THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie, Interactions, Diversité Adaptative des Plantes (BIDAP)

École doctorale École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par

Unité de recherche : L'Institut des Sciences des Plantes de Montpellier (IPSiM)

PLASTICITE DU SYSTEME RACINAIRE DU BLE EN CONDITION DE CARENCE EN N, P OU K REVELEE PAR DEVELOPPEMENT D'UNE METHODOLOGIE DE PHENOTYPAGE INTEGRANT LES POILS ABSORBANTS

Présentée par Ikram MADANI
Le 13 décembre 2022

Sous la direction de Anne-Aliénor Véry
Co-encadrements par : Hervé Sentenac et Jean-Benoît Peltier

Devant le jury composé de

M. Jacques Le Gouis, Directeur de Recherche, INRAE, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme. Marion Prudent, Chargée de Recherche, INRAE, Dijon	Rapportrice
Mme. Maïté Vicré, Maître de Conférence, Université de Rouen	Examinatrice
M. Claude Doussan, Chargé de Recherche INRAE, Avignon	Examinateur
Mme. Claude Plassard, Directrice de Recherche, INRAE, Montpellier	Présidente de jury
Mme. Anne-Aliénor Véry, Directrice de Recherche, CNRS, Montpellier	Directrice de thèse
M. Hervé Sentenac, Directeur de Recherche, INRAE, Montpellier	Encadrant
M. Jean-Benoît Peltier, Chargé de Recherche, INRAE, Montpellier	Encadrant

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

La thèse est un voyage de longue haleine qui nous amène à traverser des chemins semés d'embûches et de difficultés, mais grâce au soutien de nombreuses personnes et à l'aide des rencontres humaines que nous faisons au cours de ce parcours, ce voyage reste une belle expérience formatrice tant sur le plan humain qu'intellectuel.

A l'issue de ce parcours, de nombreux souvenirs traversent mon esprit, me rappelant tout ce que j'ai vécu et surtout toutes les personnes sans qui je n'aurais pas pu atteindre la ligne d'arrivée. A ce titre, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de cette thèse.

Je souhaite d'abord exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à mes encadrants en commençant par ma directrice de thèse Dr Anne-Aliénor Very qui m'a accueillie dans son équipe et m'a beaucoup aidée et soutenue pendant ma thèse et pour cela je lui en suis reconnaissante. Je la remercie également pour sa sympathie, pour le temps qu'elle m'a accordée pour les petites et grandes questions, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, ses remarques perspicaces qui ont permis d'améliorer le travail et les manuscrits.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude à mon encadrant Dr Hervé Sentenac. Tout au long de ce travail, il m'a apporté un soutien constant, une disponibilité et des conseils précieux, il a cru en moi et a toujours su choisir les bons mots pour m'encourager dans les moments les plus difficiles. J'ai toujours admiré son savoir-faire et apprécié son enthousiasme et sa passion pour le travail. En travaillant avec lui, j'ai compris que le monde de la recherche pouvait être un univers passionnant quand on le voulait. Je le remercie pour sa rigueur, son sens des responsabilités et surtout pour ses qualités professionnelles et humaines.

Il ne fait aucun doute que je n'aurais pas pu terminer ma thèse sans les conseils, les efforts (et aussi la bonne humeur) de mon Co-encadrant Dr Jean Benoit Peltier qui m'a toujours écouté attentivement et n'a jamais hésité à me donner un coup de main quand j'en avais besoin. Je le remercie pour son aide précieuse et ses encouragements. Il s'est beaucoup investi dans ce travail durant ces années et je lui en suis reconnaissante.

J'adresse aussi mes remerciements également au Pr Pierre Berthomieu de m'avoir encadré et appris les bases de la biologie moléculaire et d'avoir consacré beaucoup de temps pour répondre à toutes mes questions.

Je tiens également à remercier les membres du jury de thèse, Drs : Marion Prudent, Claude Plassard, Maïté Vicré, Jacques Le Gouis et Claude Doussan, de m'avoir procuré l'honneur de participer à l'évaluation de mon travail.

Je remercie les membres de comités du suivie de thèse, Drs : Claude Doussan, Florian Fort, Christophe Pradal, Philippe Nacry, Christophe Perin qui ont apporté des éclairages pertinents sur mon sujet, leurs interventions et leurs conseils m'ont permis de bien mener mes recherches.

Je suis particulièrement reconnaissante au Dr Philippe Nacry pour ses précieux conseils qui, pendant la rédaction de l'article, ont grandement contribué à améliorer le manuscrit.

Je remercie tous les membres permanents de l'équipe Ticer : Claire, Doan, Jean Christophe pour toutes les discussions enrichissantes qu'on a pu échanger. Je tiens à remercier en particulier Martin Boeglin pour son aide précieuse pendant les dernières expériences.

Je remercie tous les membres de l'UMR IPSiM, en particulier Hugues Budot pour son aide dans l'installation du dispositif d'irrigation et Carine Alcon pour les formations en microscopie et sa disponibilité pour les discussions.

J’ai eu également un grand plaisir à côtoyer et passer des moments agréables avec les membres et ex-membres de l’équipe Ticer et l'UMR IPSiM en particulier Dorsaf Hmidi, Jing Zhou, Huikyong Cho, Zahra Brij et Layla Chmeiss, Joaquim Celuzza, Amel Maghiaoui, Nadia Bouain ainsi que toutes les personnes avec qui j’ai échangé pendant ces dernières années. Je tiens à remercier en particulier Houssein Zhour pour son aide, son écoute et son soutien.

Mes remerciements s’adressent à mes amies, Lamia Djebour, Karima Belabess, Imen Boudina, Lama Braysh. Je n’oublierai jamais nos fous rires et tous les bons moments passés ensemble, Ils seront à jamais gravés dans ma mémoire.

Je ne pourrais jamais rien accomplir sans les soutiens, encouragement et l’amour inconditionnel de mes chers parents. Mes mots ne pourront jamais exprimer ma gratitude et mes remerciements pour l'amour, l'affection et la confiance qu’ils m'ont témoignés tout au long de ma vie. Cette thèse leur est dédiée.

Mes remerciements vont aussi à mes sœurs Imen, Wafaa, Kheira Nor El Houda et mon frère Mohammed kamel Eddine qui m’ont toujours soutenue et cru en moi. Merci pour vos conseils et surtout vos encouragements. A mes petites nièces Alicia et Inès qui même à distance, ont réussi à me faire sourire dans les moments les plus stressants.

Mes reconnaissances vont aussi à mes enseignants de l’université d’USTO en particulier Pr Abderrezak Djabeur, Dr Djabeur Zahra, Dr Selami Nawel, Dr Aibeche Chahra pour m’avoir aidée pendant mon parcours ¨ l'universit®d'Oran.

J’adresse ma reconnaissance et mes remerciements au gouvernement algérien pour la bourse qu’il m’a accordé, sans cette bourse, cette thèse et ce travail n’auraient pas eu lieu.

Résumé

Une faible disponibilité des macroéléments dans la plupart des sols cultivés limite fortement les rendements des cultures en absence de fertilisation. Une meilleure compréhension de l'adaptation des systèmes racinaires à des sols pauvres en ions nutritifs, et l'exploitation de la diversité génétique existante dans ce domaine, entre espèces et/ou variétés, sont susceptibles de contribuer au développement de nouveaux cultivars et de nouvelles pratiques agronomiques permettant de limiter les intrants de fertilisation chimique coûteux et polluants pour l'environnement. L'architecture du système racinaire et la production des poils absorbants à l'interface racine-sol, sont des déterminants majeurs de la capacité du système racinaire à explorer le sol et prélever les ions nutritifs. A ce jour, aucune méthodologie ne permettait de phénotyper les poils absorbants dans un système racinaire considéré dans sa totalité. Dans le cadre de cette thèse, j'ai développé une méthodologie de phénotypage global, intégratif, des systèmes racinaires, incluant les poils absorbants. Un dispositif original de type rhizobox a été développé, permettant d'acquérir des images à haute résolution, pour lesquelles j'ai mis au point une procédure d'analyse informatisée associant le logiciel libre Ilastik pour la segmentation des images, et les logiciels WinRHIZO^{TM} et ImageJ pour l'analyse de traits globaux caractérisant le développement racinaire. Après validation de la méthodologie, les systèmes racinaires de deux génotypes de blé, un cultivar d'amidonnier (*T.t. dicoccum*, cv Escandia), ancêtre du blé dur, et une variété de pays de blé dur (*T.t. durum*, cv Oued Zenati) ont été comparés entre eux et par rapport à leur réponse à une faible disponibilité en phosphate (P), azote (N) ou potassium (K). Chez des plantules âgées de 15 jours (racines de ca. 30 cm de long), les carences en N, P ou K ont affecté différentiellement la croissance des plantes (allocation de la biomasse entre racines et feuilles, et développement préférentiel du système racinaire). Les trois carences se sont révélées entraîner une augmentation de la surface totale du système racinaire, qui s'est elle-même révélée comme résultant principalement d'une augmentation de la surface totale des poils absorbants sur le système racinaire entier (traduisant une augmentation de la densité et/ou longueur des poils sur tout le système). Le taux d'augmentation de la surface totale des poils absorbants était variable entre les deux variétés et selon l'élément limitant, plus fort en condition de carence en N chez l'amidonnier, et de carence en P chez la variété de pays. Toutes les réponses racinaires analysées, incluant ou non les poils absorbants, ont révélé une plus grande plasticité développementale en réponse aux carences nutritives chez la variété ancestrale. Une perspective ouverte par ce travail serait de comparer cette plasticité chez différentes variétés de blé récapitulant la domestication et l'amélioration de cette espèce. En perspective également, je montre que la méthodologie que j'ai développée peut permettre de phénotyper les réponses racinaires à des conditions biotiques (présence de bactéries de type Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Mots clés : nutrition minérale, blé, architecture racinaire, phénotypage des poils absorbants, analyses d'images, NPK

Summary

Low macroelement availability in most cultivated soils severely limits crop yields in the absence of fertilization. A better understanding of the adaptation of root systems to nutrient-poor soils, and the exploitation of existing genetic diversity in this field, between species and/or varieties, are likely to contribute to the development of new cultivars and new agronomic practices allowing to limit costly and environmentally polluting chemical fertilization inputs. The architecture of the root system and the production of root hairs at the root-soil interface are major determinants of the capacity of the root system to explore the soil and take up nutrient ions. To date, no methodology has been available to phenotype root hairs in a root system considered entirely. In this thesis, I developed a methodology for global, integrative phenotyping of root systems, including root hairs. An original rhizobox-type device was developed, allowing to acquire high resolution images, for which I developed a computerized analysis procedure associating the free software Ilastik for image segmentation, and the softwares WinRHIZO^{TM} and ImageJ for the analysis of global traits characterizing the root development. After validation of the methodology, the root systems of two wheat genotypes, a cultivated emmer wheat cultivar (*T.t. dicoccum*, cv Escandia), ancestor of durum wheat, and a landrace of durum wheat (*T.t. durum*, cv Oued Zenati) were compared with each other and with respect to their response to low phosphate (P), nitrogen (N) or potassium (K) availability. In 15-day-old seedlings (roots ca. 30 cm long), N, P or K deficiencies differentially affected plant growth (biomass allocation between roots and leaves, and preferential development of the root system). All three deficiencies were found to result in an increase in the total surface area of the root system, resulting primarily from an increase in the total surface area of root hairs over the entire root system (reflecting an increase in the density and/or length of hairs over the entire system). The rate of increase in total absorptive root hair area was variable between the two varieties and among limiting elements, stronger under N deficiency conditions in the emmer wheat, and P deficiency in the landrace. All the root responses analyzed, including or not the root hairs, revealed a greater developmental plasticity in response to nutrient deficiency in the ancestral variety. A perspective opened by this work would be to compare this plasticity in different wheat varieties recapitulating the domestication and improvement of this species. I also show that the methodology I have developed can be used to phenotype root responses to biotic conditions (presence of Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Keywords: mineral nutrition, wheat, root architecture, phenotyping of root hairs, image analysis, NPK

Liste d’abréviations

2D/3D: 2-dimensions/3-dimensions

ABA: Acide abscissique

C: control

ca.: circa

Cent : central zones

Cf: confer

CK: cytokinines

cv: cultivar

DW: dry weight

ET: l’éthylène

FDA : fluorescein diacetate

FW: fresh weight

GUS : β Glucuronidase

Lat : lateral zones

LK: low k

LN: low N

LP: low P

PCD: La mort cellulaire programmée

PCR*:* Polymerase Chain Reaction

Pi: Phosphate inorganique

PI: propidium iodide

RH: root hair

ROS: dérivé réactif de l'oxygène

RSA: root system architecture

T. t.: *Triticum turgidum*

Triton X100: *t*-Octylphenoxypolyethoxyethanol

Tween 20 : Le monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane

vs.: versus

Table des matières **Page**

Chapitre 1 : Etude bibliographique **1**

1.1 Préambule **2**

1.2 La plante modèle : le blé **2**

1.2.1 La domestication du blé 3

1.2.2 Modifications morphologiques et physiologiques associées à la domestication 4

1.2.2.1 La domestication et la modification physiologique chez le blé 4

1.2.2.2 La domestication et la modification des traits morphologiques chez le blé 5

1.2.3 L'organisation du système racinaire chez le blé 5

1.3 Stratégies d'adaptation des systèmes racinaire à une faible disponibilité des nutriments et aux conditions environnementales **6**

1.4 Les poils absorbants **9**

1.4.1 Développement des poils absorbants 10

1.4.2 La régulation transcriptionnelle dans les trichoblastes vs atrichoblastes 10

1.4.3 Rôle des poils absorbants dans La pénétration dans le sol, l'adhésion aux particules du sol puis la formation des manchons trichoblastiques (rhizosheaths) 13

1.4.4 Exploration du sol pour l'acquisition de nutriments et d'eau : importance des poils racinaires pour la performance des plantes dans des conditions de stress 16

1.4.4.1 Poils absorbants, nutrition phosphatée et réponse à la carence en P 17

1.4.4.2 Poils absorbants, nutrition azotée et réponse à la carence en N. 18

1.4.4.3 Poils absorbants et nutrition potassique 19

1.5 Synergies des traits racinaires **20**

1.6 Stratégies et approches pour la culture des plantes avant le phénotypage des racines. **21**

1.6.1 Le phénotypage des racines en plein champ 21

1.6.2 Méthodologies de phénotypage de systèmes racinaires développés dans des conditions contrôlées 22

1.6.3 Les limites des méthodologies de phénotypage à haut débit disponibles dans la bibliographie 23

1.7 Objectifs de la thèse **24**

Chapitre 2 : Matériel et méthodes **25**

2.1 Matériel végétal **26**

2.2 Stérilisation des grains de blé 26
2.3 Préparation des solutions nutritives 26
2.4 Culture des plantes dans le rhizobox..... 27
2.5 Acquisition et segmentation des images 27
2.6 Analyse d'images 28

Chapitre 3 : Mises au point techniques et analyses supportant et validant la méthodologie de phénotypage intégratif en rhizobox 30

3.1 Le montage expérimental des dispositifs de type rhizobox 30
3.2 Le dispositif d'arrosage automatique 31
3.3 Agencement des supports des rhizobox et du système d'arrosage 31
3.4 Elimination de la buée à la surface des plaques de verre des rhizobox et augmentation de la définition des images 31
3.5 Capacité du dispositif rhizobox à permettre le développement des systèmes racinaires de différentes espèces 32
3.6 Les rhizobox permettent un suivi cinétique du développement des systèmes racinaires ...33
3.7 Comparaison du développement de plantes cultivées en rhizobox ou dans du terreau 33
3.8 Prétraitement des images..... 35
3.9 Estimation opérationnelle de la longueur et de la densité des poils absorbants des segments racinaires obtenues depuis le rhizobox..... 36
3.10 Discussion et conclusion 38

Chapitre 4 : Article 1. Une méthodologie pour le phénotypage du développement des poils absorbants dans le système racinaire entier utilisée pour comparer les réponses de deux accessions de blé à la privation de Pi..... 39

Abstract 40

1. Introduction..... 41

2. Materials and methods..... 42

2.1 Plant material and growth conditions 43

2.2 The rhizobox-type device 43

2.3 Image acquisition and segmentation: 44

2.4 Image analyses 44

2.5 Root hair viability assay 45

3. Results..... 45

3.1 A rhizobox-like device providing high resolution images of root hairs on intact root systems 45

3.2 Effects of low phosphate availability on root and root hair development 47

3.3 Using the rhizobox-based phenotyping methodology to investigate root architectural traits and plasticity 48
4. Discussion..... 49
4.1 A rhizobox-type platform developed for integrative phenotyping of root and RH traits.....50
4.2 Root system responses to Pi shortage in Oued Zenati and Escandia 51
4.3 Scientific and agronomical perspectives of root phenotyping approaches in wheat.....52
5.Supplementary data 54

Chapitre 5 : Article 2. Plasticité des réponses des semis de blé à la carence en K^+ mise en évidence par le phénotypage intégré des racines et des poils racinaires sur l'ensemble du système racinaire. 55
Abstract 57
1. Introduction 57
2. Results 60
2.1 A rhizobox-type device for high-resolution phenotyping of root systems that allows integrated global analysis of root hairs 60
2.2 Effect of K^+ shortage on plant K^+ nutrition, root system development and shoot biomass in two wheat accessions grown in the rhizobox-type device..... 62
2.3 Effect of K^+ shortage on local root hair production in seminal and lateral roots of the two wheat accessions 61
2.4 Root hair contribution to entire root system area and response to K^+ shortage **62**
3. Discussion 63
3.1 Integrative analysis of the entire root system including root hairs 63
3.2 Relevance of the RH trait parameters in the analysis of plant response to K^+ shortage.....64
3.3 Varying responses to K^+ shortage in Escandia and Oued Zenati wheat accession.....66
4. Materials and methods 67
4.1 Plant material and growth conditions..... 67
4.2 The rhizobox-type device..... 68
4.3 Image acquisition and segmentation 69
4.4 Image analysis 69
4.5 Biomass and K^+ content analyses 69
4.6 Statistical analyses 70

Chapitre 6 : Article 3. Réponses des poils absorbants à une carence d'azote et plasticité des racines révélées par le phénotypage global des systèmes racinaires de deux variétés de blé génétiquement éloignées 71

1. Introduction 72

2. Results 73

2.1 Effects of low nitrogen availability on shoot and root development 73

2.2 Effect of the N shortage treatment on root hair length and density: local measurements .. 73

2.3 Effect of N shortage on root system development: integrative global analysis 74

3. Discussion 75

3.1 Root hair traits analysed over the whole root system 75

3.2 Comparison of the responses of the two wheat accessions to nitrogen starvation 77

4. Conclusion 77

5. Materials and methods 78

5.1 Plant material and growth condition 78

5.2 Image acquisition and segmentation 79

5.3 Image analysis 79

6. Supplementary data 81

Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives 82

7.1. Introduction 83

7.2. Analyse comparative des réponses des accessions Oued Zenati et Escandia aux traitements de carences LK, LP et LN 85

7.2.1 Analyse des données obtenues dans les différents traitements contrôles 85

7.2.2. Comparaison des effets des traitements de carence en K, P et N sur les traits racinaires phénotypés 86

7.2.3. Conclusion 88

7.3. perspectives 89

7.3.1. Les différences de plasticité entre Escandia et Oued se retrouvent-elles entre variétés ancestrales et variétés modernes, et reflètent-elles des conséquences de la sélection ? 89

7.3.2. Surface et architecture du système racinaire : vers une analyse intégrative 89

7.3.3. Des opportunités d'analyses moléculaires du développement et de la morphogenèse adaptative du système racinaire 90

7.3.4. Vers l'analyse d'interactions biotiques ? 90

Références bibliographiques 94

Annexe 120

Chapitre 1

Etude bibliographique

Chapitre 1

Etude bibliographique

1.1 Préambule

La disponibilité sous-optimale des ressources minérales du sol pour les plantes est l'une des principales causes limitant le rendement des cultures et la production agricole. L'utilisation d'engrais permet d'augmenter les rendements mais à des coûts économiques et écologiques élevés et avec le risque conséquent d'épuiser des ressources non renouvelables, notamment les mines de phosphate. Mettre au point des pratiques agricoles plus économes et respectueuses de l'environnement, réduisant l'utilisation des intrants agricoles, dont les engrais chimiques, tout en assurant des rendements suffisants, apparaît maintenant comme un objectif essentiel. Le développement de nouveaux cultivars, possédant une plus grande capacité d'acquisition des ressources hydro-minérales du sol, pourra contribuer de façon significative à telle réorientation de l'agriculture vers des pratiques plus écologiques.

Les racines, qui constituent la partie "cachée" de la plante, n'ont pas été explicitement ciblées dans les programmes d'amélioration des cultures en raison des difficultés techniques pour y accéder de manière non destructive dans le sol. Cependant, depuis les années 2000, l'analyse du développement et du fonctionnement du système racinaire suscite un intérêt croissant, s'inscrivant clairement dans l'objectif de contribuer à une seconde révolution verte (Lynch, 2007), conduisant à des pratiques agricoles durables.

Des efforts importants ont été fournis au niveau international pour développer des méthodologies de phénotypage permettant d'analyser les caractéristiques phénotypiques des systèmes racinaires et leurs réponses aux conditions environnementales. Les méthodologies développées sont souvent consacrées à l'analyse du système racinaire en termes de développement, de morphologie et d'architecture, mais s'intéressent peu, ou pas du tout, aux traits racinaires concernant les poils absorbants, qui participent cependant fortement à la nutrition minérale de la plante.

Le travail que j'ai conduit au cours de ma thèse a eu pour objectif de développer une méthode de phénotypage racinaire intégrant les poils absorbants, dans des systèmes racinaires entiers et déjà relativement bien développés. J'ai ensuite utilisé cette méthodologie pour analyser les réponses racinaires à une carence en N, P ou K chez le blé dur, une espèce à grand intérêt agro-alimentaire.

Dans l'analyse bibliographique de ce premier chapitre, nous aborderons les généralités sur le blé et son système racinaire, la plasticité des systèmes racinaires des plantes en réponse aux conditions de stress nutritionnels, les principales fonctions des poils racinaires et leur importance dans la nutrition minérale, et nous passerons ensuite en revue les différentes approches de phénotypage qui ont été développées, leurs principaux objectifs et leurs limites.

1.2 La plante modèle : le blé

Le blé dur (*Triticum turgidum subsp. durum*) est cultivé dans le monde entier sur près de 17 millions d'hectares, avec une production mondiale de 38,1 millions de tonnes en 2019. Le plus grand producteur est l'Union européenne, avec 9 millions de tonnes en 2018, suivi par le Canada, la Turquie, les États-Unis, l'Algérie, le Mexique, le Kazakhstan, la Syrie et l'Inde. En outre, les pays du bassin méditerranéen sont les plus grands importateurs et les plus grands consommateurs de produits à base de blé dur (farine, pâtes et semoule). Parmi les pays de l'Union Européenne (UE), l'Italie est considérée comme le leader de la production de blé dur avec une production moyenne de 4,26 millions de tonnes au cours de la dernière décennie (1,28 millions d'hectares de surface cultivée), suivie de la France avec 1,89 million de tonnes (0,37 million d'hectares) (Xynias *et al*., 2020).

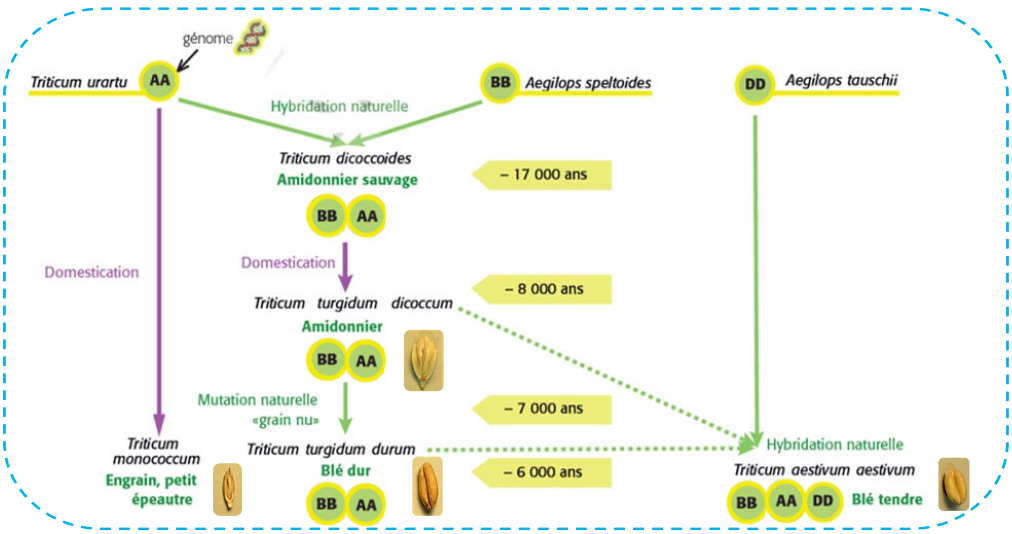
1.2.1 La domestication du blé

Depuis que l'homme a tenté pour la première fois de produire de la nourriture pendant la "révolution néolithique" il y a plus de 10 000 ans, la culture du blé et la civilisation humaine ont "co-évolué" dans la plupart des pays du globe. La domestication du blé s'est produite dans le bassin du Tigre et de l'Euphrate (ancienne Mésopotamie) et dans les montagnes d'Iran, de Turquie, de Syrie et de Jordanie dans une région souvent appelée le "Croissant fertile" (Figure 1.1).

L'origine du blé (dur et tendre) remonte à la fusion du génome de deux espèces ancestrales *Triticum urartu* (génome AA) et *Aegilops speltoides* (BB). Cette fusion conduit à l'apparition des blés durs à 28 chromosomes *Triticum turgidum dicoccoides* (BA). La domestication des géniteurs sauvages T*. turgidum subsp. dicoccoides* par les premiers agriculteurs s'est effectuée sur des bases empiriques avec une sélection d'un rachis non cassant porté par les gènes brittle rachis 2 (Br-A2) et brittle rachis 3 (Br-A3), présents sur les bras courts des chromosomes 3A et 3B, respectivement donnant l'amidonnier cultivé (*T. turgidum subsp. dicoccum*) (Kucek *et al*., 2015). Une seconde sélection a permis d'obtenir des grains nus au travers de la mutation dominante au locus Q (Xynias *et al*., 2020) (Figure 1.2).



Figure 1.1. Développement de l'agriculture au néolithique en méditerrannée orientale. Des lieux montrant des traces de la consommation par l'homme d'espèces végétales ancestrales, y compris des céréales et des légumineuses, de la domestication de ces espèces et de l'élevage d'animaux caprins, ovins et bovins, sont localisés sur la carte, et les époques correspondantes sont datées datées (BCE: "Before Common Era"; BCE et BC (before Christ) correspondent à la même référence du calendrier Grégorien). Origine de l'image: https://www.worldhistory.org/image/12521/map-of-the-fertile-crescent/



(ARVALIS, 2017) avec modifications

Figure 1.2. Généalogie des membres cultivés de blé. Les blés durs à 28 chromosomes (BBAA) sont des allotétraploïdes possédant les génomes B provenant d'*A. speltoïdes* et A de *t. urartu*. Une telle hybridation aurait donné naissance au *T. t. diccocoïdes* qui se serait diversifié et, par sélection, aurait engendré *T. t. dicoccum* puis *T. t. durum* . Dans le genre *Triticum*, on distingue l'existence de trois sous-groupes : (i) Le groupe diploïde (2n = 2x = 14 chromosomes), dont *Triticum monococcum aegilopoides* (engrain sauvage) et *Triticum monococcum* (petit épeautre), (ii) Le groupe tétraploïde (2n = 4x = 28 chromosomes) à grains vêtus avec *Triticum turgidum diccocoïdes* ou amidonnier sauvage, *Triticum turgidum dicoccum* (amidonnier), ou à grains nus '*Triticum turgidum durum* ou blé dur', et (iii) Le groupe des blés hexaploïdes (2n = 6x = 42), avec *Triticum aestivum aestivum* ou blé tendre (Kucek et al., 2015).

1.2.2 Modifications morphologiques et physiologiques associées à la domestication

1.2.2.1 La domestication et la modification physiologique chez le blé

La domestication de blé dans le Croissant fertile et la sélection subséquente du blé dur a considérablement réduit sa diversité génétique, on estime que la diversité initiale a été réduite de 84 % (Jaradat, 2012).

Les effets combinés de la sélection naturelle et humaine ont conduit au développement de génotypes représentant différentes combinaisons de caractères, tels que la tolérance au froid, à la chaleur ou à la sécheresse, la vigueur de croissance précoce, la résistance à l'humidité. Ceci est reflété par des réponses phénotypiques typiques (Donald & Hamblin, 1983) telles que la perte de dormance, l'augmentation de la taille des graines, la modification du mode de dispersion des graines (Meyer *et al*., 2012). En ce qui concerne la taille des plantes, historiquement, la hauteur des blés a d'abord augmenté progressivement de *T. turgidum s*sp. *dicoccoides* à *T. turgidum ssp. durum* (accessions avant la révolution verte, appelée également des variété de pays). Cette évolution s'est ensuite inversée pour *T. turgidum ssp. durum* (élite c'est à dire variété après la révolution verte). Ces derniers, avec leur petite taille, ont pu accepter des doses élevées d'azote, le principal ion limitant le rendement. Ce qui a ensuite permis d'obtenir des rendements élevés associés à l'application d'engrais en quantités importantes.

Par ailleurs, les agriculteurs traditionnels plantaient divers assemblages de génotypes de blé (des races locales). Cette pratique a conduit au développement de méta-populations de blé de type « variétés de pays » et à l'émergence de systèmes de semences paysannes par lesquels ils accédaient à un matériel génétique diversifié. Les variétés de pays de blé se composent de variétés de cultures traditionnelles développées par les agriculteurs au cours d'années de sélection naturelle et humaine et sont adaptées aux conditions environnementales et aux pratiques de gestion locales. En tant que populations végétales distinctes, les variétés locales sont nommées et maintenues par les agriculteurs traditionnels pour répondre à leurs besoins sociaux, économiques, culturels et environnementaux. La structure génétique des variétés locales de blé est une approche évolutive de la survie et de la performance, en particulier dans des conditions de culture arides et semi-arides.

En plus des variétés de pays, certaines variétés plus anciennes de *dicoccum* sont encore cultivées comme en Espagne et surtout en Italie où traditionnellement elles participent à des recettes dont le célèbre « Farro ». Les *dicoccum* ont été les variétés dispersées très tôt à travers le monde peu de temps après les débuts de la domestication du blé à partir des *dicoccoides*, il y a un peu plus de 10000 ans. Le pool génétique était assez diversifié avec des

variétés provenant de régions excentrées comme l'Ethiopie et ont donc eu le temps de développer des aptitudes dans des conditions pédo-climatiques diversifiées. Il est à ce sujet intéressant de constater que de nombreuses résistances comme celle à la fusariose sont trouvées dans les *dicoccum* et ne sont pas présentes dans les autres sous-espèces.

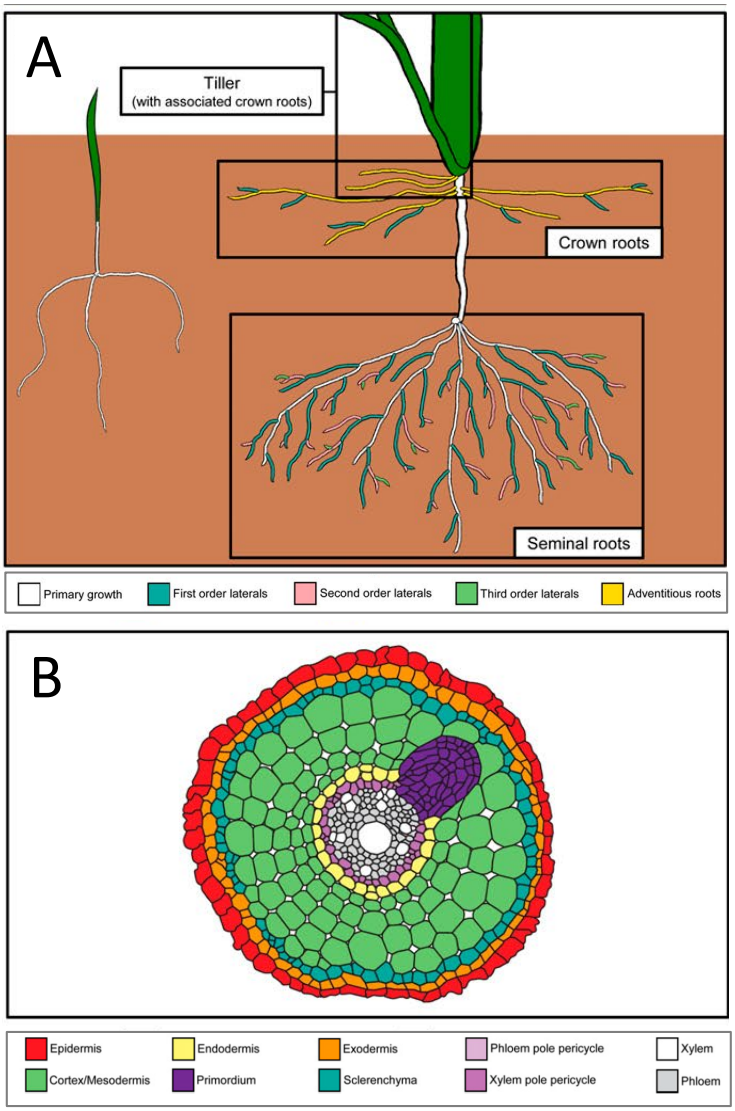
Les variétés ancêtres et locales de blé sont des sources précieuses pour élargir la base génétique du blé cultivé. Le développement de nouvelles variétés à partir des populations de blés anciens est une stratégie viable pour améliorer le rendement et la stabilité du rendement, en particulier dans des conditions de stress et de changement climatique futur. En outre, ces variétés abritent des gènes et des complexes de gènes impliqués dans la qualité du grain, la tolérance aux stress biotiques et abiotiques, et l'adaptation à un large éventail de systèmes agricoles biologiques et à faibles intrants.

1.2.2.2 La domestication et la modification des traits morphologiques chez le blé

Au niveau racinaire chez le blé, il a été constaté que les anciennes variétés avaient approximativement une biomasse racinaire trois fois plus importante avec une profondeur plus grande que les variétés élites. La taille des racines des cultivars modernes est réduite par rapport à celle des variétés sauvages (Waines et Ehdaie, 2007 ; Roucou *et al*., 2020). Par contre, la masse de racines séminales a augmenté chez les blés modernes (Golan *et al*., 2018). Quant aux barbes, des extensions filamenteuses longues et rigides des glumes, elles participent à 40% à la photosynthèse et contribuent à l'alignement des épillets portant les graines au niveau des épis. C'est la raison pour laquelle leur présence a été conservée lors de la domestication malgré le fait que les barbes des variétés domestiquées soient plus courtes que celles des sauvages (Haas *et al*., 2018). Les barbes ont aussi une fonction dans la protection contre la prédation aviaire. De plus, la domestication a réduit en grande partie la dormance des graines et augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'azote (Gioia *et al*., 2015) tandis qu'elle a augmenté le taux net de photosynthèse, le taux de production de feuilles et la teneur en azote (Roucou *et al*., 2020).

1.2.3 L'organisation du système racinaire chez le blé

Le système racinaire est le réseau formé par les divers types de racines de la plante, qui diffèrent par leur origine, leur anatomie et leur fonction. Les céréales monocotylédones ont une structure racinaire complexe comprenant plusieurs types de racines classées en deux groupes : (1) les racines embryonnaires telles que la racine primaire et les racines séminales, et (2) les racines post-embryonnaires qui se forment après la germination à partir de tissus



(Atkinson et al., 2014) .

Figure 1.3. Système racinaire du blé.

(A) Organisation du système racinaire du blé au stade de plantule (à gauche) et au stade mature (à droite).

(B) Coupes transversales des primordia des racines latérales émergentes chez les céréales. D'après Atkinson et al., 2014

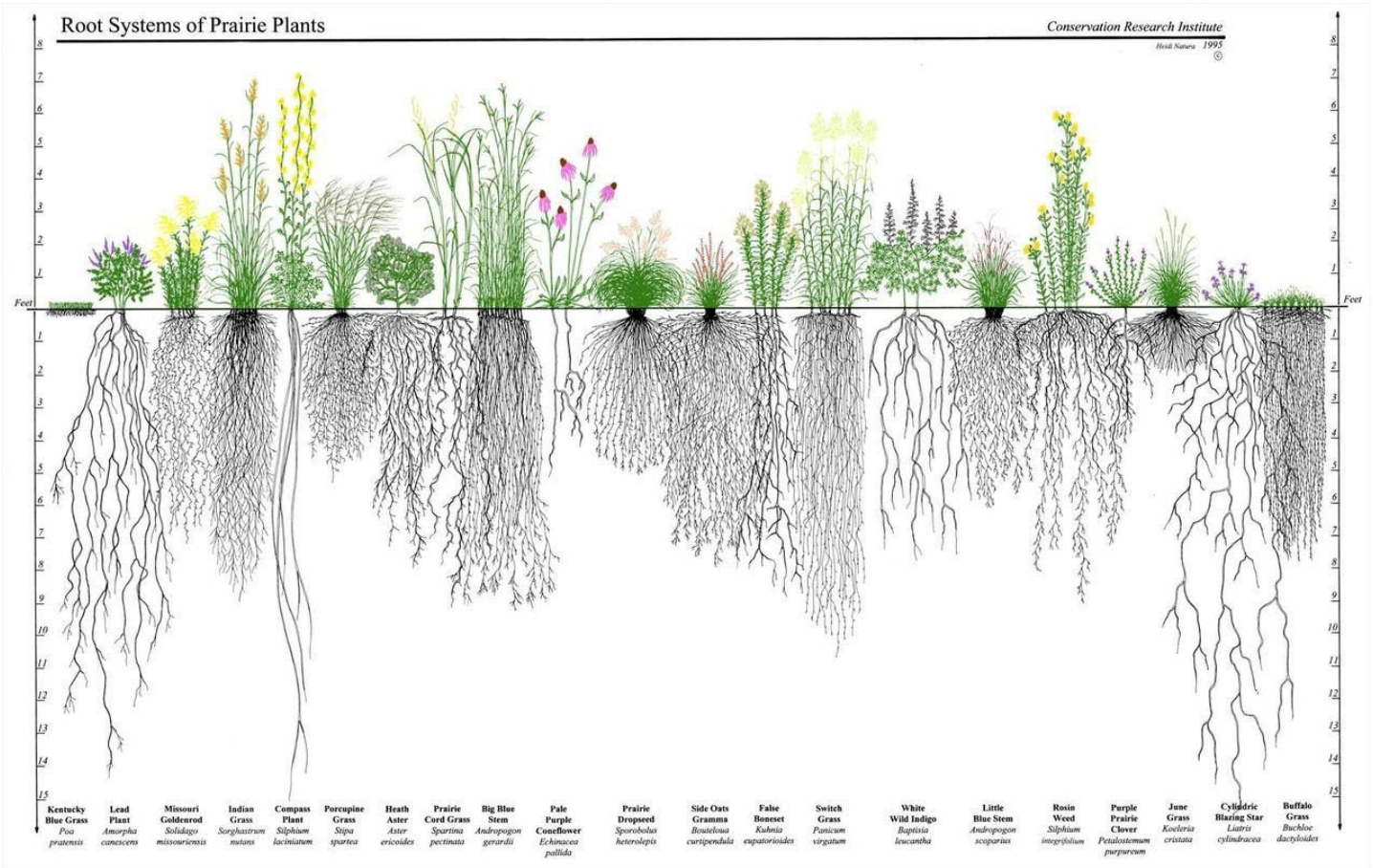
non racinaires (racines nodales) ou de racines existantes (racines latérales) (Atkinson *et al*., 2014 ; hochholdinger, 2004 ; Watt *et al*., 2008). Chez le blé, il y a environ six primordia de racines présents dans l'embryon. Lors de la germination, la racine primaire émerge à travers la coléorrhize, suivie par l'émergence de quatre ou cinq racines séminales (Golan *et al*., 2017 ; Kirby, 2002). Celles-ci jouent un rôle essentiel dans l'établissement de la plante en permettant à la plantule d'explorer le sol à la recherche d'eau et de nutriments avant qu'elle n'atteigne sa pleine capacité photosynthétique (Kirby, 2002). En plus des racines séminales, le système racinaire de blé est composé principalement des racines adventives post-embryonnaires appelées "racines de la couronne", qui proviennent des nœuds basaux de la pousse principale et des talles. Un plant de blé produit 10 à 15 axes de racines de couronne (Figure 1.3) (Gregory *et al*., 1978). À maturité, le système racinaire du blé s'étend à une profondeur de 1 à 2 m ou plus selon les conditions du sol, mais la plupart des racines se trouvent dans les 30 premiers centimètres du sol (Kirby, 2002).

1.3 Stratégies d'adaptation des systèmes racinaires à une faible disponibilité des nutriments et aux conditions environnementales

Une grande diversité de systèmes racinaires a été mise en évidence, dans le cas de prairies par exemple (Heidi Natura, 1995 ; Figure 1.4). Cette diversité témoigne de différences dans les stratégies d'acquisition des ressources hydrominérales, qui sont susceptibles de donner lieu à des compétitions ou coopérations entre espèces.

Le système racinaire est l'interface entre la plante et le sol, il remplit des fonctions essentielles telles que l'ancrage de la plante et l'acquisition d'eau et de minéraux. Dans les sols, l'acquisition des ressources est largement déterminée par la mobilité et le mode de transport des minéraux vers les racines. Les nutriments immobiles tels que le phosphore (P) et relativement immobiles comme l'ammonium (NH_4^+) et le potassium (K^+) se déplacent principalement vers la surface des racines par diffusion, tandis que les ions très mobiles (car ayant peu d'interactions physico-chimiques avec les minéraux du sol), tels que le nitrate (NO_3^-) se déplacent généralement dans la matrice du sol par flux de masse de la solution du sol vers les racines (Lynch, 2019). Par conséquent, la disponibilité des ressources hydrominérales est variable à l'échelle spatiale dans la plupart des sols, ce qui peut conduire à des carences en éléments nutritifs pour les plantes.

Étant immobiles, les plantes s'adaptent à ces conditions de carence en modulant le développement et l'architecture du système racinaire, de façon à exploiter au mieux les hétérogénéités dans la distribution des nutriments, par des stratégies adaptées aux caractéristiques d'abondance et de mobilité des éléments recherchés. Par exemple, la



(Heidi Natura, 1995)

Figure 1.4. Diversité des systèmes racinaires chez les plantes herbacées Image Obtenue depuis le lien : https://dyckarboretum.org/roots-of-native-plants/

	Gènes de transport	symbiose mycorhizienne	Symbiose bactérienne ou modifications anatomiques indépendantes
N	AtNRT1.2 AtNRT2.1 AtNRT3.1 AtNRT6.3	++ (GintAMT1, 2, 3 GiNT1, 2)	**Nodules racinaires ou aériens** Légumineuses, Parasponia, Plantes actinorhiziennes
P	AtPHT1.1 AtPHT1.2 AtPHT1.3 AtPHT1.4	+++ (GintPT1, 2, 3, 4, 5, 6) LePT3, 4, 5 PtPT10	**Racines protéoïdes** Protéacées, Légumineuses, Bétulacées, Moracées, Myricacées **Racines dauciformes** Cypéracées, Restoniacées
K	AtAKT1 AtKC1 AtHAK1 AtGORK AtTRH1 CNGC? / CHX?	++ (HcTRK1)	

(Calebrese et al., 2017)
(Garcia et al., 2013)

Tableau 1.1. Les différents modes d'acquisition des 3 macro-éléments par les plantes. Les gènes de symbiontes fongiques sont indiqués entre parenthèses

stratégie d'exploration racinaire des couches superficielles du sol est mise en œuvre par les plantes pour favoriser la nutrition phosphatée puisque les premiers centimètres du sol sont généralement plus riches en matière organique. Cela implique une modification de plusieurs caractéristiques des racines telles que la trajectoire gravitationnelle des racines conduisant à un changement d'angle de croissance de l'intérieur vers l'extérieur, ce qui se traduit par un système racinaire moins profond et plus large. A l'opposé, des plantes ont tendance à adopter une configuration racinaire profonde en cas de carence en nitrates via une augmentation de la longueur des racines étant donné que la principale forme d'azote minéral dans les sols est le nitrate qui est très mobile dans la solution aqueuse et percole donc pour atteindre les couches profondes du sol (Saengwilai *et al*., 2014 ; Xin *et al*., 2021).

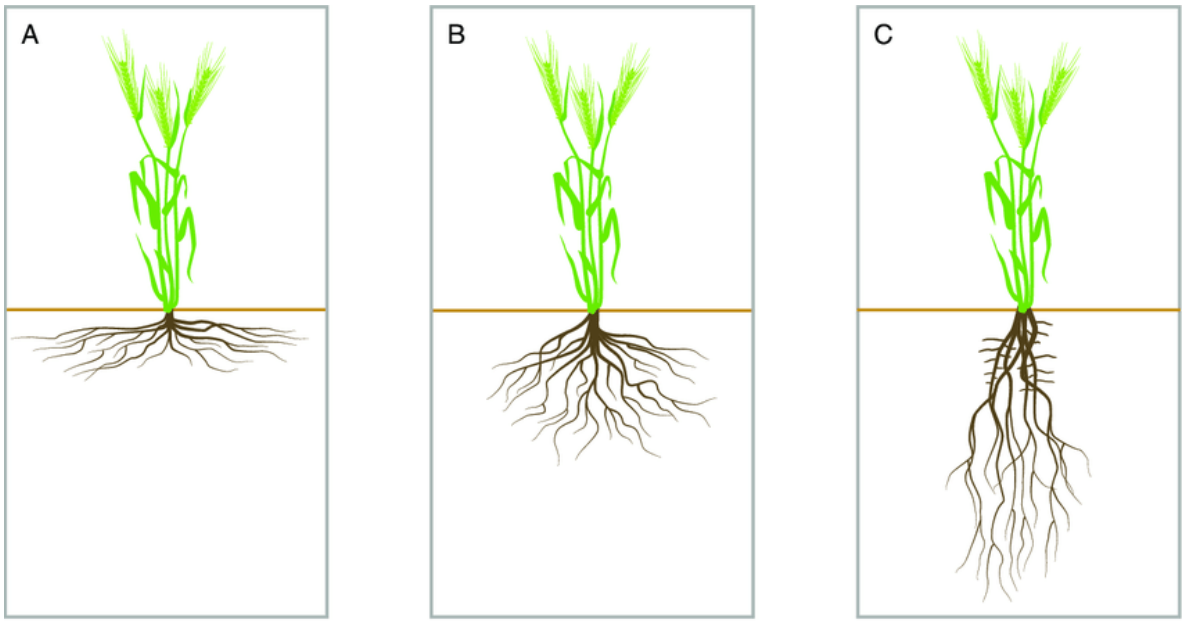
Outre les modifications de l'architecture du système racinaire et du développement des racines, les plantes disposent de différentes stratégies pour favoriser l'acquisition des ions et de l'eau. Elles peuvent moduler les niveaux d'expression des canaux ioniques et transporteurs, à forte ou faible affinité, permettant aux cellules de la périphérie racinaire d'acquérir les ressources du sol. Elles peuvent aussi développer des symbioses avec le microbiote du sol, lui permettant d'explorer bien au-delà de ses propres structures racinaires.

La symbiose mycorhizienne est une association mutualiste apparue dès la colonisation du sol par les plantes (Strullu & Strullu, 2007). La symbiose mycorhizienne est séparée entre symbiose ecto et endo-mycorhizienne, et est présente chez la très grande majorité des plantes. Différents gènes codant des systèmes de transport membranaire d'ions minéraux nutritifs (en particulier concernant la nutrition en N, P ou K) ont été caractérisés, chez des plantes ansi que chez certains de leurs partenaires fongiques (Tableau 1.1). Ces symbioses mycorhiziennes entrainent aussi des modifications importantes au niveau de l'architecture racinaire mais semblent ne pas être toujours suffisantes pour le développement des plantes en milieu compétitif ou dans des milieux pauvres peu compatibles avec la présence de champignons (certains sols australiens). Des plantes ont donc développé des symbioses complémentaires avec des bactéries diazotrophes comme les légumineuses et les plantes actinorhiziennes pour leurs besoins en azote. Ces symbioses entrainent aussi des modifications de l'architecture racinaire et l'apparition de structures spécialisées (nodules) et utilisent, pour certaines, les poils absorbants comme voie d'entrée pour les bactéries (Tableau 1.1). Concernant le phosphate et, dans une moindre mesure, l'azote, sans lien avec le microbiote, certaines plantes comme les Proteaceae ont développé des structures racinaires spécialisées comme les racines protéoïdes qui sont des radicelles se développant à très forte densité et sécrétant des molécules organiques comme des citrates aidant la plante à solubiliser les phosphates peu assimilables. Dans un but similaire, mais chez d'autres familles comme les Cypéraceae et les Rastoniaceae, cette fois, ce sont les poils absorbants qui se

développent et se densifient pour former des racines dauciformes (voir ci-dessous, § 1.4.3 et Figure 1.12) formant des formes rappelant des goupillons et sécrétant, comme les racines protéoïdes, des acides organiques pour solubiliser les phosphates (Tableau 1.1). De façon remarquable, alors même que le K^+ est le cation majoritaire chez les plantes, les carences en K^+ ne semblent pas induire de modifications racinaires notables et spécialisées chez les plantes comme dans le cas de l'azote ou du phosphate, même si la mycorhization est impliquée dans l'absorption du K^+. Cette différence pourrait être liée au statut même de l'ion K^+ par rapport à NO_3^- et "PO_4^{3-}." Ces deux derniers ions sont impliqués structurellement dans la formation de molécules organiques tels que les acides nucléiques, les protéines et les métabolites secondaires alors que K^+ a essentiellement un rôle d'osmolyte et de contre-ion, libre en solution dans le cytoplasme et la vacuole. La plante a donc potentiellement plus de possibilités de substitution de l'ion K^+ par d'autres types d'ions, comme le Na^+ (en absence de stress salin cependant) ou des molécules organiques (glycine bétaïne par exemple) pour pallier aux déficits de K^+. Cela pourrait expliquer l'absence de modifications morphologiques particulières, comme les types protéoïdes ou dauciformes, chez les plantes même dans les sols très pauvres en potassium.

En résumé l'acquisition de différents éléments minéraux, et souvent de différentes formes chimiques d'éléments minéraux, nécessite des stratégies racinaires différentes. Néanmoins, il est possible d'identifier des groupes de traits qui favorisent l'acquisition de groupes d'éléments minéraux. On peut répartir ces traits en deux catégories : (i) anatomiques & morphologiques, comme par exemple la modification du diamètre des racines, la production de racines latérales, la formation de poils absorbants ou de structures spécialisées accueillant les symbiontes, et (ii) physiologiques & moléculaires, comme la régulation de l'allocation de la biomasse aux racines au détriment des feuilles, l'expression de transporteurs d'ions à forte affinité, l'exsudation de métabolites qui affectent les concentrations d'éléments minéraux dans la rhizosphère, soit directement par l'interaction avec leur structure chimique dans le sol, soit indirectement par la communication et éventuellement le recrutement de communautés microbiennes appropriées.

Des analyses expérimentales et théoriques ont permis d'identifier des phénotypes racinaires qui jouent des rôles majeurs dans l'adaptation d'un système racinaire à son environnement pédologique et ainsi proposer des idéotypes racinaires pour augmenter l'efficacité d'acquisition des nutriments et de l'eau (Wang *et al*., 2010 ; Mi *et al*., 2010 ; Lynch, 2013 ; White, 2019). En général, des idéotypes intégrant de phènes architecturaux, anatomiques et physiologiques ont été proposés dans la littérature comme susceptibles de favoriser l'acquisition du phosphate (Lynch and Brown.,2001 ; White *et al*., 2005 ; Lynch, 2007, 2011, 2013 ; Richardson *et al*., 2011), du potassium (White *et al*.,2013b) et de l'azote



Topsoil foraging for P

Early root vigour

Large root biomass or root/shoot ratio

More cortical aerenchyma

Large root surface area (lateral rooting, root hairs) in topsoil

High root length density

Proliferation in patches of high P phytoavailability

Mycorrhizal associations

Greater exudation of H^+ and organic compounds

Greater exudation of phosphatases

Greater phosphate uptake capacity of root cells

Intermediate response for K

Early root vigour

Large root biomass or root/shoot ratio

More cortical aerenchyma

Large root surface area (lateral rooting, root hairs)

High root length density

Proliferation in patches of high K phytoavailability

Greater exudation of H^+ and organic compounds

Greater K^+ uptake capacity of root cells

Greater water uptake through transpiration

Steep, cheap and deep for N

Early root vigour

Large root biomass or root/shoot ratio

More cortical aerenchyma

Initial roots with shallow growth angles

Later roots with steep root growth angles

Large root surface area (lateral rooting, root hairs)

High root length density

Greater N-uptake capacity of root cells

Greater water uptake through transpiration

Greater exudation of Biological Nitrification Inhibitors

Greater association with organisms fixing N_2

(White et al., 2019)

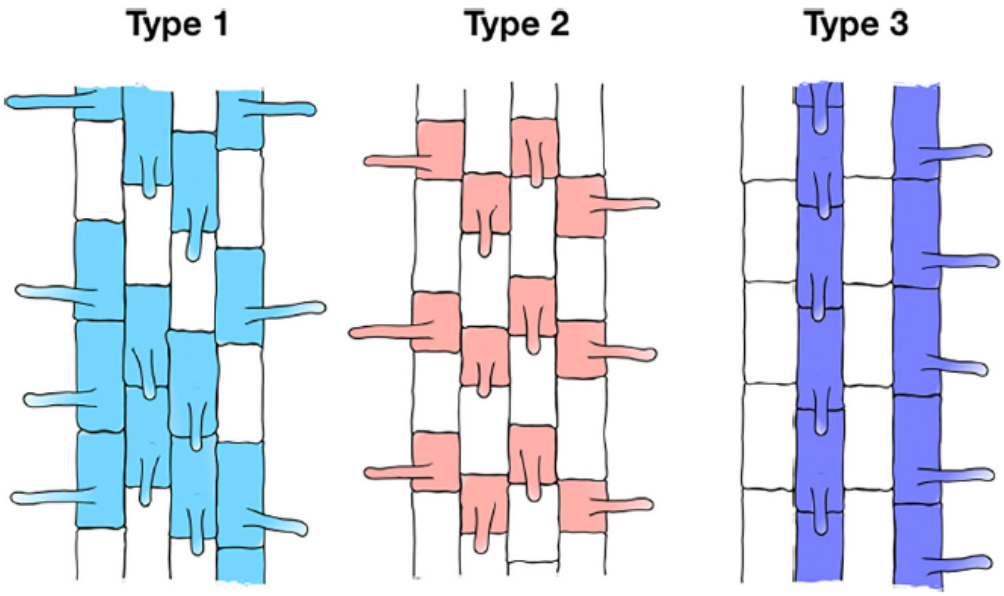
Figure 1.5. Idéotypes de racines pour l'acquisition efficace de (A) phosphate, (B) potassium et (C) azote

(Dunbabin *et al*., 2003 ; Lynch, 2013) (Figure 1.5). Ces idéotypes prennent en compte la capacité du système racinaire à parvenir à une meilleure exploration et exploitation du sol, au moindre coût métabolique (Lynch, 2011). Il est important de noter qu'une analyse coût-bénéfice des caractéristiques des racines suggère que les poils racinaires peuvent être considérés parmi les traits racinaires intéressants pour une optimisation potentielle de l'efficience du système racinaire dans le cas de carences minérales (Lynch, 2007).

1.4 Les poils absorbants

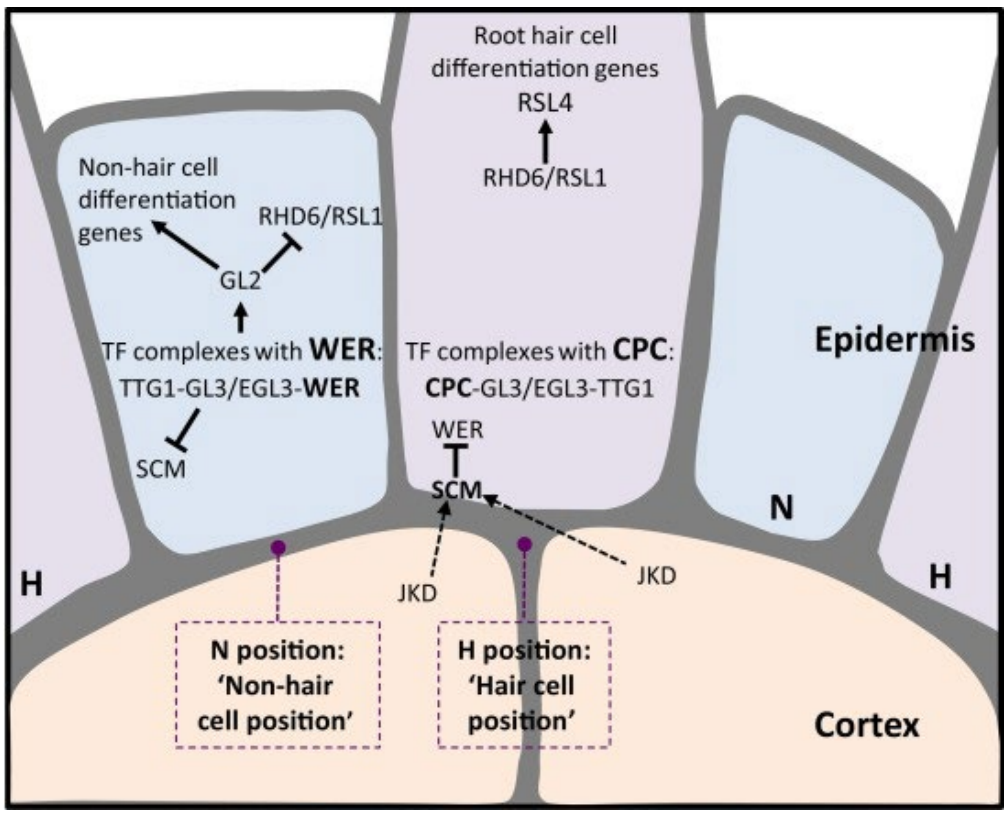
1.4.1 Développement des poils absorbants

Les poils racinaires sont de longues excroissances de forme tubulaire provenant des cellules épidermiques des racines. Chez blé, les poils racinaires ont un diamètre d'environ 12 µm (Gahoonia *et al.*, 1997) et peuvent atteindre 1 à 2.5 mm de longueur (Han *et al.*, 2016). Les poils absorbants sont produits par des cellules épidermiques appelées trichoblastes. Trois patrons de distribution des poils absorbants dans l'épiderme des racines sont identifiés chez les espèces végétales : aléatoire, alternatif et dépendant de la position, dénommés respectivement types 1, 2 et 3 (Figure 1.6). Chez les espèces présentant un modèle de type I, comme le riz ou la tomate par exemple, les poils absorbants se développent de manière aléatoire. Dans le schéma de type II les poils racinaires se développent à partir de cellules plus petites issues d'une division cellulaire asymétrique ; les cellules plus grandes entrant dans un destin d'atrichoblastes. Ce type II se retrouve chez les graminées comme Brachypodium. Dans le troisième type, les trichoblastes forment des lignes cellulaires longitudinales parallèles alternant avec des lignes d'atrichoblastes. Ce type est présent chez les Brassicaceae, comme Arabidopsis. Le destin "position-dépendant" des cellules épidermiques est déterminé à un stade précoce, puisque les cellules épidermiques immatures destinées à devenir des trichoblastes sont distinguables des atrichoblastes avant la différenciation. Elles présentent un taux de division cellulaire plus élevé, une longueur cellulaire réduite, une densité cytoplasmique plus élevée, un taux de vacuolisation plus faible, une ornementation unique de la surface cellulaire et des épitopes distincts de la paroi cellulaire (Revue : Grierson *et al*., 2014). Les mécanismes impliqués dans la spécification et le développement des cellules de poil racinaire sont assez bien caractérisés dans le cas du patron de type 3 comme chez Arabidopsis, mais le sont par contre peu chez les espèces présentant des motifs de type 1 ou 2 comme chez les céréales (Rongsawat *et al*., 2021 ; Marzec *et al*., 2015 ; Dolan *et al*., 2017 ; Huang *et al*., 2017). Dans le modèle de type 3, le destin d'une cellule épidermique par défaut est de former des poils absorbants. Le développement des atrichoblastes implique l'expression d'un facteur de transcription (TF) nommé GL2 (GABRA2) qui réprime la différenciation des



(Rongsawat et al., 2019)

Figure 1.6. Les modèles de distribution ont été classés en trois types généraux: aléatoire, alternatif et dépendant de la position, appelés respectivement types 1, 2 et 3. Voir le texte, § 1.4.1.



(Rongsawat et al., 2019)

Figure 1.7. Formation du trichoblaste chez Arabidopsis et complexes moléculaires impliqués dans la formation ou la régulation de la formation des poils absorbants Voir le texte, § 1.4.1 et 1.4.2.

poils absorbants. Dans une cellule épidermique donnée, le niveau d'expression de GL2, et donc le destin cellulaire, est déterminé par la position relative de cette cellule par rapport aux cellules corticales sous-jacentes. Une cellule épidermique en contact avec deux cellules corticales, une position qui est nommée "H" (pour "Hair"), se développe en une cellule de poil racinaire, tandis qu'une cellule en contact avec une seule cellule corticale, une position nommée "N" (pour Non hair), entre dans le programme de développement des atrichoblastes (Figure 1.7). Il a été montré que des signaux déterminant le destin des cellules épidermiques sont émis par la couche cellulaire corticale. La voie de signalisation implique JACKDAW (JKD), une protéine à doigt de zinc exprimée dans les cellules corticales, et SCRAMBLED (SCM), une kinase de type récepteur plasmalemmique dans les trichoblastes.

1.4.2 La régulation transcriptionnelle dans les trichoblastes vs atrichoblastes

Un groupe de facteurs de transcription, caractérisé chez Arabidopsis, joue un rôle clé dans la détermination du destin cellulaire. Dans les atrichoblastes, WERWOLF (WER) un facteur de transcription MYB de type R2R3, GLABRA3 (GL3) un facteur de transcription de type basic helix-loop- helix (bHLH) ou son homologue ENHANCER OF GLABLA3 (EGL3) et une protéine à domaine WD répété TRANSPARENT TESTA GLABLA1 (TTG1) forment un complexe protéique et renforcent l'expression de GLABRA2 (GL2) qui fonctionne comme un régulateur négatif de la formation du poil racinaire (Shibata *et al*., 2019). L'inactivation de GL2 provoque la formation de poils racinaires ectopiques à partir de lignes d'atrichoblastes. Pour spécifier l'identité du poil racinaire, un facteur de transcription MYB mobile de type R3, CAPRICE (CPC), joue un rôle clé. CPC est transcriptionnellement induit par le complexe WER-GL3-TTG1 dans les atrichoblastes et sa protéine se déplace vers les cellules voisines pour induire les poils racinaires (Wada *et al*., 1997). Dans les trichoblastes, CPC forme un complexe protéique avec GL3 (ou EGL3) et TTG1. En outre, TRIPTYCON (TRY) et ENHANCER OF TRY AND CPC 1 (ETC1), deux homologues de CPC, fonctionnent de manière partiellement redondante avec CPC (Salazar-Henao *et al*., 2016). ETC1, cependant, ne voyage pas de cellule à cellule comme CPC mais au contraire se déplace des cellules sous-épidermiques aux cellules du poil racinaire (Rishmawi *et al*., 2018 ; Tominaga-Wada *et al*., 2017).

CPC et ses homologues sont essentiels pour l'induction d'un facteur de transcription bHLH, ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (RHD6), qui joue un rôle clé dans la détermination de l'identité du poil racinaire. Dans les jeunes cellules de trichoblastes, RHD6 et son homologue RHD6-LIKE1 (RSL1) favorisent la transcription des gènes codant pour d'autres facteurs de transcription bHLH, RSL2, RSL4, et chez le lotier de ROOTHAIRLESS-LIKE 3 (LRL3) (Yi *et al*.,2010). RSL4 favorise la transcription de gènes ROOT HAIR SPECIFIC (RHS) qui sont

principalement exprimés dans le poil racinaire (Hwang *et al*., 2017). La séquence promotrice des gènes RHS contient un élément cis nommé Root Hair Element (RHE) et RSL4 se lie à cette séquence pour promouvoir leur expression dans les trichoblastes. Certaines protéines RHS, ainsi que d'autres cibles indirectes de RSL4, sont impliquées dans la biogenèse et le remodelage de la paroi cellulaire, la production de ROS ou le trafic de vésicules (Won *et al*., 2009), ce qui révèle les processus cellulaires essentiels à la croissance du poil racinaire en aval de la régulation de RSL4. En plus de RSL4, RSL2 favorise la croissance des poils racinaires puisque la mutation simple *rsl2* provoque des poils racinaires plus courts, et que la double mutation *rsl2 rsl4* entraîne une absence totale de poils (Mangano *et al*., 2018). Cependant, contrairement à RSL4, la surexpression de RSL2 ne favorise pas la croissance du poil racinaire, ce qui indique que RSL2 seul n'est pas suffisant pour favoriser la croissance du poil (Yi *et al*., 2010). LRL3 favorise probablement aussi la croissance du poil racinaire en aval de RHD6. Bien que le mutant simple LRL3 ne présente pas de phénotype, les doubles mutants *lrl1 lrl3* ou l*rl2 lrl3* développent des poils racinaires plus courts (Karas *et al*., 2009). Contrairement à LRL3, l'expression de LRL1 et LRL2 ne nécessite pas la présence de CPC, de MYBs de type CPC, de RHD6 et de RSL1 (Karas *et al*., 2009). Ainsi, LRL1 et LRL2 pourraient fonctionner dans une voie parallèle à la voie CPC-RHD6. Un facteur de transcription trihelix GT2-LIKE1 (GTL1) a été initialement isolé comme répresseur de la croissance des cellules du trichome (Breuer *et al*., 2009, 2012). Bien que le mutant simple *gtl1* ne présente pas de phénotypes dans les poils racinaires, la double mutation dans *GTL1* et son homologue le plus proche *DF1* prolonge l'élongation des poils racinaires (Shibata *et al*., 2018). En outre, la surexpression de GTL1 ou de DF1 dans le trichoblaste, à l'aide d'un promoteur EXPANSIN A7, supprime fortement la croissance du poil racinaire, ce qui indique que GTL1 et DF1 agissent comme des régulateurs négatifs de la croissance du poil racinaire (Shibata *et al*., 2018). GTL1 et DF1 se lient tous deux à la région du promoteur de RSL4 et suppriment directement son expression. Il est intéressant de noter que GTL1, en outre, supprime l'expression de nombreux gènes cibles de RSL4 ainsi que sa propre expression (Shibata *et al*., 2018). À l'inverse, RSL4 peut induire l'expression de GTL1, bien que probablement de manière indirecte (Shibata *et al*., 2018 ; Vijayakumar *et al*., 2016) et peut favoriser sa propre expression (Hwang *et al*., 2017). Par conséquent, RSL4 et GTL1 forment un module transcriptionnel central se régulant mutuellement et régulant leurs cibles communes en aval. En plus de GTL1 et DF1, un facteur de transcription de type DOF OBF BINDING PROTEIN 4 (OBP4) est caractérisé comme un régulateur négatif de la croissance du poil racinaire puisque l'induction d'OBP4 inhibe la croissance du poil racinaire (Rymen *et al*., 2017). Contrairement à GTL1 et DF1, OBP4 réprime l'expression de RSL2 et n'affecte pas l'expression de RSL4, ce qui suggère que les plantes disposent d'au moins deux voies transcriptionnelles pour réprimer la croissance des poils racinaires. Dans les cellules d’atrichoblastes, GL2 réprime l'expression

de RHD6, RSL1, RSL2, LRL1 et LRL2 pour empêcher la croissance ectopique des poils racinaires. L'expression ectopique de LRL1 ou LRL2 à l'aide d'un promoteur GL2 provoque la formation ectopique de poils, ce qui suggère que LRL1 et LRL2 régulent à la fois la croissance du poil racinaire et la détermination du destin cellulaire (Lin *et al*., 2015). Le tableau 1.2 fournit un résumé des différents mécanismes impliqués dans ces régulations.

Il est important de noter que des analyses transcriptomiques comparatives des gènes de développement du poil racinaire d'Arabidopsis et de 6 autres plantes vasculaires, dont des eudicots et des monocots (tomate, concombre, soja, riz, maïs, toutes ces espèces présentent un motif épidermique de type 1) et une lycophyte (*Selaginella moellendorffii*), ont révélé une divergence substantielle dans la structure et l'expression des gènes utilisés pour les processus conduisant au patron de type 3, du poil racinaire chez Arabidopsis, ce qui a conduit à conclure que le processus de motif WER/CPC d'Arabidopsis n'est pas partagé par d'autres espèces (Huang *et al*., 2017). En revanche, l'initiation et l'élongation du poil racinaire (initiation du renflement et croissance de l'extrémité) impliquent un ensemble de gènes largement conservés, probablement dérivés d'un ancien programme de croissance cellulaire unidirectionnelle et coopté au cours de l'évolution par les plantes vasculaires (Menand *et al*., 2007 ; Huang *et al*., 2017).

Les approches pharmacologiques et génétiques ont fourni des preuves que les hormones végétales jouent un rôle dans le contrôle de la différenciation des cellules épidermiques et du développement du poil racinaire (Revue : Cui *et al*., 2017), et que l'auxine et l'éthylène, ainsi que leur interaction, sont des régulateurs majeurs de ces processus (Bruex *et al*., 2012 ; Zhang *et al*., 2016). De plus, l'acide jasmonique, les strigolactones et les cytokinines sont des régulateurs positifs de la croissance du poil racinaire, tandis que les brassinostéroïdes et l'acide abscissique sont des régulateurs négatifs. Une distribution correcte de l'auxine est nécessaire pour une affectation correcte du destin cellulaire et la formation du poil racinaire (à la fois la sélection du site d'initiation et la croissance de l'extrémité). L'auxine régule la formation du poil racinaire en agissant en aval du gène RHD6 (ROOT HAIR DEFECTIVE6), et probablement principalement via le facteur de transcription RSL4 (ROOT HAIR SIX-LIKE4) (Masucci et Schiefelbein, 1996 ; Yi *et al*., 2010).

Enfin, le contrôle de la longévité du poil racinaire pourrait être d'une importance majeure dans l'adaptation du système racinaire aux facteurs abiotiques et biotiques du sol. La longévité du poil racinaire est encore mal documentée. Les valeurs rapportées chez une espèce donnée, l'orge, varient de quelques jours à 2-3 semaines (McElgunn et Harrisson, 1969 ; Holden, 1975 ; Henry et Deacon, 1981). Il a été montré que la mort cellulaire programmée de type apoptose (AL-PCD: "apoptose-like programmed cell death"),

Tableau 1.2. Les facteurs de transcription impliqués dans le développement poils absorbants
Voir le texte, § 1.4.1 et 1.4.2

Gene name	AGI	Type	Function	References
CAPRICE (CPC)	At2g46410	MYB	Cell fate	Wada et al. (1997)
TRIPTYCHON (TRY)	At5g53200	MYB	Cell fate	Schellmann et al. (2002)
ENHANCER OF TRY AND CPC (ETC1)	At1g01380	MYB	Cell fate	Simon et al. (2007)
MYB23 (MYB23)	At5g40330	MYB	Cell fate	Kang et al. (2009)
WEREWOLF (WER)	At5g14750	MYB	Cell fate	Lee and Schiefelbein (1999)
ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)	At1g63650	bHLH	Cell fate	Bernhardt et al. (2003)
GLABRA3 (GL3)	At5g41315	bHLH	Cell fate	Bernhardt et al. (2003)
TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (TTG2)	At2g37260	WRKY	Cell fate	Johnson et al. (2002), Ishida et al. (2007)
GLABRA (GL2)	At1g79840	HD-ZIP	Cell fate	Masucci et al. (1996), Di Cristina et al. (1996), Lin et al. (2015)
ZINC FINGER PROTEIN 5 (ZFP5)	At1g10480	C2H2	Hormone response	An et al. (2012)
ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3)	At3g20770	EIL	Hormone response	Song et al. (2016), Feng et al. (2017)
EIN3-LIKE1 (EIL1)	At2g27050	EIL	Hormone response	Song et al. (2016), Feng et al. (2017)
AUXIN REPONSE FACTORs (ARFs)	–	ARF	Hormone response	Mangano et al. (2017), Bhosale et al. (2018), Choi et al. (2018)
PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1)	At4g28610	MYB	Phosphate response	Bustos et al. (2010)
PHR1-LIKE1 (PHL1)	At5g29000	MYB	Phosphate response	Bustos et al. (2010)
ALFIN-LIKE6 (AL6)	At2g02470	Homeo-domain protein	Phosphate response	Chandria et al. (2013)
WRKY75	At5g13080	WRKY	Phosphate response	Devaiah et al. (2007), Rishmawi et al. (2014)
BASIC LOOP HELIX LOOP 32 (BHLH32)	At3g25710	bHLH	Phosphate response	Chen et al. (2007)
ROOT HAIR DEFECTIVE6 (RHD6)	At1g66470	bHLH	Hair growth	Masucci and Schiefelbein (1994), Menand et al. (2007)
RHD SIX-LIKE 1 (RSL1)	At5g37800	bHLH	Hair growth	Menand et al. (2007), Yi et al. (2010)
RHD SIX-LIKE 2 (RSL2)	At4g33880	bHLH	Hair growth	Yi et al. (2010), Rymen et al. (2017)
RHD SIX-LIKE 3 (RSL3)	At2g14760	bHLH	Hair growth	Bruex et al. (2012), Pires et al. (2013)
RHD SIX-LIKE 4 (RSL4)	At1g27740	bHLH	Hair growth	Yi et al. (2010) and etc
RHD SIX-LIKE 5 (RSL5)	At5g43175	bHLH	Hair growth	Pires et al. (2013)
Lotus japonicus ROOT HAIR LESS-LIKE 1 (LRL1)	At2g24260	bHLH	Cell fate & Hair growth	Karas et al. (2009), Lin et al. (2015), Breuninger et al. (2016)
Lotus japonicus ROOT HAIR LESS-LIKE 2 (LRL2)	At4g30980	bHLH	Cell fate & Hair growth	Karas et al. (2009), Lin et al. (2015), Breuninger et al. (2016)
Lotus japonicus ROOT HAIR LESS-LIKE 3 (LRL3)	At5g58010	bHLH	Hair growth	Karas et al. (2009), Lin et al. (2015), Breuninger et al. (2016)
Lotus japonicus ROOT HAIR LESS-LIKE 4 (LRL4)	At1g03040	bHLH	Hair growth	Bruex et al. (2012), Breuninger et al. (2016)
Lotus japonicus ROOT HAIR LESS-LIKE 5 (LRL5)	At4g02590	bHLH	Hair growth	Bruex et al. (2012), Breuninger et al. (2016)
MEMBRANE ANCHORED MYB (maMYB)	At5g45420	MYB	Hair growth	Slabaugh et al. (2011)
HOMEODOMAIN GLABROUS 11 (HDG11)	At1g73360	HD-ZIP	Hair growth	Xu et al. (2014)
OBF BINDING PROTEIN 4 (OBP4)	At5g60850	Dof	Hair growth	Rymen et al. (2017)
GT2-LIKE1 (GTL1)	At1g33240	Trihelix	Hair growth	Shibata et al. (2018)
DF1	At1g76880	Trihelix	Hair growth	Shibata et al. (2018)

(Shibata et al., 2019)

caractérisée par la rétraction des protoplastes, la fragmentation de l'ADN nucléaire et la sensibilité aux inhibiteurs de l'activité de type caspase-3, se produit dans les poils de racine d'Arabidopsis en réponse à un choc thermique, à un stress salin et à un traitement aux ROS (H_2O_2) (Hogg *et al*., 2011 ; Tan *et al*., 2016). Des taux d'AL-PCD allant d'environ 5 % à 15 % ont été enregistrés dans des plantules d'Arabidopsis cultivées classiquement sur des plaques de gélose (Tan *et al*., 2016). Ainsi, la présence de zones de poils racinaires ("Root Hair Zones", au sens large) et la densité du poil racinaire pourraient être régulées par l'AL-PCD en réponse aux conditions environnementales locales.

1.4.3 Rôle des poils absorbants dans la pénétration dans le sol, l'ancrage, l'adhésion aux particules du sol puis la formation des manchons trichoblastiques (rhizosheaths)

L'adhésion du poil racinaire à la particule de sol est d'une importance cruciale pour l'ancrage de l'extrémité de la racine, la pénétration dans le sol et la formation des manchons trichoblastiques (rhizosheaths) (voir ci-dessous). L'évocation rapide du rôle des poils racinaires dans l'ancrage des plantes, comme on le trouve souvent dans les articles sur le développement des poils racinaires, peut être perçue de manière confuse. Lorsque l'on compare la résistance aux forces verticales de déracinement entre des plantes d'Arabidopsis de type sauvage et des plantes mutantes altérées dans le développement des poils racinaires ou la production de racines latérales, la conclusion est que les poils racinaires ne contribuent pas à l'ancrage de la plante entière dans cette définition opérationnelle (Bailey *et al*., 2002). Par contre, il existe des preuves claires que les poils racinaires fournissent une prise pour la pénétration des extrémités des racines dans le sol. Ainsi, par exemple, on a constaté qu'environ 80 % des racines d'orge de type sauvage se développant dans une couche de sol meuble présente sur une couche de sol plus compact étaient capables de pénétrer dans le sol compact alors que le pourcentage correspondant n'était que de 1 % dans le cas de racines mutantes glabres (Haling *et al*., 2013). De même, chez le maïs, lors de la germination sur un sol présentant une résistance modérée au pénétromètre, les plantules de type sauvage mettaient environ 16 h pour s'ancrer au sol, contre plus de 30 h pour les plantules mutantes glabres, qui le plus souvent ne s'ancraient pas solidement (Bengough *et al*., 2016). Les forces d'ancrage étaient jusqu'à 5 fois plus faibles chez le mutant glabre que chez les racines de type sauvage. La force de l'adhérence fournie par les poils racinaires aux extrémités des racines en croissance dépend à la fois de la microstructure de la rhizosphère et de la taille des poils racinaires, qui déterminent ensemble la profondeur à laquelle les poils racinaires peuvent pénétrer dans la matrice et les micropores du sol. Il est tentant de supposer que, au moins chez certaines espèces, la force de l'adhérence dépend également de la sécrétion de

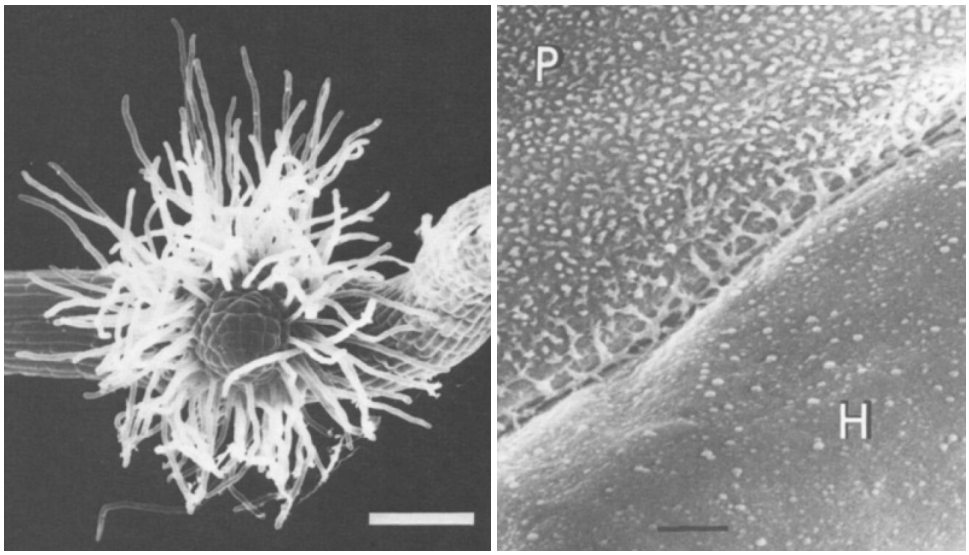


Figure 1.8. Haustorium d'Agalinis purpurea au contact d'une racine hôte.

Agalinis purpurea (L.) est une plante parasite facultatif des racines. Les haustoria, les organes racinaires spécialisés dans l'attachement et la pénétration des racines de l'hôte, se développent rapidement après l'exposition des racines du parasite aux exsudats racinaires de l'hôte ou à des molécules spécifiques induisant les haustoria. Les haustoria sont capables de s'attacher dès 6 à 12 heures après l'induction et atteignent un niveau maximal d'attachement après 36 heures. La production et l'élongation de poils absorbants "papillaire" (dont la surface présente des papilles) jouent un rôle déterminant dans l'attachement du haustorium à sa cible.

(A) Haustorium de 48H (x 150, la barre représente 100 µm)

(B) Interface entre les poils de l'haustorium (P) et la surface de la racine hôte (H) où des composés sécrétés (probablement des exopolysaccharides) ont coalescé dans la région de contact (x 10 000). Adapté de Baird & Riopel, 1983.

molécules adhérentes, comme le font les poils de l'haustorium des plantes parasites (Baird et Riopel, 1983 ; Cui *et al*., 2016) (Figure 1.8) et les poils racinaires spécialisés des plantes grimpantes comme le lierre (Huang *et al*., 2016) et *Syngonium podophyllum* (Yang et Deng, 2017). Chez le lierre (*Hedera helix*) (Figure 1.9), il a été montré que les poils racinaires présents sur les racines adventives produisent une sécrétion spécifique contenant des oligosaccharides et des nanoparticules sphériques, de 60-85 nm de diamètre, qui permettent l'adhérence au substrat. Les nanoparticules sont principalement composées de protéines à arabinogalactanes riches en hydroxyproline, qui ont été identifiées comme des composants clés de l'adhésif à haute résistance du poil racinaire du lierre (Huang *et al.*, 2016). Les propriétés adhésives peuvent être renforcées par une réticulation médiée par le calcium avec la pectine dans le mucilage sécrété (Huang, 2015) et une réticulation putative avec la matrice. De plus, le dépôt de microfibrilles selon un angle spécifique dans le poil racinaire du lierre, combiné à la dessiccation et à l'écrasement du poil racinaire dans les interstices du substrat et, au dernier stade de leur développement, à une lignification, peut également contribuer aux aspects structurels et fonctionnels de l'adhésion très forte des racines adventives de *H. helix* (Melzer 2010) (Figure 1.10).

Les mécanismes par lesquels les poils racinaires contribuent à la pénétration dans le sol sont également susceptibles de jouer un rôle majeur dans la formation des manchons trichoblastiques (rhizosheats) (Figure 1.11). Les manchons trichoblastiques ont été initialement décrits comme des "gaines particulières" composées de particules de sable agglutinées (Volkens, 1887). Des descriptions opérationnelles sont maintenant proposées à partir du poids de la terre qui adhère aux racines fraîchement excavées et soumises à un traitement d'élimination de la terre (par exemple, secouage à la main ou sonication dans l'eau) de vigueur standardisée (McCully, 1999 ; George *et al*.,2014 ; Brown *et al*., 2017 ; Pang *et al*., 2017). La présence de poils racinaires qui enchevêtrent les particules du sol est nécessaire à la formation de manchons trichoblastiques (Moreno-Espindola *et al*., 2007 ; Shane *et al*., 2011). Par conséquent, le manchon trichoblastique désigne le sol qui adhère physiquement au système racinaire, tandis que la rhizosphère désigne le sol influencé par la racine, au-delà du "cylindre" du manchon trichoblastique (Hinsinger *et al*., 2009 : York *et al*., 2016). Une forte corrélation a été trouvée entre la longueur des poils racinaires et le poids de la rhizosphère chez le blé (Delhaize *et al*.,2012). Cette corrélation est plus faible chez l'orge (George *et al*., 2014), et aucune corrélation significative n'a été observée chez 58 autres espèces, sauf lorsque les poils racinaires étaient extrêmement courts (Brown *et al*., 2017). Il est possible que les manchons trichoblastiques entourant les racines qui possèdent de longs poils racinaires soient instables et susceptibles de se désintégrer pendant les mesures, ce qui entraîne une mauvaise corrélation. Il a également été proposé que, lorsque la longueur des poils racinaires

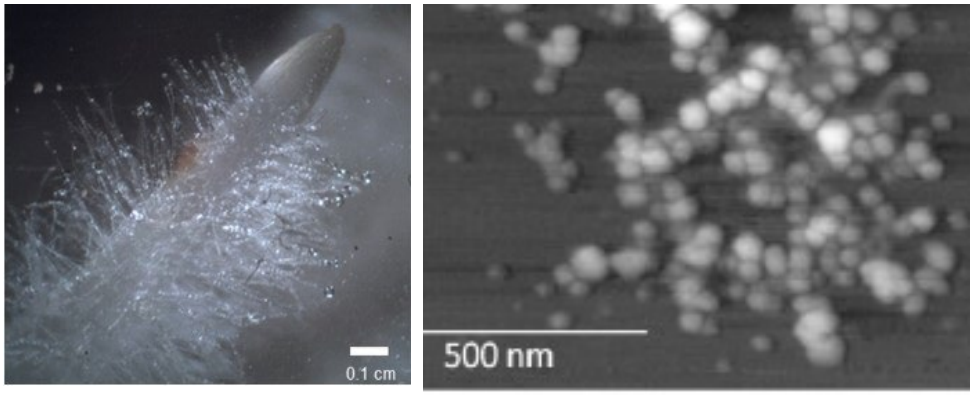


Figure 1.9 .Sécrétion de composés adhésifs par les poils absorbants du lierre *(Hedera helix).*

Panneau de gauche: la photographie à gauche montre la libération de l'adhésif à l'extrémité des poils racinaires. Les gouttelettes d'adhésif provenant de poils racinaires contigus peuvent fusionner pour former des gouttelettes plus grandes.

Panneau de droite: nanoparticules visualisées par microscopie à force atomique après purification.

Adapté de Burris et al. 2012, Burris 2016

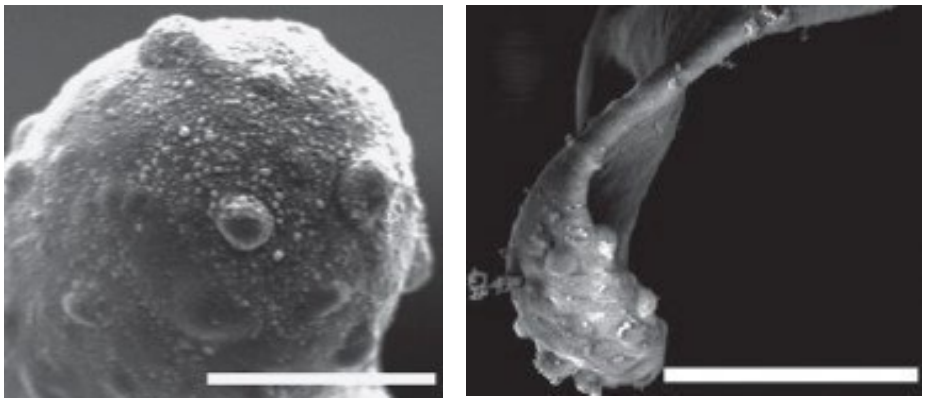


Figure 1.10. Étapes du développement des poils racinaires du lierre.

Des protubérances sont présentes à l'extrémité des poils racinaires, qui constituent le lieu d'excrétion de l'adhésif (panneau de gauche). Plus tard, les poils racinaires se dessèchent, se pressent et se lignifient en prenant l'aspect d'un ruban enroulé (panneau de droite). Barre d'échelle du panneau de gauche: 5 mm; barre d'échelle du panneau de droite: 10 mm. Adapté de Melzer et al. (2010).

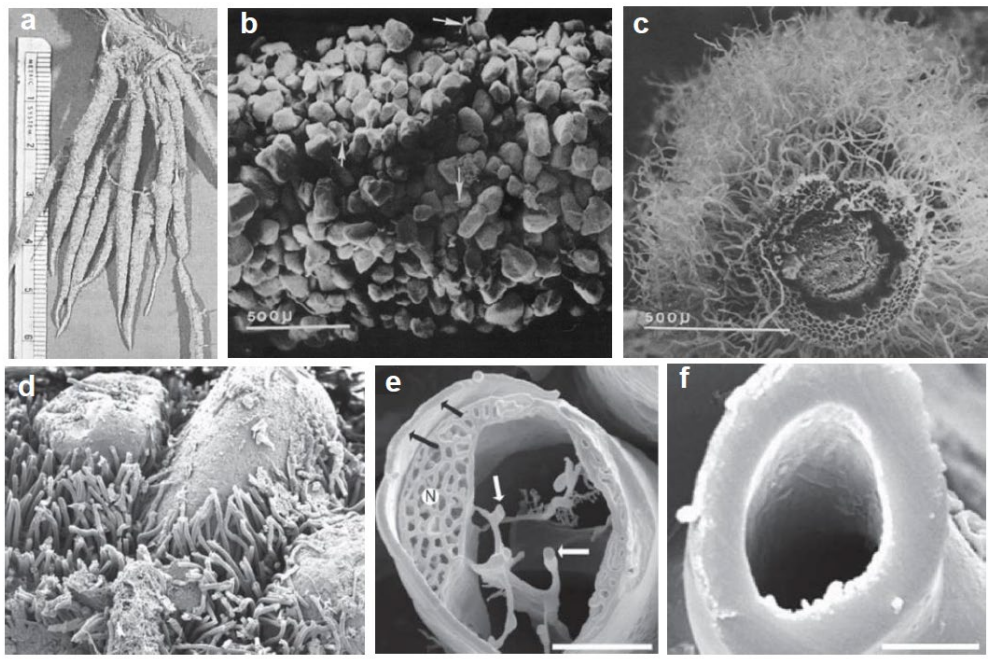


Figure 1.11. Exemples de manchons trichoblastiques chez différentes espèces végétales et structure des poils absorbants formant le manchon.

a) Manchons trichoblastiques d'*Agropyron dasystachyum.*

b) Vue externe d'un manchon trichoblastique d'*Oryzopsis hymenoides* encastré dans des grains de sable

c) Coupe transversale du manchon trichoblastique de (b) après enlèvement du sable.

d) Poils de racines emprisonnant le sable sur le manchon trichoblastique de *Lyginia barbata*

e) Coupe transversale d'un jeune poil racinaire présent près de l'extrémité apicale d'une racine chez *L. barbata*. Notez la paroi fine (flèche noire), le noyau (N) et les vésicules vacuolaires (flèches blanches)

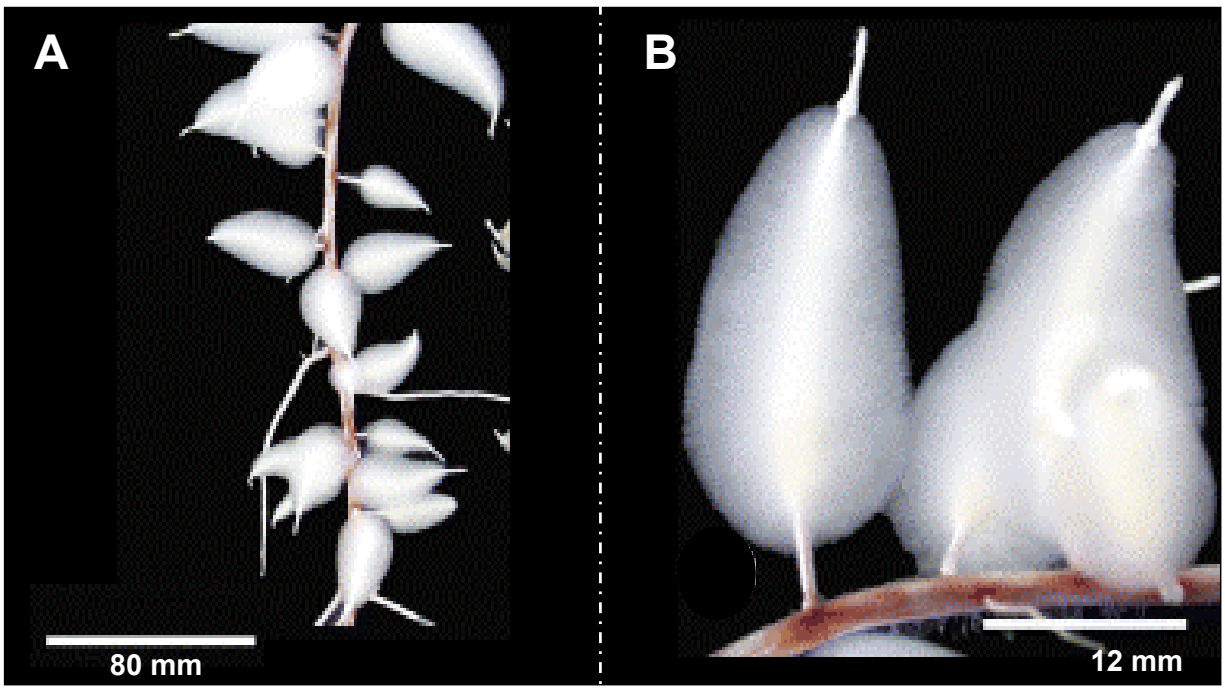
d) Coupe transversale d'un vieux poil racinaire avec une paroi très épaisse. D'après Shane et al. 2011, shane et al. 2005, Wullstein et al. 1979, Wullstein et Pratt 1981.

.

dépasse environ 300 µm, d'autres facteurs ont une importance croissante dans la formation, la taille et la stabilité des manchons trichoblastiques, parmi lesquels probablement la densité des poils racinaires et leur morphologie, par exemple, les formes courbées ou crochues qui retiendraient davantage de terre, et le mucilage racinaire et microbien (McCully, 1999, Brown *et al*., 2017).

La présence de manchons trichoblastiques peut jouer un rôle majeur dans de nombreuses fonctions physiologiques et dans l'adaptation des plantes aux conditions abiotiques et biotiques, comme la prévention de la perte d'eau, l'acquisition de nutriments et d'eau, le recyclage des nutriments, la fourniture d'une défense mécanique contre les herbivores et les parasites des plantes (Striga, Orobanches...) et la formation d'une niche favorisant la croissance pour les microbes bénéfiques (Shane *et al*., 2011). Il a également été démontré que les manchons trichoblastiques hébergent des bactéries diazotrophes (Wullstein *et al*., 1979 ; Othman *et al*., 2004) et abritent une activité nitrogénase (Wullstein *et al*., 1979). Ainsi, des QTL (loci de traits quantitatifs) sont recherchés pour la taille des manchons trichoblastiques, prise comme substitut de la longueur du poil racinaire ou, dans un sens plus large, d'un trait racinaire susceptible de contribuer à l'amélioration de la recherche de nutriments dans le sol, entraînant une augmentation de la production de biomasse et du rendement des plantes cultivées dans des sols peu fertiles (Delhaize *et al*., 2015 ; Horn *et al*., 2016 ; James *et al*., 2016 ; Liu *et al*., 2017 ; Gong et McDonald, 2017 ; voir ci-dessous).

Étroitement liés aux manchons trichoblastiques, les faisceaux de racines dauciformes (*Cf.* aussi ci-dessus, § 1.3) sont des structures racinaires spécialisées développées chez les carex (monocotylédones). Le développement de ce type de racine au cours de l'évolution ne s'est produit que chez certains genres de Cyperaceae et de Restoniaceae, conduisant à une adaptation à des concentrations très limitantes en P et/ou N. Ces "grappes" de racines latérales courtes en forme de carotte abritent des poils racinaires remarquablement denses et longs (Davies *et al*., 1973 ; Lamont, 1974, Shane *et al*., 2006) (Figure 1.12). En conclusion, les manchons trichoblastiques et les racines dauciformes sont structurellement différents des racines protéoïdes puisqu'elles ne forment pas d'abondantes radicelles déterminées mais sont fonctionnellement similaires (Shane *et al*.,2006), en termes d'abondance de fins poils racinaires et de la libération d'anions organiques qui améliorent l'absorption des minéraux et de l'eau des sols appauvris en P (Abrahao *et al*., 2014).



(Shane et al., 2006)

Figure 1.12. Racines dauciformes chez la cypéracée *Schoenus unispiculatus.*
(A) Segment d'une racine dauciforme montrant le développement de racines latérales comportant des poils racinaires denses.
(B) Agrandissement des racines latérales montrant les "manchons" de poils absorbants en forme de « carotte » . Un mince pédoncule relie l'axe en forme de carotte à la racine principale. Cette structure est fonctionnellement équivalente aux racines protéoïdes mais structurellement différente (Cg=f. texte principal, § 1.3 et 1.4.3).

1.4.4 Exploration du sol pour l'acquisition de nutriments et d'eau : importance des poils racinaires pour la performance des plantes dans des conditions de stress

La production et l'élongation des poils racinaires (RH) sont des déterminants majeurs du volume et de la surface du sol exploré et exploité. Les poils racinaires augmentent la capacité de la périphérie de la racine à interagir physiquement et chimiquement avec le sol, et contribuent de manière significative à l'acquisition des ions nutritifs du sol et à la nutrition minérale des plantes. Cependant, la distinction entre l'expression de gènes spécifiquement exprimés dans les trichoblastes ou les atrichoblastes et, au final, l'implication de chacun de ces types cellulaires dans la nutrition reste mal défini (Denyer *et al*., 2019 ; Lewsey *et al*., 2021).

1.4.4.1 Poils absorbants, nutrition phospahtée et réponse à la carence en phosphore.

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour tous les organismes vivants. Il est un constituant de nombreuses molécules (acides nucléiques, phospholipides, sucres phosphorylés…). Il joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique et intervient aussi dans les voies de signalisation basées sur la phosphorylation (Cho *et al*., 2021). Toutefois, sa disponibilité dans le sol est souvent limitante pour les plantes en raison de sa faible mobilité dans la plupart des sols (Cho *et al*., 2021). Comme il est présent à des concentrations micro ou même sub-micromolaires à l'interface racine-sol, mais à des concentrations millimolaires dans le cytoplasme, l'absorption de Pi à travers la membrane cellulaire s'effectue contre un gradient de concentration élevé. Plusieurs transporteurs de phosphate ont été localisés dans l'épiderme et les poils absorbants (Gonzalez *et al*., 2005; Bayle *et al*., 2011) chez Arabidopsis ainsi que chez plusieurs autres espèces (Huang *et al*., 2017) (Figure 1.13). L'importance des poils racinaires dans l'acquisition du Pi chez Arabidopsis a été démontrée par Bates et Lynch (2000a & b, 2001) en utilisant des mutants d'Arabidopsis ayant soit une déficience dans l'élongation des poils racinaires (*rhd2*), soit une densité réduite de poils racinaires (*rhd6*). Chez les plantes cultivées dans un milieu contenant une faible concentration de Pi, les plantes de type sauvage présentaient une biomasse, une surface, et un P total, supérieurs à ceux des deux mutants de poils racinaires (Bates et Lynch 2000a & b). En fait, les analyses par modélisation suggèrent que la longueur du poil absorbant détermine la taille de la zone d'épuisement des nutriments tandis que la densité des poils influence l'absorption des nutriments à faible diffusion (Ma *et al.*, 2001) En conséquence, les quantités de P absorbées par les poils absorbants peuvent être importantes, atteignant des quantités presque équivalentes à celles absorbées par le reste du système racinaire de la plante (Keyes *et*

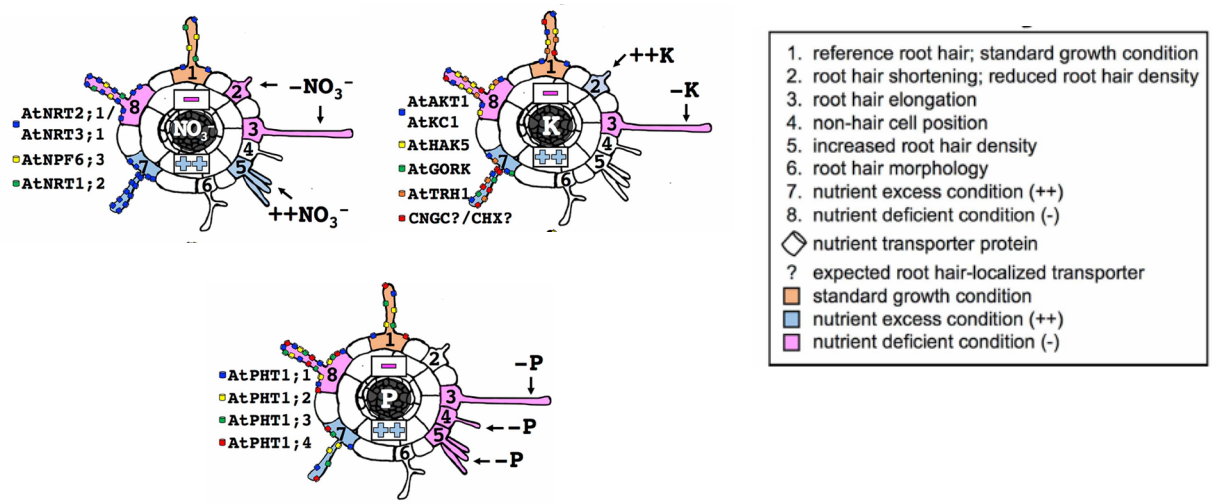


Figure 1.13. Systèmes d'absorption du nitrate, du potassium et du phosphate exprimés dans le poil absorbant chez Arabidopsis et effets de la disponibilité de ces nutriments dans le milieu sur l'expression de ces systèmes ainsi que sur le développement des poils absorbants.

Les couleurs orange, bleu et magenta réfèrent aux conditions de suffisance (orange), d'excès (bleu et caractères "++" en regard de l'ion) et de carence (magenta et caractère "-- " en regard de l'ion) des ions nutritifs nitrate, potassium et phosphate. Données extraites de l'article de revue de Bienert *et al*. (2021).

al.,2013), et l'accumulation de P dans la plante lui est corrélée positivement (Brown *et al*., 2013 ; Ahn *et al*., 2014 ; Haling *et al*., 2013 ; Tanaka *et al*., 2014).

Il est intéressant de noter que les mutants d'Arabidopsis affectés dans les premières étapes de la différenciation des poils absorbants, développent des poils absorbants de forme régulière en cas de carence en P (Muller et Schmidt, 2004) suggérant une perception à un stade précoce du développement des poils absorbants du statut en P des plantes, par la voie d'une protéine contenant un domaine SPX. Ce dernier détecte la quantité d'inositol pyrophosphate (PP-InsP), un indicateur de la teneur en P cellulaire. Une faible concentration de PP-InsP déclenche ensuite des processus de signalisation qui affectent la croissance et le destin des poils absorbants, annulant ainsi la différenciation endogène dépendante du développement (Vissenberg *et al*., 2020).

Concernant les régulations transcriptionnelles lors d'une carence en Pi, deux facteurs de transcription de type MYB, PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) et son homologue fonctionnellement redondant PHR1-LIKE1 (PHL1), jouent un rôle critique dans les réponses à la carence en Pi (Bustos *et al*., 2010). En conséquence, les doubles mutants *phr1 phl1* sont insensibles à la privation de Pi puisqu'ils ne présentent pas d'augmentation du développement du poil racinaire dans des conditions de disponibilité limitante de Pi (Bustos *et al*., 2010). La lignée de surexpression de PHR1 présente des poils racinaires beaucoup plus longs que ceux du type sauvage dans des conditions de carence en Pi (Bustos *et al*., 2010), ce qui indique que PHR1 régule positivement la croissance des poils racinaires. Il a été récemment montré que ARF7 et ARF19 favorisent l'expression de PHR1 dans les racines (Huang *et al*., 2018). En outre, ALFIN-LIKE 6 (AL6) serait un régulateur clé de la formation du poil racinaire lors de la réponse à la carence en Pi. Une protéine à homéodomaine AL6 a été isolée par un criblage génétique réalisé sur la base de défauts dans l'élongation du poil racinaire sous carence en Pi. AL6 induit la croissance du poil racinaire en activant l'expression d'ETC1 (Chandrika *et al*., 2013). Un autre régulateur potentiel est WRKY75 qui est sur-exprimé en réponse à la carence en Pi (Devaiah *et al*., 2007). Cependant, de manière surprenante, WRKY75 est un régulateur négatif du destin du poil racinaire puisqu'il supprime directement l'expression du CPC (Devaiah *et al*., 2007). Ainsi, WRKY75 empêche probablement la formation du poil racinaire dans des conditions de faible concentration en phosphate. Bien que cela semble paradoxal, la présence d'un régulateur négatif pourrait être nécessaire pour une réponse précise aux conditions environnementales qui changent rapidement (Shibata *et al*., 2019) (Figure 1.14).

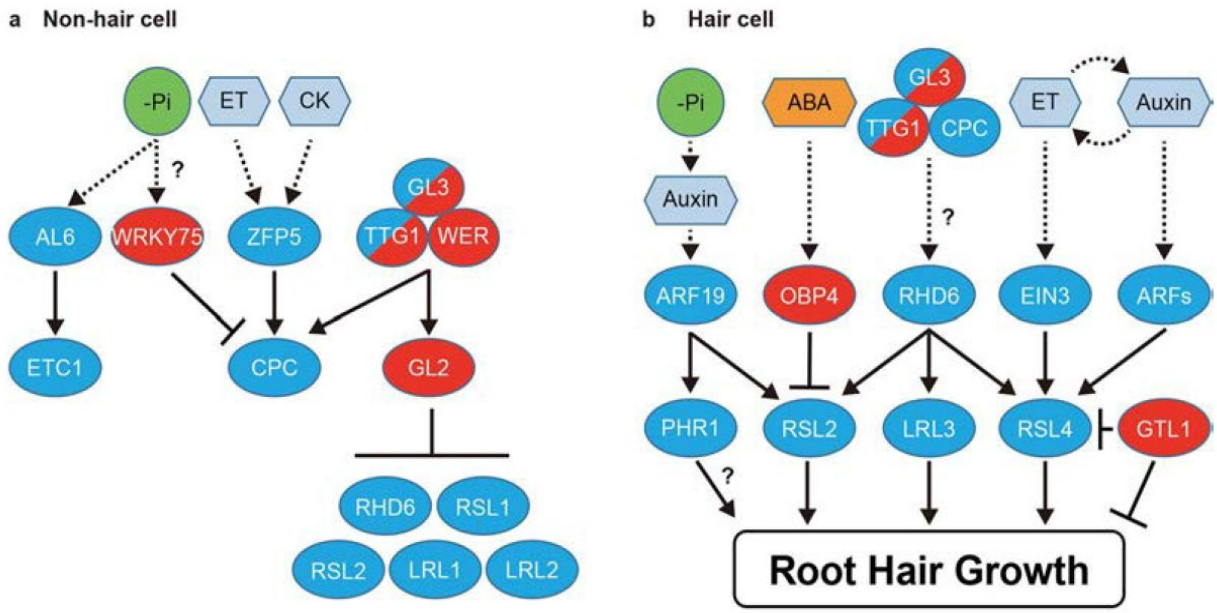


Figure 1.14. Le développement des poils racinaires répond aux signaux développementaux et environnementaux grâce à un réseau de facteurs de transcription.

a) Dans les atrichoblastes, un complexe protéique composé de WER, GL3 et TTG1 induit l'expression de GL2. GL2 supprime un ensemble de facteurs de transcription pour empêcher la formation du poil racinaire. En outre, le complexe WER-GL3-TTG1 induit CPC qui se déplace vers un trichoblaste. Bien que ZFP5 soit exprimée de manière dominante dans les trichoblastes et que la mobilité de la protéine ne soit pas caractérisée, ZFP5 est fonctionnellement rattachée aux atrichoblastes car ZFP5 régule directement CPC. Pour la même raison, WRKY75 et AL6 sont classés comme marqueurs des atrichoblastes.

b) Dans les trichoblastes, toute la signalétique passe par RSL2, RSL4 et LRL3 pour modifier la croissance cellulaire. Il n'est pas clair si PHR1 régule la croissance des poils directement ou indirectement. GTL1 supprime la croissance du poil à la fois directement et indirectement.

L'activation et la répression transcriptionnelles sont indiquées par des flèches et des traits « potence », respectivement. Les protéines dont les noms sont inscrits dans un ovale en bleu et rouge correspondent à des régulateurs susceptibles d'agir de façon positive et négative, respectivement, sur le développement du poil racinaire. Pour les deux complexes protéiques WER- GL3-TTG1 et CPC-GL3-TTG1, les protéines redondantes ne sont pas représentées dans le modèle. L'influence des phytohormones comme l'auxine (auxin), les cytokinines (CK), l'ABA et l'éthylène (ET) ou la carence en phosphate (-Pi) est indiquée par des traits pointillés (d'après Shibata *et al.*, 2019).

1.4.4.2 Poils absorbants, nutrition azotée et réponse à la carence en azote.

L'azote est un élément nutritif essentiel au développement des plantes, il est nécessaire en grandes quantités car il est un constituant crucial de nombreuses macro-molécules organiques (e.g., protéines et acides nucléiques), ainsi que des métabolites primaires et secondaires. En fonction de sa disponibilité, il joue un rôle important dans des processus de signalisation régulant l'expression globale des gènes, ce qui a un impact sur des fonctions métaboliques, physiologiques et développementales (Bouguyon *et al*., 2012 ; Medici and Krouk, 2014).

Dans la plupart des sols, et pour la plupart des plantes cultivées, l'ion nitrate constitue la forme la plus abondante d'azote assimilable. L'ion ammonium constitue la forme d'azote la plus abondante dans les sols acides en condition anaérobique (dans une rhizière par exemple). Le transport de l'ion ammonium intervenant dans de telles conditions résulte essentiellement de l'activité de transporteurs appartenant à la famille AMT (Ludewig *et al*., 2002 ; Lima *et al.*, 2010; Liu et Von Wiren, 2017; Hao *et al.*, 2020). Les connaissances dans ce domaine, et les mécanismes d'adaptation à la carence en N dans ces conditions, ne sont pas détaillés ci-dessous. En relation avec le travail que je présente dans le chapitre 6, je présente par contre dans le paragraphe suivant un résumé des connaissances concernant les mécanismes d'absorption de nitrate par les racines, et en particulier par les poils absorbants.

Pour maximiser l'efficacité de l'absorption sur des plages de concentrations externes en nitrate variables, les plantes font intervenir deux types de systèmes de transport, connus sous le nom de systèmes de transport à faible affinité (LATS) et de systèmes de transport à haute affinité (HATS) (Miller *et al.*, 2007). Le LATS permet le transport à des concentrations externes élevées (> 0,5 mM) de nitrate tandis que le HATS assure l'absorption du nitrate à de faibles concentrations externes (< 0,5 mM). Ces deux types de transport sont réalisés par différentes protéines, qui appartiennent à 3 familles différentes, nommées NPF (Leran *et al.*, 2014), NRT2 (Orsel *et al.*, 2002) et NRT3 (Okamoto *et al.*, 2006). La famille NPF comprend le "transcepteur" NPF6.3 (aussi appelé CHL1 ou NRT1.1), qui se comporte à la fois comme un transporteur de NO_3^- bidirectionnel à double affinité (Liu *et al.*, 1999 ; Leran *et al.*, 2013) et comme un "senseur" de NO_3^- présentant une perméabilité à l'auxine régulée par le NO_3^-, jouant ainsi un rôle important dans le développement des racines (Krouk *et al.*, 2010). Les données transcriptomiques fournissent des preuves que les transcrits AtNPF6.3/AtNRT1.1 sont exprimés dans les poils absorbants d'Arabidopsis (Huang *et al.*, 2017) comme son homologue dans la tomate (Lauter *et al.*, 1996). D'autres membres de la famille NPF ainsi que de la famille de NRT2 sont susceptibles de contribuer à l'acquisition de NO_3^- à partir du sol et sont exprimés également dans les poils de racine. Certains de ces systèmes sont aussi impliqués dans le transport d'ABA (Huang *et al*., 1999 ; Kanno *et al*., 2013 ; Huang *et al*., 2017) (Figure 1.13).

Concernant la contribution des poils absorbants à l'absorption de NO_3^-, il a été montré que les mutants *rhd6-3* et *cpc* d'Arabidopsis, qui présentent respectivement un défaut d'élongation des poils absorbants et une réduction du nombre de ces cellules, sont affectés dans la capacité d'absorber et accumuler NO_3^- (réduction d'environ 58% de la capacité d'aacumulation racinaire) dans des conditions de carence en NO_3^-, ce qui confirme le rôle important des poils absorbants dans l'absorption du nitrate (Canales *et al.*, 2017). Malgré cela, les effets de la disponibilité de l'azote sur le développement des poils racinaires ont été relativement peu étudiés, et certaines données apparaissent comme contradictoires. Une augmentation de la densité et de la longueur des poils absorbants a été observée en réponse à la carence en azote chez la tomate, l'épinard et le colza (Foehse et Jungkook, 1983), Arabidposis (De pessemier *et al*.,2021 ; Canales *et al*., 2017), le maïs (Saengwilai *et al*., 2021) et différentes graminées (Robinson and Rorison, 1987). En revanche, d'autres travaux ont montré que la carence en azote réduit significativement la densité des poils absorbants chez l'orange trifoliée (Cao *et al*., 2013) et Arabidopsis (Vatter *et al*., 2015), mais peut augmenter leur longueur.

Il faut noter que les différences dans les conditions expérimentales (sol, solution hydroponique, dispositif de culture) ont un impact important sur la morphologie des poils racinaires et les résultats obtenus. Canales *et al*., (2017) ont montré que les plantes augmentent la densité des poils absorbants en réponse à la carence en N en utilisant des dispositifs expérimentaux en hydroponie, qui n'imitent pas avec précision la mobilité du N dans le sol. La signification physiologique de la réduction de densité des poils racinaires en condition de carence en N (Cao *et al*., 2013 ; Vatter *et al*., 2015) est expliquée par des analyses de modélisation qui ont suggéré qu'à des densités élevées, une compétition s'introduit entre les poils racinaires contigus, tandis que l'augmentation de la longueur des poils racinaires améliore plus significativement la capacité d'acquisition d'azote (Nye, 1966 ; Itoh et Barber, 1983). Ainsi, les longs poils racinaires auraient une plus grande capacité d'exploration et d'acquisition dans les sols où l'absorption de l'azote est limitée par la diffusion.

1.4.4.3. Poils absorbants et nutrition potassique.

Le potassium (K) est un élément essentiel pour la croissance et le rendement des plantes car il remplit de nombreux rôles importants, aux niveaux cellulaires et physiologiques. Entre autres, les ions K^+ sont impliqués des processus physiologiques et biochimiques cruciaux tels que l'extension et la croissance des cellules, la neutralisation électrique des ions et macro-molécules chargées négatives, la régulation osmotique, le contrôle de l'ouverture stomatique, l'activation d'enzymes et le contrôle de la polarisation électrique de la membrane cellulaire

(Nieves-Cordones *et al*., 2016). Comme pour le phosphate et le nitrate, plusieurs transporteurs de potassium ont été identifiés dans les poils absorbants (Rigas *et al*., 2001). Les travaux effectués sur l'effet du potassium sur le développement des poils racinaires ont révélé, chez plusieurs espèces végétales, une capacité d'augmentation de la longueur des poils racinaires en réponse à une faible disponibilité de K^+ (Figure1.13). Les poils absorbants contribuent à la capacité d'absorption du K^+ en augmentant la surface et le rayon de la zone de déplétion et créent un gradient de diffusion, au sein de la rhizosphère en direction de la racine, plus "pentu" (Jungk, 2001). Néanmoins, ces modifications n'ont pas été observées chez six variétés de riz (Hogh-Jensen et Pedersen, 2003 ; Klinsawang *et al*., 2018). Chez ces plantes, la longueur des poils racinaires n'était pas affectée par des conditions K^+ sous-optimales. La plasticité de la longueur des poils ne semble donc pas être un trait universel mais plutôt spécifique à l'espèce/génotype et la condition appliquée.

1.5 Synergies des traits racinaires

Des interactions entre phènes (traits) racinaires peuvent contribuer à améliorer la capacité d'exploration du sol et le prélèvement d'ions nutritifs. Par exemple, le développement de racines séminales avec des angles de croissance peu profonds favorisera l'exploration du sol superficiel, qui est généralement plus riche en phosphore que le sol profond, et le développement de poils absorbants plus longs et plus denses sur ces racines augmentera le volume de sol exploré et exploité. Miguel *et al.* (2015) ont effectivement montré que le trait architectural "angle large d'émergence de racines séminales ou secondaires", explorant le sol superficiel, et le trait cellulaire "*poils absorbants longs et denses*" agissent de façon synergiques pour favoriser l'acquisition du phosphore. L'effet bénéfique pour l'acquisition de cet élément est notablement plus important quand ces deux traits se combinent que lorsqu'ils sont séparés. L'identification et l'évaluation de telles synergies entre traits racinaires nécessitent de développer des analyses intégrant plusieurs traits phénotypiques et dévoilant les plasticités phénotypiques de ces différents traits dans des environnements multiples.

Il est désormais largement admis que les connaissances issues de ces analyses pourraient contribuer à des pratiques agricoles plus durables, par exemple en favorisant la sélection de nouveaux génotypes de cultures adaptés à de faibles apports en fertilisation et en irrigation. De ce fait, des efforts importants ont été consentis au niveau international au cours de ces dernières années qui ont abouti à l'apparition d'un large éventail de méthodes de phénotypage. Ces méthodes varient considérablement en termes de techniques et/ou d'équipements nécessaires et dépendent des conditions de culture des plantes, en champ, en sol ou en conditions contrôlées au laboratoire (Figure 1.15).

L'objectif de mon travail de doctorat a été de développer une méthodologie de phénotypage "intégrative", prenant en compte les poils absorbants, puis de l'utiliser pour étudier les réponses racinaires du blé dur en situation de carence en N, P ou K. Avant de présenter mon travail (chapitres 2 à 6), je résume rapidement ci-dessous les différentes approches de phénotypage décrites dans la littérature.

1.6 Stratégies et approches pour la culture des plantes avant le phénotypage des racines.

L'analyse phénotypique des systèmes racinaires a commencé en champ il y a plus d'un siècle, lorsque des agronomes ont commencé à s'intéresser à la croissance des racines dans divers sols (Weaver *et al.*,1922). Depuis les années 2000, le phénotypage des racines suscite un intérêt croissant (Trachsel *et al*., 2011 ; Kuijken *et al*., 2015 ; Watt *et al*., 2020). Les méthodes développées varient considérablement en termes de techniques et/ou d'équipements nécessaires. Elles peuvent être distinguées fondamentalement selon les conditions utilisées pour la culture des plantes, en champ, en sol en serre ou dans des conditions contrôlées au laboratoire (Figure 1.15). Il est aussi possible de les distinguer selon le niveau de contrôle que l'expérimentateur peut exercer sur les conditions environnementales dans lesquelles le système racinaire se développe.

1.6.1 Le phénotypage des systèmes racinaires en plein champ

Historiquement des méthodes d'excavation ont été utilisées en creusant une tranchée le long de la plante, d'une profondeur de 2 m et d'une largeur convenable pour une visualisation globale du système racinaire (Weaver *et al*.,1922). Depuis, les techniques d'étude *in situ* ont évolué mais elles comprennent toujours des processus destructifs : excavation de l'échantillons du sol, soit par pelletage ("shovelomics » ; Trachsel *et al*., 2011), soit par excavation de blocs entiers de sol ("monolithes"; Teramoto *et al*., 2019). Ces méthodes ont permis de révéler un certain nombre de paramètres clés de l'architecture racinaire entre différents génotypes de riz. Le nombre de racines, leur angle, et le modèle de ramification ont été évalués en utilisant des individus recombinants de lignées consanguines.

Bien qu'elles soient adaptées à l'étude des racines dans leurs conditions naturelles, ces méthodes présentent plusieurs inconvénients. Elles sont très laborieuses, chronophages et nécessitent beaucoup de main d'œuvre (Böhm, 2012). De plus, il est difficile de contrôler l'environnement climatique, et l'hétérogénéité locale du sol peut avoir une influence majeure sur le développement du système racinaire. En outre, ces méthodes destructives ne

permettent qu'une évaluation partielle de d'architecture racinaire car les racines profondes et les racines latérales fines et molles ne peuvent être prises en compte lors de l'excavation.

1.6.2 Méthodologies de phénotypage de systèmes racinaires développés dans des conditions contrôlées

Les méthodologies de phénotypage racinaire se sont diversifiées grâce aux progrès de la robotique et des technologies de capteurs. Différentes méthodologies ont été développées pour effectuer le phénotypage des racines dans des environnements contrôlés permettant d'obtenir des images du système racinaire avec une résolution adéquate pour les objectifs de phénotypage définis, et avec un contraste visuel suffisant entre le système racinaire et son milieu de croissance.

Selon l'objectif de l'étude, les plantes peuvent être cultivées directement en sol ou dans du sol en rhizotron permettant l'imagerie 2-D directement grâce aux parois transparentes à l'aide de caméras ou de scanners à plat. La culture de plantes peut aussi être réalisée en hydroponie ou dans des conditions similaires à l'hydroponie (Piñeros *et al*., 2016 ; Ma *et al*., 2019) dans des rouleaux ou des poches de papier de germination imprégnés de la solution nutritive (Atkinson *et al*., 2015 ; Thomas *et al*., 2016), sur des plaques d'agar ou dans des chambres de croissance remplies d'agar (Bengough *et al*., 2004 ; Kellermeier *et al*., 2014 ; Iyer-Pascuzzi *et al*., 2010 ; De Pessemier *et al*., 2022). Les images sont généralement prises à l'aide d'un scanner ou une caméra qui permet une extraction précise de l'architecture du système racinaire.

Pour effectuer des mesures sur des systèmes racinaires développés dans des conditions/substrats moins artificiels, il est possible d'opter pour des techniques permettant d'imager/quantifier directement le système racinaire dans le sol telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par rayons X. Toutefois ces techniques nécessitent un matériel couteux, peu compatibles avec du phénotypage à haut débit, et l'analyse d'image peut être la source d'une grande variabilité.

Les systèmes de culture en hydroponie, en sol en rhizotron ou en substrat artificiel en 2D sont largement utilisés en raison de leur efficacité en termes de temps/effort/information et en raison de leur capacité à être intégrés dans des processus de phénotypage racinaire à haut débit rapide, précis et robuste. Ils permettent de traiter un grand nombre d'échantillons en même temps, ce qui est nécessaire pour comparer les variations architecturales entre espèces et génotypes, et conduire des analyses de QTL et GWAS. Cependant, il doit être conservé présent à l'esprit que la plupart de ces techniques impliquent l'utilisation de jeunes plantules,

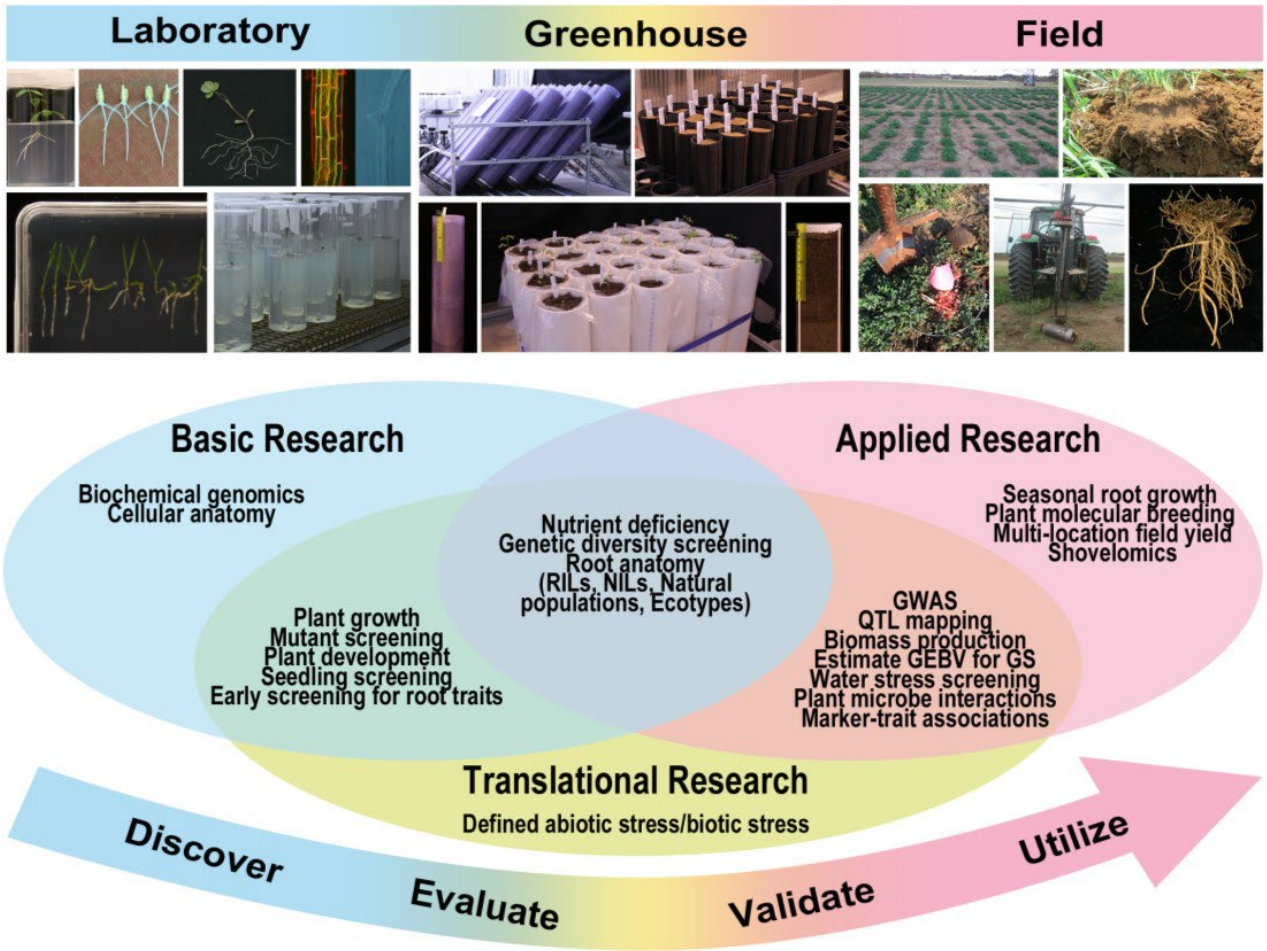


Figure 1.15. Vue d'ensemble des stratégies de phénotypage des systèmes racinaires en au laboratoire, en serre ou au champ, et de leur application à la recherche fondamentale, translationnelle et appliquée.

La description des images est faite ci-dessous dans le sens des aiguilles d'une montre à l'intérieur de chacune des trois catégories (même "fond de couleur").

En Laboratoire : racines de luzerne (Medicago sativa L.) dans des flacons transparents contenant le milieu nutritif ; semis de blé (Triticum aestivum L.) poussant sur du papier de germination, imbibé de solution nutritive, dans des plateaux en plastique ; plantule de luzerne imagée à l'aide d'un scanner à plat ; racine d'Arabidopsis thaliana colorée à l'iodure de propidium pour observer la paroi cellulaire et la protéine fluorescente verte (GFP) marquant le cytosquelette d'actine ; racine d'A. thaliana clarifiées montrant l'initiation des racines latérales; semis de luzerne poussant dans des cylindres de verre contenant un milieu de croissance; semis de Brachypodium distachtyon (monocotylédone modèle) poussant dans un milieu gélosé en boîte de Petri.

En serre : Tuyauterie en PVC transparent EnviroKing® (Harrington Industrial Plastics, Albuquerque, NM, USA) à angle oblique ; deepots noirs ; mésocosme semi-cylindrique avec façade en plexiglas transparent ; mésocosmes avec doublure en plastique ; tuyauterie individuelle en PVC transparent EnviroKing® pour l'observation en temps réel du RSA, y compris la profondeur des racines.

En champ : vue d'ensemble d'un essai en champ de luzerne ; approches de pelletage des racines de blé ; racines lavées de plants de luzerne cultivés en champ ; tracteur pour obtenir des échantillons de sol ("carottes") contenant des "portions" de systèmes racinaires; isolement d'une "motte" racinaire à l'aide d'une bêche.

(Figure issue de Paez-garcia *et al.*, 2015)

alors que les caractéristiques des racines exprimées dans un environnement artificiel à des stades précoces ne sont pas toujours en corrélation avec les caractéristiques observées au champ à des stades ultérieurs. Toutefois, les phénotypes racinaires observé chez les plantules peuvent permettre des prédictions assez justes de la morphométrie du système racinaire à des stades ultérieurs de développement (Watt *et al*., 2013). D'autre part, les caractéristiques précoces du développement racinaire déterminent la capacité de la jeune plantule à s'établir de façon compétitive dans son environnement.

1.6.3. Les limites des méthodologies de phénotypage à haut débit disponibles dans la bibliographie.

Un large éventail de méthodologies de phénotypage a été mis au point avec des objectifs allant de l'acquisition de connaissances fondamentales sur les réponses des racines aux conditions environnementales au criblage à haut débit de grandes collections de germoplasmes. Des compromis sont donc à faire entre la pertinence physiologique des conditions de croissance des plantes, le critère de haut débit, le coût total des expériences, la possibilité de contrôler/modifier l'environnement biotique et/ou abiotique et la possibilité de réaliser des analyses non invasives de séries temporelles du développement du système racinaire (Tableau 1.3). D'autre part, une limitation majeure commune à la plupart des méthodologies décrites dans la bibliographie est qu'elles n'ont pas été développées pour prendre effectivement en considération le développement des poils racinaires et des zones pilifères. Elles ne permettent donc pas de décrire les réponses du système racinaire aux conditions environnementales en intégrant la production de "surface" d'échange, à l'interface racine-substrat, résultant en partie du développement des poils absorbants et les caractéristiques morphologiques, topologiques et architecturales du système racinaire.

Les difficultés techniques pour accéder aux poils absorbants dans le sol ou les substrats artificiels de manière non destructive, ainsi que la taille et la fragilité de ces cellules, contribuent à expliquer l'attention limitée accordée au phénotypage des poils sur des systèmes racinaires entiers. Par exemple, le lavage des systèmes racinaires cultivés dans le sol, ou le retrait des racines des plaques de gélose ou même de la solution hydroponique pour les transférer sur le dispositif d'imagerie, peuvent affecter l'intégrité des zones pilifère en provoquant des dommages tels que la rupture ou le "pliage" des poils le long de l'axe de la racine, ce qui empêche les analyses ultérieures. Les méthodes permettant d'obtenir des images tridimensionnelles des systèmes racinaires *in situ* dans le sol (IRM, tomographie à rayons X) peuvent fournir des informations précieuses sur l'architecture du système racinaire mais, à ce jour, la résolution et le temps de calcul ne semblent pas être compatibles avec le

Tableau 1.3. Avantages et inconvénients des différentes approches et techniques de culture des plantes dans les méthodologies de phénotypage racinaire.

Nature de l'approche	Conditions de culture	Avantages	Inconvénients
Méthodes au laboratoire	Fortement controlées	- Évaluer la croissance des racines en temps réel - Non-destructive - Un grand nombre de conditions de croissance contrôlées peuvent être testées. - Conditions répétables - Il n'est pas nécessaire de disposer d'un grand espace pour la croissance des plantes - Racines faciles à manipuler et à "nettoyer " avant imagerie	- L'architecture racinaire (RSA) peut être affectée par le système de culture *per se* - Les conditions stériles pour la culture (e.g. su gélose) peuvent exclure l'analyse d'interactions biotiques. - Les plantes ne sont pas exposées à des conditions environnementales réelles, et, par conséquent, la pertinence des analyses doit être évaluée plus avant par des tests en champ.
Méthodes à la serre	Modérément contrôlées	- Système intermédiaire entre le laboratoire et le terrain - Permet de contrôler certaines conditions telles que le type et l'humidité du sol, l'intensité lumineuse, la température, la taille des pots et les apports en eau et en nutriments. - Évaluer le potentiel génétique des plantes RSA sans compétition intraspécifique.	- Le traitement et le nettoyage des grandes racines demandent beaucoup de travail - Les plantes peuvent être exposées à une certaine pression de maladies/insectes. - L'architecture du système racinaire (RSA) peut être affectée par les dimensions du pot contenant le substrat de croissance - Méthodologie potentiellement destructive: risque de perdre les fines racines et les poils absorbants.
Méthodes au champ	Minimalement controlées	- Pertinence physiologique et pratique	- Intensité de travail et de temps - Difficultés dues à la variabilité sur le terrain, en particulier concernant les conditions du sol - Nettoyage intensif des racines avant imagerie - Essais destructifs - Des autorisations sont nécessaires pour l'évaluation des plantes transgéniques

(Paez-garcia *et al*., 2015)

phénotypage des poils absorbants. Les approches ayant porté un intérêt aux poils absorbants se sont le plus souvent concentrées sur des régions apicales, de dimensions réduites, de racines de jeunes plantules cultivées sur des plaques de gélose ou du papier de germination (Jung *et al*., 2009 ; Stetter *et al*., 2015 ; Vatter *et al*., 2015 ; Poitout *et al*., 2017 ; Klinsawang *et al*., 2018). Une telle absence de prise en compte "globale" des zones pilifères est susceptible de réduire la pertinence des analyses lorsque l'objectif est de s'intéresser au potentiel de prélèvement des ions nutritifs et de l'eau par le système racinaire, et finalement à l'adaptation de la plante aux conditions édaphiques abiotiques et biotiques puisque de nombreuses études révèlent que les poils absorbants jouent un rôle majeur dans ces fonctions.

1.7 Objectifs de ma thèse

En conclusion de cette analyse bibliographique, nous savons que les poils absorbants jouent des rôles majeurs dans la nutrition minérale de la plante, au sens large, comprenant aussi les fonctions d'ancrage au sol, d'exploration du sol et de mise en place des interactions avec le microbiome de la rhizosphère. Il est donc très raisonnable de considérer que la prise en compte du développement des poils absorbants dans la description du système racinaire entier est susceptible d'apporter des informations importantes pour notre compréhension des réponses développementales du système racinaire à son environnement.

* *

*

Mon projet de thèse s'est inscrit dans ce contexte.

Le premier objectif a été d'ordre méthodologique. J'ai développé un dispositif de culture des plantes permettant d'obtenir des images avec une haute résolution du système racinaire, rendant possible de décrire à la fois son organisation architecturale, avec ses traits topologiques et morphologiques, et le développement des poils absorbants, en termes de longueur et de densité, sur le système racinaire entier, dans différentes conditions environnementales. J'ai ensuite utilisé cette méthodologie pour étudier les réponses du système racinaire du blé dur, comme espèce modèle, à une carence en azote, phosphate ou potassium. Cette analyse a été conduite en comparant un ancêtre du blé dur, *Triticum turgidum* L. spp. *dicoccum* (cv. Escandia) et une variété de pays, *Triticum turgidum* spp. *durum* (cv. Oued Zenati).

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Chapitre 2
Matériels et méthodes

2.1 Matériel végétal

Le travail a été conduit sur deux génotypes de blé, une variété ancestrale *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccum* cv. Escania, et une variété de pays *Triticum turgidum* L. ssp. d*urum* cv. Oued Zenati.

2.2 Stérilisation des grains de blé

Des graines de tailles similaires ont été sélectionnées et stérilisées en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 4% pendant 20 minutes sous vide (afin d'éliminer les bulles d'air éventuellement piégées dans le sillon des graines et empêchant la stérilisation de la surface du sillon des graines). Les graines ont ensuite été rincées 5 fois dans de l'eau distillée stérile, puis trempées dans de l'eau tiède (à environ 40°C) stérile (volume : 20 ml pour environ 10 graines) dans un pot en plastique. Ce dernier a été transféré à 26°C à l'obscurité pendant environ 16 h.

Le lendemain, les graines germées (graines présentant une émergence de racines primaires) ont été transférées sur du papier filtre stérile humidifié dans une boîte de Pétri et ensuite sont enrobée d'une cire imprégnée par un fongicide « l'oxyquinoléine à 0,1 % » (Staehler PP 140, Chauvin-Agro) pour protéger les graines de toute contamination fongique pendant la période de culture (Figure 2.1A).

2.3 Préparation des solutions nutritives

Diverses solutions nutritives ont été utilisées, toutes dérivées de la solution Hoagland, mais différant par leur teneur en macro-nutriments N,P, K.

Solution Hoagland complète (C) : la solution de Hoagland complète a été utilisée comme « un contrôle » pour toutes les expériences**.** Cette solution contenait **:** 5 mM de KNO_3, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM NH_4NO_3, 2 mM $MgSO_4$, 1 mM NaCl, 2mM Ca $(NO_3)_2$, 0.1 mM NaFe (III) EDTA, 12.5 µM H_3BO_3, 2 µM $MnCl_2$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.5 µM $CuSO_4$, 0.1 µM Na_2MoO_4, 0.1 µM $NiSO_4$.

Solution Hoagland low N (LN) : La solution à faible teneur en N contenait à la place de 110 µM de sources de N assimilable NH_4NO_3 10 µM et KNO_3 100 µM : le Ca $(NO_3)_2$ a été

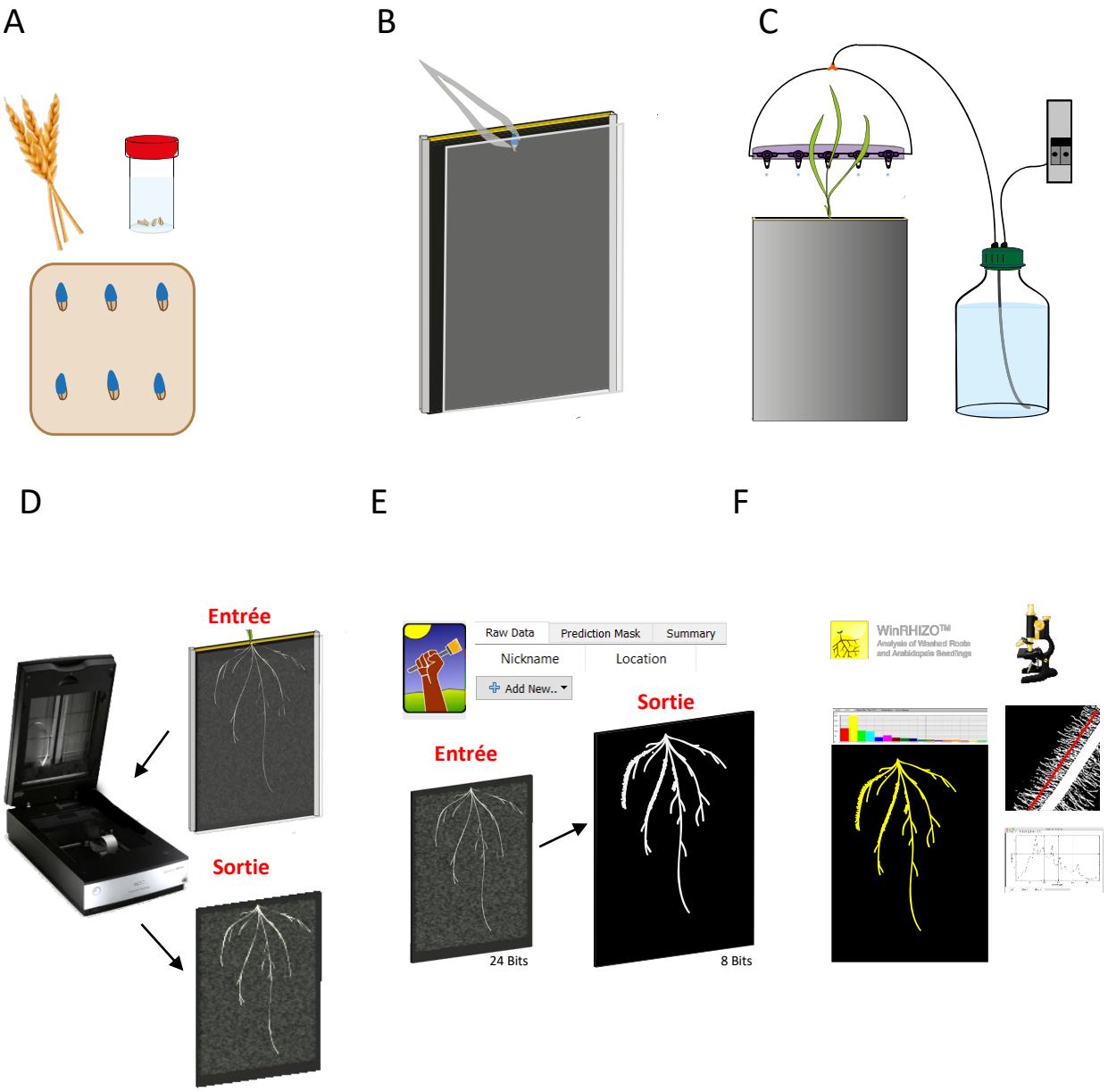


Figure 2.1. Culture, acquisition, prétraitement et analyse des traits racinaires avec le rhizobox.

(A) Préparation du matériel végétal : Les graines de blé sont décortiquées et ensuite désinfectées avec une solution d'hypochlorite de calcium à 4 %, puis enrobées par une cire contenant un fongicide. (B) Culture des plantes dans la rhizobox : les graines désinfectées sont ensuite placées (embryon vers le bas) dans un rhizobox pré-assemblé entre la plaque de verre et le tissu ensachant la mousse. (C) Les rhizobox sont installés dans la chambre de culture avec leur système d'irrigation automatique qui permet de délivrer environ 9ml/h. (D) Récolte et acquisition des images des racines : après un traitement d'élimination de la buée,(*Cf.* chapitre 3, § 3.4) les racines sont scannées directement à travers la plaque de verre de la rhizobox avec un scanner haute résolution (Epson perfection v850 pro). (E) Prétraitement des images : les images de racines à haute résolution acquises par le scanner sont segmentées avec le logiciel Ilastik. (F) Analyse des traits racinaires : les images segmentées sont analysées avec les logiciels d'analyse de bio-image (WinRHIZO™ et ImageJ) pour une quantification des traits des racines et des poils absorbants.

remplacé par $CaCl_2$ 2 mM. La diminution de la concentration de K^+ due à la réduction de la concentration de KNO_3 a été compensée par du KCl. NaCl n'a pas été ajouté dans la solution LN.

Solution Hoagland Low P (LP) : La solution à faible teneur en P contient KH_2PO_4 0.002 mM au lieu de KH_2PO_4 1 mM. La diminution de la concentration en K^+ due à la réduction de la concentration en KH_2PO_4 a été compensée par du KCl, sans ajout de NaCl.

Solution Hoagland Low K (LK) : La solution à faible teneur en K^+ contenait 60 µM de KH_2PO_4 comme seule source de K^+, 5 mM de $NaNO_3$, 1 mM de NaH_2PO_4 (ces deux sels de sodium remplaçant/compensant l'absence/la diminution de la concentration des sels de potassium correspondants dans la solution témoin. Les autres minéraux sont introduits à la même concentration que dans la solution contrôle.

2.4 Culture des plantes dans le rhizobox

Les graines enrobées ont été placées en position verticale (avec la racine primaire émergée orientée vers le bas) (Figure 2.1B) dans des dispositifs de type rhizobox (C*f.* chapitre, 3 § 3.1), qui ont ensuite été disposés de manière aléatoire et installés dans leur system d'irrigation dans une chambre de culture (16 h de photopériode,150 µE d'intensité lumineuse, température jour/nuit 22/20˚C, 65 % d'humidité relative de l'air) (Figure 2.1C).
Les rhizobox ont d'abord été irrigués avec de l'eau désionisée pendant 3 jours, puis pendant 11 jours avec des solutions de Hoagland modifiées (taux d'irrigation : 1,5 ml toutes les 10 minutes). Les solutions contenaient soit une solution de Hoagland contrôle soit une solution comportant une carence en P ou K ou N (les compositions sont mentionnées ci-dessus) selon la condition appliquée.

2.5 Acquisition et segmentation des images

Les images des systèmes racinaires ont été acquises à travers les plaques de verre transparentes avec un scanner à plat haute résolution (Epson Perfection V850 pro ; résolution 24 bits/1200 dpi) (Figure 2.1D) après 14 jours de croissance dans le rhizobox après un traitement antibuée par une application d'un dispositif d'évacuation de buée dédié (C*f*. chapitre 3, § 3.4). Les images à haute résolution obtenues (*Cf*. chapitre, 3 § 3.5) sont segmentées avec le logiciel "open source" ilastik (Berg *et al*., 2019) en utilisant le flux de travail prédéfini "Classification des pixels" (Figure 2.1E). Après avoir téléchargé les images, nous avons sélectionné les caractéristiques pour l'ensemble de l'entraînement, "Filtre gaussien, Couleur/Intensité, Bord et Texture", avec une valeur sigma inférieure à 0,7 pour extraire les

détails fins comme les poils absorbants. Nous avons entraîné le programme à distinguer l'arrière-plan (motif du tissu) des racines et des poils absorbants à l'aide d'une annotation manuelle des pixels. Nous avons ainsi obtenu des images segmentées de 8 bits, qui ont pu être analysées directement par un logiciel d'analyse d'images (*Cf*. § ci-dessous).

2.6 Analyse d'images

Les images de racines segmentées ont été analysées à l'aide de WinRHIZO™ (V.2009 Pro, Regent Instruments, Montréal, QC, Canada) et ImageJ (version 1.53) (Abràmoff *et al*., 2005) (Figure 2.1F). Le logiciel WinRHIZO™ a été utilisé pour les traits morphométriques des racines tels que la longueur totale des racines, la surface des racines et la surface des poils absorbants. Deux classes de diamètres de racines ont été définies dans WINRHIZO™ (définition de l'utilisateur) : diamètre inférieur à 0,20 mm, ou supérieur à 0,2 mm. Les éléments racinaires identifiés comme appartenant à la classe de diamètre la plus fine (0 à 0,20 mm) ont été considérés comme correspondant essentiellement à des poils racinaires. Le seuil de 0,2 mm a été choisi à la suite de tests tenant compte du fait que la surface projetée de plusieurs poils absorbants peut se chevaucher dans les scans des systèmes racinaires. Le seuil a été choisi de manière à ce que sa valeur asoit la plus grande possible seuil qui permettait permettant d'exclure efficacement les racines de la classe des poils absorbants. Les estimations opérationnelles de l'extension et de la densité des poils absorbants ont été obtenues directement avec ImageJ selon la procédure décrite dans le chapitre 3 § 3.9.

Chapitre 3

Mises au point techniques et analyses supportant et validant la méthodologie de phénotypage intégratif en rhizobox

Chapitre 3

Mises au point techniques et analyses supportant et validant la méthodologie de phénotypage intégratif en rhizobox

Ce chapitre présente les principaux développements méthodologiques qui ont conduit à la mise en place du système rhizobox ainsi que des tests de la pertinence de ce système et des méthodes d'analyse d'images utilisées.

3.1 Le montage expérimental des dispositifs de type rhizobox

La méthodologie développée pour visualiser/phénotyper le développement du système racinaire et des zones pilifères repose sur l'utilisation d'un dispositif de type "rhizobox", dans lequel les racines se développent dans un espace à deux dimensions, à la surface d'un tissu imputrescible. Les images du système racinaire sont acquises à l'aide d'un scanner à haute résolution (1200 dpi) (travail initié dans l'équipe par Rongsawat, 2019, Thèse, Montpellier). Le rhizobox est constitué, de l'intérieur vers l'extérieur, d'un panneau de mousse de polyuréthane solide (rainbow foam, Smithers-Oasis France) couvert par un tissu technique noir (maille de 18 µm, SAATICARE Hyphyl® Polyester PES 18/13). Le panneau de mousse ensaché dans sa housse de tissu en polyester est placé entre deux plaques de verre transparentes. Chaque plaque de verre est recouverte d'une plaque d'isolation en polyuréthane rendue opaque par une feuille d'aluminium, de façon à assurer l'obscurité sur le système racinaire en croissance. Les racines se développent entre le tissu en polyester et la plaque de verre. Un système de cornières en métal (aluminium) assure un espacement constant (*ca*. 2 mm) entre la plaque de verre et le tissu à la surface duquel les racines se développent (Figure 3.1A-B). Deux plantes peuvent être cultivées par rhizobox, une sur chacune des deux faces du rhizobox.

La solution nutritive est apportée automatiquement par un dispositif d'arrosage de type "goutte à goutte" (décrit ci-dessous). Les gouttes sont déversées au-dessus de la plaque de mousse de polyuréthane, sur sa tranche. Cette plaque constitue une réserve de solution interne au rhizobox, qui permet l'humidification du tissu de polyester sur lequel se développent les racines.

Les racines sont scannées directement à travers la plaque de verre sans manipulation directe. Des exemples de scans sont fournis dans la figure 3.4 (et des informations complémentaires sont fournies dans le paragraphe 3.5).

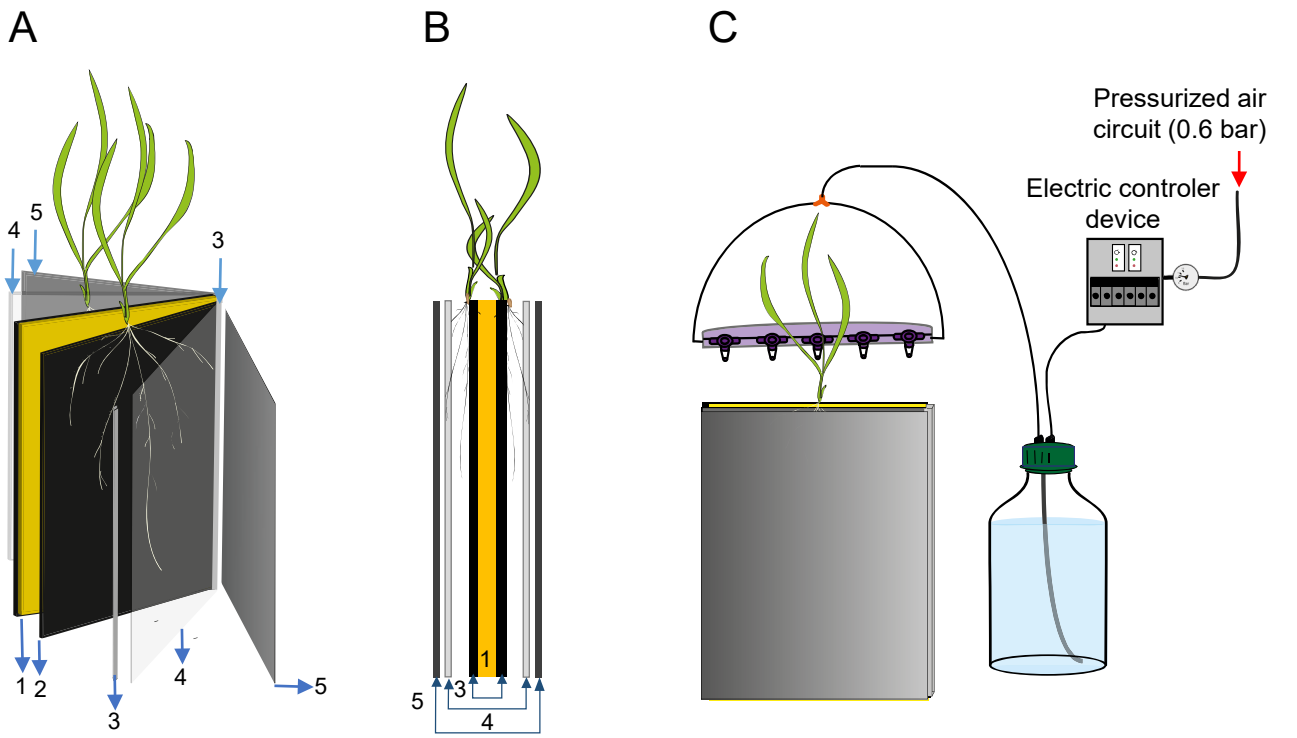


Figure 3.1. Le dispositif de phenotypage de type rhizobox et son system d'irrigation.

(A-B) Le dispositif de type rhizobox: vue latérale de l'agencement des différents constituants (A) et coupe transversale correspondante (B). (1) Panneau en mousse de polyuréthane solide. (2) Tissu en polyester noir ensachant le panneau de mousse de polyuréthane. (3) Barre coulissante en aluminium en forme de U. (4) Plaque de verre transparente. (5) Plaque de polystyrène opaque protégeant les racines de la lumière. Le rhizobox contient généralement deux plantes cultivées simultanément, une de chaque côté du rhizobox entre la face externe du tissu et la plaque de verre. Les barres coulissantes en aluminium servent de "spacers", fixant la distance entre le tissu en polyester et la plaque de verre à 2 mm. Le panneau de mousse de polyuréthane agit comme un réservoir de solution nutritive, périodiquement réapprovisionné par le dispositif d'irrigation dédié et maintenant le tissu humide. Les images des systèmes racinaires sont acquises à l'aide d'un scanner (Epson perfection v850 pro) directement à travers les plaques de verre.

(C) Le dispositif d'irrigation. La solution nutritive est contenue dans une bouteille de verre de 2 ou 5 litres, qui est équipée d'un circuit de tubes plastiques symétriques, comprenant 5 robinets permettant à la solution d'arriver sur le dessus du panneau de mousse de polyuréthane. Une pressurisation périodique du contenu de la bouteille avec de l'air (0,6 bar) assure un écoulement périodique de la solution nutritive de la bouteille vers les robinets. Un contrôleur (comprenant des minuteurs et des électrovannes à 3 voies) est utilisé pour pressuriser/dépressuriser périodiquement la bouteille. Dans les expériences actuelles, nous avons fixé la durée de chaque épisode d'arrosage à 3 s, toutes les 10 min, délivrant environ 1,5 ml par épisode d'arrosage et par rhizobox.

3.2 Le dispositif d'arrosage automatique

Nous avons développé un système d'irrigation qui permet d'assurer une distribution homogène de la solution nutritive dans chaque rhizobox. Le principe général du dispositif d'irrigation est de mettre périodiquement sous pression, à l'aide d'une réserve d'air comprimé, un récipient contenant la solution nutritive, qui est ainsi "poussée" dans un système de tubulures et distribuée au-dessus de la plaque de mousse par des rampes d'arrosage (Figure 3.1C). La solution est apportée de façon indépendante dans chaque rhizobox. La durée et la fréquence d'irrigation sont régulées d'une façon précise par un système d'horloges asservissant des électrovannes 3 voies pour contrôler de façon précise et rendre répétitif (entre les différents rhizobox) le processus d'arrosage, en termes de quantité de solution apportée par rhizobox (cette quantité étant directement dépendante de la fréquence et de la durée des arrosages).

Ce dispositif d'arrosage contrôlé et automatique est organisé en modules indépendants. Chaque module permet de desservir en parallèle 12 rhizobox, et donc 24 plantules (Figure 3.2A). Chaque récipient de solution nutritive est alimenté en air comprimé par une électrovanne (3 voies), et les douze électrovannes sont réparties en deux sous-ensembles de 6, chaque sous-ensemble étant piloté par sa propre horloge (qui fixe la fréquence et la durée de l'ouverture de l'électrovanne permettant l'arrosage).

3.3 Agencement des supports des rhizobox et du système d'arrosage

Le retrait des rhizobox du dispositif pour le scan est délicat et peut conduire à blesser les parties aériennes des plantules si les rhizobox ne sont pas bien agencés. La mise au point d'un dispositif d'agencement des rhizobox permettant leur maintien vertical et l'arrangement des rampes d'arrosage de façon précise au-dessus des rhizobox est nécessaire pour assurer le bon développement des plantes. J'ai utilisé un logiciel d'impression 3-D pour concevoir et fabriquer un système complet d'agencement des rhizobox. Les différents éléments, fabriqués en plastique avec une imprimante 3D, sont assemblés pour construire le dispositif final (Figure 3.2B).

3.4 Elimination de la buée à la surface des plaques de verre des rhizobox et augmentation de la définition des images

La formation de buée et de micro-gouttelettes d'eau sur la face interne des plaques de verre par condensation au cours de la culture ou de la manipulation des rhizobox pour la prise



Figure 3.2. Installation des rhizobox avec leur système d'irrigation et supports dans la chambre de culture.

(A) Vue d'ensemble d'un agencement de rhizobox. Les flèches bleues désignent les tableaux électro-mécaniques qui contrôlent l'irrigation des rhizobox, par pressurisation et dépressurisation périodiques et contrôlées des flacons de solution nutritives (recouverts d'aluminium pour les isoler de la lumière et éviter le développement d'algues).

(B) Dispositif de maintien des rhizobox (flèche rouge) dont les éléments sont fabriqués à l'aide d'une imprimante 3-D, et rampes d'arrosage (flèche verte). Les robinets de la rampe sont disposés de telle sorte que la solution nutritive tombe goute à goute sur la plaque de polyuréthane (flèche orange), au centre du rhizobox, lors d'un épisode de pressurisation de la bouteille de solution nutritive.

d'images s'est révélée susceptible d'impacter, de façon relativement aléatoire, la qualité des images prises sur le scanner. Une partie importante des opérations de mise au point méthodologique a eu pour objectif la résolution de ce problème en testant différentes procédures, chimiques ou physiques.

Dans une première série de tests, la face interne de chaque plaque de verre des rhizobox a été traitée par différents détergents (Tween 20, Triton X100) ou des solutions "anti-buée" commerciales recommandées en principe pour revêtir transitoirement des instruments médicaux pour « endoscopie » en rendant hydrophobe leur surface. De façon assez générale, ce type de traitement empêchait efficacement la formation de buée mais pouvait avoir des effets toxiques sur les racines, révélés par l'observation attentive des images obtenues. L'existence de tels effets toxiques, difficilement maîtrisables, nous a conduit à éliminer ce type de procédure chimique. Dans le prolongement de ce travail, différents types de films adhésifs transparents et hydrophobes, commercialisés par différentes sociétés, ont été testés après les avoir "collés" sur la face interne des plaques de verre. Ce type de revêtement ne s'est pas révélé suffisamment efficace pour prévenir la formation de buée. De plus, ces films altéraient la qualité des images.

J'ai ensuite testé la possibilité d'éliminer la buée avant la prise d'image par traitement thermique, en "réchauffant" légèrement la plaque de verre immédiatement avant le scan. Ce type de traitement s'est révélé efficace pour éliminer de façon satisfaisante la buée, mais délicat à maîtriser parce qu'une température légèrement trop élevée peut conduire à une perte de turgescence rapide des poils absorbants, qui peut même être irréversible. La solution retenue pour maitriser ce traitement a été l'utilisation d'un tapis de germination "chauffant", dont la température est contrôlée (par une sonde) à une valeur (23°C) légèrement plus élevée que celle du rhizobox (et de la salle dans laquelle les rhizobox sont scannés). Le rhizobox est placé au contact du tapis chauffant pendant une durée déterminée (2 min) immédiatement avant le scan (Figure 3.3A). Ce traitement s'est avéré inoffensif pour les racines et très efficace pour l'augmentation de la résolution et la définition des images (Figure 3.3B-C).

3.5 Capacité du dispositif rhizobox à permettre le développement des systèmes racinaires de différentes espèces.

Les rhizobox présentent un format "utile" de dimensions A4 (ce qui correspond aux caractéristiques du scanner utilisé). Ils peuvent donc permettre le développement de systèmes racinaires présentant des racines d'une longueur d'une trentaine de cm au minimum avant qu'elles n'atteignent le bas du rhizobox. Le temps de culture nécessaire pour qu'au moins une racine végétale atteigne le fond du rhizobox varie en fonction de la plante et de son architecture racinaire. Nous avons testé la possibilité de cultiver dans ce type de rhizobox 3 espèces, le

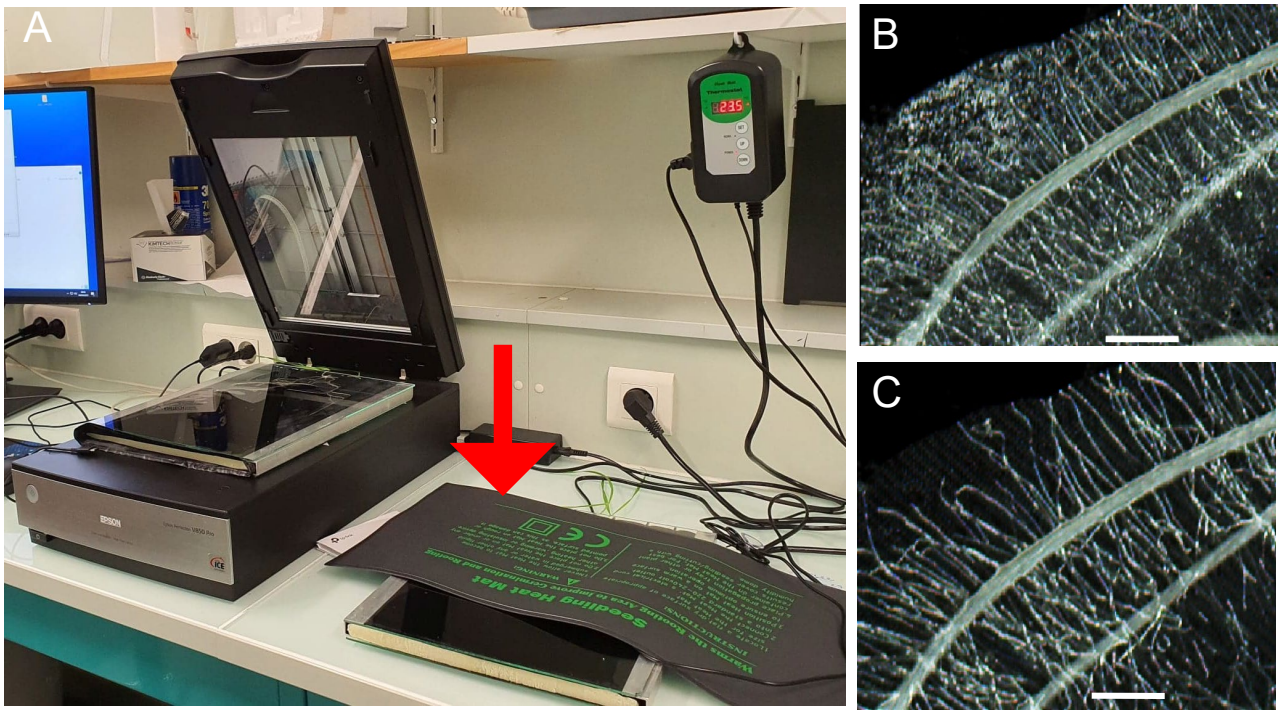


Figure 3.3. Elimination de la buée à la surface de la plaque de verre du rhizobox par un chauffage doux à l'aide d'un tapis chauffant.

(A) Tapis chauffant placé sur le rhizobox avant le scan. Le tapis chauffant (tapis "de semis" ; flèche rouge) est muni d'une sonde thermique permettant le contrôle de sa température. Cette température est ajustée à une valeur voisine de 23 °C, légèrement supérieure à celle de la salle d'expérimentation. Le rhizobox est conservé sous le tapis chauffant pendant environ 2 min, ce qui suffit en général pour éliminer la buée de la face interne de la plaque de verre ainsi traitée. Le rhizobox est alors transféré immédiatement sur le scanner (présent à gauche du tapis chauffant sur la photographie).

(B-C) Illustration d'une amélioration par le traitement thermique de la qualité des images fournies par le scanner. Les deux panneaux B et C présentent la même région d'un système racinaire, provenant d'un scan effectué avant (B) ou après (C) élimination de la buée par le traitement thermique.

blé, le maïs et Arabidopsis. La figure 3.4 fournit des images représentatives de systèmes racinaires de plantules de blé dur (Figure 3.4A), qui est l'espèce sur laquelle porte ma thèse, de maïs (Figure 3.4B) et d'Arabidopsis (Figure 3.4C), après 2 semaines de développement en rhizobox pour le blé et le maïs et 25 jours pour Arabidopsis. Les agrandissements de régions de ces systèmes racinaires montrent des poils racinaires "couvrant" une grande partie des racines, à l'exception des régions apicales mais y compris des régions relativement « âgées ». Les images montrent aussi que ces systèmes racinaires sont principalement constitués de racines séminales (embryonnaires) et de racines latérales de premier ordre pour le blé et le maïs, et de 1er et 2eme ordre pour Arabidopsis. Les agrandissements montrent de grands segments de racines avec des poils longs et denses (Figure 3.4).

3.6 Les rhizobox permettent un suivi cinétique du développement de systèmes racinaires

Les images des systèmes racinaires développés en rhizobox sont acquises directement à travers la plaque de verre du rhizobox, sans ouverture de ce dispositif de culture. Cette procédure d'imagerie n'affecte pas l'intégrité du système racinaire, qui peut donc être scanné à plusieurs reprises au cours de son développement. Cela permet de pouvoir suivre le processus de croissance (élongation des racines, devenir de poils absorbants) d'une plante donnée sur une partie de son cycle de croissance. Un exemple d'une telle analyse cinétique est fourni par la Figure 3.5 pour une plantule de blé dur.

3.7 Comparaison du développement de plantes cultivées en rhizobox ou dans du terreau

Nous avons comparé la croissance et le développement racinaire de plantules de blé dur cultivées dans des rhizobox ou dans du terreau afin d'avoir des éléments d'évaluation de la signification physiologique de la culture en rhizobox.

Des grains de blé de la variété Escandia ont été désinfectés (*Cf.* chapitre 2, §2.1 et 2.2) puis cultivés en parallèle, dans la même chambre de culture, soit dans des rhizobox soit dans du terreau (des pots de 250 ml ; une plante par pot). Les plantes cultivées en rhizobox ont été arrosées par de la solution complète de Hoagland (*Cf*. chapitre 2, § 2.3) et les plantes en terreau par de l'eau osmosée. Après 14 jours de culture, les systèmes racinaires des plantes en rhizobox ont été scannés directement à travers la plaque de verre des rhizobox. Les systèmes racinaires des plantes cultivées dans le terreau ont été soigneusement déterrés et lavés, immergés dans de l'eau dans un récipient transparent et scannés. Des images représentatives de ces systèmes racinaires sont présentées dans la (Figure 3.6 A-B). Les

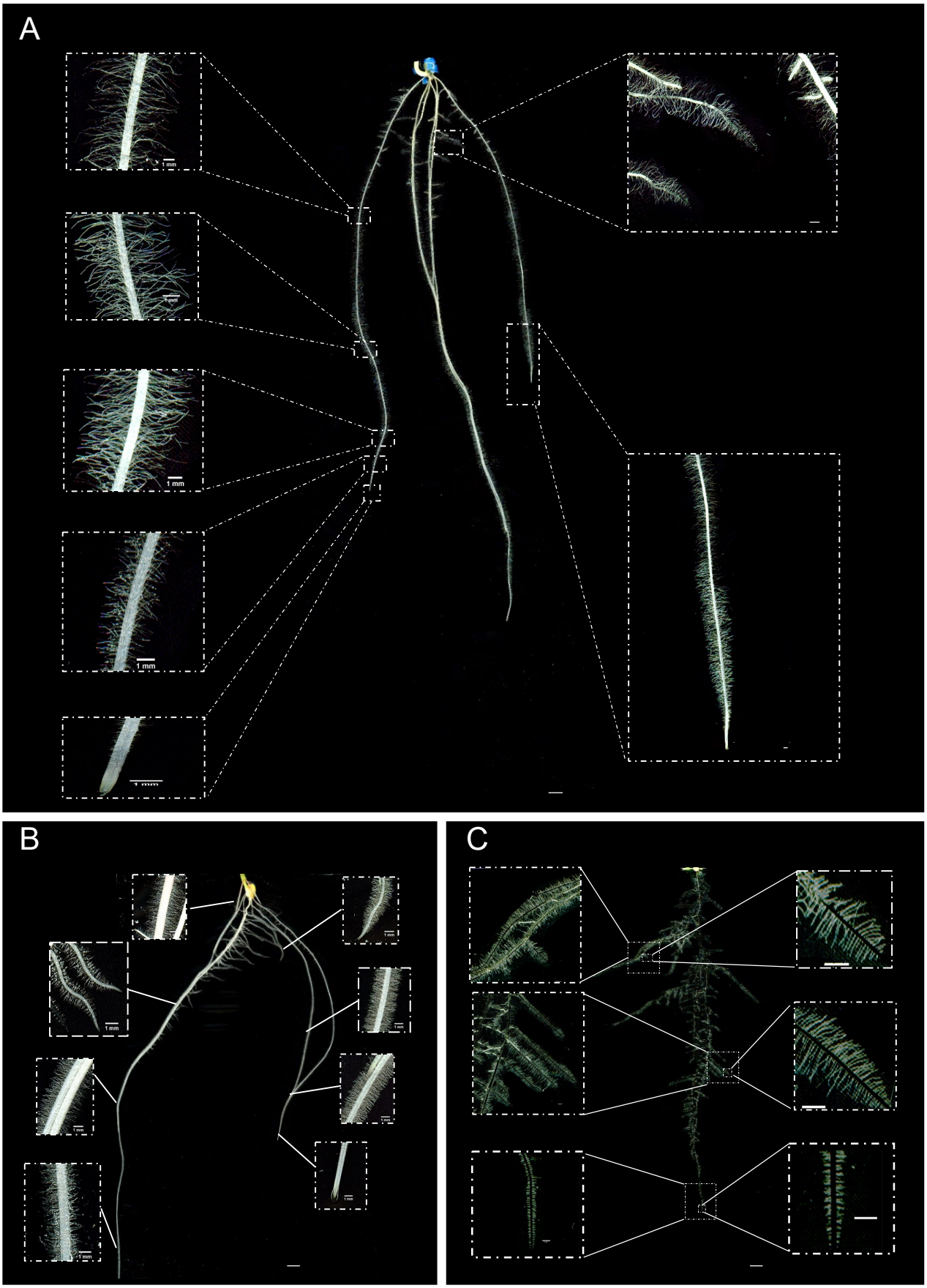


Figure 3.4. Images représentatives des systèmes racinaires de plantules de blé, maïs et Arabidopsis, développées dans des dispositifs de type rhizobox.

Image d'un système racinaire de blé âgé de 14 jours (A), de maïs âgé de 15 jours (B) et d'Arabidopsis âgé de 25 jours (C) et agrandissements de régions de ces systèmes racinaires. Barres: 1 cm pour les systèmes entiers et 1 mm pour les agrandissements.

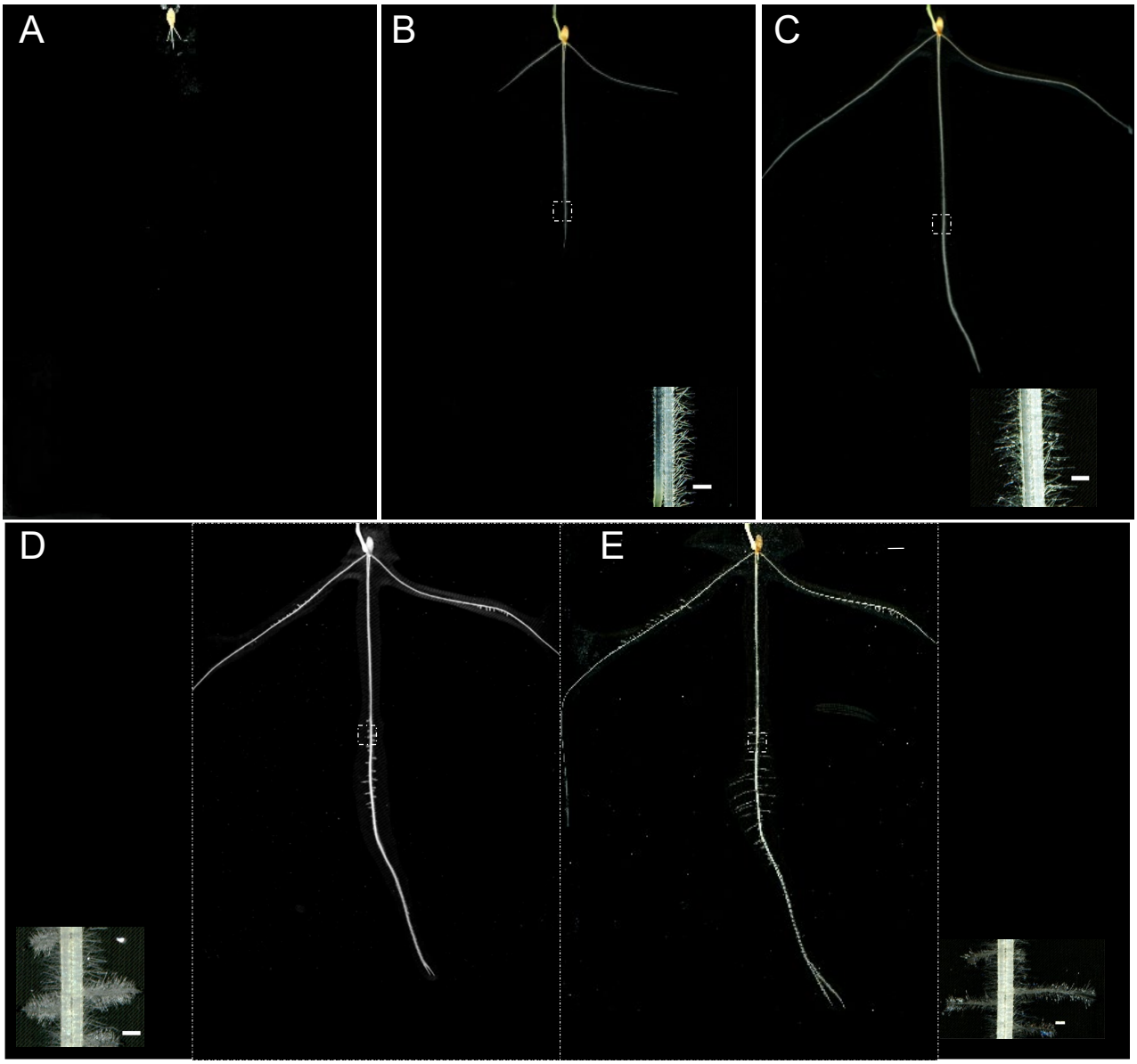


Figure 3.5. Acquisition d'images successives d'un système racinaire au cours de son développement dans un rhizobox.

Système racinaire d'une plantule de blé (accession: Escandia) à 2 jours (A), 4 jours (B), 7 jours (C), 9 jours (D) et 11 jours (E) après le dépôt de la semence pré-germée dans le rhizobox.

plantes récoltées ont été échantillonnées pour la mesure de la biomasse fraîche et sèche. La biomasse fraîche des racines et des feuilles a été déterminée immédiatement après la récolte. Pour la mesure de la biomasse sèche, les racines et les feuilles ont été préalablement traitées à 60°C pendant 72 h.

Concernant la production de biomasse fraiche (Figure 3.6C-D) et sèche (Figure 3.6E-F) par les plantes cultivées en rhizobox ou en terreau, aucune différence significative n'a été observée entre les deux types de plantes, ni pour les parties racinaires, ni pour les parties foliaires. Le rapport de la biomasse (sèche) des racines à celle des feuilles n'est pas non plus différent entre les deux types de plantes (Figure 3.6G). La conclusion est donc que les plantes cultivées en rhizobox présentent quantitativement, en termes de biomasse, une croissance similaire, à celle des plantes cultivées en terreau, au moins pendant les deux premières semaines de culture, jusqu'à l'imagerie des systèmes racinaires.

Dans les images de systèmes racinaires présentées par la Figure 3.6A et B, l'aspect du système racinaire de la plante cultivée en rhizobox apparait cependant différent de celui de la plante cultivée en terreau (Figure 3.6A et B, respectivement). Les scans des systèmes racinaires, après segmentations des images ont été analysés avec WinRHIZO™ et ImageJ (méthodes décrites dans le chapitre 2, § 2.5 et 2.6). La surface totale des systèmes racinaires "nus" (sans poils absorbants) a été comparée entre les deux types de plante, les poils racinaires des plantes cultivées en terreau étant endommagés lors du "déterrement" et du lavage des racines. Les résultats montrent que les plantes cultivées en pot présentent une surface racinaire et une surface spécifique (surface rapportée à la biomasse) significativement plus grandes (respectivement d'environ 60% et 71%) que celles des plantes cultivées en rhizobox (Figure 3.7A et B, respectivement). Ces différences résultent probablement au moins en partie du fait que les plantes cultivées en terreau présentent des racines latérales plus fines que les plantes cultivées en rhizobox. En effet, des mesures locales de diamètre avec ImageJ ont révélé des valeurs inférieures, de 22% environ, chez les plantes cultivées en terreau, par rapport aux plantes cultivées en rhizobox (Figure 3.7C). Des tests préliminaires réalisés au cours de ces expériences ont de plus révélé la présence d'aérenchymes dans les racines des plantes cultivées en terreau, qui sembleraient plus nombreux dans ces racines que dans celles des plantes cultivées en rhizobox. Des différences entre les deux types de plante dans le développement d'aérenchymes pourraient donc contribuer à la différence de surface spécifique entre les deux types de racines. De nouvelles séries d'expériences sont en cours pour préciser les différences phénotypiques entre les systèmes racinaires des plantes cultivées en rhizobox ou en terreau, et tester l'hypothèse d'une formation d'aérenchymes plus abondants et/ou plus grands chez les plantes cultivées en terreau.

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'artificialisation du substratum et de l'environnement dans le rhizobox modifie très probablement le développement du système

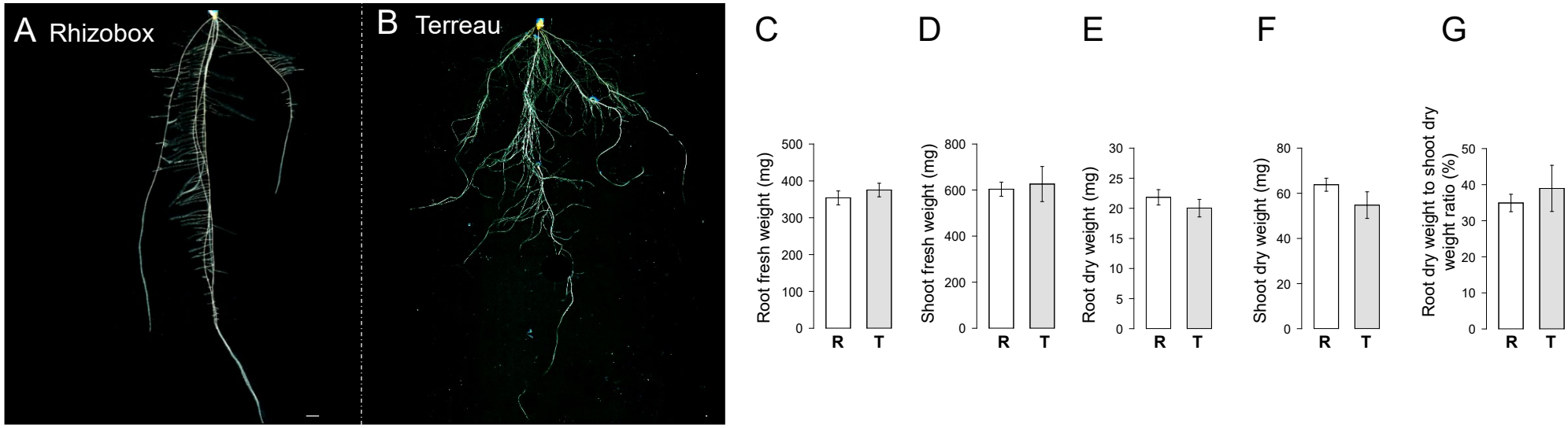


Figure 3.6. Comparaison du développement de plantules de blé dur cultivées en rhizobox ou en pot dans du terreau.

Les plantules de blé Escandia ont été cultivées en parallèle pendant 14 jours dans la même chambre de culture. Les plantules cultivées en rhizobox ont été arrosées avec une solution de Hoagland complète, et celles cultivées en terreau (pots de 0,25 l, avec 7 cm de profondeur) ont été arrosées avec de l'eau.

(A-B) Image représentatives d'un système racinaire développé dans un rhizobox (A) ou dans du terreau (B). Barre d'échelle : 1 cm. Le système racinaire développé dans du terreau a été lavé "délicatement" de façon à le débarrasser de toutes les particules du sol avant d'être scanné (immergé dans de l'eau).

(C-D) Biomasse fraîche des parties foliaires (C) et racinaires (D) de plantules cultivées dans des rhizobox (R) ou dans du terreau (T). Les biomasses racinaires ont été mesurées après imagerie (scan) des systèmes racinaires. Analyse des scans: *Cf.* Figure 3.7.

(E-G) Biomasse sèche des parties racinaires (E) et foliaires (F), et rapport de la biomasse racinaire à la biomasse foliaire (G) des plantules.

Moyennes ± SE (n=14 pour les plantes dans le rhizobox et n= 5 pour les plantes cultivées dans le terreau). L'analyse statistique (test t de Student) indique qu'aucune des différences observées dans les panneaux C à G entre les plantes cultivées en rhizobox et celles cultivées en pot dans du terreau n'est significative ($p>0.05$).

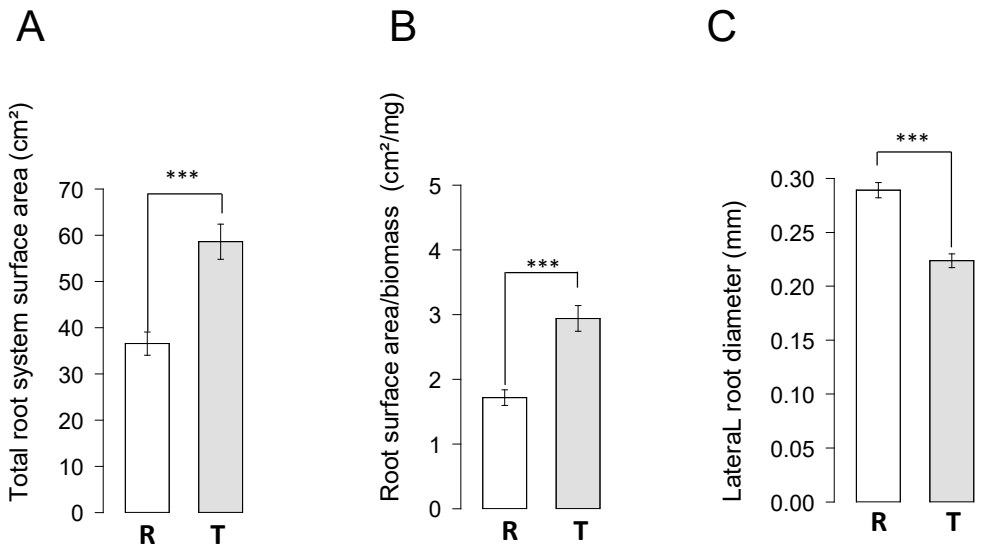


Figure 3.7. Comparaison du développement racinaire des plantules de blé dur cultivées en rhizobox ou en pot dans du terreau.

Des plantules de blé dur Escandia (mêmes plantules que celles des expériences présentées par la Figure 3.6) ont été cultivés pendant 14 jours en rhizobox (R) ou en pot dans du terreau (T). Les images des systèmes racinaires des plantes cultivées en rhizobox ont été acquises comme décrit dans le chapitre 2 (§ 2.5 et 2.6), directement à travers les plaques de verre des rhizobox. Pour les plantes cultivées en pot, les systèmes racinaires sont déterrés et précautionneusement lavés pour être débarrassés de toutes les particules de substrat. Ils sont ensuite individuellement transférés dans un récipient en plexiglass, et immergés dans de l'eau. Le récipient est ensuite transféré sur le scanner pour l'acquisition de l'image du système racinaire.

(A) Surface totale du corps racinaire "nu" (système racinaire sans ses poils absorbants) des plantes cultivées en rhizobox (R) ou en terreau (T). Ce paramètre est obtenu à l'aide de WinRHIZO™ après segmentation des images avec Ilastik (*Cf*. § 3.7).

(B) Estimation de la surface spécifique des corps racinaires "nus" des plantes cultivées en rhizobox (R) et en terreau (T). Ce paramètre est calculé en rapportant la surface totale des corps racinaires (données du panneau C) à la biomasse du système racinaire. Dans ce calcul, les pois absorbants ne sont pas considérés.

(C) Diamètre de racines latérales des plantes cultivées en rhizobox ou en terreau (mesuré manuellement avec ImageJ sur les images segmentées).

Moyennes ± SE. Pour C et D, n=14 pour les plantes en rhizobox et n= 5 pour les plantes en terreau. Pour E, n=24 pour les plantes en rhizobox et n=40 pour les plantes en terreau. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives (test t de Student, p<0,005).

racinaire, par rapport à la croissance dans un sol. Cependant, cela est le cas, et le prix à payer, dans toutes les méthodologies de phénotypage racinaire acceptant une artificialisation du milieu afin de contrôler les conditions environnementales et faciliter l'analyse du développement racinaire. Il est très largement considéré que ce type de stratégie permet d'effectuer de façon pertinente des comparaisons entre espèces et/ou variétés, ou entre les réponses d'un génotype donné à des environnements différents. De plus, dans notre méthodologie, les plantes cultivées en rhizobox ne se distinguent pas des plantes contrôles cultivées en terreau par leurs biomasses foliaires et leur biomasse racinaire, et ont donc le même ratio de partage des photosynthétats entre croissance foliaire et racinaire. Nous considérons ce résultat comme rassurant par rapport à la question de la signification physiologique du développement de la plante en rhizobox et à la pertinence de la procédure de phénotypage comparatif.

3.8 Prétraitement des images

Les images brutes des systèmes racinaires fournies par le scanner présentent un bruit de fond se traduisant par des nuances du gris. Ce bruit a différentes origines, dont par exemple des reliquats de buée, mais aussi la structure du tissu, dont la maille forme un motif constitué de lignes parallèles répétées (Figure 3. 8A). Sur de telles images, des poils absorbants relativement translucides ou dont la couleur correspond à certaines nuances de gris peuvent être "confondus" avec le « pattern » du tissu, ce qui rend les méthodes de segmentation classiques comme le seuillage et l'application des filtres (Gaussian, transformations de Fourrier) très peu pertinentes, conduisant très souvent à la suppression des poils absorbants. Pour cette raison, pour analyser les images, nous effectuons une segmentation sémantique avec un logiciel d'apprentissage automatique (ilastik) avec un ensemble de caractéristiques d'images sélectionnées et définies par l'utilisateur pour produire des segmentations basées sur des pixels (les détails de la méthode utilisée sont décrits dans le chapitre 2, §2.5). En résumé le logiciel nous fournit des images, segmentées en 8 bits, qui sont ensuite analysées par le logiciel WinRHIZO^{TM} pour une analyse en termes de surface racinaire, et par imageJ pour une estimation de longueur et densité des poils absorbants.

Pour évaluer la pertinence de la méthode de segmentation automatique que nous avons utilisée, par rapport à la segmentation manuelle, nous avons comparé la surface des poils absorbants obtenue avec WinRHIZO^{TM} à partir de la même image d'un système racinaire (Figure 3.8A), mais segmentée soit manuellement, par un "débruitage effectué par l'expérimentatrice elle-même", soit automatiquement par deux logiciels de segmentation sémantique différents.

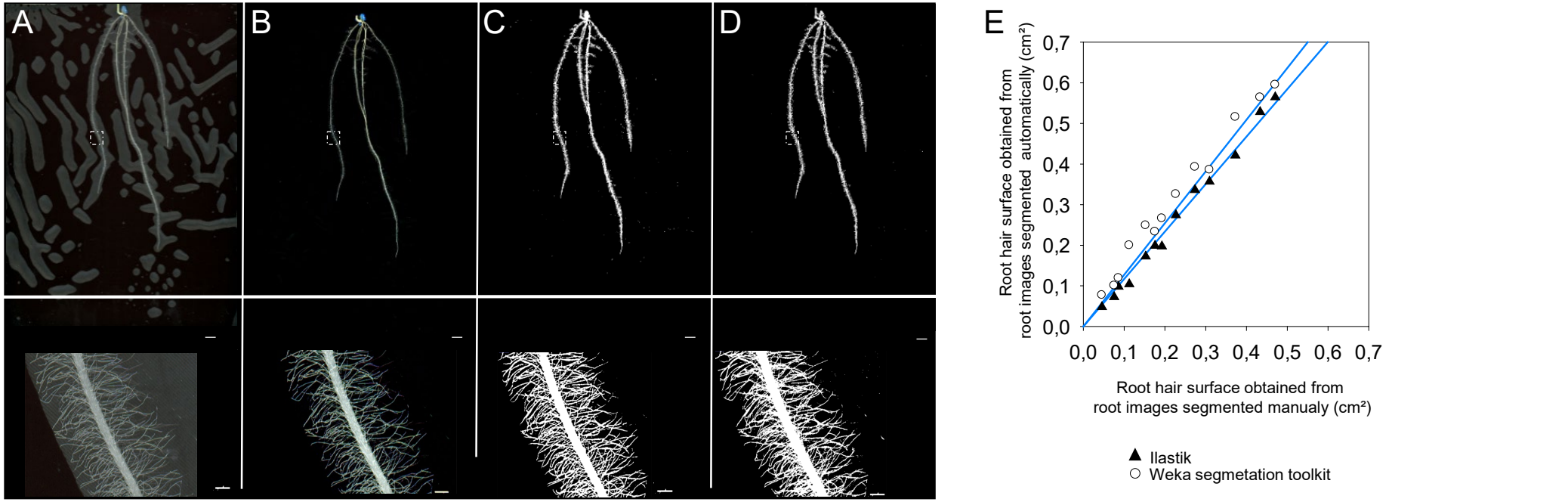


Figure 3.8. Segmentation des images de systèmes racinaires : validation de la procédure utilisant le logiciel ilastik.

La segmentation effectuée manuellement, à partir de l'image brute d'un système racinaire acquise par scan, est comparée à la segmentation obtenue avec les logiciels de segmentation sémantique Ilastik ou "*Trainable Weka Segmentation*". Dans tous les panneaux (A à D), un agrandissement de la région du système racinaire encadrée dans l'image du système racinaire entier est montrée en bas de cette image.

(A) Image brute du système racinaire de plantule de blé dur (Oued Zenati) cultivée en condition de carence en phosphate pendant 14 jours en rhizobox.

(B) Image du même système racinaire, traitée manuellement (avec Photoshop) pour améliorer le contraste et réduire le bruit.

(C) Image segmentée par le logiciel "*Trainable Weka Segmentation*" (plug-in d'imageJ).

(D) Système racinaire segmenté par le logiciel " *ilastik* ".

(E) Comparaison de la surface des poils absorbants obtenue avec WinRHIZO™ dans différentes régions du système racinaire dont le scan brut est présenté par le panneau A, à partir des images traitées manuellement (image dans panneau B), segmentées à l'aide de "*ilastik*" (image du panneau C) ou segmentées à l'aide de "*Trainable Weka Segmentation*" (image du panneau D).

Le débruitage manuel a été effectué avec le logiciel Photoshop par un seuillage et amélioration du contraste suivi d'une suppression manuelle des pixels appartenant au background. L'image ainsi traitée présente un fond homogène ainsi que des racines et des poils absorbants bien définis (Figure 3.8B)

La segmentation sémantique a été réalisée soit à l'aide de "Trainable Weka Segmentation", qui est présent en tant que plug-in dans ImageJ, soit à l'aide de ilastik, qui est un logiciel "libre". Comme ilastik, Trainable Weka Segmentation contient une collection d'outils de visualisation et d'algorithmes pour l'analyse de données et la modélisation prédictive, ainsi que des interfaces graphiques pour un accès facile à cette fonctionnalité. Après annotation manuelle des pixels appartenant au background et à la racine, ce logiciel effectue la segmentation de l'image, en 8 bits. (Figure 3.8C). Il faut noter cependant que ce plug-in est peu adapté à des photos aussi lourdes que les nôtres (de taille voisine de 400 MB), ce qui engendre un temps de traitement très long (2h par image). Le logiciel ilastik permet une segmentation efficace (Figure 3.8D) en des temps plus courts (1 min par images) (détails dans le chapitre 2, §2.5).

Nous avons sélectionné en tout 14 régions de systèmes racinaires, et les avons analysées avec WinRHIZO^{TM}, pour obtenir la surface des poils absorbants, à partir des mêmes photos mais segmentées selon chacune des 3 différentes méthodes de segmentation mentionnées ci-dessus.

Les valeurs de surface des poils absorbants fournies par WinRHIZO^{TM} à partir des 2 images segmentées automatiquement sont comparées aux valeurs correspondantes obtenues par le « débruitage » manuel (Figure 3.8E). Dans l'ensemble, ces analyses indiquent que la segmentation automatique en utilisant un logiciel basé sur l'apprentissage automatique est fiable pour effectuer nos analyses. Pour des raisons pratiques (temps de traitement court), nous avons utilisé ilastik dans la suite de ce travail.

3.9 Estimation opérationnelle de la longueur et de la densité des poils absorbants des segments racinaires des plantes cultivées dans le rhizobox.

La plasticité développementale des poils absorbants, en réponse à différentes conditions environnementales, conduit à des variations de leur longueur et densité, et donc de leur surface totale à l'échelle de la racine ou du système racinaire entier. Dans la littérature, les caractéristiques des poils absorbants sont très généralement mesurées sur des segments de racine présélectionnés, en utilisant un microscope à fort grossissement avec une résolution suffisante pour mesurer la longueur individuelle et le nombre de poils absorbants sur un segment de racine de longueur limitée.

Les images obtenues à partir des plantes en rhizobox permettent une analyse intégrative de traits racinaires globaux, tels que la totalité de la surface du système racinaire, ou la totalité de la surface des poils absorbants sur le système racinaire entier. Il est cependant également possible de faire des analyses de traits racinaires locaux, par exemple architecturaux comme l'angle formé par les deux racines séminales les plus externes de part et d'autre de la racine principale. Concernant les poils absorbants, nous avons développé deux procédures pour obtenir des estimations opérationnelles de leur longueur et de leur densité locale, sur un segment de racine donné. Ces procédures sont explicitées sur la Figure 3.9.

La longueur des poils absorbants est estimée opérationnellement (Figure 3.9A) comme la distance, appelée "Root hair sheath width", entre deux lignes tracées parallèlement à la surface de la racine, la première ligne juste le long de la surface du segment racinaire considéré, et la seconde interceptant les extrémités des poils absorbants apparaissant comme les plus longs dans l'image (scan 2D d'un objet 3D). La distance entre ces deux lignes est prise comme une estimation opérationnelle de l'extension moyenne de poils absorbants dans le segment racinaire correspondant (Figure 3.9A).

La densité des poils absorbants est estimée par une procédure (Figure 3.9B) décomptant automatiquement le nombre de pixels appartenant à des poils absorbants et le nombre de pixels appartenant au "background" le long d'une ligne tracée parallèlement à la racine, à une distance de la racine égale à la moitié de la largeur du "root hair sheath width" (*Cf.* § ci-dessus). Cette procédure automatique repose sur l'hypothèse que tous les poils absorbants de la région analysée possèdent le même diamètre, ce qui peut être vérifié sur les images. Dans le cadre de cette hypothèse, le nombre de pixels de poils absorbants interceptés par la ligne, et le pourcentage de ces pixels sur une distance donnée le long de cette ligne, sont proportionnels au nombre de poils absorbants interceptés par cette ligne (sur cette distance). Dans les images codées sur 8 bits, les pixels blancs et noirs ont respectivement pour valeur de couleur 255 et 0. Dans une telle image binarisée, utilisant le blanc pour la racine et le noir pour le background, le pourcentage NW% de pixels blancs interceptés par la ligne peut être obtenu directement à partir de la "moyenne de la valeur grise", mgrey fournie par ImageJ le long de la ligne considérée. En effet, la valeur mgrey calculée par ImageJ est la moyenne des valeurs de couleurs, 255 ou 0 dans notre cas, le long de la ligne. Donc, dans une telle image, le pourcentage de pixels "poils absorbants", qui est pris comme une estimation opérationnelle de la densité des poils absorbants, est égal à : NW% = (mgrey/255) x 100 (Figure 3.9B). La valeur ainsi obtenue ne mesure pas la densité de poils *sensu stricto*, c'est-à-dire le nombre de poils absorbants par unité de longueur, mais elle lui est proportionnelle, et fournit ainsi un moyen très simple de comparer différentes zones au sein d'un système racinaire, ou appartenant à des systèmes racinaires différents, à condition que l'hypothèse

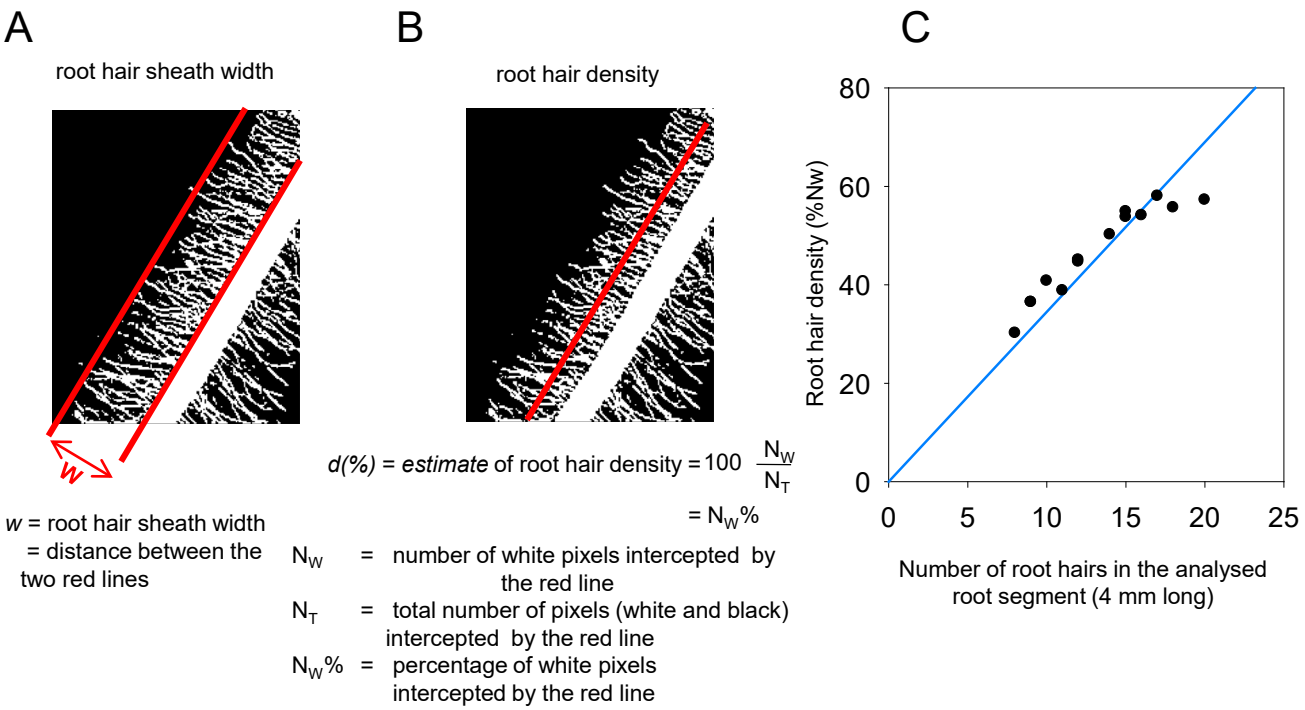


Figure 3.9. Estimation de la longueur et de la densité locales des poils absorbants.

(A) Estimation de la longueur des poils absorbants dans une région donnée du système racinaire. Deux lignes (en rouge) sont tracées parallèlement l'une à l'autre et à la surface du segment racinaire analysé, la première juste le long de la surface du segment racinaire et la seconde interceptant les extrémités des poils racinaires apparaissant comme les plus longs dans l'image (scan 2D d'un objet 3D). La distance entre les deux lignes, nommée w (pour width of the root hair sheath) est prise comme une estimation opérationnelle de la longueur moyenne des poils absorbants dans le segment racinaire correspondant.

(B) Estimation opérationnelle de la densité des poils racinaires. Une ligne est tracée, parallèle à la surface du segment de racine analysé et à une distance de cette surface égale à environ la moitié de l'estimation w de la longueur des poils absorbants. Le nombre de poils traversés par la ligne est proportionnel au nombre de pixels blancs traversés par la ligne puisque tous les poils absorbants semblent avoir le même diamètre. Nous avons utilisé directement le pourcentage de pixels blancs interceptés par la ligne, NW%, comme une estimation opérationnelle de la densité (d) des poils racinaires. En utilisant ImageJ, NW% peut être obtenu directement et rapidement à partir de la "moyenne de la valeur grise", mgrey, des pixels interceptés par la ligne. Dans l'image codée sur 8 bits (pixels blancs et noirs " code couleur : 255 et 0, respectivement), NW% = (mgrey/255) x 100 (*Cf.* texte principal, § 3.9).

(C) Relation entre le nombre de poils absorbants déterminé manuellement (abscisse) et la mesure opérationnelle NW% de la densité des poils absorbants obtenue selon la procédure décrite en (B). Chacun des points expérimentaux correspond à une région sélectionnée au sein du système racinaire dont l'image segmentée par Ilastik est présentée dans la Figure 3.8D. Au total, 14 régions ont été sélectionnées pour cette analyse comparative, présentant des densités de poils variant entre environ 8 et 20 poils par mm.

d'un même diamètre pour tous les poils absorbants de ces différentes zones soit vérifiée. Nous avons procédé à une validation de cette méthode (Figure 3.9C) en comparant la densité des poils absorbants estimée par le pourcentage de pixels blancs NW% au nombre de poils absorbants déterminé manuellement dans 14 régions présentant des densités de poils absorbants variables, entre *ca*. 8 et 20 poils par environ 4 mm, sélectionnées au sein du système racinaire dont l'image est fournie par la figure 3.8A, après segmentation par ilastik (Figure 3.8D). Les résultats de cette comparaison fait apparaître une corrélation très satisfaisante entre l'estimation opérationnelle NW% et la valeur mesurée manuellement (Figure 3.9C)

3.10 Discussion et conclusion

Les résultats présentés par la Figure 3.6 ont indiqué que, dans des conditions de chambre de culture, la croissance des plantes (biomasse des feuilles et des racines) étaient similaires chez les plantes de blé dur cultivées dans le dispositif rhizobox ou en pot dans du terreau. Il est raisonnable de considérer que cela indique que les conditions environnementales présentes dans le dispositif de type rhizobox sont plutôt physiologiquement pertinentes, au moins pour les plantes de blé cultivées pendant environ 2 semaines.

Toutes les méthodologies de phénotypage du système racinaire directement basées sur l'analyse d'images, comme la présente, introduisent des biais dus au fait que les analyses sont effectuées sur la projection 2-D d'une structure 3-D (système racinaire). Ceci est particulièrement vrai pour la surface des poils absorbants puisque la surface projetée du corps de la racine recouvre partiellement et " cache " la surface projetée des poils absorbants. On peut supposer que ces biais, ainsi que les autres biais possibles résultant du protocole d'imagerie et de la procédure d'analyse des images, sont très similaires pour toutes les images, ce qui rend pertinente la comparaison entre les génotypes et les traitements. De façon générale, les descripteurs du système racinaire proposés dans la méthodologie que nous avons développée doivent être considérés comme des paramètres permettant de comparer entre elles des espèces/cultivars et leurs réponses à des conditions environnementales contrôlées et imposées par l'expérimentateur, abiotiques, dont des carences en ions minéraux nutritifs (Chapitres 4, 5 et 6), ou biotiques (Chapitre 7, Discussion Générale et Perspectives).

Chapitre 4

Une méthodologie pour le phénotypage du développement des poils absorbants dans le système racinaire entier utilisée pour comparer les réponses de deux accessions de blé à la privation de Pi

Title: A methodology for phenotyping root hair development in whole root system used to compare the responses of two wheat accessions to Pi starvation.

Running head: Integrating root hair traits in root system phenotyping

Ikram Madani[1], Thanyakorn Rongsawat[1,2], Houssein Zhour[1], Philippe Nacry[1], Volker Bäcker[3], Anne-Aliénor Véry[1], Hervé Sentenac[1], Jean-Benoît Peltier[1,*]

[1]IPSiM, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France
[2]Tropical Fruit and Plantation Crops Research Center, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand
[3]Montpellier Ressources Imagerie, BioCampus, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

[*]For correspondence. E-mail jean-benoit.peltier@inrae.fr

Abstract

While root hairs efficiently contribute to soil exploitation, no affordable methodology for phenotyping the development of this cell type in intact whole root system was available. We established such a methodology and used it to compare two wheat genotypes, an ancestor and a landrace, by analyzing root hair length and density per root class (seminal and lateral roots), the contribution of root hairs to total root system area (contribution larger than 40% were observed), and the responses of all these traits to phosphate availability. The wheat ancestor showed greater plasticity than the landrace under phosphate shortage, particularly in terms of increasing root hair area and ratio of root hair area to total root area. It also displayed larger emergence angles between the outermost seminal roots and the ability to reorient the growth axis of seminal roots to a quasi-horizontal direction as soon as a physical constraint imposing vertical growth ceased. Such root traits and root hair plasticity could allow more efficient exploitation of upper soil layers. These results indicate that the proposed methodology could help to select cultivars with better soil exploration capacity as well as to design appropriate varietal mixtures with complementary strategies in soil exploration for co-cultivation.

Keywords (5-10)

Root hairs, root phenotyping, wheat, *Triticum turgidum durum, dicoccum*, seminal roots, lateral roots, phosphate starvation, root plasticity, rhizobox

1 | INTRODUCTION

One of the main constraints limiting crop productivity, besides drought, is the low availability of nutrient ions in the soil, which is remedied by high fertilizer inputs in conventional agriculture. Today, however there is a consensus that agriculture must undergo a new revolution to reduce its ecological costs while coping with an increasing world population (Del Bianco and Kepinski, 2018; Lynch, 2022). A major objective in this context is to decrease the dependence of crop yield on the use of fertilizers from the chemical industry. Research programs are therefore being conducted to identify root system traits beneficial to crop yield in order to select new cultivars capable of performing under limited levels of fertilization (Lynch, 2007; Kuijken *et al*., 2015; Del Bianco and Kepinski, 2018; Amtmann *et al*., 2022).

Root systems exhibit considerable structural variation among species and among genotypes within a species (Sandhu *et al*., 2016; De Pessemier *et al*., 2022). Furthermore, within a given genotype, phenotypic plasticity of roots allows for more efficient adaptation to spatiotemporal changes in soil conditions and increased capture of edaphic resources (Zhu *et al*., 2005; Gruber *et al*., 2013; Rellán-Álvarez *et al*., 2016). Experimental and theoretical analyses have identified root phenes that play major roles in the adaptation of a root system to its soil environment and thus propose root ideotypes to increase nutrient and water acquisition efficiency (Wang *et al*., 2010; Mi *et al*., 2010; Lynch, 2013; White, 2019). For example, as phosphate (Pi) mobility is very low in the soil and the relative abundance of this nutrient is most often higher in upper soil layers than in deep soil, root traits associated with better topsoil foraging, such as shallow root growth and development of long root hairs, improve the plant capacity to acquire Pi and have been successfully exploited in crop breeding programs (Burridge *et al*., 2019; Strock *et al*., 2019). In contrast, steep and deep roots can contribute to more efficient nitrate and water acquisition since the relative abundance of these resources is higher (water) or may be significant (nitrate, due to leaching) in deep soil (Mi *et al*., 2010; Lynch, 2013; Uga *et al*., 2013; Trachsel *et al*., 2013; Placido *et al*., 2020). In addition to such steep and deep root architecture traits, development of long and dense root hairs can contribute to water and nitrate uptake (Foehse and Jungk, 1983; Robinson and Rorison, 1987; White and Kirkegaard, 2010; Saengwilai *et al*., 2021; Rongsawat *et al*., 2021; Cai and Ahmed, 2022). It should be noted, however, that root traits and plasticity that contribute to plant adaptation to soil conditions and spatiotemporal changes in nutrient and water availability also generate competition between neighboring/adjacent plants. This issue is important since the trade-off between root traits contributing to individual plant fitness and the resulting competition between neighboring plants can affect the final yield of high-density cultivated crops such as wheat (Gersani *et al*., 2001; Weiner *et al*., 2017; Weiner, 2019; Schneider and Lynch, 2020).

A very large diversity of root phenotyping methodologies is available, comprising soil-free, soil-based and field-based approaches (reviews: Kuijken *et al*., 2015; Paez-Garcia *et al*., 2015; Atkinson *et al*., 2019; Tracy *et al*., 2020; Watt *et al*., 2020; Danilevicz *et al*., 2021; Maqbool *et al*., 2022). The purposes of these methodologies range from high-throughput screening of large germplasm collections to gaining fundamental knowledge on root responses to environmental conditions. Trade-offs are thus required between the physiological relevance of plant growth conditions, the high-throughput criterion, the total cost of the experiments, the possibility of controlling/modifying the biotic and/or abiotic environment and the possibility of performing non-invasive time-series analyses of root system development. Thus, depending on the objectives, plants are grown in hydroponics or hydroponics-like conditions (Piñeros *et al*., 2016; Ma *et al*., 2019), on agar plates or in agar-filled growth chambers (Bengough *et al*., 2004; Kellermeier *et al*., 2014; Iyer-Pascuzzi *et al*., 2010; De Pessemier *et al*., 2022), in transparent substrates (Downie *et al*., 2012; Ma *et al*., 2019), in germination paper rolls or pouches (Atkinson *et al*., 2015; Thomas *et al*., 2016), in soil, in soil-like substrates or in soil solution in rhizoboxes-type devices allowing to get 2-D images of the root systems using cameras or flatbed scanners (Goron *et al*., 2015; Adu *et al*., 2017; Jeudy *et al*., 2016; Joshi *et al*., 2017; Cassidy *et al*., 2020), in soil in pots or columns allowing to get 3-D images using X-ray tomography or magnetic resonance imaging (Mooney *et al*., 2012; Mairhofer *et al*., 2013, Metzner *et al*., 2015, Piovesan *et al*., 2021), in soil using subterranean root imagers inserted in transparent tubes (Ghimire *et al*., 2020) or directly in fields using the so-called “shovelomics” procedure (Trachsel *et al*., 2011).

Although very diverse, the phenotyping procedures described to date have most often paid little attention to root hairs, although these cells can strongly contribute to the acquisition of water and nutrient ions (Rongsawat *et al*., 2021; Kohli *et al*., 2022; De Pessemier *et al*., 2022). Typical approaches have most often focused on the so-called root hair zone of young seedlings grown on agar plates or germination paper (Jung *et al*., 2009; Stetter *et al*., 2015; Vatter *et al*., 2015; Poitout *et al*., 2017; Klinsawang *et al*., 2018). Furthermore, while root system architectural traits and root hair production and elongation are likely to act synergistically in acquiring soil resources (Miguel *et al*., 2015; Wang *et al*., 2021), and both are sensitive to nutrient shortage, none of these methodologies have been developed to allow integrative phenotyping of root and root hair traits in a whole root system.

We have developed an affordable high-throughput phenotyping methodology, based on a rhizobox-type device, allowing to get high-resolution images of root hairs over a 30-cm-long root system, and we have used this methodology to compare the root responses to low phosphate availability in a wheat ancestor and a wheat landrace.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Plant material and growth conditions

Root traits were phenotyped in two wheat genotypes, a landrace *Triticum turgidum* spp*. durum* cv. Oued Zenati (Oued) and an ancestral accession *Triticum turgidum L.* spp. *dicoccum* cv. Escandia (Escandia).

Seeds of similar size were surface-sterilized by immersion in 6% acetic acid solution for 30 seconds and then in 4% calcium hypochlorite solution for 20 minutes. The latter treatment was performed under vacuum in order to eliminate the air bubbles trapped in seed groove. The seeds were then rinsed 5 times in sterile distilled water and thereafter soaked in sterile warm water (approximately 40 °C; 20 ml for about 10 seeds) in a plastic cup which was then left at 26 °C in the dark for about 16 h. This procedure was found to stimulate seed germination.

Germinated seeds (showing primary root emergence) were selected, transferred onto sterile moistened filter paper in a Petri dish where they were coated with a wax containing 0.1% oxyquinoline fungicide (Staehler PP 140, Chauvin-Agro) to avoid fungal contamination during the growth period in rhizobox. Coated seeds were placed in an upright position (with the primary emerged root facing downward) in rhizobox-type devices (Figure 1; description: see below), which were then randomly arranged in the phenotyping platform (Supporting Information: Figure S1) in a growth chamber (16 h of photoperiod,150 µE of light intensity, day/night temperature 22/20 ˚C, 65% air humidity).

The rhizoboxes were first irrigated with deionized water for 3 days and then for 11 days with modified Hoagland solutions (irrigation rate: 1.5 ml every 10 minutes). The solutions contained either 1 mM or 0.002 mM KH_2PO_4 as sole phosphate source (control and low P solution, respectively), and 1 mM NH_4NO_3, 5 mM KNO_3, 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM NaFe(III)EDTA, 1 mM NaCl, 12.5 µM H_3BO_3, 2 µM $MnCl_2$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.5 µM $CuSO_4$, 0.1 µM Na_2MoO_4, and 0.1 µM $NiSO_4$. In the low P solution (LP), the decrease in K^+ concentration due to the reduction in KH_2PO_4 concentration was compensated by KCl, without addition of NaCl.

2.2 | The rhizobox-type device

The rhizobox-type device developed to obtain high-resolution images of root systems, allowing to phenotype root hair traits, is described in Figure 1. Briefly, a polyurethane foam board (width/height/thickness in mm: 260/320/15; Smithers-Oasis® France, Saint-Martin Lalande, France) is bagged in a black, hydrophilic, non-putrescible, water-, nutrient-, and microbe-permeable polyester fabric (mesh size: 18 µm, solution holding capacity: 2.5 µl/cm²; Saaticare

Hyphyl®, SAATI, Appiano Gentile, Italy). The board (bagged in the fabric) is placed between two transparent glass plates. Each glass plate is covered with a polyurethane board that protects the growing root system from light. The roots grow between the polyester fabric and the glass plate. Two plants can be grown simultaneously in one rhizobox, one on each side of the rhizobox. Laterally placed aluminium spacers (2 mm thick and 20 mm wide) ensure a constant spacing between the glass plate and the black fabric (Figure 1a-b). Images of the root system are acquired through the transparent glass plate. Nutrient solution is provided by an automatic device (Figure 1c), the solution being dropped on top of the polyurethane foam plate, which acts as a reservoir of nutrient solution inside the rhizobox, moistening the polyester fabric on which the roots develop.

2.3 | Image acquisition and segmentation:

Images of root systems were acquired though the transparent glass plates with a flatbed scanner (Epson Perfection V850 pro; resolution 24 bits/1200 dpi) after 14 days of growth in the rhizobox. The raw images are composed of multiple image segments (roots, root hairs, and repeated parallel line pattern of the polyester fabric**)**. We chose to perform semantic segmentation with Ilastik (Berg *et al*., 2019) using the predefined "Pixel Classification" workflow. After uploading the images, we selected the features for the training set, "Gaussian Filter, Color/Intensity, Edge, and Texture", with sigma value less than 0.7 to extract fine details like root hairs. We trained the program to distinguish the background (pattern of the fabric) from the roots and root hairs using manual annotation/labeling. This gave us eight-bit segmented images, which could be straightforwardly analysed by bio-image analysis softwares.

2.4 | Image analyses

Segmented images were analysed using WinRHIZO™ (V.2009 Pro, Regent Instruments, Montreal, QC, Canada) and ImageJ (version 1.47). For morphometric root traits such as root and root hair surface, 3 classes of root diameter were defined within WinRHIZO™ (user arbitrary definition): diameter smaller than 0.20 mm, between 0.21 and 0.30 mm or larger than 0.31 mm. Root elements identified as belonging to the thinnest diameter class (smaller than 0.20 mm) correspond essentially to root hairs. Additional analyses were performed with ImageJ (version 1.47) (Abràmoff *et al*., 2005) for root angle, root hair length (root hair sheath) and root hair density measurements (Figure S2).

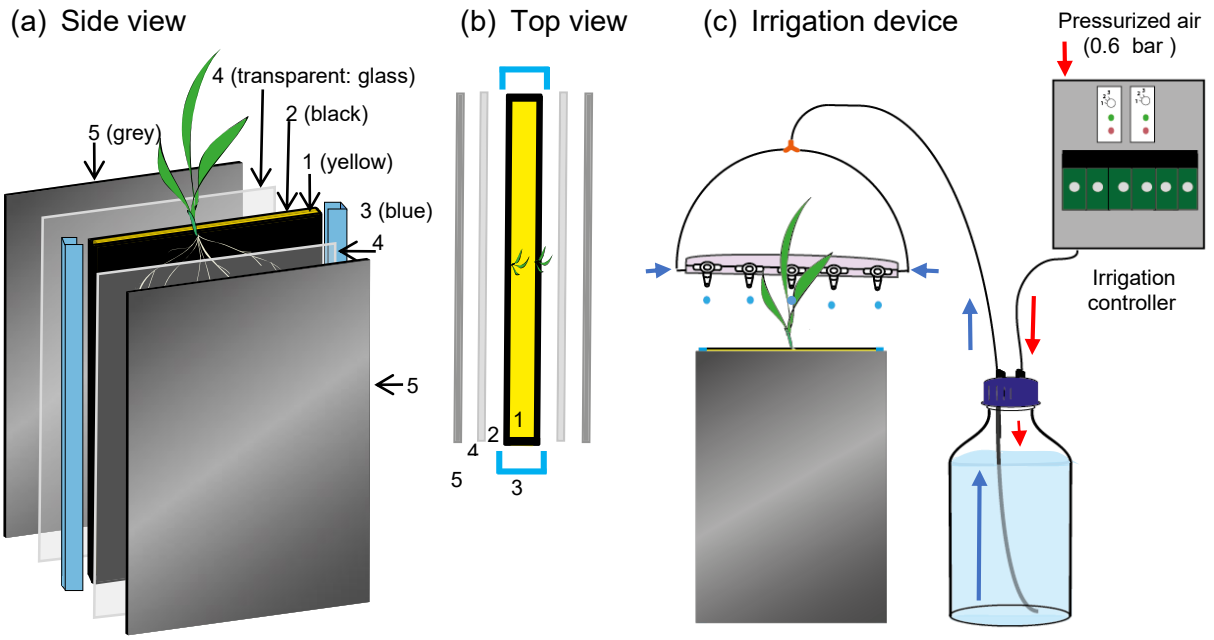


Figure 1. Schematic representation of the rhizobox device and its watering system.(a-b) Side view (a) and top view (b) of the arrangement of the rhizobox-like device. The rhizobox usually contains two plants, grown simultaneously, one on each side, but the drawing shows only one plant for simplicity. (1) Solid polyurethane foam board (width/height/thickness in mm: 260/320/15). The microporous structure of the foam allows the board to act as a water reservoir. (2) Black polyester fabric (PES 18/13) bagging the polyurethane foam board. Roots grow on the external face of the bag.
(3) U-shape aluminum sliding bar. (4) Glass plate (in mm: 260×320×2). The aluminum sliding bars are used as spacers, so that the distance between the polyester fabric and the glass plate is 2 mm. (5) Polystyrene board (in mm: 260×320×4) covered with an aluminum foil, preventing light to reach roots.(c) Watering system. Pressurized air (0.6 bar) moves the nutrient solution from a reservoir bottle (2 or 5 L) to the rhizobox via a symmetrical circuit and 5 taps allowing the solution to drop onto the top of the polyurethane foam board. A watering controller (including timers and 3-way solenoid valves) is used to periodically pressurize/depressurize the bottle. In the present experiments, we set the duration of each watering episode to 3 s, every 10 min, delivering about 1.5 ml per episode.

2.5 | Root hair viability assay

Root hair viability was examined by dual fluorescent staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) as described by Jones *et al*. (2016). FDA exclusively stains the cytoplasm of living cells. PI stains nuclei of dead cells and cell walls (of living and dead cells), Stock solutions of FDA (F7378, Sigma) and PI (P3566, Thermo Fisher Molecular Probes) (2 µg/ml and 10 µg/ml respectively) were prepared in Hoagland solution. Dual-staining solution contained 0.05% FDA and 0.1% PI. It was prepared by diluting aliquots of the stock solutions in Hoagland solution. Because root hairs adhered to the polyester fabric in the rhizobox-type device, the selected root segments were not to be separated from the fabric, as such treatment would have damaged root hairs. Thus, the fabric was carefully cut around the selected root segment with a razor blade without moving the root segment on the fabric surface. The excised sample (fabric piece + root segment) was directly transferred into dual-staining solution for 2 minutes. Images of the root segment (still on the fabric piece) were obtained using a macroscope (Axio Zoom V16, Zeiss) and analysed with ImageJ version 1.47 (Abràmoff *et al*., 2005).

3 | RESULTS

3.1 | A rhizobox-like device providing high resolution images of root hairs on intact root systems

Elongated root hairs are fragile cells and can be damaged upon common root treatment protocols such as a "gentle" washing of roots having grown in soil or the transfer of (pieces of) roots grown in hydroponics onto the imaging device. Root hairs may then be broken and/or bent against the root, making it difficult to analyse root hair zones throughout the root system. Thus, the main objective of the method we developed was to obtain high-resolution images of whole root systems and their root hairs *in situ*, i.e., without any previous manipulation of the roots.

Root systems grown in the rhizobox-like device described in Figure 1 were scanned directly through the glass plate. Already well-developed root systems can thus be observed since the "A4" size of the space available for the roots in the rhizobox (21 cm width x 30 cm length) allows the plant (wheat) to grow for about 2 weeks after germination in our experimental conditions before the bottom of the rhizobox is reached by the longest roots. The nutrient solution is delivered by an automatic device that allows controlled and precise distribution of the solution. The roots grow on the surface of a black polyester fabric (black for better

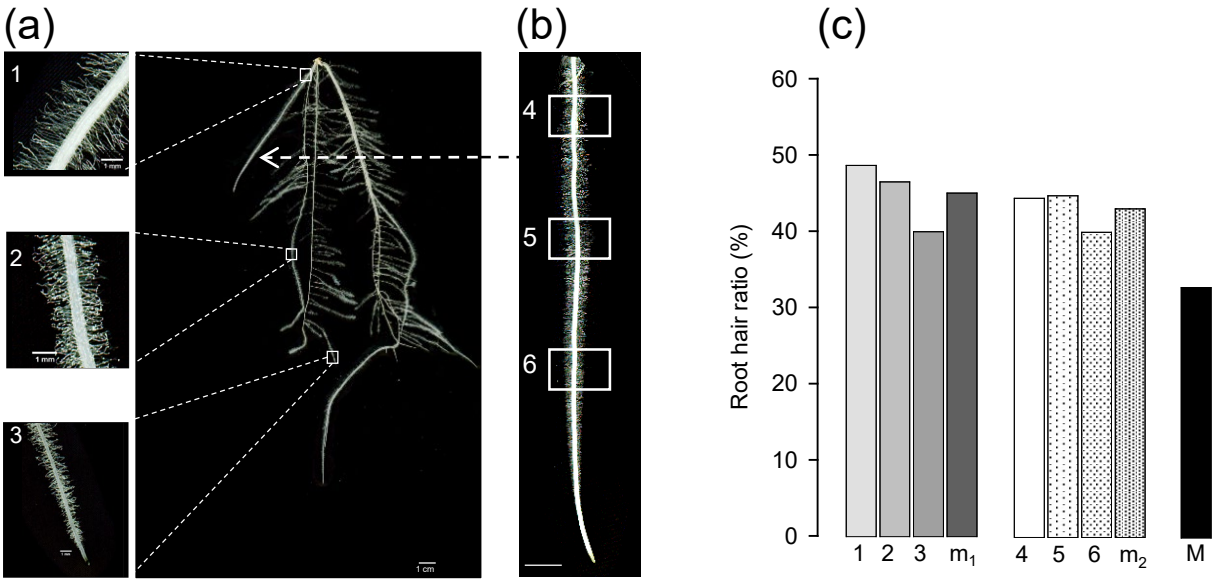


Figure 2. Representative image of root systems of wheat seedlings grown in rhizoboxes.
The seedling (*Triticum turgidum L.* spp. *durum*, cv. Oued Zenati) was grown for 14 days in a rhizobox (see Figure 1) watered with control complete nutrient solution.

(a) Whole root system and enlargements of 3 different regions. White bars: 1 cm for the whole root system, and 1 mm for the enlargements.

(b) Enlargement of the seminal root indicated by the arrow in (a). White bar: 1 cm.

(c) Root hair area contribution (%) to total root area. Root hair area was determined in the different regions, 1-3 (magnified in panel a) and 4-6 (panel b) and expressed as a percentage of the corresponding total root area (root hair area + area of root skeleton bearing the corresponding root hairs); m_1 and m_2: mean values of regions 1-3 and 4-6, respectively. M (right bar of the histogram): root hair contribution to the total root system area.

root/background contrast; polyester: a non-putrescible material) kept moist by contact with a polyurethane foam panel acting as a water reservoir (Figure 1).

An example of a high-resolution image of a wheat root system (Oued Zenati in control conditions) grown in such a rhizobox is provided in Figure 2. The fairly large root system comprised both seminal roots and first order lateral roots at the end of growth period (2 weeks). Magnified regions of the image (Figure 2) indicate that root hairs "covered" large regions of the root system, including old ones, with the exception of the apical regions (Figure 2a-b). By the same, long and dense root hairs were found to cover large regions of maize root systems grown in rhizobox devices (Figure S3).

The dead or alive status of the root hairs in different wheat root regions was determined using fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). Removal of the glass plate from the rhizobox to access the root system damaged the root hairs adhering to the glass. Even more severe damage resulted from the separation of selected root segments from the fabric. We therefore had to carefully cut the tissue around the selected area with a razor blade, without moving the root segment on the surface of the fabric, and directly transfer the collected sample (root segment carefully kept on the excised fabric piece) into the FDA and PI dual-labeling solution. The fluorescence signals were then directly observed using a macroscope (Axio Zoom V16, Zeiss; https://www.zeiss.com) without separating the root segment from the fabric piece. With these precautions taken, a large majority of the root hairs were found to be still alive at this final stage of the observation (Figure S4).

The mesh pattern of the fabric was apparent in high resolution images such as those provided in Figure 2, and interfered with image analyses. Image segmentation was performed using the interactive machine learning software Ilastik (Berg *et al*., 2019; see Material and Methods). The examples of binarized segmented images provided in Figure 3 show that roots and root hairs were efficiently segmented from the background by the procedure we used, allowing to use the software WinRHIZO™ to get operational estimates of root hair area and root skeleton area.

The operational estimates of root hair area obtained in this way, expressed as a percentage of the corresponding total root area (root hair area + area of the root “skeleton” bearing the corresponding root hairs) indicated that root hairs contributed significantly to the total root area. For example, in Figure 2, such estimates of relative root hair area were determined at 3 different locations (different types of roots) in the root system (enlargements 1, 2, and 3 in Figure 2a), at 3 different locations along a single root (locations 4, 5, and 6 in Figure 2b), and for the entire root system. The data (Figure 2c) indicate that the individual values of relative root hair area obtained for regions 1-6 were between approximately 40% and 50%. The value obtained for this root system as a whole was slightly lower (ca. 38%; Figure 2c), in part because of the absence of root hairs in the apical regions (Figure 2b). Altogether, these results indicated

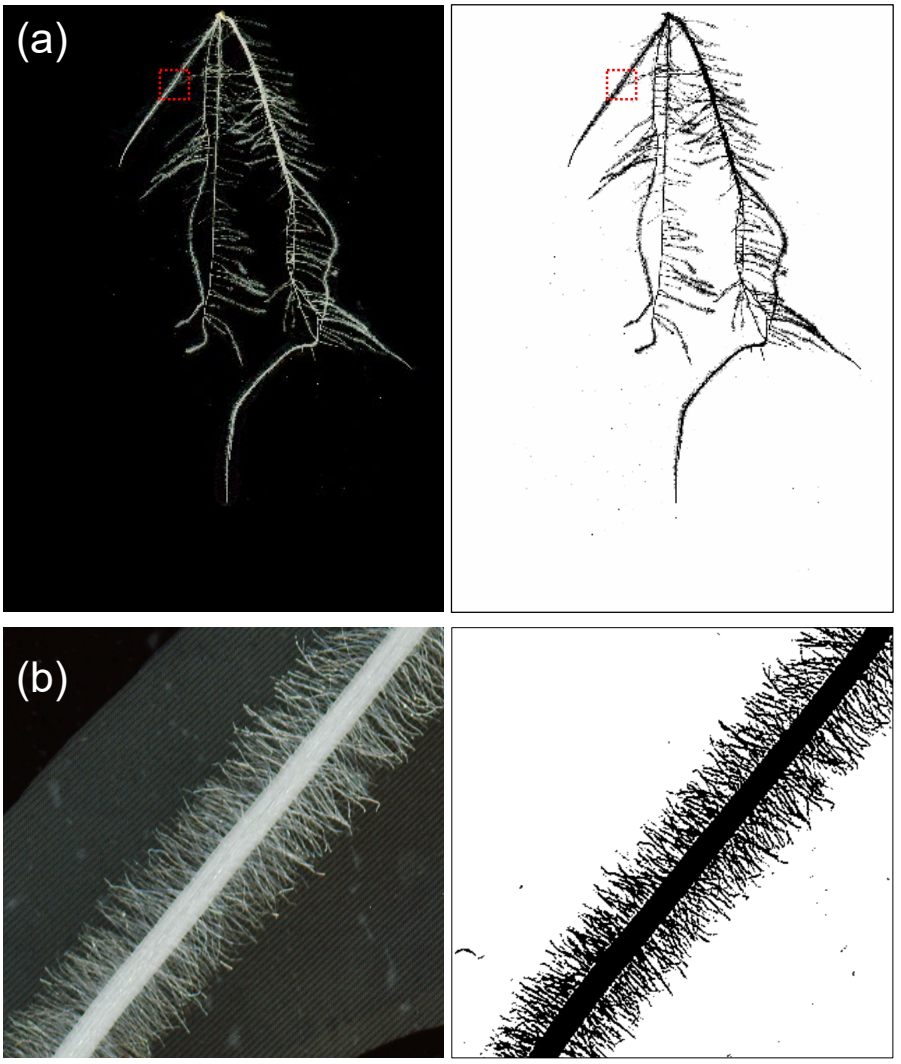


Figure 3. Root and root hair image segmentation using the pixel-based trainable classifier Ilastik workflow.

(a) Image of a whole root system (same one as in Figure 2) and corresponding binarized segmented image (right panel).

(b) Enlargement of the region boxed in (a) and corresponding binarized segmented image. At this scale, the pattern of the black polyester fabric becomes apparent in the initial image (left panel).

Image segmentation was performed using the pixel classification procedure of the interactive machine learning for (bio)image analyses software Ilastik (Berg et al., 2019). The images show that root and root hairs are effectively segmented from the background using this procedure.

that root hairs displaying rather similar features, in terms of mean length and density, were present on almost all regions of the root system, and that the resulting root hair area strongly contributed to total root system area since it is in the same order of magnitude as the root skeleton area in many regions. In regions displaying such long and dense root hairs (for instance regions 1-2 and 4-6 in Figure 2), it seems likely that most nutrient moving in the soil solution towards the roots (due to free diffusion and soil water mass flow resulting from transpiration) will hit the surface of a root hair before that of the root skeleton. Thus, in such regions, the root hairs are likely to provide a larger contribution to nutrient ion uptake than the "root skeleton epidermis".

3.2 | Effects of low phosphate availability on root and root hair development

Seedlings of 2 wheat accessions, Oued Zenati (*Triticum turgidum* spp*. durum*) and Escandia (*Triticum turgidum* spp*. dicoccum*) were grown in rhizoboxes watered with modified Hoagland solution containing either 1 mM or 2 µM phosphate (Pi; provided as KH_2PO_4). Pi shortage affected plant growth (biomass production), leading to a strong increase in the root to shoot biomass ratio in both accessions (Figure 4a-c). Images of root systems are provided in Figures S5 and S6 for Oued Zenati grown under control and low Pi conditions, respectively, and in Figures S7 and S8 for Escandia under control and low Pi conditions. Analysis of these images using WinRHIZO™ revealed that Pi shortage resulted in an increase in entire root system area (Figure 4d), mainly due to a large increase in root hair area (Figure 4e). The root hair contribution to the increase in entire root system area due to Pi shortage was particularly significant in Escandia seedlings (Figure 4f). In this accession, the ratio of root hair area to total root system area was more than two times increased (from 15% to more than 30%) by Pi shortage.

The effect of Pi deficiency on root hair development were analysed in both seminal and lateral roots using the procedures to estimate root hair length ("root hair sheath width") and root hair density described in Figures S2a and S2b, respectively. Pi deficiency significantly increased root hair length (Figure 5a) in seminal and lateral roots by 34% and 44%, respectively, in Oued Zenati, and by about 58% and 70% in Escandia. In contrast, root hair density was poorly affected by Pi deficiency (Figure 5b): the difference was statistically significant only in Escandia lateral roots, which showed an increase in root hair density in response to Pi shortage by approximately 12% in seminal root and 24% in lateral roots (Figure 5b). Altogether, these results also indicated that Escandia is more plastic, in terms of root hair development in response to changes in Pi availability, than Oued Zenati.

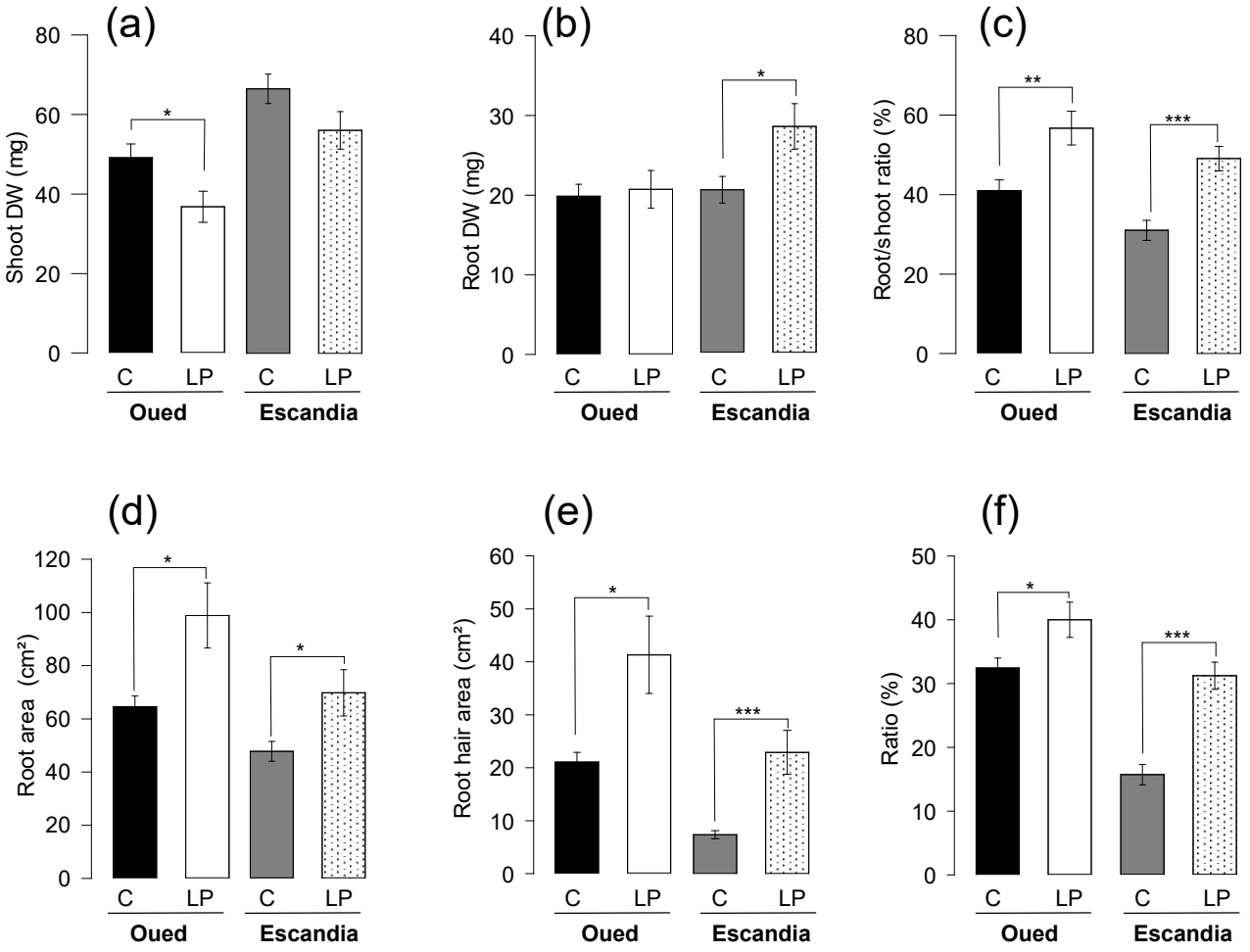


Figure 4. Effects of low phosphate availability on plant growth and root system development in Oued Zenati and Escandia seedlings grown in rhizoboxes.

Wheat seedlings, cv. Oued Zenati or Escandia, were grown for 14 days in rhizoboxes. They were watered with either control complete (C; presence of 1 mM KH2PO4) or low phosphate (LP; 2 µM KH2PO4) solution.

(a-c) Shoot biomass (a), root biomass (b) and root/shoot biomass ratio (c).

(d-f) Root area (d), root hair area (e) and ratio (in %) of root hair area to entire root system (roots + root hairs) area (f). Areas were evaluated using WinRHIZO, with the diameter classification parameters set so that root hairs were assimilated to root elements with a diameter smaller than 0.2 mm. Root elements displaying a diameter larger than 0.2 mm were classified as roots (lateral roots being not distinguished from seminal roots in this analyses).

Means ± SE (n=8); *, ** and *** denote statistically significant differences (Student t test; $p<0.05$, 0.01 or 0.005 respectively). Images of the corresponding root systems: see Figures S5 to S8.

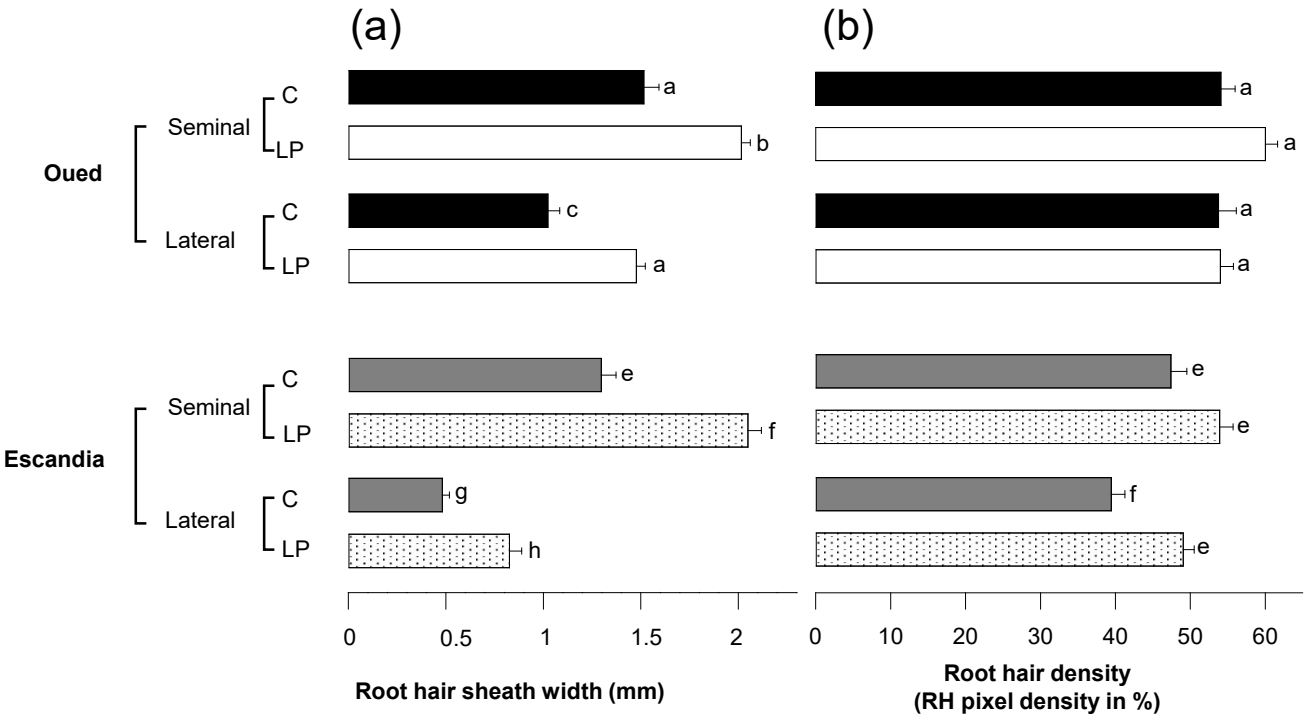


Figure 5. Effects of low phosphate availability on root hair elongation and density in Oued Zenati and Escandia seedlings grown in rhizoboxes.

Oued Zenati (Oued) or Escandia wheat seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with either control complete (C) or low phosphate (LP) solution (containing 1 mM KH_2PO_4 or 2 µM KH_2PO_4, respectively). Original images of the corresponding root systems: see Figures S5 to S8. Seminal and lateral roots were analysed separately.

(a) Root hair sheath width. Eight root system images were analysed per genotype and treatment. Images of the corresponding root systems: see Figures S5 to S8. Procedure used for measuring root hair sheath width: see Figure S2. Three regions displaying fully developed root hairs and considered as representative regions based on similar analyses as those described in Figure 2c were selected and analysed for each root system (24 regions analysed in total).

(b) Root hair density, expressed in % of root hair pixels along a line parallel to the root surface (procedure: see Figures S2). The same 24 regions as in (a) were analysed.

Means ± SE (n=24); different letters denote statistically significant differences (one-way ANOVA test; $p<0.05$ or 0.005).

3.3 | Using the rhizobox-based phenotyping methodology to investigate root architectural traits and plasticity

A classically-measured root architectural trait is the angle of seminal root emergence as it can contribute to preferential exploration of shallow soil layers or deep soil (Christopher *et al*. 2013; Atkinson *et al*., 2015) and thereby to more efficient acquisition of Pi (from superficial soil layers) or water (from deep soil) (Miguel *et al*., 2015; Lynch, 2013). Angle between the two outermost seminal roots of Oued Zenati and Escandia seedlings grown in rhizobox-type devices was measured as described in Figure 6a. This angle was found to be larger in Escandia than in Oued Zenati (Figure 6b). In both genotypes, it was poorly sensitive to the availability of Pi in the watering solution, probably because it is mainly genetically determined during early seedling development (Rufo *et al*., 2020).

The pattern of colonization of the rhizobox space by the root system was studied using the procedure described in Figure 6a. Briefly, the rhizobox space available for root growth (A4 size) was divided vertically into a central zone, located below the germinated grain and 10 cm wide, and two lateral zones, with a total width of approximately 11 cm. These two lateral zones were considered to form a single zone because of their symmetry with respect to the sprouted grain. In Oued Zenati seedlings grown under control conditions (1 mM Pi), the percentage of the surface area of the entire root system (root skeleton + root hairs) present in the central zone was much larger, by almost 3 times, than the corresponding percentage in the lateral zones. Pi deficiency resulted in an increase in the relative surface area in the lateral zones, which, however, remained significantly lower than the corresponding area in the central zone (Figure 6c). In contrast, in Escandia, the percentage of root system area was similar in the lateral and central zones, and the colonization pattern of the rhizoboxes did not appear to be significantly affected by the change in Pi availability (Figure 6c). Altogether these results reveal a greater tendency to explore the rhizobox lateral zones in Escandia than in Oued Zenati, which is consistent with the fact that the angle between the two outermost seminal roots was larger in Escandia (Figure 6b). In both wheat accessions, the root hair contribution to the entire root system area was similar in the central and lateral zones, independently of the increase in root hair development induced by Pi shortage (Figure 6d).

In another type of experiment, facilitated by the rhizobox-type device, plastic jumpers were placed in rhizoboxes to obstruct plagiotropic growth of the outer seminal roots and impose vertical growth (Figure S9). An unexpected behavior of seminal roots constrained in this way was observed in Escandia: as soon as the vertical constraint ceased, when the root tip reached the extremity of the plastic jumper, a strong reorientation of the growth axis occurred, resulting in horizontal growth. We have no hypothesis on the mechanisms underlying this behavior, observed only in Escandia, but they would deserve to be studied. In the soil, due to the

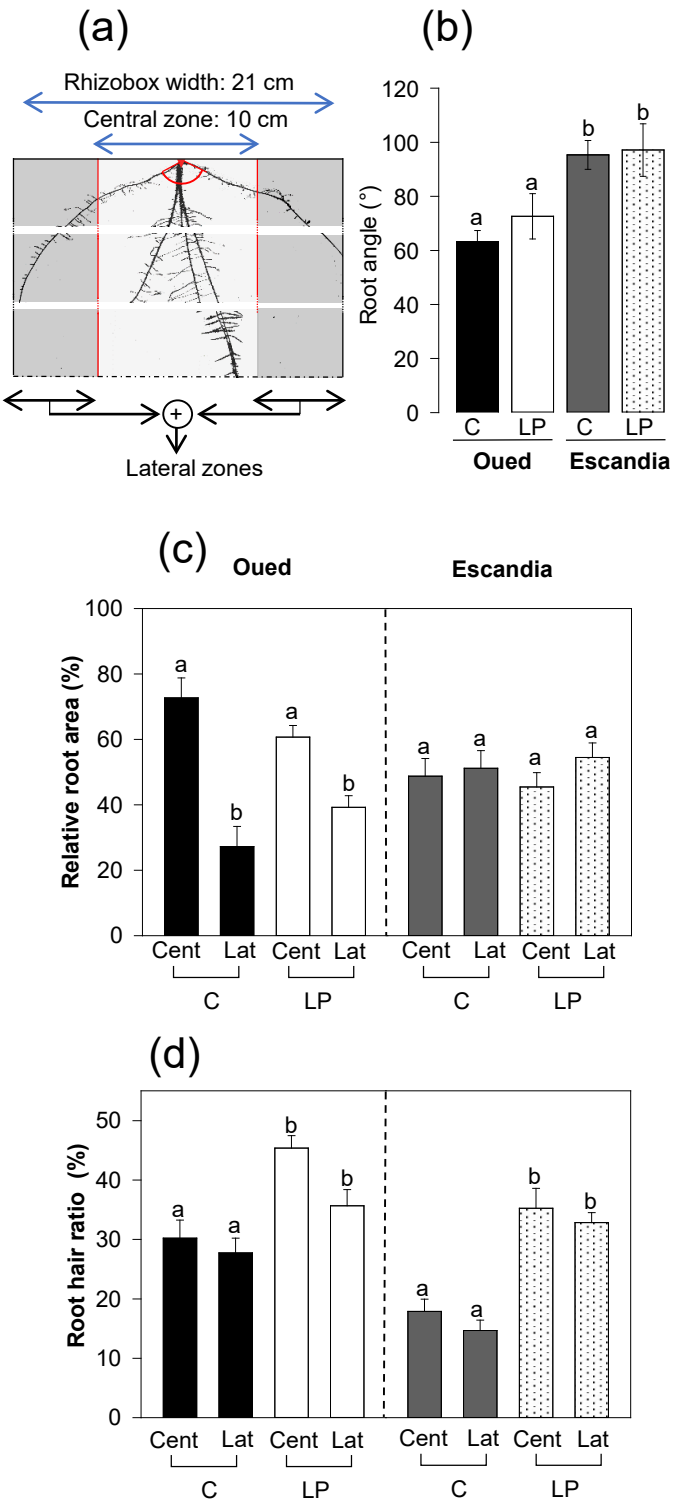


Figure 6. Differences in rhizobox occupancy between Oued Zenati and Escandia seedlings. Oued Zenati and Escandia wheat seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with control complete nutrient solution (C) containing 1 mM KH_2PO_4 or with low phosphate solution (LP) containing 2 µM KH_2PO_4.

(a) Measurement of the angle of emergence between the outermost seminal roots and procedure used to analyse rhizobox occupancy by the root system. The angle of emergence (see the red arc of circle) is measured at about 1 cm from the germinated grain. The rhizobox area (A4-size) is vertically divided into a 10 cm wide "central" zone (5 cm wide on either side of the vertical line through the germinated grain) and 2 lateral zones (considered as a single zone of 11 cm width in total). The areas (root hair area, area of the corresponding root skeleton and total area, i.e. root hair area + root skeleton area) of the parts of the root system present in the central and lateral zones are determined using WinRHIZO™.

(b) Angle of emergence (expressed in degrees) between the outermost seminal roots (n=16 for Escandia and Oued Zenati in control condition and 8 in LP condition).

(c) Root system areas (root hair + root skeleton) present in the central and lateral zones of the rhizoboxes and expressed in % of the total root system area.

(d) Root hair areas measured in the central and lateral zones of the rhizoboxes and expressed in %of the of the total root system area. Statistical analyses: Means ± SE (n=10 and 8 for Oued Zenati and Escandia, respectively). Different letters denote statistically significant differences (one-way ANOVA test; $p<0.05$ or 0.005).

presence of stones or compacted areas, such a behavior is likely to contribute to the final architecture of the root system and perhaps to the exploration of the upper soil layers.

4 | DISCUSSION

4.1 | A rhizobox-type platform developed for integrative phenotyping of root and root hair traits

There has been increasing interest in root phenotyping since the 2000's (for reviews: Trachsel *et al*., 2011; Kuijken *et al*., 2015; Watt *et al*., 2020). The idea is now widely shared that knowledge gained from such analyses will contribute to more sustainable agriculture practices, for instance by favouring the breeding of new crop genotypes adapted to low fertilization and irrigation inputs. A large range of phenotyping methodologies has been developed, from the lab to the field, each one with its own strengths and limitations (Kuijken *et al*., 2015; Paez-Garcia *et al*., 2015; Atkinson *et al*., 2019; Tracy *et al*., 2020; Watt *et al*., 2020; Danilevicz *et al*., 2021; Maqbool *et al*., 2022). A major limitation common to most of them is that they were not developed to pay attention to root hairs and to allow integrative analyses of root hair and root architectural trait responses to environmental conditions. It has however been widely reported that root hairs play major roles in nutrient ion acquisition (Gahoonia and Nielsen, 1998; Jungk., 2001; Klinsawang *et al*., 2018; Kimura *et al*., 2019; Rongsawat *et al*., 2021; Bienert *et al*., 2021; Saengwilai *et al*., 2021) and that root hair traits such as length and density are responsive to nutrient availability (Foehse and Jungk, 1983; Mackay and Barber, 1985; Robinson and Rorison, 1987; Ma *et al*., 2001; Savage *et al*., 2013; Datta *et al*., 2015; Bhosale *et al*., 2018). Root hairs have indeed been proposed as major contributors to root system plasticity (Kumar *et al*., 2020).

Technical difficulties in accessing root hairs in soil or artificial substrates in a non-destructive way, and the size and fragility of these cells, contribute to explain the limited attention given to root hair phenotyping on whole root systems. For instance, washing root systems grown in soil, or removing roots from agar plates or even from hydroponics solution to transfer them onto the imaging device, can result in damage to root hairs such as breakage or bending along the root axis impeding further analyses. Methodologies for obtaining 3-D images of root systems in situ in soil (MRI, X-ray CT) can provide valuable information on root system architecture but, to date, the resolution and computing time do not appear to be compatible with phenotyping of root hair traits.

The strength of the here-described methodology is to allow integrative phenotyping of root hair development on intact roots in relatively well-developed root systems (30 cm long). To our

knowledge, the images obtained with this method, displaying well resolved root hairs and root hair zones, allowing to quantify the length and density of root hairs and their relative contribution to the total area of the root system, have no equivalent in the literature.

In our device, the roots develop between a glass plate and a synthetic rot-proof fabric kept moistened by a solid polyurethane board placed behind the fabric. A fixed distance between the fabric and the glass plate (2 mm in our experimental device) ensures air circulation, preventing the root system to suffer from anoxic stress and accumulation of volatile organic compounds. Digital images of the root system are easily obtained using a flatbed scanner. The roots and root hairs can be segmented from the background using an interactive learning toolkit (Berg *et al*., 2019). Several root system and root hair traits can be collected from the segmented images using classical image analysis softwares like WinRHIZO™, imageJ or SmartRoot (Lobet *et al*., 2011) for instance.

This methodology is particularly suited to analyse the effects of nutrient shortage on root and root hair development in an affordable way. Customization could also allow to investigate the consequences of root inoculation with micro-organisms (e.g., with Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) on root and root hair development, or to carry out split-root experiments. It could also be customized to phenotype larger root systems by using A3-sized rhizoboxes and flatbed scanners. As a non-destructive procedure, it could also be customized to record time-lapse images of root development.

Like all rhizobox-derived methods, as well as methods relying on root growth on agar plates or on germination paper using the so-called “pouch and wick “or “cigar-roll” systems (for review: Atkinson *et al*., 2019), the phenotyping procedure described here inherently suffers from the fact that root system development cannot occur in 3-D as in soil but is constrained in 2-D space. It should be noted, however, that recent analyses have revealed that this limitation has a very limited impact on plant biomass production and the ratio of root to shoot biomass when comparing plants grown in soil-filled rhizoboxes to plants grown in pots containing the same volume of soil as the rhizoboxes (Mašková and Klimeš, 2020). A more significant issue is the physiological significance of root growth under experimental conditions resulting in high water availability and/or high air humidity as in our rhizobox device and in methods based on the culture of plants on agar plates or on germination paper soaked with nutrient solution. It can be assumed that such conditions mimic pores of humid soils. Root system development can exploit soil cracks and pores (including biopores) (White and Kirkegaard, 2010; Islam *et al*., 2021; Zhou *et al*., 2021). Locally or temporally, soil pores can be humid and/or contain a rather humid atmosphere. It has been reported that about 30-60% of roots can be present in soil pores or cracks in surface soil layers (< 60 cm), and 85-100% in subsoil (> 60 cm) (White and Kirkegaard, 2010; Zhou *et al*., 2021). Roots present in soil pores contact the surrounding soil via long and dense root hairs (White and Kirkegaard, 2010). The images of root hair

development obtained using our phenotyping methodology appear to be quite consistent with images of regions of wheat roots present in soil pores (White and Kirkegaard, 2010), as well as with images of regions of wheat roots grown in soil in pots (Rongsawat *et al*., 2021) or in Turface clay (Goron *et al*.,2015). Furthermore, all these images provide evidence that root hair zones are not restricted to young regions close to root apices (see also Figure 6 in Schneider and Lynch (2020) for maize roots). Our root images reveal wheat root segments (more than 13-cm long) and maize root segments (more than 25-cm long; Figure S9) “entirely covered” with long root hairs. Such images provide an unprecedented description of the ability of well-watered plants to develop functional root hairs over large portions of the whole root system.

Root hair contribution to nutrient ion uptake, and thereby to plant growth, depends on total length of the segments of the root system bearing root hairs and on root hair density and length (Brown *et al*., 2013; Mohammed *et al*., 2021; De Pessemier *et al*., 2022). These 3 traits are implicitly integrated in the present phenotyping procedure, using WinRHIZO^{TM} to operationally estimate the so-called "total" root hair area (Figure 2) and its responses to nutrient ion availability.

Furthermore, because our methodology was developed to enable integrative phenotyping of root hair development in intact root systems, it allows to assess root hair length and density in seminal and lateral roots, for example, and the root hair contribution to total root system surface area, as well as to describe root system architectural features and the responses of all these traits to nutrient ion availability. Such an opportunity for integrative analyses is valuable because it directly takes into account the fact that synergism among root traits improves nutrient ion acquisition from poor soils (Miguel *et al*., 2015; Wang *et al*., 2021; Ajmera *et al*., 2022).

4.2 | Root system responses to Pi shortage in Oued Zenati and Escandia

Phosphate starvation has been widely reported to result in increased root to shoot biomass ratios (Hermans *et al*., 2006). This type of response to Pi shortage was observed in both Oued Zenati and Escandia (Figure 4c), and it was accompanied by a significant increase in total root system surface area (root + root hair areas) (Figure 4d). Such plastic development of the root system is classically thought to increase the volume of soil exploited by the roots and thus the amounts of accessible "free" Pi ions, which are poorly mobile and most often present at very low concentrations in the soil solution (Bieleski, 1973; Niu *et al*., 2013; Brown *et al*., 2013; Lynch, 2022).

From the data displayed in Figures 4d and e, it can be estimated that, at the end of the Pi deprivation treatment, the increase in root hair area and the increase in area of the so-called "root skeleton" (root system "without" root hairs) accounted for 59% and 41%, respectively, of

the total increase in root area in Oued Zenati, and for 70% and 30% in Escandia. Thus, in both genotypes, the contribution of root hairs to the increase in total root surface area was larger than that of the "root skeleton". Reported to the total root area, root hair area was close to 33% in the control condition in Oued Zenati, and increased to 41% upon Pi starvation (Figure 4f). In Escandia, the corresponding values were 15% and 32%, thus a 2-fold increase upon Pi starvation, which indicated that this genotype was more plastic than Oued Zenati in terms of root hair area production in response to Pi shortage.

Root hair density, which was found to be rather similar in seminal and lateral roots, was poorly dependent on the level of Pi supply in both wheat genotypes, except in Escandia lateral roots where it was slightly increased (Figure 5b). Root hair length was found to be smaller in lateral than in seminal roots but to be strongly increased upon Pi starvation in both types of roots and in both genotypes. The physiological significance of the latter response to Pi deprivation is enlightened by mathematical modelling analyses indicating that, because of competition between contiguous root hairs, increasing root hair length results in a greater improvement in phosphate acquisition capacity than increasing root hair density when the concentration and mobility of Pi ions in the soil are low (Ma *et al*., 2001; Brown *et al*., 2013), as it is most often the case in natural conditions (Bieleski, 1973). It is worth noting that, in both seminal and lateral roots, the relative increase in root hair length due to Pi starvation appears to be larger in Escandia than in Oued Zenati (Figure 5a), which indicates that the plasticity of this trait is larger in Escandia than in Oued Zenati.

4.3 | Scientific and agronomical perspectives of root phenotyping approaches in wheat

Root trait phenotyping can allow to identify appropriate root ideotypes and genetic targets for breeding the crop cultivars of the future (White, 2019; Amtmann *et al*., 2022). Depending on the availability of nutrient ions in the soil, different root hair and root architecture traits can synergistically improve the mineral nutrition and thereby the individual fitness and growth of the plant. For instance, this has been evidenced for root hair length and large (shallow) angles between seminal roots, which result in more intense colonization of upper soil layers where nutrient ions may be more concentrated (Miguel *et al*., 2015), as it is often the case of phosphate (Bieleski, 1973). With respect to these traits, the root system of Escandia appears to be both more plastic and more adapted to low Pi availability than that of Oued Zenati.

Also, the greater tendency of Escandia seminal roots to colonize the lateral zones of the rhizobox-type device and to strongly re-orientate their growth axis towards a more horizontal direction when a physical constraint imposing vertical growth ceases (Figure S9) is likely to contribute, in field conditions, to more intense colonization of upper soil layers, and thus to

favour Pi acquisition or to compete more efficiently with weeds using allelopathic compounds like benzoxazinoids (Aslam *et al*., 2017; Reiss *et al*., 2018).

There is a large diversity in root system traits among *T. turgidum* subspecies (Boudiar *et al*., 2020; González *et al*., 2021). Consequently, the root characteristics displayed by Escandia cannot be considered as evolutionary traits specifically present in *T. t. dicoccum* spp compared to *T. t. durum* spp (Oued Zenati). It would be very useful to thoroughly investigate the consequences of wheat domestication/selection on the plasticity of root and root hair development under nutrient shortage. Increased knowledge in this area could be valuable for the selection of new cultivars as well as for the design of varietal mixtures for co-cultivation (Wuest *et al*., 2021) in order to reduce the level of competition between adjacent root systems of high-density cultivated plants, and thus optimize the exploitation of the different soil layers. With respect to such goals, another area of research to which root phenotyping approaches are likely to contribute concerns potential conflicts between the fitness of individual plants and the performance of the whole plant population (Gersani *et al*., 2001; Weiner, 2019). For example, root traits that might be expected to increase individual plant fitness under nutrient ion shortages are also likely to result in stronger competition between roots of adjacent plants, and thus to negatively impact the performance of the plant population as a whole (Weiner *et al*., 2017; Zhu *et al*., 2019a). Evolution in nature is driven by individual fitness, whereas the goal in agriculture is to optimize population performance (Denison *et al*., 2003; Weiner, 2003). This issue is receiving increasing attention, especially for high-density crops such as wheat (Anten and Vermeulen, 2016; Weiner *et al*., 2017; Zhu *et al*., 2022). For instance, newer wheat cultivars have been reported to produce higher yields than older ones only when grown at higher seeding densities, providing evidence that yield increases can result directly from changes in the competitive behaviour of the root system (Zhu *et al*., 2019b).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.-B.P., H.S., A.-A.V. and I.M. conceived the original research plans; I.M. and T.R. developed the Rhizobox-type device. J.-B.P., H.S. and A.-A.V. supervised the experiments; I.M. performed the experiments and analysed the images; I.M., J.-B.P. and H.S. analyzed the data; I.M. and H.S. wrote the first draft of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved the submitted version.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

Supplementary data

(a) (b)

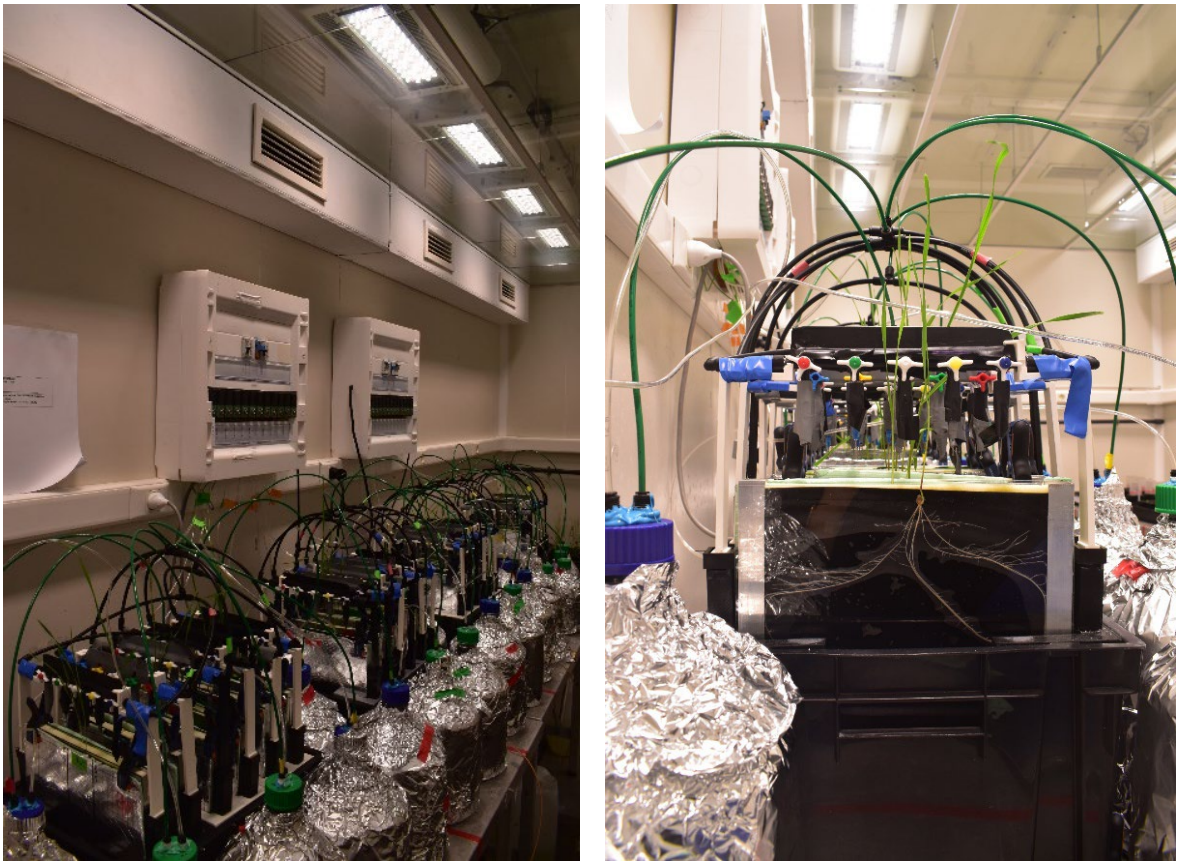


Figure S1. Rhizoboxes and irrigation system in a growth chamber.

(a) Each rhizobox-type device is associated with a bottle of nutrient solution (protected with an aluminum foil). Periodic delivery of compressed air into the bottle is controlled by an electrical clock and 3-way valves, ensuring automatic delivery of the nutrient solution. Five taps fitted with needles allow the solution to drop onto the polyurethane foam that acts as a water reservoir in the rhizobox (see Figure 1).

(b) Front view of the rhizobox device with the polystyrene protection board removed, showing the aerial part and root system of a wheat seedling.

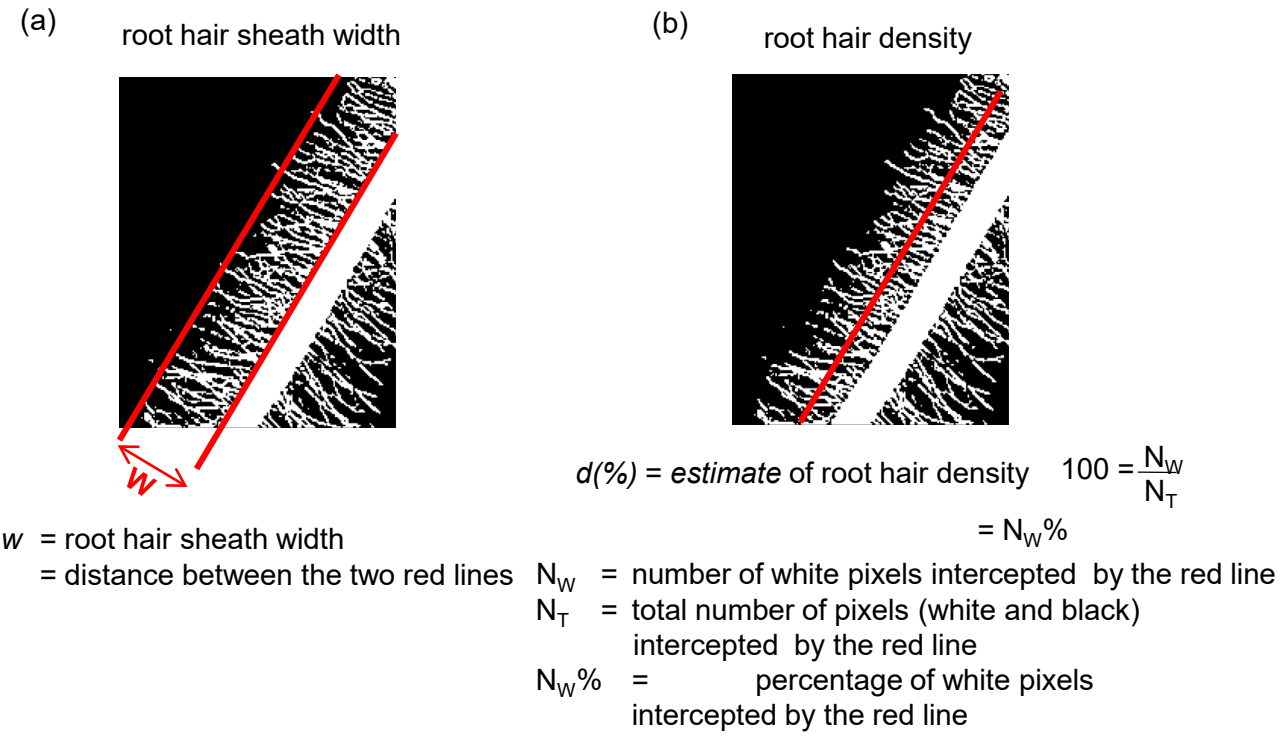


Figure S2. Operational estimation of root hair extension and density.

ImageJ was used to calculate operational estimates of root hair extension and density in order to compare wheat genotypes and their responses to phosphate shortage.

(a) Root hair sheath width. Two lines (shown in red) were drawn parallel to each other and to the surface of the analyzed root segment, the first one just along the surface of the root segment and the second one crossing the tips of the root hairs appearing as the longest ones in the image (2D scan of a 3D object). The distance between the two lines, named w for root hair sheath width, is taken as an operational estimate of the average root hair extension in the corresponding root segment.

(b) Root hair density. The number of root hairs crossed by the line can be considered to be proportional to the number of white pixels crossed by the line since all root hairs appear to have the same diameter. We directly used the percentage of white pixels intercepted by the line, NW%, as an operational estimate, named d, of root hair density. NW% can be obtained directly from the "grey value average", mgrey obtained using ImageJ for the pixels intercepted by the line. In the 8-bit coded image (white and black pixels " color code: 255 and 0, respectively), NW% = 100 mgrey/255).

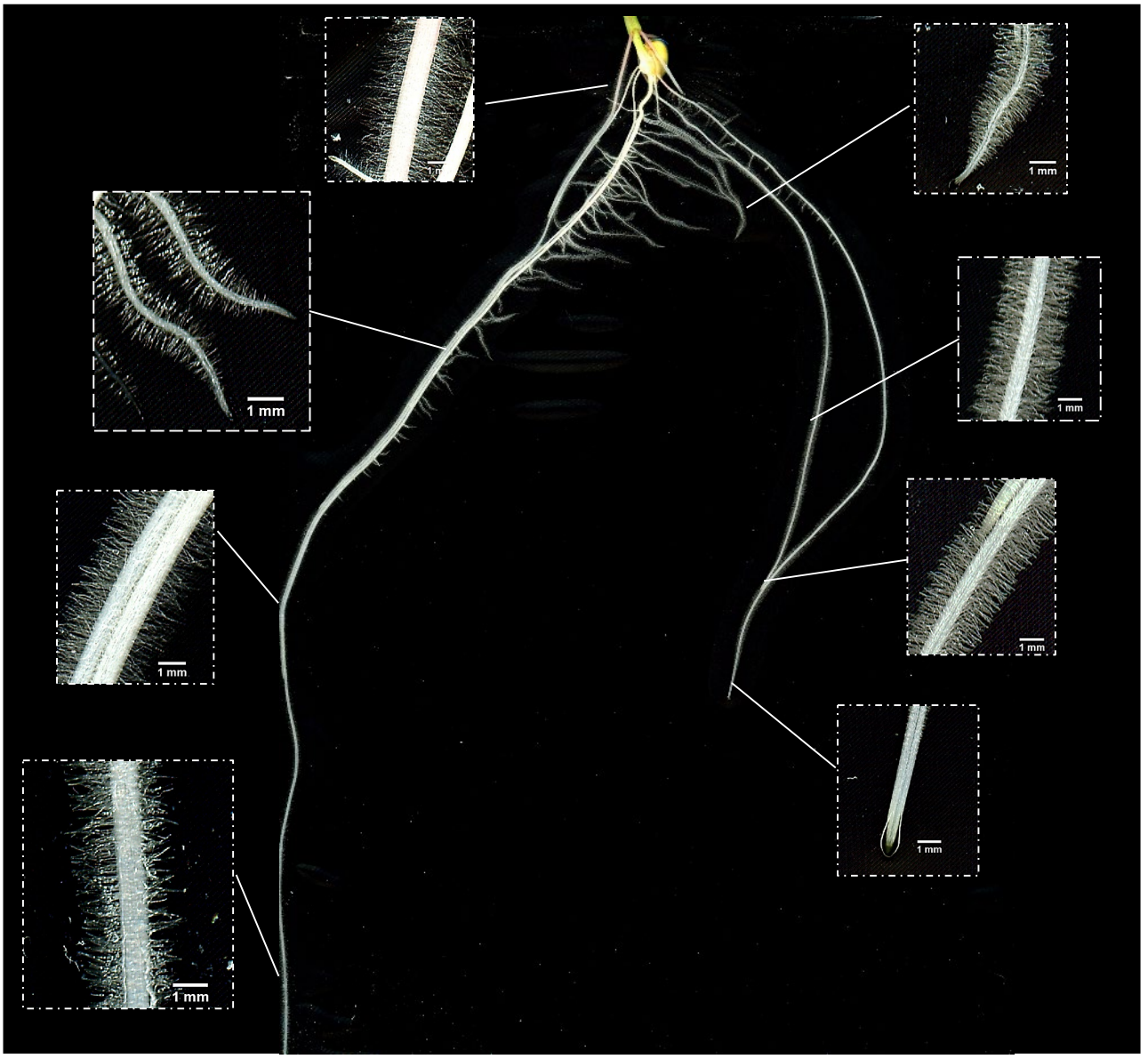


Figure S3. Root system of a maize seedling grown in a rhizobox-type device.

The rhizobox was watered with control complete nutrient solution. The root system was scanned when the seedling was 14-day old. Whole root system (white bar: 1 cm) and enlargements of 8 different regions (white bars: 1 mm).

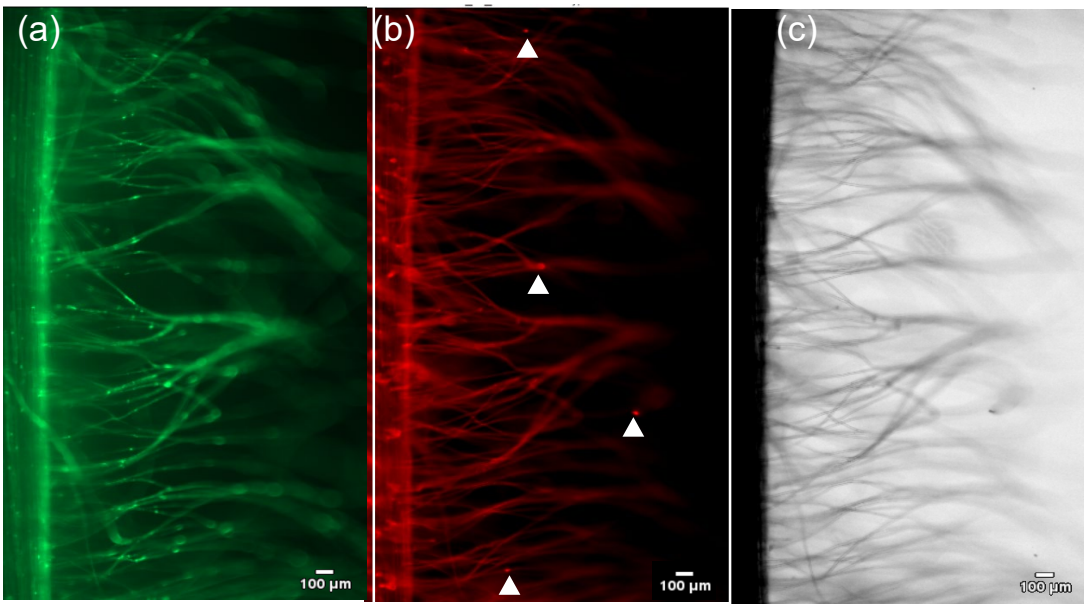


Figure S4. Vital staining of root hair cells indicating that most cells were alive.

(a-b) Vital tests using fluorescein diacetate (FDA; panel a) and propidium iodide (PI; panel b) as described by Jones et al. (2016).

(c) Corresponding bright field image.

Pieces of fabric on which root regions harboring root hairs were present were carefully excised (without moving the root segment at the surface of the fabric to prevent root hair damages; see main text) and directly transferred into dual-labeling solution containing both FDA (0.05%) and PI (0.1%) (see main text). Fluorescence signals were then observed using a macroscope (Zeiss Axio Zoom V16), the root segment being still present on the fabric piece. FDA labels intact alive cells with green-fluorescence signals. PI labels cell walls and nuclei of dead cells and cells with damaged membranes allowing free diffusion of PI into the cell with red fluorescence signals. Thus, negative staining of cells by FDA and positive staining of nuclei by PI are indicative of dead/damaged cells. White triangles point to the nucleus of such cells. Representative images of root segments located at least 10 cm from the corresponding root tips. Bar = 100 µm.

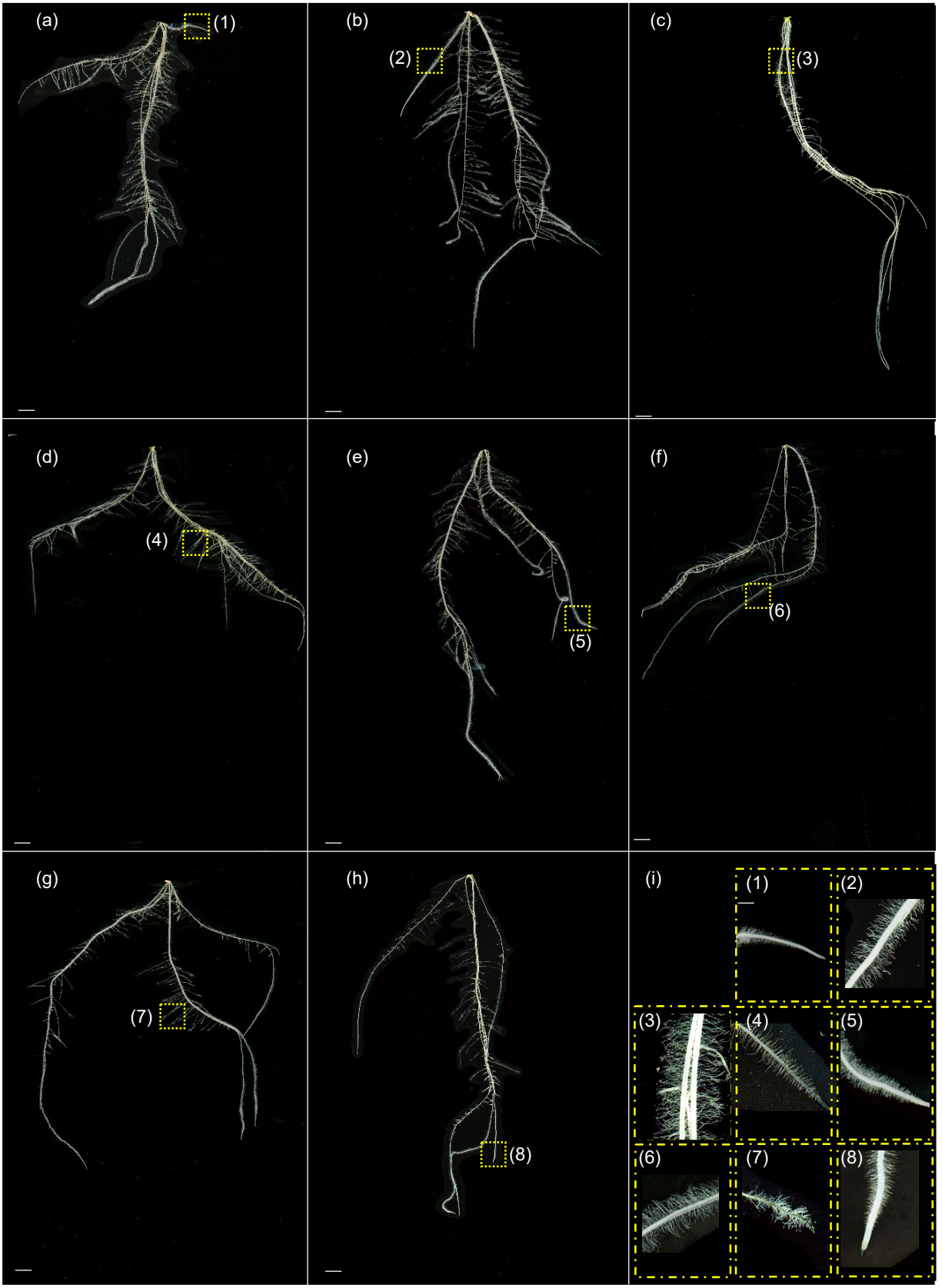


Figure S5. Images of root systems of Oued Zenati wheat seedlings grown in absence of nutrient deficiency (control conditions).

(a-h) Root systems of seedlings grown for 14 days in rhizoboxes watered with control complete nutrient solution containing 1 mM KH_2PO_4.

(i) Enlargements of different regions from these root systems.

The root systems shown in this Figure and in Figure S6 are from seedlings grown and analysed in parallel.

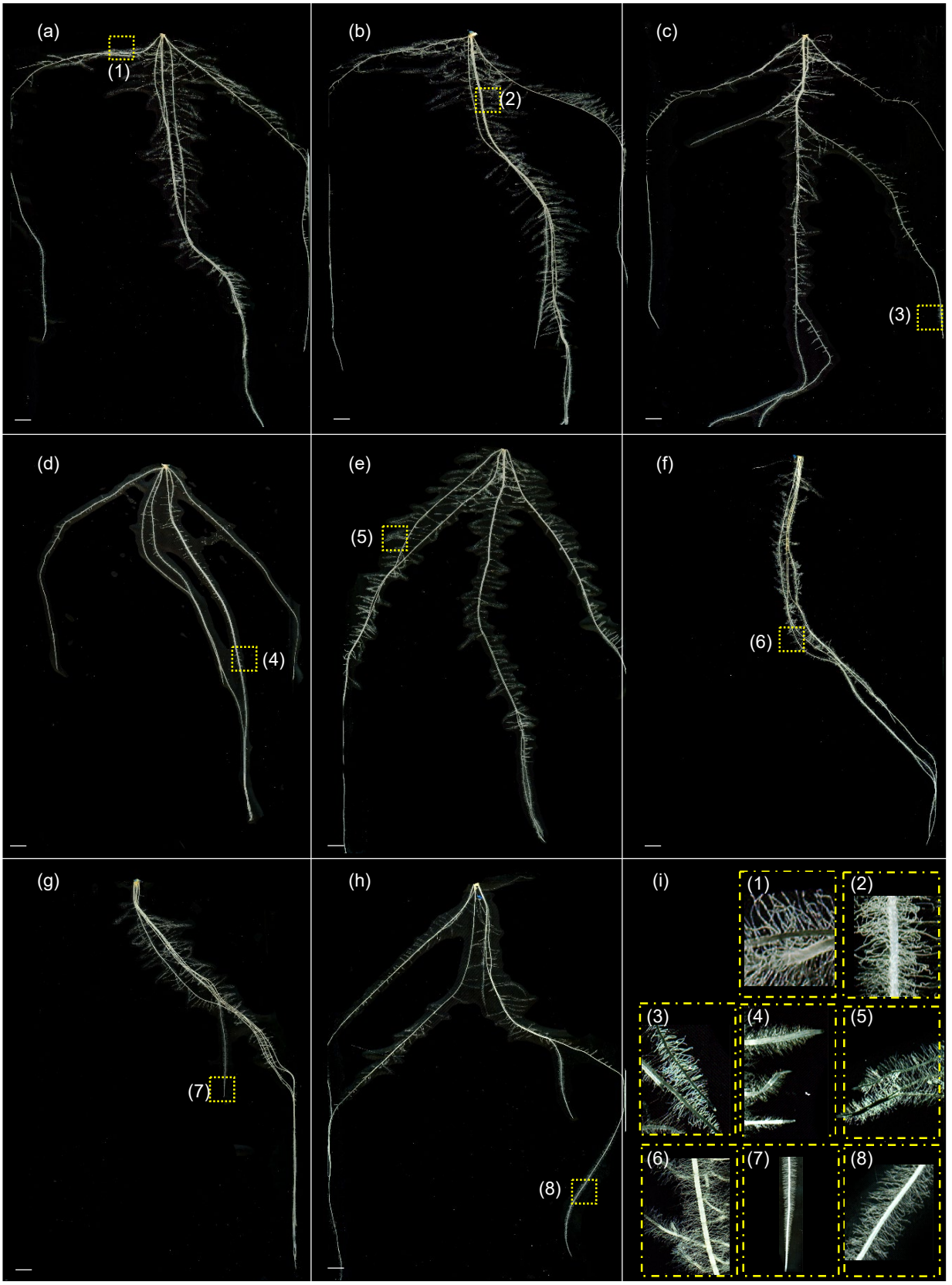


Figure S6. Images of root systems of Oued Zenati wheat seedlings grown under low phosphate conditions.

(a-h) Root systems of seedlings grown for 14 days in rhizoboxes watered with low phosphate (LP) solution containing 2 µM KH_2PO_4.

(i) Enlargements of different regions from these root systems.The root systems shown in Figure S5 (watering with control complete nutrient solution) and in Figure S6 (LP solution) are from Oued Zenati seedlings grown and analysed in parallel

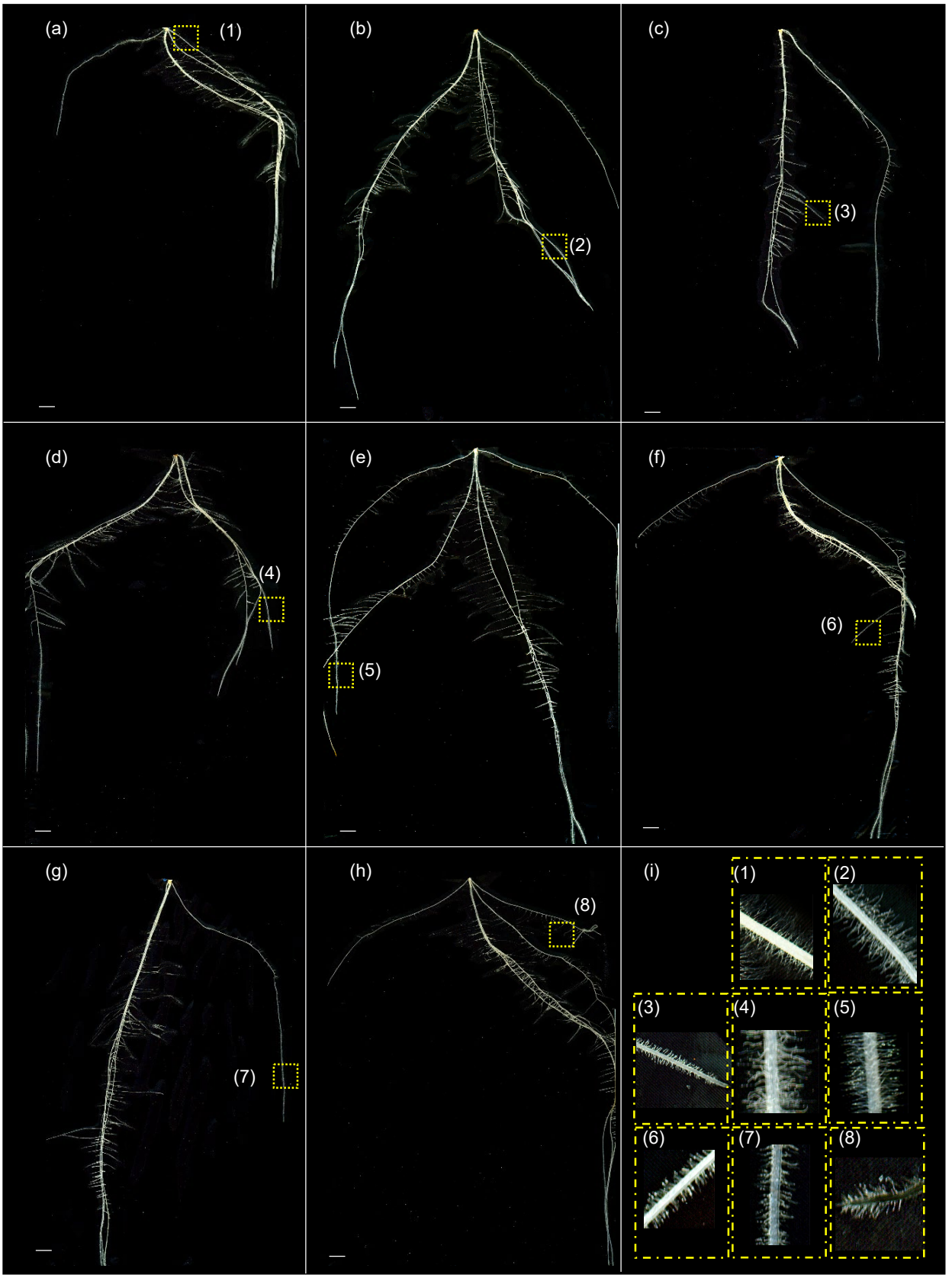


Figure S7. Images of root systems of Escandia wheat seedlings grown in absence of nutrient deficiency (control conditions).

(a-h) Root systems of seedlings grown for 14 days in rhizoboxes watered with control complete nutrient solution containing 1 mM KH_2PO_4.

(i) Enlargements of different regions from these root systems.

The root systems shown in this Figure and in Figure S8 are from seedlings grown and analysed in parallel.

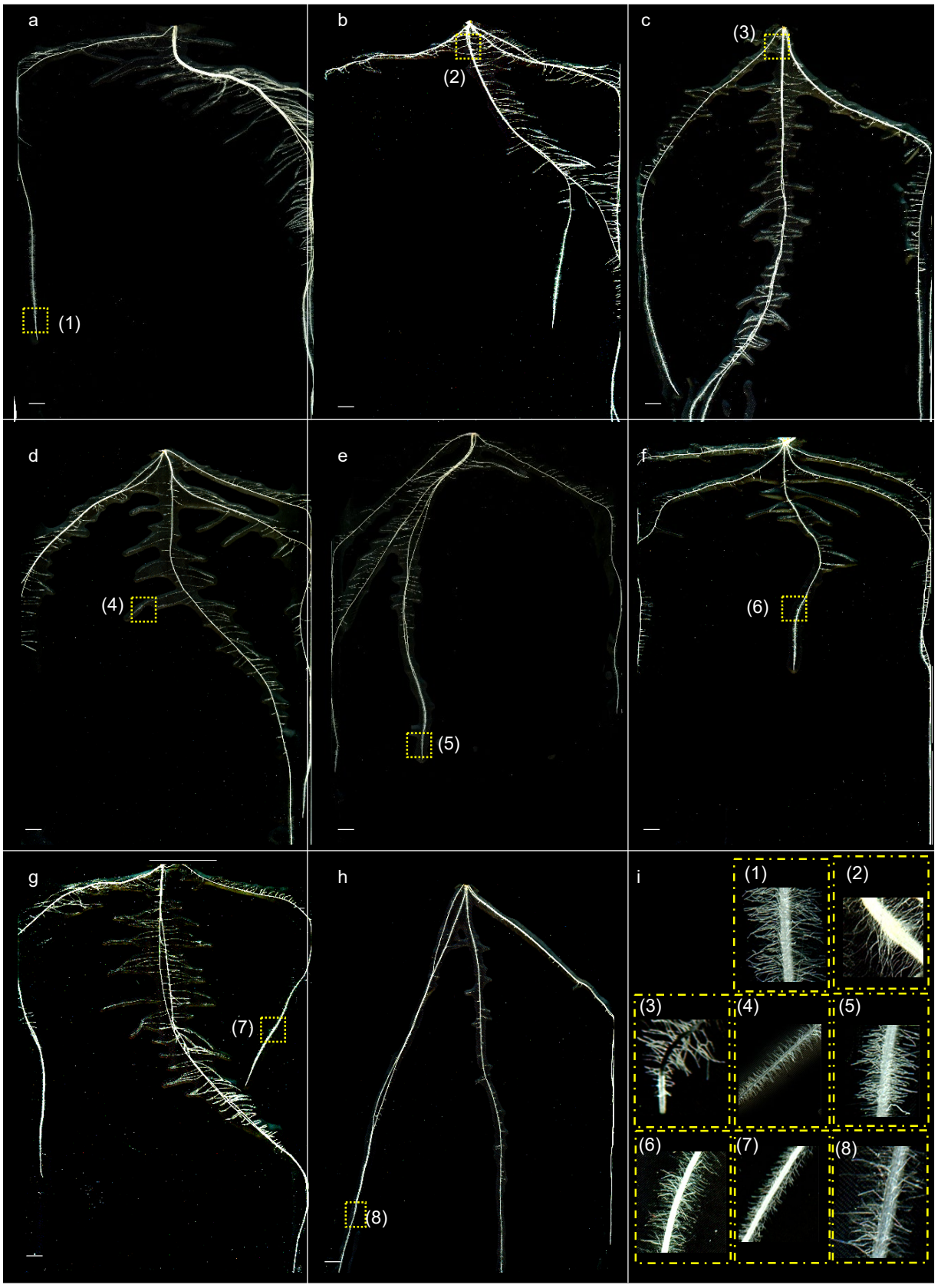


Figure S8. Images of root systems of Escandia wheat seedlings grown under low phosphate conditions.

(a-h) Root systems of seedlings grown for 14 days in rhizoboxes watered with low phosphate (LP) solution containing 2 µM KH_2PO_4.

(i) Enlargements of different regions from these root systems.

The root systems shown in Figure S7 (watering with control complete nutrient solution) and Figure S8 (Escandia, LP solution) are from seedlings grown and analysed in parallel.



Figure S9. Response to a physical constraint imposing vertical growth to seminal roots of Escandia wheat seedlings: reorientation towards horizontal growth upon cessation of the constraint.

Plastic jumpers of different lengths, 2 mm wide and 2 mm thick, were arranged in rhizoboxes between the fabric and the glass plates to impose vertical growth to outermost seminal roots. Germinated Oued Zenati and Escandia grains were placed in the rhizoboxes and the seedlings were grown for 2 weeks, watered with control complete nutrient solution. (a) and (b): Representative images of root systems of Oued (c) and Escandia (d) seedlings grown in such conditions.

Chapitre 5

Plasticité des réponses des semis de blé à la carence en K^+ mise en évidence par le phénotypage intégré des racines et des poils racinaires sur l'ensemble du système racinaire

Title: Plasticity of wheat seedling responses to K^+ deficiency highlighted by integrated phenotyping of roots and root hairs over the entire root system

Ikram Madani, Jean-Benoît Peltier, Martin Boeglin, Hervé Sentenac, Anne-Aliénor Véry*

Institut des Plantes de Montpellier, UMR Université Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

*Correspondence: anne-alienor.very@supagro.fr

Author details

Institut des Plantes de Montpellier, UMR 5004 CNRS- 386 INRAE- Université Montpellier-Institut Agro, Campus SupAgro-INRAE bat 7, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France.

Authors' contributions

IM, J-BP, HS and A-AV conceived the original research plan; IM, J-BP and HS developed the Rhizobox-type device. IM performed the experiments, together with MB, and analyzed the images; IM and HS analyzed the data; J-BP, HS and A-AV supervised the experiments; IM, HS and A-AV wrote the first draft of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved the submitted version.

Availability of data and materials

The data and material that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Statements and Declarations

Ethics approval and consent to participate

The presented work has been performed in line with principles of the Committee on Publication Ethics (COPE).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Abstract

The availability in the soil of potassium (K^+), a poorly mobile macronutrient required in large quantities for plant growth, is generally suboptimal for crop production in the absence of fertilization, making improvement of the ability of crops to adapt to K^+ deficiency stress a major issue. Increasing the uptake capacity of the root system is among the main strategies to achieve this goal. Here, we report an integrative approach to examine the effect of K^+ deficiency on the development of the entire root system, including root hairs, which are known to provide a significant contribution to the uptake of poorly mobile nutrients such as K^+, in two genetically distant wheat varieties. A rhizobox-type methodology was used to obtain well-resolved images, allowing using classical image analysis procedures to describe root and root hair traits using global parameters determined over the whole root system. The two wheat varieties responded differently to the K^+ shortage: Escandia, a wheat ancestor, targeted shoot for biomass reduction in condition of K^+ shortage and substantially increased the surface area of its root system, specifically by increasing the total root hair area. Oued Zenati, a landrace, conversely appeared unresponsive to the K^+ shortage but was shown to constitutively express, independently of the external K^+ availability, favorable traits to cope with reduced K^+ availability, among which a high total root hair area. Thus, valuable information on root system adaptation to K^+ deficiency was provided by global analyses including root hairs, which should also be relevant for other nutrient stresses.

Keywords:

K^+ deficiency, root hair, root system phenotyping, wheat, rhizobox, root plasticity

1. Introduction

Together with leaf photosynthetic activity, the root system contributes to plant autotrophy by taking up nutrients and water from the soil. In most ecosystems, plant growth is notably limited by the low bio-availability in the soil of N, P and K. In conventional agriculture, intensive soil fertilization strongly increases crop yield, but this is achieved at high environmental costs, which are now widely considered as unsustainable. The evolution towards alternative models aiming at maintaining high yields while respecting the environment implies not only profound changes in mentality but also the implementation of science-based solutions. With the objective of contributing to a vital new green revolution, strong efforts have thus been aimed at characterizing the mechanisms underlying plant adaptation to low nutrient availability. They have actually provided evidence, in particular, that the genetic variation in root traits can be

used to reduce fertilization inputs and increase crop yield in poor soil (Lynch, 2011; White *et al*., 2013).

The status, in terms of concentration and bioavailability, differ between the main sources of N, P and K in the soil (Marschner and Rengel, 2012). In brief, phosphate ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) is present at very low concentration in the soil solution, in the µM range, while the concentration of K^+ is most often in the 0.1-1 mM range and that of NO_3^-, which is generally the dominant chemical form of N in agricultural systems, is higher, in the 1-5 mM range. These ions also differ in their mobility in the soil: NO_3^- weakly interacts with soil particles and is mobile, while Pi and K^+ (to a lesser extent) are poorly mobile due to strong interactions with soil minerals and organic matter (Jungk and Claassen, 1997; Marschner and Rengel, 2012). The mobility of NH_4^+, which can be present at high concentration (mM range) in acidic and anaerobic soils, is lower than that of NO_3^-, rather similar to that of K^+. The acquisition of a particular nutrient by the root system requires its transfer to the root surface, which occurs by mass flow (the movement of soil solution to the surface of the root system driven by the transpiratory water loss of the plant), particularly for the most mobile and abundant nutrients such as NO_3^- (and K^+ but most often to a much lesser extent), or by diffusion along the concentration gradient within the rhizosphere created by uptake by cells in the root periphery that depletes soil solution at the root surface (White and Greenwood, 2013). The contribution of diffusion is more important for nutrients poorly mobile and present at low concentrations in the soil solution like Pi and K^+. Thus, it can be predicted because of this disparity in nutrient availability status/nature, that the ability to acquire a particular nutrient can be enhanced by expression of a specific set of root traits (White *et al*., 2013; Kellermeier *et al*., 2014).

Root traits influencing the acquisition of nutrient ions are very diverse and differ between plant species. For example, efficient soil foraging, in a broad sense, is dependent on the root mass fraction (the proportion of total plant mass allocated to roots) as well as the root surface area, including root hairs. Efficient soil mining relies, for example, on expression of high affinity membrane transport systems in root periphery cells, as well as modification of rhizosphere physico-chemical conditions, via the secretion of organic acids, chelating molecules and enzymes, resulting in increased bioavailability of nutrient ions, or exudation of compounds attracting and feeding beneficial microorganisms and symbionts (White *et al*., 2013).

As a prerequisite of efficient nutrient uptake, the root area in contact with the soil has to be large to allow adequate quantities of the soil nutrients to reach the root surface by their own movement. The roots of most plant species have the ability to produce root hairs, which extend the absorptive surface of roots and may be regarded as a small-scale subsystem of roots foraging for nutrients (Jungk, 2001). For poorly mobile nutrients, root hairs are more efficient than the "naked" root cylinder/body in drawing advantage from the laws of diffusion

due to their thinner diameter (Claassen and Steingrobe, 1999; Jungk, 2001). They express high-affinity nutrient uptake systems (Damiani *et al*., 2016; Bienert *et al*., 2021; Rongsawat *et al*., 2021) and have been assumed to have a higher influx per unit area than that of the root axis (Gahoonia and Nielsen, 1998).

Less analyzed than nitrogen and phosphorus deficiencies in plant nutrition science, K^+ deficiency in agriculture is, however, remarkably broad, affecting crops worldwide (Zörb *et al*., 2014; Ruan *et al*., 2015). Large agricultural areas of the world are indeed reported to be deficient in K availability, for instance two-thirds of the wheat belt of Southern Australia and three-fourth of the paddy soils in China (Mengel and Kirkby, 2001; Römheld and Kirkby, 2010; Zörb *et al*., 2014; Ruan *et al*., 2015; Thornburg *et al*., 2020). It is widely acknowledged that further research should be conducted on root responses to K^+ deficiency to develop strategies to increase crop adaptation to this problem (Zörb *et al*., 2014; Minjian *et al*., 2015; Sustr *et al*., 2019; Thornburg *et al*., 2020).

Current knowledge on plant responses to nutrient deficiency is lower in crop plants than in the model plant Arabidopsis. Reports on changes in root and root hair development under K^+ deficiency conditions, however, already exist in different species (Høgh-Jensen & Pedersen, 2003; Cao *et al*., 2013; Zhao *et al*., 2016; Sustr *et al*., 2019). An increase in the ratio of root to shoot biomass, indicative of a relative enhancement of the flux of photosynthates allocated to roots, when compared to shoots, and increases in root hair length and/or density have been reported (Høgh-Jensen & Pedersen, 2003; Hermans *et al*., 2006; Sustr *et al*., 2019). However, existing publications have not systematically reported such changes, revealing differences between species and even between genotypes within some species (Chen and Gabelman, 2000; Desbrosses *et al*., 2003; Klinsawang *et al*., 2018; Sustr *et al*., 2019; Thornburg *et al*., 2020; Bienert *et al*., 2021). Thus, the characterization of root response to K^+ deficiency remains fragmentary, with some results appearing contradictory (Sustr *et al*., 2019).

The aim of the present study was to investigate the consequences of K^+ shortage on root and root hair development in a major crop, wheat. In the present study, our investigation of the consequences of K^+ shortage on the root system aimed to provide a holistic view through an integrative analysis, by measuring the total absorptive surface area of the root system and the contribution of the root hair area to this total root system area. To our knowledge, this approach has not been used previously in the reports on root system responses to K^+, N or P shortages. We developed a rhizobox-like methodology to achieve this goal and compared two subspecies of wheat (a landrace and a wheat ancestor) to test biological diversity in response to K^+ deficiency in this crop.

2. Results

2.1 A rhizobox-type device for high-resolution phenotyping of root systems that allows integrated global analysis of root hairs

The rhizobox-type device described in Fig. 1A-C was developed in order to acquire images allowing to phenotype entire root systems with a high-enough resolution to include root hairs. A representative image of a durum wheat root system grown for 14 days in such rhizobox-type device watered with a complete nutrient medium (modified Hoagland) is shown in Fig. 1D, together with enlargements of 5 regions of the longest seminal root, showing root hairs (right lateral panels).

From this type of images, operational analyses of root hairs were implemented, providing estimates of local root hair length and density (Fig. 1E and F). Such analyses were applied to approximately 4-mm-long root segments at the 5 locations along the seminal root shown in Fig. 1D. Long root hairs were present in each of the 5 analyzed regions (including old and young root regions). The width of the "root hair sheath" (operational root hair length estimate), however, substantially varied between regions (from ca. 1.4 mm to 2.3 mm; Fig. 1G), providing evidence that quite large heterogeneities in root hair length can occur over short distance along a root segment (15 % and 38% difference between region 4 and the adjacent regions 3 and 5, respectively, distant by 1 or 2 cm). The operational estimates of root hair density (Fig. 1H) also provided evidence of heterogeneities in root hair density over short distances along this seminal root segment. Heterogeneities in local values of root hair length and density were observed in every root system image (see also the insets in Fig. 4).

2.2 Effect of K^+ shortage on plant K^+ nutrition, root system development and shoot biomass in two wheat accessions grown in the rhizobox-type device

The rhizobox-type device was used to examine the consequences on root system development of K^+ shortage. Two *Triticum turgidum* L. subspecies were grown in parallel, a durum wheat landrace, Oued Zenati, and an ancestral *dicoccum* genotype, Escandia. Plants were watered with either a control nutrient solution, containing 6 mM K^+, or a low K^+ solution containing 60 µM K^+. The root and shoot K^+ contents were assayed after 14 days of growth in the rhizobox-type devices (Fig. 2). The low K^+ treatment resulted in strong decrease in K^+ contents of both roots and shoots, when compared with the control treatment, in both Oued Zenati and Escandia wheat plants (Fig. 2). The root K^+ contents were decreased from *ca.* 3 $mmol.g^{-1}$ DW to 1 $mmol.g^{-1}$ DW or less in the two wheat genotypes (Fig. 2A) or, when expressed on fresh weight basis, from *ca.* 200 $\mu mol.g^{-1}$ FW to 40 $\mu mol.g^{-1}$ FW or less (root FW

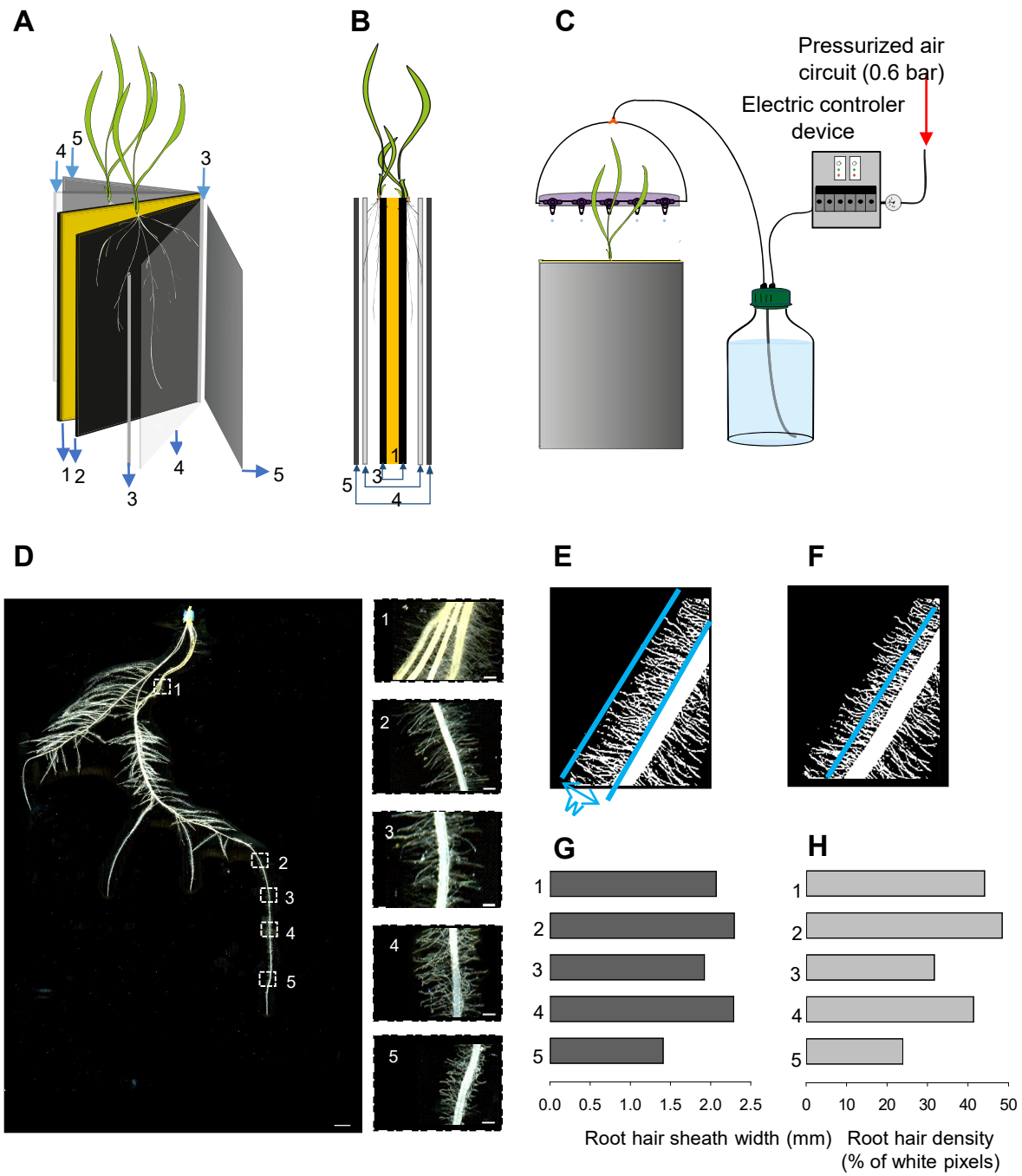

A
B
C
Pressurized air
circuit (0.6 bar)
Electric controler
device
D
E
F
G
H
Root hair sheath width (mm)
Root hair density
(% of white pixels)

Fig. 1 Integrative phenotyping of root hair development throughout the wheat root system in a rhizobox-type device.

A-C The rhizobox-type device developed for integrative phenotyping of root hair development in whole root system. **A-B** Arrangement of the different rhizobox components: side view (A) and corresponding cross section (B). (1) Solid polyurethane foam panel. (2) Black polyester fabric bagging the polyurethane foam panel. (3) U-shape aluminum sliding bar. (4) Transparent glass plate. (5) Opaque polystyrene plate protecting roots from light. The rhizobox usually contains two plants grown simultaneously, one on each side of the rhizobox between the external face of the fabric and the glass plate. The aluminum sliding bars are used as spacers, setting the distance between the polyester fabric and the glass plate at 2 mm. The polyurethane foam panel acts as a nutrient solution reservoir, periodically replenished by the dedicated irrigation device and maintaining the fabric moistened. **C** The irrigation device ensuring controlled delivery of nutrient solution to the growing seedlings. The nutrient solution is contained in a 2- or 5-l bottle, which is fitted with a symmetrical plastic tube circuit, comprising 5 taps allowing the solution to drop onto the top of the polyurethane foam panel. Periodic pressurization of the bottle content with air (0.6 bar) ensures periodic flow of nutrient solution from the bottle to the taps. A controller (including timers and 3-way solenoid valves) is used to periodically pressurize/depressurize the bottle. In the present experiments, we set the duration of each watering episode to 3 s, every 10 min, delivering about 1.5 ml per watering episode and per rhizobox.

D-H Representative image of a wheat root system grown in the rhizobox-type device and focus on root hairs at different regions along a seminal root. **D** Image of the entire root system of a Oued Zenati plant grown for 14 days in the rhizobox-type device. The plant was watered with 6 mM K^+ in the nutrient solution. Five regions (numbered 1 to 5) of the longest seminal root are magnified in the right-side panels. **E** Operational estimation of average root hair length. Two lines (shown in blue) are drawn parallel to each other and to the surface of the analyzed root segment. The first one is drawn just along the surface of the root segment. The second line crosses the tips of the root hairs appearing as the longest ones in the image (2D scan of a 3D object). The distance between the two lines is taken as an operational estimate of the average root hair sheath width in the corresponding root segment and is named w for root hair sheath width. **F** Operational estimation of average root hair density. The number of root hairs crossed by the blue line (drawn parallel to the root surface at a distance of about w/2, i.e. half of the root hair sheath width; see legend to panel E) can be considered to be proportional to the number of white pixels crossed by the line since all root hairs appear to have the same diameter. We directly used the density of the white pixels intercepted by the line, D%, i.e., the number of white pixels reported (in %) to the total number of pixels, white or black, intercepted by this line, as an operational estimate of root hair density. D% can be obtained directly from the "mean gray value", m_{gray}, obtained using ImageJ for the pixels intercepted by the line. In the 8-bit coded image (white and black pixels color code: 255 and 0, respectively), D% = 100 m_{grey}/255.

G-H Root hair sheath width (G) and root hair pixel density (H) measured in the 5 regions magnified in panel D. For regions 2 to 4, the data provide the mean of the values obtained on both sides of the root segment

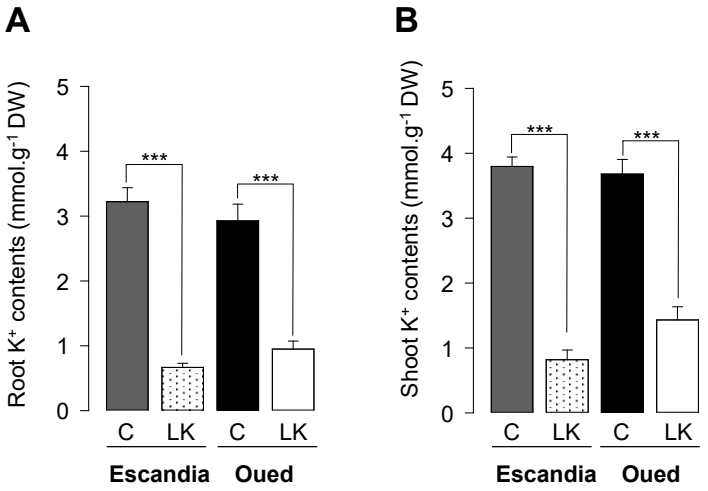


Fig. 2 Effects of K^+ shortage on K^+ contents in Escandia and Oued Zenati wheat seedlings grown in rhizobox-type devices. Escandia and Oued Zenati wheat seedlings were grown in rhizoboxes for 14 days. The modified Hoagland nutrient solution contained either 6 mM (control ("C")) or 60 µM K^+ (low K^+ ("LK") condition). Root (A) and shoot (B) K^+ contents were measured by flame spectrophotometry. Means ± SE (n = 14 for Oued Zenati and 6 for Escandia). *** indicates that the difference between the values in control condition and the corresponding values in LK condition is statistically significant (Student *t* test; p<0.005)

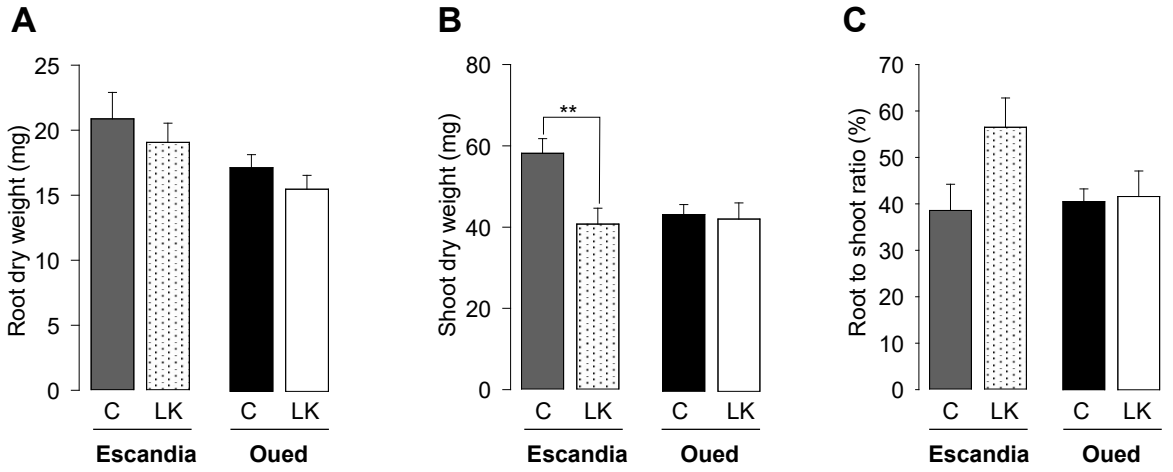


Fig. 3 Effects of K^+ shortage on root and shoot biomass in Escandia and Oued Zenati wheat seedlings. Escandia and Oued Zenati wheat seedlings were grown in rhizoboxes for 14 days in the same ionic conditions (control and low K^+) as in Fig. 2. **A** Root, and **B** shoot measured biomass (dry weight: DW), and **C** the calculated root to shoot DW ratio. Means ± SE (n = 10 for control condition, and 14 for low K^+ condition, in Escandia and n = 14 for both conditions in Oued Zenati). ** denotes statistically significant differences (Student *t* test; p< 0.01)

to DW ratio close to 5%). The shoot K^+ contents were reduced from *ca.* 3.7 mmol.g^{-1} DW (400 µmol.g^{-1} FW) to 1.5 mmol.g^{-1} DW (80 µmol.g^{-1} FW) or less than 1 mmol.g^{-1} DW (<50 µmol.g^{-1} FW) in the two wheat genotypes (Fig. 2B; shoot FW to DW ratio close to 10%).

The root biomass was only slightly (not significantly) decreased by the K^+ shortage treatment in both wheat genotypes (Fig. 3A). The production of shoot biomass in Oued Zenati was not affected either by the K^+ shortage treatment (Fig. 3B). In contrast, in Escandia, this treatment resulted in a significant reduction in shoot biomass, by *ca.* 25%, and thus in an increase in root to shoot biomass ratio (Fig. 3B and C).

Representative images of Oued Zenati and Escandia root systems developed for 14 days in rhizobox-type devices supplied with control or low K^+ solution, are shown in Fig. 4. Total length and surface area of the "naked" root system (when root hairs were not considered) could be directly estimated using WinRHIZO™ over the entire root system (Figs. 4 and 5A and B).

K^+ shortage poorly affected the analyzed parameters of the "naked" root system (Fig. 5). Total length (Fig. 5A) and surface area (Fig. 5B) of the "naked" root system were not sensitive to the K^+ shortage treatment in Oued Zenati, and responded only slightly with a non-significant increase in Escandia. The average root diameter over the whole root system, obtained by dividing the "naked" root system surface area (Fig. 5B) by the length of the corresponding root system (Fig. 5A) and by π (3.14) (given that the root total surface area obtained using WinRHIZO = root length*root diameter*π), was also unaffected by the K^+ shortage treatment in both wheat accessions (Fig. 5C).

2.3 Effect of K^+ shortage on local root hair production in seminal and lateral roots of the two wheat accessions

Additional analyses were carried out to measure root hair length and density in different root types of the root systems. Both seminal and lateral roots were analyzed (see examples of root hair images from both types of roots in Fig. 4). The measurements were carried out using the procedures described in Fig. 1E and F. To allow comparison between the two wheat genotypes, since we observed that root hair length and density can show significant heterogeneities with position along the same root, especially in the youngest regions close to the root tip (Fig. 1G and H, Fig. 4), the latter measurements were performed on 4-mm-long regions at fixed positions, selected *ca.* 6 cm from the root tip in seminal roots and in the middle of the root in lateral roots. The resulting values of root hair length were higher in seminal than in lateral roots in both wheat genotypes (Fig. 6). In contrast, root hair density appeared to be weakly dependent on root type in these measurements (Fig. 6).

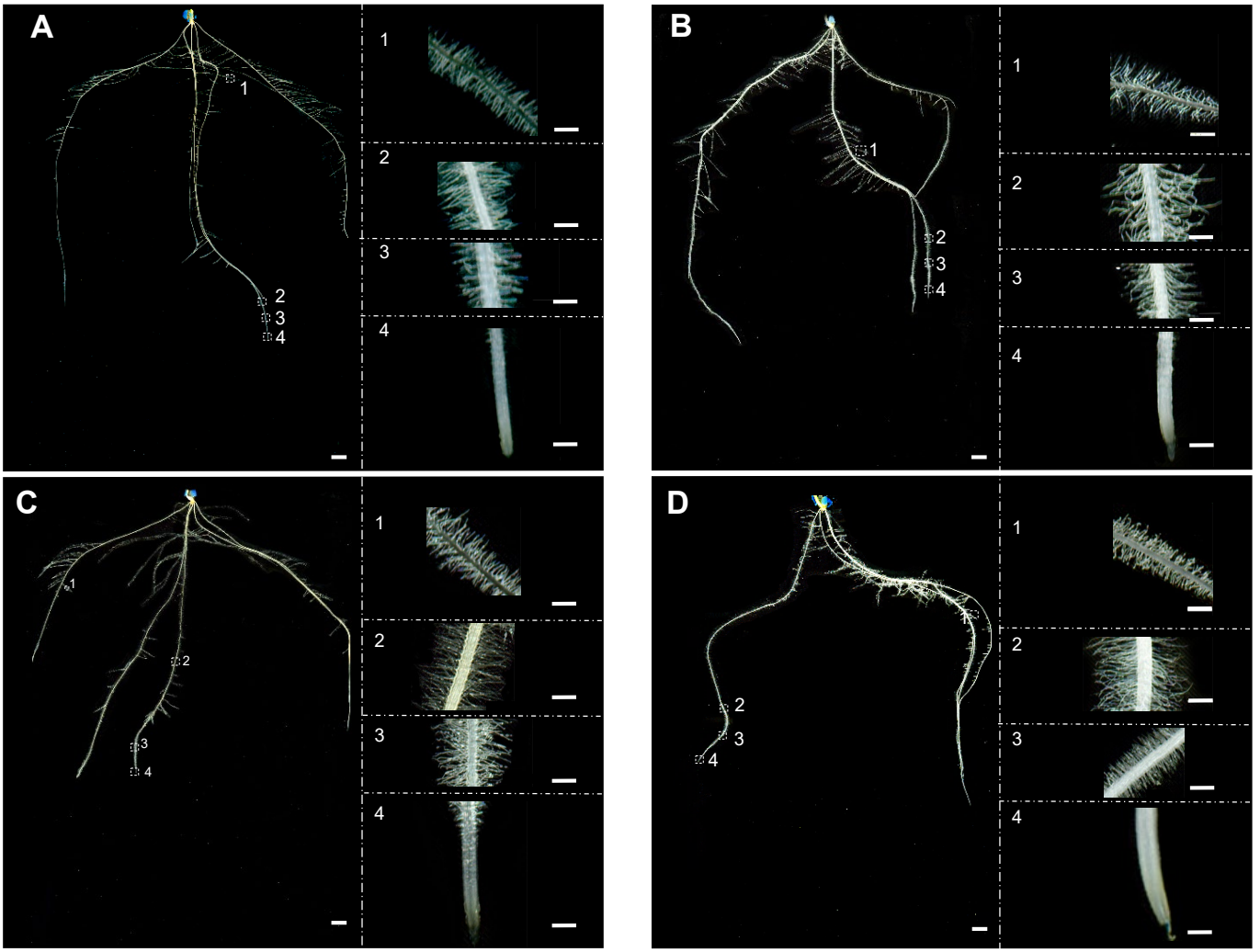


Fig. 4 Representative images of root systems of Escandia and Oued Zenati wheat seedlings grown in the rhizobox-type device under control or K^+ shortage conditions. Plants were grown for 14 days in rhizobox devices in control (A, B) and K^+ shortage (C, D) conditions (see legends to Figs. 1 and 2). **A, C** Escandia; **B, D** Oued Zenati. Insets at right of panels show enlargements of regions from seminal and lateral roots. White bars: 1 cm for the whole root systems, and 1 mm for the enlargements

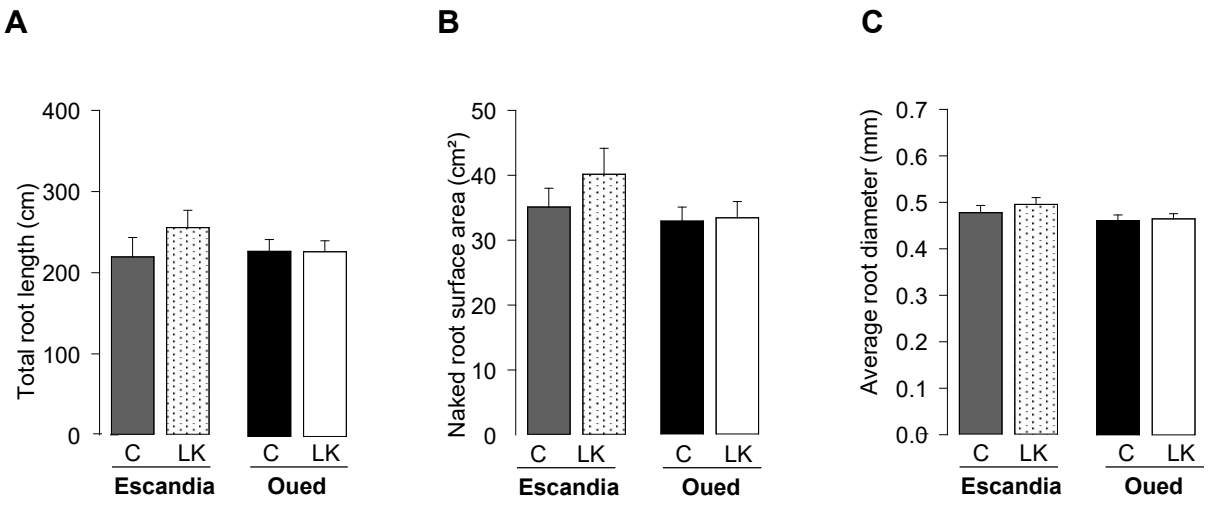


Fig. 5 Effect of K^+ shortage on total length of root system and on root diameter in Escandia and Oued Zenati wheat seedlings. Plants were grown for 14 days in rhizoboxes in control and K^+ shortage conditions (see the legend to Fig. 2). **A** Total root system (seminal + lateral root) length, obtained using WinRHIZO™software. Root elements displaying a diameter equal or larger than 0.2 mm were classified as roots, in contrast with root hairs that were assimilated to root elements with a diameter smaller than 0.2 mm. **B** "Naked" (when root hairs were not considered) root surface area, obtained using WinRHIZO™software. **C** Averaged root diameter over the entire root system (expressed in mm), calculated by dividing the "naked" (when root hairs were not considered) root surface area (data in Fig. 5B) by the total root length (data in Fig. 5A) and by π (3.14). Means ± SE (n = 10 for control condition, and 14 for low K^+ condition, in Escandia and n = 14 for both conditions in Oued Zenati. Absence of star above the bars indicates no statistically significant difference between the values in control condition and the corresponding values in K^+ shortage condition (Student *t* test; $p>0.05$)

In Escandia plants grown under K^+ shortage conditions compared with the plants grown under control conditions, root hair length values were higher, by ca. 20% in both seminal and lateral roots (Fig. 6A). Escandia root hair density values were also greater in plants grown under K^+ shortage conditions, also by about 20% compared to plants grown under control conditions in both root types (Fig. 6A). In Oued Zenati, root hair density was found similarly to be increased by the K^+ shortage treatment, but root hair length was not affected (Fig. 6B).

2.4 Root hair contribution to entire root system area and response to K^+ shortage

We then sought to obtain overall estimates of root hair area in the root systems. Such data could be obtained directly using WinRHIZO™ after image segmentation thanks to the high resolution of the root system images (Fig. 4), with root hairs then considered in WinRHIZO™ as the finest class of roots (with diameters less than 0.2 mm; see materials and methods' section).

The K^+ shortage treatment resulted in a large increase in total root hair area in the Escandia root system (Fig. 7A), consistent with the locally evidenced increases in both root hair length and density (Fig. 6). In contrast, although local measurements in Oued Zenati indicated increase in one of the root hair parameters under K^+ shortage (density; Fig. 6), only a slight non-significant increase in root hair area was found over the entire root system of this accession (Fig. 7A).

Total root hair area values were then divided by total root system lengths to determine the extent to which changes in total root hair areas under K^+ shortage conditions were due to changes in the ratio of root hair to "naked root" production rather than in the development of the entire root system. The ratio of root hair area to root length showed a similar variation to that of root hair area in both wheat varieties under K^+ deficiency (Fig. 7B). Thus, while no significant change in the ratio of root hair area to root length was observed in Oued Zenati, an increase greater than 100% was observed in Escandia (Fig. 7B). This indicates that the developmental program of the root system in Escandia was strongly modified by the K^+ shortage, with a strong increase in the root hair to "naked root" ratio.

Finally, the impact of the K^+-shortage induced root hair production in Escandia was assessed at the whole root system level by comparing the surface of the whole root system ("naked" root + root hairs, determined using WinRHIZO™) under control and low K^+ growth conditions. K^+ shortage resulted in Escandia in a substantial increase in the surface area of the entire root system (by ca. 35%; Fig. 7C). Similar analyses in Oued Zenati indicated, in agreement with the separate analyses of the root hairs and "naked" root system (Figs. 5B and 6B), that the total surface area of the root system was not significantly affected by the K^+ shortage treatment in this wheat accession (Figure 7C).

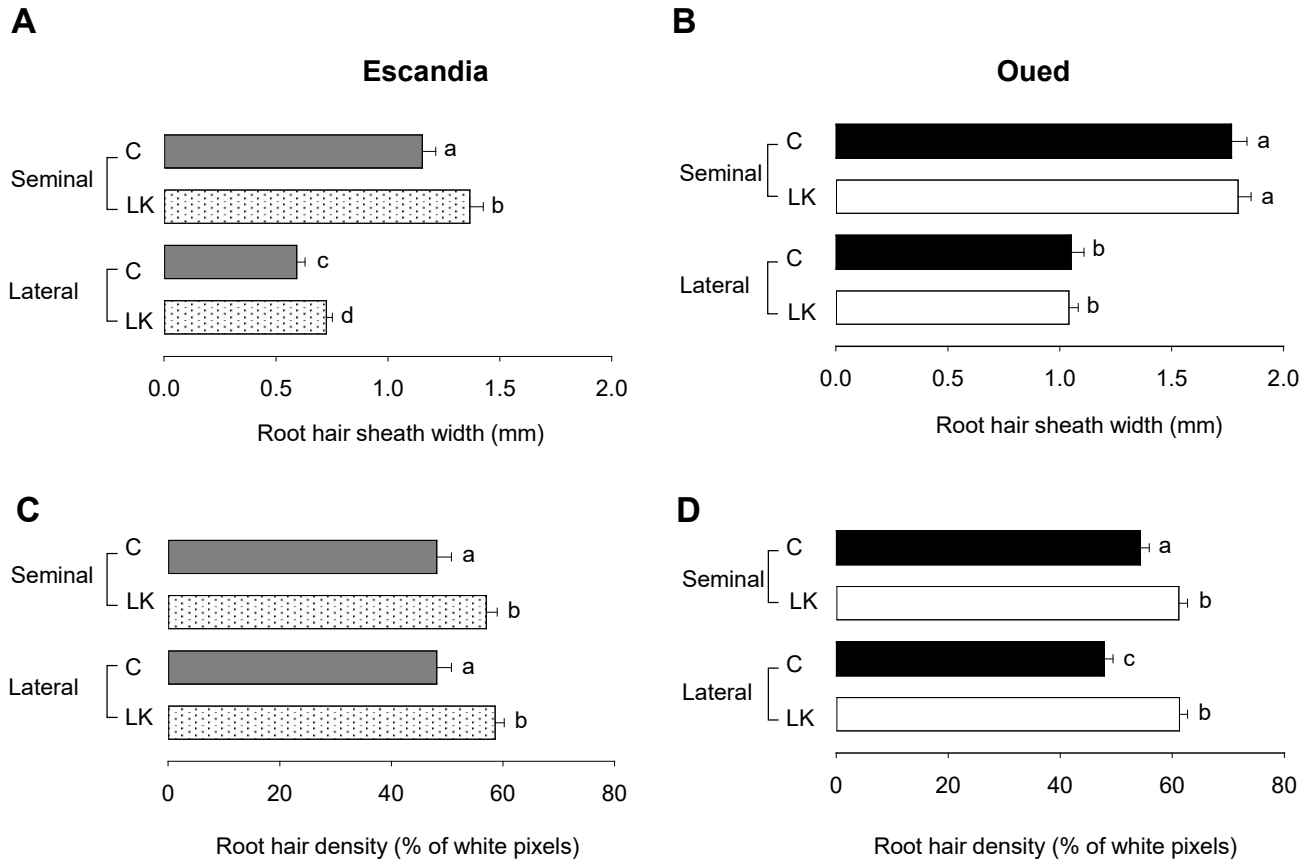


Fig. 6 Differences in local root hair elongation and density values between wheat plants grown in control or K^+ shortage conditions. Escandia and Oued Zenati wheat plants were grown for 14 days in rhizoboxes in control and low K^+ conditions (see the legend to Fig. 2). Operational estimates of root hair elongation ("root hair sheath width") and of root hair density ("root hair pixel density" along a line parallel to the root surface) were obtained from the same plants as in Fig. 5 and 6 according to the procedures described in Fig. 1D and Fig. 1F, respectively. Measurements were performed at 6 cm from the root tip for seminal roots and at the middle of lateral roots, over 4 mm root segments in both cases. Segments from 4 seminal roots and 4 lateral roots from different seminal roots were analyzed per plant. **A, B** Root hair sheath width in Escandia (A) and Oued Zenati (B) seminal and lateral roots of plants grown under control or low K^+ conditions. **C, D** Root hair (white pixels) density in Escandia (C) and Oued Zenati (D) seminal and lateral roots of plants grown under control or low K^+ conditions. Means ± SE (n = 40 from 10 plants for control condition and 56 from 14 plants for low K^+ condition in Escandia and n = 56 from 14 plants for both conditions in Oued Zenati). Different letters denote statistically significant differences (One way anova test, $p<0.05$) between the values in control condition and the corresponding values in K^+ shortage condition, and between values in seminal and lateral roots

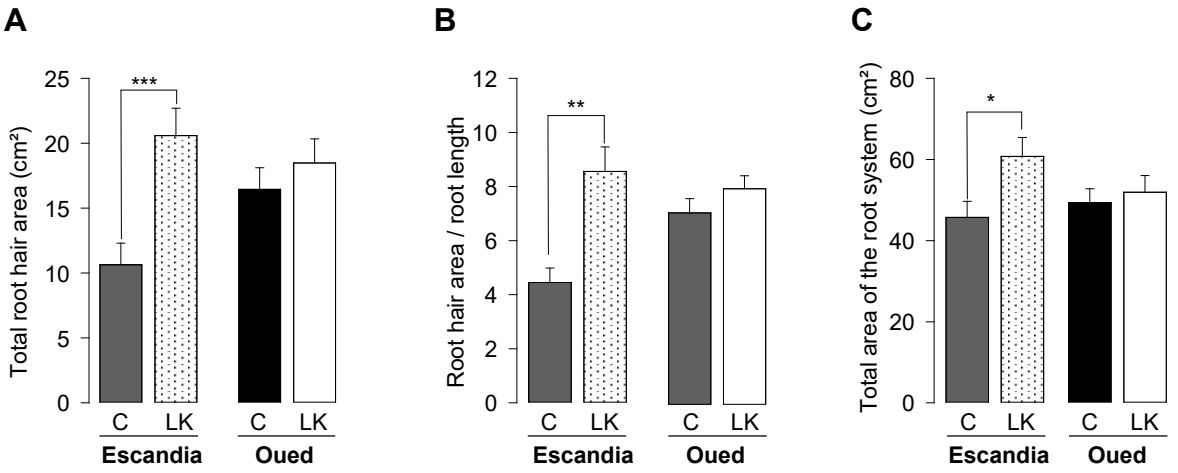


Fig. 7 Effect of K^+ shortage on total surface areas of root system, and surface areas of root hairs in Escandia and Oued Zenati wheat seedlings. Plants were grown for 14 days in rhizoboxes in control and K^+ shortage conditions (see legend to Fig. 2). Plants were the same as in Figs. 5 and 6. **A** Total root hair surface area. **B** Ratio of total root hair surface area (cm^2) to total root (seminal + lateral) length (cm), as an average root hair surface over the root system. Total root (seminal + lateral) length data were from Fig. 5A). **C** Entire root system surface area (roots + root hairs). Areas were measured using WinRHIZO^{TM}, the diameter classification parameters being set so that root hairs were assimilated to root elements with a diameter smaller than 0.2 mm. Root elements displaying a diameter equal or larger than 0.2 mm were classified as roots. Means ± SE (n = 10 for control condition, and 14 for low K^+ condition, in Escandia and n = 14 for both conditions in Oued Zenati). * and ** denote statistically significant differences (Student *t* test; $p<0.05$ or 0.01, respectively) between the values in control condition and the corresponding values in K^+ shortage condition

3 Discussion

3.1 Integrative analysis of the entire root system including root hairs

The availability of K^+ in non-fertilized soils, like that of nitrogen and phosphate, is commonly limiting crop yield. Consequences of nutrient deficiencies on root system architecture and root hair development have been extensively investigated for P, less for N and even less for K (Wang *et al*., 2016; Bienert *et al*., 2021; Wang *et al*., 2021). K^+ deficiency has often been reported to have a negative impact on root system development. However, the response to K^+ deficiency is complex and can differ between root types, but also between species and accessions (Ashley *et al*., 2006; Jung *et al*., 2009; Kellermeier *et al*., 2013; Kellermeier *et al*., 2014; Sustr *et al*., 2019; Thornburg *et al*., 2020). For instance, in Arabidopsis thaliana Col-0, K^+ shortage conditions did not affect growth of the primary root, but decreased the elongation of first order lateral roots, and increased that and the number of the second order laterals (Kellermeier *et al*., 2014). But some other *A. thaliana* ecotypes (e.g. Catania-1) showed different response to low K^+, with arrest of primary root elongation in favor of lateral branching (Kellermeier *et al*., 2014).

Another level of complexity in root system responses concerns root hair development. With respect to K^+ availability, information on root hair development responses in terms of changes in elongation and density is very poor. And apparently contradictory results can be found, which could result from differences in experimental approaches (e.g., soil substrate, phenotyping procedure or applied K^+ shortage concentration) or may reflect differences between plant accessions: for example, either no change or an increase in root hair elongation was reported during K^+ shortage in Arabidopsis (Desbrosses *et al*., 2003; Jung *et al*., 2009; Sustr *et al*., 2019). Differences between plant species were also reported (Klinsawang *et al*., 2018; Bienert *et al*., 2021).

For K but also for P and N, the changes in root system and root hair development in response to nutrient shortage have almost exclusively been separately investigated, without integrative analyses (Bates & Lynch, 1996; Wang *et al*., 2016; Klinsawang *et al*., 2018; De Pessemier *et al*., 2022). Thus, while root hairs have essential functions in nutrient uptake, and particularly in the case of K^+ (Tanaka *et al*., 2014; Bienert *et al*., 2021), no assessment of root hair contribution to the total root system surface area and how this parameter varies with external nutrient availability was generally attempted. Furthermore, root hair analyses so far concerned selected region(s) of the root system relatively restricted in length, assumed to be representative of the whole root system (Lamont, 1983; Høgh-Jensen & Pedersen, 2003; Wang *et al*., 2016; Vincent *et al*., 2017).

Here, we have investigated the developmental responses of the root system and root hairs to K^+ shortage in wheat, in two strongly different genetic backgrounds, a wheat ancestor and a durum wheat landrace. We first assessed the variability of root hair length and density in the root systems, along the roots and between root types (Fig. 1D-H, Fig. 5), which revealed very significant variability, especially in the length of root hairs between primary and secondary roots (Fig. 6). Next, our goal was to perform integrated analyses of root hair responses to K^+ deficiency treatment within the whole root system (Fig. 7A), and then to perform further integration to access altogether the "naked roots" and root hairs in terms of surface area, in our analysis of root system responses to K^+ deficiency treatment (Fig. 7C). This required the development of a dedicated rhizobox-type device and an imaging procedure.

The rhizobox-type device (Fig. 1A-C) actually allowed to obtain well resolved images of root hairs, in terms of length and density, on entire root systems (Fig. 1D-F and Fig. 4). The suitability of this experimental device for such investigation essentially results from the fact that root growth occurs at the surface of a black (increasing the contrast between the roots and the background) polyester fabric (non-putrescible and kept moistened by a polyurethane foam panel periodically watered) at a constant and adequately chosen distance (2 mm in the present experiments with wheat) from a glass plate. This allowed to directly get high resolution scans, through the glass plate, of root systems and their root hairs. The quality of the segmented images, which seems without equivalent in the literature to our knowledge, allowed to carry out integrative analyses of the plant responses to K^+ shortage, in terms of both root system development and root hair production, using the classical softwares ImageJ and WinRHIZO™ (Thornburg *et al*., 2020; Strock *et al*., 2018; Saengwilai *et al*., 2014; Vandamme *et al*., 2013).

3.2 Relevance of the root hair trait parameters in the analysis of plant response to K^+ shortage

In most soil, K^+ is poorly mobile due to strong interactions (adsorption/desorption) with soil constituents, notably clay minerals and organic matter (Sparks and Huang, 1985; Sparks, 1987; Dobermann *et al*., 1998; Zörb *et al*., 2014). It is widely recognized that important adaptive responses to low K^+ (a common situation in the absence of agricultural inputs) lie in functional adjustments of the root system to increase its uptake capacity, which can be achieved, in particular, by increasing the surface area of the root system or by inducing or enhancing the activity of the outer root layer K^+ transport systems. The combination of strategies adopted varies among species and accessions. For example, some tomato varieties found to be tolerant to K^+ deficiency compared to susceptible varieties were observed to increase their root

surface uptake capacity, while others enhanced the growth of their root system (Chen and Gabelman, 2000).

Root ideotypes likely to enhance, under scarcity conditions, the uptake of nutrients such as K^+ that crops require in large quantities, have been proposed. Such root traits include greater production of lateral roots and root hairs to increase the surface area for K^+ uptake by roots and reduce the distance needed for K^+ diffusion and water flow (White *et al*., 2013). Root hair parameters (length and density) are thus commonly mentioned along with the length of the roots, as likely major determinants of the acquisition of poorly mobile nutrients such as K^+ (Mengel & Steffens, 1985; Sustr *et al*., 2019; Bienert *et al*., 2021). Molecular information on cell-specific expression of K^+ transport systems in the outer layers of roots (Véry *et al*., 2014) indeed pointed to the root hair as a likely major contributor to root K^+ uptake, in agreement with analyses of developmental mutants affected in root hair elongation in Arabidopsis (Rigas *et al*., 2001; Tanaka *et al*., 2014; e.g., 40% loss of K^+ uptake in the *trh1* mutant with very short root hairs). It appears therefore highly relevant when trying to determine the absorption capacity of a root system to integrate the total surface area of the root hairs in the root system with that of the "naked root bodies".

Priority was thus given, in the present study, to the analysis of the effects of K^+ shortage on total root surface area (roots + root hairs)," naked" root surface area (root system without root hairs), total root hair area (Figs. 5B, Fig. 7A and C) and contribution of root hair area to the area of the root system.

The heterogeneities in root hair length and density that were observed at the entire root system level, for instance along a long seminal root (Fig. 1G and H, Fig. 4) or between lateral and seminal roots (Figs. 4 and 6) were present in both root systems developed in high and low K^+ (Fig 1Gand H; Fig. 4) and are therefore not directly related to the plant response to K^+ availability. It should be noted for instance that in Arabidopsis grown in Petri dishes on agar plates devoid of carbon source, root hair elongation has been reported to be much reduced during the dark period, when compared with the light period (Poitout *et al*., 2017). Thus, global parameters such as the whole root hair area (Fig. 7A) or the whole root system area (roots + root hairs; Fig. 7C), avoid any bias in the selection of local zones to measure root hair length and density, and thereby provide valuable information on the integrated strategy of the plant to develop the whole area of its root system surface.

Root parameters describing root hair development on the root surface, such as total root hair area or local root hair density for example (Fig. 1F, Fig. 6C and D, Fig. 7A), should be considered as providing underestimated values of the corresponding trait because they are obtained from the 2-D projection (image of the root system) of a 3-D structure, the area of the projected root therefore masking partially that of root hairs. This bias is dependent on the diameter of the root, when compared to root hair length, the greater the diameter the larger the

underestimation. K^+ shortage did not affect the “mean” root diameter (averaged over the whole root system) in Escandia and in Oued Zenati (Fig. 5C). Furthermore, this parameter was very similar in Escandia and Oued Zenati (Fig. 5C). Thus, the changes in root hair area due to K^+ shortage, as well as the differences between the two wheat accessions in their responses to this stress, essentially reflected changes in root hair production at the root surface.

In our wheat genotypes, the total root hair area (Fig. 7A) corresponded to 30 to 54% of the area of the "naked” root systems (Fig. 5B) under the different nutrient conditions and genotypes, and thus accounted for a very significant portion of the total root system area (22 to 40%; Fig. 7A and C), which is a very relevant parameter to include in the analysis of the development and function of the root system when considering nutrient uptake. In Oued Zenati, the contribution of the root hair surface area to the whole root system surface area did not significantly vary with the K^+ treatment (33% in high K^+ and 35% in low K^+; Fig. 7A and C). In contrast in Escandia, K^+ shortage strongly increased the relative root hair area in the root system (22% in high K^+ to 40% in low K^+; Fig. 7A and C). Thus, this further highlighted that strong developmental changes increasing the root hair to naked root surface area ratio can be induced in some wheat genotypes in response to K^+ shortage stress. Furthermore, the fact that high variability between the two genotypes was observed in terms of reprogramming of root hair production upon low K^+ treatment highlights the relevance of such integrative root hair surface analyses at the scale of the whole root system for the analysis of plant adaptation strategies to K^+ shortage stress, in wheat and likely also in other species.

3.3 Varying responses to K^+ shortage in Escandia and Oued Zenati wheat accessions

Low K^+ treatments, compared to control conditions that can be considered as luxury feeding allowing an "insurance strategy", result in a sharp decrease in plant tissue K^+ content and growth adaptation. A possible critical concentration of K^+ in plant tissues, between 0.5 and 2% of dry matter, has been proposed (Leigh and Wyn Jones, 1984), but is recognized as difficult to assess as it obviously depends on the growth stage and the crop species (Zörb *et al*., 2014). Here, the 14-day low-K^+ treatment (11 days with 60 µM K^+ irrigation input after 3 days with deionized water input) in the rhizobox devices led to K^+ contents of root and shoot tissues down to levels which are consistent with those reported in wheat (*T. aestivum*) seedlings grown in hydroponics (Ruan *et al*., 2015), and wereslightly lower in Escandia than in Oued Zenati: 3% and 4% of root dry matter in Escandia and Oued Zenati, respectively,, and 3.3 vs. 5% of shoot dry matter (Fig. 2). Since the K^+ contents in well-fed plants were not significantly different between the two wheat varieties (Fig. 2), Escandia and Oued Zenati differed in terms of K^+ homeostasis upon external K^+ limitation. A stronger response to the K^+ shortage treatment was

observed in Escandia in terms of biomass allocation in favor to roots (Fig. 3C), a trait thought to improve K^+ acquisition under shortage conditions (White *et al*., 2013; Sustr *et al*. 2019).

The global analyses of the root system development that were performed here led to the conclusion that the “naked” root system did not significantly change its overall absorbing area under K^+ shortage in both wheat genotypes (Fig. 5). However, the K^+ shortage induced a sharp increase in the root hair production of Escandia that very significantly increased the uptake area of the entire root system of this accession (Fig. 7), constituting another expected trait of adaptation to low K^+ levels in this genotype. Oued Zenati, in contrast did not manifest overall developmental change in response to the K^+ shortage treatment (Figs. 3, 5, and 7). This indicates that the response to low K^+ (sensing, adaptation ability/strategy) is different in the two varieties. It should be noted in particular that although Oued Zenati appeared to be unresponsive to the K^+ treatment, under control conditions, this variety showed growth values (root/shoot biomass) and root hair surface values closer to those under low K^+ conditions in Escandia (Figs. 2 and 7). Thus, Oued Zenati seems to express independently of the availability of K^+ in the external medium, some favorable traits to cope with K^+ shortage.

Very little information was yet available on the response of wheat roots to K^+ availability and its variability among accessions. Variations in root and shoot biomass induced by K^+ deficiency has been reported in hexaploid wheat varieties (Ruan *et al*., 2015), but no detailed analysis of root systems in relation to external K^+ availability was so far described to our knowledge. The integrated root hair analysis that we performed in this study, which provides quantitative (less subjective) estimates of the total root hair area in a whole root system, compared to analyses based solely on root spots, appears to be particularly well suited for comparisons between conditions or genotypes. Since this total root hair area appears to be substantial relative to the "naked" root area, at least with the genotypes and conditions used in our study, its integration with the "naked" root area also provides a better estimate of the total absorptive area in a root system. These global parameters, shown here of importance in describing the responses of the root system to a nutrient constraint, will provide new tools for the analysis of root adaptation to soil nutrient stresses.

4. Materials and methods

4.1 Plant material and growth conditions

The effects of K^+ deficiency on root system development were investigated in two wheat accessions, Oued Zenati (*Triticum turgidum spp. durum*), which is a landrace, and Escandia (*Triticum turgidum L. spp. dicoccum*), an ancestral genotype.

Seeds of similar size were selected and surface sterilized by immersion in 4% calcium hypochlorite solution for 20 minutes under vacuum (in order to remove the air bubbles possibly

trapped in seed groove and impeding sterilization of the groove surface). The seeds were then rinsed 5 times in sterile distilled water and then soaked in sterile warm water (about 40°C, and 20 ml for about 10 seeds) in a plastic pot, which was transferred to 26°C in the dark for about 16 h. The latter treatment was found to stimulate seed germination.

Germinated seeds (seeds showing primary root emergence) were transferred to sterile moistened filter paper in a Petri dish and coated with a wax containing 0.1% oxyquinoline fungicide (Staehler PP 140, Chauvin-Agro) to prevent fungal contamination during the growth period. The plants were then grown in rhizobox-type devices (see below) developed in order to allow integrative phenotyping of root and root hair traits in entire root systems. Coated seeds were placed in the rhizobox devices with the emerged primary root facing downward. The rhizobox-type devices were randomly arranged in a growth chamber (16 h of photoperiod,150 µE of light intensity, day/night temperature 22/20˚C, 70% air humidity). Images of root systems were acquired after 14 days of growth.

4.2 The rhizobox-type device

The rhizobox-type device allowing to obtain high-resolution images of root systems is described in Fig. 1A-C (see also the end of the first part of the Discussion section). A polyurethane foam panel (width/height/thickness in mm: 260/320/15, Smithers-Oasis France Sarl, Saint-Martin-Lalande; acting as nutrient solution reservoir: see below) is bagged in a black, hydrophilic, non-putrescible, water- and nutrient-permeable polyester fabric (mesh size: 18 µm, solution holding capacity: 2.5 µl/cm²; Saaticare Hyphyl®, Appiano Gentile, Italy). The polyurethane foam panel inside the rhizobox (see below for watering device) moistens the polyester fabric on which the roots develop. The foam panel bagged in the fabric is placed between two transparent glass plates. Laterally placed aluminum spacers (2 mm thick and 20 mm wide) ensure a constant spacing between the glass plate and the black fabric. Each glass plate is covered with a polystyrene insulation panel that protects the growing root system from light (Fig. 1A and B). The roots grow between the polyester fabric and the glass plate. Two plants can be grown simultaneously in one rhizobox, one plant on each side of the rhizobox. Images of the root system are acquired through the transparent glass plate. Nutrient solution is provided by an automatic device (Fig. 1C), with the solution dropped on top of the polyurethane foam panel (1.5 ml every 10 min), maintaining constant the water content of the panel.

The germinated seeds transferred to the rhizoboxes were first watered with deionized water for 3 days and then the seedlings were watered for 11 days with either control (6 mM K^+-containing) or low K^+ (60 µM K^+-containing) modified Hoagland solution (Shavrukov *et al*., 2012). The control solution comprised 5 mM KNO_3, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM NH_4NO_3, 2 mM

$MgSO_4$, 1 mM NaCl, 0.1 mM NaFe(III)EDTA, 12.5 µM H_3BO_3, 2 µM $MnCl_2$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.5 µM $CuSO_4$, 0.1 µM Na_2MoO_4, and 0.1 µM $NiSO_4$. The low K^+ solution contained 60 µM KH_2PO_4 as sole source of K^+, 5 mM $NaNO_3$, 1 mM NaH_2PO_4 (these two sodium salts replacing/compensating the absence/decrease in concentration of the corresponding potassium salts in the control solution), as well as $MgSO_4$ and micro-nutrients introduced at the same concentration as in the control solution.

4.3 Image acquisition and segmentation

Images of 14-day old root systems were acquired though the transparent glass plates with a high-resolution flatbed scanner (Epson Perfection V850 pro; resolution 24 bits/1200 dpi). The obtained root images were processed using the Ilastik software (Berg *et al*., 2019) in order to perform root segmentation from the background.

The segmentation was performed using the predefined “pixel classification workflow” of the Ilastic software. We trained the program to distinguish the background (pattern of the fabric) from the roots and root hairs using manual annotation/labeling. The selected parameters in the Ilastik software were: "Gaussian Filter, Color/Intensity, Edge, and Texture", with sigma value less than 0.7 to extract fine details like root hairs. This process resulted in eight-bit segmented images, which could be directly analyzed by bio-image analysis softwares.

4.4 Image analysis

Segmented root images were analyzed using WinRHIZO™ (V.2009 Pro, Regent Instruments, Montreal, QC, Canada) and ImageJ (version 1.53) (Abràmoff *et al*., 2005). The WinRHIZO™ software was used for morphometric root traits such as total root length, root surface area and root hair surface area. Two classes of root diameters were defined within WINRHIZO™ (user definition): diameter smaller than 0.20 mm, or larger than 0.2 mm. Root elements identified as belonging to the thinner diameter class (0 to 0.20 mm) were considered as corresponding essentially to root hairs. The 0.2 mm threshold was chosen following tests taking into account that the projected area of several root hairs can overlap in scans of root systems. It was the largest threshold that allowed to efficiently exclude roots from the root hair class. Operational estimates of root hair extension and density were directly obtained using ImageJ according to the procedure described in Fig. 1E and Fig. 1F, respectively.

4.5 Biomass and K^+ content analyses

Wheat plants were sampled for biomass measurements and K^+ content analyses immediately after acquisition of the root system images at the end of the 14-day growth period in rhizoboxes. Shoot and root fresh weights (FW) were measured. Dry weights were determined

after 72 h at 60 °C. Shoot and root potassium contents were assayed by flame spectrophotometry (SpectrAA 150220FS, Varian) after ion extraction from dry tissue samples with 0.1 N HCl.

4.6 Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SigmaPlot Version 11 (Systat Software, Inc). Data are presented as means and standard errors of the distributions. Student's t-test or analysis of variance (ANOVA) were performed to determine the significance of differences between data sets. All tests were two-tailed, performed at the significance level $\alpha = 0.05$. For all analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$, ***$p < 0.005$).

Chapitre 6

Réponses des poils absorbants à une carence d'azote et plasticité des racines révélées par le phénotypage global des systèmes racinaires de deux variétés de blé génétiquement éloignées.

Chapter 6

Root hair responses to nitrogen shortage and root plasticity revealed by global phenotyping of root systems in two genetically distant wheat varieties.

1. INTRODUCTION

Improved understanding of the functioning of root systems will contribute to better exploit the genetic variation in productivity of crops in poorly fertile soils and to develop new cultivars with enhanced capacity for soil resource acquisition. Root system architecture and, at the root–soil interface, production and elongation of root hairs are major determinants of the location and volume of exploited soil.

Modelling analyses suggest that root traits that can favor nutrient ion uptake of a given nutrient ion are likely to differ depending on the ion and its availability and mobility in the soil. For instance, root traits favoring the exploitation of the superficial layer of the soil can support the uptake of phosphate (Pi) uptake, whereas long roots, exploring the deep soil, would favor that of nitrate, because Pi is generally more abundant and mobile in the superficial layer of the soil, due to the degradation of organic matter, whereas NO_3^- may be relatively more present in the deep soil due to the leaching process of this ion which is not retained by the soil colloids and organic matter. In both cases, production of long and dense root hairs extends the volume of explored soil, contributing to soil mining. The role of root hairs in soil mining is considered to be more physiologically significant for nutrient ions that are weakly concentrated and poorly mobile in the soil, and whose arrival at the root absorbing surface is essentially dependent on diffusion and not on soil solution mass flow driven by leaf transpirational water loss. This is typically the case of Pi in most soils, and development of long and dense root hairs has been extensively demonstrated to increase the root capacity to take up this nutrient ion. Conversely, Pi starvation has been widely demonstrated to increase root hair elongation and density.

The effects of N deficiency on the development of root hairs have been much less extensively investigated, compared to the effects of Pi deficiency. Furthermore, it is also worth to note that, for N but also for P and K, studies analyzing the effect of a reduction in the availability of these nutriments on the development of root hairs have rarely been conducted on the whole root system, for example by evaluating the surface area of root hairs in the entire root system and by comparing the respective contributions, in terms of surface area, of the roots and of root hairs to the adaptation of the root system to nutrient shortage.

Here, we analyse the root responses to nitrogen shortage in durum wheat. We compare the respective responses of the whole root system, the "naked" roots and the root hairs in two-week-old seedlings subjected to a nitrogen deficiency resulting in a significant reduction in the

growth of the aerial parts. The analyses were conducted with a rhizobox-type experimental device that we developed to acquire high-resolution images making it possible to directly analyse the development of root hairs, in terms of area, over the entire root system. The analysis carried out in two wheat varieties, a wheat ancestor and a landrace, revealed that the nitrogen deficiency treatment led to a strong increase in the total surface area of the whole root system, which essentially resulted, in both genotypes, from the increase in total root hair area. It is interesting to note that, with respect to all the analysed root traits, a significantly larger plasticity was systematically observed in one of the two varieties, the wheat ancestor one.

2.RESULTS

2.1 Effects of low nitrogen availability on shoot and root development

Decreasing the concentration of assimilable N from 11 mM to 110 µM in the nutrient solution resulted in a strong reduction in shoot biomass (DW) in both Oued Zenati and Escandia (Figure 1A), by ca. 38% and 29%, respectively, after 2 weeks of growth in rhizobox-type device. In contrast, root biomass was not impacted in Oued Zenati and even increased by ca. 22% in Escandia (Figure 1B). The root to shoot biomass ratio was thus significantly increased in both Oued Zenati and Escandia (Figure 1C), by about 70% and 2 times respectively. These results indicate that the plants were stressed due to low availability of assimilable N and developed a classical response to this type of stress by increasing the root to shoot ratio (Argen et Franklin., 2003).

Representative image of root systems of Oued Zenati and Escandia seedlings grown for 14 days in rhizoboxes watered with control or low N solution are shown in Figure 2. Direct visual observation of the rhizoboxes indicated that the reduction in assimilable N resulted in a striking increase in root hair length. Local measurements and global analyses of root and root hair traits were then carried out to quantitatively analyse the root system response to N starvation. The sets of analysed images are shown in Supplemental Figures 1 and 2 for Oued Zenati and Escandia, respectively.

2.2 Effect of the N shortage treatment on root hair length and density: local measurements

Root systems grown in rhizobox-type device show local heterogeneities in root hair length and density, which may occur over short distances along the roots (Figure 2; see also previous corresponding analyses in Chapters 4 and 5). Quantitative analyses of responses of these traits to nitrogen shortage are therefore subject to biases due to such local heterogeneities,

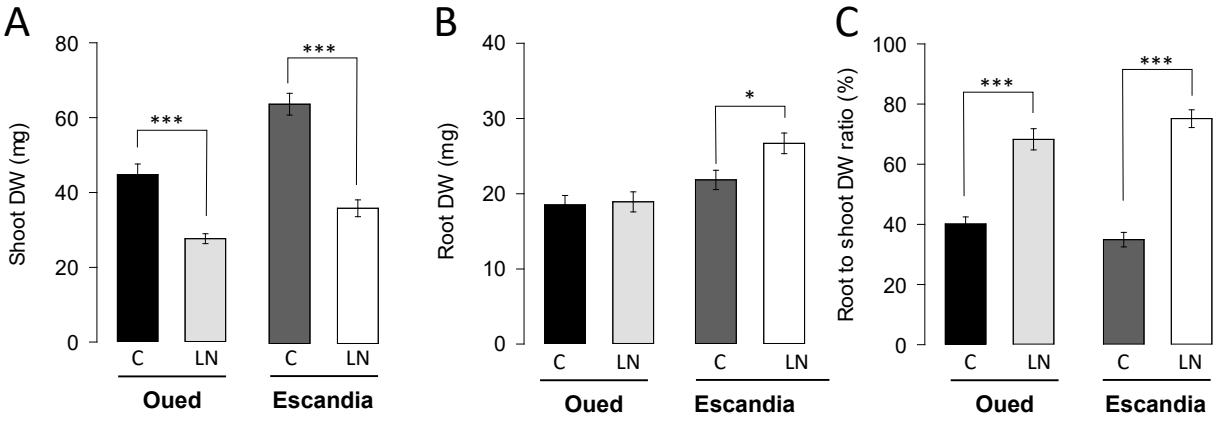


Figure 1. Biomass production in Oued Zenati and Escandia seedlings grown in control or low N condition.

Oued Zenati and Escandia seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with either control solution (C) containing 11 mM assimilable N (1 mM NH_4NO_3, 5 mM KNO_3 and 2 mM $Ca(NO_3)_2$) or low N (LN) solution containing 110 µM assimilable N (10 µM NH_4NO_3 and 90 µM KNO_3, the concentrations of K^+ and Ca^{2+} being maintained at the same values than in the control solution by addition of KCl and $CaCl_2$)

(A) Shoot dry weight (DW).

(B) Root dry weight.

(C) Root to shoot DW ratio.

Means ± SE (n =17 for Oued Zenati and 14 for Escandia). * and *** denote statistically significant differences (Student t test; $p<0.05$ or 0.005 respectively)

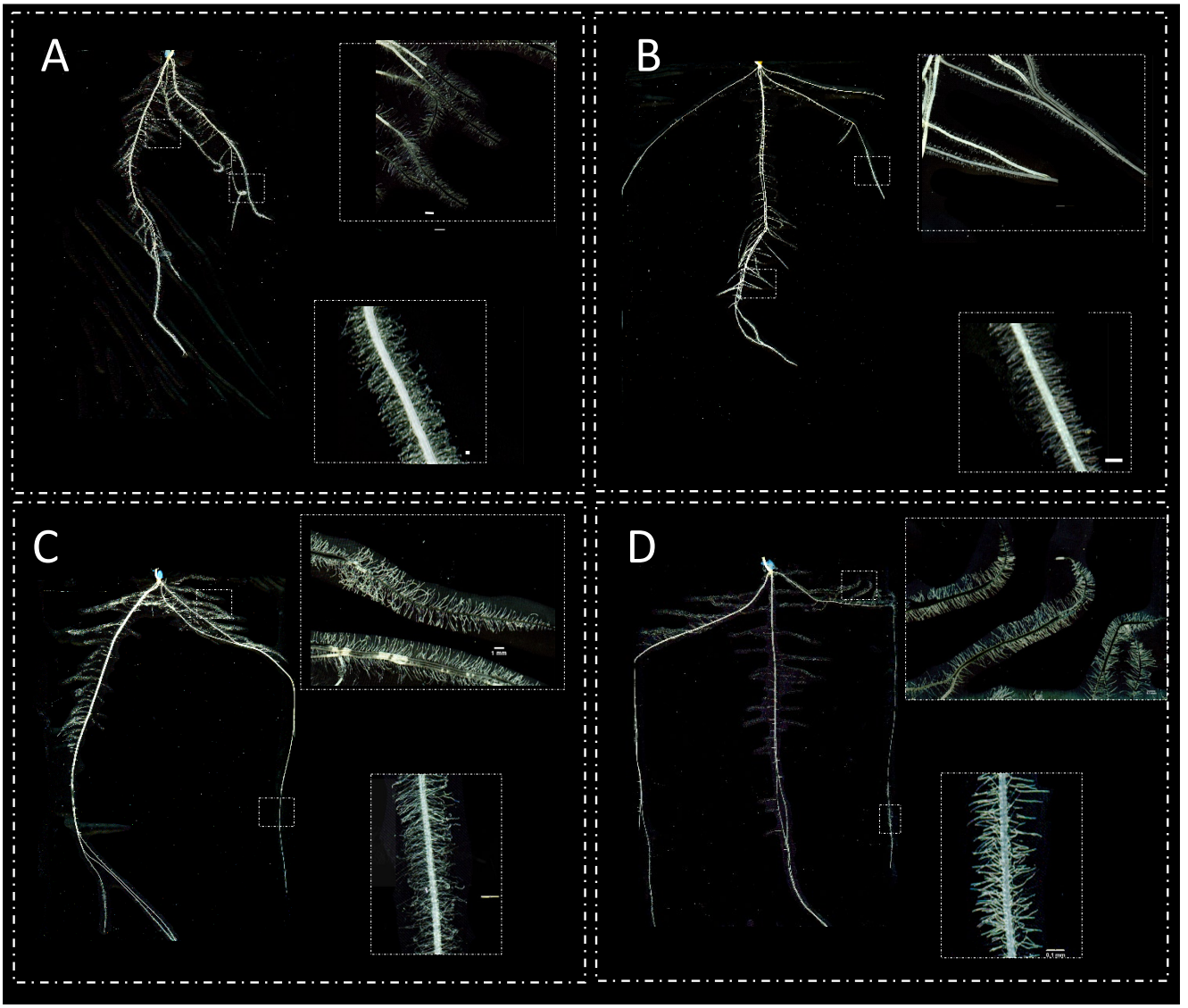


Figure 2. Root systems of wheat seedlings grown in rhizoboxes under control or low N condition.

Oued Zenati and Escandia seedling were grown for 14 days in rhizobox-type devices watered with a modified Hoagland solution containing either 11 mM assimilable N (control condition: C) or 110 µM assimilable N (low N condition: LN). See legend to Figure 1.

(A-B) Root system of Oued Zenati (A) and Escandia (B) grown in control condition.

(C-D) Root system of Oued Zenati (C) and Escandia (D) grown in low N condition.

(a) and (b): enlargements of lateral (a) and seminal (b) root regions.

White bars: 1 cm for the whole root system, and 1 mm for the enlargements.

and to subjectivity in the selection of root zones where to make local measurements. The latter issue was taken into account by measuring the local parameters systematically at the same location along the roots, at 6 cm from the tip for seminal roots, and at the middle of the root for lateral roots. The major conclusions resulting from the analysis of the data thereby obtained can be summarized as follows. (i) In control condition, seminal roots displayed longer root hairs than lateral roots, by about 41% in Oued Zenati and 60% in Escandia. (ii) N starvation poorly affected root hair length in seminal roots in either wheat accession, but resulted in a strong increase in root hair length in lateral roots in both accessions, by ca 75 % in Oued Zenati and more than 2 times in Escandia (Figure 3A). (iii) Root hair density was rather similar in seminal and lateral roots in both genotypes when growth occurred in control condition. It was not significantly affected by the N shortage treatment in seminal roots and weakly reduced by this stress in lateral roots, by ca. 27 % in Oued Zenati and 12% in Escandia (Figure 3B).

2.3 Effect of N shortage on root system development: integrative global analysis

Root system responses to N shortage were investigated in a first set of analyses using the following global descriptors: total root system (roots + root hairs) surface area, total length of the root system (without root hairs: "naked" roots), total "naked" root area and total root hair area. These different traits were determined by analyzing the sets of images shown in Supplemental Figures 1A-B for Oued Zenati and 2A-B for Escandia using WinRHIZO^{TM}.

The area of the total root system surface (root + root hairs) was significantly increased by the N shortage treatment in both Oued Zenati and Escandia, by ca. 23% in Oued and still more importantly, by ca. 43 % in Escandia (Figure 4). The relative contribution of total naked root area and total root hair area to this increase in total root system surface area was then investigated.

The N shortage treatment was found to poorly affect total root length and total naked root surface area in Oued Zenati (Figure 5A and B), and to result in rather weak increases of these trait in Escandia (ca. 11% increase in total root length and 14% increase in total naked root area; Figure 5A and B). The ratio of the total naked root surface area to the total root length and to π (3.14) provides a parameter that can be considered as the "average" root diameter over the whole root system. This trait, similar in Oued Zenati and Escandia (ca. 0.4 mm), was not significantly affected by the N shortage treatment (Figure 5C). Thus, these results provided first evidence that the increase in total root system area due to N shortage (Figure 4) did not result from a simple increase in the size (length) of the root system and that further processes were induced in response to the nutritional stress.

In agreement with the previous local measurements of root hair length and density (Figure 3), the global analysis revealed that the total root hair surface area was significantly

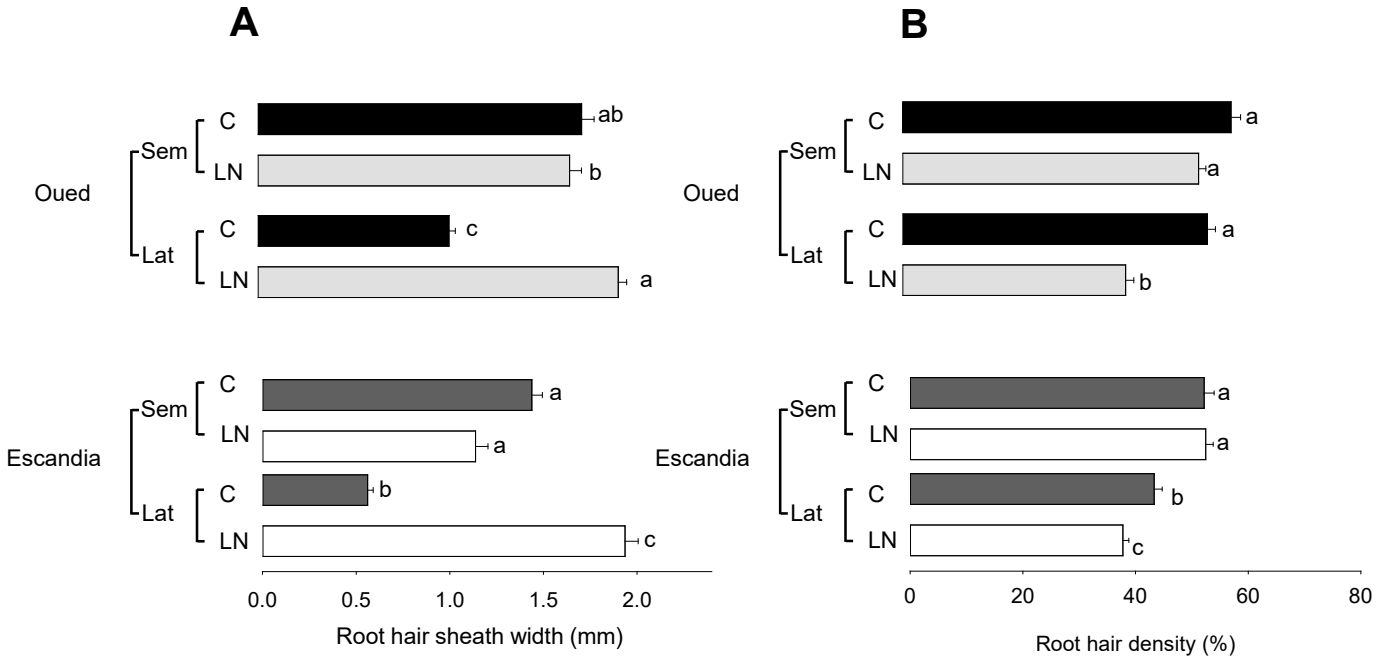


Figure 3. Effect of N deficiency on root hair length and density in Oued Zenati and Escandia: local measurements.

Oued Zenati and Escandia seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with either control (C; 11 mM assimilable N) or low N (LN; 110 µM assimilable N) solution (see legend to Figure 1).

(A) Root hair sheath length. Two or 3 representative regions of seminal and lateral roots with fully developed root hairs were analyzed for each root system as described previously (see Figure 3.12A in chapter III).

(B) Root hair density analyzed in the regions selected for root hair sheath width measurement. Root hair density is expressed as the % of root hair pixels, with respect to the total number of pixels (root hair + background pixels), along a line parallel to the root surface according to the procedure described previously (see Figure 3.12B in chapter III).

Means ± SE (n = 40). Different letters in front of histogram bars indicate statistical significance at $p<0.05$ (ANOVA)

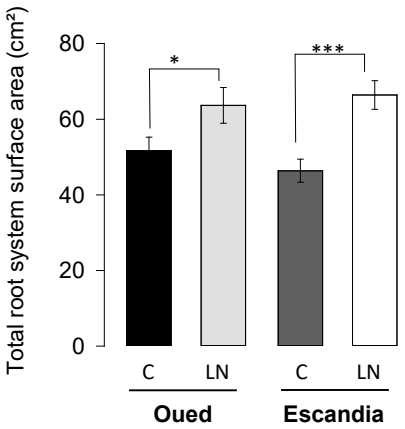


Figure 4. Effect of N deficiency on total area of the whole root system in Escandia and Oued Zenati seedlings.

Oued Zenati and Escandia seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with either control (C; 11 mM assimilable N) or low N (LN; 110 µM assimilable N) (see legend to Figure 1). Same plants as those analyzed for biomass production in Figure 1. Total root system (naked roots + root hairs) area was measured using WinRHIZO^{TM} as previously described (see chapter II, Material and Method section). Means ± SE (n =17 for Oued Zenati and 14 for Escandia). * and *** denote statistically significant differences (Student t test; $p<0.05$ or 0.005, respectively).

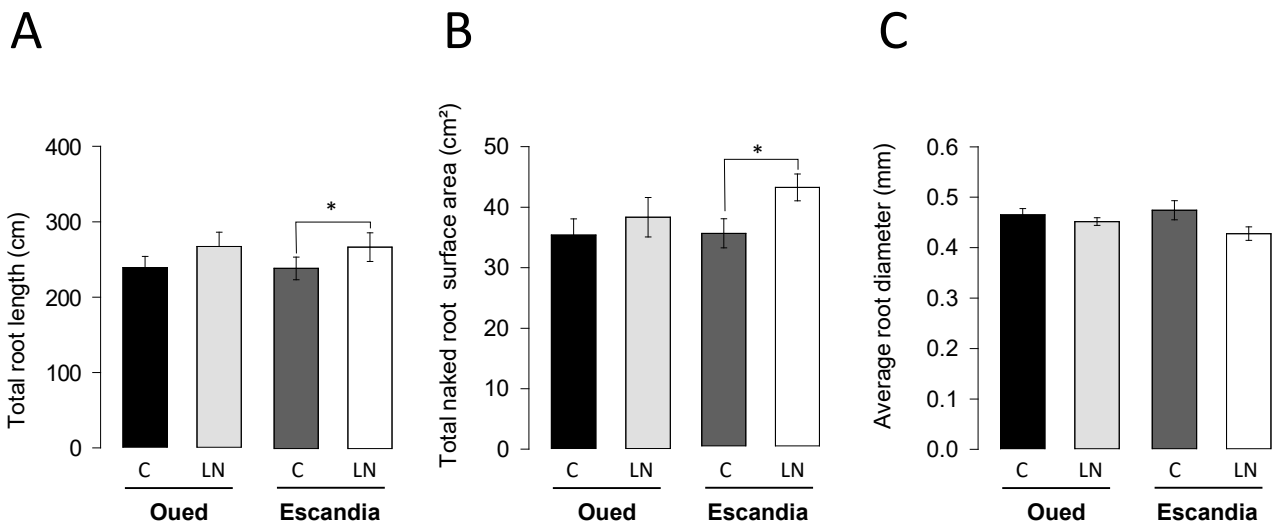


Figure 5. Effect of N deficiency on root system development in Escandia and Oued Zenati seedlings: analysis of "naked root system" global traits.

Oued Zenati and Escandia seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with either control (C; 11 mM assimilable N) or low N (LN; 110 µM assimilable N) (see legend to Figure 1). Same plants as those analyzed for biomass production in Figure 4.

(A) Total root system length (root hairs excluded).

(B) Total "naked root" surface area (area of all the roots without that of their root hairs).

(C) Average root diameter over the whole root system.

Total length of the root system (A) and total "naked root" surface area (B) were determined using WinRHIZO^{TM} as previously described (see chapter II, Material and Method section). Average root diameter over the whole root system is defined as the ratio of total "naked root" surface area to total root system length (data from panels B and A, respectively).

Means ± SE, n =17 for Oued Zenati and 14 for Escandia; *: statistically significant difference (Student t test; $p<0.05$).

increased by the N shortage treatment in both Oued Zenati and Escandia (Figure 6A), by about 55% in Oued Zenati, and by more than 2.5 times in Escandia. The ratio of root hair surface area to total root system surface area, which was always estimated to be lower than 50% in these experiments, was increased from ca. 30% to 40% in Oued Zenati, and from ca. 20% to 40% in Escandia (Figure 6B). Altogether, these data indicated that enhanced root hair development contributed to more than 70% of the corresponding increase in total whole root system surface area in both wheat accessions (Figure 6C). In other words, the root hair contribution to the increase in total root system surface area upon N shortage was at least two times larger than the naked root contribution The ratios of root hair surface area to total root length (Figure 6D) and to total naked root surface area (Supplemental Figure 3) were both significantly increased by the N shortage treatment. Altogether, these results indicate that the increase in total root system surface area in response to N shortage did not merely result from an increase in the size of the root system but was mainly due to changes in the control of root hair development.

3. DISCUSSION

3.1 Root hair traits analysed over the whole root system

Genetics evidence that root hairs significantly contribute to nitrate uptake is available in Arabidopsis (Canales *et al*., 2017; plants grown on agar plates) and maize grown in soil in greenhouse (Saengwilai *et al*., 2021). There are still however only few reports in the literature about the effect of nitrate or nitrogen availability on root hair development, which furthermore do not support the same conclusions probably due to differences between plant species, plant age and growth conditions. A reduction in external nitrate availability has been shown to increase both root hair length and density in tomato, spinach, rape (Foehse and Jungk, 1983) and in four grass species (Robinson and Rorison,1987) grown in hydroponics conditions, but to decrease these root hair traits in maize grown in aeroponics (Gaudin *et al*., 2011). In *Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype plants grown in hydroponics or on agar plates, decreasing the concentration of nitrate in the external medium resulted in decreased root hair density (Ma *et al*. 2001; Vatter *et al*., 2015; Canales *et al*., 2017), and either poorly affected root hair length in plants grown in hydroponics (Canales *et al*., 2017) or increased this trait in plants grown on agar plates (Vatter *et al*., 2015; De Passemier *et al*., 2022). In the latter growth conditions, in young seedlings (3-cm-long primary root), the decrease in root hair density due to the reduction in external nitrate availability was more than compensated by the increase in root hair length, so that the corresponding root hair area was increased (Vatter *et al*., 2015). Within the same study, the reduction in external nitrate availability was also shown to reduce root hair density

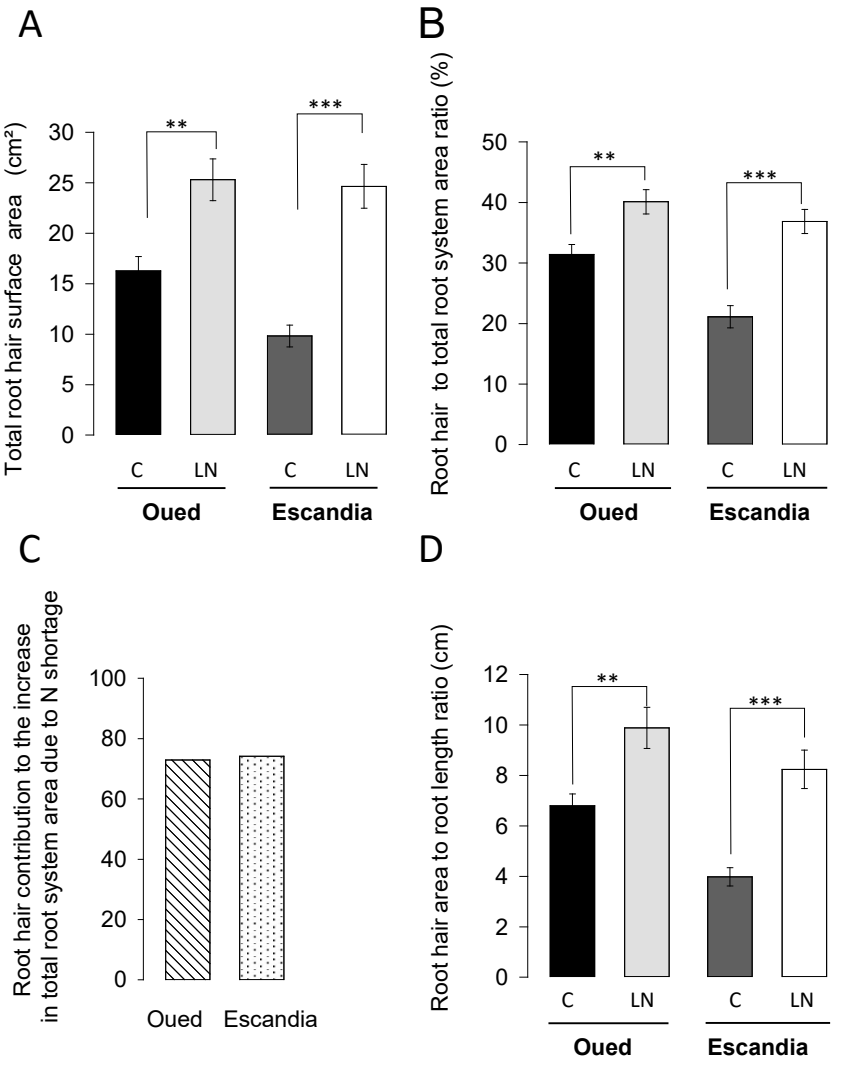


Figure 6. Effect of N deficiency on root system development in Escandia and Oued Zenati seedlings: integrative analysis of root hair responses.

Oued Zenati and Escandia seedlings were grown for 14 days in rhizoboxes watered with either control (C; 11 mM assimilable N) or low N (LN; 110 µM assimilable N) (see legend to Figure 1). Same plants as those analyzed in Figure 5.

(A) Total root hair surface area over the entire root system, determined using WinRHIZO™ as previously described (see chapter II, Material and Method section).

(B) Ratio of total root hair surface area to total root system surface area (data from panel A and Figure 4, respectively).

(C) Contribution of root hairs to the increase in total root surface area due to N shortage: ratio (in%) of the increase in total root hair area (calculated from the data shown in Panel A) to the increase in total root system surface area (calculated from the data shown in Figure 4).

(D) Ratio of total root hair area to total root system length (data from panel A and Figure 5A). Means ± SE (n =17 for Oued Zenati and 14 for Escandia). ** and *** denote statistically significant differences (Student t test; $p<0.01$ or 0.005 respectively).

in two other Arabidospsis ecotypes, Sha and Tsu-0, but to be without significant effect on root hair length in these plants (Vatter *et al*., 2015). In older Arabidopsis plants (2-week-old; primary roots approximately 10-15 cm long), reduced nitrate availability resulted in an increase in mean root hair length in most Arabidopsis ecotypes tested, including Col 0 and Tsu 0 (Sha being not included in this study) (De Passemier *et al*. 2022). Besides these differences between Arabidopsis accessions, it has also been shown that the sensitivity of root hair development to the availability of assimilable nitrogen in the external medium is modulated by the nature of the nitrogen source, NO_3^- or NH_4^+, in the medium (Bai *et al*., 2014; Vatter *et al*., 2015; Jia and von Wiren, 2020). Altogether, these results also indicate that the growth conditions and plant age are also likely to affect the observed responses of root hair development to nitrogen availability (see also Gaudin *et al*., 2011, and Saengwilai *et al*., 2021).

In the present study, root hair traits were investigated in 2-week-old wheat seedlings displaying 20- to 30 cm-long seminal roots. N was essentially available as nitrate (90% NO_3^-, 10% NH_4^+), as it is often the case in agricultural soils (Saengwilai *et al*., 2021).The external concentration of nitrogen (NO_3^- + NH_4^+) was either 10 mM (agriculturally relevant concentration; (Jia et Von Wirén., 2020; Marschner,1986) or 100 µM (a concentration that actually resulted in nitrogen starvation as evidenced by the strong decrease in shoot biomass; Figure 1A). High-resolution scans of the root system grown over the dark tissue directly provided high quality images, whose segmentation using Ilastic was efficient and rather straightforward.

Long and dense root hairs could be observed even in regions rather old and far from the corresponding root tip. The images also showed heterogeneities in root hair length and density. Altogether, these observations indicated that the classical model of a few-cm-long root hair zone that moves, because of the short life of individual root hairs, by continuously changing its place following the growth of the root apex (Hofer, 1996; Jungk, 2001), does not describe root development in our experimental conditions (and in those used by Goron *et al*., 2015).

The global analysis of root hair development we have carried out, aimed at assessing the total area of root hairs over the whole root system, provides objective information because it integrates local heterogeneities in root hair length and density that can occur even over short distances along the roots, and avoids subjective or random selection of representative locations for measurement. Clearly however, local measurements can also be carried out and provide stimulating information since, for instance, the data shown in Figure 3 reveal that root hair length and density, and the sensitivity of these traits to N shortage, can differ between seminal and lateral roots. Thus the post-embryonic lateral roots appear to be more plastic in response to N shortage than the embryonic primary root or seminal roots. It is also worth to note that the data shown in Figure 3 indicate that the N-shortage induced decrease in root hair density in lateral roots was more than compensated by the increase in root hair length.

The global analysis procedure revealed that N shortage resulted in a strong increase in total root hair area, by about 55% in Oued Zenati and by more than 2.5 times in Escandia. The contribution of total root hair area to total root system area, close to 34% in Oued Zenati and 21% in Escandia under control conditions, was significantly increased by N shortage, reaching then approximately 40% of the total root system area in the two wheat accessions (Figure 6B). The ratio of root hair area to total root system length was also considerably increased, by ca. 28% in Oued Zenati and 74 % in Escandia. Altogether, these results indicated that adaptation to low nitrogen availability resulted in increased root hair production, and thus involved altered developmental processes within the leaf epidermis.

3.2 Comparison of the responses of the two wheat accessions to nitrogen starvation

Upon N shortage, both Oued Zenati and Escandia displayed a significant increase in root to shoot biomass ratio (Figure 1C), in total root system surface area (Figure 4), in total root hair area (Figure 6A) and in the ratios of total root hair area to total root system surface area (Figure 6B) and total length of the root system (Figure 6B and D, respectively). Interestingly, the variations induced by N shortage of each of these global parameters were always relatively larger in Escandia than in Oued Zenati. Furthermore, only in Escandia were root biomass, total length of the root system and total naked root area significantly increased by the N shortage treatment (Figures 1B, 5A and 5B). Altogether, these results provide evidence that the root system of Escandia displays more plasticity under nitrogen shortage than that of Oued Zenati.

4. Conclusion

As a prerequisite of nutrient uptake, the root surface has to be in contact with the soil solution. The total area of the root system is thus a major determinant of nutrient uptake capacity. Root hairs increase this area with a modest biomass investment (Bates and Lynch., 2000b) and specialize in nutrient uptake (Rongsawat *et al*., 2021; Bienert *et al*., 2021). The present analysis reveals a strong increase in total root hair area of the entire root system in response to nitrogen shortage. In contrast, the total length of the root system and the total naked root surface area were not significantly affected in Oued Zenati, and only weakly increased in Escandia. Altogether, these results indicate that the major consequence of nitrogen shortage, at least quantitatively in terms of root surface area in contact with the substratum, is an increase in root hair area production. Thus, unprecedented information on root system adaptation to N starvation, likely to be of interest for plant breeders, was provided by global analyses including root hairs.

5. MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed using the same rhizobox-type device according to the same experimental protocol and in the same environmental conditions as in previous experiments aimed at analyzing the plant responses to low P (chapter 4) or low K (chapter 5) availability in terms of root and root hair development. Images of root systems (scans) were taken after 14 days of growth in the rhizobox devices as previously, and image analysis was carried out according to the same procedures.

5.1 Plant material and growth conditions

Two wheat genotypes were phenotyped, a landrace and an ancestral genotype: *Triticum turgidum spp. durum* cv. Oued Zenati (Oued), and *Triticum turgidum L. spp. dicoccum* cv. Escandia (Escandia), reaspectively.

Seeds of similar size were selected and then surface sterilized in a 4% calcium hypochlorite solution. Pots containing the seeds and sterilization solution were placed under vacuum for 20 minutes, this step aims to remove air bubbles potentially trapped in the seed crease and preventing the solution to be in direct contact with seed surface. The seeds were then washed 5 times in sterile distilled water and then soaked in sterile hot water (about 40 °C; 20 ml for about 10 seeds) in a sterile plastic container that was transferred to 26 °C in the dark for about 16 h. The latter treatment was found to stimulate seed germination.

Germinated seeds (seeds showing primary root emergence) were transferred to sterile moistened filter paper in a Petri dish and coated with a wax containing 0.1% oxyquinoline fungicide (Staehler PP 140, Chauvin-Agro) to prevent fungal contamination during the growth period in rhizobox. Coated seeds were placed with the primary emerged root facing downward) in the rhizobox-type device as previously described (Madani *et al*., 2022;-submitted), briefly the rhizobox is constructed of a polyurethane foam board (width/height/thickness in mm: 260/320/15) bagged in a non-putrescible black, hydrophilic, water and microbe-permeable polyester fabric, The board (bagged in the fabric) is placed between two transparent glass plates. Each glass plate is covered with an opaque board that protects the root systems from light. The roots grow between the polyester fabric and the glass plate. One rhizobox allow to grow two plants simultaneously, one on each side. Laterally placed aluminum spacers (2 mm thick and 20 mm wide) ensure a constant spacing (2 mm) between the glass plate and the black fabric (Supplemental Figure 1A-C). Nutrient solution is provided by an automatic device (Supplemental Figure 1D), with the solution dropped on top of the polyurethane foam plate, which acts as a reservoir of nutrient solution inside the rhizobox, moistening the polyester fabric on which the roots develop.

The Rhizobox were then randomly arranged in the phenotyping platform in a growth chamber (16 h of photoperiod,150 µE of light intensity, day/night temperature 22/20 ˚C, 70% air humidity).

The rhizoboxes were first irrigated (irrigation rate: 1.5 ml every 10 minutes) for 3 days with deionized water and then for 11 days with a modified Hoagland solution containing either 11 mM assimilable N (control solution: 1 mM NH_4NO_3, 5 mM KNO_3 and 2 mM $Ca(NO_3)_2$) or 110 µM assimilable N (low N solution; 10 µM NH_4NO_3 and 100 µM KNO_3). Both solutions conatained 1 mM KH_2PO_4, 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM NaFe(III)EDTA,12.5 µM H_3BO_3, 2 µM $MnCl_2$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.5 µM CuSO4, 0.1 µM Na_2MoO_4, and 0.1 µM $NiSO_4$. The reduction in the concentration of KNO_3 and $Ca(NO_3)_2$ in the LN solution, when compared to the control solution, was compensated by the addition of 4.9 mM KCl and 2 mM $CaCl_2$ so that the concentrations of K^+ and Ca^{2+} were the same in both solutions, 1 mM NaCl was added in the control solution.

5.2 Image acquisition and segmentation

Fourteen days old root system was scanned through the transparent glass plate of the rhizobox-type device using a flatbed scanner (Epson Perfection V850 pro; resolution 24 bits/1200 dpi). The obtained root images were processed with Ilastik software (Berg *et al*., 2019) in order to perform root segmentation from the background. The segmentation was performed using the predefined “pixel classification workflow”. We trained the program to distinguish the background (pattern of the fabric) from the roots and root hairs using manual annotation/labeling, the selected parameters were "Gaussian Filter, Color/Intensity, Edge, and Texture", with sigma value less than 0.7 to extract fine details like root hairs. The eight-bit segmented images thereby obtained were directly analyzed using bio-image analysis softwares.

5.3 Image analysis

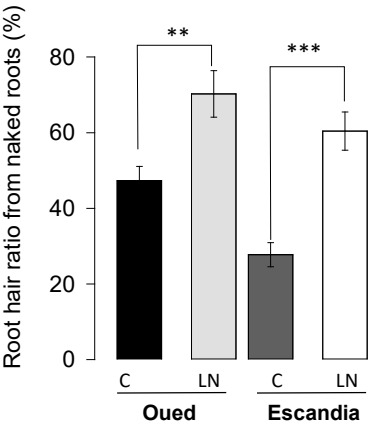
Segmented root images were analyzed using WinRHIZO™ (V.2009 Pro, Regent Instruments, Montreal, QC, Canada) and ImageJ (version 1.53) (Abràmoff *et al*., 2005).

Global morphometric root traits such as total root length, total root system (roots + root hairs) area, total naked (without root hair) root area and total root hair area were obtained using WinRHIZO™, by defining two classes of root diameter (user arbitrary definition) within this software: diameter smaller than 0.20 mm, or larger than 0.2 mm. Root elements identified as belonging to the thinnest diameter class (< 0.2 mm) were found to essentially correspond to root hairs. The threshold of 0.2 mm was chosen, based on trial error correction tests, to take

into account that, when root hair density is high along a region of the root system, the projected areas of several root hairs can overlap.

ImageJ was used to obtain operational estimates of root hair length and density according to the procedures described previously (Chapter 3, Figure12). For root hair length, two lines were drawn parallel to each other and to the surface of the analysed root segment, the first one just along the surface of the root segment and the second one crossing the tips of the root hairs appearing as the longest ones in the image (2D scan of a 3D object). The distance between the two lines, named w for root hair sheath width, is taken as an operational estimate of the average root hair length in the corresponding root segment. For root hair density, a line was drawn parallel to the root surface at a distance of about w/2, i.e. half of the root hair sheath width. The number of root hairs crossed by a line drawn parallel to the root surface can be considered to be proportional to the number of white pixels crossed by this line since all root hairs appear to have the same diameter. We directly used the percentage of white pixels intercepted by the line, N_W%, as an operational estimate, named *d*, of root hair density. N_W% can be obtained directly from the "grey value average", m_{grey} obtained using ImageJ for the pixels intercepted by the line. In the 8-bit coded image (white and black pixel color code: 255 and 0, respectively), $N_W\% = 100\ m_{grey}/255$).

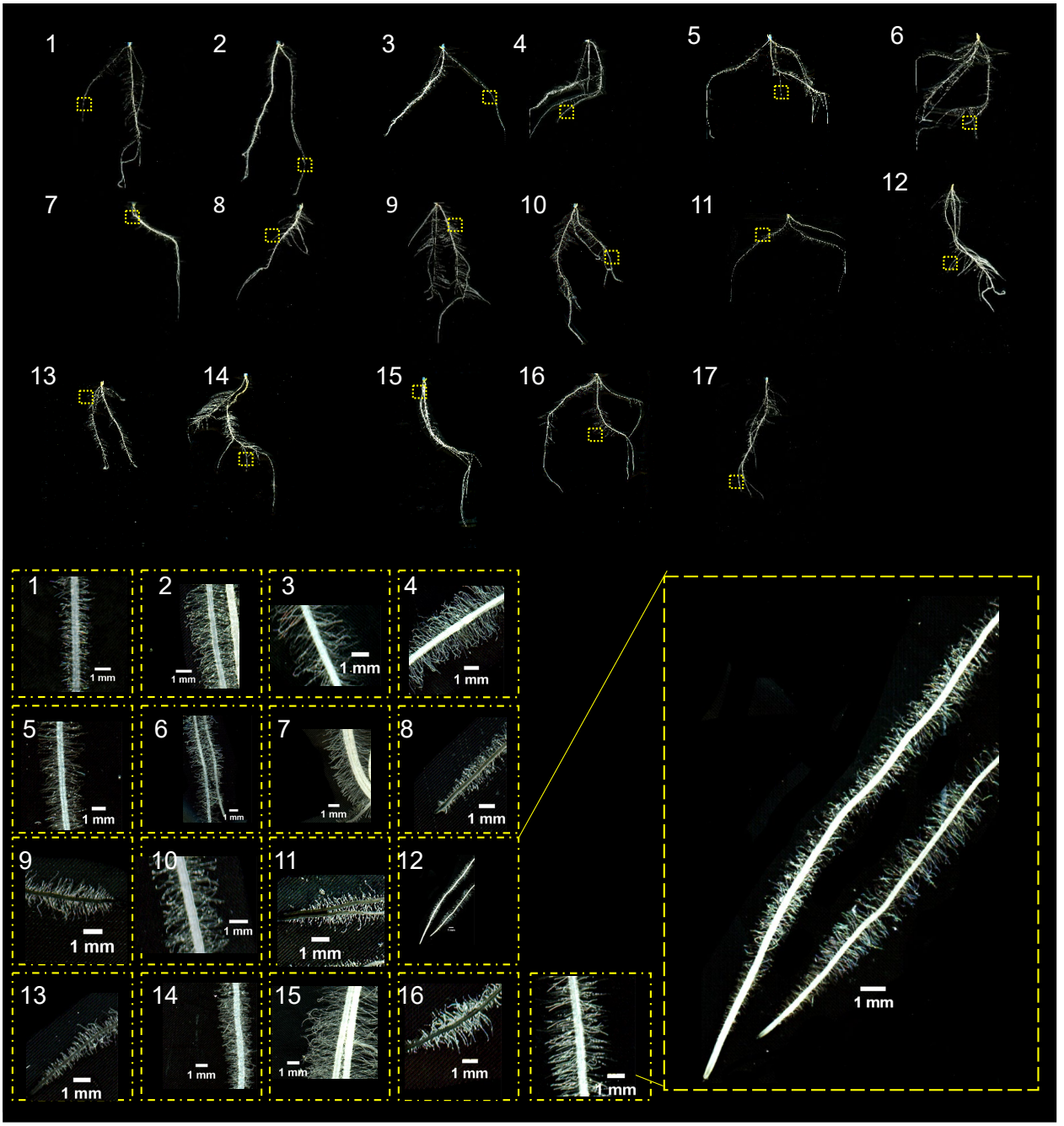
Supplementary data



Supplemental Figure 5. Effect of N deficiency on root system development in Escandia and Oued Zenati seedlings: ratios of total root hair area to total naked root area.

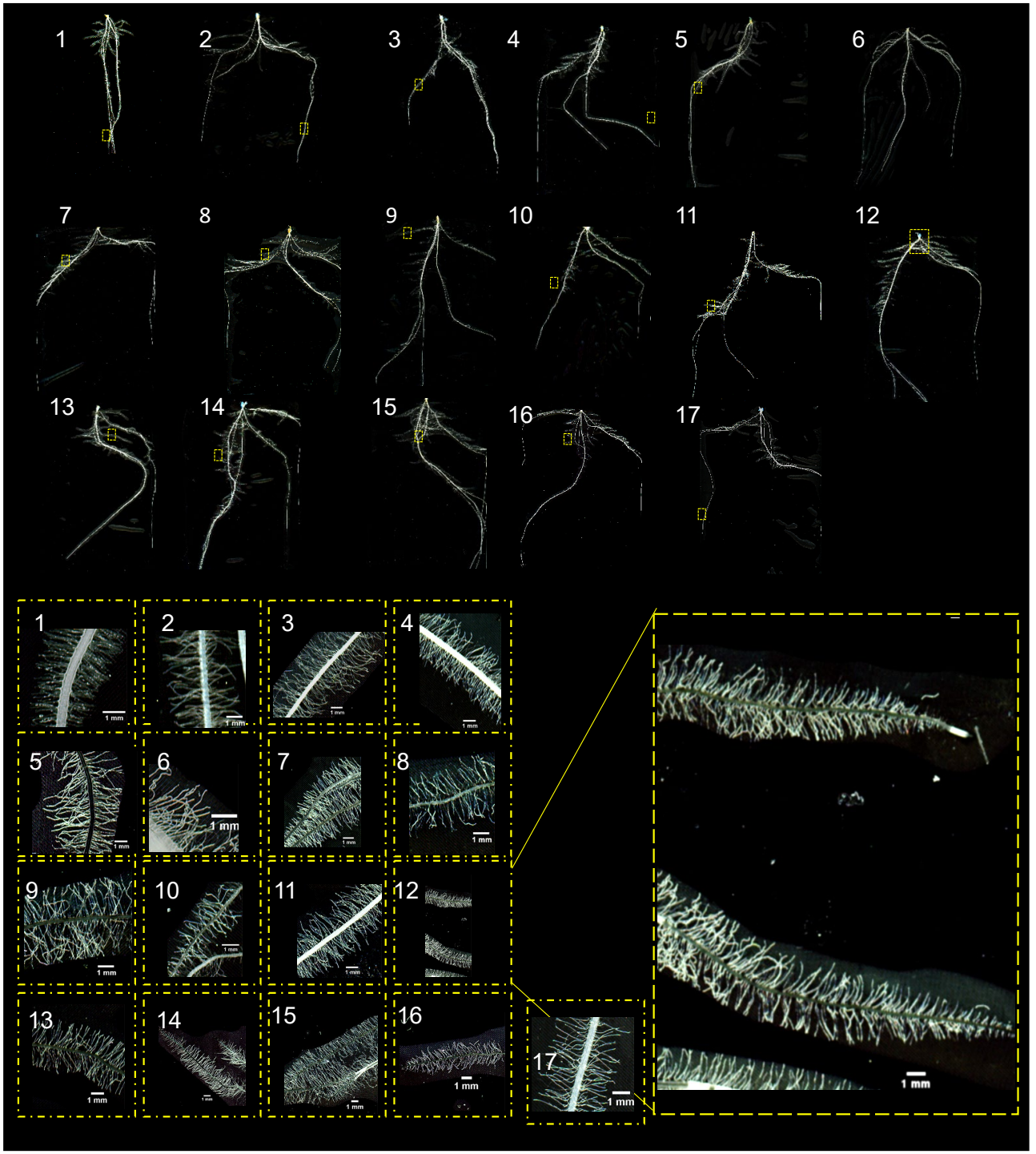
The ratios (expressed in %) are those obtained from the data shown in Figure 6A total root hair surface area) and Figure 5B (Total naked root surface area).

Means ± SE (n =17 for Oued Zenati and 14 for Escandia). ** and *** denote statistically significant differences (Student t test; $p<0.01$ or 0.005 respectively).



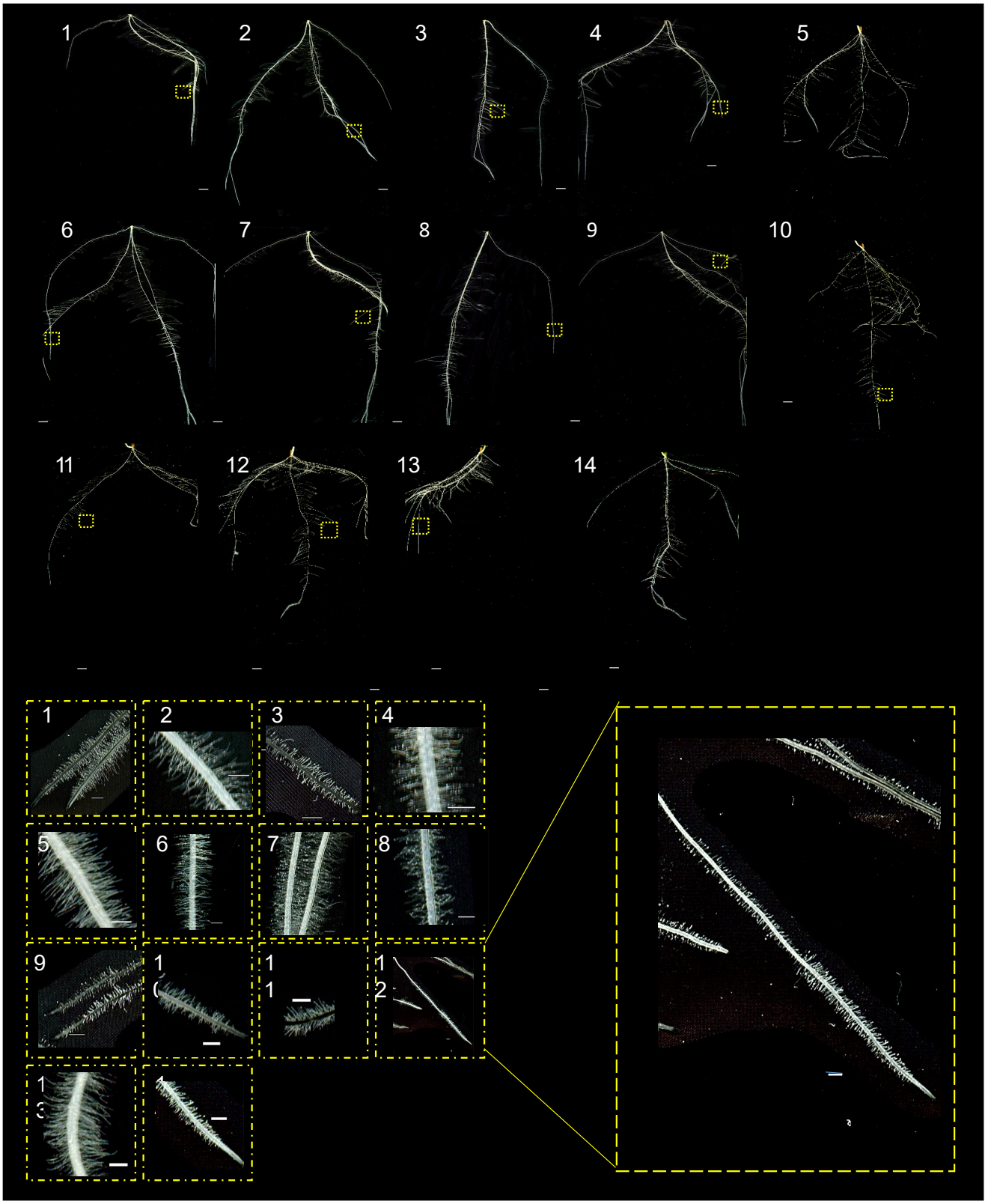
Supplemental Figure 1. Root systems of Oued Zenati wheat seedlings grown for 14 days in control condition (11 mM assimilable N in the watering solution).

The solution contained 1 mM NH_4NO_3, 5 mM KNO_3 and 2 mM $Ca(NO_3)_2$. The plants were grown for 14 days in rhizobox-like devices. Root systems of 17 plants (upper panels) and enlargements of the root segment localized by the square in each of the 17 root systems. Numbers in the lower panels refer to the n 1um7ber of the root system in the upper panels. White bars: 1 cm in the upper panels, and 1 mm for the enlargements.



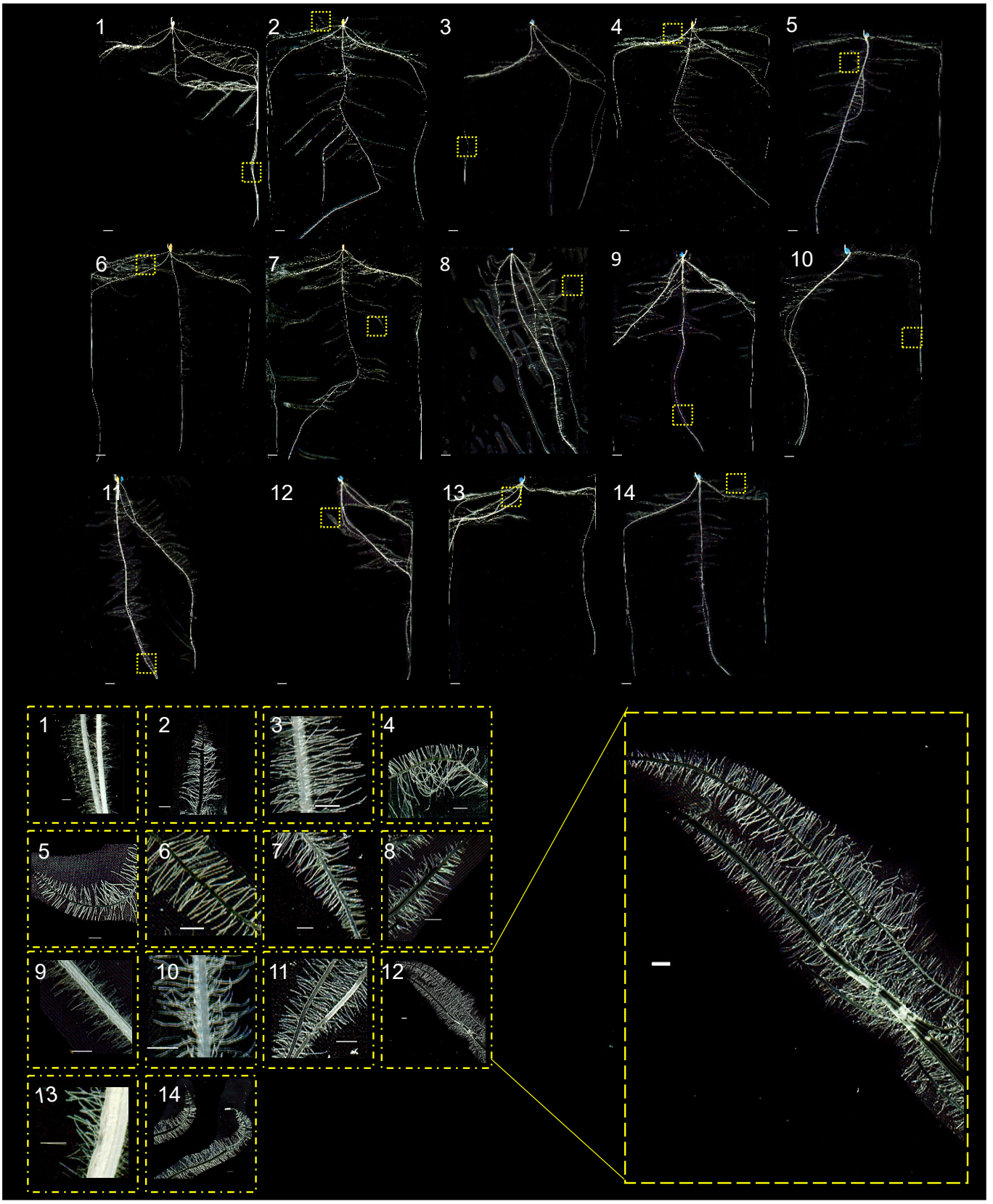
Supplemental Figure 2. Root systems of Oued Zenati wheat seedlings grown for 14 days in low N (LN) condition (110 µM assimilable N in the watering solution).

The LN solution contained 10 µM NH_4NO_3 and 90 µM KNO_3, the concentrations of K^+ and Ca^{2+} being maintained at the same values than those of the corresponding concentrations in the control solution (see legend to Supplemental Figure 1) by addition of KCl and CaCl2. The plants were grown for 14 days in rhizobox-like devices. Root systems of 17 plants (upper panels) and enlargements of the root segment localized by the square in each of the 17 root systems. Numbers in the lower panels refer to the number of the root system in the upper panels. White bars: 1 cm in the upper panels, and 1 mm for the enlargements.



Supplemental Figure 3. Root systems of Escandia wheat seedlings grown for 14 days in control condition (11 mM assimilable N in the watering solution).

The solution contained 1 mM NH_4NO_3, 5 mM KNO_3 and 2 mM $Ca(NO_3)_2$. The plants were grown for 14 days in rhizobox-like devices. Root systems of 17 plants (upper panels) and enlargements of the root segment localized by the square in each of the 14 root systems. Numbers in the lower panels refer to the number of the root system in the upper panels. White bars: 1 cm in the upper panels, and 1 mm for the enlargements.



Supplemental Figure 4. Root systems of Escandia wheat seedlings grown for 14 days in low N (LN) condition (110 µM assimilable N in the watering solution).

The LN solution contained 10 µM NH_4NO_3 and 90 µM KNO_3, the concentrations of K^+ and Ca^{2+} being maintained at the same values than those of the corresponding concentrations in the control solution (see legend to Supplemental Figure 1) by addition of KCl and $CaCl_2$. The plants were grown for 14 days in rhizobox-like devices. Root systems of 14 plants (upper panels) and enlargements of the root segment localized by the square in each of the 17 root systems. Numbers in the lower panels refer to the number of the root system in the upper panels. White bars: 1 cm in the upper panels, and 1 mm for the enlargements.

Chapitre 7

Discussion générale et perspectives

Chapitre 7

Discussion générale et perspectives

7.1. Introduction

En absence de fertilisation du sol, la faible disponibilité, par rapport aux besoins de la plante, des macro-éléments minéraux nutritifs N, P et K limite fortement le rendement des cultures. L'apport d'engrais peut permettre de corriger des carences en ces macro-éléments et ainsi stimuler fortement le rendement de la culture, mais à des coûts économiques et environnementaux importants, avec aussi pour conséquence l'épuisement relatif de certaines ressources naturelles, dont les mines de phosphate. Il existe aujourd'hui un consensus pour considérer à la fois que ce type de modèle agricole n'est pas durable, mais aussi qu'il n'est pas possible de l'abandonner sans trouver des solutions "d'intensification écologique" permettant d'assurer des rendements agricoles suffisants et la sécurité alimentaire mondiale. Dans ce contexte, une meilleure compréhension de la fonction de nutrition minérale du système racinaire apparait comme un des objectifs majeurs des recherches en biologie végétale, afin de mieux exploiter la variabilité de la capacité de croissance sur des sols pauvres observée entre espèces, et même entre variétés au sein des espèces cultivées. Un article pionnier dans ce domaine, résumant la problématique et décrivant les objectifs généraux des efforts de recherche à consentir, a eu pour titre "*Roots of the second green revolution*" (Lynch, 2007).

Dans le cadre de ces efforts consentis pour mieux comprendre les déterminants majeurs de la capacité et de l'efficacité de l'exploitation du sol par les racines, des travaux fondamentaux ont été consacrés à l'analyse du développement et de l'architecture du système racinaire, avec différents protocoles de culture de la plante, d'imagerie du système racinaire et d'analyse des images. En interaction avec de tels travaux conduits au niveau fondamental, souvent en laboratoire, des investissements importants ont été réalisés pour développer des plateformes de phénotypage à haut-débit du système racinaire. De façon générale cependant, les méthodologies de phénotypage racinaire utilisées dans ces différents types d'approche sont le plus souvent consacrées à l'analyse du système racinaire en termes de développement, de morphologie et d'architecture, et s'intéressent moins à la "couverture" du système racinaire par les poils absorbants. Cela s'est traduit, par exemple, par le fait que les méthodologies d'imagerie des plateformes de phénotypage racinaire à haut débit n'ont pas eu pour objectif d'inclure, dans leur cahier des charges, la visualisation des poils absorbants et l'analyse de la "pilosité" globale du système racinaire. Il est par contre largement démontré

que les poils absorbants augmentent le volume de sol exploré par les racines et contribuent significativement au prélèvement des ions nutritifs. Dans ce contexte, les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont eu pour objectif de s'intéresser plus particulièrement aux poils absorbants et à leur contribution à la surface de la totalité du système racinaire, avec comme idée sous-jacente que la surface de l'interface racine-sol est un déterminant important de la capacité de prélèvement des ions nutritifs.

Pour cela, je me suis impliquée dans le développement d'un dispositif de type rhizobox permettant d'obtenir des images suffisamment résolues pour pouvoir analyser le développement des poils absorbants sur des systèmes racinaires entiers. En résumé, les racines se développent dans un espace de format A4, à la surface d'un tissu sombre tendu à une distance de 2 mm d'une plaque de verre à travers laquelle se fait l'acquisition de l'image à l'aide d'un scanner. Le tissu est maintenu humide par une plaque de polyuréthane, ensachée dans le tissu et périodiquement arrosée par un dispositif automatique. J'ai présenté dans le chapitre 3 les différents développements méthodologiques que j'ai effectués, à partir d'un prototype initial, pour aboutir au dispositif actuel. Parallèlement à ce travail méthodologique sur le dispositif de culture, j'ai mis au point la démarche informatisée permettant la segmentation et l'analyse des images à partir de logiciels *ad hoc*, Ilastik, ImageJ et WinRHIZO^{TM} en particulier (*Cf.*, chapitre 3, § 3.8 et 3.9). L'ensemble de ce travail m'a permis d'obtenir et analyser des images de systèmes racinaires sans équivalents, me semble-t-il, dans la littérature.

J'ai ensuite utilisé cette méthodologie pour étudier les réponses du système racinaire de plantules de blé à une "carence" en phosphate, en potassium ou en azote. J'ai présenté et discuté les résultats correspondants dans les chapitres 4, 5 et 6, pour respectivement les carences en P, K et N. Les chapitres 4 et 5 se présentent sous la forme de manuscrits soumis pour publication, et le chapitre 6 a été préparé sous la forme d'une première ébauche d'un manuscrit à soumettre.

A l'issue de ce travail sur chacun des 3 macro-éléments N, P et K, je vais analyser de façon synthétique maintenant l'ensemble des résultats obtenus (§ 7.2 ci-dessous). Je commencerai par comparer les résultats correspondant aux traitements contrôles (§ 7.2.1), réalisés systématiquement dans les expériences concernant successivement les carences en P, K et N, puisque ces contrôles correspondent tous aux mêmes conditions expérimentales, avec en particulier l'utilisation de la même solution nutritive complète (*Cf.* chapitre 2) (la comparaison a alors à dessein d'évaluer la répétabilité et la diversité entre les 2 variétés de blé). Je m'intéresserai ensuite (§ 7.2.2) à analyser de façon comparative les réponses du système racinaire à chacune des 3 carences, en P, K et N. Je formulerai ensuite des perspectives que mon travail peut offrir dans le domaine de l'analyse des réponses développementales du système racinaire à son environnement abiotique et biotique (§ 7.3).

7.2. Analyse comparative des réponses des accessions Oued Zenati et Escandia aux traitements de carence LK, LP et LN

7.2.1 Analyse des données obtenues dans les différents traitements contrôles

Les traitements « contrôles » effectués au sein des expériences concernant les effets de la carence en Pi (chapitre 4), en K (chapitre 5) et en N (chapitre 6) sont appelés respectivement CP, CK et CN.

La figure 7.1 compare les biomasses (poids sec) des parties racinaires (Figure 7.1A) et foliaires (Figure 7.1B) des plantes contrôles de ces 3 expériences, et les rapports de la biomasse racinaire à la biomasse foliaire (Figure 7.1C).

Concernant les racines, les valeurs de biomasse racinaire sont comprises entre 15 et 20 mg environ par plante (Figure 7.1A), ce qui correspond à approximativement 30% à 40% de la biomasse foliaire de la plante (Figure 7.1C). Les variations de la biomasse racinaire entre la plus forte et la plus faible valeur observée entre les 3 contrôles (CP par rapport à CK chez Oued Zenati, et CN par rapport à CP chez Escandia) sont inférieures à 13% chez Oued Zenati, et 5% chez Escandia. Aucune de ces différences n'est statistiquement significative. De même, aucune des différences concernant la biomasse foliaire et le rapport des biomasses racinaires et foliaires n'est statistiquement significative, ni chez Oued Zenati ni chez Escandia.

La figure 7.2 compare, entre les contrôles CK, CP et CN, les valeurs des paramètres majeurs utilisés dans notre méthodologie de phénotypage, à savoir la totalité de la surface du système racinaire (Figure 7.2A), la totalité de la surface du "corps racinaire nu" (système racinaire sans les poils absorbants) (Figure 7.2B), la totalité de la surface des poils absorbants sur le système racinaire entier (Figure 7.2C), et le rapport de la totalité de la surface des poils absorbants à la totalité de la surface du système racinaire (Figure 7.2D). Aucune des variations observées entre les traitements contrôles CK, CP et CN pour chacun de ces 4 paramètres n'apparait comme statistiquement significative, chez aucune des deux accessions Oued Zenati et Escandia.

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que le dispositif de type rhizobox que nous avons développé assure une bonne "répétabilité" des observations, à la fois en termes de biomasse des plantes et de traits phénotypiques racinaires, dans des conditions de croissance des plantes qui peuvent être considérées comme relativement physiologiques, puisque les plantes cultivées dans ces "rhizobox" présentent des biomasses racinaires et foliaires semblables à celle de plantes cultivées dans du terreau dans la même chambre de culture, (*Cf.* chapitre 3, Figures 3.6).

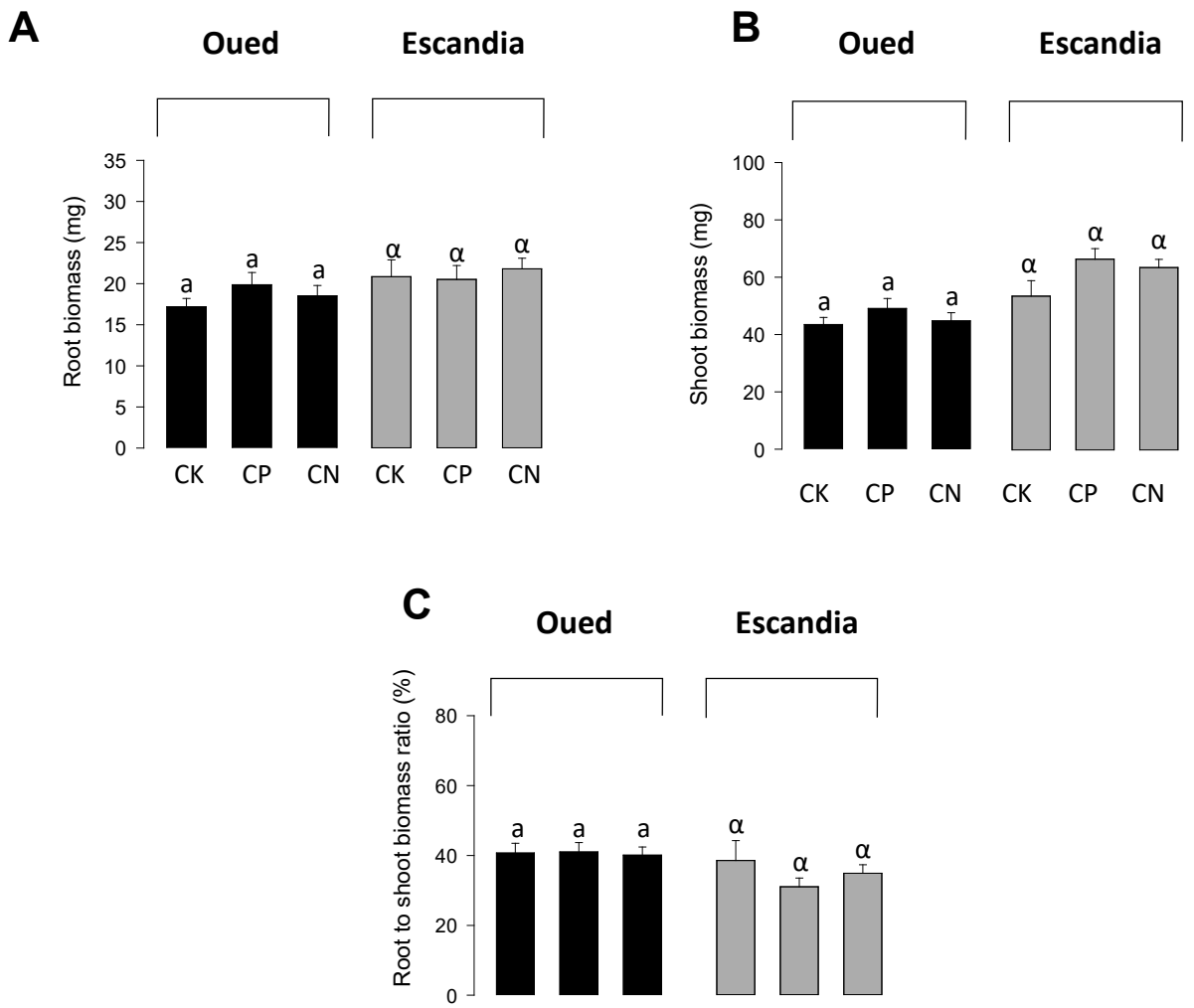


Figure 7.1. Comparaison des biomasses des parties racinaires et foliaires, et du rapport entre la biomasse racinaire et aérienne, chez les 3 séries de plantes CK, CP et CN utilisées comme contrôles dans les traitements inducteurs de carences en K, P ou N.

(A) Biomasse racinaire.

(B) Biomasse foliaire.

(C) Rapport de la biomasse racinaire à la biomasse foliaire (exprimé en % de la biomasse foliaire).

Les valeurs des biomasses sont celles obtenues pour les plantes contrôles (arrosées avec une solution nutritive complète) au cours de l'analyse des effets de la carence en K, P ou N (chapitres 5, 4 et 6, figures 3, 4 et 1, respectivement). La présence de lettres identiques au-dessus des barres des histogrammes indique que les différences ne sont pas significatives (test ANOVA, $p>0,05$, réalisé indépendamment pour chaque accession).

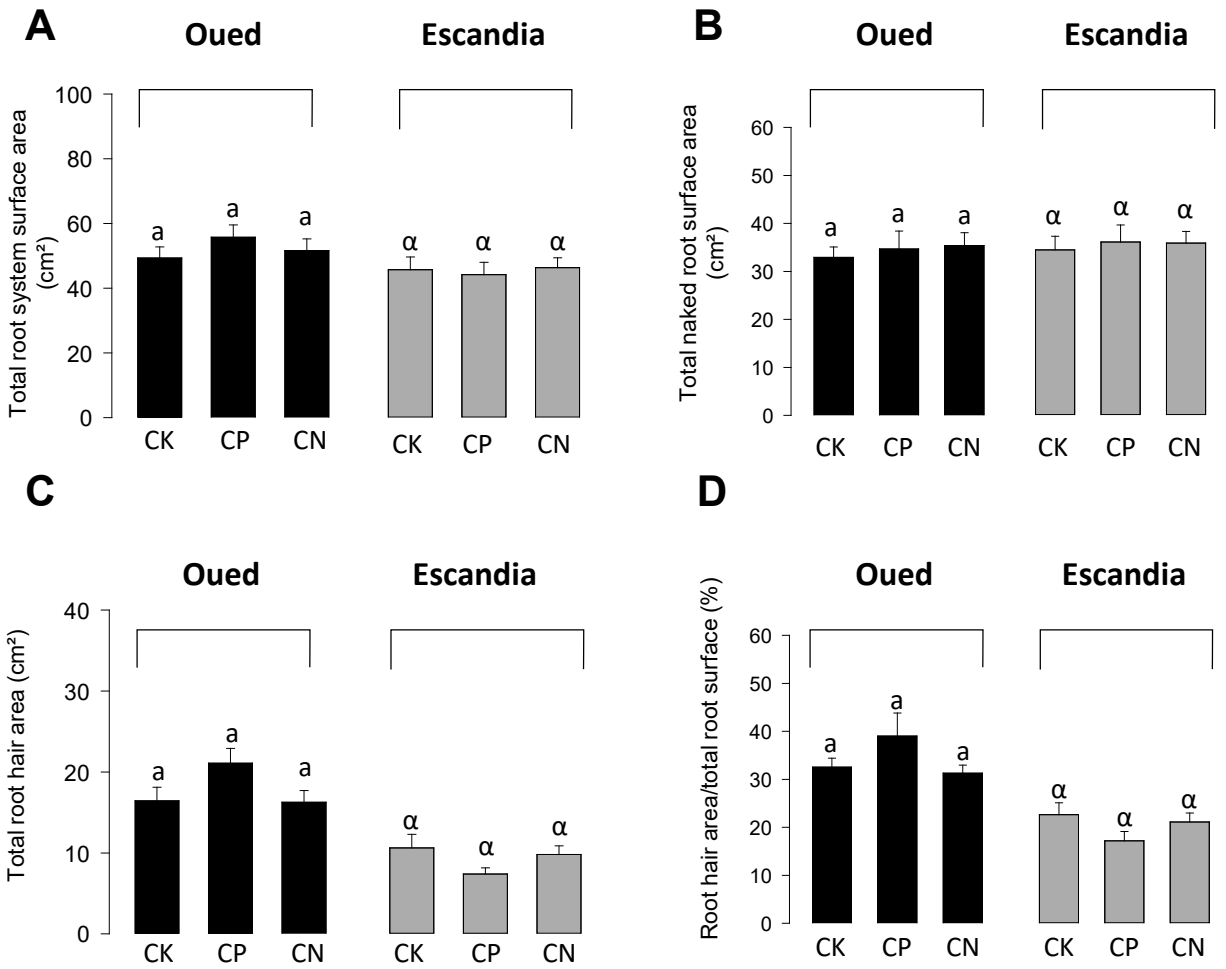


Figure 7.2. Comparaison du phénotype racinaire des plantes CK, CP et CN utilisées comme contrôles dans les traitements inducteurs de carences en K, P ou N.

(A) Surface de la totalité du système racinaire (poils absorbants inclus).

(B) Surface du "corps racinaire nu" (système racinaire sans ses poils absorbants).

(C) Surface totale des poils absorbants du système racinaire entier.

(D) Rapport de la surface totale des poils absorbants à la surface totale du système racinaire.

Les données sont celles obtenues pour les plantes contrôles (arrosées avec une solution nutritive complète) au cours de l'analyse des effets de la carence en K, P ou N (chapitre 5 (Figures 5 et 7), chapitre 4 (Figure 4), chapitre 6 (Figures 5 et 6)). La présence de lettres identiques au-dessus des barres des histogrammes indique que les différences ne sont pas significatives (test ANOVA, $p>0,05$, réalisé indépendamment pour chaque accession).

7.2.2. Comparaison des effets des traitements de carence en K, P et N sur les traits racinaires phénotypés

Les traitements utilisant des solutions nutritives faiblement concentrées en potassium (60 µM; chapitre 5), phosphate (2 µM; chapitre 4) et azote (110 µM; chapitre 6) sont respectivement appelés LK, LP et LN ci-dessous. Les Figures 7.3 et 7.4 rassemblent l'ensemble des données concernant les conséquences, chez Oued Zenati et Escandia, des traitements LK, LP et LN sur la biomasse racinaire et foliaire (Figure 7.3) et sur les traits phénotypiques racinaires analysés de façon globale dans mon approche (Figure 7.4).

Au cours de l'analyse de ces données dans les chapitres précédents, nous avons conclu que chacun des traitements LK (chapitre 5), LP (chapitre 4) et LN (chapitre 6) se traduisait effectivement par un stress nutritionnel. Ces trois stress ont cependant des impacts différents sur la croissance des plantes, en termes de production de biomasse racinaire et foliaire qui peuvent varier selon l'accession, Oued Zenati ou Escandia. Par exemple, les stress LK et LP provoquent une réduction de la biomasse foliaire chez Oued Zenati, mais pas chez Escandia (Chapitre 5, Figure 3 pour LK, et chapitre 4, figure 4 pour LP), alors que le stress LN provoque une réduction de ce paramètre chez les deux accessions (Chapitre 6, Figure 1). La biomasse racinaire n'est pas affectée par le stress LK chez les deux accessions de blé (Chapitre 5, Figure 3), ni par le stress LP chez l'une de ces deux accessions, Oued Zenati (chapitre 4, Figure 4), alors qu'elle a été augmentée par ce stress et par le stress LN chez Escandia (chapitre 4, Figure 4, et chapitre 6, Figure 1). Enfin, le stress LN est celui qui diminue le plus la biomasse foliaire, en particulier chez Oued Zenati, mais aussi chez Escandia, à quasi-égalité avec le traitement LK (Figure 7.3B). Il est aussi celui qui conduit à la plus forte augmentation du rapport de la biomasse racinaire à la biomasse foliaire (Figure 7.3C). En conclusion, les trois traitements LK, LP et LN, comparés aux traitements contrôles correspondants, se distinguent l'un de l'autre par leurs effets sur la production de biomasse racinaire et/ou foliaire des plantes. Ces différences traduisent probablement, au moins en partie, le fait que les carences en K, P et N provoquées par la diminution de la disponibilité du potassium, du phosphate et de l'azote assimilable dans la solution extérieure (concentrations de 60 µM, 2 µM et 110 µM respectivement dans les traitements LK, LP et LN) n'engendrent pas un stress nutritif de même "intensité", par rapport aux besoins de la plante pour sa croissance. Il est aussi possible que chacun de ces stress se développe selon une cinétique qui lui est propre et qui dépende, par exemple, des réserves initiales de la graine. Enfin, chacune de ces carences est susceptible d'affecter la physiologie de la plante selon des processus distincts. Par exemple, il a été montré que la carence en K^+ se traduit par un défaut de transport à longue distance des assimilats, des feuilles vers les racines par le phloème

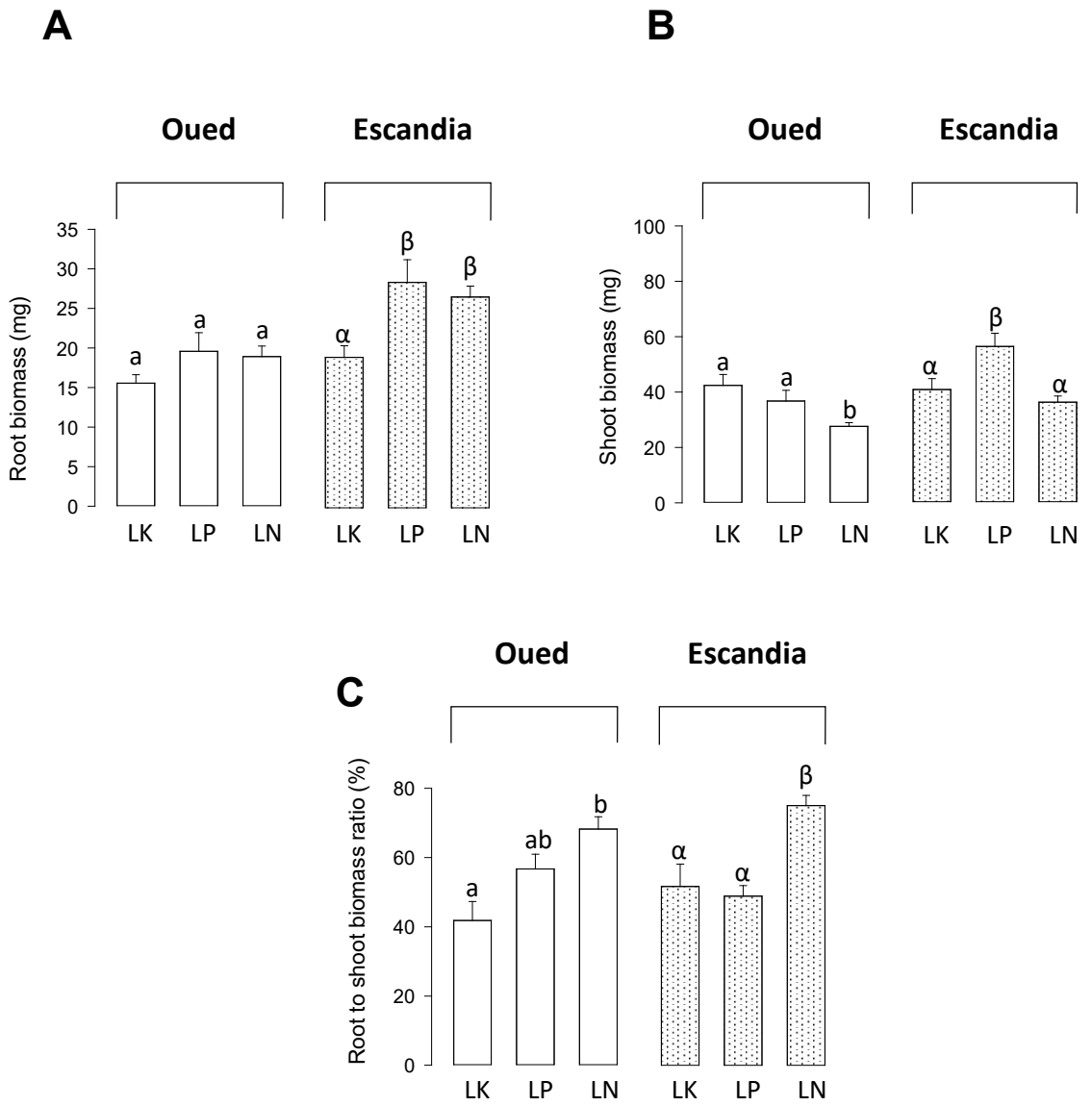


Figure 7.3. Comparaison des biomasses des parties racinaires et foliaires, et du rapport entre la biomasse racinaire et foliaire, chez les plantes LK, LP et LN soumises aux traitements inducteurs de la carence en K, P ou N.

(A) Biomasse racinaire.

(B) Biomasse foliaire.

(C) Rapport de la biomasse racinaire à la biomasse foliaire (exprimé en % de la biomasse foliaire).

Les valeurs des biomasses sont celles obtenues pour les plantes carencées en K, P ou N et analysées respectivement dans le chapitre 5 (Figure 3), le chapitre 4 (Figure 4) et le chapitre 6 (Figures 1). La présence de lettres identiques au-dessus des barres des histogrammes indique que les différences ne sont pas significatives (test ANOVA, $p>0,05$, réalisé indépendamment pour chaque accession).

(Cakmak *et al*.,1994 ; Wang et Wu, 2010), alors qu'un tel effet n'a pas été mentionné pour les carences en P et N.

Il est raisonnable d'imaginer que ces différences dans les conséquences des traitements LK, LP et LN sur la production de biomasse foliaire et racinaire des plantes, sont susceptibles de se répercuter sur les traits phénotypiques racinaires auxquels nous nous sommes intéressés, et d'obscurcir donc la signification des analyses comparatives. Nous avons cependant comparé ces trois traitements LK, LP et LN entre eux, en termes de conséquences sur chacun des quatre paramètres globaux "*Total root system area*" (Figure 7.4A) "*Total naked root area*" (Figure 7.4B), "*Total root hair area*" (Figure 7.4C) et "*Total root hair to total root system area*" (Figure 7.4D). Il est intéressant d'observer, sur ces figures, que chacun de ces 4 paramètres majeurs dans notre procédure d'analyse globale du phénotype du système racinaire est affecté de façon similaire par les 3 traitements LK, LP et LN chez Escandia. Autrement dit, chez Escandia, chacun de ces 4 paramètres présente la même valeur sous carence en en K, P ou N. Chez Oued Zenati, si le traitement LP présente des effets stimulateurs statistiquement plus forts que ceux des traitements LK et LN sur chacun des quatre paramètres considérés, les traitements LK et LN ne se distinguent pas l'un de l'autre (Figure 7.4). Dans leur ensemble, ces analyses apportent des éléments assez rassurants quant à la possibilité de comparer les réponses adaptatives des systèmes racinaires aux traitements LK, LP et LN. Nous avons donc cherché à évaluer, de façon comparative, la plasticité du système racinaire en réponse à chacune des carences imposées, N, P ou K, et chez les deux accessions Escandia et Oued Zenati.

En tant que premier indicateur de cette plasticité, nous avons calculé le pourcentage d'augmentation de la surface totale du système racinaire (différence entre la surface en condition de stress nutritif et celle en condition contrôle) pour chacun des 3 traitements LK, LP et LN. Les valeurs ainsi obtenues sont présentées dans la Figure 7.5A. De façon similaire, nous avons calculé le pourcentage d'augmentation de la surface totale du "corps racinaire nu" ("naked root system area"; valeurs présentées dans la Figure 7.5B), et le pourcentage d'augmentation de la totalité de la surface des poils absorbants sur le système racinaire entier (Figure 7.5C). Enfin, comme derniers indicateurs de la plasticité racinaire dans nos expériences de carence, nous avons évalué la contribution du corps racinaire nu, puis celle des poils absorbants, à l'augmentation de la surface totale du système racinaire (Figure 7.5D et E).

Concernant la surface totale du système racinaire, la Figure 7.5A indique que chacun des 3 traitements LK, LP et LN conduit à une augmentation de ce trait phénotypique. Exprimée en pourcentage de la valeur observée en condition contrôle (Figure 7.5A), cette augmentation est très variable selon le traitement chez Oued Zenati: elle est relativement faible, voisine de 5% environ, dans le cas du traitement LK, et elle est supérieure à 20% dans le cas du

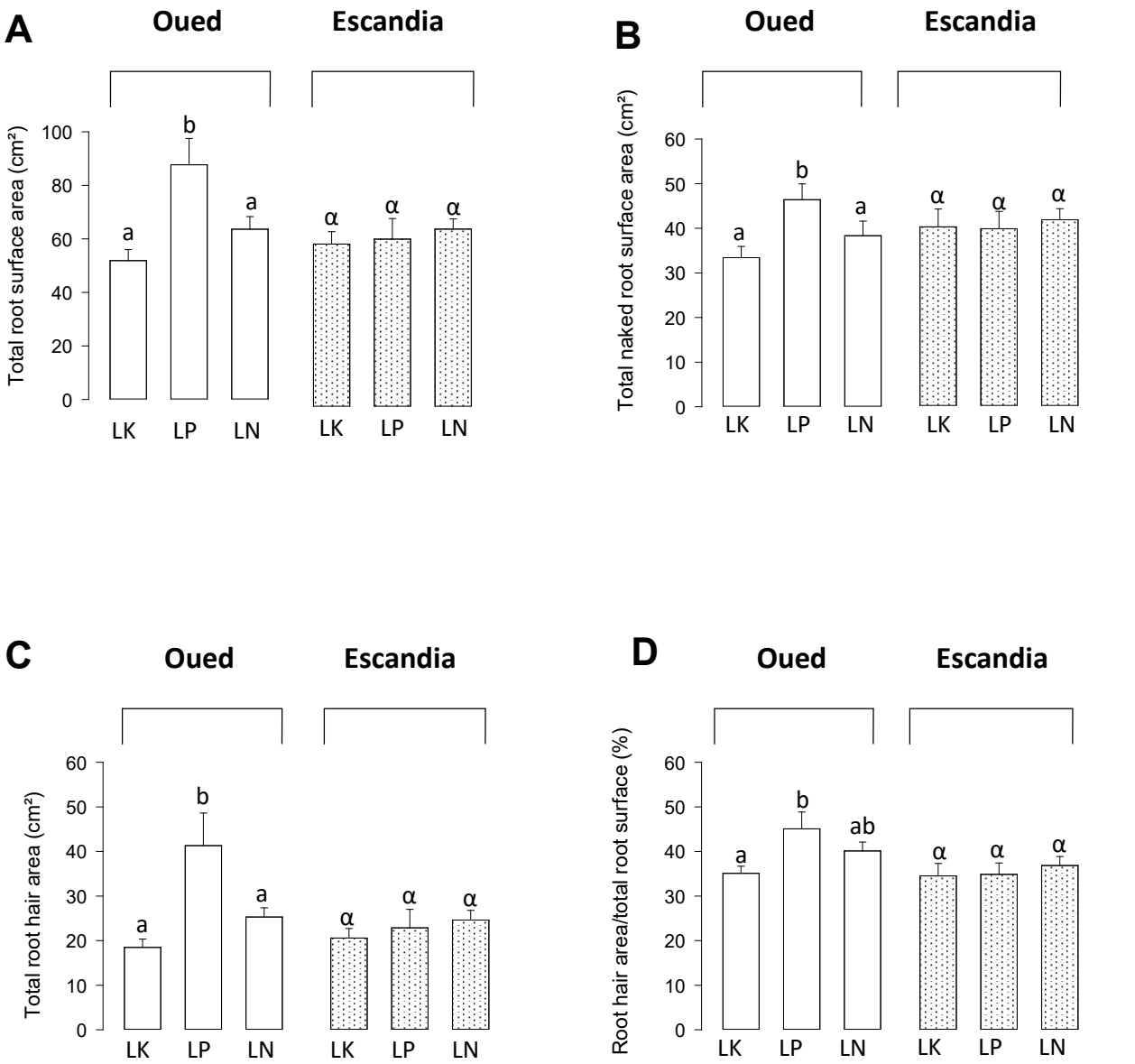


Figure 7.4. Comparaison du phénotype racinaire des plantes LK, LP et LN soumises aux traitements inducteurs de la carence en K, P ou N.

(A) Surface de la totalité du système racinaire (poils absorbants inclus).

(B) Surface du "corps racinaire nu" (système racinaire sans ses poils absorbants).

(C) Surface totale des poils absorbants du système racinaire entier.

(D) Rapport de la surface totale des poils absorbants à la surface totale du système racinaire.

Les données sont celles obtenues pour les plantes carencées en K (chapitre 5, Figures 5 et 7), carencées en P (chapitre 4, Figure 4) ou carencées en N (chapitre 6, Figures 5 et 6). La présence de lettres identiques au-dessus des barres des histogrammes indique que les différences ne sont pas significatives (test ANOVA, $p>0,05$, réalisé indépendamment pour chaque accession).

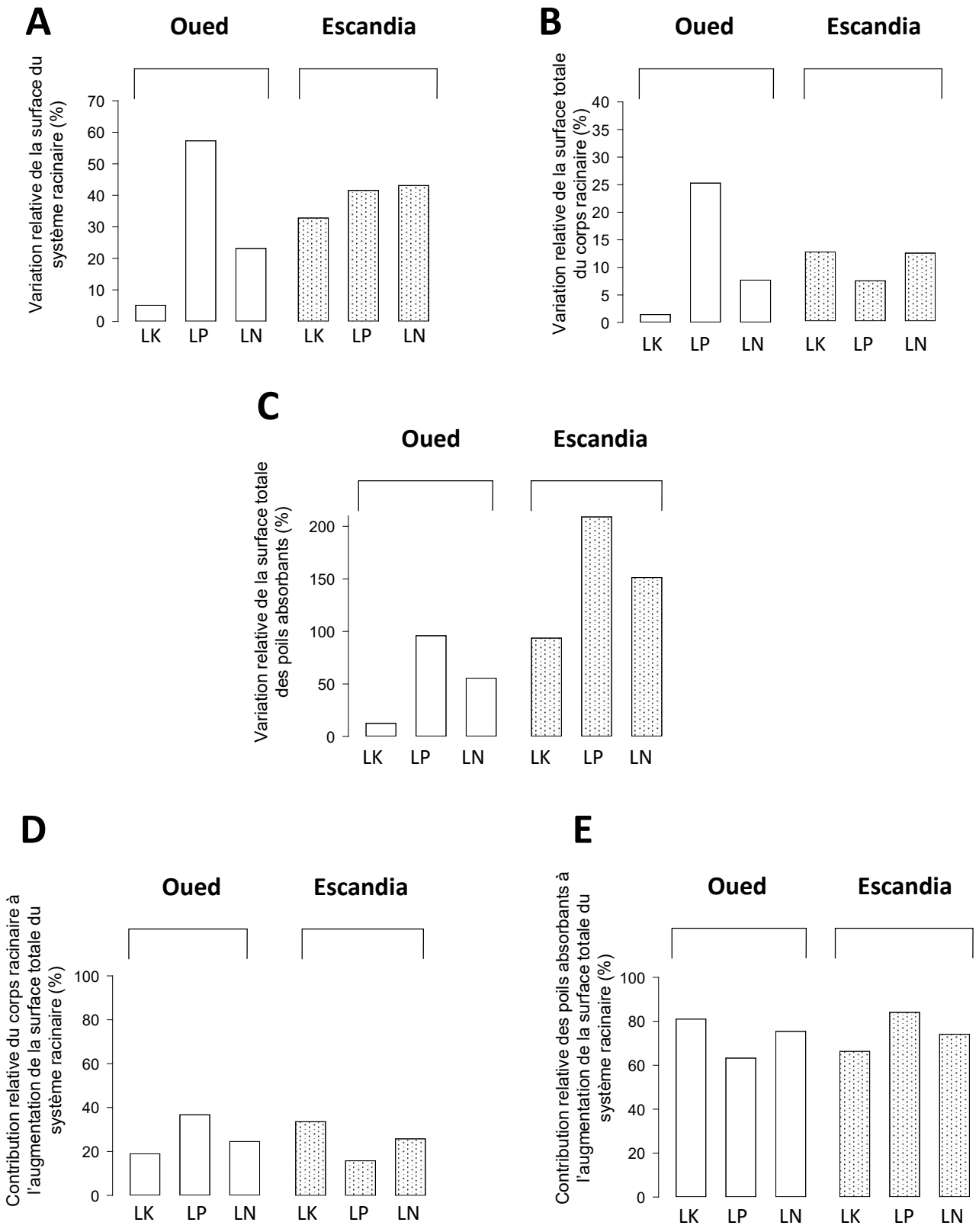

A
Oued
Escandia
Variation relative de la surface du système racinaire (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
LK
LP
LN
LK
LP
LN
B
Oued
Escandia
Variation relative de la surface totale du corps racinaire (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
LK
LP
LN
LK
LP
LN
C
Oued
Escandia
Variation relative de la surface totale des poils absorbants (%)
0
50
100
150
200
LK
LP
LN
LK
LP
LN
D
Oued
Escandia
Contribution relative du corps racinaire à l'augmentation de la surface totale du système racinaire (%)
0
20
40
60
80
100
LK
LP
LN
LK
LP
LN
E
Oued
Escandia
Contribution relative des poils absorbants à l'augmentation de la surface totale du système racinaire (%)
0
20
40
60
80
100
LK
LP
LN
LK
LP
LN

Figure 7.5. Plasticité des systèmes racinaires de Oued Zenati et Escandi en réponse aux carences en K, P ou N.

La plasticité des systèmes racinaires en réponse à la carence en K, P ou N (résultant des traitements LK, LP et LN) est évaluée à partir d'indicateurs exprimant les variations relatives de différents traits racinaires. Les données sont celles obtenues pour les plantes carencées en K (chapitre 5, Figures 5 et 7), carencées en P (chapitre 4, Figure 4) ou carencées en N (chapitre 6, Figures 5 et 6).

(A) Variation relative de la surface racinaire totale provoquée par la carence en K, P ou N. Cet indicateur est calculé en déterminant la différence entre la surface totale du système racinaire observée en condition de carence et celle observée en condition contrôle, puis en rapportant (en %) cette différence à la surface totale du système racinaire observée en condition contrôle.

(B) Variation relative de la surface totale du corps racinaire nu. Cet indicateur est calculé en déterminant la différence entre la surface du corps racinaire nu observée en condition de carence et celle observée en condition contrôle, puis en rapportant (en %) cette différence à la surface totale du corps racinaire nu observée en condition contrôle.

(C) Variation relative de la surface totale des poils absorbants. Cet indicateur est calculé en déterminant la différence entre la surface totale des poils absorbants observée en condition de carence et celle observée en condition contrôle, puis en rapportant (en %) cette différence à la surface totale des poils absorbants observée en condition contrôle.

(D) Contribution relative de l'augmentation de la surface du corps racinaire nu à l'augmentation de la surface de la totalité du système racinaire en réponse à la carence en K, P ou N. Indicateur déterminé en rapportant (en %) la variation de la surface du corps racinaire nu à la variation de la surface totale du système racinaire.

(E) Contribution relative de l'augmentation de la surface des poils absorbants à l'augmentation de la surface de la totalité du système racinaire en réponse à la carence en K, P ou N. Indicateur déterminé en rapportant (en %) la variation de la surface totale des poils absorbants à la variation de la surface totale du système racinaire.

traitement LN, et proche de 60% dans le traitement LP. Chez Escandia, les pourcentages d'augmentation par LK, LP et LN apparaissent tous à la fois comme relativement importants et relativement semblables, compris entre 32% et 42% environ.

L'augmentation de la surface totale du système racinaire, en réponse à chacun des traitements LK, LP et LN, intègre une augmentation de la surface du corps racinaire nu et une augmentation de la surface totale des poils absorbants. Nous nous sommes intéressées à ces deux composantes de la surface totale du système racinaire et à leur contribution à l'augmentation de la surface totale du système racinaire en condition de carence.

Exprimées en pourcentage de la valeur correspondante observée en condition contrôle, les augmentations de la surface du corps racinaire nu apparaissent à nouveau très variables chez Oued Zenati (respectivement d'environ 1.5%, 8% et 33% en réponse au traitement LK, LN et LP) et plus semblables chez Escandia (entre 7% et 14% selon le traitement) (Figure 7.5B). Les variations correspondantes de la surface totale des poils absorbants (Figure 7.5C) sont variables chez les deux accessions, mais toujours importantes, comprises entre environ 10% et 100% chez Oued Zenati selon le traitement, et encore bien plus fortes, entre 100% et 200%, chez Escandia. Ces valeurs indiquent donc que les augmentations de surface induites par les traitements LK, LP et LN sont beaucoup plus importantes pour les poils absorbants que pour les systèmes racinaires nus. Les Figures 7.5D et 7.6E révèlent que la contribution de l'augmentation de la surface du système racinaire nu à l'augmentation de la surface racinaire totale est souvent voisine de 20%, et toujours inférieure à 40%, et donc que la contribution correspondante des poils absorbants est toujours supérieure à 60% et peut atteindre 80%, à la fois chez Oued Zenati et chez Escandia.

7.2.3. Conclusion

L'ensemble des comparaisons effectuées dans les paragraphes précédents indiquent que les plantes répondent aux traitements LK, LP et LN avec des différences, selon le traitement ainsi que selon leur génotype, Oued Zenati ou Escandia. En dépit de ces différences, nous considérons qu'il est raisonnable de considérer que ces analyses comparatives permettent de conclure que :

(i) le trait racinaire qui est le plus augmenté par le stress nutritif, en N, P ou K, est la surface totale des poils absorbants (et donc la contribution de la production de poils absorbants à la surface totale du système racinaire).

(ii) Le système racinaire d'Escandia présente une plus grande plasticité que celui d'Oued Zenati en réponse aux carences en N, P et K résultant des traitements LN, LP et LK.

* *

*

7.3. Perspectives

7.3.1. Les différences de plasticité entre Escandia et Oued Zenati se retrouvent-elles entre variétés ancestrales et variétés modernes, et reflètent-elles des conséquences de la sélection ?

Nous avons conclu à l'issue des analyses précédentes que le système racinaire est plus plastique, dans ses réponses à la carence en N, P ou K, chez Escandia que chez Oued Zenati. Par contre, Oued Zenati semble posséder, de façon constitutive, même en absence de carence, des caractéristiques (surface totale des poils absorbants en particulier) susceptibles de constituer un avantage en cas de faible disponibilité d'éléments nutritifs. Escandia correspond à une variété ancestrale (un *dicoccum*) alors que Oued Zenati est une variété plus moderne (un *durum*). Il serait intéressant d'évaluer, si les différences de traits que nous avons observées entre Escandia et Oued Zenati se retrouvent fréquemment entre variétés ancestrales et variétés modernes. Notre méthodologie de phénotypage rendrait possible d'aborder cette question en utilisant un transect d'accessions constitué de deux ou trois variétés de *Triticum dicocoides*, *T. dicoccum*, variétés de pays et variété moderne de blé dur (*T. durum*), récapitulant la domestication et l'amélioration du blé dur. A terme, et avec des expériences complémentaires en champ, il serait intéressant d'analyser dans quelles conditions environnementales une plus grande plasticité du système racinaire présente un avantage pour la plante, en particulier en termes de compétitivité et développement sur des sols peu fertilisés.

7.3.2. Surface et architecture du système racinaire : vers une analyse intégrative

L'architecture et la "surface" du système racinaire sont des déterminants majeurs de la capacité de la plante à prélever les éléments nutritifs nécessaires à sa croissance. L'architecture détermine par exemple les possibilités d'exploration des couches superficielles du sol, souvent plus riches en éléments nutritifs, et en phosphate en particulier, ou des couches plus profondes, où la disponibilité de l'eau et du nitrate, par exemple, peuvent être plus grandes. D'autre part, parce que les ions doivent arriver à la surface de la racine, par les processus de diffusion et de flux de masse, pour y être prélevés par les cellules périphériques, toute augmentation de la surface de l'interface sol-racine est susceptible de faciliter le prélèvement ionique. Alors que les recherches sur la morphogenèse adaptative du système racinaire ont le plus souvent ciblé l'architecture, j'ai choisi de m'intéresser préférentiellement à la "surface" dans ce travail de thèse. La quasi-totalité des paramètres que j'ai élaborés pour décrire le système racinaire et ses réponses aux carences en N, P ou K concernent, plus ou

moins directement, l'amplitude de l'interface racine-substrat. J'ai initié une analyse de traits architecturaux, de façon modeste, en m'intéressant par exemple à l'angle formé par les deux racines séminales les plus externes (chapitre 4) au niveau de leur site d'émergence. Les images présentées dans ce mémoire pourraient cependant permettre des analyses plus approfondies des caractéristiques topologiques et architecturales du système racinaire chez les deux accessions de blé, et leurs éventuelles réponses aux stress nutritifs. Cela permettrait d'aborder aussi la question des synergies positives évoquées dans la littérature (Miguel *et al*., 2015) entre architecture racinaire et développement de poils absorbants longs et denses chez des espèces/cultivars compétitives dans des sols pauvres. Il est cependant important de noter que les logiciels classiques disponibles dans la littérature sont peu adaptés à l'analyse topologique de systèmes racinaires relativement complexes comme ceux qui ont été imagés au cours de cette Thèse. Il me semble qu'il serait quand-même possible de démarrer des analyses architecturales et topologiques à l'aide de logiciels "semi-automatiques" ou "automatiques", comme SmartRoot (Lobet *et al*., 2011) ou WinRHIZO™, puis d'essayer de développer des contacts avec des informaticiens pour adapter/améliorer/développer des procédures plus adaptées aux images de nos systèmes racinaires. Une première tentative dans ce sens a été initiée en collaboration avec la structure "*Montpellier Bio-Imagerie*" et Volker Baëcker, avec le développement d'un "plug-in" dans ImageJ (Abràmoff *et al*., 2005).

7.3.3. Des opportunités d'analyse moléculaires du développement et de la morphogenèse adaptative du système racinaire

Le dispositif de type rhizobox, qui fournit des images au format A4, permet le développement de systèmes racinaires assez complexes, présentant des racines de taille relativement importante, par exemple des racines séminales d'une trentaine de cm et porteuses de nombreuse racines latérales. Des adaptations de ce dispositif de culture pourraient être effectuées, pour passer d'un format A4 à un format A3, par exemple, ou pour conduire des expériences de type "split root", permettant de disposer, au sein d'un même système racinaire, des racines qui auraient poussé dans des solutions nutritives différentes, "riches" ou "appauvries" en un élément donné. La facilité de manipulation du dispositif rhizobox peut permettre de prélever, sans endommagement majeur, des régions particulières du système racinaire, sélectionnées sur la base d'hypothèses de travail, pour des analyses ioniques et moléculaires. Selon l'espèce cultivée, il serait même possible de purifier des fractions enrichies en poils absorbants, par "cryo-décapage" dans de l'azote liquide (Damiani *et al*., 2016). Il serait aussi possible de cibler des segments racinaires plus ou moins âgés par exemple, ou des racines primaires ou secondaires, ou des racines se développant en présence d'une solution nutritive complète ou appauvrie en éléments nutritifs, pour des analyses mécanistiques *via*

des approches d'imagerie cellulaire ou de biologie moléculaire (*e.g.*, hybridation *in situ* ou PCR *in situ*, analyse de l'expression génique par Q-PCR ou transcriptomique…). Dans le cadre de telles approches, l'utilisation de plantes mutantes, affectées dans l'expression de gènes candidats, pourrait permettre par exemple d'aborder des questions de signalisation, pour identifier les mécanismes en jeu et préciser si les processus sont locaux ou systémiques. De telles expériences pourraient commencer par cibler, par exemple, des plantes présentant des mutations pertes de fonction (KO) dans des transcepteurs percevant la concentration extérieure de nitrate (orthologues du transcepteur NRT1.1/NPF6 d'Arabidopsis; (Bouguyn *et al*., 2015 ; Jia *et al*.,2020)) et peut-être celle du potassium (canal potassique AKT1 chez Arabidopsis ; (Kellermeier *et al*.,2015, Jia *et al*., 2020)). Les expériences que j'ai présentées dans ce mémoire concernent le blé (dur). Chez cette espèce, les approches de type moléculaires ne sont pas aisées à ce jour. J'ai cependant montré que le dispositif rhizobox convient aussi à la culture du maïs et d'Arabidopsis. Les analyses moléculaires évoquées ci-dessus pourraient donc être conduites sur des espèces modèles comme Arabidopsis, et probablement le riz pour les céréales.

7.3.4. Vers l'analyse d'interactions biotiques ?

La fonction de nutrition minérale du système racinaire implique la capacité des racines à établir des relations symbiotiques bénéfiques avec des micro-organismes du sol, par exemple avec des champignons mycorhiziens ou des bactéries appelées génériquement PGPR (pour "Plant Growth Promoting Rhizobacteria"). Le système rhizobox que j'ai développé peut offrir des opportunités pour analyser la mise en place et les conséquences sur le développement racinaire de telles interactions. J'ai engagé des essais préliminaires dans cette direction en m'intéressant aux effets d'une inoculation par une bactérie PGPR sur le développement du système racinaire et des poils absorbants. Un des effets le plus souvent rapporté des PGPR dans la littérature est une stimulation de l'élongation des poils absorbants. J'ai utilisé une souche de *Pseudomonas urmiensis*, isolée dans notre laboratoire (Thèse de doctorat de Houssein Zhour, 2022) à partir de la rhizosphère d'un blé sauvage poussant spontanément dans une zone refuge au Liban (région qui fait partie du "*Croissant Fertile*", où le blé a été domestiqué). Les figures 7.6 et 7.7 présentent des résultats obtenus au cours de ces premiers essais, conduits avec l'accession Escandia. J'ai observé que l'inoculation par la bactérie PGPR provoque une forte augmentation de la surface de la totalité du système racinaire, largement due à une augmentation de la surface totale des poils absorbants lorsque les plantes étaient cultivées en présence d'une solution nutritive complète, sans carence (Figure 7.7). J'ai par contre observé que la même bactérie n'avait plus d'effet statistiquement significatif sur la surface du système racinaire et des poils absorbants lorsque les plantes étaient cultivées en

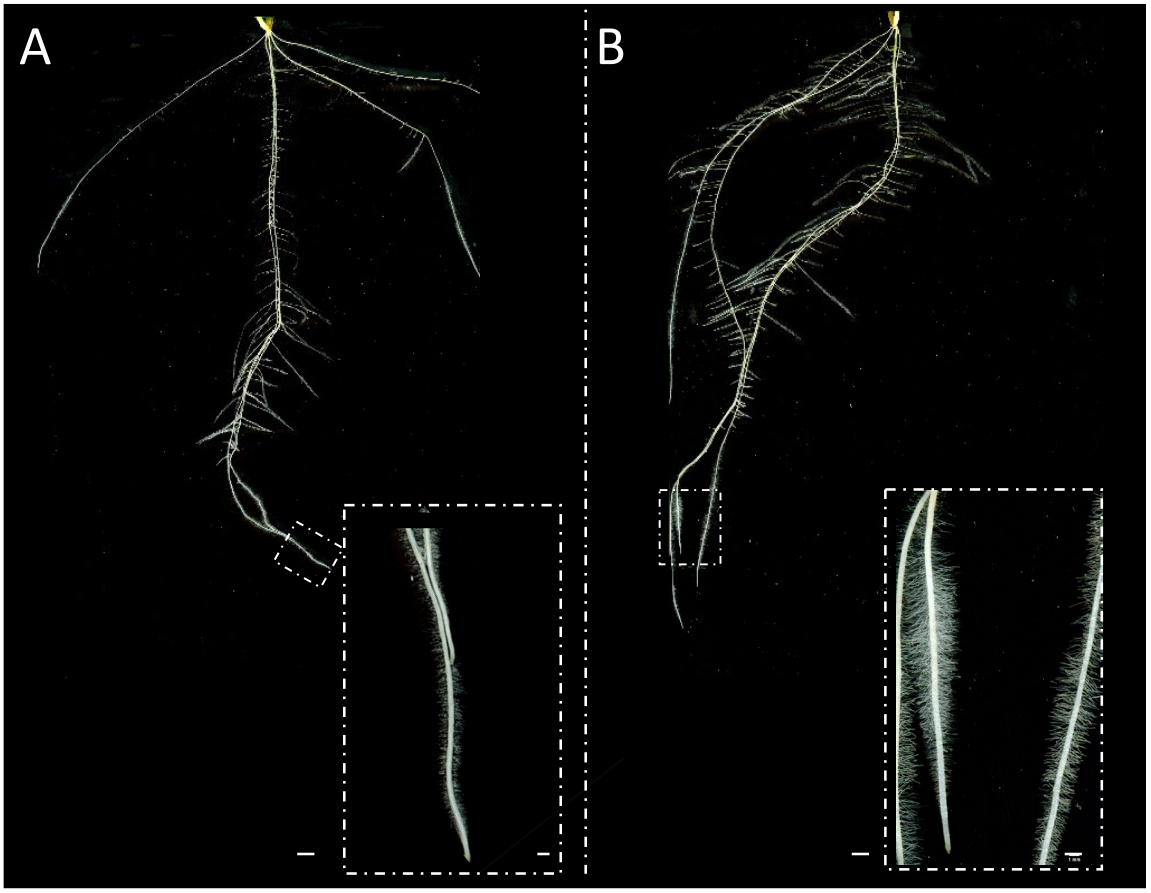


Figure 7.6. Images représentatives de systèmes racinaires de plantules de blé Escandia cultivées dans le dispositif de type rhizobox et inoculées ou non inoculées avec une souche de *Pseudomonas*.

Les plantes non inoculées (A) ou inoculées (B) ont été cultivées pendant 14 jours dans des dispositifs de type rhizobox dans un milieu Hoagland complet. Pour l'inoculation, nous avons utilisé une souche de *Pseudomonas urmiensis.* Les bactéries cultivées en milieu LB ont été prélevées pendant la phase exponentielle, lavées 3 fois (dans une solution de Hoagland) et remises en suspension à une densité finale d'environ 2 10^7 cellules/ml (DO de la suspension dans la gamme 0,8-1) dans de la solution de Hoagland. Les graines de blé ont été inoculées au cours du premier jour de croissance dans le dispositif de type rhizobox en déposant 200 µl de la suspension bactérienne sur la graine. Les images ont été acquises par scan à travers les plaques de verre des rhizobox à l'issue des 14 jours de culture. Les barres blanches incrustées dans les images indiquent l'échelle: 1 cm pour les systèmes racinaires entiers, et 1 mm pour les agrandissements. La souche de *Pseudomonas urmiensis* utilisée a été isolée dans notre laboratoire par Houssein Zhour à partir de la rhizosphère de plants de blé sauvages se développant spontanément dans une zone refuge au Liban. Cette souche présente des propriétés de type PGPR ("Plant Growth Promoting Rhizobacteria") et stimule la croissance du blé (Zhour, 2022, Thèse de doctorat, Montpellier).

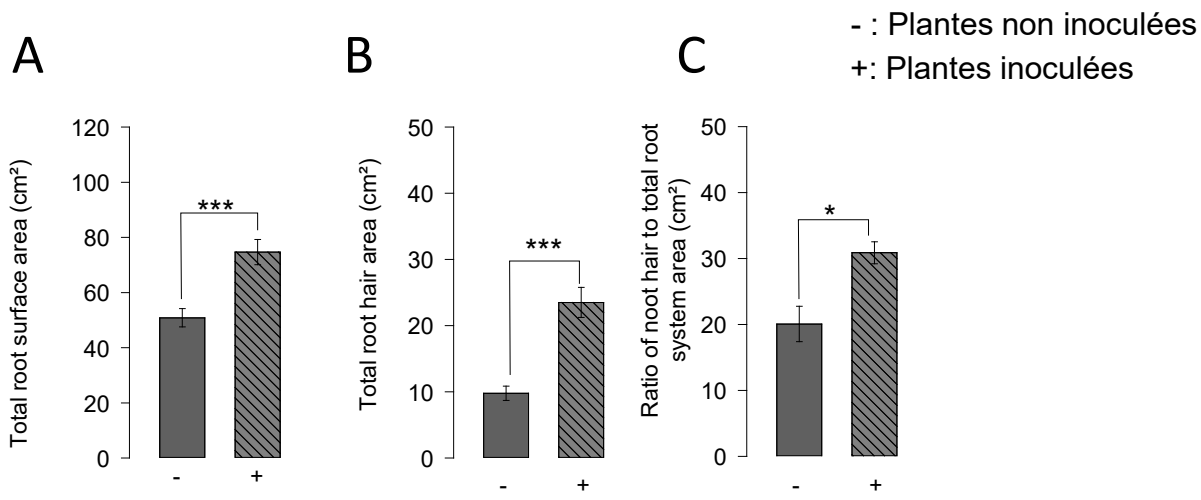


Figure 7.7. Effets de l'inoculation avec *Pseudomonas urmiensis* sur le développement racinaire chez le blé Escandia.

Les plantules, non inoculées (-) ou inoculées (+) avec *Pseudomonas urmiensis*, ont été cultivées dans des rhizobox pendant 14 jours dans un milieu Hoagland complet.

(A) Surface totale des systèmes racinaires.

(B) Surface totale des poils absorbants sur les systèmes racinaires entiers.

(C) Rapport (en %) de la surface des poils absorbants sur la surface totale des systèmes racinaires.

Moyennes ± erreur standard; n =17 pour les plantes non inoculées et 5 pour les plantes inoculées. * et ***: différences statistiquement significatives (test de Student), avec respectivement $p<0.05$ et $p<0.005$.

conditions de carence en N (110 µmol. l^{-1} d'azote assimilable dans la solution nutritive; *Cf.* chapitre 6). Les plantes, inoculées ou non, cultivées dans ces conditions de carence présentaient un développement des poils absorbants comparable à celui des plantes inoculées et cultivées dans la solution complète contrôle (résultat non illustré). Une première hypothèse serait que la carence en N et l'inoculation par des bactéries PGPR ne pourraient pas avoir d'effets cumulatifs sur le développement du système racinaire et des poils absorbants, au-delà d'un certain niveau de développement. Pour tester cette hypothèse, il serait crucial de s'assurer de l'efficacité de l'inoculation chez les plantes cultivées en condition de carence en N, et de l'existence d'interactions "physiques" entre les bactéries et la plante similaires dans les conditions "contrôle" et "carence". Cela pourrait probablement être fait en utilisant des bactéries transformées exprimant un gène codant une protéine fluorescente de type GFP. Si ce type d'expériences confirmait nos résultats initiaux, cela conduirait à se demander si, et par quels mécanismes, la bactérie est susceptible de réellement favoriser le développement d'une plante en situation de carence nutritive sévère en azote.

Dans le domaine des interactions racines-bactéries PGPR, il pourrait paraître aussi très intéressant de tester, dans notre système rhizobox, diverses souches de PGPR contre différentes accessions de blé (éventuellement récapitulant des étapes de la domestication/sélection), pour identifier des couples accession de blé-bactérie PGPR qui présenteraient des interactions très marquées en termes de modification du développement des poils absorbants. Il serait ensuite possible de tester l'existence d'une corrélation entre la spécificité de telles interactions et l'effet bénéfique des bactéries sur le développement de la plante. A terme, de telles analyses pourraient avoir des applications au champ, éventuellement par enrobage des semences de l'accession cultivée avec une souche bactérienne qui lui est particulièrement spécifique et utile.

* *
*

J'ai investi une partie importante de mon travail de thèse dans la mise au point d'une méthodologie de phénotypage du système racinaire, avec comme objectif original de prioriser l'analyse quantitative de la surface racinaire totale, à l'interface avec le substratum, et donc de prendre en compte le développement des poils absorbants. J'ai ensuite utilisé cette méthodologie pour étudier les réponses de systèmes racinaires de deux accessions de blé soumises à une carence en N, P ou K. L'analyse des résultats a révélé que la réponse la plus systématique et évidente, au niveau phénotypique, est une forte augmentation de la surface racinaire, résultant largement d'une augmentation de la production de poils absorbants, plus denses et surtout plus longs. Les deux accessions de blé étudiées se sont distinguées

cependant par différents traits racinaires, révélant des différences de plasticité en réponse à la carence.

Références bibliographiques

Abrahão, A., de Britto Costa, P., Teodoro, G. S., Lambers, H., Nascimento, D. L., Adrián López de Andrade, S., Ryan, M. H., & Silva Oliveira, R. (2020). Vellozioid roots allow for habitat specialization among rock- and soil-dwelling Velloziaceae in campos rupestres. *Functional Ecology*, *34*(2), 442–457. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13479

Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2005). Image processing with ImageJ Part II. *Biophotonics International*, *11*(7), 36–43.

Adu, M. O., Yawson, D. O., Bennett, M. J., Broadley, M. R., Dupuy, L. X., & White, P. J. (2017). A scanner-based rhizobox system enabling the quantification of root system development and response of brassica rapa seedlings to external p availability. *Plant Root*, *11*, 16–32. https://doi.org/10.3117/plantroot.11.16

Ahn, S. J., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2004). Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K+ uptake. *Plant Physiology*, *134*(3), 1135–1145. https://doi.org/10.1104/pp.103.034660

Ajmera, I., Henry, A., Radanielson, A. M., Klein, S. P., Ianevski, A., Bennett, M. J., Band, L. R., & Lynch, J. P. (2022). Integrated root phenotypes for improved rice performance under low nitrogen availability. *Plant Cell and Environment*, *45*(3), 805–822. https://doi.org/10.1111/pce.14284

ALI-KHAN, S. T., SNOAD, B., & ARTHUR, A. E. (1977). Root and shoot development in peas. *Annals of Applied Biology*, *85*(1), 137–146. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1977.tb00639.x

Allred, B. J., Brown, G. O., & Bigham, J. M. (2007). Nitrate mobility under unsaturated flow conditions in four initially dry soils. *Soil Science*, *172*(1), 27–41. https://doi.org/10.1097/01.ss.0000240548.44551.74

Amtmann, A., Bennett, M. J., & Henry, A. (2022). Root phenotypes for the future. *Plant Cell and Environment*, *45*(3), 595–601. https://doi.org/10.1111/pce.14269

An, L., Zhou, Z., Sun, L., Yan, A., Xi, W., Yu, N., Cai, W., Chen, X., Yu, H., Schiefelbein, J., & Gan, Y. (2012). A zinc finger protein gene ZFP5 integrates phytohormone signaling to control root hair development in Arabidopsis. *Plant Journal*, *72*(3), 474–490. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05094.x

Anten, N. P. R., & Vermeulen, P. J. (2016). Tragedies and Crops: Understanding Natural Selection To Improve Cropping Systems. *Trends in Ecology and Evolution*, *31*(6), 429–439. https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.010

ARVALIS. (2017). Blé dur - Guide de culture. Editions ARVALIS. ISBN : 978-2-8179-0353-8

Ashley, M. K., Grant, M., & Grabov, A. (2006). Plant responses to potassium deficiencies: A role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2 SPEC. ISS.), 425–436. https://doi.org/10.1093/jxb/erj034

Aslam, F., Khaliq, A., Matloob, A., Tanveer, A., Hussain, S., & Zahir, Z. A. (2017). Allelopathy in agro-ecosystems: a critical review of wheat allelopathy-concepts and implications. *Chemoecology*, *27*(1). https://doi.org/10.1007/s00049-016-0225-x

Atkinson, J. A., Pound, M. P., Bennett, M. J., & Wells, D. M. (2019). Uncovering the hidden half of plants using new advances in root phenotyping. *Current Opinion in Biotechnology*, *55*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.06.002

Atkinson, J. A., Rasmussen, A., Traini, R., Voß, U., Sturrock, C., Mooney, S. J., Wells, D. M., & Bennett, M. J. (2014). Branching out in roots: Uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiology*, *166*(2), 538–550. https://doi.org/10.1104/pp.114.245423

Atkinson, J. A., Wingen, L. U., Griffiths, M., Pound, M. P., Gaju, O., Foulkes, M. J., Le Gouis, J., Griffiths, S., Bennett, M. J., King, J., & Wells, D. M. (2015). Phenotyping pipeline reveals major seedling root growth QTL in hexaploid wheat. *Journal of Experimental Botany*, *66*(8), 2283–2292. https://doi.org/10.1093/jxb/erv006

Bai, L., Ma, X., Zhang, G., Song, S., Zhou, Y., Gao, L., Miao, Y., & Song, C. P. (2014). A receptor-like kinase mediates ammonium homeostasis and is important for the polar growth of root hairs in Arabidopsis. *Plant Cell*, *26*(4), 1497–1511. https://doi.org/10.1105/tpc.114.124586

Bailey, P. H. J., Currey, J. D., & Fitter, A. H. (2002). The role of root system architecture and root hairs in promoting anchorage against uprooting forces in Allium cepa and root mutants of Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, *53*(367), 333–340. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.367.333

Baird, W. V., & Riopel, J. L. (1983). Experimental studies of the attachment of the parasitic angiosperm Agalinis purpurea to a host. *Protoplasma*, *118*(3), 206–218. https://doi.org/10.1007/BF01281804

Bates, T. R., & Lynch, J. P. (1996). Stimulation of root hair elongation in Arabidopsis thaliana by low phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment*, *19*(5), 529–538. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00386.x

Bates, T. R., & Lynch, J. P. (2000a). Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of Arabidopsis thaliana (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, *87*(7), 958–963. https://doi.org/10.2307/2656994

Bates, T. R., & Lynch, J. P. (2000b). The efficiency of Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *American Journal of Botany*, *87*(7), 964–970. https://doi.org/10.2307/2656995

Bayle, V., Arrighi, J. F., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., Gonzalez, E., Paz-Ares, J., & Nussaume, L. (2011). Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell*, *23*(4), 1523–1535. https://doi.org/10.1105/tpc.110.081067

Bengough Glyn, A., Loades, K., & McKenzie, B. M. (2016). Root hairs aid soil penetration by anchoring the root surface to pore walls. *Journal of Experimental Botany*, *67*(4), 1071–1078. https://doi.org/10.1093/jxb/erv560

Bengough, A. G., Gordon, D. C., Al-Menaie, H., Ellis, R. P., Allan, D., Keith, R., Thomas, W. T. B., & Forster, B. P. (2004). Gel observation chamber for rapid screening of root traits in cereal seedlings. *Plant and Soil*, *262*(1–2), 63–70. https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037029.82618.27

Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C. N., Kausler, B. X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J. I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F. A., & Kreshuk, A. (2019). Ilastik: Interactive Machine Learning for (Bio)Image Analysis. *Nature Methods*, *16*(12), 1226–1232. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9

Bernhardt, C., Lee, M. M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A., & Schiefelbein, J. (2003). The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root. *Development*, *130*(26), 6431–6439. https://doi.org/10.1242/dev.00880

Bhosale, R., Giri, J., Pandey, B. K., Giehl, R. F. H., Hartmann, A., Traini, R., Truskina, J., Leftley, N., Hanlon, M., Swarup, K., Rashed, A., Voß, U., Alonso, J., Stepanova, A., Yun, J., Ljung, K., Brown, K. M., Lynch, J. P., Dolan, L., … Swarup, R. (2018). A mechanistic framework for auxin dependent Arabidopsis root hair elongation to low external phosphate. *Nature Communications*, *9*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03851-3

Bieleski, R. L., (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Annual Review of Plant Physiology, 24, 225-252.

Bienert, M. D., Werner, L. M., Wimmer, M. A., & Bienert, G. P. (2021). Root hairs: The villi of plants. *Biochemical Society Transactions*, *49*(3), 1133–1146. https://doi.org/10.1042/BST20200716

Bonser, A.M., Lynch, J.P., Snapp, S., (1996). Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots of Phaseolus vulgaris L. New Phytol. 132, 281–288.

Boudiar, R., González, J. M., Mekhlouf, A., Casas, A. M., & Igartua, E. (2020). Durum wheat seminal root traits within modern and landrace germplasm in Algeria. *Agronomy*, *10*(5), 1–15. https://doi.org/10.3390/agronomy10050713

Bouguyon, E., Gojon, A., & Nacry, P. (2012). Nitrate sensing and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *23*(6), 648–654. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.004

Bourion, V., Laguerre, G., Depret, G., Voisin, A. S., Salon, C., & Duc, G. (2007). Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Annals of Botany*, *100*(3), 589–598. https://doi.org/10.1093/aob/mcm147

Breuer, C., Kawamura, A., Ichikawa, T., Tominaga-Wada, R., Wada, T., Kondou, Y., Muto, S., Matsui, M., & Sugimoto, K. (2009). The trihelix transcription factor GTL1 regulates ploidy-dependent cell growth in the Arabidopsis trichome. *The Plant cell*, *21*(8), 2307–2322. https://doi.org/10.1105/tpc.109.068387

Breuer, C., Morohashi, K., Kawamura, A., Takahashi, N., Ishida, T., Umeda, M., Grotewold, E., & Sugimoto, K. (2012). Transcriptional repression of the APC/C activator CCS52A1 promotes active termination of cell growth. *EMBO Journal*, *31*(24), 4488–4501. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.294

Breuninger, H., Thamm, A., Streubel, S., Sakayama, H., Nishiyama, T., & Dolan, L. (2016). Diversification of a Transcription Factor Family Led to the Evolution of Antagonistically Acting Genetic Regulators of Root Hair Growth. *Current Biology*, *26*(12), 1622–1628. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.060

Brown, L. K., George, T. S., Barrett, G. E., Hubbard, S. F., & White, P. J. (2013). Interactions between root hair length and arbuscular mycorrhizal colonisation in phosphorus deficient barley (Hordeum vulgare). *Plant and Soil*, *372*(1–2), 195–205. https://doi.org/10.1007/s11104-013-1718-9

Brown, L. K., George, T. S., Dupuy, L. X., & White, P. J. (2013). A conceptual model of root hair ideotypes for future agricultural environments: What combination of traits should be targeted to cope with limited P availability? *Annals of Botany*, *112*(2), 317–330. https://doi.org/10.1093/aob/mcs231

Brown, L. K., George, T. S., Neugebauer, K., & White, P. J. (2017). The rhizosheath – a potential trait for future agricultural sustainability occurs in orders throughout the angiosperms. *Plant and Soil*, *418*(1–2), 115–128. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3220-2

Brown, L. K., George, T. S., Thompson, J. A., Wright, G., Lyon, J., Dupuy, L., Hubbard, S. F., & White, P. J. (2012). What are the implications of variation in root hair length on tolerance to phosphorus deficiency in combination with water stress in barley (Hordeum vulgare)? *Annals of Botany*, *110*(2), 319–328. https://doi.org/10.1093/aob/mcs085

Bruex, A., Kainkaryam, R. M., Wieckowski, Y., Kang, Y. H., Bernhardt, C., Xia, Y., Zheng, X., Wang, J. Y., Lee, M. M., Benfey, P., Woolf, P. J., & Schiefelbein, J. (2012). A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, *8*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002446

Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, *173*(1), 11–26. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x

Burridge, J. D., Findeis, J. L., Jochua, C. N., Miguel, M. A., Mubichi-Kut, F. M., Quinhentos, M. L., Xerinda, S. A., & Lynch, J. P. (2019). A case study on the efficacy of root phenotypic selection for edaphic stress tolerance in low-input agriculture: Common bean breeding in Mozambique. *Field Crops Research*, *244*(October), 107612. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.107612

Burris, J. N., Lenaghan, S. C., Zhang, M., & Stewart, C. N. (2012). Nanoparticle biofabrication using English ivy (Hedera helix). *Journal of Nanobiotechnology*, *10*, 1–7. https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-41

Burris, J.N. (2016). Nanocomposite Adhesive of English ivy (Hedera helix): Bioproduction, Nanoparticle Isolation, and Molecular Analysis (Doctoral dissertation, University of Tennessee, Knoxville).

Cai, G., & Ahmed, M. A. (2022). The role of root hairs in water uptake: recent advances and future perspectives. *Journal of experimental botany*, *73*(11), 3330–3338. https://doi.org/10.1093/jxb/erac114

Cakmak, I., Hengeler, C., & Marschner, H. (1994). Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany*, *45*(9), 1251–1257.https://doi.org/10.1093/jxb/45.9.1251

Canales, J., Contreras-López, O., Álvarez, J. M., & Gutiérrez, R. A. (2017). Nitrate induction of root hair density is mediated by TGA1/TGA4 and CPC transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, *92*(2), 305–316. https://doi.org/10.1111/tpj.13656

Cao, X., Chen, C., Zhang, D., Shu, B., Xiao, J., & Xia, R. (2013). Influence of nutrient deficiency on root architecture and root hair morphology of trifoliate orange (Poncirus trifoliata L. Raf.) seedlings under sand culture. *Scientia Horticulturae*, *162*, 100–105. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.034

Cassidy, S. T., Burr, A. A., Reeb, R. A., Melero Pardo, A. L., Woods, K. D., & Wood, C. W. (2020). Using clear plastic CD cases as low-cost mini-rhizotrons to phenotype root traits. *Applications in Plant Sciences*, *8*(4), 1–7. https://doi.org/10.1002/aps3.11340

Chandrika, N. N. P., Sundaravelpandian, K., Yu, S. M., & Schmidt, W. (2013). ALFIN-LIKE 6 is involved in root hair elongation during phosphate deficiency in Arabidopsis. *New Phytologist*, *198*(3), 709–720. https://doi.org/10.1111/nph.12194

Chen, J., & Gabelman, W. H. (2000). Morphological and physiological characteristics of tomato roots associated with potassium-acquisition efficiency. *Scientia Horticulturae*, *83*(3–4), 213–225. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00079-5

Chen, Y. L., Dunbabin, V. M., Diggle, A. J., Siddique, K. H. M., & Rengel, Z. (2011). Development of a novel semi-hydroponic phenotyping system for studying root architecture. *Functional Plant Biology*, *38*(5), 355–363. https://doi.org/10.1071/FP10241

Chen, Z. H., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., & Nimmo, H. G. (2007). BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in Arabidopsis. *Biochemical Journal*, *405*(1), 191–198. https://doi.org/10.1042/BJ20070102

Chiou, T. J., Liu, H., & Harrison, M. J. (2001). The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from Medicago truncatula indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant Journal*, *25*(3), 281–293. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.00963.x

Cho, H., Bouain, N., Zheng, L., & Rouached, H. (2021). Plant resilience to phosphate limitation: current knowledge and future challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, *41*(1), 63–71. https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1825321

Choi, H. S., Seo, M., & Cho, H. T. (2018). Two TPL-binding motifs of ARF2 are involved in repression of auxin responses. *Frontiers in Plant Science*, *9*(March), 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00372

Christopher, J., Christopher, M., Jennings, R., Jones, S., Fletcher, S., Borrell, A., Manschadi, A. M., Jordan, D., Mace, E., & Hammer, G. (2013). QTL for root angle and number in a population developed from bread wheats (Triticum aestivum) with contrasting adaptation to water-limited environments. *Theoretical and Applied Genetics*, *126*(6), 1563–1574. https://doi.org/10.1007/s00122-013-2074-0

Claassen, N., Steingrobe, B. (1999). Mechanistic simulation models for a better understanding of nutrient uptake from soil. Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications. In: Z. Rengel ed., Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implications, Food products Press, New York, pp 327-367

Clark, R. T., MacCurdy, R. B., Jung, J. K., Shaff, J. E., McCouch, S. R., Aneshansley, D. J., & Kochian, L. V. (2011). Three-dimensional root phenotyping with a novel imaging and software platform. *Plant Physiology*, *156*(2), 455–465. https://doi.org/10.1104/pp.110.169102

Cogliatti, D.H, Clarkson, D.T. (1983). Physiological changes in, and phosphate uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency. Physiol. Plant. ;581(1):287–294.

Cui, S., Suzaki, T., Tominaga-Wada, R., & Yoshida, S. (2018). Regulation and functional diversification of root hairs. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *83*, 115–122. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.003

Damiani, I., Drain, A., Guichard, M., Balzergue, S., Boscari, A., Boyer, J. C., Brunaud, V., Cottaz, S., Rancurel, C., da Rocha, M., Fizames, C., Fort, S., Gaillard, I., Maillol, V., Danchin, E. G. J., Rouached, H., Samain, E., Su, Y. H., Thouin, J., … Sentenac, H. (2016). Nod factor effects on root hair-specific transcriptome of medicago truncatula: Focus on plasma membrane transport systems and reactive oxygen species networks. *Frontiers in Plant Science*, *7*(June2016), 1–22. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00794

Danilevicz, M. F., Bayer, P. E., Nestor, B. J., Bennamoun, M., & Edwards, D. (2021). Resources for image-based high-throughput phenotyping in crops and data sharing challenges. *Plant physiology*, *187*(2), 699–715. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab301

Datta, S., Prescott, H., & Dolan, L. (2015). Intensity of a pulse of RSL4 transcription factor synthesis determines Arabidopsis root hair cell size. *Nature plants*, *1*, 15138. https://doi.org/10.1038/nplants.2015.138

Davies, J., Briarty, L.G and Rieley, J.O. (1973). Observations on the swollen lateral roots of the Cyperace. New Phytol. 72: 167-174.

De Pessemier, J., Moturu, T. R., Nacry, P., Ebert, R., De Gernier, H., Tillard, P., Swarup, K., Wells, D. M., Haseloff, J., Murray, S. C., Bennett, M. J., Inze, D., Vincent, C. I., & Hermans, C. (2022). Root system size and root hair length are key phenes for nitrate acquisition and biomass production across natural variation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *73*(11), 3569–3583. https://doi.org/10.1093/jxb/erac118

Del Bianco, M., & Kepinski, S. (2018). Building a future with root architecture. *Journal of Experimental Botany*, *69*(22), 5319–5323. https://doi.org/10.1093/jxb/ery390

Delhaize, E., James, R. A., & Ryan, P. R. (2012). Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (Triticum aestivum) grown on acid soil. *New Phytologist*, *195*(3), 609–619. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04183.x

Delhaize, E., Rathjen, T. M., & Cavanagh, C. R. (2015). The genetics of rhizosheath size in a multiparent mapping population of wheat. *Journal of Experimental Botany*, *66*(15), 4527–4536. https://doi.org/10.1093/jxb/erv223

Denison, R. F., Kiers, E. T., & West, S. A. (2003). Darwinian agriculture: when can humans find solutions beyond the reach of natural selection?. *The Quarterly review of biology*, *78*(2), 145–168. https://doi.org/10.1086/374951

Desbrosses, G., Josefsson, C., Rigas, S., Hatzopoulos, P., & Dolan, L. (2003). AKT1 and TRH1 are required during root hair elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *54*(383), 781–788. https://doi.org/10.1093/jxb/erg066

Devaiah, B. N., Karthikeyan, A. S., & Raghothama, K. G. (2007). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant physiology*, *143*(4), 1789–1801. https://doi.org/10.1104/pp.106.093971

Di Cristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I., & Morelli, G. (1996). The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *10*(3), 393–402. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.10030393.x

Dobermann, A., Cassman, K.G., Mamaril, C.P., Sheeh, J.E. (1998). Management of phosphorus, potassium, and sulfur in intensive, irrigated lowland rice. Field Crops Res 56:113–138

Dolan, L. (2017). Root hair development in grasses and cereals (Poaceae). *Current Opinion in Genetics and Development*, *45*, 76–81. https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.009

Donald, C.M., & Hamblin, J. (1983). The Convergent Evolution of Annual Seed Crops in Agriculture. Advances in Agronomy, 36, 97-143.

Downie, H., Holden, N., Otten, W., Spiers, A.J., Valentine, T.A. & Dupuy, L.X. (2012). Transparent soil for imaging the rhizosphere. PLoS One, 7(9). e44276. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044276

Drew. (n.d.). *New Phytologist - November 1975 - DREW - COMPARISON OF THE EFFECTS OF A LOCALISED SUPPLY OF PHOSPHATE NITRATE AMMONIUM*.

Ehdaie, B., Layne, A. P., & Waines, J. G. (2012). Root system plasticity to drought influences grain yield in bread wheat. *Euphytica*, *186*(1), 219–232. https://doi.org/10.1007/s10681-011-0585-9

Ehdaie, B., Layne, A. P., & Waines, J. G. (2012). Root system plasticity to drought influences grain yield in bread wheat. *Euphytica*, *186*(1), 219–232. https://doi.org/10.1007/s10681-011-0585-9

Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., Gong, Y., Xin, Y., Zhu, Z., Wang, Y., & Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(52), 13834–13839. https://doi.org/10.1073/pnas.1711723115

Foehse, D., & Jungk, A. (1983). Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of rape, spinach and tomato plants. *Plant and Soil*, *74*(3), 359–368. https://doi.org/10.1007/BF02181353

Gahoonia, T. S., & Nielsen, N. E. (1998). Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (32P) uptake from soil. *Plant and Soil*, *198*(2), 147–152. https://doi.org/10.1023/A:1004346412006

Gahoonia, T. S., & Nielsen, N. E. (2004). Barley genotypes with long root hairs sustain high grain yields in low-P field. *Plant and Soil*, *262*(1–2), 55–62. https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037020.58002.ac

Gahoonia, T. S., Care, D., & Nielsen, N. E. (1997). Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant and Soil*, *191*(2), 181–188. https://doi.org/10.1023/A:1004270201418

Gaudin, A. C., McClymont, S. A., Holmes, B. M., Lyons, E., & Raizada, M. N. (2011). Novel temporal, fine-scale and growth variation phenotypes in roots of adult-stage maize (Zea mays L.) in response to low nitrogen stress. *Plant, cell & environment*, *34*(12), 2122–2137. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02409.x

George, T. S., Brown, L. K., Ramsay, L., White, P. J., Newton, A. C., Bengough, A. G., Russell, J., & Thomas, W. T. B. (2014). Understanding the genetic control and physiological traits associated with rhizosheath production by barley (Hordeum vulgare). *New Phytologist*, *203*(1), 195–205. https://doi.org/10.1111/nph.12786

George, T. S., Brown, L. K., Ramsay, L., White, P. J., Newton, A. C., Bengough, A. G., Russell, J., & Thomas, W. T. B. (2014). Understanding the genetic control and physiological traits associated with rhizosheath production by barley (Hordeum vulgare). *New Phytologist*, *203*(1), 195–205. https://doi.org/10.1111/nph.12786

Gersani, M., Brown, J. S., O'Brien, E. E., Maina, G. M., & Abramsky, Z. (2001). Tragedy of the commons as a result of root competition. *Journal of Ecology*, *89*(4), 660–669. https://doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.00609.x

Ghimire, B., Hulbert, S.H., Steber, C.M., Garland-Campbell, K., & Sanguinet, K.A. (2020). Characterization of root traits for improvement of spring wheat in the Pacific Northwest. Agronomy Journal, 112(1), 228-240.

Gioia, T., Nagel, K. A., Beleggia, R., Fragasso, M., Ficco, D. B. M., Pieruschka, R., De Vita, P., Fiorani, F., & Papa, R. (2015). Impact of domestication on the phenotypic architecture of durum wheat under contrasting nitrogen fertilization. *Journal of Experimental Botany*, *66*(18), 5519–5530. https://doi.org/10.1093/jxb/erv289

Golan, G., Hendel, E., Méndez Espitia, G. E., Schwartz, N., & Peleg, Z. (2018). Activation of seminal root primordia during wheat domestication reveals underlying mechanisms of plant resilience. *Plant Cell and Environment*, *41*(4), 755–766. https://doi.org/10.1111/pce.13138

Gong, X., & McDonald, G. (2017). QTL mapping of root traits in phosphorus-deficient soils reveals important genomic regions for improving NDVI and grain yield in barley. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, *130*(9), 1885–1902. https://doi.org/10.1007/s00122-017-2931-3

González, E., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2005). PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis. *The Plant cell*, *17*(12), 3500–3512. https://doi.org/10.1105/tpc.105.036640

González, J. M., Cañas, R., Cabeza, A., Ruiz, M., Giraldo, P., & Loarce, Y. (2021). Study of variability in root system architecture of spanish triticum turgidum l. Subspecies and analysis of the presence of a mite element inserted in the ttdro1b gene: Evolutionary implications. *Agronomy*, *11*(11), 0–10. https://doi.org/10.3390/agronomy11112294

Goron, T. L., Watts, S., Shearer, C., & Raizada, M. N. (2015). Growth in Turface® clay permits root hair phenotyping along the entire crown root in cereal crops and demonstrates that root hair growth can extend well beyond the root hair zone. *BMC Research Notes*, *8*(1), 4–9. https://doi.org/10.1186/s13104-015-1108-x

Gregory, P. J., Bengough, A. G., Grinev, D., Schmidt, S., Thomas, W. T. B., Wojciechowski, T., & Young, I. M. (2009). Root phenomics of crops: Opportunities and challenges. *Functional Plant Biology*, *36*(11), 922–929. https://doi.org/10.1071/FP09150

Gregory, P.J., McGowan, M., Biscoe, P.V., Hunter, B. (1978). Water relations of winter wheat:513 Growth of the root system. The Journal of Agricultural Science 91, 91-102.

Grierson, C., Nielsen, E., Ketelaarc, T., & Schiefelbein, J. (2014). Root Hairs. *The Arabidopsis Book*, *12*, e0172. https://doi.org/10.1199/tab.0172

Gruber, B. D., Giehl, R. F., Friedel, S., & von Wirén, N. (2013). Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant physiology*, *163*(1), 161–179. https://doi.org/10.1104/pp.113.218453

Haas, M., Schreiber, M., & Mascher, M. (2019). Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *Journal of Integrative Plant Biology*, *61*(3), 204–225. https://doi.org/10.1111/jipb.12737

Haling, R. E., Brown, L. K., Stefanski, A., Kidd, D. R., Ryan, M. H., Sandral, G. A., George, T. S., Lambers, H., & Simpson, R. J. (2018). Differences in nutrient foraging among Trifolium subterraneum cultivars deliver improved P-acquisition efficiency. *Plant and*

Hao, D.L., Yang, S.Y., Liu, S.X., Zhou, J.Y., Huang, Y.N., Véry, A.A., Sentenac, H., Su, Y.H. (2020) Functional Characterization of the Arabidopsis Ammonium Transporter AtAMT1;3 With the Emphasis on Structural Determinants of Substrate Binding and Permeation Properties. Front. Plant Sci. 11:571. doi: 10.3389/fpls.2020.00571

Henry, C.H., and Deacon, J.W. (1981). Natural (non-pathogenic) death of the cortex of wheat and barley seminal roots, as evidenced by nuclear staining with acridine orange. Plant and Soil. 60: 255-274.

Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., & Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, *11*(12), 610–617. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.007

Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., & Young, I. M. (2009). Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, *321*(1–2), 117–152. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9885-9

Hoad, S. P., Russell, G., Lucas, M. E., & Bingham, I. J. (2001). The management of wheat, barley, and oat root systems. *Advances in Agronomy*, *74*, 193–246. https://doi.org/10.1016/s0065-2113(01)74034-5

Hochholdinger, F., Park, W. J., Sauer, M., & Woll, K. (2004). From weeds to crops: Genetic analysis of root development in cereals. *Trends in Plant Science*, *9*(1), 42–48. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.003

Hofer, R.M. (1996). Root hairs. In Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi (eds): Plant roots – The hidden half. Marcel Dekker, New-York, p 111-116

Hogg, B. V., Kacprzyk, J., Molony, E. M., O'Reilly, C., Gallagher, T. F., Gallois, P., & McCabe, P. F. (2011). An in vivo root hair assay for determining rates of apoptotic-like programmed cell death in plants. *Plant Methods*, *7*(1), 45. https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-45

Høgh-Jensen, H., & Pedersen, M. B. (2003). Morphological plasticity by crop plants and their potassium use efficiency. *Journal of Plant Nutrition*, *26*(5), 969–984. https://doi.org/10.1081/PLN-120020069

Holden, J., (1975). Use of nuclear staining to assess rates of cell death in cortices of cereal roots. Soil Biol. Biochem. 7, 333-334.

Horn, R., Wingen, L. U., Snape, J. W., & Dolan, L. (2016). Mapping of quantitative trait loci for root hair length in wheat identifies loci that co-locate with loci for yield components. *Journal of experimental botany*, *67*(15), 4535–4543. https://doi.org/10.1093/jxb/erw228

Huang, L., Shi, X., Wang, W., Ryu, K. H., & Schiefelbein, J. (2017). Diversification of Root Hair Development Genes in Vascular Plants. *Plant physiology*, *174*(3), 1697–1712. https://doi.org/10.1104/pp.17.00374

Ishida, T., Hattori, S., Sano, R., Inoue, K., Shirano, Y., Hayashi, H., Shibata, D., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., & Wada, T. (2007). Arabidopsis TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *The Plant cell*, *19*(8), 2531–2543. https://doi.org/10.1105/tpc.107.052274

Islam, M. D. D., Price, A. H., & Hallett, P. D. (2021). Contrasting ability of deep and shallow rooting rice genotypes to grow through plough pans containing simulated biopores and cracks. *Plant and Soil*, *467*(1–2), 515–530. https://doi.org/10.1007/s11104-021-05131-4

Itoh, S., & Barber, S. A. (1983). A numerical solution of whole plant nutrient uptake for soil-root systems with root hairs. *Plant and Soil*, *70*(3), 403–413. https://doi.org/10.1007/BF02374895

Iyer-Pascuzzi, A. S., Symonova, O., Mileyko, Y., Hao, Y., Belcher, H., Harer, J., Weitz, J. S., & Benfey, P. N. (2010). Imaging and analysis platform for automatic phenotyping and trait ranking of plant root systems. *Plant physiology*, *152*(3), 1148–1157. https://doi.org/10.1104/pp.109.150748

James, R. A., Weligama, C., Verbyla, K., Ryan, P. R., Rebetzke, G. J., Rattey, A., Richardson, A. E., & Delhaize, E. (2016). Rhizosheaths on wheat grown in acid soils: phosphorus acquisition efficiency and genetic control. *Journal of experimental botany*, *67*(12), 3709–3718. https://doi.org/10.1093/jxb/erw035

Jaradat, A. A. (2013). Wheat landraces: A mini review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *25*(1), 20–29. https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i1.15376

Jeudy, C., Adrian, M., Baussard, C., Bernard, C., Bernaud, E., Bourion, V., Busset, H., Cabrera-Bosquet, L., Cointault, F., Han, S., Lamboeuf, M., Moreau, D., Pivato, B., Prudent, M., Trouvelot, S., Truong, H. N., Vernoud, V., Voisin, A. S., Wipf, D., & Salon, C. (2016). RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: Test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant Methods*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s13007-016-0131-9

Jia, Y. bo, Yang, X. e., Feng, Y., & Jilani, G. (2008). Differential response of root morphology to potassium deficient stress among rice genotypes varying in potassium efficiency. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *9*(5), 427–434. https://doi.org/10.1631/jzus.B0710636

Jia, Z., & von Wirén, N. (2020). Signaling pathways underlying nitrogen-dependent changes in root system architecture: From model to crop species. *Journal of Experimental Botany*, *71*(15), 4393–4404. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa033

Johnson, C. S., Kolevski, B., & Smyth, D. R. (2002). TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant cell*, *14*(6), 1359–1375. https://doi.org/10.1105/tpc.001404

Jones, K., Kim, D. W., Park, J. S., & Khang, C. H. (2016). Live-cell fluorescence imaging to investigate the dynamics of plant cell death during infection by the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12870-016-0756-x

Jordan, M., Picard, D., & Trendel, R. (1992). Ramification des racines nodales primaires du maïs (Zea mays L). Données de structure et de cinétique. *Agronomie*, *12*(1), 15–30. https://doi.org/10.1051/agro:19920102

Joshi, D. C., Singh, V., Hunt, C., Mace, E., van Oosterom, E., Sulman, R., Jordan, D., & Hammer, G. (2017). Development of a phenotyping platform for high throughput screening of nodal root angle in sorghum. *Plant methods*, *13*, 56. https://doi.org/10.1186/s13007-017-0206-2

Jung, J. Y., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2009). Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in arabidopsis. *Plant Cell*, *21*(2), 607–621. https://doi.org/10.1105/tpc.108.063099

Jungk, A. (2001). Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *164*(2), 121–129. https://doi.org/10.1002/1522-2624(200104)164:2<121::AID-JPLN121>3.0.CO;2-6

Jungk, A., and Claassen, N. (1997). Ion diffusion in the soil-root system. *Advances in agronomy*. 61, 53–110. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60662-8

Kang, Y. H., Kirik, V., Hulskamp, M., Nam, K. H., Hagely, K., Lee, M. M., & Schiefelbein, J. (2009). The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the Arabidopsis root epidermis. *The Plant cell*, *21*(4), 1080–1094. https://doi.org/10.1105/tpc.108.063180

Kanno, Y., Kamiya, Y., & Seo, M. (2013). Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*, *8*(12), e26624. https://doi.org/10.4161/psb.26624

Karas, B., Amyot, L., Johansen, C., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., & Szczyglowski, K. (2009). Conservation of lotus and Arabidopsis basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant physiology*, *151*(3), 1175–1185. https://doi.org/10.1104/pp.109.143867

Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T. J., Danku, J., Salt, D. E., & Amtmann, A. (2014). Analysis of the root system architecture of Arabidopsis provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *Plant Cell*, *26*(4), 1480–1496. https://doi.org/10.1105/tpc.113.122101

Kellermeier, F., Chardon, F., & Amtmann, A. (2013). Natural variation of Arabidopsis root architecture reveals complementing adaptive strategies to potassium starvation. *Plant Physiology*, *161*(3), 1421–1432. https://doi.org/10.1104/pp.112.211144

Keyes, S. D., Daly, K. R., Gostling, N. J., Jones, D. L., Talboys, P., Pinzer, B. R., Boardman, R., Sinclair, I., Marchant, A., & Roose, T. (2013). High resolution synchrotron imaging of wheat root hairs growing in soil and image based modelling of phosphate uptake. *New Phytologist*, *198*(4), 1023–1029. https://doi.org/10.1111/nph.12294

Keyes, S. D., Zygalakis, K. C., & Roose, T. (2017). An Explicit Structural Model of Root Hair and Soil Interactions Parameterised by Synchrotron X-ray Computed Tomography. *Bulletin of Mathematical Biology*, *79*(12), 2785–2813. https://doi.org/10.1007/s11538-017-0350-x

Khan, M. A., Gemenet, D. C., & Villordon, A. (2016). Root system architecture and abiotic stress tolerance: Current knowledge in root and tuber crops. *Frontiers in Plant Science*, *7*(NOVEMBER2016), 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01584

Kirby, E.J.M. (2002). Botany of the wheat plant. In Bread wheat - Improvement and production, B.C. Curtis,S. Rajaram, and H. Gomez Macpherson, eds. (Rome: Food and Agriculture Organisation).

Klinsawang, S., Sumranwanich, T., Wannaro, A., & Saengwilai, P. (2018). Effects of root hair length on potassium acquisition in rice (Oryza sativa L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, *16*(2), 1609–1620. https://doi.org/10.15666/aeer/1602_16091620

Kohli, P. S., Maurya, K., Thakur, J. K., Bhosale, R., & Giri, J. (2022). Significance of root hairs in developing stress-resilient plants for sustainable crop production. *Plant Cell and Environment*, *45*(3), 677–694. https://doi.org/10.1111/pce.14237

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., & Gojon, A. (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell*, *18*(6), 927–937. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008

Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., & Sorrells, M. E. (2015). A grounded guide to gluten how modern genotypes and processing impact wheat sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(3), 285–302. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12129

Kuijken, R. C. P., Van Eeuwijk, F. A., Marcelis, L. F. M., & Bouwmeester, H. J. (2015). Root phenotyping: From component trait in the lab to breeding. *Journal of Experimental Botany*, *66*(18), 5389–5401. https://doi.org/10.1093/jxb/erv239

Lamont, B. (1974). the Biology of Dauciform Roots in the Sedge Cyathochaete Avenacea. *New Phytologist*, *73*(5), 985–996. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1974.tb01327.x

Lamont, B. (1983). Root hair dimensions and surface/volume/weight ratios of roots with the aid of scanning electron microscopy. *Plant and Soil*, *74*(1), 149–152. https://doi.org/10.1007/BF02178753

Lauter, F. R., O. Ninnemann, M. Bucher, J. W. Riesmeier and W. B. Frommeer. (1996). Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 8139-8144.4

Lee, M. M., & Schiefelbein, J. (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell*, *99*(5), 473–483. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81536-6

Leigh, R.A., Wyn Jones, R.G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. New Phytol 97:1–13.

Léran, S., Muños, S., Brachet, C., Tillard, P., Gojon, A., & Lacombe, B. (2013). Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. *Molecular plant*, *6*(6), 1984–1987. https://doi.org/10.1093/mp/sst068

Léran, S., Varala, K., Boyer, J. C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J. M., Halkier, B. A., Harris, J. M., Hedrich, R., Limami, A. M., Rentsch, D., … Lacombe, B. (2014). A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. *Trends in Plant Science*, *19*(1), 5–9. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.008

Liao, H., Rubio, G., Yan, X., Cao, A., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2001). Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. *Plant and soil*, *232*(1-2), 69–79.

Lima, J.E, Kojima, S., Takahashi, H., von Wirén N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. The Plant Cell 22, 3621–3633.

Lin, Q., Ohashi, Y., Kato, M., Tsuge, T., Gu, H., Qu, L. J., & Aoyama, T. (2015). GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *Plant Cell*, *27*(10), 2894–2906. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00607

Liu Y, von Wirén N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. Journal of Experimental Botany 68, 2581–2592.

Liu, K. H., Huang, C. Y., & Tsay, Y. F. (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant cell*, *11*(5), 865–874. https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.865

Liu, M., Rathjen, T., Weligama, K., Forrest, K., Hayden, M., & Delhaize, E. (2017). Analysis of aneuploid lines of bread wheat to map chromosomal locations of genes controlling root hair length. *Annals of botany*, *119*(8), 1333–1341. https://doi.org/10.1093/aob/mcx030

Lobet, G., Pagès, L., & Draye, X. (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiology*, *157*(1), 29–39. https://doi.org/10.1104/pp.111.179895

Ludewig, U., von Wirén, N., and Frommer, W. B. (2002). Uniport of NH4+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. J. Biol. Chem. 277, 13548–13555.

Lynch J. P. (2022). Harnessing root architecture to address global challenges. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *109*(2), 415–431. https://doi.org/10.1111/tpj.15560

Lynch, J. P. (2007). Turner review no. 14. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany*, *55*(5), 493–512. https://doi.org/10.1071/BT06118

Lynch, J. P. (2011). Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. *Plant Physiology*, *156*(3), 1041–1049. https://doi.org/10.1104/pp.111.175414

Lynch, J. P. (2013). Steep, cheap and deep: An ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Annals of Botany*, *112*(2), 347–357. https://doi.org/10.1093/aob/mcs293

Lynch, J. P. (2019). Root phenotypes for improved nutrient capture: an underexploited opportunity for global agriculture. In *New Phytologist* (Vol. 223, Issue 2). https://doi.org/10.1111/nph.15738

Lynch, J. P., & Ho, M. D. (2005). Rhizoeconomics: Carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant and Soil*, *269*(1–2), 45–56. https://doi.org/10.1007/s11104-004-1096-4

Lynch, J. P., Chimungu, J. G., & Brown, K. M. (2014). Root anatomical phenes associated with water acquisition from drying soil: Targets for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, *65*(21), 6155–6166. https://doi.org/10.1093/jxb/eru162

Lynch, J.P. (1995). Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, *109*(1), 7 LP – 13. https://doi.org/10.1104/pp.109.1.7

Ma, L., Shi, Y., Siemianowski, O., Yuan, B., Egner, T. K., Mirnezami, S. V., Lind, K. R., Ganapathysubramanian, B., Venditti, V., & Cademartiri, L. (2019). Hydrogel-based transparent soils for root phenotyping in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *166*(22), 11063–11068. https://doi.org/10.1073/pnas.1820334116

Ma, Z., Bielenberg, D. G., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2001). Regulation of root hair density by phosphorus availability in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*, *24*(4), 459–467. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00695.x

Ma, Z., Walk, T. C., Marcus, A., Lynch J.P. (2001). Morphological synergism in root hair length , density , initiation and geometry for phosphorus acquisition in Arabidopsis thaliana : A modeling approach . *Plant and Soil* **236**, 221–235 (2001). https://doi.org/10.1023/A:1012728819326ron

Mackay, A.D. and Barber, S.A. (1985) Effect of Soil Moisture and Phosphate Level on Root Hair Growth of Corn Root. Journal of Plant and Soil, 86, 321-331. http://dx.doi.org/10.1007/BF02145453

Mairhofer, S., Zappala, S., Tracy, S., Sturrock, C., Bennett, M. J., Mooney, S. J., & Pridmore, T. P. (2013). *Mairhofer, Stefan, et al. Recovering complete plant root system architectures from soil via X-ray μ-computed tomography. Plant methods 9.1 (2013) 8.pdf*. 1–7. Httpd://doi:10.1186/1746-4811-9-8

Mangano, S., Denita-Juarez, S. P., Choi, H. S., Marzol, E., Hwang, Y., Ranocha, P., Velasquez, S. M., Borassi, C., Barberini, M. L., Aptekmann, A. A., Muschietti, J. P., Nadra, A. D., Dunand, C., Cho, H. T., & Estevez, J. M. (2017). Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(20), 5289–5294. https://doi.org/10.1073/pnas.1701536114

Maqbool, S., Hassan, M. A., Xia, X., York, L. M., Rasheed, A., & He, Z. (2022). Root system architecture in cereals: progress, challenges and perspective. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *110*(1), 23–42. https://doi.org/10.1111/tpj.15669

Marschner, H. (1986). Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition), Academic Press,),Page 487, ISBN 9780123849052,https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00028-5.

Marschner, P., Rengel, Z. (2012). Nutrient availability in soils. In: ed P. Marschner, Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier, Amsterdam, pp 315–330. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905- 2.00012-1

Marzec, M., Melzer, M., & Szarejko, I. (2015). Root hair development in the grasses: what we already know and what we still need to know. *Plant physiology*, *168*(2), 407–414. https://doi.org/10.1104/pp.15.00158

Mašková, T., & Klimeš, A. (2020). The Effect of Rhizoboxes on Plant Growth and Root: Shoot Biomass Partitioning. *Frontiers in plant science*, *10*, 1693. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01693

Masucci, J. D., & Schiefelbein, J. W. (1996). Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root. *The Plant cell*, *8*(9), 1505–1517. https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1505

McCully, M. E. (1999). Roots in soil: Unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annual Review of Plant Biology*, *50*, 695–718. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.695

McElgunn, J. D. *and* Harrison, C. M. *(*1969*),* Formation*,* elongation *and* longevity *of* barley root hairs. *Agronomy Journal.,* 61*,* 79–81*.*

McPhee, K. (2005). Variation for seedling root architecture in the core collection of pea germplasm. *Crop Science*, *45*(5), 1758–1763. https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0544

Medici, A., & Krouk, G. (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *Journal of experimental botany*, *65*(19), 5567–5576. https://doi.org/10.1093/jxb/eru245

Melzer, B., Steinbrecher, T., Seidel, R., Kraft, O., Schwaiger, R., & Speck, T. (2010). The attachment strategy of English ivy: a complex mechanism acting on several hierarchical levels. *Journal of the Royal Society, Interface*, *7*(50), 1383–1389. https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0140

Menand, B., Yi, K., Jouannic, S., Hoffmann, L., Ryan, E., Linstead, P., Schaefer, D. G., & Dolan, L. (2007). An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5830), 1477–1480. https://doi.org/10.1126/science.1142618

Mengel, K. and Kirkby, E. A. (2004). Principles of plant nutrition. *Annals of Botany*, *93*(4), 479–480. https://doi.org/10.1093/aob/mch063

Mengel, K. and Steffens, D. (1985). Potassium uptake of rye-grass (Lolium perenne) and red clover (Trifolium pratense) as related to root parameters. *Biology and Fertility of Soils* .1:53-58

Metzner, R., Eggert, A., van Dusschoten, D., Pflugfelder, D., Gerth, S., Schurr, U., Uhlmann, N., & Jahnke, S. (2015). Direct comparison of MRI and X-ray CT technologies for 3D imaging of root systems in soil: potential and challenges for root trait quantification. *Plant methods*, *11*, 17. https://doi.org/10.1186/s13007-015-0060-z

Meyer, R. S., DuVal, A. E., & Jensen, H. R. (2012). Patterns and processes in crop domestication: An historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytologist*, 196, 29–48. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04253.x

Mi, G., Chen, F., Wu, Q., Lai, N., Yuan, L., & Zhang, F. (2010). Ideotype root architecture for efficient nitrogen acquisition by maize in intensive cropping systems. *Science China. Life sciences*, *53*(12), 1369–1373. https://doi.org/10.1007/s11427-010-4097-y

Miguel, M. A., Postma, J. A., & Lynch, J. P. (2015). Phene synergism between root hair length and basal root growth angle for phosphorus Acquisition. *Plant Physiology*, *167*(4), 1430–1439. https://doi.org/10.1104/pp.15.00145

Miller, A. J., & Smith, S. J. (2008). Cytosolic nitrate ion homeostasis: could it have a role in sensing nitrogen status?. *Annals of botany*, *101*(4), 485–489. https://doi.org/10.1093/aob/mcm313

Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, *58*(9), 2297–2306. https://doi.org/10.1093/jxb/erm066

Miller, C. R., Ochoa, I., Nielsen, K. L., Beck, D., & Lynch, J. P. (2003). Genetic variation for adventitious rooting in response to low phosphorus availability: Potential utility for phosphorus acquisition from stratified soils. *Functional Plant Biology*, *30*(9), 973–985. https://doi.org/10.1071/FP03078

Misson, J., Thibaud, M. C., Bechtold, N., Raghothama, K., & Nussaume, L. (2004). Transcriptional regulation and functional properties of Arabidopsis Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant molecular biology*, *55*(5), 727–741. https://doi.org/10.1007/s11103-004-1965-5

Mooney, S. J., Pridmore, T. P., Helliwell, J., & Bennett, M. J. (2012). Developing X-ray computed tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. *Plant and Soil*, *352*(1–2), 1–22. https://doi.org/10.1007/s11104-011-1039-9

Moreno-Espíndola, I. P., Rivera-Becerril, F., de Jesús Ferrara-Guerrero, M., & De León-González, F. (2007). Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(10), 2520–2526. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.021

Müller, M., & Schmidt, W. (2004). Environmentally Induced Plasticity of Root Hair Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *134*(1), 409–419. https://doi.org/10.1104/pp.103.029066

Niu, Y. F., Chai, R. S., Jin, G. L., Wang, H., Tang, C. X., & Zhang, Y. S. (2013). Responses of root architecture development to low phosphorus availability: A review. *Annals of Botany*, *112*(2), 391–408. https://doi.org/10.1093/aob/mcs285

Nye, P. H. (1966). The effect of the nutrient intensity and buffering power of a soil, and the absorbing power, size and root hairs of a root, on nutrient absorption by diffusion. *Plant and Soil*, *25*(1), 81–105. https://doi.org/10.1007/BF01347964

Okamoto, M., Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Crawford, N. M., & Glass, A. D. M. (2006). High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiology*, *140*(3), 1036–1046. https://doi.org/10.1104/pp.105.074385

Orsel, M., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. *Plant physiology*, 129(2), 886–896. https://doi.org/10.1104/pp.005280

Othman, A. A., Amer, W. M., Fayez, M., & Hegazi, N. A. (2004). Rhizosheath of sinai desert plants is a potential repository for associative diazotrophs. *Microbiological research*, *159*(3), 285–293. https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.05.004

Paez-Garcia, A., Liao, F., & Blancaflor, E. B. (2019). Two wheat cultivars with contrasting post-embryonic root biomass differ in shoot re-growth after defoliation: Implications for breeding grazing resilient forages. *Plants*, *8*(11), 1–17. https://doi.org/10.3390/plants8110470

Paez-Garcia, A., Motes, C. M., Scheible, W. R., Chen, R., Blancaflor, E. B., & Monteros, M. J. (2015). Root traits and phenotyping strategies for plant improvement. *Plants*, *4*(2), 334–355. https://doi.org/10.3390/plants4020334

Pallardy, S. G. (2008). The Woody Plant Body. *Physiology of Woody Plants*, 9–38. https://doi.org/10.1016/b978-012088765-1.50003-8

Pang, J., Ryan, M. H., Siddique, K. H. M., & Simpson, R. J. (2017). Unwrapping the rhizosheath. *Plant and Soil*, *418*(1–2), 129–139. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3358-y

Péret, B., Larrieu, A., & Bennett, M. J. (2009). Lateral root emergence: A difficult birth. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3637–3643. https://doi.org/10.1093/jxb/erp232

Piñeros, M. A., Larson, B. G., Shaff, J. E., Schneider, D. J., Falcão, A. X., Yuan, L., Clark, R. T., Craft, E. J., Davis, T. W., Pradier, P. L., Shaw, N. M., Assaranurak, I., McCouch, S. R., Sturrock, C., Bennett, M., & Kochian, L. V. (2016). Evolving technologies for growing, imaging and analyzing 3D root system architecture of crop plants. *Journal of integrative plant biology*, *58*(3), 230–241. https://doi.org/10.1111/jipb.12456

Piovesan, A., Vancauwenberghe, V., Van De Looverbosch, T., Verboven, P., & Nicolaï, B. (2021). X-ray computed tomography for 3D plant imaging. *Trends in plant science*, *26*(11), 1171–1185. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.010

Pires, N. D., Yi, K., Breuninger, H., Catarino, B., Menand, B., & Dolan, L. (2013). Recruitment and remodeling of an ancient gene regulatory network during land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(23), 9571–9576. https://doi.org/10.1073/pnas.1305457110

Placido, D. F., Sandhu, J., Sato, S. J., Nersesian, N., Quach, T., Clemente, T. E., Staswick, P. E., & Walia, H. (2020). The LATERAL ROOT DENSITY gene regulates root growth during water stress in wheat. *Plant biotechnology journal*, *18*(9), 1955–1968. https://doi.org/10.1111/pbi.13355

Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkoor, S., Gamet, L., Varoquaux, F., Paris, N., Sentenac, H., Touraine, B., & Desbrosses, G. (2017). Local signalling pathways regulate the Arabidopsis root developmental response to Mesorhizobium loti inoculation. *Journal of Experimental Botany*, *68*(5), 1199–1211. https://doi.org/10.1093/jxb/erw502

Reiss, A., Fomsgaard, I. S., Mathiassen, S. K., Stuart, R. M., & Kudsk, P. (2018). Weed suppression by winter cereals: relative contribution of competition for resources and allelopathy. *Chemoecology*, *28*(4–5), 109–121. https://doi.org/10.1007/s00049-018-0262-8

Rellán-Álvarez, R., Lobet, G., & Dinneny, J. R. (2016). Environmental Control of Root System Biology. *Annual review of plant biology*, *67*, 619–642. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111848

Rengel, Z., & Damon, P. M. (2008). Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiologia Plantarum*, *133*(4), 624–636. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01079.x

Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K. A., Grabov, A., Dolan, L., & Hatzopoulos, P. (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. *The Plant cell*, *13*(1), 139–151. https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.139

Rishmawi, L., Wolff, H., Schrader, A., & Hülskamp, M. (2018). Sub-epidermal Expression of *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1* and Its Role in Root Hair Formation Upon Pi Starvation. *Frontiers in plant science*, *9*, 1411. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01411

Robinson, D. & Rorison, I.H. (1987). Root hairs and plant growth at low nitrogen availabilities. *New Phytologist*, 107(4), 681-693. doi:10.1111/j.1469-8137.1987.tb00906.x

Römheld, V., & Kirkby, E. A. (2010). Research on potassium in agriculture: Needs and prospects. *Plant and Soil*, *335*(1), 155–180. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0520-1

Rongsawat, T. (2019). Root developmental responses to nutrient shortage and biotic conditions in wheat: identification of beneficial bacteria from wheat rhizosphere and new procedures for phenotyping root and root hair development. Thése, université de montpellier

Rongsawat, T., Peltier, J. B., Boyer, J. C., Véry, A. A., & Sentenac, H. (2021). Looking for Root Hairs to Overcome Poor Soils. *Trends in Plant Science*, *26*(1), 83–94. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.001

Roucou, A., Violle, C., Fort, F., Roumet, P., Ecarnot, M., & Vile, D. (2018). Shifts in plant functional strategies over the course of wheat domestication. *Journal of Applied Ecology*, *55*(1), 25–37. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13029

Ruan. L., Zhang, J., Xin, X., Zhang, C., Ma, D., Chen, L.& Zhao B. (2015). Comparative analysis of potassium deficiency-responsive transcriptomes in low potassium susceptible and tolerant wheat (Triticum aestivum L.). *Scientific Reports*, 5(1):1-13. https://doi.org/10.1038/srep10090

Rufo, R., Salvi, S., Royo, C., & Soriano, J. M. (2020). Exploring the genetic architecture of root-related traits in Mediterranean bread wheat landraces by genome-wide association analysis. *Agronomy*, *10*(5). https://doi.org/10.3390/agronomy10050613

Rymen, B., Kawamura, A., Schäfer, S., Breuer, C., Iwase, A., Shibata, M., Ikeda, M., Mitsuda, N., Koncz, C., Ohme-Takagi, M., Matsui, M., & Sugimoto, K. (2017). ABA Suppresses Root Hair Growth via the OBP4 Transcriptional Regulator. *Plant physiology*, *173*(3), 1750–1762. https://doi.org/10.1104/pp.16.01945

Saengwilai, P., Strock, C., Rangarajan, H., Chimungu, J., Salungyu, J., & Lynch, J. P. (2021). Root hair phenotypes influence nitrogen acquisition in maize. *Annals of botany*, *128*(7), 849–858. https://doi.org/10.1093/aob/mcab104

Saengwilai, P., Tian, X., & Lynch, J. P. (2014). Low crown root number enhances nitrogen acquisition from low-nitrogen soils in maize. *Plant Physiology*, *166*(2), 581–589. https://doi.org/10.1104/pp.113.232603

Sandhu, N., Anitha Raman, K., Torres, R. O., Audebert, A., Dardou, A., Kumar, A., & Henry, A. (2016). Rice root architectural plasticity traits and genetic regions for adaptability to variable cultivation and stress conditions. *Plant Physiology*, *171*(4), 2562–2576. https://doi.org/10.1104/pp.16.00705

Savage, N., Yang, T.J., Chen, C.Y., Lin, K.L., Monk, N.A. & Schmidt, W. (2013) Positional signaling and expression of ENHANCER OF TRY AND CPC1 are tuned to increase root hair density in response to phosphate deficiency in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, 8(10), e75452. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075452

Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jürgens, G., & Hülskamp, M. (2002). TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *The EMBO journal*, *21*(19), 5036–5046. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf524

Schenk, H. J. (2006). Root competition: Beyond resource depletion. *Journal of Ecology*, *94*(4), 725–739. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01124.x

Schneider, H. M., & Lynch, J. P. (2020). Should Root Plasticity Be a Crop Breeding Target?. *Frontiers in plant science*, *11*, 546. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00546

Seago, J. L., Jr, & Fernando, D. D. (2013). Anatomical aspects of angiosperm root evolution. *Annals of botany*, *112*(2), 223–238. https://doi.org/10.1093/aob/mcs266

Shane, M. W., McCully, M. E., Canny, M. J., Pate, J. S., & Lambers, H. (2011). Development and persistence of sandsheaths of Lyginia barbata (Restionaceae): relation to root structural development and longevity. *Annals of botany*, *108*(7), 1307–1322. https://doi.org/10.1093/aob/mcr244

Shavrukov, Y., Genc, Y., Hayes, J. (2012). The use of hydroponics in abiotic stress tolerance research. 7th edn. https://doi.org/10.5772/35206.

Shibata, M., & Sugimoto, K. (2019). A gene regulatory network for root hair development. *Journal of Plant Research*, *132*(3), 301–309. https://doi.org/10.1007/s10265-019-01100-2

Shibata, M., Breuer, C., Kawamura, A., Clark, N. M., Rymen, B., Braidwood, L., Morohashi, K., Busch, W., Benfey, P. N., Sozzani, R., & Sugimoto, K. (2018). GTL1 and DF1 regulate root hair growth through transcriptional repression of ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4 in Arabidopsis. *Development (Cambridge)*, *145*(3). https://doi.org/10.1242/dev.159707

Simon, M., Lee, M. M., Lin, Y., Gish, L., & Schiefelbein, J. (2007). Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Developmental Biology*, *311*(2), 566–578. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.001

Sinha, S. K., Rani, M., Kumar, A., Kumar, S., Venkatesh, K., & Mandal, P. K. (2018). Natural variation in root system architecture in diverse wheat genotypes grown under different nitrate conditions and root growth media. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, *30*(3), 223–234. https://doi.org/10.1007/s40626-018-0117-2

Slabaugh, E., Held, M., & Brandizzi, F. (2011). Control of root hair development in Arabidopsis thaliana by an endoplasmic reticulum anchored member of the R2R3-MYB transcription factor family. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *67*(3), 395–405. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04602.x

Sparks, D.L& Huang, P.M. (1985). Physical chemistry of soil potassium. In: Munson RD, ed., Potassium in agriculture. *American Society of Agronomy, Madison*, WI, pp 201–276.

Sparks, D.L. (1987) Potassium dynamics in soils. *Advances in Soil Science,* 6:1–63.

Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, *170*(2), 603–617. https://doi.org/10.1104/pp.15.01360

Stetter, M. G., Schmid, K., & Ludewig, U. (2015). Uncovering genes and ploidy involved in the high diversity in root hair density, length and response to local scarce phosphate in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120604

Strock, C. F., De La Riva, L. M., & Lynch, J. P. (2018). Reduction in root secondary growth as a strategy for phosphorus acquisition. *Plant Physiology*, *176*(1), 691–703. https://doi.org/10.1104/pp.17.01583

Strock, C.F., Burridge, J., Massas, A.S., Beaver, J., Beebe, S., Camilo, S.A. et al. (2019) Seedling root architecture and its relationship with seed yield across diverse environments in Phaseolus vulgaris. *Field Crops Research*, 237, 53-64.

Strullu-Derrien, C., & Strullu, D. G. (2007). Mycorrhization of fossil and living plants. *Comptes Rendus - Palevol*, *6*(6–7), 483–494. https://doi.org/10.1016/j.crpv.2007.09.006

Sustr, M., Soukup, A., & Tylova, E. (2019). Potassium in root growth and development. *Plants*, *8*(10). https://doi.org/10.3390/plants8100435

Takahashi, H., & Pradal, C. (2021). Root phenotyping: Important and minimum information required for root modeling in crop plants. *Breeding Science*, *71*(1), 109–116. https://doi.org/10.1270/jsbbs.20126

Tan, K., Wen, C., Feng, H., Chao, X., & Su, H. (2016). Nuclear dynamics and programmed cell death in Arabidopsis root hairs. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, *253*, 77–85. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.08.006

Tanaka, N., Kato, M., Tomioka, R., Kurata, R., Fukao, Y., Aoyama, T., & Maeshima, M. (2014). Characteristics of a root hair-less line of Arabidopsis thaliana under physiological stresses. *Journal of experimental botany*, *65*(6), 1497–1512. https://doi.org/10.1093/jxb/eru01

Thomas, C. L., Graham, N. S., Hayden, R., Meacham, M. C., Neugebauer, K., Nightingale, M., Dupuy, L. X., Hammond, J. P., White, P. J., & Broadley, M. R. (2016). High-throughput phenotyping (HTP) identifies seedling root traits linked to variation in seed yield and nutrient capture in field-grown oilseed rape (Brassica napus L.). *Annals of Botany*, *118*(4), 655–665. https://doi.org/10.1093/aob/mcw046

Thornburg, T. E., Liu, J., Li, Q., Xue, H., Wang, G., Li, L., Fontana, J. E., Davis, K. E., Liu, W., Zhang, B., Zhang, Z., Liu, M., & Pan, X. (2020). Potassium Deficiency Significantly Affected Plant Growth and Development as Well as microRNA-Mediated Mechanism in Wheat (Triticum aestivum L.). *Frontiers in Plant Science*, *11*(August), 1–10. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01219

Tominaga-Wada, R., Ishida, T., & Wada, T. (2011). New Insights into the mechanism of development of Arabidopsis root hairs and trichomes. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 286, Issue C). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385859-7.00002-1

Trachsel, S., Kaeppler, S. M., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2011). Shovelomics: High throughput phenotyping of maize (Zea mays L.) root architecture in the field. *Plant and Soil*, *341*(1–2), 75–87. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0623-8

Trachsel, S., Kaeppler, S.M., Brown, K.M. and Lynch, J.P. (2013) Maize root growth angles become steeper under low N conditions. *Field Crops Research*. 140: 18–31. https://doi.org/10.1016/J.FCR.2012.09.010

Tracy, S. R., Nagel, K. A., Postma, J. A., Fassbender, H., Wasson, A., & Watt, M. (2020). Crop Improvement from Phenotyping Roots: Highlights Reveal Expanding Opportunities. *Trends in plant science*, *25*(1), 105–118. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.10.015

Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., Kitomi, Y., Inukai, Y., Ono, K., Kanno, N., Inoue, H., Takehisa, H., Motoyama, R., Nagamura, Y., Wu, J., Matsumoto, T., Takai, T., Okuno, K., & Yano, M. (2013). Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature genetics*, *45*(9), 1097–1102. https://doi.org/10.1038/ng.2725

Van Dusschoten, D., Metzner, R., Kochs, J., Postma, J. A., Pflugfelder, D., Bühler, J., Schurr, U., & Jahnke, S. (2016). Quantitative 3D analysis of plant roots growing in soil using magnetic resonance imaging. *Plant Physiology*, *170*(3), 1176–1188. https://doi.org/10.1104/pp.15.01388

Vandamme, E., Renkens, M., Pypers, P., Smolders, E., Vanlauwe, B., & Merckx, R. (2013). Root hairs explain P uptake efficiency of soybean genotypes grown in a P-deficient Ferralsol. *Plant and Soil*, *369*(1–2), 269–282. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1571-2

Vatter, T., Neuhäuser, B., Stetter, M., & Ludewig, U. (2015). Regulation of length and density of Arabidopsis root hairs by ammonium and nitrate. *Journal of Plant Research*, *128*(5), 839–848. https://doi.org/10.1007/s10265-015-0733-8

Véry, A. A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., & Sentenac, H. (2014). Molecular biology of K+ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *Journal of Plant Physiology*, *171*(9), 748–769. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.011

Vijayakumar, P., Datta, S., & Dolan, L. (2016). ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE4 (RSL4) promotes root hair elongation by transcriptionally regulating the expression of genes required for cell growth. *The New phytologist*, *212*(4), 944–953. https://doi.org/10.1111/nph.14095

Vincent, C., Rowland, D., Na, C., & Schaffer, B. (2017). A high-throughput method to quantify root hair area in digital images taken in situ. *Plant and Soil*, *412*(1–2), 61–80. https://doi.org/10.1007/s11104-016-3016-9

Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., & Schoenaers, S. (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *71*(8), 2412–2427. https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA048

Volkens, G. (1887). Die Flora der aegyptisch-arabischen Wuste: auf Grundlage anatomisch-physiologischer Forschungen. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Von Wirén, N., Lauter, F. R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., & Frommer, W. B. (2000). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *21*(2), 167–175. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00665.x

Wada, T., Tachibanan, T., Shimura, Y., & Okada, K. (1997). Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC. *Science* , 277(5329), 1113–1116. https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1113

Waines, J. G., & Ehdaie, B. (2007). Domestication and crop physiology: Roots of green-revolution wheat. *Annals of Botany*, *100*(5), 991–998. https://doi.org/10.1093/aob/mcm180

Wang, L., Li, X., Mang, M., Ludewig, U., & Shen, J. (2021). Heterogeneous nutrient supply promotes maize growth and phosphorus acquisition: additive and compensatory effects of lateral roots and root hairs. *Annals of botany*, *128*(4), 431–440. https://doi.org/10.1093/aob/mcab097

Wang, X., Yan, X., & Liao, H. (2010). Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: a radical approach. *Annals of botany*, *106*(1), 215–222. https://doi.org/10.1093/aob/mcq029

Wang, Y., & Wu, W. H. (2010). Plant sensing and signaling in response to K+-deficiency. *Molecular plant*, *3*(2), 280–287. https://doi.org/10.1093/mp/ssq006

Wang, Y., Thorup-Kristensen, K., Jensen, L. S., & Magid, J. (2016). Vigorous root growth is a better indicator of early nutrient uptake than root hair traits in spring wheat grown under

low fertility. *Frontiers in Plant Science*, *7*(JUNE2016), 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00865

Watt, M., Fiorani, F., Usadel, B., Rascher, U., Muller, O., & Schurr, U. (2020). Phenotyping: New Windows into the Plant for Breeders. *Annual review of plant biology*, *71*, 689–712. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041124

Watt, M., Magee, L. J., & McCully, M. E. (2008). Types, structure and potential for axial water flow in the deepest roots of field-grown cereals. *The New phytologist*, *178*(1), 135–146. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02358.x

Watt, M., Moosavi, S., Cunningham, S. C., Kirkegaard, J. A., Rebetzke, G. J., & Richards, R. A. (2013). A rapid, controlled-environment seedling root screen for wheat correlates well with rooting depths at vegetative, but not reproductive, stages at two field sites. *Annals of Botany*, *112*(2), 447–455. https://doi.org/10.1093/aob/mct122

Weaver, J.E, Jean, F.C & Crist, J.W. (1922). Development and activities of roots of crop plants; a study in crop ecology

Webb, R. (1936). Crown and root development in wheat varieties '. *Journal of Agricultural Research*, *52*(8), 569–584.

Weiner J. (2019). Looking in the Wrong Direction for Higher-Yielding Crop Genotypes. *Trends in plant science*, *24*(10), 927–933. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.07.001

Weiner, J. (2003). Ecology – the science of agriculture in the 21st century. *The Journal of Agricultural Science, 141*(3-4), 371-377. doi:10.1017/S0021859603003605

Weiner, J., Du, Y. L., Zhang, C., Qin, X. L., & Li, F. M. (2017). Evolutionary agroecology: individual fitness and population yield in wheat (Triticum aestivum). *Ecology*, *98*(9), 2261–2266. https://doi.org/10.1002/ecy.1934

White P. J. (2019). Root traits benefitting crop production in environments with limited water and nutrient availability. *Annals of botany*, *124*(6), 883–890. https://doi.org/10.1093/aob/mcz162

White, P. J., George, T. S., Dupuy, L. X., Karley, A. J., Valentine, T. A., Wiesel, L., & Wishart, J. (2013). Root traits for infertile soils. *Frontiers in Plant Science*, *4*(JUN), 1–7. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00193

White, P.J., Greenwood, D.J. (2013). Properties and management of cationic elements for crop growth. In: eds P.J. Gregory and S. Nortcliff, Soil Conditions and Plant Growth. https://doi.org/10.1002/9781118337295.ch6

White, R. G., & Kirkegaard, J. A. (2010). The distribution and abundance of wheat roots in a dense, structured subsoil--implications for water uptake. *Plant, cell & environment*, *33*(2), 133–148. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02059.x

Wiengweera, A., & Greenway, H. (2004). Performance of seminal and nodal roots of wheat in stagnant solution: K+ and P uptake and effects of increasing O2 partial pressures around the shoot on nodal root elongation. *Journal of Experimental Botany*, *55*(405), 2121–2129. https://doi.org/10.1093/jxb/erh232

Wuest, S. E., Peter, R., & Niklaus, P. A. (2021). Ecological and evolutionary approaches to improving crop variety mixtures. *Nature ecology & evolution*, *5*(8), 1068–1077. https://doi.org/10.1038/s41559-021-01497-x

Wullstein, L.H., Bruening, M.L. and Bollen, W.B. (1979) Nitrogen fixation associated with sand grain root sheaths (rhizosheaths) of certain xeric grasses of certain xeric grasses. Physiologia Plantarum. 46: 1-4. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb03176.x.

Xin, W., Zhang, L., Gao, J., Zhang, W., Yi, J., Zhen, X., Bi, C., He, D., Liu, S., & Zhao, X. (2021). Adaptation Mechanism of Roots to Low and High Nitrogen Revealed by Proteomic Analysis. *Rice*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s12284-020-00443-y

Xu, P., Cai, X. T., Wang, Y., Xing, L., Chen, Q., & Xiang, C. B. (2014). HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, *65*(15), 4285–4295. https://doi.org/10.1093/jxb/eru202

Xynias I.N., Mylonas I., Korpetis E.G., Ninou E., Tsaballa A., Avdikos I.D., Mavromatis A.G. Durum Wheat Breeding in the Mediterranean Region: Current Status and Future Prospects. Agronomy. 2020;10:432. doi: 10.3390/agronomy10030432.

Yang, X., & Deng, W. (2017). Morphological and structural characterization of the attachment system in aerial roots of Syngonium podophyllum. *Planta*, *245*(3), 507–521. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2621-4

Yi, K., Menand, B., Bell, E., & Dolan, L. (2010). A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nature genetics*, *42*(3), 264–267. https://doi.org/10.1038/ng.529

York, L. M., Carminati, A., Mooney, S. J., Ritz, K., & Bennett, M. J. (2016). The holistic rhizosphere: Integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *Journal of Experimental Botany*, *67*(12), 3629–3643. https://doi.org/10.1093/jxb/erw108

Yuan, H. M., Blackwell, M., McGrath, S., George, T. S., Granger, S. H., Hawkins, J. M. B., Dunham, S., & Shen, J. B. (2016). Morphological responses of wheat (Triticum aestivum L.) roots to phosphorus supply in two contrasting soils. *Journal of Agricultural Science*, *154*(1), 98–108. https://doi.org/10.1017/S0021859615000702

Zhang, H., & Forde, B. G. (1998). An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5349), 407–409. https://doi.org/10.1126/science.279.5349.407

Zhang, S., Huang, L., Yan, A., Liu, Y., Liu, B., Yu, C., Zhang, A., Schiefelbein, J., & Gan, Y. (2016). Multiple phytohormones promote root hair elongation by regulating a similar set of genes in the root epidermis in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, *67*(22), 6363–6372. https://doi.org/10.1093/jxb/erw400

Zhao, X. H., Yu, H. Q., Wen, J., Wang, X. G., Du, Q., Wang, J., & Wang, Q. (2016). Response of root morphology, physiology and endogenous hormones in maize (Zea mays L.) to potassium deficiency. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(4), 785–794. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61246-1.

Zhou, H., Whalley, W. R., Hawkesford, M. J., Ashton, R. W., Atkinson, B., Atkinson, J. A., Sturrock, C. J., Bennett, M. J., & Mooney, S. J. (2021). The interaction between wheat

roots and soil pores in structured field soil. *Journal of experimental botany*, *72*(2), 747–756. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa475

Zhu, J., Kaeppler, S. M., & Lynch, J. P. (2005). Mapping of QTL controlling root hair length in maize (Zea mays L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, *270*(1), 299–310. https://doi.org/10.1007/s11104-004-1697-y

Zhu, J., Kaeppler, S. M., & Lynch, J. P. (2005). Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (Zea mays). *Functional Plant Biology*, *32*(8), 749–762. https://doi.org/10.1071/FP05005

Zhu, J., Zhang, C., & Lynch, J. P. (2010). The utility of phenotypic plasticity of root hair length for phosphorus acquisition. *Functional Plant Biology*, *37*(4), 313–322. https://doi.org/10.1071/FP09197

Zhu, Y. H., Weiner, J., & Li, F. M. (2019a). Root proliferation in response to neighbouring roots in wheat (Triticum aestivum). *Basic and Applied Ecology*, *39*, 10–14. https://doi.org/10.1016/j.baae.2019.07.001

Zhu, Y. H., Weiner, J., Jin, Y., Yu, M. X., & Li, F. M. (2022). Biomass Allocation Responses to Root Interactions in Wheat Cultivars Support Predictions of Crop Evolutionary Ecology Theory. *Frontiers in plant science*, *13*, 858636. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.858636

Zhu, Y. H., Weiner, J., Yu, M. X., & Li, F. M. (2019). Evolutionary agroecology: Trends in root architecture during wheat breeding. *Evolutionary Applications*, *12*(4), 733–743. https://doi.org/10.1111/eva.12749

Zörb, C., Senbayram, M., & Peiter, E. (2014). Potassium in agriculture--status and perspectives. *Journal of plant physiology*, *171*(9), 656–669. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.008

Zhur, H. (2022). Dialogue moléculaire plante – microbiote : analyse des exsudats racinaires et bactériens, et évolution de la fonction d'exsudation racinaire au cours de la domestication et de l'amélioration du blé. Thèse, Montpellier

Annexe

Annexe

Introduction

En marge de mon travail principal d'analyse de l'architecture racinaire et des zones pilifères, faisant appel à des questionnements/expérimentations/développements dans les domaines du phénotypage, de l'analyse d'image et de la physiologie, j'ai souhaité effectuer un court projet en biologie moléculaire.

Il m'a alors été proposé de prendre en charge un travail de clonage pour terminer un ancien projet de l'équipe sur une famille de transporteur de K^+/Na^+ exprimés en particulier dans les racines (famille "High-affinity K^+ Transporteur" (HKT)), chez *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula* possède 5 gènes *HKT*, dont 4 sont fonctionnels. Le gène qui restait à finir de caractériser, *MtHKT1;2*, avait été identifié dans un transcriptome de poil absorbant (Damiani et al., 2016). Des analyses complémentaires restaient à faire pour obtenir une information plus précise de son profil d'expression racinaire. La stratégie choisie pour faire cette analyse était d'exprimer la région promotrice de ce gène en fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *GUS*, dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula*. J'ai préparé la construction pour la transformation, encadrée dans l'équipe par Pierre Berthomieu. Je présente ci-dessous dans cette annexe le travail de biologie moléculaire que j'ai effectué et le profil racinaire d'expression de *MtHKT1;2* qui a été obtenu.

Fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *MtHKT1;2* avec le gène rapporteur *GUS* dans le vecteur pCambia1301

1. Recherche *in silico* de la séquence de la région promotrice du gène *MtHKT1;2* et choix de sites de restriction pour le clonage de cette région dans le vecteur de destination

Le gène *MtHKT1;2* (Medtr6g092840) est présent sur le chromosome 6 de *Medicago truncatula*, entre 2 autres gènes *HKT*, *MtHKT1;1* et le pseudogène *MtHKT1;3* (Figure 1). Une séquence génomique de 2600 bp en amont de la séquence codante de *MtHKT1;*2, supposées contenir l'ensemble des séquences régulatrices de la région promotrice, a été récupérée de la base de donnée génomique de *Medicago truncatula*.

Une étude des sites de restriction enzymatique sur la région identifiée de 2.6 kpb du promoteur ainsi que sur le vecteur où la région promotrice doit être insérée immédiatement en amont de celle du gène rapporteur *GUS* (Figure 2) a été faite pour choisir les enzymes de

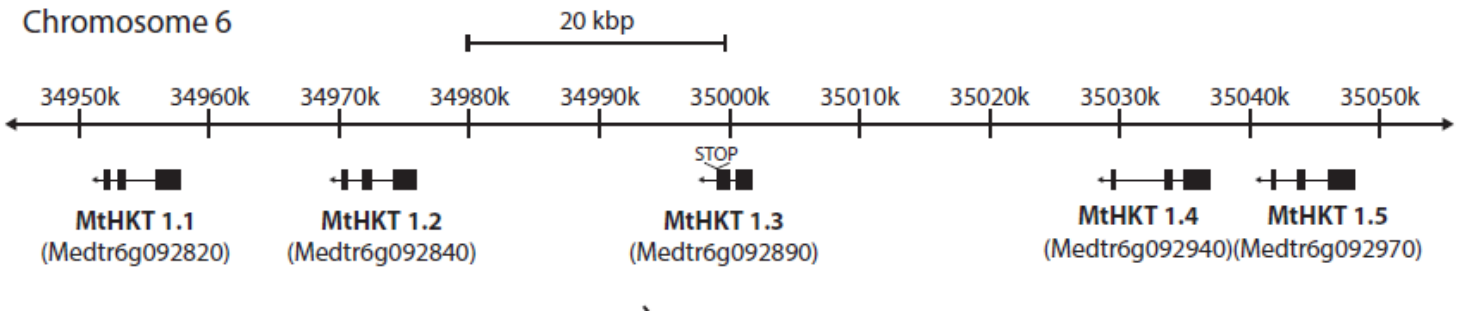


Figure 1. Illustration de la portion annotée du chromosome 6 (34,950,000..35,050,000) du génome de *Medicago truncatula* (https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/) montrant l'emplacement du gène *MtHKT1;2.*

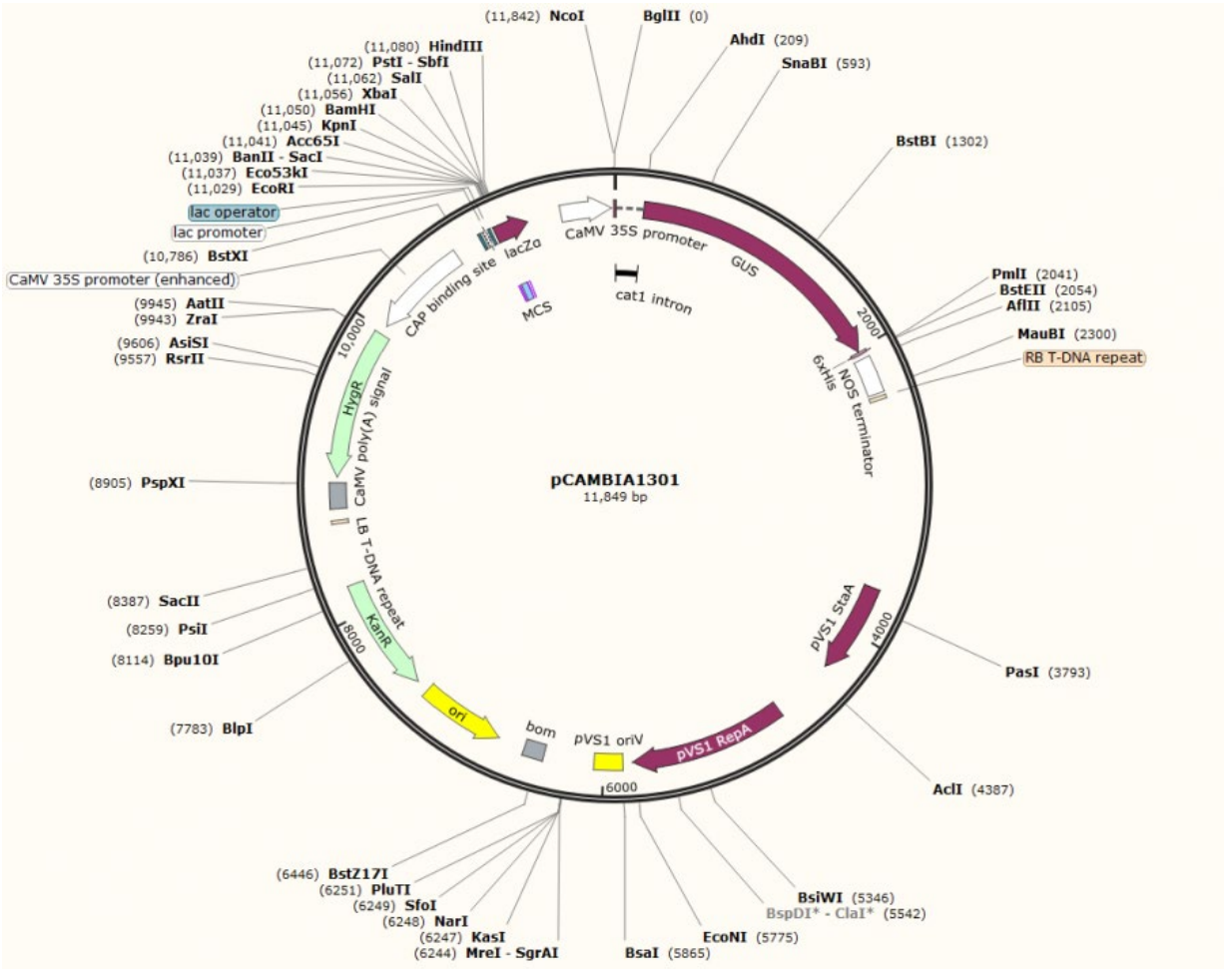


Figure 2. Vecteur pCAMBIA 1301 d'expression dans les plantes , contenant le gène rapporteur *GUS* pour des constructions de fusion transcriptionnelle.

restriction qui serviront au clonage. J'ai choisi deux enzymes, BglII, en 3' de la séquence à insérer et SacI, en 5', pour couper le vecteur et cloner la séquence du promoteur. Des sites de restriction pour ces 2 enzymes sont présents sur le vecteur à une position prévue pour ce type de clonage. Par contre, aucun des 2 sites n'est présent dans la séquence promotrice, et devront alors être ajoutés aux 2 extrémités de cette séquence.

2. Amplification de la région promotrice de *MtHKT1;2.*

La séquence promotrice doit être amplifiée par une réaction de PCR. Au départ j'ai dessiné des amorces pour amplifier la région promotrice entière d'une taille de 2.6 kpb. Ces amorces sont composées en partie d'une séquence qui s'hybride parfaitement sur 21 pb du côté 5' de la séquence à amplifier, et sur 25 pb du côté 3' de cette séquence. A ces séquences sont ajoutés les sites de restriction pour le clonage ainsi que 3 bases après chacun des 2 sites pour permettre aux enzymes de restriction de se positionner de façon adéquate pour la coupure (*Cf.* ci-dessous).

Amorce sens :

TGAGAGCTCTTGAGGATTTGACACATTGGA (6g092840-dir-1)

Amorce antisens, du côté de l'initiation de la séquence codante ("ATG" ou CAT en réverse) :

CGCAGATCTTG**CAT**ATTTGTTTTCTCTTTAATATACACA (6g092840-rev-1)

Les produits de la réaction de PCR effectuée avec ce couple d'amorce sur de l'ADN génomique de *Medicago truncatula*, séparés en fonction de leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1%, ne montre que des dimers d'amorces dans les réactions témoins sans ADN génomique et aucune bande d'ADN amplifié dans les réactions contenant de l'ADN génomique (avec les 2 sources d'ADN).

Dans cette expérience, le programme d'amplification par PCR était le suivant :

Dénaturation de l'ADN double brin :	98°C : 3 min
Puis 35 cycles de réactions comprenant les étapes suivantes :	
Dénaturation de l'ADN double brin	98°C : 15''
Hybridation des amorces	57°C : 30''
Elongation des fragments d'ADN	72°C : 1 min 30''
Enfin une étape d'élongation finale	72°C : 2 min
Et une étape de refroidissement	10°C : 15 min

35x

Le mélange réactionnel de la réaction de PCR effectuée avec une ADN polymérase à haute-fidélité ("Phusion") comprenait environ 100 ng d'ADN génomique, 1 µl de chacune des amorces diluées à 10 µM, 1 µl de mélange de nucléotides (dNTP) à 10 mM, 0,5 µl d'enzyme ainsi que son tampon à la concentration adéquate (1X), et de l'eau pure dépourvue de nucléase pour compléter le volume à 20 µl.

Le fragment désiré n'ayant pas été amplifié, **une nouvelle stratégie d'amplification de la région promotrice a été adoptée, basée sur l'amplification de fragments plus petits.** Ainsi, puisque l'amplification du promoteur complet n'a pas marché, j'ai décidé d'amplifier le promoteur en 2 fois en isolant en premier lieu une séquence de 1,75 kpb (coté ATG).

Pour me donner davantage de chances de succès, j'ai également fait différentes réactions de PCR avec quelques variations dans le protocole : J'ai testé deux ADN polymérases, la Phusion comme précédemment, et la GoTaq, une enzyme non à haute-fidélité mais possiblement moins critique pour l'amplification. J'ai fait aussi un gradient de température pour l'hybridation des amorces (entre 53,9 et 58,9 °C avec 3 réactions ayant une température d'hybridation qui variait d'1 degré et demi). Enfin, le nombre de cycles d'amplification a été augmenté à 50.

Programme d'amplification (Phusion): 98°C: 3 min

Puis 50 cycles constitués des étapes suivantes :

98°C: 15''
53.9-58.9 C: 30'' 50x
72°C: 2 min

Et pour finir :

72°C: 2 min
10°C: 15 min

L'amorce antisens était la même que lors de la tentative d'amplification du fragment entier de promoteur. L'amorce sens par contre a été modifiée pour s'hybrider à 1,75 kpb en amont du début de la séquence codante. Un site de restriction pour l'enzyme SacI et les bases nécessaires au fonctionnement de l'enzyme ont été ajoutés (*Cf.* ci-dessous).

Amorce sens : AACGAGCTCCATCAACGACGAACAATTCA
Amorce antisens : CGCAGATCTTG**CAT**ATTTGTTTTCTCTTTAATATACACA

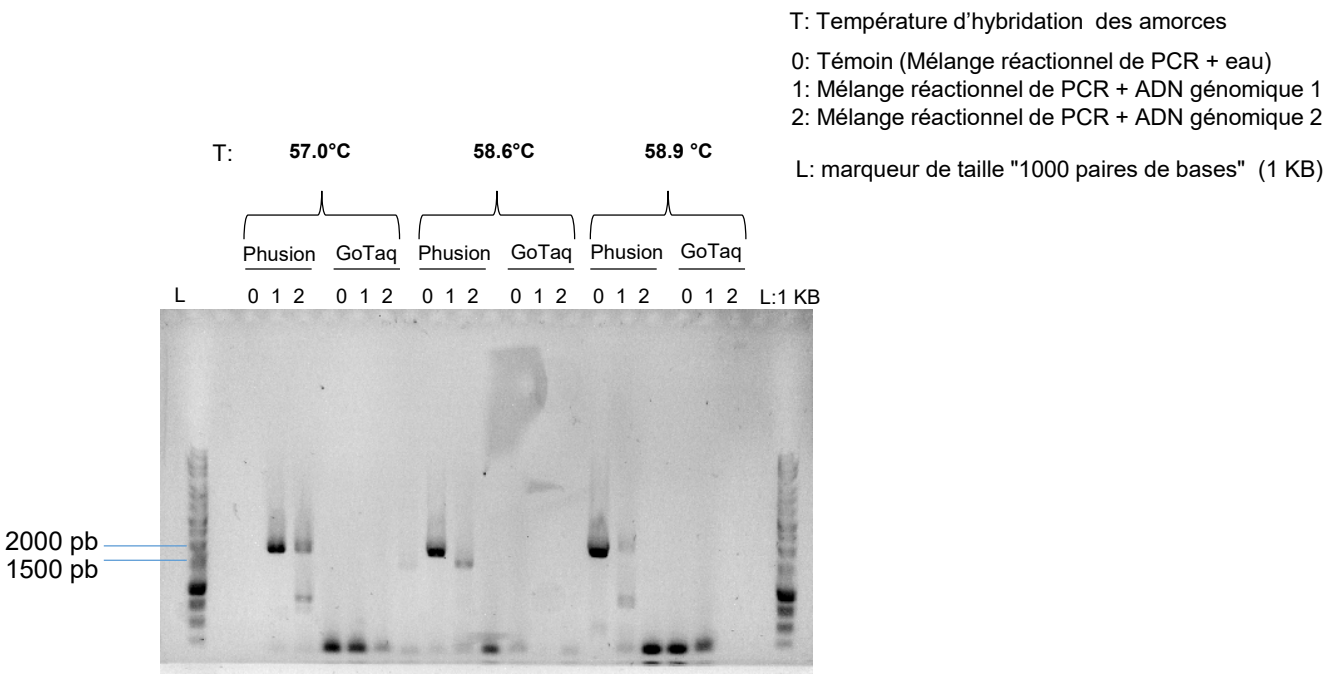


Figure 3. Amplification par réaction de PCR de la première moitié du promoteur de *MtHKT1;2*

Deux sources d'ADN génomique de *Medicago truncatula* ("1" et "2") ont été utilisées pour amplifier le premier fragment de promoteur de *MtHKT1;2* (1,75 kpb). Les réactions de PCR ont été faites avec 2 ADN polymérases, la Phusion et la GoTaq. Trois températures d'hybridation des amorces ont été testées.

Après migration par électrophorèse d'un échantillon (3µl) des différents produits de réactions de PCR dans un gel d'agarose, la présence d'une bande d'ADN de la taille attendue est observée avec les 3 températures d'hybridation testées, pour l'une des sources d'ADN génomique utilisée. Cette amplification d'ADN n'a été obtenue qu'avec l'une des 2 ADN polymérases, la Phusion (Figure 3).

Les échantillons de réaction PCR pour lesquels des bandes d'ADN de taille attendue ont été amplifiées ont été conservés pour effectuer la purification de l'ADN de ces produits de PCR.

Amplification de la deuxième "moitié" de la séquence promotrice de *MtHKT1.2*

Pour l'amplification du deuxième morceau de promoteur, la stratégie a été d'amplifier une séquence présentant en 3' une partie commune avec l'extrémité 5' du morceau aval du promoteur précédemment amplifié. Dans cette partie commune est présent un site de restriction unique dans la région promotrice (pour l'enzyme SwaI/SmiI), qui permettra, après découpage des 2 morceaux par l'enzyme, de les assembler par ligation.
Les amorces dessinées pour l'amplification de ce deuxième morceau de promoteur comprennent un site de restriction pour l'enzyme SacI du côté 5' de l'amorce sens pour le clonage de ce morceau de promoteur dans le vecteur pCambia1301 (*Cf.* ci-dessous pour le clonage). L'amorce antisens permet d'inclure dans la séquence amplifiée le site de restriction unique SwaI/SmiI. La taille de l'ADN amplifié avec cette paire d'amorces est de 1300 pb.

Les amorces utilisées pour l'amplification du 2ème morceau de promoteur sont :

Mt-dir 1: TGAGAGCTCTTGAGGATTTGACACATTGGA (6g092840-dir-1)
Mt-rev 2: ATCCTCGCGTACAAACCGTG (6g092840-rev-2)

La réaction de PCR a été effectuée en utilisant l'ADN polymérase Phusion et des conditions similaires à celles des réactions antérieures pour l'amplification du 1er fragment (seul le gradient de température exploré pour l'hybridation des amorces a été décalé entre 56 et 62°C, compte tenu de la température de dissociation des amorces, plus élevée que celle des amorces utilisées pour l'amplification du premier fragment).

Les 5 conditions de PCR ont permis l'amplification d'une bande d'ADN de la taille attendue (Figure 4).

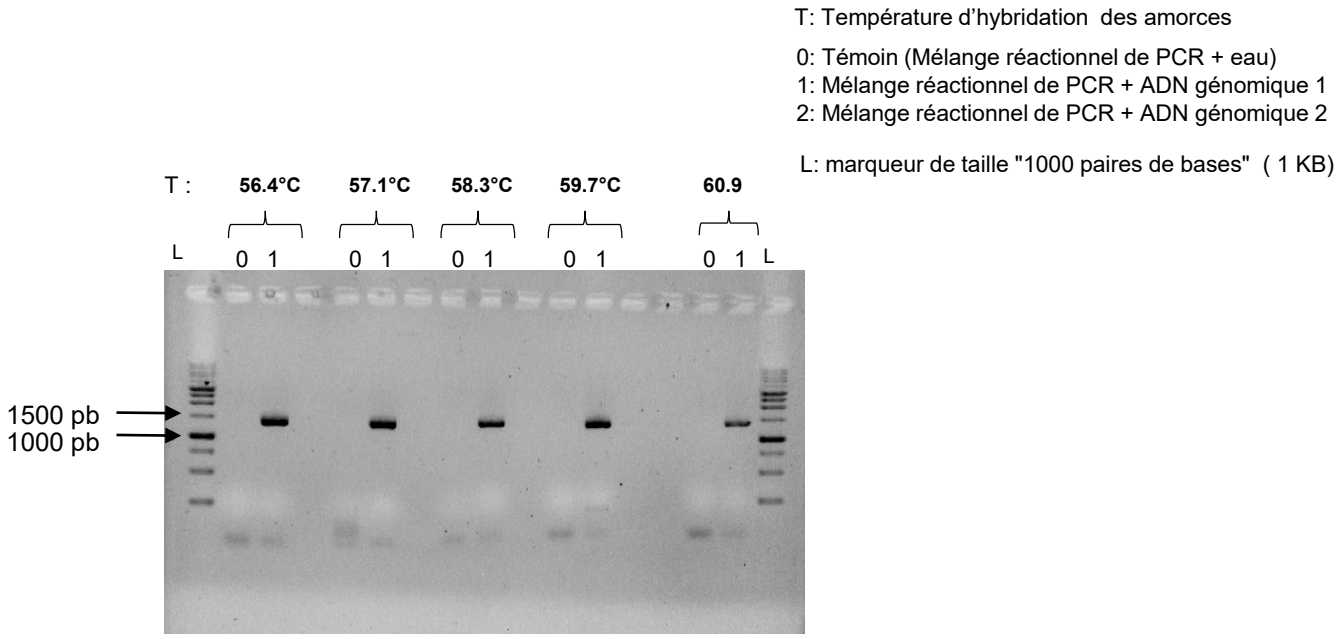


Figure 4. Amplification de la deuxième moitié du promoteur de *MtHKT1;2*.

L'amplification du 2ème fragment du promoteur a été effectuée avec l'enzyme Phusion en testant 5 températures d'hybridation des amorces différentes.

3. Clonage de la région promotrice de *MtHKT1;2* dans le vecteur pCambia1301.

Etape de purification des produits de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant le kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System", basé sur le principe d'une fixation de l'ADN sur une membrane de silice en présence de sels chaotropiques, puis après lavage, une élution de l'ADN dans de l'eau.

Digestion de l'ADN et purification

J'ai effectué une digestion des 2 fragments de promoteur amplifiés et du vecteur pCambia1301 avec les enzymes choisies, permettant d'obtenir des bouts cohésifs pour la ligation du promoteur au vecteur. Le clonage des 2 fragments de promoteur s'est fait en 2 étapes. Dans un premier temps, le fragment terminal du promoteur (à insérer immédiatement en 5' de la séquence du gène rapporteur *GUS* dans le vecteur pCambia1301) a été cloné. Pour ce faire, deux digestions, l'une du vecteur et l'autre du fragment de promoteur (insert), ont été effectuées avec les enzymes BglII et SacI. En plus, nous avons ajouté l'enzyme HindIII dans la réaction avec l'ADN du vecteur pour couper en deux le petit fragment d'ADN à éliminer entre les 2 sites de clonage, dans l'objectif de limiter le risque que ce fragment vienne reformer le vecteur d'origine lors de l'étape de ligation.

Une fois, ce premier fragment de promoteur inséré dans le vecteur (*Cf*. ci-dessous pour la fin des étapes de clonage), la stratégie pour l'insertion (en amont du premier fragment) du deuxième fragment dans le vecteur, a été la suivante : (i) effectuer une nouvelle digestion du vecteur contenant le premier fragment de promoteur pour supprimer la partie entre le site SacI en 5' du clonage et le site SwaI/SmiI dans le fragment de promoteur inséré, (ii) digérer le deuxième fragment de promoteur à insérer avec les mêmes enzymes, et enfin liguer le deuxième fragment dans le vecteur en amont du premier fragment. Il est à noter que pour la digestion en vue du clonage de ce 2ème fragment de promoteur, les 2 enzymes nécessitaient des températures différentes, ce qui a impliqué 2 étapes successives de digestion avec l'une puis l'autre enzymes.

Les digestions d'ADN sont effectuées dans un volume final de 150 µl dans les conditions suivantes :

Insert 1

40 µl ADN (env. 70 ng/µl)

81 µl H_2O

15 µl Tampon commun aux enzymes

7 µl enzyme BglII

7 µl enzyme SacI

Plasmide (1er clonage)

45 µl ADN (env. 100 ng/µl)

76 µl H_2O

15 µl Tampon

6 µl enzyme BglII

6 µl enzyme SacI

2 µl HindIII

Insert 2

50 µl ADN (env. 70 ng/µl)

15 µl H_2O

7,5 µl Tampon de l'enzyme SacI

7 µl enzyme SacI

Puis 2ème digestion après ajout de 7,5 µl de tampon de SwaI/SmiI

Et 7 µl d'enzyme SwaI/SmiI

Plasmide (2ème clonage)

76µl ADN (env. 100 ng/µl)

76 µl H_2O

7,5 µl Tampon de l'enzyme SacI

7 µl enzyme SacI

Puis 2ème digestion après ajout de 7,5 µl de tampon de SwaI/SmiI

Et 7 µl d'enzyme SwaI/SmiI

Le mélange réactionnel est placé dans un bain Marie réglé auparavant à 37°C pour BglII et SacI, et 25°C pour SwaI/SmiI, pendant 1h. Après l'incubation, chaque enzyme est inactivée à la température d'inactivation qui lui correspond : SacI et SwaI/SmiI à 65°C pendant 5 min et respectivement 20 min, HindIII à 80°C pendant 10 min, BglII par contre ne s'inactive pas, j'ai alors mis les échantillons au congélateur pour arrêter la fonction de cette enzymeI.

Les fragments d'ADN digérés sont ensuite purifiés par une méthode d'extraction d'ADN au phénol chloroforme :

A un volume de digestat d'ADN de 150 µl sont ajoutés 150 µl d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique en proportion 25/24/1. Après vortex énergétique pendant 3 min puis centrifugation à vitesse maximale, la phase aqueuse contenant l'ADN purifié des protéines (et les sels) est récupérée et transférée dans un deuxième tube auquel sont ajoutés 150 µl de chloroforme/alcool isoamylique en proportion 24/1 pour une purification supplémentaire. Après vortex énergétique de nouveau, et centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et y sont ajoutés un volume/10 d'acétate de Na 3 M (pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol 100%, pour effectuer la précipitation de l'ADN. Après avoir bien mélangé et centrifugé 15 minutes à vitesse maximale, le surnageant est jeté et le culot d'ADN est lavé par l'ajout de 500 µl d'éthanol à 70%. Après 5 min de centrifugation à vitesse maximale, le surnageant est jeté et le culot d'ADN est mis à sécher pendant une nuit, le tube renversé sur une feuille de papier absorbant. Le culot sec est re-suspendu dans de l'eau pure (volume : 10 µl).

Ligation

La ligation des fragments d'ADN purifiés a été effectuée à l'aide d'une ADN ligase T4, pendant une vingtaine d'heures à une température de 16-20°C. Dans un volume de 10 µl sont mélangés 2 µl d'insert digéré (env. 133 ng d'ADN), 1 µl de vecteur digéré (env. 198.9 ng d'ADN), 1 µl de tampon, 1 µl de ligase et 5 µl d'H_2O.

Sélection des clones positifs

Les vecteurs ayant acquis avec succès l'insert à l'issue de l'étape de ligation sont sélectionnés en effectuant une transformation de bactéries *E. coli* compétentes avec le produit de ligation et en analysant les colonies bactériennes obtenues. Les bactéries n'ayant pas intégré de vecteur sont éliminées en utilisant l'ajout de kanamycine comme marqueur de sélection dans le milieu LB de culture des bactéries (présence d'un gène de résistance à cet antibiotique dans le vecteur pCambia1301 utilisé).

Les bactéries compétentes (NEB 5-alpha F'*Iq* Competent *E. coli*) sont transformées par choc thermique en présence de 3 µl de produit de ligation, selon le protocole préconisé pour ces cellules par le fabriquant pour l'obtention d'une transformation hautement efficace (https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-

c2992). Après récupération du choc thermique, les bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB gélosé en présence de kanamycine (étalement de 100 µl à 250 µl de bactéries sur des boites différentes), puis mises à pousser à 37°C. Le milieu gélosé contient aussi de l'IPTG (un analogue non métabolisable du galactose; 0.1M) et les boites de Pétri sont également imprégnées de Xgal (40mg/ml) avant étalement des bactéries transformées pour permettre après croissance une première sélection visuelle des bactéries transformées (bactéries ayant intégré un vecteur contenant ou non un insert) par un test coloré blanc/bleu. Ce test est permis par la présence de séquences promotrice et codante du gène de la ß-galactosidase d'*E. coli* dans le vecteur pCambia1301. Dans la région codante de la ß-galactosidase se trouve une cassette de polyclonage qui maintient le cadre de lecture de la ß-galactosidase et n'empêche pas la fonction de l'enzyme produite dans le vecteur "vide". L'IPTG induit l'expression du gène de la ß-galactosidase et Xgal est un substrat de l'enzyme dont le produit conduit à la présence d'un pigment bleu. Ainsi, les bactéries ayant incorporé un vecteur pCambia1301 natif forment des colonies bleues en présence de Xgal/IPTG, alors que les colonies porteuses de plasmides recombinants où la phase de lecture du gène de la ß-galactosidase est modifiée forment des colonies blanches (Figure 5). Ce test blanc/bleu a pu être utilisé pour le clonage du premier insert permettant une première sélection de colonies blanches.

Dans une deuxième étape, une analyse plus précise sur les colonies a été effectuée par PCR pour vérifier l'insert cloné. Le couple d'amorce alors utilisé ne ciblait qu'une partie de l'insert (500-600 pb), pour obtenir une réponse rapide et fiable de la présence de l'insert d'intérêt. D'autre part, le taux de réussite du clonage étant possiblement faible, des pools de 10 colonies ont été utilisés pour ces criblages. Les colonies sont prélevées à l'aide d'une pointe et sont re-suspendues dans de l'eau dont un petit volume est alors utilisé pour la réaction de PCR (les plasmides sont extraits par la chaleur). L'ADN polymérase GoTaq (non haute-fidélité) est utilisée, avec un protocole standard pour cette enzyme (tenant compte des amorces utilisées).

Amorces utilisées :
Vérification du premier clonage

pcambia-dir TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
Mt-rev 2 : ATCCTCGCGTACAAACCGTG

Vérification du clonage final avec le promoteur complet

Pcambia-dir : TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
6g092840-rev 3 : CCGTGATAGATAGGAGGGAGG

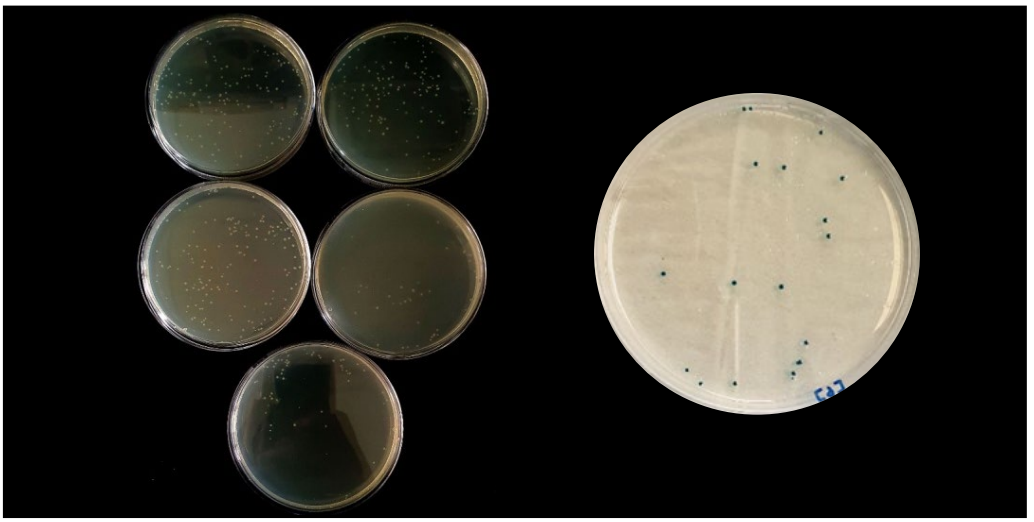


Figure 5. Criblage des colonies ayant intégré un vecteur pCambia 1301 dans lequel un insert a été cloné, par le test blanc/bleu.

Après ligation du 1er fragment de promoteur amplifié avec le plasmide pCAMBIA 1301, une première sélection des clones potentiellement positifs est réalisée par un crible blanc/bleu des colonies en présence d'Xgal/IPTG (*Cf.* détails dans le §3).

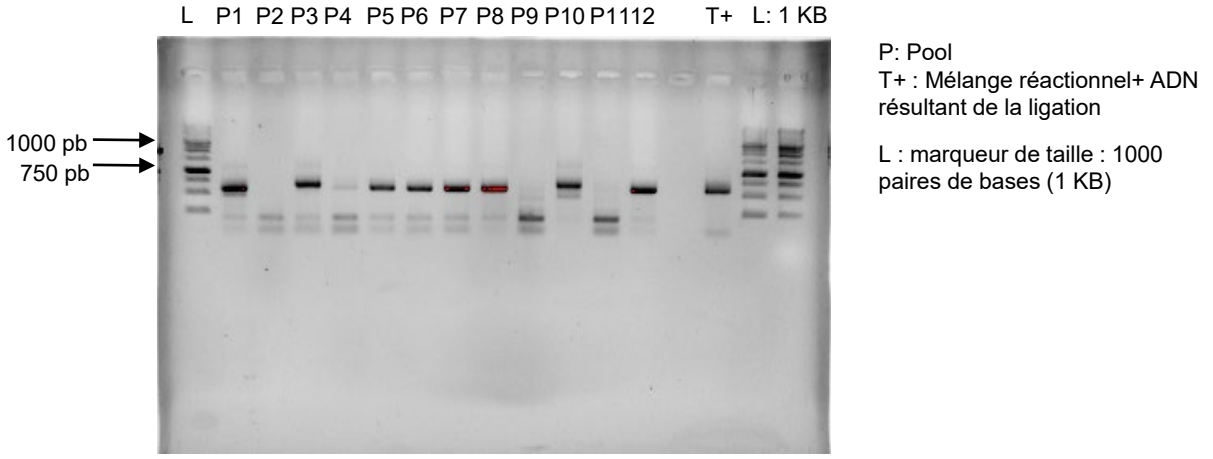


Figure 6. Criblages des clones positifs d'insertion du 1er fragment de promoteur dans le vecteur pCambia 1301 par PCR à partir d'un pool de colonies.

Des colonies blanches ont été sélectionnées à partir des boites montrées dans figure 5, puis regroupées en pools de 10 colonies. Une PCR a été réalisée selon le protocole mentionné dans le §3.

Protocole de PCR sur colonies :

94°C : 3 min
94°C :30''
55°C: 30''
72°C : 00 :50min
4°C :5 min

Finalement, pour ces clonages, presque tous les pools de colonies se sont révélés posséder des vecteurs avec l'insert. La Figure 6 présente le résultat des réactions de PCR effectuées pour analyser le clonage du premier fragment de promoteur. Deux pools positifs sont choisis. Des réactions de PCR sont alors faites à nouveau sur chacune des 10 colonies des 2 pools choisis. La Figure 7 montre l'identification d'une colonie positive dans chacun des 2 pools choisis pour l'analyse du clonage du premier fragment de promoteur.

Pour finaliser la validation de colonies sur lesquelles la réaction de PCR a montré la présence de l'insert recherché, une extraction de plasmide a été effectuée sur 2-3 colonies positives (préalablement mises en culture pour amplification durant une nuit dans du milieu LB liquide contenant l'antibiotique de sélection), puis une nouvelle vérification de la présence de l'insert recherché a été effectuée par PCR sur l'ADN plasmidique extrait (Figure 8) pour le clonage final de la séquence complète de promoteur).

L'étape d'extraction de plasmide a été faite en utilisant un kit dédié ("Wizard® SV Minipreps DNA Purification System). Ce type de kit permet une séparation efficace de l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique bactérien.

Enfin, les plasmides obtenus ont été envoyés au séquençage, qui a été effectué à l'aide d'amorces spécifiques permettant de vérifier l'intégralité de la séquence de l'insert ainsi que les jonctions entre l'insert et le vecteur. Les séquençages ont validé mon clonage des 2 fragments de promoteur de *MtHKT1;2* dans le vecteur pCambia1301.

Amorces de séquençage du 1er fragment de promoteur dans pCambia1301
pcambia-dir : TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
Gus-rev : GGGGTTTCTACAGGACGGAC

Amorces de séquençage du 2ème fragment de promoteur dans pCambia1301
pcambia-dir: TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG

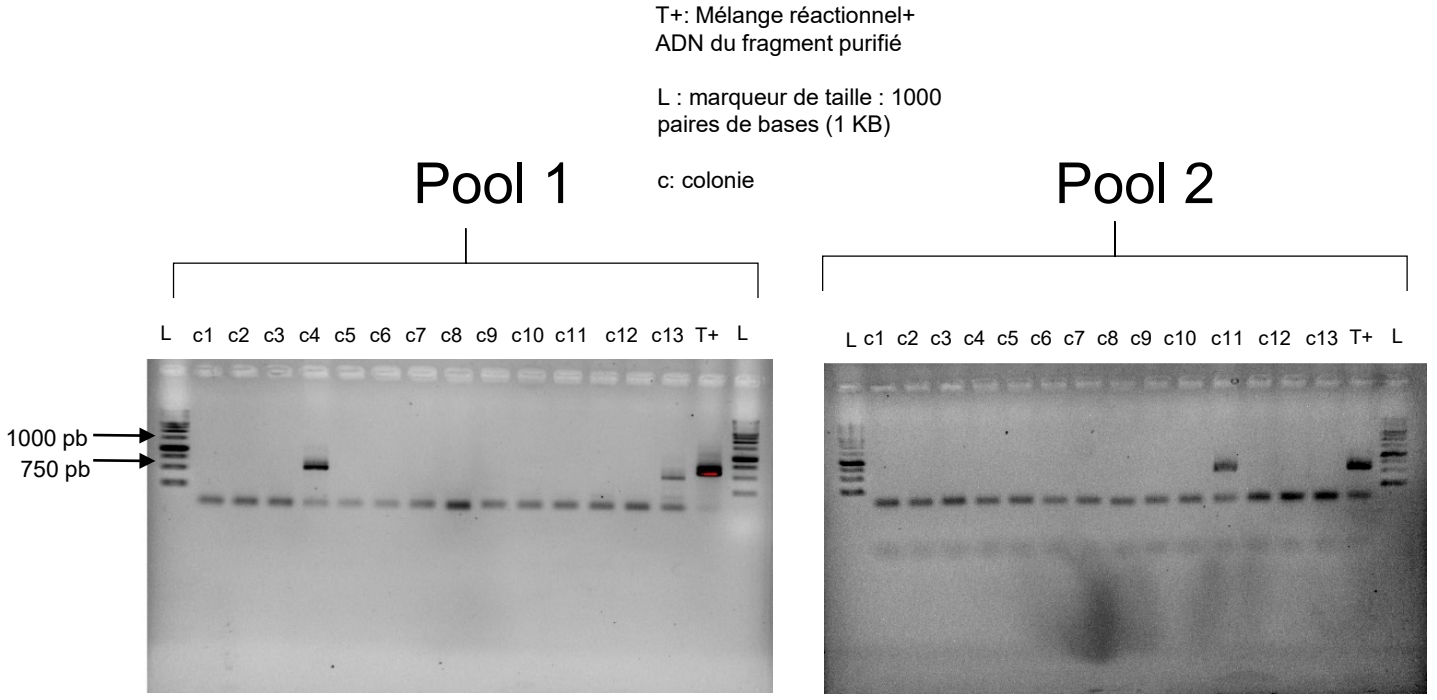


Figure 7. Criblages des colonies positives pour le premier fragment de promoteur au sein des pools positifs, par PCR sur colonies individuelles.

Deux pools de colonies ayant montré la présence du premier fragment de promoteur ont été choisis (Pool 1) et (Pool 2) et des réactions de PCR ont été réalisées sur chaque colonie de ces deux pools.

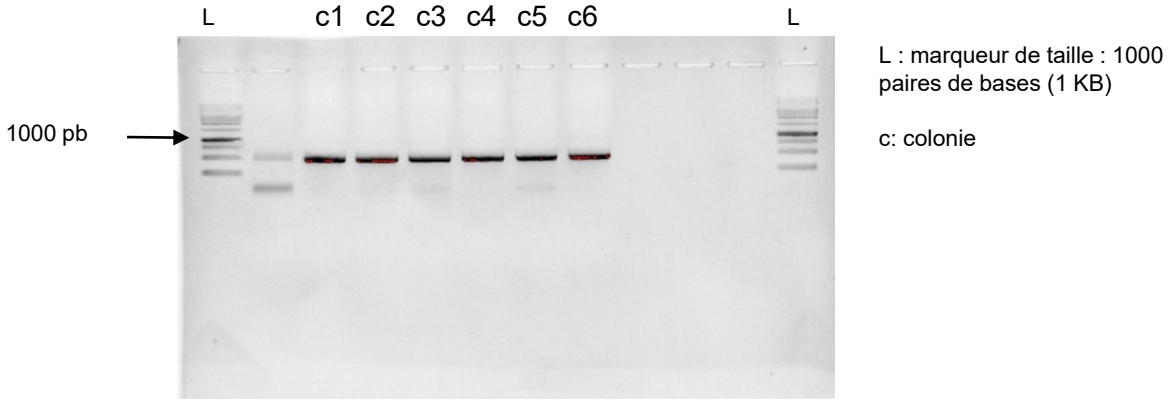


Figure 8. Vérification par PCR du clonage du deuxième fragment de promoteur, sur les plasmides isolés de colonies issues de la transformation des produits de ligation.

Mt-rev 2 : ATCCTCGCGTACAAACCGTG

4. Analyse du profil d'expression de *MtHKT1;2* dans les racines de *Medicago truncatula* transgéniques exprimant la construction *pMtHKT1;2::GUS*

Le vecteur pCambia1301 contenant le promoteur *pMtHKT1;2* que j'ai cloné a été confié à un collaborateur (Nicolas Pauly; Université de Nice Sophia Antipolis et Université Paul Sabatier de Toulouse), compétent pour la transformation des racines de *Medicago truncatula* par *Agrobacterium rhizogenes*, pour effectuer l'analyse du profil d'expression de ce gène *HKT* dans les racines de *Medicago truncatula*.

Les tests histochimiques de l'activité GUS dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula* exprimant la construction *pMtHKT1;2::GUS*, ont été effectués sur des plantes cultivées en condition low N (0,2 mM), inoculées ou non avec la rhizobactérie symbiotique *Sinorhizobium meliloti.* Ces tests ont montré que le gène *MtHKT1;*2 s'exprime essentiellement dans les tissus vasculaires des racines et également les tissus vasculaires alimentant les nodosités chez des plantes inoculées avec *S. meliloti* (Figure 9). En condition de stress salin, le profil d'expression de *MtHKT1;*2 semble s'étendre aux couches périphériques de la racine (Figure 9).

Ainsi, mon travail de clonage a permis de compléter un précédent travail de l'équipe sur l'analyse des propriétés fonctionnelles et de l'expression de l'ensemble des gènes *HKT* de *Medicago truncatula*, qui permettra de finaliser un article précédemment soumis à BioXRiv intitulé "The *Medicago truncatula* HKT family: Ion transport properties and regulation of expression upon abiotic stresses and symbiosis".

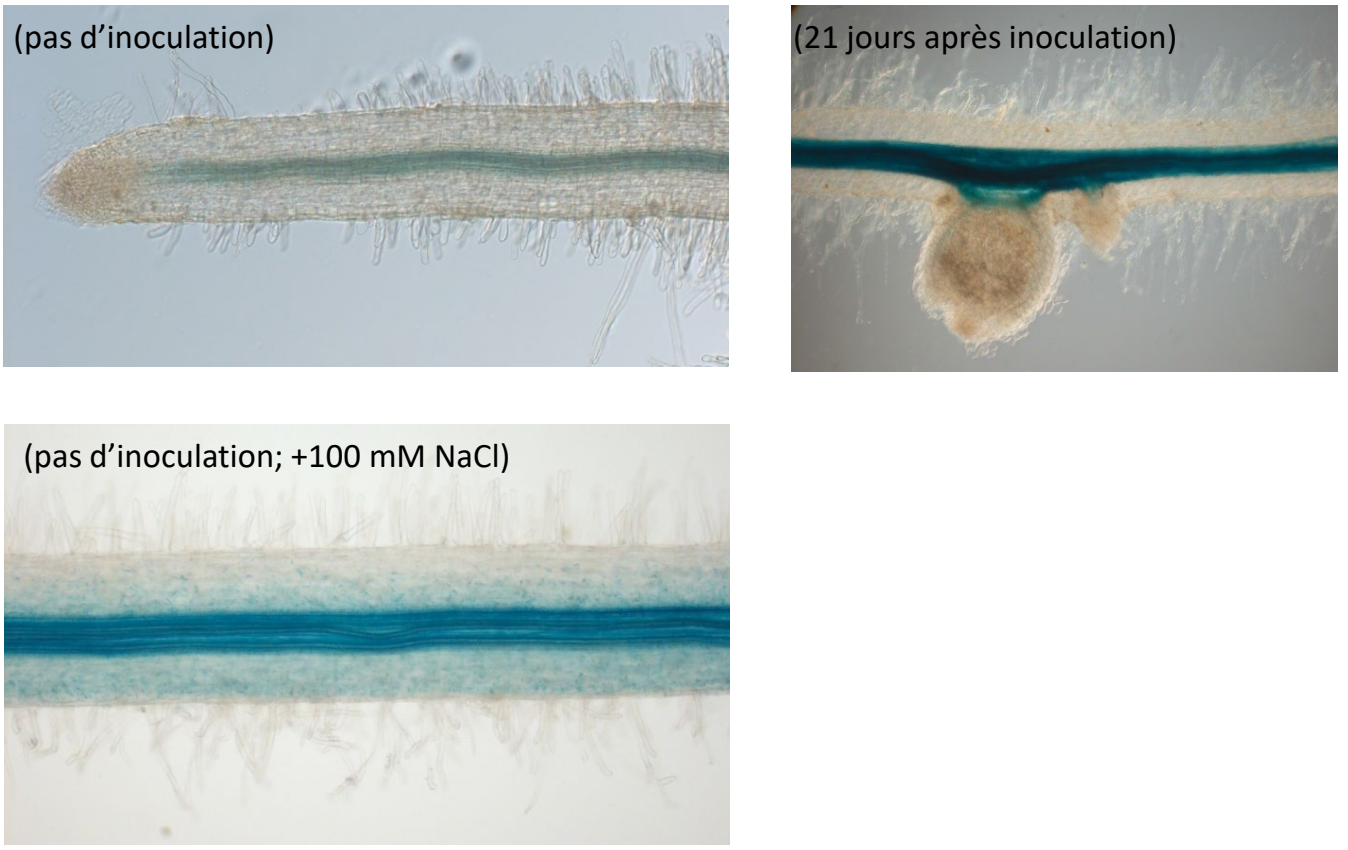


Figure 9. Profils d'expression de *MtHKT1;2* dans des racines transgéniques de *Medicago truncatula*.
Les plantes transgéniques ayant intégré la construction *pMtHKT1;2 ::GUS* ont été cultivées sur le milieu Fahraeus (doi: 10.1099/00221287-16-2-374) en présence de 0,2 mM d'azote et ont été inoculées (panneau du haut à droite) par la bactérie symbiotique *Sinorhizobium meliloti* en vue d'induire le développement de nodosités ou n'ont pas été inoculées (autres panneaux). Un stress salin par ajout de 100 mM de NaCl a été effectué sur certaines plantes (panneau du bas). Les tests histochimiques de l'activité GUS révèlent le profil d'expression dans les racines de *MtHKT1;2* (tissus présentant une coloration bleue).

Résumé

Une faible disponibilité des macroéléments dans la plupart des sols cultivés limite fortement les rendements des cultures en absence de fertilisation. Une meilleure compréhension de l'adaptation des systèmes racinaires à des sols pauvres en ions nutritifs, et l'exploitation de la diversité génétique existante dans ce domaine, entre espèces et/ou variétés, sont susceptibles de contribuer au développement de nouveaux cultivars et de nouvelles pratiques agronomiques permettant de limiter les intrants de fertilisation chimique coûteux et polluants pour l'environnement. L'architecture du système racinaire et la production des poils absorbants à l'interface racine-sol, sont des déterminants majeurs de la capacité du système racinaire à explorer le sol et prélever les ions nutritifs. A ce jour, aucune méthodologie ne permettait de phénotyper les poils absorbants dans un système racinaire considéré dans sa totalité. Dans le cadre de cette thèse, j'ai développé une méthodologie de phénotypage global, intégratif, des systèmes racinaires, incluant les poils absorbants. Un dispositif original de type rhizobox a été développé, permettant d'acquérir des images à haute résolution, pour lesquelles j'ai mis au point une procédure d'analyse informatisée associant le logiciel libre Ilastik pour la segmentation des images, et les logiciels WinRHIZO™ et ImageJ pour l'analyse de traits globaux caractérisant le développement racinaire. Après validation de la méthodologie, les systèmes racinaires de deux génotypes de blé, un cultivar d'amidonnier (*T.t. dicoccum*, cv Escandia), ancêtre du blé dur, et une variété de pays de blé dur (*T.t. durum*, cv Oued Zenati) ont été comparés entre eux et par rapport à leur réponse à une faible disponibilité en phosphate (P), azote (N) ou potassium (K). Chez des plantules âgées de 15 jours (racines de ca. 30 cm de long), les carences en N, P ou K ont affecté différentiellement la croissance des plantes (allocation de la biomasse entre racines et feuilles, et développement préférentiel du système racinaire). Les trois carences se sont révélées entraîner une augmentation de la surface totale du système racinaire, qui s'est elle-même révélée comme résultant principalement d'une augmentation de la surface totale des poils absorbants sur le système racinaire entier (traduisant une augmentation de la densité et/ou longueur des poils sur tout le système). Le taux d'augmentation de la surface totale des poils absorbants était variable entre les deux variétés et selon l'élément limitant, plus fort en condition de carence en N chez l'amidonnier, et de carence en P chez la variété de pays. Toutes les réponses racinaires analysées, incluant ou non les poils absorbants, ont révélé une plus grande plasticité développementale en réponse aux carences nutritives chez la variété ancestrale. Une perspective ouverte par ce travail serait de comparer cette plasticité chez différentes variétés de blé récapitulant la domestication et l'amélioration de cette espèce. En perspective également, je montre que la méthodologie que j'ai développée peut permettre de phénotyper les réponses racinaires à des conditions biotiques (présence de bactéries de type Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Mots clés : nutrition minérale, blé, architecture racinaire, phénotypage des poils absorbants, analyses d'images, NPK

Summary

Low macroelement availability in most cultivated soils severely limits crop yields in the absence of fertilization. A better understanding of the adaptation of root systems to nutrient-poor soils, and the exploitation of existing genetic diversity in this field, between species and/or varieties, are likely to contribute to the development of new cultivars and new agronomic practices allowing to limit costly and environmentally polluting chemical fertilization inputs. The architecture of the root system and the production of root hairs at the root-soil interface are major determinants of the capacity of the root system to explore the soil and take up nutrient ions. To date, no methodology has been available to phenotype root hairs in a root system considered entirely. In this thesis, I developed a methodology for global, integrative phenotyping of root systems, including root hairs. An original rhizobox-type device was developed, allowing to acquire high resolution images, for which I developed a computerized analysis procedure associating the free software Ilastik for image segmentation, and the softwares WinRHIZO™ and ImageJ for the analysis of global traits characterizing the root development. After validation of the methodology, the root systems of two wheat genotypes, a cultivated emmer wheat cultivar (*T.t. dicoccum*, cv Escandia), ancestor of durum wheat, and a landrace of durum wheat (*T.t. durum*, cv Oued Zenati) were compared with each other and with respect to their response to low phosphate (P), nitrogen (N) or potassium (K) availability. In 15-day-old seedlings (roots ca. 30 cm long), N, P or K deficiencies differentially affected plant growth (biomass allocation between roots and leaves, and preferential development of the root system). All three deficiencies were found to result in an increase in the total surface area of the root system, resulting primarily from an increase in the total surface area of root hairs over the entire root system (reflecting an increase in the density and/or length of hairs over the entire system). The rate of increase in total absorptive root hair area was variable between the two varieties and among limiting elements, stronger under N deficiency conditions in the emmer wheat, and P deficiency in the landrace. All the root responses analyzed, including or not the root hairs, revealed a greater developmental plasticity in response to nutrient deficiency in the ancestral variety. A perspective opened by this work would be to compare this plasticity in different wheat varieties recapitulating the domestication and improvement of this species. I also show that the methodology I have developed can be used to phenotype root responses to biotic conditions (presence of Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Keywords: mineral nutrition, wheat, root architecture, phenotyping of root hairs, image analysis, NPK