des techniques culturales simplifiées (TCS) comme un labour fortement réduit, la présence d'un RMC intact améliore nettement la colonisation racinaire rapide des jeunes plantes lors de la germination des cultures annuelles (Brigido et al., 2017). Les échanges d'éléments nutritifs via ce RMC sont aussi très importants. Le transfert d'eau

via le réseau est aussi primordial et limite les phénomènes de concurrence entre les deux strates végétales. Ainsi, dans les systèmes agroforestiers, conçus selon le principe d'imiter les forêts et d'optimiser les interactions écologiques, les interactions entre les plantes et le sol, telles que celles qui sont véhiculées par les CMA, revêtent une importance primordiale.

**Les freins des viticulteurs dans l'adoption de pratiques agroforestières**

La principale contrainte pour l'implantation d'un système agroforestier réside dans l'itinéraire technique mis en place par les viticulteurs. Les projets agroforestiers en viticulture se heurtent parfois à des choix techniques inadaptés : erreurs sur le choix des essences, mauvaise qualité

des plants, protection inadéquate des jeunes arbres face aux herbivores, dégâts occasionnés aux arbres au cours des manœuvres d'engins agricoles.

L'itinéraire technique doit avoir été pensé, éprouvé et adapté à la parcelle plantée. Par exemple, afin de diminuer les risques de gelées blanches, les effets microclimats et les circulations d'air doivent être étudiés, le développement des couverts végétaux géré en conséquence. L'évolution dans le temps du système doit également être anticipée afin de faire coïncider l'aménagement agroforestier avec l'évolution des vignes. La taille de formation est aussi un point essentiel afin de conformer l'arbre et le guider en hauteur pour permettre le passage des engins dans les parcelles mécanisées. L'absence de suivi technique et le manque de prise en compte des besoins et objectifs du viticulteur dans le processus de décision aboutissent généralement à un échec dans l'implantation du système agroforestier. Dans ses premières étapes, les contraintes réglementaires peuvent aussi être un point limitant et doivent être prises en compte lors du dimensionnement du projet agroforestier. Ces aspects conditionnent le succès des projets agroforestiers en viticulture. La montée en compétences des viticulteurs est un enjeu majeur garantissant la réussite de la mise en place de ces systèmes et leur durabilité, qui atteignent parfois de hauts niveaux de complexité techniques (et réglementaires).

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

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



Essai d'enherbement en conditions sèches.

### Introduction

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

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

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

### L'intérêt des couverts en agriculture

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

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

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

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

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

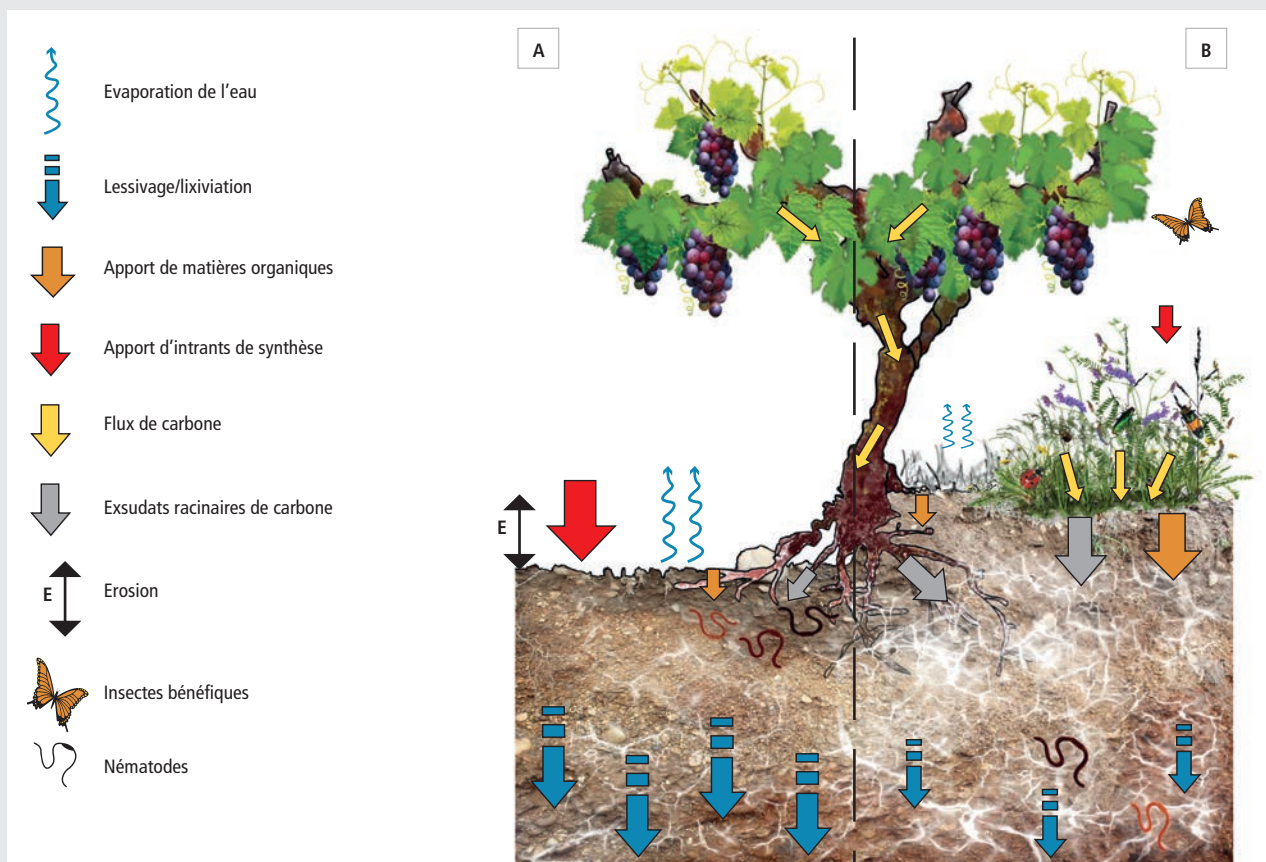
De manière générale, l'installation d'une couverture végétale améliore la structure du sol (fig. 1). La présence de racines contribue à l'agrégation des particules du sol, ce qui permet une meilleure rétention de l'eau et des éléments minéraux nécessaires à la croissance de la culture d'intérêt et des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

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

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

### Les couvertures dans le vignoble

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



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

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

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

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



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

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

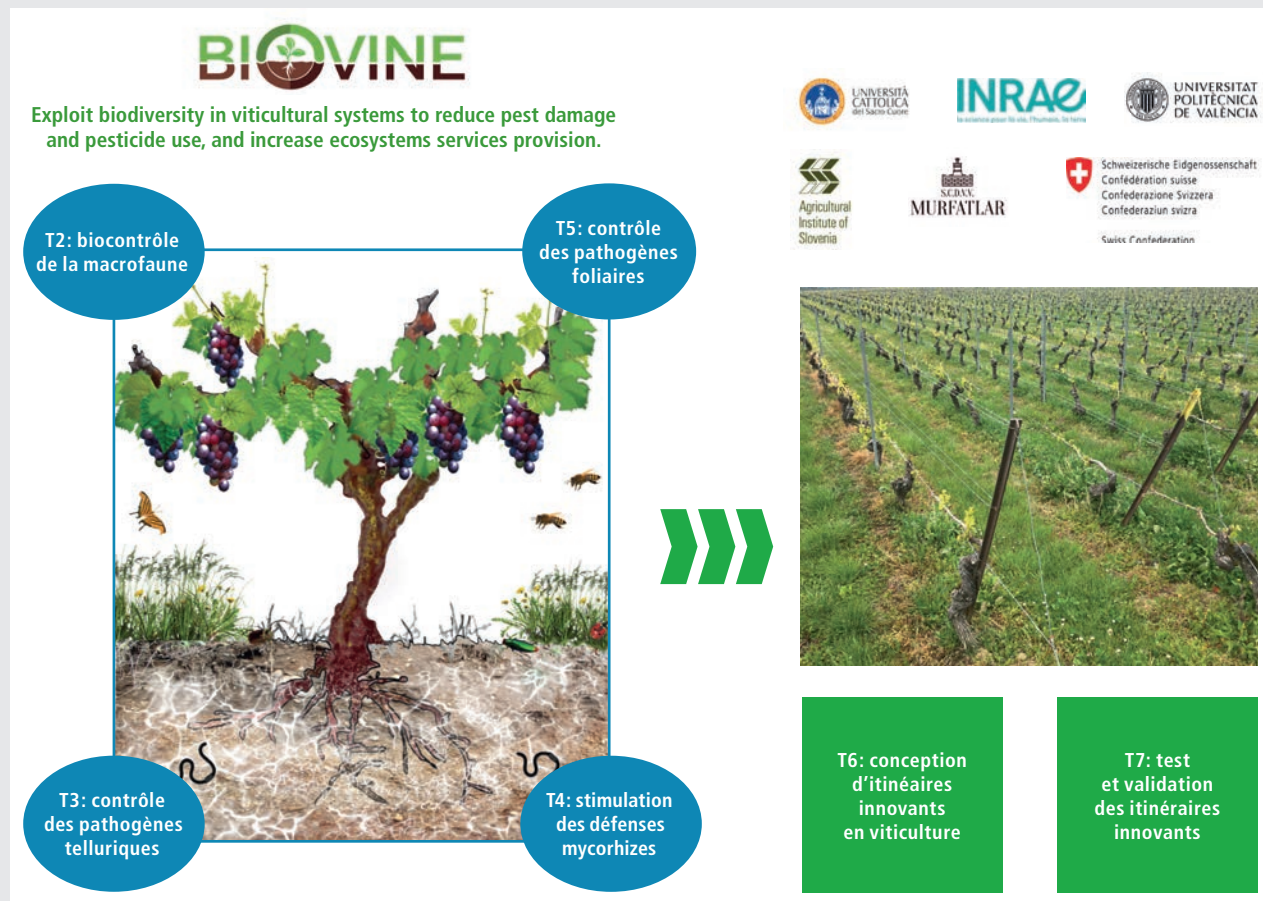


Figure 3 | Présentation schématique des actions, tâches et partenaires du projet Biovine.

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

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

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

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

#### Les auteurs

Pierre-Antoine NOCETO<sup>1</sup>, Anne-Laure FRAGNIÈRE<sup>2</sup>, Patrik KEHRLI<sup>2</sup>, Mathilde HÉRICHÉ<sup>1</sup>, Jérôme FROMENTIN<sup>1</sup>, Vittorio ROSSI<sup>3</sup>, Saša ŠIRCA<sup>4</sup>, Aurora RANCA<sup>5</sup>, Josep ARMENGOL<sup>6</sup>, Sophie TROUVELOT<sup>1</sup>, Diederik VAN TUINEN<sup>1</sup>, Pierre-Emmanuel COURTY<sup>1</sup> et Daniel WIPF<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Agroscope, route de Duillier 50, 1260 Nyon, Suisse

<sup>3</sup> Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, 8429122 Piacenza, Italie

<sup>4</sup> Plant Protection Department, Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slovénie

<sup>5</sup> S.C.D.V.V. Murfatlar, Calea Bucuresti nr. 2, Murfatlar, 905100 Constanta, Roumanie

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

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

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

#### Remerciements

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

#### Bibliographie

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

### Les services rendus par les mycorhizes au vignoble

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

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

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