

TRANSPARISATION DE RACINES TANNIQUES POUR ETUDIER LES INTERACTIONS PLANTES- CHAMPIGNONS DANS LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE A ARBUSCULES

HERICHE Mathilde ¹, ARNOULD Christine ^{1,2},
WIPF Daniel ¹, COURTY Pierre-Emmanuel ¹

¹ Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne, 21000 Dijon, France

² Plateforme DimaCell, Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ.
Bourgogne, 21000 Dijon, France

pierre-emmanuel.courty@inrae.fr

CLEARING TANNIC ROOTS TO STUDY MYCORRHIZAL SYMBIOSIS

ABSTRACT

Three-dimensional imaging of large samples is limited by the refraction and absorption of light by tissue components (lipids, pigments, etc.). In order to limit these phenomena and allow the acquisition of images over the entire thickness of the root, it is necessary to clear the samples by depigmenting and homogenizing the different refractive indices within the tissue through chemical treatments. This technique, called tissue clearing, allows three-dimensional analysis of the fluorescently labeled structures of interest on thick specimens. More than twenty different clearing techniques are based on this principle [1]. Most of them have been developed and optimized for clearing animal tissues, especially soft tissues such as brain. Although known for several decades in plants, only a few recent methods are compatible with fluorescent labeling because their effectiveness depends on clearing chlorophyll-containing organs such as leaves and stems. However, there is a lack of methods for clearing roots. In this context, we have developed a clearing protocol for a plant of agronomic interest with roots containing tannins: grapevine [2]. Once clear enough, we carried out different fluorescent labelings and we demonstrated that this protocol is suitable with mycorrhized tannic roots.

KEY WORDS

Clearing, Fluorescent labelling, Grapevine, Mycorrhiza, Roots.

RESUME

L'imagerie en trois dimensions d'échantillons épais est limitée par la réfraction et l'absorption de la lumière par les composants tissulaires (lipides, pigments, etc.). Afin de limiter ces phénomènes et de permettre l'acquisition d'images sur toute l'épaisseur d'une racine, il est nécessaire de rendre les échantillons transparents en dépigmentant et en homogénéisant les différents indices de réfraction au sein du tissu, par des traitements chimiques. Cette technique, appelée transparisation, permet une analyse tridimensionnelle des structures d'intérêt marquées par fluorescence sur des échantillons épais. Plus d'une vingtaine de techniques différentes de transparisation des tissus sont basées sur ce principe de clarification [1]. La plupart d'entre elles ont été développées et optimisées pour la transparisation des tissus animaux ; en particulier les tissus mous comme le cerveau. Bien que développées chez les plantes depuis plusieurs décennies, seules quelques méthodes récentes sont compatibles avec un marquage fluorescent et leur efficacité repose sur la transparisation d'organes et de tissus chlorophylliens (feuilles et tiges). Toutefois, aucune méthode n'avait encore été développée à ce jour pour transparer les racines afin de pouvoir étudier notamment les interactions entre les racines et les microorganismes du sol. Dans ce contexte, nous avons développé un protocole de transparisation pour une plante d'intérêt agronomique ayant des racines avec des tanins : la vigne [2]. Une fois les racines suffisamment transparentes, nous avons procédé à différents marquages fluorescents et nous avons démontré que ce protocole est adapté aux racines tanniques mycorhizées.

MOTS CLES

Marquage fluorescent, Mycorhize, Racine, Transparisation, Vigne.

INTRODUCTION

La grande majorité des plantes terrestres (environ 95 %) forment au niveau de leurs racines, une association symbiotique mutualiste, appelée « mycorhize »,

avec des champignons telluriques [3]. Le mot mycorhize a pour origine les termes grecs anciens *mukês* pour champignon et *rhiza* pour racine. Il existe plusieurs types de symbioses mycorhiziennes, dont deux principales, qui se distinguent par la morphologie de l'interaction entre les deux partenaires : l'ectomycorhize (dite externe) et l'endomycorhize (dite interne). L'endomycorhize la plus ancienne et la plus courante sur terre est la symbiose mycorhizienne à arbuscules (SMA). Cette association aurait participé au passage de la vie aquatique à la vie terrestre des plantes photosynthétiques et ainsi à la colonisation des terres émergées [4]. Malgré une faible diversité d'espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), plus de 200 000 espèces végétales (soit plus de 80% des plantes terrestres), dont la majorité des plantes cultivées, peuvent former des SMA [5]. Seules les familles des *Brassicaceae* (choux), *Chenopodiaceae* (betterave), *Caryophyllaceae* (œillet) et *Polygonaceae* (oseille) ne forment pas de mycorhizes. Toutes les autres plantes cultivées, telles que les graminées (blé et riz), les légumineuses (soja et pois), les plantes maraîchères (tomates et oignons), les cultures horticoles (géraniums et rosiers) et les arbres fruitiers (pommiers et vignes) forment une symbiose racinaire avec des CMA.

La structure fongique, appelée arbuscule, se développe entre la paroi cellulaire de la plante et la membrane plasmique modifiée appelée membrane péri-arbusculaire. Cette structure mixte présente de nombreuses ramifications qui génèrent une très grande surface d'échange. Ainsi, les nutriments minéraux (ex. azote, phosphore, potassium) et l'eau sont transférés du CMA vers la plante. Inversement, le carbone est transporté de la plante vers le CMA, sous forme de sucres et de lipides [6]. La plante fournit tout le carbone nécessaire au développement du CMA ; ce sont des organismes biotrophes obligatoires, c'est-à-dire que leur développement dépend du carbone provenant de la plante hôte. On peut également observer des structures ovoïdes appelées vésicules, impliquées dans le stockage et remplies de lipides (ex. glycolipides). Les hyphes des CMA, non septés et de 6 à 20 μm de diamètre, ont une très grande capacité d'exploration du sol, bien supérieure à celle de la plante dont les racines fines ont un diamètre de l'ordre de 300 μm . Les hyphes des CMA forment une extension du système racinaire qui permet d'augmenter le

volume de sol exploré par la plante d'au moins 40 fois [7], et d'améliorer ainsi la capacité des plantes à absorber l'eau et les nutriments minéraux.

La colonisation des racines par ces micro-organismes symbiotiques n'est pas homogène ce qui rend l'étude des arbuscules, lieu des échanges des nutriments, compliquée. En plus de cette faible probabilité de présence du CMA sur un fragment de racine pris au hasard, l'utilisation de coupes histologiques pour réaliser des marquages fluorescents d'intérêt (i) peut s'avérer laborieuse car certaines racines sont fortement pigmentées ce qui diminue considérablement la qualité de l'observation en microscopie optique, (ii) sont coûteuses en temps de coupe, de réalisation des marquages fluorescents, et en temps d'imagerie, et (iii) sont aussi coûteuses monétairement en anticorps ou marqueurs fluorescents. Afin d'approfondir l'analyse structurale et fonctionnelle de la SMA en volume, le développement de la transparence racinaire s'avère nécessaire.

L'objectif de la procédure est donc de pouvoir réaliser des coupes virtuelles (donc sans destruction de l'échantillon) avec une reconstruction 3D des structures de la racine. Pour cela, il est nécessaire d'améliorer le passage de la lumière à travers un échantillon en utilisant des traitements chimiques pour diminuer la diffusion de la lumière en éliminant les pigments et la réfraction de la lumière due aux indices de réfraction variables (n : eau 1,33 ; cytoplasme 1,36 ; paroi cellulaire 1,42) à travers le tissu en les homogénéisant grâce à un agent de transparence (Figure 1).

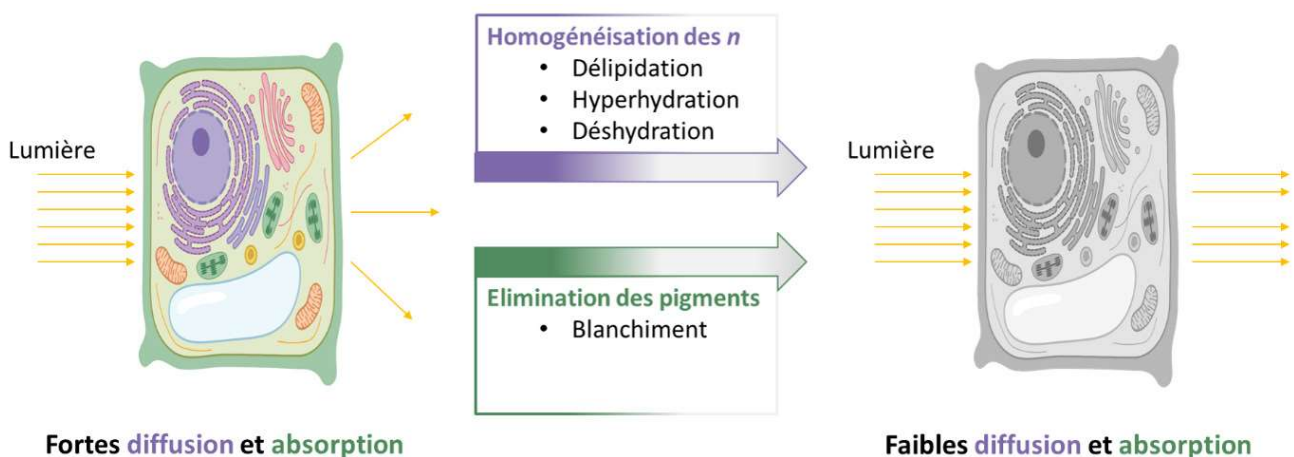


Figure 1 : Le protocole de transparence donne accès aux caractéristiques anatomiques des tissus des plantes pérennes sans sectionnement physique. (adapté de [12]).

Il existe plus d'une vingtaine de protocoles différents de transparençisation [1]. La plupart de ces protocoles ont été développés et optimisés sur tissus animaux, notamment des tissus mous comme le cerveau. Scale®, un agent à base d'urée, permet d'acquérir des images de cerveaux de souris jusqu'à 1,6 mm de profondeur par microscopie confocale [8]. Cependant, de telles profondeurs n'ont pas encore été atteintes sur des tissus végétaux. L'utilisation d'un agent de transparençisation pour observer les tissus végétaux a commencé à la fin du 19^{ème} siècle. Différents protocoles d'éclairçissement ont été développés indépendamment. Ils varient en fonction de la nature de l'échantillon (organes reproducteurs, [9]), de la structure d'intérêt (lignine [10]) et de la durée de la procédure (éclairçissement en une étape [11]). Des protocoles de transparençisation complexes résultant de la combinaison de ces traitements sont apparus ainsi que des protocoles n'utilisant que des agents de transparençisation soit sous forme de solvants aqueux soit sous forme de solvants organiques [12]. Depuis la fin du 20^{ème} siècle, l'objectif d'augmenter la profondeur d'analyse a stimulé le développement du sectionnement optique grâce à la microscopie confocale, à feuille de lumière, et multi-photonique. Il existe peu de protocoles de transparençisation adaptés aux végétaux. Par comparaison avec celui que nous proposons, nous faisons un focus sur un autre protocole de transparençisation développé pour imager des tissus végétaux à une profondeur de 200 µm en quelques heures, le TOMEI (Transparent plant Organ MEthod for Imaging (TOMEI) [13]. Cependant, ce protocole n'élimine pas tous les pigments, diminuant ainsi l'intensité de la fluorescence [14]. Pour surmonter ces limitations, une mise à jour de ce protocole, appelée iTOMEI (improved TOMEI) a été publiée en 2021 [15]. Il propose une large sélection de traitements chimiques pour chaque étape du protocole de transparençisation en se basant sur (i) la préservation du signal GFP, (ii) l'amélioration du signal GFP et (iii) l'efficacité de la décoloration. Par contre, ce protocole peut avoir un impact sur les teneurs en protéines et en lipides du spécimen. Néanmoins, ces technologies avancées utilisant l'imagerie par marqueurs fluorescents ne permettent pas d'obtenir une résolution micrométrique sur un échantillon macroscopique sans une bonne méthode de transparençisation en raison de leur sensibilité à la diffusion de la lumière [16].

Jusqu'ici, les protocoles de transparisation permettant l'acquisition d'un signal fluorescent et appliqués sur racines de plantes ne concernaient que des racines très fines et non pigmentées. De plus, ils étaient transposés aux racines bien que développés sur organes chlorophylliens [17–19]. Il était donc pertinent de développer un protocole spécifique de transparisation racinaire afin d'approfondir les connaissances concernant la répartition tridimensionnelle du CMA à l'intérieur de la racine mycorhizée. Dans un premier temps, l'optimisation a été réalisée sur des racines blanches de la plante modèle *Medicago truncatula*. Puis, le protocole que nous vous présentons ici, a été adapté sur racines ligneuses et tanniques de vigne (*Vitis vinifera*), une plante d'intérêt agronomique, particulièrement difficile à observer en microscopie optique.

MATERIELS ET METHODES

Des boutures de trois porte-greffes de vigne (SO4, Riparia et Berlandieri) issus de culture *in vitro* (5 semaines en milieu Cown), ont été acclimatées pendant un mois en pots individuels dans un substrat inorganique (sable/zéolithe 1:1). Ensuite, un poireau mycorhizé âgé de trois semaines et entouré d'une mèche de nylon (diamètre 43 µm) est ajouté dans chaque pot. La mèche empêche les racines de poireau d'être en contact avec celles de la vigne mais permet aux hyphes du CMA de se développer et de coloniser tout le pot. Chaque poireau a été inoculé avec 1 mL d'une solution contenant 200 spores/mL du CMA *Rhizophagus irregularis* DAOM197198. Les plantes sont cultivées en serre et reçoivent chaque semaine 10 mL de solution nutritive (Hoagland modifiée: $[\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4] = 0,1 \text{ mM}$) jusqu'à la récolte. Après 6 mois de culture en serre, le système racinaire des plantes est récolté. Les racines sont soigneusement nettoyées et coupées à la lame de rasoir en tronçons de 1 à 1,5 cm de long. Ces fragments de racines sont ensuite immergés dans une solution de fixation (Paraformaldéhyde 4%, DMSO 5%, dans du tampon PME (50 mM Pipes, 5 mM MgSO_4 , 10 mM acide egtazique (EGTA), pH 6,9)), passés sous vide pendant 5 min puis incubés une nuit sous agitation (70 rpm) à 4 °C. Le lendemain, les

échantillons sont lavés trois fois avec du tampon PME, puis incubés 30 min avec agitation (70 rpm) dans une solution de 50 mM NH_4Cl dans du PME après un passage sous vide à température ambiante (25 °C).

Pour l'étape de dépigmentation [17], les racines sont lavées une nuit à 4 °C dans une solution de PBST (PBS pH 7,3, 0,1% Tween®20) puis incubées 1 h dans une solution de 0,5X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium, pH 7,2) 0,1% Tween®20. Ensuite, elles sont placées dans une solution de dépigmentation (5% formamide, 0,5X SSC, 3% H_2O_2) à température ambiante, avec agitation et lumière (utilisation d'une lampe horticoles), jusqu'à complète dépigmentation. Le temps de dépigmentation pour les trois porte-greffes est d'environ 1h30. Il est possible d'augmenter la concentration d' H_2O_2 jusque 5% pour accélérer le processus. Les échantillons sont ensuite lavés pendant 2h dans des bains successifs de PBST puis pendant une nuit dans du PBS à température ambiante. La digestion enzymatique des racines [18] permet de perméabiliser les tissus et de rendre les composés cellulaires accessibles aux marqueurs fluorescents. Les échantillons sont rincés dans trois bains successifs de PME, puis deux bains successifs de Pipes 0,1 M pH 5,5 et enfin incubés dans ce dernier tampon 1 h à température ambiante avec agitation (70 rpm). Les échantillons sont incubés dans une solution de 1% cellulase RS (Duchefa Biochimie), 0,1% pectolyase Y23 (Duchefa Biochimie) à 37 °C dans du tampon Pipes 0,1 M pH 5,5 pendant 1 h. Ils sont lavés une fois dans un bain de Pipes puis 3 fois par du PBS pH 7,2 à température ambiante et laissé sur la nuit dans du PBS à 4°C.

Pour l'étape de transparisation les racines sont lavées une fois dans une solution de ClearSeeAlpha (xylitol 10% (m/v); sodium deoxycholate 15% (w/v), urée à 25% (m/v), sulfite de sodium 50 mM) [19] et incubées dans 30 mL de cette même solution pendant deux semaines, avec un changement de solution tous les cinq jours pour éliminer tous les polyphénols et tanins. Les échantillons sont lavés pendant 2 h dans du PBS, avec un changement de solution toutes les heures avant d'être marqués. Deux marquages fluorescents distincts ont été effectués, le premier à l'iodure de propidium (IP, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon PBS 45 min avec une agitation de 70 rpm à température ambiante) et le deuxième au WGA-Alexa488 (0,1 mg/mL dans du PBS, 1h30 avec une agitation de 70 rpm à température ambiante). Après trois rinçages successifs dans du

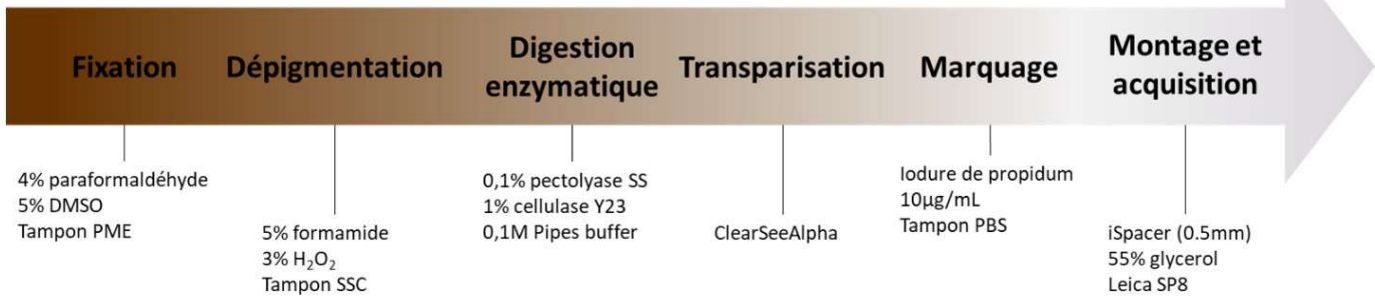
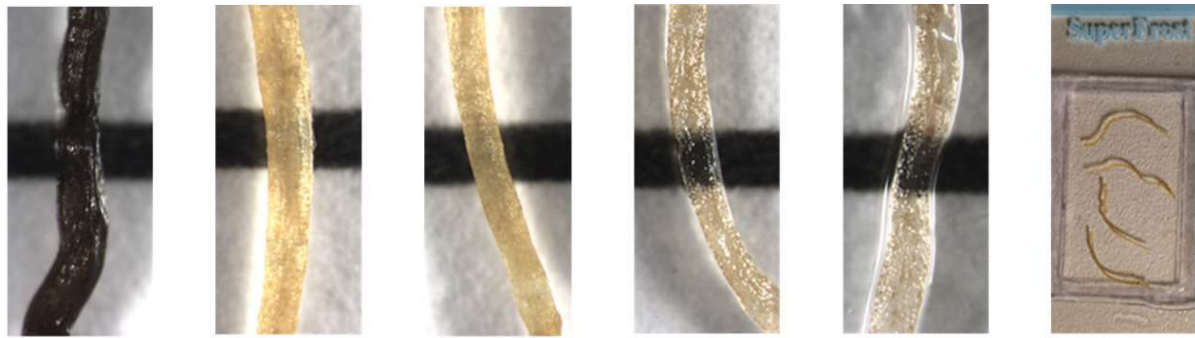


Figure 2 : Le protocole de transparisation est efficace sur des racines lignifiées de vigne et d'une taille supérieure à 250 µm. Ce schéma représente les étapes du protocole de transparisation de racines tanniques de vignes mycorhizées (CTR, adapté de [12]).

tampon PBS, les échantillons sont incubés dans du ClearSeeAlpha après un passage sous vide, entre 12 et 24 h. Le jour de l'acquisition, les échantillons sont montés entre lame et lamelle avec un espaceur (iSpacer Sunjilab 0,5 mm) dans du ClearSeeAlpha (n : 1,41) comme milieu de montage et du glycérol 55% (n : 1,41) comme milieu d'immersion (**Figure 2**).

RESULTATS

Les racines de vignes contiennent de nombreux composés phénoliques qui leur donnent une couleur brune et qui rend particulièrement difficile, voire quasiment impossible leur observation en microscopie à fluorescence, ainsi qu'en volume (**Figure 3 A**).

Grâce à la transparisation racinaire, il est désormais possible d'imager avec un objectif à glycérol le signal fluorescent de l'iodure de propidium sur toute l'épaisseur racinaire (250 µm) (**Figure 3 C et D**) et de reconstituer ce signal en trois dimensions (**Figure 3 D**).

Il est également possible d'imager la répartition tridimensionnelle des micro-

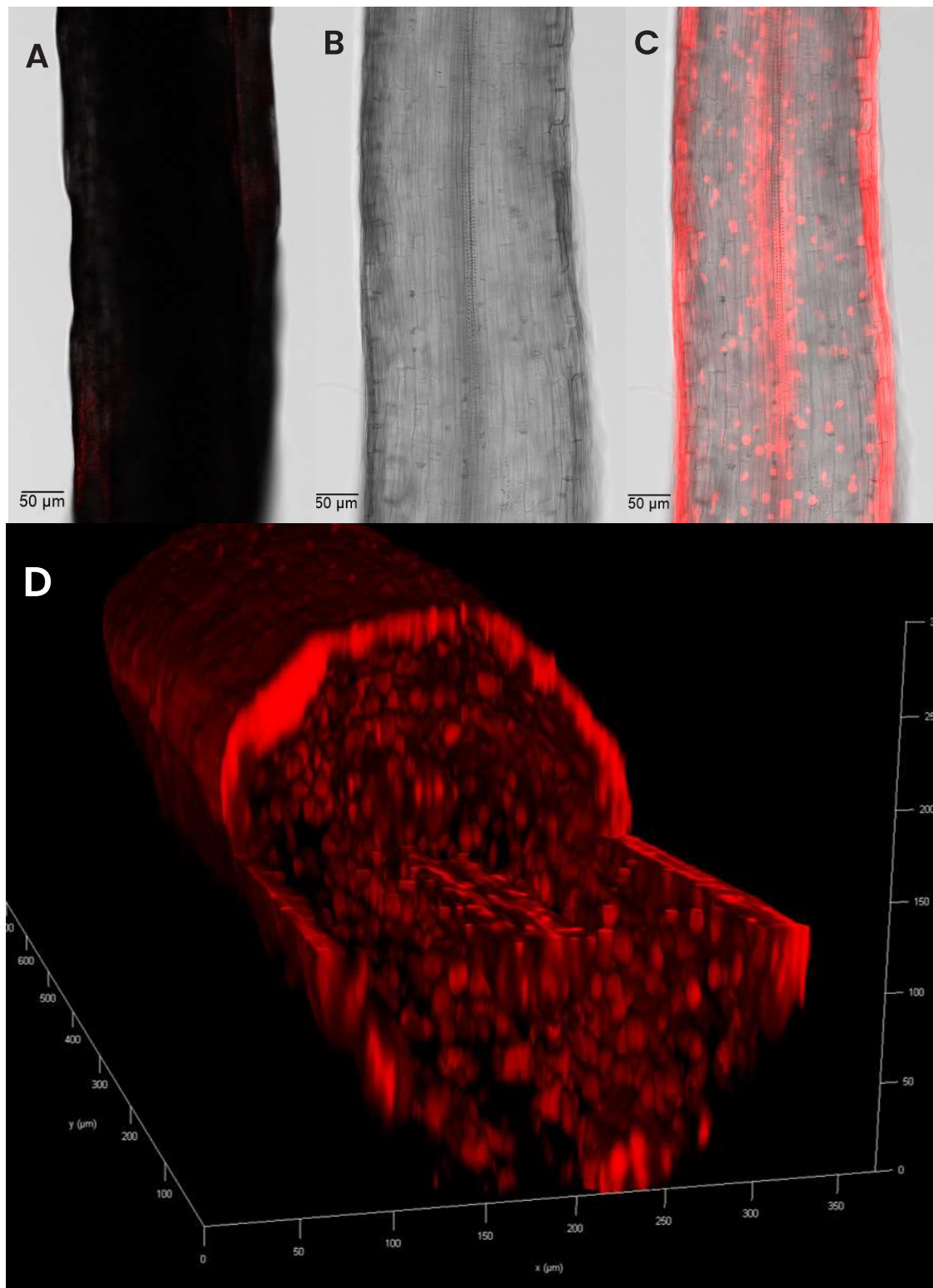


Figure 3 : Le processus d'éclaircissement ClearSeeAlpha préserve le signal de fluorescence et peut-être utilisé avec des sondes endogènes. Racines du porte greffe SO4 de *Vitis vinifera*, marquées à l'iodure de propidium (IP), imagées au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif 16xNa 0.6 à immersion glycérol 55%, WD 2500 μm, λ_{ex} 552 nm, λ_{em} 589 nm - 653 nm). Superposition de la lumière transmise et du signal IP d'une racine non transparisée (A), de la lumière transmise d'une racine transparisée (B), et avec superposition du signal IP (C) à une profondeur de 130 μm (axe z). La reconstruction 3D du signal IP (D) correspond à l'image C (LasX, Leica).

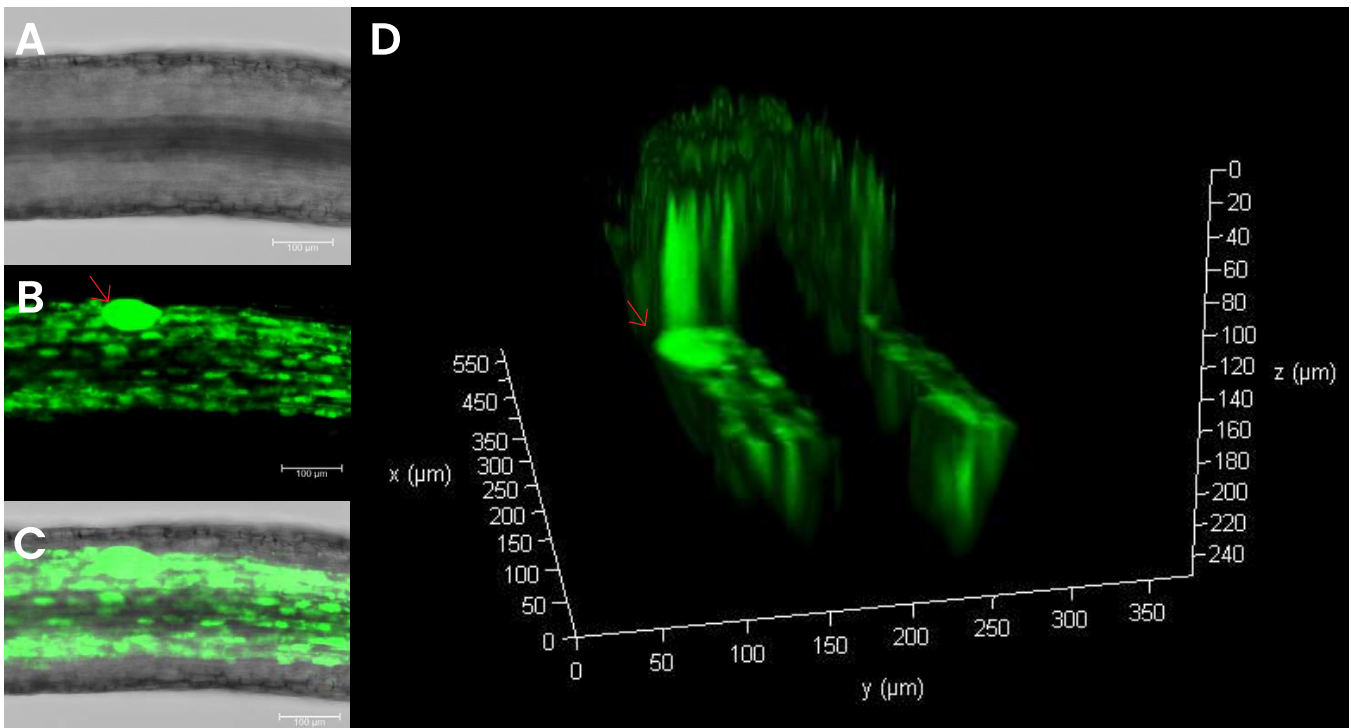


Figure 4 : Le processus d'éclaircissement ClearSeeAlpha préserve le signal de fluorescence et peut-être utilisé avec des sondes endogènes. Racines du porte greffe *Riparia* de *Vitis vinifera*, marquée au WGA-Alexa488, imagée au microscope confocal à fluorescence laser (Leica SP8, objectif 16xNa 0.6 à immersion glycérol 55%, WD 2500 μm, longueur d'onde λ_{ex} 488nm, λ_{em} 501 nm - 543 nm). Lumière transmise (A), signal WGA Alexa488 (B) et superposition des deux (C) à une profondeur de 90 μm (axe z). La reconstruction 3D du signal WGA Alexa488 (D) correspond à l'image B (LasX, Leica).

organismes tels que les CMA, grâce à des marqueurs tels que le WGA-Alexa 488 qui a une affinité pour la chitine du champignon (**Figure 4**). La profondeur maximum à laquelle nous pouvons imaginer avec cette technique, avec un objectif à glycérol et un marqueur fluorescent est de 250 μm.

DISCUSSION-CONCLUSION

Ce protocole de transparençation pourrait s'avérer particulièrement utile pour l'imagerie d'autres symbioses, comme l'ectomycorhize, qui concerne dans la plupart des cas des racines pigmentées de plantes pérennes. Ce protocole pourrait être utilisé pour comparer (i) la répartition en 3D d'une espèce de champignon mycorhizien dans une racine de plante annuelle et dans une

racine de plante pérenne, (ii) l'impact des cycles végétatifs des plantes pérennes et annuelles sur la morphologie du champignon mycorhizien (répartition de la colonisation racinaire par des hyphes, des vésicules et des arbuscules), et (iii) l'évolution de la morphologie de la colonisation racinaire dans le cadre d'un réseau mycélien restreint (ex. deux plantes en microcosmes connectées par un même champignon et subissant des stress différents). Ces perspectives pourraient mettre en lumière des mécanismes encore inconnus aujourd'hui.

Bien que ce protocole de transparençation n'utilise pas de solvants organiques, les traitements chimiques modifient la composition du tissu (ex. digestion enzymatique des parois cellulaires, utilisation de détergents qui peuvent modifier le contenu lipidique du tissu). Par ailleurs, dans la littérature, les modifications de structure engendrées par ces protocoles, surtout sur tissus végétaux ne sont pas assez documentées. De ce fait, des analyses de micromorphologie sur échantillons transparençés en microscopie électronique à transmission pourrait remédier à cette lacune, et valider ou non la fidélité de ces observations.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Conseil régional de Bourgogne Franche Comté et le Ministère français de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. Ce travail a bénéficié des installations du Centre de Microscopie INRAE Dijon/Université de Bourgogne, Plateforme DimaCell.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RICHARDSON, D.S., GUAN, W., MATSUMOTO, K., PAN, C., CHUNG, K., ERTÜRK, A., UEDA, H.R. & LICHTMAN, J.W. Tissue Clearing. *Nature Review Methods Primers*, 2021, **1**(1) 84.
2. HÉRICHÉ, M., ARNOULD, C., WIPF, D. & COURTY, P.E. New clearing protocol for tannic roots optical imaging. *Trends in Plant Science*, 2021, **27** (6) 616–7.

3. TRAPPE, J.M. A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza*, 2005, **15** (4) 277–81.
4. MALLOCH, D.W., PIROZYNSKI, K.A. & RAVEN, P.H. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, **77** (4) 2113–8.
5. GAVÉRIAUX, J.-P. - Mycorrhizes VAM et Geosiphon pyriformis (Kützing) Wettstein - *Bulletin de la Société Botanique du Nord de la France*, 2012, 17p.
6. SMITH, S. & READ, D. Mycorrhizal Symbiosis - 3rd Edition. 2008. <https://www.elsevier.com/books/mycorrhizal-symbiosis/smith/978-0-12-370526-6> (accessed June 10, 2019).
7. GIOVANNETTI, M., FORTUNA, P., CITERNESI, A.S., MORINI, S. & NUTI, M.P. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 2001, **151** (3) 717–24.
8. HAMA, H., KUROKAWA, H., KAWANO, H., ANDO, R., SHIMOGORI, T., NODA, H., FUKAMI, K., SAKAUE-SAWANO, A. & MIYAWAKI, A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience*, 2011, **14** (11) 1481–8.
9. STEBBINS, G.L. A Bleaching and Clearing Method for Plant Tissues. *Science*, 1938, **87** (2245) 21–2.
10. BERNHEIM, F., BUNN, C. & WILBUR, K.M. The Thiobarbituric Acid Color Reaction in Plant Tissues. *American Journal of Botany*, 1951, **38** (6) 458–9.
11. HERR, J.M. A New Clearing-Squash Technique for the Study of Ovule Development in Angiosperms. *American Journal of Botany*, 1971, **58** (8) 785–90.
12. HÉRICHÉ, M., ARNOULD, C., WIPF, D. & COURTY, P.-E. Imaging plant tissues: advances and promising clearing practices. *Trends in Plant Science*, 2022, **27** (6) 601–15.
13. HASEGAWA, J., SAKAMOTO, Y., NAKAGAMI, S., AIDA, M., SAWA, S. & MATSUNAGA, S. Three-Dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. *Plant Cell*, 2016, **57** (3) 462–72.
14. MUSIELAK, T.J., SLANE, D., LIEBIG, C. & BAYER, M. A Versatile Optical Clearing Protocol for Deep Tissue Imaging of Fluorescent Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 2016, **11** (8), e0161107

15. SAKAMOTO, Y., ISHIMOTO, A., SAKAI, Y., SATO, M., NISHIHAMA, R., ABE, K., SANO, Y., FURUICHI, T., TSUJI, H., KOHCHI, T. & MATSUNAGA, S. Improved Clearing Method Contributes to Deep Imaging of Plant Organs. *Communications Biology*, 2022, **5** 12.
16. SILVESTRI, L., COSTANTINI, I., SACCONI, L. & PAVONE, F.S. Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, **21** (8) 081205.
17. AFFATICATI, P., LE MÉVEL, S., JENETT, A., RIVIÈRE, L., MACHADO, E., MUGHAL, B.B. & FINI, J.-B. X-FaCT: Xenopus-Fast Clearing Technique. Vleminckx K, In *Xenopus*, Vol1865, edited by: Springer New York, 2018: 233–41.
18. NAGAKI, K., YAMAJI, N. & MURATA, M. ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples. *Scientific Reports*, 2017, **7** , 42203, <https://doi.org/10.1038/srep42203>
19. KURIHARA, D., MIZUTA, Y., NAGAHARA, S. & HIGASHIYAMA, T. ClearSeeAlpha: Advanced Optical Clearing for Whole-Plant Imaging. *Plant and Cell Physiology*, 2021, **62**, 1302–1310 <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab033>.