



HAL
open science

Test et apports d'outils de phénotypage racinaires directs (imagerie des racines) et indirects (méthode électrique capacitive) pour une utilisation en sélection variétale au champ : application au blé

François Postic

► To cite this version:

François Postic. Test et apports d'outils de phénotypage racinaires directs (imagerie des racines) et indirects (méthode électrique capacitive) pour une utilisation en sélection variétale au champ : application au blé. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2016. Français. NNT : 2016AVIG0680 . tel-01513554

HAL Id: tel-01513554

<https://theses.hal.science/tel-01513554>

Submitted on 25 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Test et apports d'outils de phénotypage racinaires directs (imagerie des racines) et indirects (méthode électrique capacitive) pour une utilisation en sélection variétale au champ : application au blé

Présentée publiquement

par

François POSTIC

Soutenue le 13 décembre 2016, devant le jury composé de :

Dr. Alexia STOKES	Directrice de recherche, INRA	Rapporteur
Dr. Isabelle COUSIN	Directrice de recherche, INRA	Rapporteur
Pr Nicolas FLORSCH	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Dr. Christophe JOURDAN	Chargé de recherche, CIRAD	Examineur
Dr. David GOUACHE	Directeur de recherche, Terres Inovia	Membre invité
Dr. Jean-Pierre COHAN	Adjoint au Directeur scientifique, ARVALIS	Membre invité
Dr. Liliana DI PIETRO	Directrice de recherche, INRA	Directrice de thèse
Dr. Claude DOUSSAN	Chargé de recherche, INRA	Encadrant

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer mes remerciements à Isabelle Cousin et Alexia Stokes d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire. Je remercie également Liliana Di Pietro, Jean-Pierre Cohan, Nicolas Florsch, David Gouache et Christophe Jourdan d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mes remerciements s'adressent à Liliana Di Pietro, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens à exprimer ensuite mes plus vifs remerciements à Claude Doussan qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a encadré tout au long de ces années de thèse. Je le remercie particulièrement pour m'avoir toujours guidé, encouragé, prodigué de nombreux et importants conseils et m'avoir fait profiter de ses vastes connaissances, tout en me laissant une grande liberté d'action à chaque étape de cette aventure. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma reconnaissance.

Je remercie grandement Katia Beauchêne d'ARVALIS pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son pragmatisme et son appui dans la mise en œuvre des campagnes d'essais, pour ses conseils avisés, pour sa disponibilité et pour s'être toujours intéressée à l'avancée de mes travaux.

L'équipe technique Arvalis de Gréoux-les-Bains, Magali Camous, Olivier Moulin, Guillaume Meloux et Stéphane Jezequel, pour leur inestimable expérience dans la conduite des essais agronomiques.

Je remercie Xavier Le Bris et Baptiste Soenen d'ARVALIS pour avoir partagé leur savoir en agronomie et ainsi contribué à l'exploitation des résultats de la campagne de mesures racinaires au champ.

Je tiens à remercier chaleureusement Arnaud Chapelet, technicien à l'UMR EMMAH, pour son indispensable aide lors de toutes les campagnes expérimentales au champ, et ses nombreuses heures passées à collecter, laver et trier des racines.

Je remercie les stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler. Merci à Hannah Kuttler pour les innombrables heures qu'elle a passées à effectuer les tracés de racines vues au minirhizotron. Merci à Randa Ben Youssef et Arthur Gierczak pour leurs résultats d'expérimentations qui ont contribué aux chapitres 1 et 3 de cette thèse.

Je remercie Phillipe Hinsinger et Ran Erel, de l'INRA Montpellier, UMR Eco&Sols, pour m'avoir permis de d'utiliser leur campagne de mesures sur des plants de maïs et pour leurs contributions au troisième chapitre de cette thèse.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'UMR EMMAH, et je remercie ici ses membres et ex-membres que j'ai côtoyés quotidiennement durant ces années : Mohammed Al-Khassem, Régis Marcel-Auda, Éric Avayan, Carine Baudet, Annette Bérard, Bernard Bes, Nicolas Beudez, Elodie Canchon, Line Capowiez, Simon Carrière, Konstantinos Chalikakis, Lucie Dal Soglio, Micheline Debroux, Guillaume Girardin, Alizée Lehoux, Anne-Sophie Lissy, Mounia Mahkoul, Éric Michel, Nathalie Moitrier, Nicolas Moitrier, René Pallut, Stéphane Ruy, Stéphane Sammartino, Vincent Tesson, Bernadette Thomas, Frank Tison, Romain Van Den Bogaert.

Une pensée pour Amélie et Bastien, les stagiaires de l'année 2016, pour les bons moments passés ;

Enfin je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille qui m'a soutenu sans faille, en toute occasion.

Résumé

Pour soutenir la demande en denrées alimentaires d'une population mondiale croissante, les rendements des productions en céréales, notamment du blé, doivent être améliorés par sélection végétale. À cause du changement climatique et de l'épuisement des ressources fossiles, les systèmes racinaires des futures variétés de blé devront être adaptés aux épisodes de sécheresse et aux sols peu fertiles. Il est donc crucial de développer des outils de mesure de traits racinaires au champ répondant aux exigences de la sélection variétale. Ainsi, la pertinence des minirhizotrons et de l'impédance électrique des plantes a été évaluée en essai agronomique sur des variétés de blé, conçu pour obtenir un panel varié d'enracinement.

Nous avons montré que les minirhizotrons fournissent une quantification dynamique et pertinente de la longueur de racines profondes, qui jouent rôle majeur dans les rendements obtenus en conditions pluviales. Malgré une sous-estimation de la partie superficielle des systèmes racinaires, la conversion volumétrique des données issues des minirhizotrons basée sur une profondeur de champ, et à l'aide de prélèvements pour les horizons de surface, a permis une estimation du ratio de masse racinaire sur masse aérienne.

À travers une étude méthodologique en laboratoire, nous avons déterminé le montage optimal de mesure d'impédance électrique sur des plants de blé. Son application au champ montre que la qualité de l'estimation diminue au cours de la croissance et dépend de l'humidité du sol. Nous avons montré que l'impédance des plants de blé est décrite par un modèle de condensateur plan, les tissus végétaux formant un diélectrique imparfait. Ainsi, la réactance est un prédicteur de la masse racinaire, uniquement dans les couches superficielles et sèches du sol.

Mots clés : biomasse racinaire, triticum spp, blé, minirhizotron, impédance, mesures au champ

Ensuring the food supply of an increasing world population could be achieved by improving crop yields through plant breeding. Due to the climate change and the rarefaction of fossil resources, the root systems of the future wheat cultivars should be adapted to low soil moisture and low soil fertility. Developing tools for in situ root traits measurements fulfilling the high throughput requirement of modern breeding is crucial. For this purpose, an agronomic trial was conducted on wheat cultivars to evaluate the relevance of minirhizotrons and plant electrical impedance on assessing varied rooting architecture.

We showed that minirhizotrons provide dynamic and relevant quantifications of deep root lengths, which was a key factor in crop yield under rainfed conditions. In spite of underestimated lengths in the shallow part of the root systems, a volumetric conversion of minirhizotron data using a depth-of-field criterion, coupled with auger sampling for surface layers, allowed fairly estimation root to shoot ratio at different growth stages.

We determined the optimal setup of plant impedance measurements by a methodological study performed under laboratory conditions. The application of this optimal setup to an in situ survey showed that the quality of the predictions decreased at later growth stages and under low soil wetness. The plant impedance was described by an imperfect parallel-plate capacitor mode, where plant tissues acted as the separating medium. Consequently, electrical reactance is a root biomass sensor, but only in surface soil layers at low water content.

Keywords: root biomass, wheat, triticum spp, minirhizotron, electrical impedance, field measurement.

Abréviations

DOF – Profondeur de champ, cm

GY – Rendement en grains, t.ha⁻¹

RDM – Masse racinaire sèche totale (obtenue avec tarière et minirhizotron), t.ha⁻¹

RLD – Densité de longueur racinaire, mm.cm⁻³

RLSD – Densité surfacique de longueur racinaire, mm.cm⁻²

R:S – Ratio de masse racinaire /masse aérienne, Sans dimension

SDM – Masse des parties aériennes, t.ha⁻¹

SRL – Longueur spécifique racinaire m.g⁻¹

TRLSD – Densité surfacique de longueur racinaire totale, mm.cm⁻²

i – Unité imaginaire, Sans dimension

A – Aire de superposition d'un condensateur, square meters, m²

C –Capacité parallèle, F

G – Conductance, S

L – Distance de séparation des plaques d'un condensateur, m

R_p –Résistance en parallèle, Ω

S – Section d'une racine, m²

X – Réactance, Ω

Y – Admittance, S

ε^* – Permittivité complexe, F.m⁻¹

ε' – Composante réelle de la permittivité, F.m⁻¹

ε'' – Composante imaginaire de la permittivité, F.m⁻¹

ω – Fréquence angulaire, rad.s⁻¹

ω_0 – Fréquence de coupure, rad.s⁻¹

σ – Conductivité électrique, S.m⁻¹

τ – Temps de relaxation, s

Table des matières

Introduction

1. Cadre général.....	2
2. Les défis à venir de l'agriculture.....	4
1.1. Assurer la sécurité alimentaire mondiale d'une population croissante.....	4
1.2. Perspectives climatiques.....	6
1.3. Occurrence des évènements extrêmes.....	9
2. Caractères de sélections du blé moderne et futur.....	10
2.1. La révolution verte.....	10
2.2. Traits liés à la révolution verte.....	12
2.2.1. Nanisme.....	12
2.2.2. Changements phénologiques.....	12
2.2.3. Adaptation à l'apport d'azote.....	13
2.2.4. Tolérance aux stress hydriques.....	14
2.2.5. Changements dans la diversité génétique.....	14
2.3. Les traits racinaires adaptés aux futures conditions climatiques.....	16
2.3.1. Contexte.....	16
2.3.2. Généralités sur la croissance racinaire.....	17
2.3.3. Traits architecturaux d'intérêts dans les grandes cultures.....	20
2.3.4. Les traits morphologiques et anatomiques des racines.....	22
3. Méthodes de mesures des systèmes racinaires.....	24
3.1. Échelle d'observation pratiquée.....	24
3.2. Méthodes utilisées en milieux contrôlés.....	24
3.2.1. Aperçu global.....	24
3.2.2. Contraintes et limites des études en milieux contrôlés.....	25
3.3. Méthodes applicables au champ.....	26
3.3.1. Inadaptation des méthodes destructives aux exigences du phénotypage.....	26
3.3.2. Méthodes non destructives d'observation directe.....	27
3.3.3. Méthodes non destructives de caractérisation indirectes.....	29
4. Bases sur les techniques de mesures des racines employées dans cette thèse.....	31
4.1. Les minirhizotrons.....	31
4.1.1. Tubes d'observation.....	32
4.1.2. Systèmes de capture d'images des racines.....	35

4.1.3. Données issues des minirhizotrons	36
4.2. Mesures indirectes des systèmes racinaires par méthode électrique	40
4.2.1. Propriétés électriques des tissus biologiques	40
4.2.2. Application de la mesure de l'impédance aux systèmes racinaires	44
4.2.3. Implication pour les programmes de sélection variétale	50
Objectifs et résultats	
Objectifs de la thèse	53
Chapitre 1 : Analyse comparative des méthodes électriques pour l'estimation rapide de la biomasse racinaire.....	55
Chapitre 2 : Impact des systèmes racinaires de différentes variétés de blé en conditions multi-stressantes, mis en évidence à l'aide de minirhizotrons à scanner.....	69
Chapitre 3 : Un modèle étendu de l'impédance des plantes : détection <i>in situ</i> des racines .	117
Conclusions	161
Annexes	175
Références	189

Introduction

1. Cadre général

La population mondiale pourrait atteindre 9 milliards d'habitants en 2050, augmentant ainsi la pression sur les ressources alimentaires. Il est estimé qu'en 2050, la demande en blé, actuellement la troisième céréale la plus produite à l'échelle mondiale, pourrait subir une hausse de 39,7 % par rapport au niveau de consommation 2005–2007 (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Dans le même temps, la hausse des surfaces cultivables sera très faible (1,35 %) (Alexandratos and Bruinsma, 2012), impliquant que le gain de production sera réalisé à travers une amélioration végétale. Par ailleurs, depuis les années 2000, les rendements du blé semblent stagner dans plusieurs régions du monde, notamment en Europe (Brisson et al., 2010). Le changement climatique pourrait en être la cause (Brisson et al., 2010), et les prévisions sur le futur climat de la zone Europe indiquent une forte variabilité des précipitations (Salzmann, 2016) et une augmentation des épisodes de sécheresse, principal facteur de stress et de perte de rendement, rendant les ressources en eau moins disponibles pour les cultures. De plus, la raréfaction des ressources fossiles et minérales, à partir desquelles sont produits les engrais, pourrait contraindre l'utilisation des fertilisants à moyen terme.

Ainsi la sélection variétale doit s'attacher à améliorer l'efficacité des plants de blé à la capture de l'eau et des nutriments présents dans le sol. Le système racinaire étant l'organe qui assure cette fonction, l'amélioration des rendements des futures variétés pourrait s'appuyer sur une sélection de systèmes racinaires aux traits adaptés aux futures conditions agroclimatiques. Différents traits racinaires sont adaptés à la résistance à la sécheresse, tel un enracinement profond pour extraire l'humidité des couches profondes du sol en période de sécheresse

(Manschadi et al., 2006), ou une vigueur racinaire précoce (Bertholdsson and Brantestam, 2009).

Toutefois, à cause de sa nature souterraine, le système racinaire n'a, qu'à de très rares occasions, fait l'objet de programmes de sélection. En effet, l'amélioration génétique du milieu du XXème siècle (la Révolution Verte) est basée sur la sélection de traits aériens, et depuis cette dernière décennie, de nombreux outils de phénotypages ont été conçus pour leur mesure à haut-débit, que ce soit en serre (Fiorani and Schurr, 2013) ou au champ (Comar et al., 2012). Les techniques d'imagerie des systèmes racinaires sont actuellement appliquées aux serres automatisées (Jeudy et al., 2016), permettant d'atteindre les exigences de nombre de plantes mesurées chaque jour. Cependant, les mesures au champ semblent incontournables, car les traits racinaires obtenus aux stades végétatifs sont difficilement reproductibles à des stades plus avancés (Watt et al., 2013). Utiliser alors des méthodes de mesure destructives (Trachsel et al., 2011) ne serait pas adapté aux exigences de la sélection, car cela impliquerait une utilisation intense de main-d'œuvre et une multiplication de la superficie des essais. Ces deux difficultés sont d'autant plus présentes lorsqu'il s'agit de mesurer des dynamiques d'enracinement, impliquant une multiplicité de dates d'échantillonnage.

À l'instar des techniques d'imagerie utilisées pour la caractérisation des traits aériens, il est nécessaire de développer des techniques de mesures racinaires adaptées au champ, qui devront être caractérisées par leur aspect non destructif, non invasif et rapide.

2. Les défis à venir de l'agriculture

1.1. Assurer la sécurité alimentaire mondiale d'une population croissante

Si la croissance démographique annuelle est en train de ralentir actuellement (de 1,28 % en 2000 à 1,13 % en 2015) et pour le futur, avec des prévisions en 2050 aux alentours de 0,52 % (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2015), il n'en reste pas moins que la population mondiale pourrait atteindre 9,3 milliards d'êtres humains d'ici 2050, représentant ainsi un accroissement d'un tiers de la population actuelle (7,35 milliards en 2015).

Dans le même temps, la demande mondiale en production agricole augmentera nécessairement, représentant une hausse de 39,7 % de la production de céréales en 2050, par rapport à la production de 2005–2007, ce qui revient à une croissance annuelle de 0,83 % sur 40 ans (Alexandratos and Bruinsma, 2012). En ce qui concerne la production agricole totale, la hausse pourrait être plus élevée, de l'ordre de 60% (Alexandratos and Bruinsma, 2012), en tenant compte des changements de régimes alimentaires associés à la hausse du pouvoir économique des habitants des pays en voie de développement. Il est estimé que la demande en produit carnés sera plus importante de 76% en 2050 (Alexandratos and Bruinsma, 2012), induisant ainsi une hausse de la production de céréales fourragères.

De ce fait, l'équilibre entre demande et production de denrées alimentaires pourrait être plus précaire. Un pourcentage élevé de cette demande doit être satisfait par les principales cultures de base, le blé (*Triticum aestivum* L.), le riz (*Oryza sativa* L.), le maïs (*Zea mays* L.), et l'orge (*Hordeum vulgare* L.). L'augmentation de la production a deux sources : l'augmentation des

surfaces cultivées et l'augmentation des rendements agricoles. La production mondiale a progressé ces quatre dernières décennies principalement grâce à l'augmentation des rendements (Figure 1), responsable de 85% de la hausse en production des céréales (blé, maïs, riz) et de 70% de celle du fourrage (en ajoutant donc la production de soja) (Fischer et al., 2014). De la même façon, la FAO prédit que la hausse des rendements devrait rester le premier facteur d'augmentation de la production jusqu'en 2050, l'agrandissement des surfaces cultivables étant marginal (Alexandratos and Bruinsma, 2012).

En parallèle, d'importantes régions agricoles dans le monde font face à une stagnation du rendement des cultures, en Chine (Ray et al., 2012), en Europe pour la production du blé (Brisson et al., 2010; Ray et al., 2012), imputée aux impacts du changement climatique et à des modifications des pratiques agronomiques. Par ailleurs, la concurrence des biocarburants face à la production alimentaire, la raréfaction des ressources hydriques, l'urbanisation des territoires, ainsi que la baisse de la qualité des ressources du sol (Carberry et al., 2013) sont des contraintes supplémentaires à l'augmentation de la production céréalière.

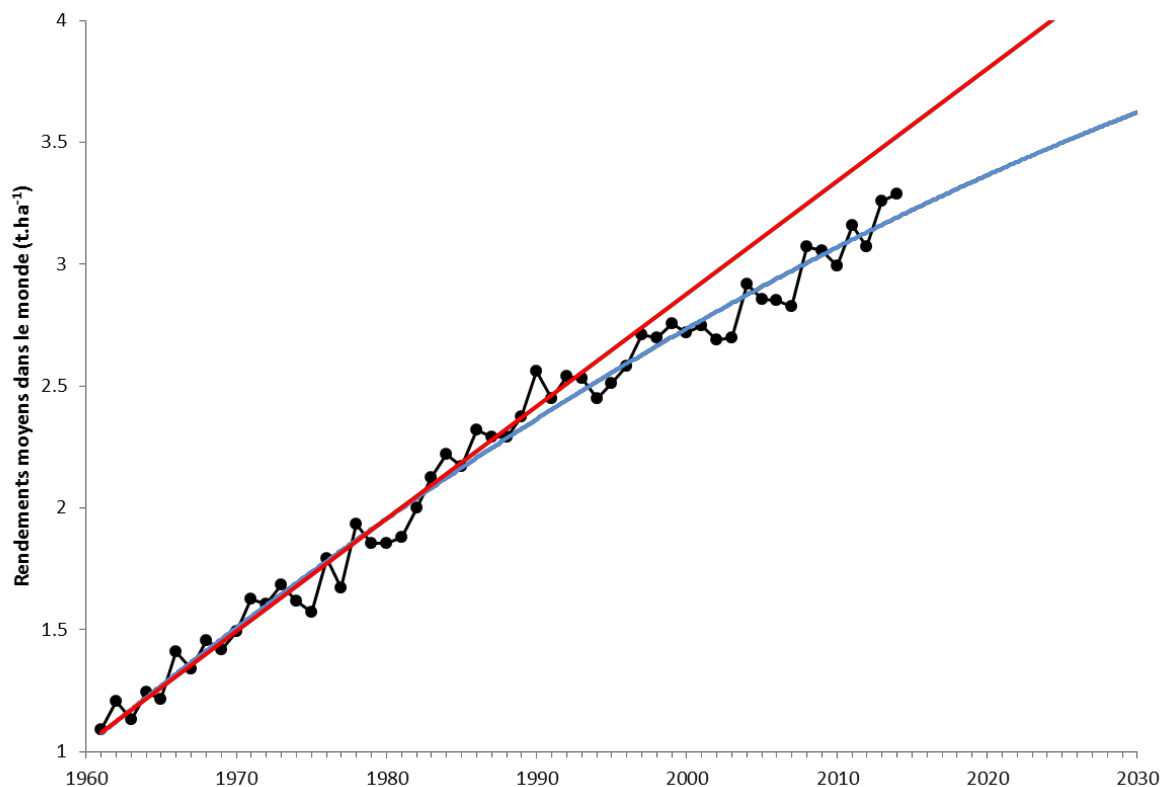


Figure 1. Rendement moyen des cultures de blé à l'échelle mondiale sur la période 1960-2014 (Données FAO 2016). La période 1960–1990 est caractérisée par une progression constante des rendements (courbe rouge), un 'infléchissement des rendements apparaît à partir des années 1990 (courbe bleue).

1.2. Perspectives climatiques

Depuis l'époque préindustrielle, la température mondiale moyenne a augmentée de 0,9°C (Figure 2). Cette hausse est significative par rapport à la variabilité sur des périodes comparables antérieures (Rummukainen, 2014). Les prédictions de changements climatiques pour le milieu du XXI^{ème} siècle sont assez variables selon les modèles climatiques et les scénarios d'émissions de gaz à effet de serre (Stocker et al., 2013). La température pourrait augmenter de 0,3 à 4,8°C d'ici la fin du XXI^{ème} siècle selon le cinquième rapport du GIEC

(Stocker et al., 2013). D'après des simulations climatiques, une augmentation des précipitations mondiales accompagnera ce réchauffement climatique. Ces simulations indiquent une hausse d'environ 1% pour chaque hausse de 1°C de la température moyenne mondiale (Rummukainen, 2014).

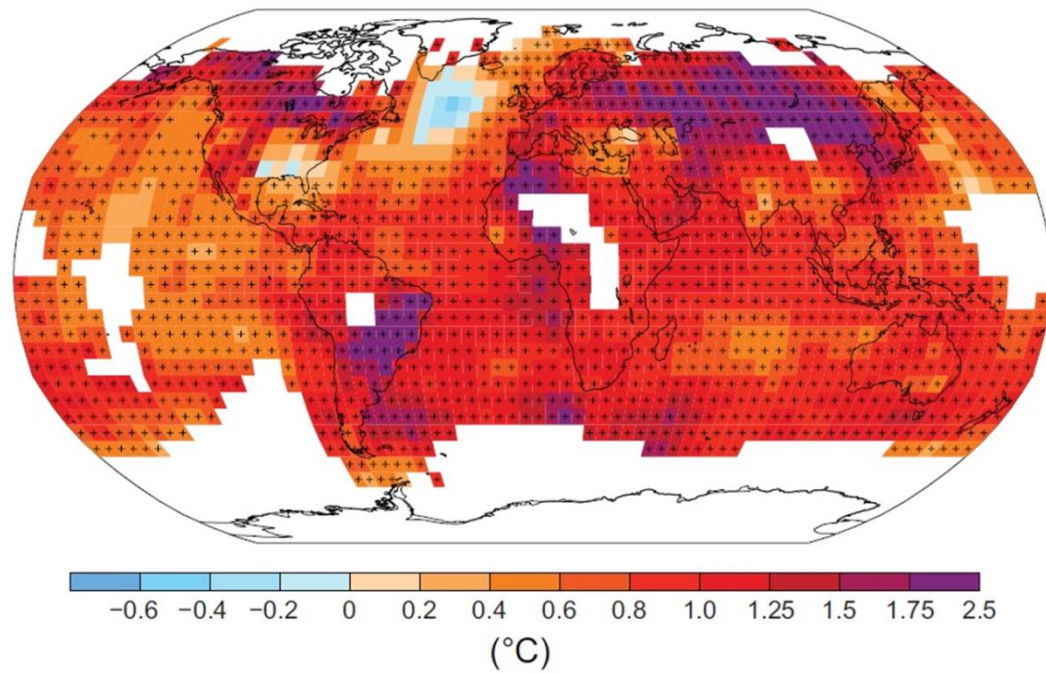


Figure 2. Variation de la température annuelle moyenne sur la période 1901–2012 d'après le GIEC 2013, extrait de Stocker et al (2013)

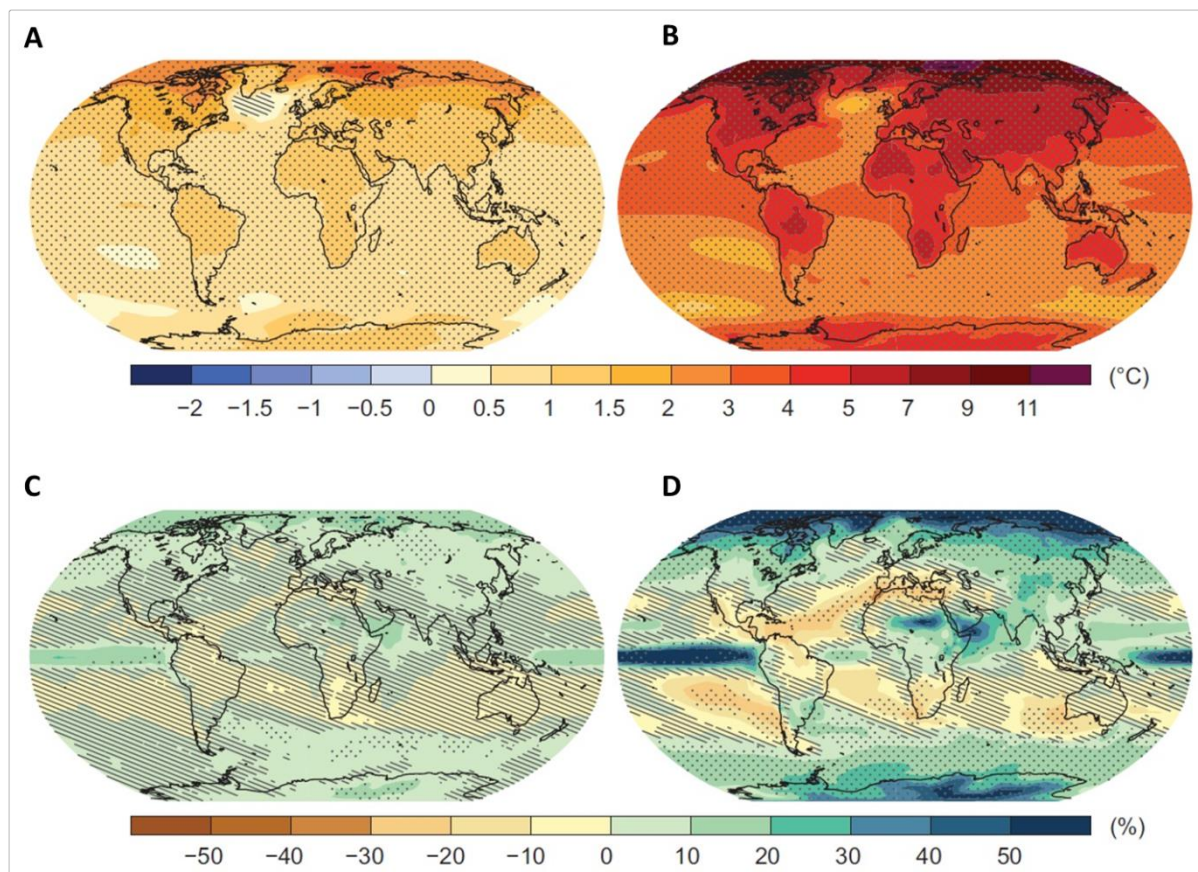


Figure 3. Impacts du changement climatique à l'horizon 2100 dans différents scénarios basés sur une analyse multi-modèles, d'après le GIEC (Stocker et al., 2013). Les figures A et B représentent les prévisions pour la période 2081–2100 du changement de la température annuelle moyenne pour des scénarios optimiste (A) et pessimiste (B), par rapport à la période 1986–2005. Les prévisions dans le changement des précipitations annuelles pour la période 2081–2100, par rapport à la période 1986–2005, sont présentées dans les scénarios optimiste (C) et pessimiste (D).

Toutefois, les prédictions sont très hétérogènes selon les zones climatiques considérées (Figure 3). En Europe, les tendances générales des projections sur le climat peuvent être décrites par une intensification des écarts de précipitations entre les zones humides et les zones sèches (Salzmann, 2016), autrement dit, les zones humides deviennent plus humides et les zones sèches deviennent plus sèches.

Par ailleurs, l'intensité, la durée et la fréquence des vagues de chaleur sont fortement susceptibles d'augmenter (Coumou and Rahmstorf, 2012). La fréquence des évènements climatiques extrêmes est le résultat de changements concernant les moyennes des variables climatiques, de leur variance, ou d'une modification de la distribution statistique de ces variables (Stocker et al., 2013). Les études qui ne considèrent que les changements des moyennes des variables climatiques pourraient conclure de façon erronée sur l'incidence des évènements extrêmes (Rummukainen, 2014).

1.3. Occurrence des évènements extrêmes

Le changement climatique provoquant une variabilité accrue des conditions météorologiques, ainsi qu'une recrudescence des phénomènes climatiques extrêmes, impacte négativement la production alimentaire et, par conséquent, la sécurité alimentaire (Coumou and Rahmstorf, 2012). L'augmentation de la fréquence des phénomènes extrêmes tels que les vagues de chaleur et les sécheresses prolongées est déjà observable (Christidis et al., 2014), entraînant des impacts négatifs majeurs sur la production agricole dans de nombreuses régions du monde. Ce fut le cas en 2007, 2010 et 2012 avec une occurrence simultanée de phénomènes météorologiques défavorables dans les régions agricoles importantes (Lobell and Gourdj, 2012). Les projections sur le climat futur prédisent une fréquence significativement plus élevée d'années très défavorables pour la production agricole, provoquant des retombées économiques désastreuses dans de nombreuses régions agricoles (Stocker et al., 2013).

Afin de faire face aux défis du changement climatique futur, caractérisé par l'augmentation des phénomènes météorologiques extrêmes, il est primordial d'adapter les systèmes de production agricole (Trnka et al., 2014). En outre, les incertitudes sur les projections des

changements climatiques posent des défis particuliers aux obtenteurs variétaux et aux scientifiques du domaine de l'amélioration variétale (Semenov et al., 2014).

2. Caractères de sélections du blé moderne et futur

2.1. La révolution verte

La révolution verte est le processus qui décrit l'introduction de la génétique dans l'amélioration variétale avec des variétés à haut rendement, couplée à la mécanisation et à l'utilisation intensive d'intrants (eau, fertilisants, produits phytosanitaires). Elle a commencé dans les années 60 avec Norman Borlaug qui a développé des cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum*) aux tiges plus courtes, à haut rendement. La création au Mexique du Centro internacional de mejoramiento de maiz y trigo (CIMMYT ou centre international d'amélioration du maïs et du blé), grâce aux efforts de Norman Borlaug (prix Nobel de la Paix en 1970), a permis aux sélectionneurs de développer des blés semi-nains et résistants aux maladies caractéristiques des zones humides telles la septoriose et la fusariose. Ces cultivars adaptés aux zones humides ont rapidement été diffusés dans l'Asie du Sud pour faire face à l'insécurité alimentaire de cette époque.

Ces changements de hauteur des plantes, accompagnés par une meilleure résistance aux maladies, ont participé à l'augmentation des rendements ainsi qu'à leur stabilité. L'impact global du programme de sélection du blé de CIMMYT a été important et bien documenté (Lopes et al., 2012). À cet égard, la progression annuelle des rendements fournit un moyen pour évaluer le succès d'un programme de sélection végétale.

Comme on peut l'observer sur la Figure 1, les rendements de blé dans le monde entier ont augmenté de manière relativement linéaire, bien que cette croissance se soit tassée dans les

quinze dernières années. Sur la période 1990–2014, les rendements du blé ont alors enregistré une hausse de 1,38% par an en moyenne (Food and Agriculture Organization, 2016), alors que sur la période 1960–2014, et le rendement moyen du blé au niveau mondial a augmenté au rythme d'environ 2,25% par an.

Bien que la base génétique de la révolution verte du blé ait d'abord été « simple » et impliqué l'introduction dans le génome du blé de quelques gènes avec des effets majeurs — sur la hauteur de la plante et l'élimination de la réponse de la photopériode pour la culture en zone équatoriale — , les sélectionneurs ont maintenu des progrès dans l'amélioration génétique du rendement du blé par la manipulation des systèmes de gènes de plus en plus complexes.

La sélection variétale internationale du blé réalisée par le CIMMYT peut être divisée en quatre périodes d'amélioration de 1951 à nos jours (Ortiz et al., 2008) :

- de 1951 à 1962, introduction chez les agriculteurs de cultivars avec une meilleure résistance de la tige face à la verse, et des feuilles face à la rouille brune du blé (*Puccinia triticina.*) ;
- de 1962 à 1975, introduction chez les agriculteurs de cultivars semi-nains ;
- de 1975 aux années 1990, amélioration du potentiel de rendement, de la résistance aux maladies (notamment la rouille dont la résistance des souches s'est accrue) et amélioration de la qualité industrielle (taux de protéines) de cultivars semi-nains ;
- enfin, depuis les années 1990, amélioration de la tolérance aux stress abiotiques, utilisation de cultivars de blé hybrides et synthétiques, et amélioration de la qualité du grain.

2.2. Traits liés à la révolution verte

2.2.1. Nanisme

Les cultivars semi-nains de blé apparus dans les années 70 sont caractérisés par leurs tiges plus courtes (Trethowan et al., 2002) que celles des cultivars traditionnels. Ainsi ils sont plus tolérants à la verse et possèdent un potentiel de rendement plus élevé que les cultivars traditionnels du fait qu'une forte proportion de leur biomasse soit consacrée aux grains (et non à la tige). Ce phénotype semi-nain est contrôlé par deux gènes d'insensibilité à l'acide gibbérellique, les gènes *Rht1* et *Rht2*, découverts par Borlaug (1968). La présence d'un seul de ces deux gènes produit un cultivar semi-nain, alors que leur présence simultanée produit un cultivar double nain. La courte stature des cultivars double nains n'est appropriée qu'aux environnements les plus productifs dans lesquels l'eau et l'engrais ne sont pas limitants.

2.2.2. Changements phénologiques

L'essentiel des traits associés à l'augmentation des rendements concernent les parties aériennes. Le rendement des cultivars semi-nains continue d'augmenter de 1% par an avec les progrès génétiques (Ortiz et al., 2008). Au-delà du rendement potentiel, la stabilité du rendement face aux différentes conditions environnementales est une caractéristique agronomique importante. Cependant, l'adaptation des cultivars à des environnements spécifiques n'apparaît pas être une solution efficace, à cause de la variabilité des précipitations annuelles dans la plupart des régions de cultures (Ortiz et al., 2008).

De nombreuses études montrent que l'augmentation des potentiels de rendements est associée à une augmentation de la biomasse totale, du nombre de grains par mètre carré, du rapport grain sur paille et à une hausse de l'efficacité à intercepter le rayonnement photosynthétiquement actif (Sayre et al., 1997). Chez les cultivars les plus récents, il semble

que le poids des grains contribue peu à l'amélioration récente des potentiels de rendements, l'essentiel de l'amélioration reposant sur l'efficacité d'interception du rayonnement photosynthétiquement actif avant floraison (Shearman et al., 2005).

De même, les gènes *Rht1* et *Rht2* impliquent des changements plus subtils pour l'obtention de rendements élevés, grâce à une adaptation à de fortes densités de semis. En effet, il apparaît que les cultivars semi-nains sur la base des gènes *Rht1* et *Rht2* sont plus adaptés à la culture à des densités de plantes élevées que des cultivars traditionnels (Reynolds et al., 1994).

Parmi les autres modifications physiologiques, une comparaison des cultivars de blé publiée entre 1962 et 1988 au Mexique a montré une augmentation de 27% de rendement associé à une augmentation de 63% de la conductance stomatique, une augmentation de 23% du taux de photosynthèse maximale et une baisse de 6°C de la température de la canopée (Fischer et al., 1998). Une température de canopée plus froide mesurées chez certains cultivars pourrait être liée à leur capacité à puiser l'eau des couches profondes du sol, dans les environnements sujets à la sécheresse (Lopes and Reynolds, 2010).

2.2.3. Adaptation à l'apport d'azote

La Révolution verte est critiquée sur l'efficacité des cultivars dans les environnements où l'azote est une ressource limitante. En effet, les cultivars développés sont issus de sélections destinées à produire des génotypes obtenant des rendements élevés en conditions potentielles, autrement dit sans limitation de l'apport d'eau et d'azote. En conséquence, les cultivars obtenus pourraient ne pas être adaptés aux conditions limitantes, et l'efficacité de l'utilisation de l'azote — c'est-à-dire la quantité de biomasse produite par rapport à la quantité d'azote présent dans la plante — pourrait être plus faible dans les cultivars modernes. La tendance semble cependant être inverse. Sur une sélection de cultivars enregistrés au catalogue français

entre 1940 et 1995, l'efficacité de l'utilisation de l'azote est améliorée avec la date de d'entrée au catalogue (Le Gouis et al., 2000), que ce soit en conditions limitantes en azote ou optimales, hormis pour trois variétés sur les vingt testées. Le même constat apparaît sur les cultivars diffusés au Mexique entre 1950 et 1985 (Ortiz-Monasterio et al., 1997). L'efficacité de l'utilisation de l'azote est elle-même une caractéristique composite, et il semble que ce soit le taux d'absorption qui contribue le plus à l'efficacité des cultivars en situation d'azote limitant (Ortiz-Monasterio et al., 1997).

2.2.4. Tolérance aux stress hydriques

Bien que la base génétique de la tolérance à la sécheresse du blé soit complexe et mal comprise, l'analyse historique des rendements de blé du réseau d'essai international du CIMMYT montre clairement que l'adaptation au déficit hydrique des variétés s'améliore avec le temps (Trethowan et al., 2002). L'architecture des racines est un élément de cette amélioration de l'utilisation de l'eau des cultures; par exemple, des racines plus longues sont en mesure d'accéder à l'eau plus profondément dans le profil du sol (Araus et al., 2002).

2.2.5. Changements dans la diversité génétique

Les premières années de la révolution verte sont marquées par une diminution de la diversité génétique à cause du faible nombre de cultivars semi-nains différents, cultivés sur de vastes zones (Pretty, 1995). Néanmoins, une source récente de diversité génétique a été introduite avec les cultivars de blé dits synthétiques. Ces blés synthétiques sont développés en croisant des variétés de blé dur moderne (*Triticum turgidum*) avec *Aegilops tauschii*, l'espèce identifiée comme le donneur probable du génome D du blé (la nomenclature du génome du blé est précisée sur la Figure 4), originaire du Moyen-Orient, notamment dans l'actuelle

Arménie. Ce type de croisement est à la source des cultivars de blé tendre hexaploïde moderne, et ces croisements se sont produits spontanément dans la nature il y a des milliers d'années (Figure 4).

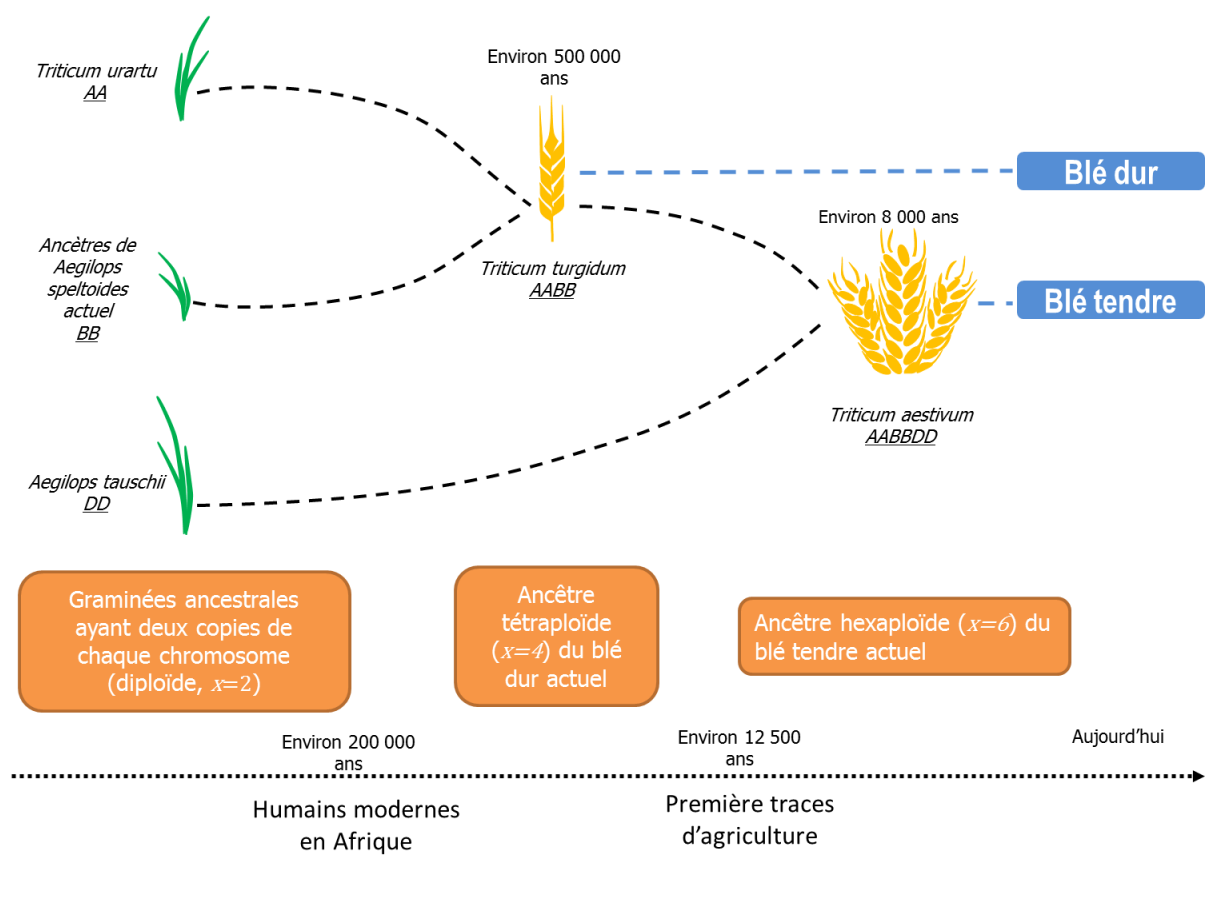


Figure 4. Ascendance du blé dur (*Triticum durum*) et du blé tendre (*Triticum aestivum*) modernes. Les variétés ancestrales proviennent d'hybridations naturelles qui ont eu lieu avant et pendant la domestication du blé. Le génome du blé provient donc de *Triticum urartu* (génom A), de *Aegilops speltoides* (génom B) et de *Aegilops Tauschii* (génom D). Les variétés de blé dites synthétiques sont obtenues à l'aide de ces mêmes hybridations.

Ces nouveaux blés synthétiques introduisent du nouveau matériel génétique pour la tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Certains de ces cultivars synthétiques ont montré une

amélioration des rendements en cas de sécheresse et se sont révélés être de nouvelles sources utiles pour la résistance aux maladies (van Ginkel and Ogonnaya, 2007).

2.3. Les traits racinaires adaptés aux futures conditions climatiques

2.3.1. Contexte

Le changement climatique pourrait intensifier les conditions défavorables pour la croissance des plantes cultivées telles que la diminution des ressources en eau, l'augmentation de la salinité des sols et l'appauvrissement en nutriments des sols. Les traits racinaires qui permettent une meilleure utilisation des ressources souterraines devraient donc être d'une importance cruciale afin de préserver, voire d'augmenter, les rendements futurs. Au-delà d'assurer la fonction d'ancrage, le système racinaire détermine la capacité d'une plante à absorber les nutriments et l'eau présents dans le sol et d'autres fonctions importantes dans un environnement donné tels la production d'hormones, le stockage d'assimilats ou les associations symbiotiques (Hodge et al., 2009). Bien que la plupart des études portant sur les stress observent des traits architecturaux (configuration spatiale des racines), d'autres adaptations anatomiques entrent en jeu dans l'efficacité du système racinaire (Figure 5). Les effets sur le système racinaire de stress uniques sont nettement plus documentés que les effets d'une combinaison de stress (Rich and Watt, 2013). Ces conditions multi-stressantes pouvant être plus fréquentes dans l'avenir, le 2ème chapitre de cette thèse porte sur l'effet in situ de telles combinaisons de stress.

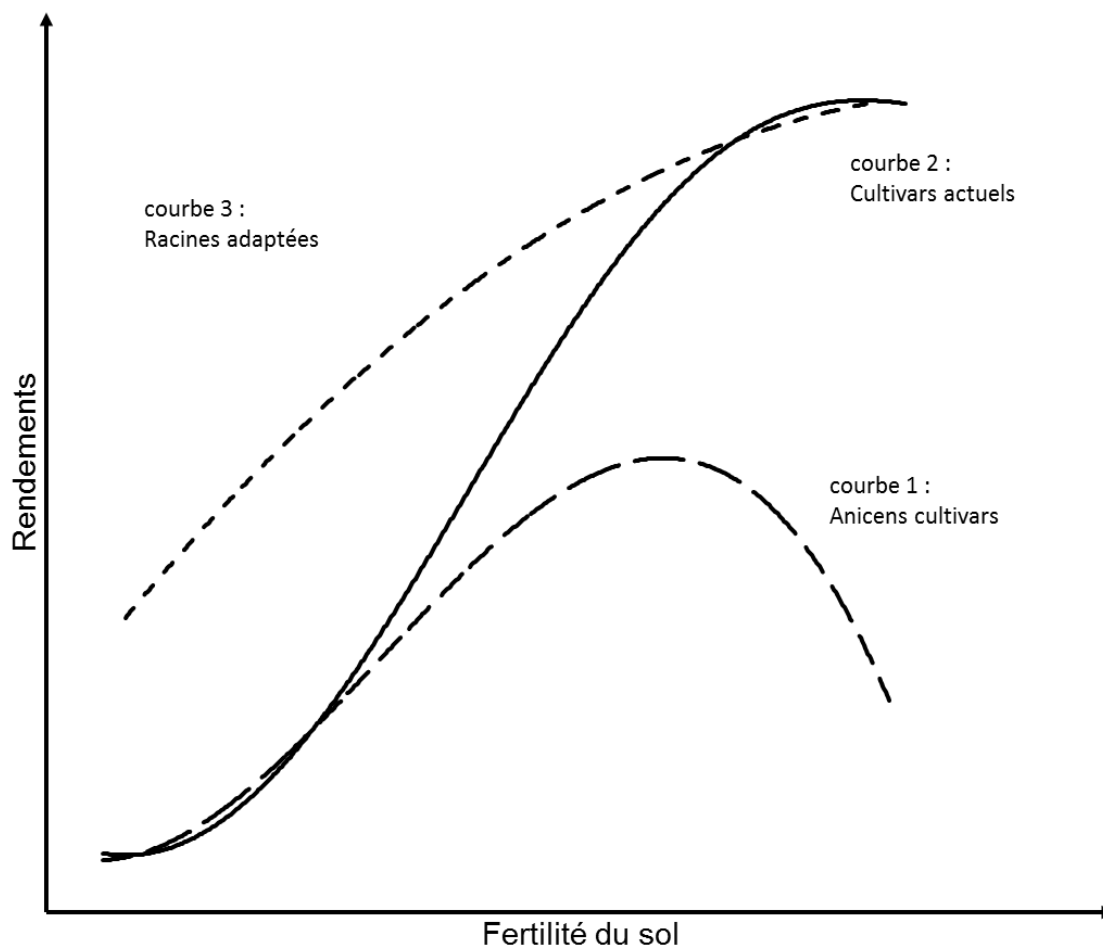


Figure 5. Potentiel de rendement des différentes générations de cultivars face à la disponibilité des nutriments. La courbe 1 montre la réponse des cultivars de blé pré-Révolution verte, sujets à la verse en cas d'un apport important en azote causant ainsi des pertes de rendements. La courbe 2 montre les rendements des géotypes nains caractéristiques de la Révolution verte, moins sujets à la verse, aux potentiels de rendement améliorés lors de l'utilisation intensive de fertilisants. La courbe 3 montre l'objectif de potentiel de rendements pour les géotypes aux systèmes racinaires adaptés à des conditions de sol peu fertiles. Extrait de Lynch (2007)

2.3.2. Généralités sur la croissance racinaire

2.3.2.1. Mécanismes de croissance à l'échelle cellulaire

À l'échelle cellulaire, la croissance racinaire est assurée par le méristème apical situé près de l'extrémité des racines. Ce méristème racinaire est une zone de division et de différenciation

cellulaire, complexe et hétérogène en terme de population cellulaire (Webster and MacLeod, 1980). Dans cette zone apparaît une première différenciation qui conduit à la formation des cellules de la coiffe (cellules situés à l'extrémité des racines) et des cellules responsables de l'élongation des racines (la différenciation et la spécialisation ayant lieu dans un second temps). Cette élongation à partir du méristème est nommée croissance primaire et l'augmentation du diamètre des racines est désignée par croissance secondaire. Bien que généralement absente chez les monocotylédones (groupe incluant le blé), cette croissance secondaire joue un rôle majeur chez les espèces ligneuses, en étant à l'origine de la formation du xylème et du phloème secondaires (tissus transportant l'eau et les nutriments). À cette échelle, plusieurs traits clés dans l'adaptation à des conditions limitantes sont déterminés tels le diamètre et la masse linéique des racines (Fitter et al., 2002).

2.3.2.2. Plasticité à l'échelle du système racinaire

La configuration spatiale du système racinaire d'une plante au cours du temps forme l'architecture racinaire, qui est déterminée par la croissance des différents types de racines du système racinaire (par exemple les racines principales déterminent le volume de sol exploitable tandis que les racines d'ordre supérieur déterminent la colonisation et l'exploitation de ce volume). Les plantes étant immobiles, l'adaptation de leur système racinaire est une stratégie capitale pour faire face aux variations temporelles et spatiales de la disponibilité de l'eau et des nutriments dans le sol (Hodge et al., 2009). Pour faire face à cette variabilité des sources de nutriments, l'initiation et l'élongation de racines secondaires (ou latérales) est un facteur clé de l'adaptation du système racinaire (Hodge et al., 2009). Ces racines latérales permettent à la plante d'explorer le sol et de le coloniser dans les zones riches en nutriments. En cas de conditions limitantes en nutriments, les plantes peuvent au contraire réduire la croissance de ces racines latérales dans les zones appauvries et maintenir une

croissance des racines primaires pour explorer des zones plus profondes du sol (Deak and Malamy, 2005). Par exemple, dans le cas du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), une faible disponibilité des nutriments phosphatés en surface entraîne une augmentation de l'élongation au détriment de l'initiation de racines latérales (Borch et al., 1999).

L'architecture racinaire diffère selon les espèces (Figure 6), et des variations génotypiques chez une même espèce existent, notamment chez les céréales (Manschadi et al., 2008).

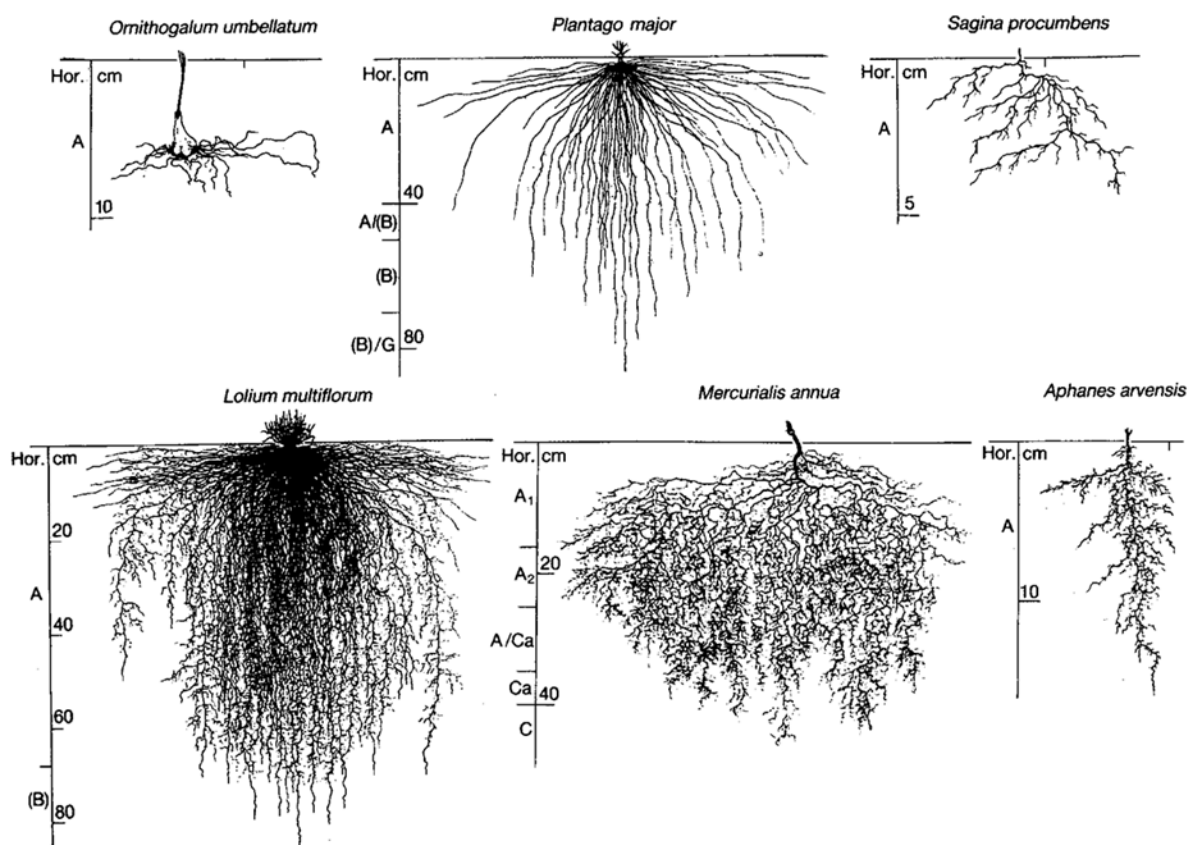


Figure 6. Exemples de la variabilité de différentes architectures racinaires classée suivant la dominance de l'axe racinaire principal (en horizontal) et de la densité de ramification de ces axes (en vertical), adapté de Kutschera L (1960) pour les architectures racinaires.

Dans le cas du blé, l'architecture racinaire est largement déterminée par l'angle de croissance des racines séminales (radicule issue de la graine) et nodales (ou adventives), qui semble être associé à l'efficacité d'acquisition de l'eau et des nutriments phosphatés (Manschadi et al., 2013). Les génotypes présentant des racines séminales et nodales aux angles plus verticaux forment des systèmes compacts et profonds, alors que les génotypes présentant des racines séminales et nodales aux angles plus horizontaux tendent à former des systèmes larges et superficiels (Manschadi et al., 2010 — Figure 7).

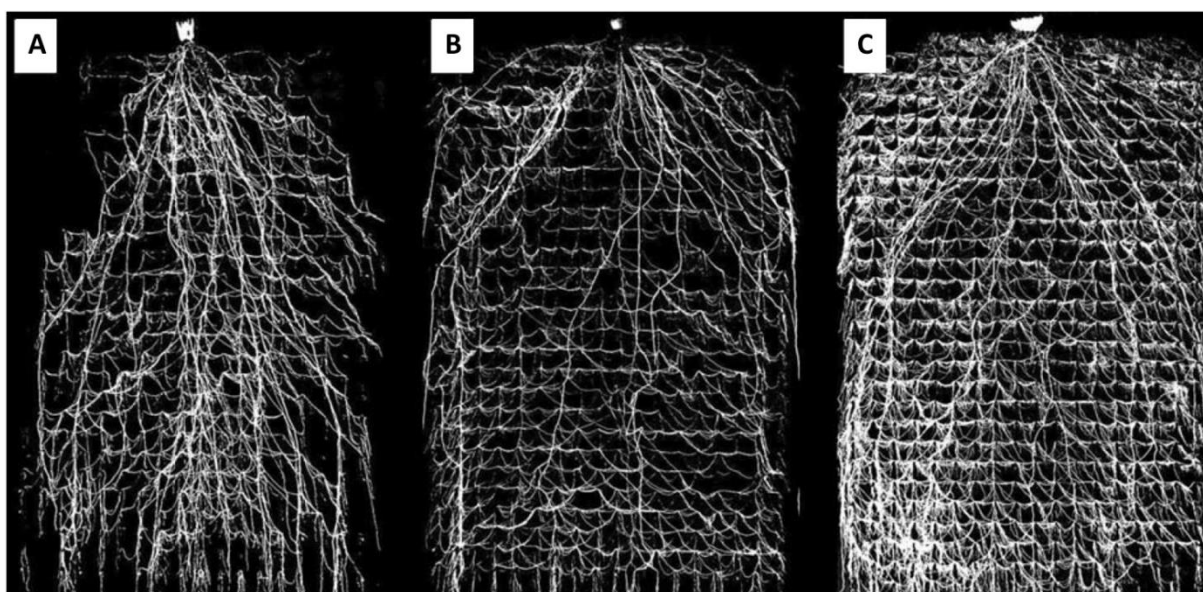


Figure 7. Systèmes racinaires de plants de céréales 33 jours après leur levée. Sont présentés des cultivars de blé Serim82 (A) et Hartog (B), la figure C est un cultivar d'orge (*Hordeum vulgare* L.) Mackay. Extrait de Manschadi et al. (2008)

2.3.3. Traits architecturaux d'intérêts dans les grandes cultures

2.3.3.1. La profondeur d'enracinement

La durée de croissance et la profondeur d'enracinement dans le sol des racines du blé est approximativement reliée au temps nécessaire à la floraison (Gregory et al., 1978). Ainsi un moyen d'augmenter la profondeur d'enracinement consiste à allonger le temps nécessaire

pour atteindre le stade de floraison. Ainsi, un semis plus précoce augmente la profondeur racinaire et améliore l'efficacité de l'utilisation de l'eau (Passioura and Angus, 2010).

Des variations de profondeur du système racinaire, suivant les génotypes, peuvent résulter d'une pousse plus rapide, citée comme la vigueur racinaire (Palta and Watt, 2009), et/ou des angles d'émissions des racines primaires plus verticaux (Manschadi et al., 2010).

En ce qui concerne la prolifération des racines latérales, il peut exister une croissance racinaire après floraison et ses effets sur le rendement pourraient être significatifs. D'importantes différences dans la prolifération des racines profondes après floraison ont été observées entre différents génotypes de blé (Manschadi et al., 2006) et il a été observé que le génotype présentant le plus fort accroissement des racines profondes après floraison a obtenu un rendement supérieur.

2.3.3.2. L'exploration racinaire des couches superficielles

Dans la plupart des cultures céréalières, la densité de longueur racinaire en surface est forte, dépassant les 3–5 cm.cm⁻³. Pour l'extraction d'eau, cette densité forte excèderait la densité requise pour extraire l'eau disponible en surface (Passioura, 1983). Dans le cas de cultures non-irriguées, où des déficits hydriques sont possibles en cours/fin de saison, une diminution de la quantité (densité) de racine dans ces horizons superficiels pourrait s'avérer bénéfique pour le blé, mais au détriment de la capture de nutriments au cours de la saison (Wasson et al., 2012). En effet, cette profusion de racines superficielles pourrait être également particulièrement utile pour la capture des nutriments (Zhu et al., 2005) en période humide (début de saison), tels que les nutriments peu mobiles Zn et P, qui sont de première importance lors du remplissage du grain.

2.3.3.3. *L'exploration des couches profondes*

Il est estimé qu'il faut environ 1cm de racines pour extraire l'eau disponible dans 1cm³ de sol, en considérant un temps suffisant, un bon contact racines-sol et une conductivité hydraulique sol-racines suffisante (Passioura, 1983). À la récolte, les céréales/les cultures avec une densité de longueur racinaire insuffisante en profondeur peuvent laisser de l'humidité inexploitée dans les couches profondes du sol. Or, il a été montré que des quantités modestes d'eau supplémentaires exploitées en post-floraison, en cas de déficit hydrique, conduisent à une augmentation substantielle du rendement, de l'ordre de 60 kg/ha par mm d'eau (Kirkegaard et al., 2007). Puisque un système plus profond va de pair avec plus d'eau accessible, une augmentation de la longueur racinaire dans ces zones est également nécessaire pour les exploiter au mieux.

Dans le cas du blé, sur une base de modélisation et de données de précipitation (Lilley and Kirkegaard, 2011), il a été montré qu'une pénétration plus rapide des racines (20%) induisant un système racinaire plus profond et couplé avec une meilleure extraction de l'eau dans le sous-sol (20% en-dessous de 60cm), pourrait ainsi augmenter les rendements. Dans une zone où le stock d'eau profonde se forme durant la saison de culture (le sud de l'Australie dans l'étude), de tels systèmes racinaires pourraient produire une hausse moyenne du rendement de 0.32 t.ha⁻¹. De même, dans une zone où le stock d'eau profonde se forme avant la saison de culture (le nord de l'Australie), la hausse de rendement pourrait atteindre 0.44 t.ha.

2.3.4. Les traits morphologiques et anatomiques des racines

La réduction du coût métabolique de l'exploration du sol est un des traits intéressants pour optimiser l'efficacité du système racinaire. Pour réduire ce coût, une solution possible est de réduire le diamètre des racines ou la densité des tissus. Ainsi pour chaque gramme de racine

produit, le volume de sol exploré est plus important. Une réduction du diamètre des racines peut être provoquée par une faible disponibilité en nutriments (Zhu and Lynch, 2004), mais il existe aussi des variations génotypiques du diamètre des racines primaires et latérales associées à de plus grandes longueurs spécifiques (*SRL*) des racines latérales (Zhu and Lynch, 2004).

La conductance hydraulique des racines pourrait être également un des leviers pour optimiser la quantité d'eau extraite du sol. La conductivité hydraulique axiale (de la racine vers la tige) est nettement plus élevée que la conductivité hydraulique radiale (du sol vers la racine) (Rowse and Goodman, 1981). Dans le but d'améliorer la capture des intrants, et pour partie la conductivité hydraulique radiale, augmenter la densité des poils racinaires peut être une solution. En effet, ces poils racinaires participent à l'augmentation de la conductivité hydraulique sol-racines en agrandissant la surface de contact entre les racines et le sol. Cela est confirmé par l'analyse d'absorption d'eau par des jeunes plants d'orge mutants dépourvus de poils racinaires (Segal et al., 2008). Par ailleurs, deux gènes contrôlant l'élongation des poils racinaires ont été identifiés chez le maïs, RTH1 et RTH3, et pourraient être d'intérêt pour l'amélioration génétique (Hochholdinger and Tuberosa, 2009).

À l'inverse, réduire la conductance axiale des racines permettrait de réduire la quantité d'eau prélevée en début de saison, et donc de sécuriser une partie de l'eau disponible en pré-floraison, pour une meilleure utilisation en post-floraison. Ceci a été tenté, avec un certain succès, pour le blé en Australie en sélectionnant des variétés avec des racines séminales présentant une conductance axiale réduite (Richards et Passioura, 1989, Passioura, 1991).

3. Méthodes de mesures des systèmes racinaires

3.1. Échelle d'observation pratiquée

Bien que les détails fins de la structure des racines soient importants, notamment le rôle des poils racinaires dans l'absorption de nutriments, le système racinaire est généralement étudié dans son ensemble (Lynch, 1995). Cette architecture globale du système racinaire possède un rôle important dans l'adaptation des cultures aux conditions limitantes (Fitter, 2002; Lynch, 1995), notamment aux conditions de sécheresse, qui seront d'autant plus récurrentes du fait du réchauffement climatique. Malgré cette échelle d'observation relativement large, quantifier rapidement un grand nombre de systèmes racinaires reste un défi.

3.2. Méthodes utilisées en milieux contrôlés

3.2.1. Aperçu global

Les méthodes en milieux contrôlés bénéficient des progrès de la robotisation et des technologies de capteurs, à travers la mise au point de serres automatisées appelées plateformes de phénotypage. Récemment, des plateformes à but commercial ou développées par des acteurs du domaine public ont été déployées sous la forme de serres automatisées. Ces plateformes sont spécifiquement conçues pour la recherche et le phénotypage haut débit sur un panel limité d'espèces, comprenant les céréales majeures (Bock et al., 2010; De Smet et al., 2012; Sultan, 2000). Le but de ces plateformes est de fournir tout un éventail de mesures pour chaque plante en culture grâce à la robotique (pour les aspect logistiques) et l'analyse d'image, tout en assurant un contrôle de l'environnement de culture (Fiorani and Schurr, 2013).

Dans ces serres de phénotypage, les systèmes racinaires peuvent être imagés directement grâce aux parois transparentes des pots ou des rhizotrons de culture. Dans ce cas, les capteurs utilisés pour l'imagerie des parties aériennes peuvent être également utilisés pour caractériser les systèmes racinaires dans le spectre visible/infrarouge. Les plantes sont cultivées soit sur substrat naturel (Devienne-Barret et al., 2006), soit sur substrat artificiel (Jeudy et al., 2016) afin d'augmenter le contraste visuel entre le système racinaire et son milieu de croissance.

Des techniques permettant d'imager/quantifier directement le système racinaire dans le sol telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie à rayons X, nécessitent du matériel coûteux et sont peu répandues actuellement.

Par exemple, l'IRM a permis de mesurer l'effet de la taille des pots sur le système racinaire de plants d'orge (Poorter et al., 2012) ou la distribution racinaire de plants de maïs cultivés avec une autre espèce dans le même pot (Rascher et al., 2011). La tomographie à rayons X fournit des données volumétriques sur l'hétérogénéité du sol (Pierret et al., 2002; Young et al., 2008) et sur les structures des plantes (Stuppy et al., 2003). Au-delà de la disponibilité et du coût, les limites sont principalement liées au traitement d'image nécessaire, qui peut être source d'une grande variabilité, par exemple dans la longueur racinaire estimée (Flavel et al., 2012).

3.2.2. Contraintes et limites des études en milieux contrôlés

L'observation des traits des systèmes racinaires en milieux contrôlés, en pots ou en rhizotrons 2D, à des stades relativement développés, est problématique. Les systèmes racinaires atteignent rapidement les limites du container, modifiant la croissance et le développement que les racines auraient eu naturellement au champ. Ainsi, des traits racinaires exprimés en milieu contrôlé à des stades jeunes ne sont pas toujours corrélés aux traits observés au champ

à des stades plus âgés (Watt et al., 2013). Pour assurer des mesures sur des systèmes racinaires plus proches de la réalité terrain, il est possible d'augmenter le volume des pots (ce qui réduit drastiquement la faisabilité des expérimentations et des répétitions) ou d'opter pour des mesures au champ. Dans ce cas, les systèmes racinaires peuvent se développer plus profondément et en conditions réelles. Toutefois, ce choix possède des inconvénients majeurs : un contrôle difficile de l'environnement climatique, du sol et de son hétérogénéité, la difficulté d'observer le système racinaire et d'obtenir des échantillons de racines, et finalement du volume d'échantillons nécessaires à une quantification fiable.

3.3. Méthodes applicables au champ

3.3.1. Inadaptation des méthodes destructives aux exigences du phénotypage

Les techniques de caractérisations au champ de traits des parties souterraines des plantes ne sont pas aussi développées qu'en milieu contrôlé, en particulier dans le cadre du phénotypage non destructif et haut-débit. Du fait de leur croissance dans le sol, milieu opaque et difficile à investiguer, l'étude des systèmes racinaires nécessite des techniques bien spécifiques. Les techniques classiques d'études *in situ* comprennent des méthodes destructives : prélèvement d'échantillons de sol, que ce soit à l'aide de tarière ou en excavant des blocs entiers de sol (monolithes), tranchées d'observation (verticales ou horizontales).

En condition de culture au champ, la sélection végétale nécessite la caractérisation de traits d'intérêt des plantes avec comme condition de caractériser un grand nombre de plantes dans un court laps de temps. Dans cet objectif, un protocole de mesures destructives basé sur l'excavation de la partie proximale du système racinaire a été mis au point pour les cultures de maïs (Trachsel et al., 2011). Dénommé Shovelomics, ce protocole de mesure reposait initialement sur des descriptions qualitatives de traits racinaires. Depuis, des avancées ont été

réalisées afin d'obtenir des mesures quantitatives automatiques grâce au développement d'algorithmes de traitement image mesurant les traits racinaires entrant dans le score de Shovelomics (Colombi et al., 2015). Ces méthodes atteignent un débit de mesure relativement élevé d'une plante mesurée toutes les 2 minutes, mais en nécessitant un personnel important. Néanmoins, au-delà de leur aspect destructif, ces méthodes type « shovelomics » concentrent les mesures sur la partie superficielle des systèmes racinaires, et de fait, les mesures de systèmes racinaires en profondeur sont absentes. Ainsi, pour mesurer des aspects liés à la distribution spatiale des systèmes racinaires — les densités de longueurs de racines ou les diamètres moyens — , il est nécessaire d'effectuer de nombreux prélèvements (Levillain et al., 2011), et d'autant plus nombreux s'il s'agit de suivre des aspects dynamiques, tel que la vitesse d'enracinement. Extraire les racines de ces prélèvements nécessite un temps considérable (Berhongaray et al., 2013), impliquant que le phénotypage racinaire basé sur des méthodes destructives engendre un coût de main-d'œuvre et de temps importants.

3.3.2. Méthodes non destructives d'observation directe

Des techniques non-destructives comme les minirhizotrons ont été mises en œuvre pour une observation directe et permettant un suivi temporel des systèmes racinaires. Les rhizotrons standards (i.e. un milieu de culture séparé par une interface transparente permettant de voir les racines le long de cette interface) font partis des outils de mesures appliqués principalement en milieu contrôlé bien que des utilisations au champ existent (Zang et al., 2014). Ces rhizotrons consistent en des containers de culture aux parois transparentes destinées à permettre la visualisation de la croissance des racines et leur quantification à travers des mesures de longueurs des racines, prises à même les parois ou par photographie. L'emploi des rhizotrons au champ a plusieurs contraintes, la principale étant l'ampleur des travaux à réaliser pour leur installation.

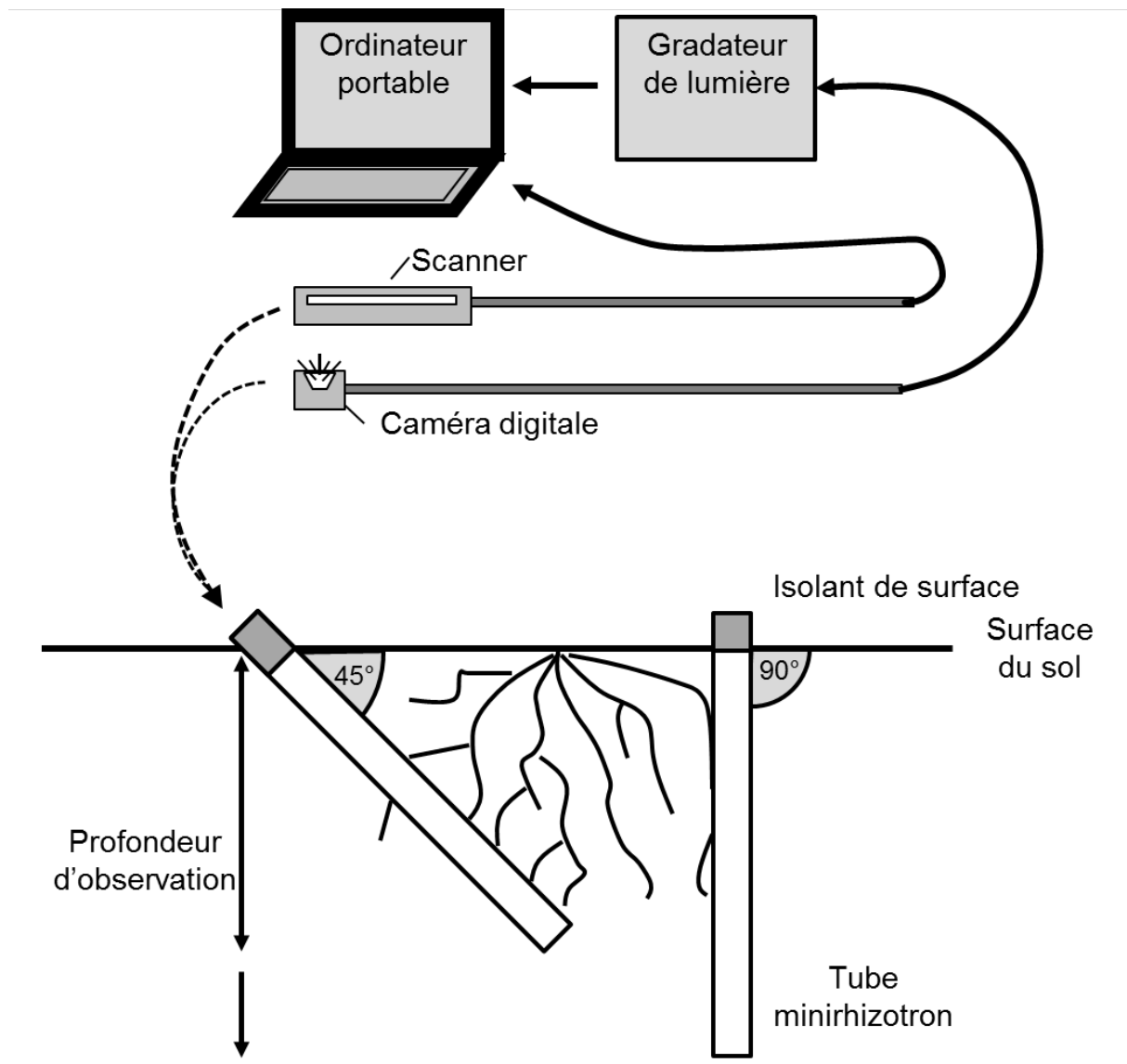


Figure 8. Principe de fonctionnement des minirhizotrons modernes. Extrait de (Rewald and Ephrath, 2012)

Ces minirhizotrons ont contribué à enrichir notre compréhension des systèmes racinaires sur des aspects de phénologie, de distribution spatiale ou de production de racines et de longévité (Eizenberg, 2005; Hendrick and Pregitzer, 1992; Rytter and Hansson, 1996; Upchurch and Ritchie, 1983).

Une alternative possible, plus simple d'installation, est l'emploi de minirhizotrons. Ces outils consistent en des tubes transparents installés dans le sol, dans lesquels on insère des caméras pour capturer des images des racines en sous-sol, et ainsi suivre leur croissance. Différents appareillages de capture d'images ont été mis au point (Rewald and Ephrath, 2012) et, de nos jours, les deux systèmes les plus répandus sont basés sur des caméras vidéo (Withington et al., 2003) ou des scanners (Liao et al., 2015; Munoz-Romero et al., 2010) (Figure 8). Bien qu'ils permettent de quantifier les systèmes racinaires, les minirhizotrons sont encore peu utilisés pour étudier l'enracinement des grandes cultures. Ce faible usage provient de la difficulté à une installation convenable. En effet, un mauvais contact entre la paroi des tubes et le sol induit un biais qui se manifeste par une prolifération des racines autour du tube. La fiabilité des minirhizotrons dans un cadre de grandes cultures est donc encore peu documentée (Liao et al., 2015). Ainsi, leur fiabilité et leur pertinence dans le cadre d'étude de phénotypage, par exemple pour quantifier la réaction des systèmes racinaires de plants de blé soumis à un déficit en intrants, sont explorées, sous forme d'article, dans le 2^{ème} chapitre de cette thèse.

3.3.3. Méthodes non destructives de caractérisation indirectes

Parmi les méthodes non destructives et non invasives figurent les techniques issues de la géophysique, exploitant les propriétés électriques du sol et des plantes. Le sol et les tissus biologiques contiennent des électrolytes et sont donc susceptibles de conduire le courant par conduction ionique.

Développées à l'origine pour des applications de caractérisation géologique en profondeur, les techniques de la géophysique se tournent vers des applications plus superficielles, à destinations environnementales, hydrogéologiques et agronomiques (caractérisation de nappes, de l'hétérogénéité des sols). Plus récemment encore, on a tenté d'appliquer ces

techniques au fonctionnement des plantes. Par exemple, la polarisation spontanée — la différence naturelle de potentiel électrique entre une plante et le sol, — mesurée sur des arbres (*Quercus cerris*) a été montrée corrélée aux variations de flux de sèves (aux flux d'électrolytes) dues à la transpiration et à la pression générée par les racines (Koppan et al., 2002). Ces techniques ont également été appliquées à l'estimation et à la quantification des racines dans le sol.

Parmi ces techniques, le **géoradar** permet de cartographier les couches superficielles du sol et éventuellement les racines grâce à des impulsions électromagnétiques haute-fréquence qui interrogent les propriétés diélectriques du sol. La technique est rapide, mais est limitée aux racines de plus de 5 mm de diamètre et est dépendante du type de sol : les résultats sont optimaux dans des sols sableux peu humides, par contre l'onde radar ne pénètre que peu dans des sols argileux. Le traitement des signaux radar peut également s'avérer délicat suivant l'hétérogénéité du milieu. Ces limitations rendent le géoradar principalement utile pour détecter la biomasse des racines des espèces ligneuses (Stover et al., 2007; Zhu et al., 2014). Utilisant un signal électrique basse fréquence, **la tomographie de résistivité** permet l'imagerie des propriétés résistives du milieu, et est donc sensible à la constitution du sol et à son humidité. Les applications à la détection de racines peuvent être directes ou indirectes. Bien que l'humidité du sol soit le facteur majeur de variation de résistivité du sol, les racines ligneuses en forte densité pourraient être directement détectables, alors que dans le cas de faibles densités de racines leur effet sur la résistivité du milieu n'apparaît pas significatif (Amato et al., 2008). Dans ce cas, l'estimation des perturbations provoquées par les racines pourrait cependant être possible en suivant une dynamique temporelle (Attia Al Hagrey, 2007) mais nécessite une longue étape de calibration et de prélèvements .

Des méthodes d'estimation plus directes, mais ne permettant pas d'imagerie, existent. Une solution revient à mesurer l'impédance du système plante-sol (en y appliquant un signal

électrique), reflétant les propriétés électrique du système, elles-mêmes potentiellement reliées à la composition et la structure du sol et des tissus biologiques. De la même façon que la maturation des fruits est quantifiable à travers l'impédance (Harker and Maindonald, 1994), il serait possible d'analyser les propriétés électriques du système plante-sol pour en retrouver la signature des racines. Généralement le sol et les tissus biologiques agissent comme des résistances électriques (liées au flux d'électrolytes) ou comme des condensateurs (liées à l'accumulation de charge à chaque interface).

4. Bases sur les techniques de mesures des racines employées dans cette thèse

4.1. Les minirhizotrons

Les minirhizotrons ont été utilisés pour la mesure de traits architecturaux comme la profondeur d'enracinement (Rasmussen et al., 2015), la distribution des racines, ces traits entrant dans la résistance du blé à la sécheresse (Manschadi et al., 2006). La morphologie des racines peut être aussi étudiée par minirhizotrons, tel le diamètre des racines (Withington et al., 2003), un trait entrant en jeu dans l'efficacité de la capture de l'eau du sol. La production de nouvelles racines et le renouvellement du système racinaire sont aussi observés avec cette technique (Pilon et al., 2012), en particulier sur les dynamiques à court terme (Majdi et al. 2007). Les taux de mortalité observés au minirhizotron seraient comparables aux valeurs issues d'autres techniques, notamment celles des méthodes isotopiques, lorsque le volume des racines observées est considéré (Pritchard and Strand, 2008)— combinant ainsi longueurs et diamètres observés. Les interactions avec la faune souterraine, le suivi de phénomènes de parasitisme ont aussi fait l'objet d'étude par les minirhizotrons (Eizenberg, 2005).

4.1.1. Tubes d'observation

4.1.1.1. Installation des tubes d'observation

Les minirhizotrons reposent sur l'installation de tubes transparents installés dans le sol. Le type de sol et des facteurs spécifiques à l'espèce doivent être pris en compte lors de leur installation. Pour éviter de perturber le sol et la végétation, il faut minimiser le piétinement des zones étudiées. Ainsi, les minirhizotrons doivent être installés le plus tôt possible pour les plantes annuelles (grandes cultures), de préférence à la levée.

Les sols caillouteux sont problématiques dans l'installation, à cause des complications de forage qu'ils provoquent. Les trous d'insertion des minirhizotrons sont généralement obtenus à l'aide de tarières (Munoz-Romero et al., 2010) ou de carottier (J. W. Hummel et al., 1989), ou encore avec des dispositifs mécaniques de forage (Box et al., 1989; Kloeppel and Gower, 1995). Les tubes d'observations minirhizotrons sont généralement enfoncés jusqu'à 1 m de profondeur. Afin de creuser des trous rectilignes, un socle de support doit être positionné en surface et peut occasionner des perturbations supplémentaires aux plantes en surface.

Afin d'éviter au mieux des artéfacts de la croissance racinaire, les tubes minirhizotrons doivent idéalement être en contact parfait avec le sol. Toutefois, assurer un contact parfait tout le long d'un tube est une opération difficile, et le diamètre du trou est un facteur déterminant de l'installation. Ainsi, un forage au diamètre ajusté au diamètre du tube est la solution la plus efficace, réduisant la chance de formation d'interstices entre le sol et la paroi du tube, et de rotation des tubes lors de leur utilisation (Johnson et al., 2001). Bien qu'il facilite l'installation des tubes minirhizotrons, un trou surdimensionné induit un écart entre la paroi du tube et le sol, qui, même de taille réduite, constitue une zone de croissance préférentielle offrant peu de résistance mécanique, ce qui peut augmenter artificiellement la colonisation par les racines

(Volkmar, 1993). Un forage trop large peut nuire à la qualité des images obtenues du fait de la condensation d'eau autour du tube ou de l'augmentation des risques d'effondrement des parois du trou, provoquant une réorganisation du sol autour des tubes.

Hormis l'éventuelle compaction du sol provoquée par un trou trop ajusté (McMichael et al., 1991) le phénomène de condensation autour du tube est réduit, facilitant l'observation des racines. Le remblayage des trous surdimensionnés est généralement exclu, à cause de l'effet sur les traits racinaires observés de la densité et de la structure non-naturelle du sol (Kloppel and Gower, 1995).

4.1.1.2. Angle d'installation

Actuellement, les tubes minirhizotrons sont classiquement installés à un angle de 30° ou 45°, bien que certaines études utilisent des tubes verticaux (90°) ou horizontaux (0°) (Johnson et al., 2001). Les tubes posés avec un angle sont présentés comme permettant de mieux estimer la distribution racinaire des grandes cultures que les tubes verticaux en réduisant l'effet de croissance préférentielle le long du tube (Pagès and Bengough, 1997). Cet effet préférentiel accru sur les tubes verticaux est probablement lié à l'infiltration de l'eau le long du tube et du gravitropisme des racines, augmentant ainsi la tendance des racines à suivre le tube. Même si aucune croissance préférentielle des racines de blé en fonction de l'angle d'insertion en sol limono-sableux n'a été mise en évidence (Ephrath et al., 1999), les tubes en biais peuvent intercepter en profondeur des plantes éloignées du lieu d'insertion du tube en surface, permettant l'observation de racines provenant de plusieurs plantes comme celles d'un rang dans une culture.

L'installation de tubes dans des milieux moins naturels, comme les lysimètres ou les phytotrons semble être moins problématique. Ceux-ci permettent une pose plus aisée de tubes

horizontaux pour maximiser la surface d'observation par profondeur de sol, bien qu'il semble qu'il y ait une grande variation entre la surface supérieure des tubes et la surface inférieure (Dubach and Russelle, 1995).

4.1.1.3. Protection du tube de la lumière et du climat

Il est nécessaire de fermer les deux extrémités du tube, avec un bouchon en pvc en partie inférieure et un capuchon sur la partie émergente, pour éviter la présence d'eau à l'intérieur du tube, que ce soit dû à la pluie ou aux remontées capillaires. Toutefois, l'eau peut aussi s'accumuler par condensation, et ainsi il est important d'isoler la partie émergée des tubes de la lumière et des fluctuations thermiques. Il est conseillé d'appliquer sur la surface des tubes émergés un matériau isolant réfléchissant. De plus, cette isolation permet d'éviter l'illumination de l'intérieur des tubes ainsi que les fluctuations thermiques qui peuvent affecter la croissance racinaire (Levan et al., 1987).

4.1.1.4. Matériel et types de tubes d'observation minirhizotron

Différents matériaux ont été utilisés pour les tubes d'observation, et il apparaît que les tubes plastiques (Munoz-Romero et al., 2010) (en polyméthacrylate de méthyle [PMMA] ou en polycarbonate) sont plus résistants que les tubes en verre (Kloepfel and Gower, 1995), face aux phénomènes de gonflement et rétractation ou face au gel, tout en étant l'option la plus économique. Bien que le verre et le plastique n'aient pas les mêmes propriétés optiques (notamment dans la transmission), aucune différence significative sur les profils racinaires obtenus avec les minirhizotrons n'a été constatée (Withington et al., 2003). Néanmoins, il semble que la dynamique de production et de mortalité des racines soit possiblement impactée par les différents matériaux constituant les tubes (Withington et al., 2003), les matériaux plastiques pouvant conduire à une sous-estimation de la production de racines.

4.1.2. Systèmes de capture d'images des racines

Dans la décennie écoulée, la technologie dédiée à l'acquisition d'images pour les minirhizotrons a progressé en augmentant la vitesse d'acquisition et permettant la prise d'images de plus grand format. Les systèmes d'acquisition utilisés de nos jours se divisent en deux catégories : les caméras vidéo numériques et les scanners. Ces deux systèmes d'acquisition sont instrumentés à l'aide d'ordinateurs portables équipés de logiciels dédiés, gérant l'acquisition et l'étiquetage des images. Ils sont aussi équipés d'un système de guidage qui permet à l'utilisateur de prendre des photos répétées au même endroit du sol.

4.1.2.1. Caméra vidéo numérique

Différentes tailles d'appareils existent, et le diamètre des tubes minirhizotrons doit être choisi en fonction du diamètre du boîtier de la caméra. Dans les systèmes commerciaux, le système le plus répandu est produit par Bartz (Carpinteria, CA, États-Unis). Les différentes générations de caméra offrent différents niveaux de qualité d'images, certaines caméras proposent un zoom optique 100×, permettant d'étudier en détails les racines (Eizenberg, 2005). Cependant la caméra ne couvre qu'une zone étroite du tube (<2 cm de large), l'utilisation de caméra à plus large champ étant impossible en raison des déformations optiques. Ainsi, des rotations de la caméra sont nécessaires pour obtenir tout le profil de sol et de racines à une profondeur donnée. La plupart des systèmes basés sur des caméras vidéo permettent un réglage manuel de la mise au point et de l'exposition et permettent l'adaptation à des sources lumineuses avec un spectre lumineux spécifique, telles les sources infrarouges.

4.1.2.2. Scanner rotatif

L'unique système basé sur un scanner rotatif existant est produit par CID Inc. (Camas, WA, Etats-Unis). Un capteur CCD de scanner de bureau classique est monté sur un moteur rotatif et permet de prendre des images sur 345° sur une profondeur de champ de l'ordre de 5mm. Les images acquises sont décimétriques (20cm de large sur 22cm de haut), réduisant drastiquement la quantité de prises de vues nécessaire pour la capture de l'intégralité de la surface d'un tube. Avant chaque utilisation, le niveau de blanc du scanner doit être calibré. Bien que la résolution maximale soit de 1200 ppp, la résolution de routine est typiquement de 300 ou 600 ppp afin de réduire le temps d'acquisition. La technologie CCD a pour caractéristique intrinsèque une exposition homogène et une mise au point automatique, facilitant l'usage. L'unique diamètre des scanners en vente implique l'utilisation de tubes de 70 mm de diamètre.

4.1.3. Données issues des minirhizotrons

Les minirhizotrons rendent possible l'analyse de nombreux traits des systèmes racinaires, jusqu'à lors difficilement accessibles *in situ* en particulier la dynamique temporelle. Néanmoins, l'interprétation de leurs données doit tenir compte des biais possibles associés à la technique. Par exemple, les minirhizotrons pourraient sous-échantillonner le nombre de classes de diamètres par rapport à un classement fait à partir de prélèvements destructifs (Taylor et al., 2013). Une estimation fiable des diamètres des racines est importante car la description de la dynamique racinaire est souvent basée sur des distributions de diamètres, qui peuvent montrer un éventail de réponses aux traitements appliqués (Tingey et al., 1997; Wilcox et al., 2004). Cependant, ce biais est surtout lié aux espèces présentant une grande variabilité de diamètres, du fait que la quantité de racines de fort diamètre soit généralement très sous-estimée. C'est le cas de la biomasse racinaire des arbres et arbustes qui n'est pas

quantifiable globalement de façon fiable avec les minirhizotrons. Ces derniers sont plus adaptés aux cultures annuelles, telles les céréales, dont les systèmes racinaires sont composés essentiellement de racines aux diamètres inférieurs à 2 mm.

4.1.3.1. Données exploitables à partir des images

La mesure la plus simple est la présence (ou l'absence) de racines sur les images acquises, ce qui permet de décrire la profondeur du sol exploré par le système racinaire sur le pourtour du tube. Evidemment, aucune information n'est fournie sur les racines en dehors de la zone d'échantillonnage.

La longueur de racines, communément mesurée sur les images de minirhizotrons, est souvent divisée par la surface totale des tubes. On exprime alors la longueur de racines par unité de surface (cm de racine par cm^2 de surface de tube). La surface des racines elles-mêmes, par l'estimation de leur diamètre, peut être observée et rapportée à la surface totale des tubes (Johnson et al., 2001).

Certaines études utilisent le nombre de racines pour estimer la dynamique de croissance (Fitter et al., 1998; Rytter and Rytter, 1998). Bien que le nombre de racines soit moins sensible à la fréquence d'échantillonnage, il ne peut pas prendre en compte l'accroissement de la longueur lié aux racines déjà présentes. Ainsi mesurer la longueur des racines semble une meilleure option pour quantifier les dynamiques d'accroissement des systèmes racinaires, en considérant l'orientation des racines afin de privilégier les racines impactant par dessus les tubes minirhizotrons.

4.1.3.2. Transformations volumiques des données racinaires acquises

Les mesures surfaciques ne sont pas directement comparables avec les unités aériennes, ni avec les prélèvements destructifs classiques exprimés par unité de volume de sol ou, en cumulatif, par unité de surface au sol jusqu'à une profondeur donnée. De ce fait, les données surfaciques doivent être converties sur une base volumique. Deux méthodes de conversion sur une base volumétrique existent, et diffèrent selon la méthode destructive équivalente considérée : la fosse d'observation ou le prélèvement d'échantillons.

La première approche (Merrill and Upchurch, 1994) utilise seulement le nombre de racines qui interceptent les tubes et non leurs longueurs observées. La conversion sur une base volumique calcule la valeur attendue de la longueur des racines dans le volume du sol occupé par le tube en son absence, en tenant compte de toutes les orientations possibles au point d'intersection avec le tube. La conversion est exprimée comme suit :

$$RLD_v = \frac{Ef \times N}{A} \quad (1)$$

où RLD_v est la densité volumique de longueur des racines (m m^{-3}); N le nombre de racines observées (sans unité), A l'aire du tube minirhizotron (m^2); et Ef , le facteur de conversion théorique (m m^{-1}). Il est basé sur la longueur moyenne des racines qui traverserait la section du tube en son absence.

Ainsi Ef est donc la longueur moyenne des arcs d'un cercle au diamètre égal au tube. Pour un tube de diamètre d , le facteur de conversion est donné par :

$$Ef = \frac{2d}{\pi}$$

L'auteur minimise l'impact de l'orientation verticale des racines, les considérant toutes comme orthogonales à la surface du tube, induisant une sous-estimation de la longueur des racines présentant un autre angle d'impact.

L'autre approche repose sur la conversion vers un échantillon équivalent obtenu par carottage. Ainsi pour calculer la densité de la longueur des racines par unité de volume, on suppose que les images 2D acquises de minirhizotron sont représentatives d'une faible épaisseur de sol autour du tube, équivalente à une profondeur de champ. Typiquement les profondeurs de champ utilisées dans cette approche sont de l'ordre de 2–3 mm (Johnson et al., 2001; Zhang et al., 2008). Les longueurs de racines observées sont alors divisées par le produit de la surface des tubes minirhizotrons et de la profondeur de champ, donnant la densité de la longueur des racines par unité de volume du sol :

$$RLD_v = \frac{L}{A \times DOF} \quad (2)$$

où RLD_v est la densité volumétrique de longueur des racines (m m^{-3}); L la longueur racinaire observée (m), A l'aire du tube minirhizotron (m^2); et DOF , la profondeur de champ théorique (m).

Chacune de ces densités volumiques de longueur des racines peut également être exprimée sur une base d'aire en surface du sol en multipliant par la profondeur du profil du sol échantillonné (D):

$$RLD_A(\text{mm}^{-2} \text{ to depth } D) = RLD_v(\text{mm}^{-3}) \times D \quad (3)$$

Toutefois, les racines ont tendance à suivre les tubes, notamment si l'interstice entre le sol et la paroi est important, et ce type de conversion surestime la densité de longueur racinaire. Dans ce cadre, les minirhizotrons paraissent donc plus appropriés pour quantifier les dynamiques de productions racinaires.

4.2. Mesures indirectes des systèmes racinaires par méthode électrique

4.2.1. Propriétés électriques des tissus biologiques

4.2.1.1. Notions de base

L'impédance (en Ω) décrit les propriétés électriques d'un matériel soumis à un courant alternatif. Elle est définie par la généralisation de la loi d'Ohm à des courants alternatifs. Notée Z , l'impédance relie ainsi la tension U et le courant I mesuré comme suit :

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} \quad (4)$$

où ω est la fréquence angulaire, défini par $\omega = 2\pi f$, f étant la fréquence temporelle du signal (en Hz). Pour simplifier les calculs, le courant et la tension peuvent également être exprimés en utilisant la notation exponentielle complexe:

$$I(\omega, t) = A(\omega) e^{j(\omega t + \varphi_1)} \quad (5)$$

$$U(\omega, t) = B(\omega) e^{j(\omega t + \varphi_2)} \quad (6)$$

j désigne l'unité imaginaire (i.e. $j^2 = -1$), pour éviter les confusion avec le courant noté i , et φ_1 et φ_2 les phases initiales du courant et de la tension. En appliquant l'équation Eq.4, il vient :

$$Z(\omega) = \frac{B(\omega)}{A(\omega)} e^{j(\varphi_2 - \varphi_1)} \quad (X4)(7)$$

$$Z(\omega) = Z_0(\omega) e^{j\varphi_0} \quad (8)$$

On constate que l'impédance possède une composante réelle et une composante imaginaire (Eq. 8). Z_0 décrit l'effet de l'impédance sur l'amplitude de la tension mesurée, et φ_0 celui du

déphasage induit par l'impédance. Cette notation exponentielle est rarement utilisée, la notation cartésienne dans le plan complexe lui étant préférée :

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + j Z''(\omega) \quad (9)$$

L'impédance de tout composant électronique peut s'écrire sous cette forme (Eq.9). Ainsi l'impédance d'une résistance de valeur R (Eq.10) et d'un condensateur de valeur C (Eq.11) sont décrits par :

$$Z_R = R \quad (10)$$

$$Z_c = \frac{1}{j\omega C} \quad (11)$$

Les propriétés conductrices des résistances ne varient pas avec la fréquence appliquée, alors que celles des condensateurs en dépendent. À haute fréquence (ω grand), l'impédance d'un condensateur est proche de 0, le condensateur est alors très conducteur, alors qu'à basse fréquence celui-ci devient très résistif (à la limite courant continu ($\omega = 0$) le condensateur devient parfaitement résistant).

Dans le cas où un condensateur est en série avec d'autres composants sur une même « branche » d'un circuit électrique, l'impédance de ceux-ci est occultée à basse fréquence, car l'impédance du condensateur est élevée. Par contre, à haute fréquence, le condensateur devient conducteur (faible impédance) et alors l'impédance totale de la « branche » est régie par celle des autres composants.

4.2.1.2. Spectre d'impédance et tissus biologiques

La variation de l'impédance avec la fréquence définit le spectre d'impédance, et selon la forme du spectre des conclusions peuvent être tirées sur les caractéristiques du milieu investigué.

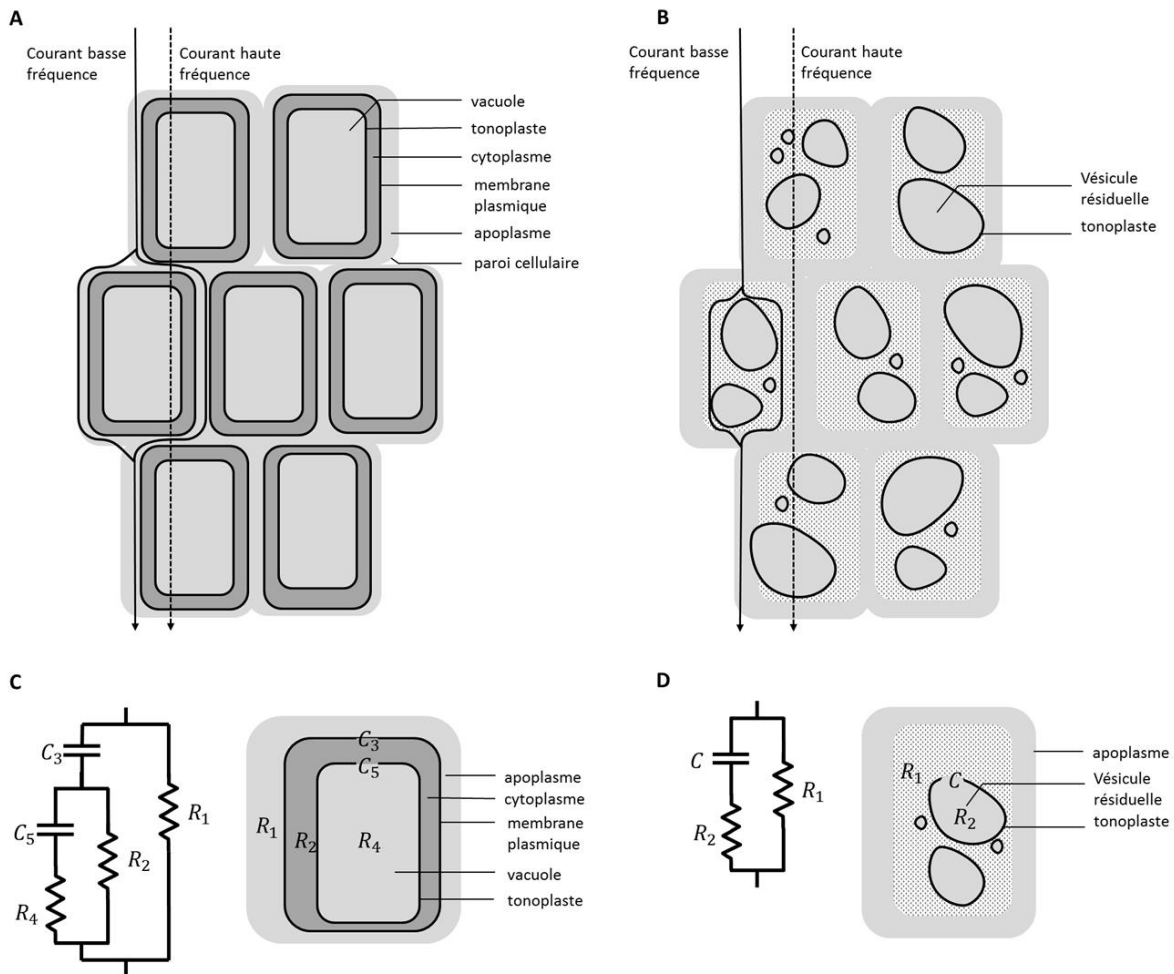


Figure 9. Représentation schématique du passage d'un courant alternatif à travers les tissus végétaux dans le cas de tissus sains et endommagés par le gel. Le passage du courant peut être modifié par l'état des tissus et des structures le composant. La différence d'impédance mesurée entre les tissus sains (A) et les tissus endommagés par le gel (B) pourrait provenir de l'état des cellules qui les composent. Les cellules saines (C) contribuent différemment des cellules endommagées (D) qui présentent moins d'interfaces en raison des dommages causés à la membrane cytoplasmique par le gel. Extrait de Repo et al., 2012, et de Zhang et Willison, 1992

Les tissus biologiques peuvent être modélisés grâce à des combinaisons d'éléments résistifs et d'éléments capacitifs. L'aspect résistif des tissus est lié à la conduction des électrolytes, dans l'apoplasme par exemple chez les plantes, alors que l'aspect capacitif aux différentes

fréquences décrit les phénomènes d'accumulation d'électrolytes aux interfaces, par exemple au niveau des membranes plasmiques. Il est possible de modéliser chaque interface par un condensateur et chaque milieu conducteur par une résistance, la mise en série d'un condensateur avec un autre élément correspondant au passage d'une interface (membrane).

Une des conséquences de la caractéristique alternative du champ électrique appliqué est que le passage du courant peut interroger différents compartiments formant le tissu végétal suivant la fréquence (Figure 9-A et C). En raison de leur bicouche lipidique, les membranes cellulaires ne peuvent pas être traversées par un courant alternatif basse fréquence, agissant ainsi comme des condensateurs. Dans cette situation, le courant circule dans l'espace apoplastique et l'impédance totale mesurée est alors principalement liée à la résistance de ce continuum. À mesure que la fréquence augmente, les membranes cellulaires deviennent conductrices, et à des fréquences suffisamment élevées (> 100 kHz), l'impédance totale est composée d'une combinaison parallèle des résistances intracellulaire (symplastique) et extracellulaire (apoplastique).

Ainsi Zhang and Willison (1992) ont modélisé l'effet d'une congélation/décongélation sur des plants de carottes, par deux circuits différents. Le premier modèle décrivant des cellules végétales intactes contient deux interfaces (Figure 9 C) — la membrane plasmique et le tonoplaste — , alors que le second modèle décrit une cellule dont la membrane plasmique a explosé et ne possède donc plus qu'une seule interface (Figure 9 D)

On peut aussi modéliser ce phénomène de dispersion à travers les variations de la permittivité du milieu. Cela revient à décrire l'effet des tissus biologiques lorsqu'ils sont utilisés comme isolants, comme dans un condensateur. Puisque la permittivité est une grandeur intensive (qui ne dépend pas de la taille du système), son utilisation en modélisation permet de considérer

simplement des circuits distribués — caractérisés par un circuit élémentaire répété selon la taille du système. Ainsi, la permittivité est décrite par un nombre complexe :

$$\varepsilon = \varepsilon' - j\varepsilon'' = \varepsilon' - j\frac{\sigma}{\omega} \quad (12)$$

où ε' et ε'' sont des parties réelles et imaginaires de la permittivité (F.m^{-1}). D'une manière générale, ε' se rapporte à la fraction de l'énergie électrique qui est stockée dans les condensateurs, et ε'' à la fraction dissipée par conduction.

4.2.2. Application de la mesure de l'impédance aux systèmes racinaires

4.2.2.1. Rapide historique

L'exploration de l'utilisation de la mesure capacitive pour estimer la biomasse racinaire a débuté avec Oldřich Chloupek au début des années 1970. Ainsi, il mis au point une première expérience (Chloupek, 1972) dont le but était de quantifier des traits racinaires de plantes de différentes espèces — maïs (*Zea mays*. L.), tournesols (*Helianthus annuus* L.), colza (*Brassica napus* L.), avoine (*Avena sativa*. L.) et oignon (*Allium cepa*. L.) — toutes cultivées dans des pots remplis avec des substrats sableux ou argileux, portés à leur humidité maximum avant chaque mesure. L'auteur observa une relation linéaire entre la capacité électrique du système et la masse racinaire du système. Le montage électrique consistait en 2 électrodes, l'une placée sur la plante, et l'autre placée dans le substrat, les deux reliées à un appareil de mesure de capacité.

Dans des expérimentations ultérieures (Chloupek, 1977), le même auteur confirme cette relation empirique au laboratoire et en condition de plein champ sur ce panel d'espèces. De fortes corrélations entre la masse racinaire et la capacité furent observées, que ce soit au laboratoire sur des pommes de terre (*Solanum tuberosum*) ou au champ sur des tournesols

(*Helianthus annuus* L.). L'auteur conclut que cet effet capacitif est lié à la polarisation des cellules des tissus biologiques des racines (Schwan, 1959), et que le sol joue un rôle négligeable à cause de sa grande conductivité.

Plus tard, d'autres expérimentations sur des plantes (*Medicago sativa*) en situation de culture montrent que l'efficacité de la méthode capacitive diminue avec le développement des plantes et n'est plus fiable lorsque les stades jeunes sont dépassés (Kendall et al., 1982).

À partir d'expérimentations en milieu contrôlé (hydroponie), et en se basant sur quelques hypothèses concernant les dimensions caractéristiques des racines, Dalton (1995) formule la contribution de chaque racine à la capacité électrique totale du système racinaire.

Néanmoins, l'application au champ semble pourtant poser des difficultés (Preston et al., 2004), et il semble que les paramètres de la relation linéaire soient spécifiques aux espèces (Aulen and Shipley, 2012). De même, les observations au champ indiquent que la méthode est sensible à l'humidité du sol, cette dernière jouant un rôle prépondérant dans la variance inexplicée des relations. En étendant cette méthode de mesure sur une gamme de fréquences, l'exploitation du spectre obtenu en modélisant des systèmes électriques équivalents a permis d'isoler la réponse spécifique des racines (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005), réduisant ainsi pour partie l'impact du milieu de culture sur la variabilité des prédictions de biomasse racinaire. Malgré cet effort d'amélioration de la prédiction de biomasse, les paramètres de la relation linéaire entre biomasse et capacité électrique ne sont pas établis. Autrement dit, il n'existe pas de formule donnant les valeurs des paramètres de cette relation linéaire en fonction du système sol-plante mesuré, et il reste nécessaire d'effectuer des prélèvements destructifs pour les déterminer.

Dalton (1995) a introduit une représentation et une théorie expliquant l'influence de la biomasse racinaire sur la transmission du courant plante-sol et son effet sur la capacité mesurée. Longtemps admise, cette théorie a été remise en question récemment plus ou moins profondément (Ellis et al., 2013 ; Dietrich et al., 2012). Dans ce dernier cas, ce n'est plus la biomasse racinaire mais seulement la section des racines en contact avec le substrat de culture qui influe sur la capacité mesurée. Ces différents modèles sont présentés ci-dessous.

4.2.2.2. Le modèle de Dalton

Dalton (1995) introduit une théorie sur la relation linéaire expérimentale masse racinaire - capacité, en proposant un modèle électrique équivalent, à l'échelle d'une racine, pour une section élémentaire. L'auteur décrit un élément de racine comme un condensateur cylindrique, le conducteur interne étant la sève du xylème et le phloème — tissus du système vasculaire des plantes — le conducteur externe étant l'interface sol-racine. Les tissus parenchymatiques du cortex et de la stèle, entre le système vasculaire et l'épiderme, forment le matériel diélectrique (Figure 10 A). En calculant la capacité d'un tel condensateur, dans le cas où le rayon interne est petit devant l'épaisseur de diélectrique, et en ajoutant que la surface des racines est corrélée à leur masse — impliquant que le diamètre et la densité de masse des racines de plantes d'une même espèce soient peu variables, les variations de diamètres sont plus faible qu'un ordre de grandeur — l'auteur dérive une relation linéaire entre masse racinaire et capacité électrique.

Par ailleurs l'effet de position de l'électrode « plante » est évaluée et une longueur élémentaire de tige est ainsi identifiée comme une série de circuit RC mis en série. Sans donner de détails sur les hypothèses sous-jacentes à la conductivité des différentes structures

racinaires (conductivité du xylème par rapport conductivité du sol), l'auteur met l'accent sur l'importance d'avoir un sol humide, pour maximiser la surface d'interface sol-plante.

Une extension utilisant une analyse du spectre d'impédance (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005) a été proposée pour isoler l'impédance du système racinaire de l'impédance du sol, afin d'affiner la prédiction de masse racinaire.

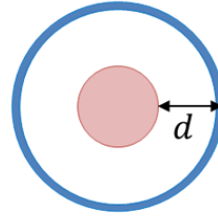
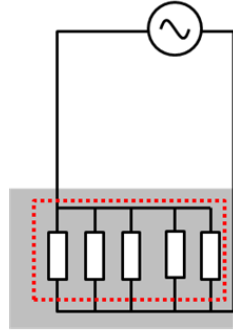
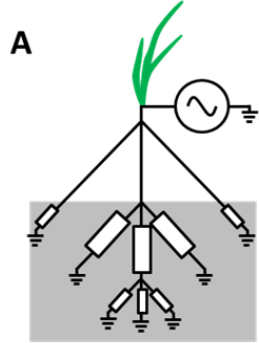
4.2.2.3. Le modèle d'Ellis et al.

Dans le modèle de Dalton (1995), le diamètre des racines entre en jeu dans le modèle électrique équivalent d'une racine, i.e. le condensateur cylindrique. Dans ses expériences, Dalton ne mesure pas ce diamètre et ne peut donc pas évaluer l'impédance d'un segment de racine, ni la permittivité des tissus qui le compose. Afin d'évaluer cette valeur de permittivité, et d'évaluer la théorie de Dalton, Ellis propose d'évaluer les corrélations entre la capacité, la longueur, la surface, et la masse chez le pois (*Vicia Faba*). Les auteurs introduisent un nouvel estimateur de la masse de racine, basé sur une relation empirique liant la longueur, la capacité et la masse volumique des racines (Figure 10 B). En appliquant le modèle des condensateurs cylindriques et à l'aide de mesures de diamètres, les auteurs parviennent à déterminer une valeur de permittivité des tissus racinaires satisfaisante ($\epsilon_r = 68$) au regard des permittivités de la cellulose ($\epsilon_r = 7,6$) et de l'eau ($\epsilon_r = 80$). Les auteurs concluent que la capacité électrique est un estimateur de la longueur racinaire, en précisant que la quasi-intégralité du système racinaire forme un système électrique interconnecté — appuyant ainsi l'importance d'avoir un sol humide.

Schéma électrique équivalent

Représentation électrique d'une racine

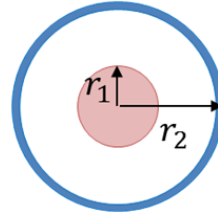
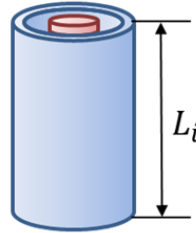
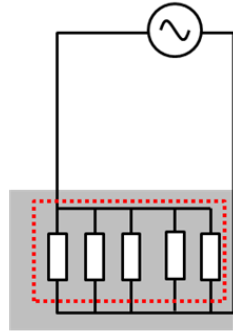
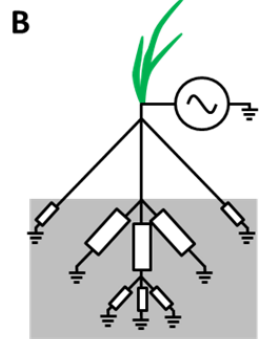
Capacité élémentaire et totale



$$C_i = \frac{\epsilon S_i}{4\pi d_i}$$



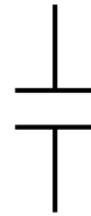
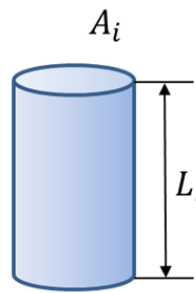
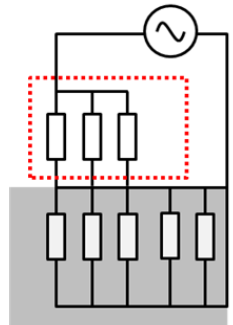
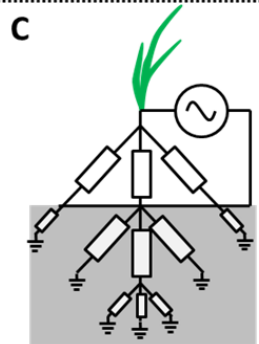
$$C \propto m$$



$$C_i = \frac{2\pi\epsilon L_i}{\ln\left(\frac{r_{i2}}{r_{i1}}\right)}$$



$$C = \frac{\alpha \rho^k}{LY}$$



$$C_i = \frac{\epsilon A_i}{d_i}$$



$$C = \left[\sum_i \frac{A_i}{L_i} \right]^{-1}$$

Figure 10. Récapitulatif des théories de l'effet capacitif des racines de Dalton (1995, A), Ellis (2013, B) et Dietrich (2012, C). Le schéma présente (de gauche à droite) le diagramme électrique équivalent, les rectangles blancs représentant des circuits RC parallèles, avec encadrée en rouge la partie du circuit équivalent sondée, le modèle électrique équivalent de la contribution élémentaire d'une racine ainsi que la formulation mathématique de la contribution élémentaire et la relation globale reliant les propriétés des plantes mesurées à la capacité électrique (C). La théorie de Dalton (1995, A) relie la capacité électrique totale (C) à la biomasse du système racinaire (m) et la contribution élémentaire d'une racine à la capacité électrique (C_i) à la permittivité relative du tissu racinaire (ϵ), à l'épaisseur du tissu racinaire d'un élément de racine entre xylème et la paroi externe (d_i) et à la surface extérieure d'un élément de racine (S_i). La théorie de Ellis (2013, B) relie la capacité électrique totale (C) à la longueur du système racinaire (L) et à la masse volumique moyenne des tissus racinaires (ρ) modulées par les facteurs correctifs γ et k . Dans cette théorie, la contribution élémentaire d'une racine à la capacité électrique (C_i) est fonction de la longueur d'un élément de racine (L_i), du rayon du xylème (r_{i1}) et du rayon d'une racine (r_{i2}). Enfin Dietrich (2012, C) formule la contribution élémentaire d'une racine à la capacité électrique comme une fonction de la section d'un élément de racine (A_i) et de la longueur de racine (L_i) entre l'électrode et une surface conductrice.

4.2.2.4. Le modèle de Dietrich et al.

Une théorie alternative a été formulée (Dietrich et al., 2012), à partir d'expériences menées sur des plantes cultivées en hydroponie. En mesurant l'impédance d'un système racinaire placé à différents niveaux d'immersion dans l'eau, ou en excisant les racines situées sous l'eau, Dietrich et al. (2012) constatent que l'impédance ne dépend pas de la quantité de racines immergées (Figure 10 C), obtenant ainsi des résultats opposés à des expérimentations antérieures (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005). À l'opposé des théories précédentes, les auteurs concluent que les racines immergées ne contribuent pas à la capacité du système.

Expérimentalement, il apparaît que la capacité mesurée est proportionnelle à la somme des sections des racines au niveau de leur contact avec la surface de l'eau. Ceci peut être expliqué par un modèle équivalent de condensateur plan, établi par les auteurs, où le milieu isolant est composé des tissus de la plante, et les armatures du condensateur plan sont formées par la pince en contact avec la tige de la plante et par l'intersection de la surface d'eau avec les racines.

Dans ce cas, l'efficacité de la relation biomasse – capacité mesurée pour l'estimation de masse racinaire reposerait sur l'existence d'une relation allométrique entre la masse de racine et le diamètre de la tige, comme dans d'autres espèces de graminées (Niklas, 1993). Cette nouvelle théorie (Dietrich et al., 2012) s'applique aussi aux plantes en pots lorsque le sol est humide (à capacité au champ) ; elle appuie ainsi que la capacité n'est pas un estimateur direct de la masse racinaire.

4.2.3. Implication pour les programmes de sélection variétale

Globalement, les propriétés électriques des tissus racinaires sont peu documentées (Zanetti et al., 2011), en particulier celles des racines fines, et il existe peu d'éléments pour déterminer la

contribution du xylème dans la conduction du courant dans une plante — pourtant cité comme conducteur interne par Dalton. Cette méconnaissance des propriétés électriques des tissus racinaires ne permet pas d'établir une théorie régissant les résultats issus des techniques de mesure d'impédance électrique destinées à détecter la biomasse.

Ainsi, trois théories s'opposent sur la partie du système racinaire sondée par ces techniques d'impédance électrique : les tissus localisés dans un milieu humide, et les tissus localisés dans un milieu sec. Dans ces deux cas, les théories ne quantifient pas l'effet d'un milieu partiellement humide, tels les milieux de cultures naturels. Une telle incertitude a des conséquences majeures sur l'application au champ de ces techniques d'impédance électrique. En effet, les conditions *in situ* sont caractérisées par une hétérogénéité du sol, que ce soit en termes de texture du sol ou d'humidité. De même, le stade de croissance est important, puisqu'il couple l'aspect humidité du sol — le sol ne s'asséchant qu'en milieu de saison — et distribution en profondeur des systèmes racinaires — les systèmes racinaires jeunes étant superficiels. C'est pourquoi le 3^{ème} chapitre de cette thèse portera sur la discussion des théories dans le cadre d'un suivi *in situ* de l'impédance sol-plante de blé à différents stades de développement et pour différentes conditions de milieu de culture (en particulier hydriques).

Dans un cadre de sélection de traits racinaires, ici la biomasse racinaire, ces techniques semblent donner des résultats spécifiques aux espèces (Aulen and Shipley, 2012), impliquant une calibration pour chaque culture, et aussi potentiellement spécifique à chaque type de sol. Malgré ces limitations, la méthode de mesure de capacité a été utilisée comme outil de sélection sur critère racinaire pour des cultures d'orge (Svačina et al., 2014) et de blé (Heřmanská et al., 2015), sans que la corrélation masse-capacité n'ait été testée au champ.

Au-delà du pouvoir de prédiction de ces techniques — en d'autres mots, de la qualité de la corrélation en impédance et masse racinaire — , leur sensibilité aux variations de biomasse

racinaire est rarement discutée, bien qu'il s'agisse d'un point crucial pour son utilisation en tant que capteur. Ainsi, l'optimisation du dispositif de mesure est capitale, autant pour assurer un outil fiable destiné à la sélection variétale que pour standardiser ces techniques d'impédance électrique. C'est pourquoi l'objet du 1^{er} chapitre du manuscrit sera de déterminer un montage optimal de mesure de ces techniques d'impédance électrique appliquées aux plantes.

Objectifs et résultats

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse qui fait l'objet des trois articles présentés ci-après, vise à développer des méthodes de phénotypage racinaire en champ, pour mesurer des traits intégrateurs, tels que la biomasse des systèmes racinaires, ou spatialisés comme les profils d'enracinement. Les méthodes choisies répondent aux contraintes du phénotypage au champ, les minirhizotrons étant non-invasifs et les méthodes électriques combinant les aspects non-invasifs et non-destructifs.

Les méthodes basées sur l'impédance électriques des plantes pour l'estimation racinaire n'ont été explorée qu'à de rares fois au champ. Un premier objectif consiste à améliorer la technique grâce à un travail méthodologique. Dans le but d'obtenir un outil permettant des comparaisons de biomasses racinaires, différents protocoles de mesure de l'impédance ont été évalués, afin d'optimiser la précision de l'estimation de la biomasse et la robustesse de la mesure face à différentes textures de sol.

Dans un même temps, les minirhizotrons modernes (endoscopes basés sur des scanners d'imprimantes, et non des caméras vidéo) ont rarement été utilisés pour caractériser in situ l'enracinement des cultures de blé, et notamment dans le cadre de comparaisons variétales. Ces travaux ont pour objectif d'évaluer la représentativité des mesures issues des minirhizotrons, et de juger de la pertinence des mesures de systèmes racinaires dans le cadre d'essais multi-stressés, et de leur éventuelle contribution dans le rendement obtenu.

Enfin, le dernier objectif consiste à appliquer cette méthode d'impédance à des plants de blé cultivés au champ, à plusieurs stades de croissance et dans conditions d'humidité du sol contrastées, afin de juger du modèle électrique équivalent à considérer afin d'obtenir des estimations racinaires fiables in situ.

Chapitre 1 : Analyse comparative des méthodes électriques pour l'estimation rapide de la biomasse racinaire

**François Postic
Claude Doussan**

Plant Methods, 2016

Ce premier chapitre, présenté sous forme d' article, vise à mettre au point le dispositif idéal de mesure électrique pour la détection de racines. Nos mesures ont été effectuées en suivant les recommandations de Dalton (1995), c'est-à-dire de porter les substrats à capacité au champ. Ces expérimentations en pots de faibles volume nous ont permis de déterminer quelle configuration de mesure — en termes de nombre de terminaux, électrode de contact à la plante, fréquence du signal, variable électrique — choisir pour obtenir le meilleur estimateur de masse racinaire que ce soit en terme de prédiction, ou de sensibilité. Sur les différents sols de culture, il apparait que la capacité électrique en parallèle est le meilleur estimateur de masse racinaire. Cet article a été publié dans *Plant Methods*.

METHODOLOGY

Open Access



Benchmarking electrical methods for rapid estimation of root biomass

François Postic^{1,2} and Claude Doussan^{2*} 

Abstract

Background: To face climate change and subsequent rainfall instabilities, crop breeding strategies now include root traits phenotyping. Rapid estimation of root traits in controlled conditions can be achieved by using parallel electrical capacitance and its linear correlation with root dry mass. The aim of the present study was to improve robustness and efficiency of methods based on capacitance and other electrical variables, such as serial/parallel resistance, conductance, impedance or reactance. Using different electrode configurations and stem contact electrodes, we have measured the electrical impedance spectra of wheat plants grown in pots filled with three types of soil.

Results: For each configuration, parallel capacitance and other linearly independent electrical variables were computed and their quality as root dry mass estimator was evaluated by a 'sensitivity score' that we derived from Pearson's correlation coefficient r and linear regression parameters. The highest sensitivity score was obtained by parallel capacitance at an alternating current frequency of 116 Hz in three-terminal configuration. Using a clamp, instead of a needle, as a stem electrode did not significantly affect the capacitance measurements. Finally, in handheld LCR meter equivalent conditions, capacitance had the highest sensitivity score and determination coefficient ($r^2 = 0.52$) at 10 kHz frequency.

Conclusion: Our benchmarking of linear correlations between different electrical variables and root dry mass enables to determine more coherent practices for ensuring a sensitive and robust root dry mass estimation, including in handheld LCR meter conditions. This would enhance the value of electrical capacitance as a tool for screening crops in relation with root systems in breeding programs.

Keywords: Wheat, *Triticum durum*, Root mass, Electrical impedance spectrometry, Capacitance, Terminal configuration, Contact electrode

Background

Higher cereal yield are needed to feed a growing population in the near future [1]. However, partly as a consequence of climate change, yield of cereals tends to level off in different parts of the world as crops are facing more often sub-optimal conditions (water, nutrients, temperature) for growth [2]. The root system is a central actor in alleviating stress when inputs are suboptimal or limiting [3] and, in such conditions, water/nutrient capture is directly linked to root distribution and activity in soil in relation with the temporal pattern of resource

availability. For example, depending on rainfall pattern, root proliferation in shallow soil layer may exhaust soil water too quickly before anthesis, detrimentally to yield, while deep rooting would be advantageous in capturing deep stored water at post-anthesis, and beneficial to yield [4–7]. Both modelling and field experiments showed that such a deep rooting could indeed increase or maintain grain yield for rainfed wheat [8, 9]. Nevertheless, regardless of the root distribution pattern, increase/decrease in root density and biomass would be a factor influencing yield, depending on the environmental conditions [6, 7]. Besides, the early vigour and growth of root systems also plays a major role in drought tolerance, as shown for barley [10]. Whereas high-throughput phenotyping is developing extensively [11, 12], especially on aerial parts,

*Correspondence: claudedoussan@paca.inra.fr

² UMR EMMAH, INRA, UAPV, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

Full list of author information is available at the end of the article

root system traits' estimation is still time-consuming, expensive in terms of manpower and highly destructive [13]. In the context of crop selection based on root traits, including greenhouse and field selection stages [14], fast techniques for root systems characterization are relevant and needed [15]. Fast imaging techniques [16] and methods based on the root electrical properties could shorten greenhouse selection stages, but at the cost of limited pot size and varying measurement reliability, respectively.

A linear correlation between root mass and electrical capacitance has been empirically found [17] and, later, an equivalent electrical model has been proposed [18]. The capacitance measurement has been tested for different plants under greenhouse condition, for different potting conditions: soil, potting mix substrates, hydroponics, pots of different sizes [19–24]. It has been argued that the correlation between capacitance and root mass comes from allometric relationships in hydroponics [25, 26]. However, such electrical measurements were also successfully experimented these last years in the field for root length density estimation [27] and root trait selection in wheat [28]. In addition, 3D capacitance tomography has been used as a root distribution probe in laboratory [29].

Only few studies [17, 22] were aimed at improving the efficiency, practicability and sensitivity of root biomass estimation with electrical methods. The response of electrical methods applied to soil can be affected by environmental factors (soil water content, temperature, salinity) [30]. However, for soil–plant applications of electrical methods, the optimal experimental setup of measurement remains to be determined: current frequency and voltage, the number of terminals, the electrode type and the electrical variable used as a root mass estimator.

In this study, we propose to (1) evaluate the correlation between root dry mass (RDM, in g) and parallel capacitance over a frequency range of 0.5–20,000 Hz, (2) measure the impact of electrode-stem contact on capacitance values, (3) measure the impact of terminal number on the coefficient of determination between root dry mass and capacitance, (4) compare different widely used electrical variables and (5) evaluate the accuracy of handheld equivalent LCR meter measurements.

Theory

Electrical parameters and equivalent RC circuits

In alternating current circuits, electrical impedance is an extension of the concept of resistance in Ohm's Law. Impedance is defined by two parameters, which are measured with an LCR meter: (1) the magnitude Z (equal to the ratio U/I , where U and I are the sinusoidal voltage and current amplitudes respectively), and (2) the phase angle θ (which expresses the phase shift between

sinusoidal tension and current or equivalently the time difference between the maxima of sinusoidal current and tension). The variation of these two parameters with respect to frequency is the impedance spectrum. Impedance Z^* is a complex number that describes the effect of the circuit on both the magnitude and phase of the electrical signal. In complex notation, impedance can be decomposed in its real (in phase) and imaginary (out of phase) part as follow:

$$Z^* = Z \times e^{j\theta} = Z \times \cos(\theta) + j \times Z \times \sin(\theta) \quad (1)$$

where $j = \sqrt{-1}$. However, other electrical descriptions can also be used, assuming that the equivalent circuit of the investigated system is serial or parallel. In the case of serial circuits, classical simple variables would be either the resistance R (Eqs. 2, 3) and reactance X (Eqs. 2, 4) which are respectively the real and imaginary parts of impedance (both in Ω), or expressed as elements of a serial RC circuit: the serial resistance R_s (in Ω , Eq. 6) and serial capacitance C_s (in farads, Eq. 7) of. All these electrical variables can be expressed as functions of Z and θ , as follow:

$$Z^* = R + j \times X \quad (2)$$

$$R = Z \times \cos(\theta) \quad (3)$$

$$X = Z \times \sin(\theta) \quad (4)$$

$$Z = R_s + \frac{1}{j \times \omega \times C_s} \quad (5)$$

$$R_s = Z \times \cos(\theta) \quad (6)$$

$$C_s = \frac{-1}{\omega \times Z \times \sin(\theta)} \quad (7)$$

$\omega = 2\pi f$ is the angular frequency, with f frequency of injected current.

In the case of parallel circuits, classical variables would be the conductance G (Eq. 10) and susceptance B (Eq. 11), both in Siemens, which are the real and imaginary part of admittance Y^* (inverse of impedance, Eq. 8, in Siemens), respectively. The parallel resistance R_p (in Ω) and parallel capacitance C_p (in farads) of the parallel RC equivalent circuit are given by Eqs. 13 and 14.

$$Y^* = \frac{1}{Z^*} = G + j \times B \quad (8)$$

$$Y = \frac{1}{Ze^{j\theta}} \quad (9)$$

$$G = \frac{\cos(\theta)}{Z} \quad (10)$$

$$B = \frac{\sin(\theta)}{Z} \quad (11)$$

$$\frac{1}{Z^*} = \frac{1}{R_p} + j \times \omega \times C_p \quad (12)$$

$$R_p = \frac{Z}{\cos(\theta)} \quad (13)$$

$$C_p = \frac{-\sin(\theta)}{\omega \times Z} \quad (14)$$

Each of these interlinked variables could be tested for a link with plant roots. For simplifying the choice and number of electrical variables to be studied in relation with plant roots, we consider only those that are neither equal nor proportional to each other. Thus, we can discard R which is equal to R_p , and B which is proportional to C_p .

Effect of injected current frequency

A classic RC parallel circuit (i.e. a circuit with a constant capacitor C and a constant resistor R in parallel) displays a constant value of C_p and R_p over the whole spectrum (i.e. with any test signal frequency). Likewise, a RC serial circuit (i.e. a circuit with a constant capacitor C and a constant resistor R in series) displays a constant value of C_s and R_s over the whole spectrum. These simple circuits can be described by one or two electrical variables that are constant with respect to frequency.

However, in complex systems like biological entities, the electrical variable measured can show frequency dependence (e.g., measured C_p varies with frequency). Such variations point to a more complex equivalent electrical circuit than a simple lumped RC circuit.

Furthermore, a non-linear behaviour of an electrical variable with frequency implies that comparison of two investigated systems is also frequency dependant. For example, if one uses an electrical parameter as an explanatory variable of the mass a plant root system, conclusions of comparative studies of two plants will depend on the frequency. A ratio of these two electrical parameters computed at a given frequency will differ from a ratio of these parameters computed at another frequency. As a consequence, measurements performed at different frequencies are not equivalent.

Electrode configuration in impedance measurements

Impedance measurements can be done with different electrode configurations, which are more or less sensitive to bias. Four-terminal (4T) sensing is a technique that eliminates the electrodes' contact impedance from measurement. This is achieved by separating pairs of current

injection electrodes (C1 and C2) and voltage-measuring electrodes (P1 and P2). However, most measurements on plants are performed in a two-terminal (2T) configuration, where current and voltage-measuring electrodes are merged, leading to C1–P1 and C2–P2 electrode patterns. This configuration is sensitive to contact impedance. Finally, an intermediate configuration with three terminals (3T) is made possible by merging a current electrode and a voltage-measuring electrode (e.g., merging C1 and P1), analogous to ground resistance measurement.

Methods

Soil and plant material

We used three soil types of contrasting textures: a silt loam (20.9 % sand, 53.3 % silt and 25.8 % clay), a loam (37.7 % sand, 48.7 % silt and 13.6 % clay) and a sandy loam (60.4 % sand, 26.6 % silt and 12.9 % clay). Plastic pots (12.5 cm × 12.5 cm × 22 cm) were filled with 2.5 dm³ of these air-dry soils, over a coarse sand and gravel layer for drainage. The field capacity of pots for the different potting substrates was estimated before sowing. Pots were watered with 500 cm³ of tap water. Three seeds of durum wheat (cv Isildur) were planted in each pot and the pots were transferred into a growth chamber maintained at 25 °C. Twenty-four hours after sowing, 100 cm³ of tap water were added. After emergence, plants were brought to a greenhouse. The pots were thinned to one seedling per pot about 1 week after emergence. In the course of plant growth, pots were weighted regularly (each 2–3 days) and water added to reach the estimated field capacity. Electrical measurements in pots containing silt loam soil were performed 15, 21, 30, 37, and 45 days after sowing, with 4, 2, 2, 2, 2 and 4 replicates, respectively. Measurements for pots containing loam and sandy loam substrates were performed 15, 30, 38 and 45 days after sowing, with 2 replicates for each sampling date. After electrical measurement completion, root systems were collected by carefully washing off the soil and collecting roots on 0.5 mm and 2 mm sieves. The roots were oven-dried at 65 °C for 24 h and their dry masses were precisely recorded on an electronic scale.

Measurement of the electrical impedance spectrum

Electrical impedance was measured with a SIP FUCHS III LCR-meter (Radic Research, Germany) at 26 logarithmically distributed, pre-programmed current frequencies, ranging from 0.5 to 20,000 Hz, with 1 V terminal voltage. This device enables measurements with 2 terminals (2T), 3 terminals (3T) and 4 terminals (4T) configuration. The electrical variables delivered by the SIP FUCHS III are the magnitude of impedance (Z) and the phase angle (θ).

Tests of different terminal configurations

This first experiment involved 30 wheat plants. Those plants were successively measured in 2T, 3T and 4T configurations. The electric circuit (Fig. 1) includes an alternating current source (electrodes C1 and C2 inserted into the plant and soil, respectively) and voltage was measured between electrodes P1 and P2. In each configuration, electrode C1, an alligator clamp with 15-mm clamp width, was placed on the stem and maintained precisely 5 cm above the soil surface, and 10 cm long bronze rods (diameter 1 mm) were used as soil terminal electrodes, inserted 3 cm deep into the potting soil. For 2T experiments, electrodes C1–P1 (plant) as well as C2–P2 (soil) were merged. Soil terminal electrode C2–P2 was positioned 8 cm away from the stem base. For 3T experiments, plant electrodes C1–P1 were merged, and soil terminal electrodes P2 and C2 were positioned 4 cm and 8 cm away from the stem base, respectively. Finally, for 4T experiments, the plant terminal electrode P1 was placed few millimetres above the soil surface, and the soil terminal electrodes P2 and C2 were positioned 4 cm and 8 cm away from the stem base, respectively.

Comparison between different electrode types

In a second experiment, 30 wheat plants were subjected to plant-electrode contact comparison. When stems were

high enough, a stainless steel alligator clamp with 15 mm clamp width and a 0.5 mm diameter stainless steel needle were successively used as plant contact electrodes for measurements. From those data, the relative difference ΔC_p between C_c and C_n , the parallel capacitances obtained with alligator clamp and needle, respectively, was calculated by $|C_c - C_n|/C_c$. To determine statistical significance of ΔC_p , the distributions of capacitances (C_n and C_c) were compared using the Wilcoxon signed-rank test, with an α error of 0.01.

Comparison between different potting soils

The third experiment involved 30 plants grown in pots filled with different soils (14 plants grown in silt loam, 8 in loam, 8 in sandy loam). The impacts of the three soil types on the coefficient of determination between root mass and electrical capacity have been compared.

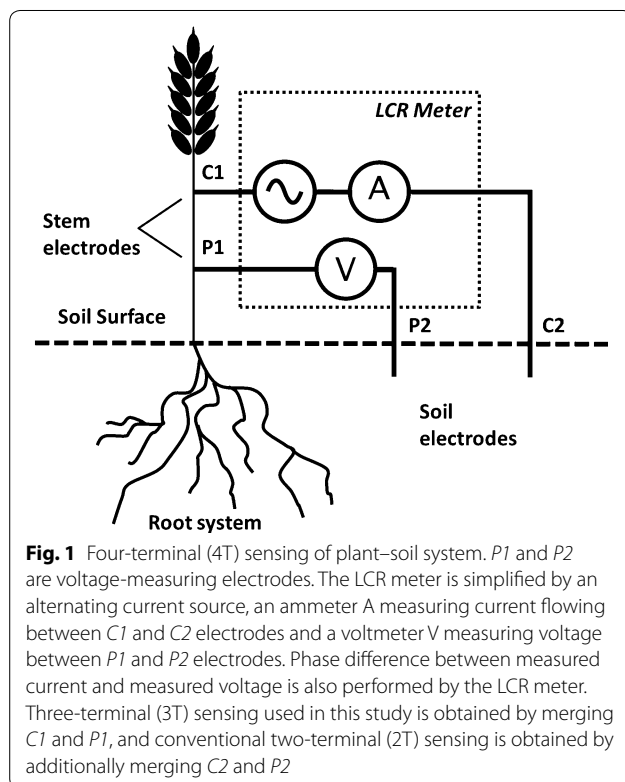
Electrical variables considered

For each measurement, magnitude (Z , in Ω) and phase angle (θ , in $^\circ$) of electrical impedance were obtained from SIP FUCHS III. From these basic complex parameters, different widely used electrical variable were computed [from Eqs. (4), (6), (7), (10), (13) and (14)]: Parallel capacitance (C_p , in F), serial capacitance (C_s , in F), parallel resistance (R_p , in Ω), serial resistance (R_s , in Ω), conductance (G , in S) and reactance (X , in Ω).

Quality ranking of root mass predictors

A linear correlation ($y = a RDM + b$) between root dry mass (RDM) and each electrical variable (y) has been calculated for each of the 26 measurement frequencies. Computations of linear model parameters (slope a and y -intercept b) and coefficient of determination r^2 were performed using Matlab ('nlinfit' routine). The maximum determination coefficient between an electrical variable and root dry mass is denoted as r_{max}^2 (dimensionless) and the corresponding frequency, f_{max} (Hz), is called 'maximum determination frequency'. Ideal sensors are designed to deliver a response proportional to the measurand [31]. This linear behaviour between input and output ensures: (1) a constant sensitivity free of saturation effects, and (2) a reduced static error, i.e. linearity prevents additional error issued from a conversion of non-linear input signal to linear output. With a constant sensitivity in the measurement range, a linear response will best allow the comparison between two measurements.

However, the determination coefficient r^2 is not a sufficient criterion for rating the efficiency of a root mass predictor. Another key criterion is the sensitivity to a variation of the estimated root mass. In other words, the ratio between two different root masses should ideally



equal the ratio of two measurements of an electrical variable. For linear correlation, it is equivalent to a negligible value of the ratio between interception and slope for a characteristic mass of root.

For two given root masses m_1 and m_2 , two measurements of an electrical variable are obtained (y_1 and y_2), thus:

$$\frac{y_1}{y_2} = \frac{a \times m_1 + b}{a \times m_2 + b} \tag{15}$$

For a given characteristic root mass, i.e. the order of magnitude of the average root mass measured, we can state:

$$m_1 = \alpha \times m_0 \text{ and } m_2 = \beta \times m_0 \text{ with } \alpha \approx 1 \text{ and } \beta \approx 1.$$

Thus Eq. (15) becomes:

$$\frac{y_1}{y_2} = \frac{\alpha + \frac{b}{a \times m_0}}{\beta + \frac{b}{a \times m_0}} \tag{16}$$

$$\text{If } \left| \frac{b}{a \times m_0} \right| \ll 1 \tag{17}$$

Equation (16) becomes: $\frac{y_1}{y_2} = \frac{\alpha}{\beta} = \frac{m_1}{m_2}$, which is the true ratio between the root masses. Thus, as shown in Eq. (17) when this ratio become close to 1 or is higher, the sensitivity of electrical variable is poor, and it makes the electrical variable unreliable for comparison of root masses.

In order to rank the electrical variables tested as predictors of root dry mass, we introduced a ‘sensitivity score’ s , calculated as follows:

$$s = \max \left(r_{\max}^2 \times \left(1 - \left| \frac{b}{a \times m_0} \right| \right); 0 \right) \tag{18}$$

where m_0 (in g) is a characteristic mass of dry roots, in our case $m_0 = 1$ g. The sensitivity score represents the accuracy of the comparison between measurements obtained from 2 plants, with the same order of magnitude of root dry mass (m_0). A maximum score ($s = 1$) means that the ratio between two measurements is equal to the ratio between two plants root mass. A minimum score ($s = 0$) means that only very large variations of root mass would be reliably estimated.

Literature data

Data that we could retrieve from prior experiments on the quantification of plant root biomass using electrical capacitance were compiled [18, 19, 22–25, 32]. Most of these experiments used C_p measured in a 2T configuration at 1 kHz for root biomass estimation. The growth media, the measured characteristic biomass of wet or dry roots, the parameters linear regression found between root biomass and C_p and the coefficient of determination were extracted

in order to computed their respective y -intercept:slope ratio (Eq. 17) and their ‘sensitivity score’ s (Eq. 18). The measured characteristic biomass of roots was roughly the median of root biomass measured in each experiment.

Results

Root mass

The harvested plants presented a root mass ranging from 0.02 to 0.72 g, with a mean value of 0.2 g and a standard deviation of 0.19 g. This reflects the fact that plants were harvested at different times and that they were relatively young (Additional file 1).

Frequency dependence of the parallel capacitance: root dry mass correlation

Determination coefficients from linear correlations between root dry mass and parallel capacitance are plotted in Fig. 2 as a function of frequency. The correlation between C_p and RDM is frequency-dependant. The same pattern occurs in 2T and 4T configurations (Additional file 2: Figure S1, Additional file 3: Figure S2). On average for the 3 soil types, the maximum determination value r_{\max}^2 ($p < 0.01$) between root dry mass (RDM) and C_p equals 0.787, and occurs at a maximum determination frequency f_{\max} of 116 Hz. In this configuration, the RDM (in g) relation with C_p (in nF) is:

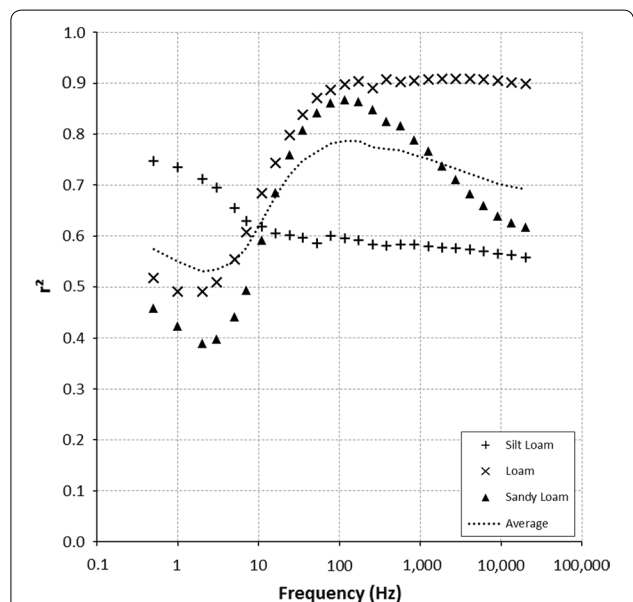


Fig. 2 Coefficient of determination (r^2) between root dry mass and parallel capacitance, as a function of frequency. The semi-log plot was obtained from measurements for a 3T configuration, a frequency range of 0.5–20,000 Hz (log scale). Plants were grown in silt loam (plus symbol), loam (times symbol) and sandy loam (filled triangle) soils. The black dots represent the average of the three soil types. The maximum determination frequency f_{\max} for average is 116 Hz

$$C_p = 4.2 \times RDM + 0.37$$

The magnitude of r^2 at f_{max} depends on the soil. Thus, at $f_{max} = 116$ Hz, the determination coefficient from the linear correlation between biomass and C_p in a loam soil reaches high value ($r^2 = 0.898$), while a silty loam soil has a lower maximum r^2 value of 0.595. In addition, each soil type displays different f_{max} value, in all terminal configurations.

Effect of plant electrode type: clamp versus needle electrode on average for the three soil types

The mean relative differences in parallel capacitance ΔC_p , between needle measurements and clamp measurements, are shown in Fig. 3. As a general trend, the relative difference ΔC_p tends to increase with the test signal frequency. The relative difference is <20 % over the range of 0.5–100 Hz and is ~6 % for low frequency 2T measurements. However, relative differences in 4T measurements exceed 20 % for frequencies over 100 Hz and peaks to 180 % at 1250 Hz. Nevertheless, 2T and 3T configurations exhibit a relative difference maximum of 50 %, down to 6 %, especially for 3T measurements in the frequency range of 0.5–172 Hz. Additionally, in 2T configuration, the relative difference was not statistically significant (p value >0.01) in the frequency range of 0.5–13,458 Hz.

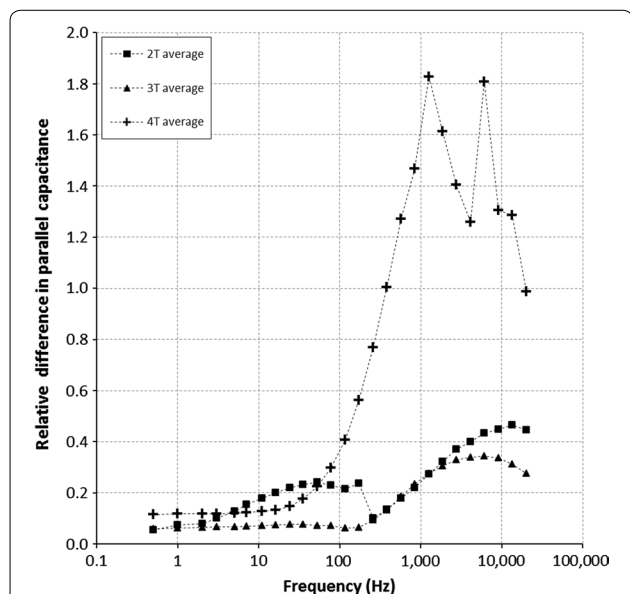


Fig. 3 Impact of the stem contact electrode on the measured electrical capacitance of the plant–soil system. Plot of the mean relative difference between the parallel capacitance measured with a clamp and that measured with a needle, as a function of frequency, in 2T (filled square), 3T (filled triangle) and 4T (plus symbol) configurations. Differences are <6 % for frequencies <200 Hz in 3T configuration

The same occurred for 3T and 4T configurations, but in the narrower frequency range of 0.5–381 Hz.

Performance of electrical variables for root dry mass prediction

Table 1 shows, for all the electric variables studied the sensitivity scores, maximum of coefficient of determination from the linear correlation with root dry mass and maximum determination frequency f_{max} averaged over the three soil types investigated. An exhaustive list of the regression parameters used for the s score calculations are given in Additional file 1 and illustrations of a good, moderate and low score are provided in Additional files 4, 5 and 6 respectively. Parallel capacitance C_p reaches a maximum r^2 value with RDM in 3T configuration (r^2_{max} 0.787), while it exhibits a slightly lower maximum r^2 value (r^2_{max} 0.771) in 2T configuration. In 3T configuration, all electrical variables display a r^2_{max} close to 0.7, except for the phase angle (r^2_{max} 0.331). However, f_{max} differs for all variables, ranging from 3 to 20,000 Hz in 2T, 116 to 20,000 Hz in 3T and 0.5 to 20,000 Hz in 4T configuration. Regarding sensitivity scores, the parallel capacitance C_p displays the best score in 3T configuration ($s = 0.717$), followed by serial capacitance C_s ($s = 0.688$) and conductance G ($s = 0.679$). For all variables except phase angle θ , sensitivity scores were higher in 3T than in 2T and 4T configurations. In general, our sensitivity score changes the ranking of electrical variables by their determination coefficient with root dry mass. In all terminal configurations, C_p , C_s and G exhibit the best sensitivity scores, especially in 4T measurement where R_p , R_s , Z and X scores are null, meaning that these variables are not reliable for root mass estimation.

Performance of terminal configurations for root dry mass estimation

The number of terminals is generally related to the coefficient of determination from linear correlations between electrical variables and RDM (Table 1). The 3T measurements exhibit the best r^2 values, while 2T measurements have slightly lower, yet close, r^2 values. Four-terminal configuration shows the worst determination of RDM, with $r^2 < 0.5$. Parallel capacitance (C_p), C_s and G maximum determination frequencies increase with the number of terminals. The 2T (see Additional file 2) and 3T measurements exhibit similar y -intercept/slope ratios of the linear regression, but lower than that of 4T measurements (see Additional file 3). This means that this latter configuration is less sensitive to the root biomass variations. Most of experiments relating root biomass and electrical capacitance in the literature were performed with handheld LCR meters in 2T configuration. Most of the time, the test signal frequency used is 1000 Hz, but 100 and 10,000 Hz

Table 1 Signal frequencies leading to the highest scores for electrical variable depending on the chosen terminal configuration

Electrical variable	Terminal configuration	Sensitivity score	r_{max}^2	f_{max} (Hz)
C_p	2T	0.71	0.771***	78
	3T	0.72	0.787***	116
	4T	0.45	0.560	566
C_s	2T	0.48	0.520**	3
	3T	0.69	0.754***	6094
	4T	0.28	0.353	20,000
R_p	2T	0.44	0.657***	78
	3T	0.53	0.797***	841
	4T	0.00	0.377	9056
R_s	2T	0.45	0.642**	9056
	3T	0.54	0.791***	4101
	4T	0.00	0.348	20,000
G	2T	0.52	0.585**	78
	3T	0.68	0.751***	4101
	4T	0.31	0.398	20,000
Z	2T	0.43	0.645***	78
	3T	0.53	0.795***	1857
	4T	0.00	0.357	1,3458
X	2T	0.46	0.653**	20,000
	3T	0.55	0.794***	6094
	4T	0.00	0.330	20,000
θ	2T	0.05	0.331	20,000
	3T	0.10	0.752***	20,000
	4T	0.26	0.374	0.5

The sensitivity scores, the maximum of the coefficient of determination with root dry mass (r_{max}^2) and the maximum determination frequency (f_{max} , in Hz), for parallel capacitance (C_p), serial capacitance (C_s), parallel resistance (R_p), serial resistance (R_s), conductance magnitude (G), impedance magnitude (Z), reactance (X) and phase angle (θ), in 2T, 3T and 4T configurations averaged for the three soil types studied

*** Linear regression is significant at the 0.01 level

** Linear regression is significant at the 0.05 level

frequencies are also available on LCR meters. Table 2 shows the results of our experiments close to these measurement conditions: frequencies considered are 116, 1250 and 13,458 Hz with 2T configuration.

Among electrical variables, parallel capacitance displays the highest sensitivity score ($s = 0.50$) of all variables at 13,458 Hz. Considering only determination coefficients, and thus ignoring the sensitivity, reactance reaches the highest coefficient of determination ($r^2 = 0.649$), this makes it the best choice. Interestingly, at 1250 Hz frequency, parallel capacitance reaches the highest sensitivity over all other variables. However its sensitivity score at 1250 Hz ($s = 0.46$) is lower than at 13,458 Hz ($s = 0.50$). This would

Table 2 Sensitivity scores for each electrical variable in conditions similar to the widely used LCR meters

Electrical variable	Frequency (Hz)	Sensitivity score	r^2
C_p	116	0.49	0.542
	1250	0.46	0.524
	13,458	0.50	0.605
C_s	116	0.10	0.119
	1250	0.29	0.331
	13,458	0.38	0.436
R_p	116	0.40	0.584**
	1250	0.45	0.635**
	13,458	0.38	0.599**
R_s	116	0.39	0.563**
	1250	0.44	0.615**
	13,458	0.44	0.639**
G	116	0.28	0.317
	1250	0.35	0.394
	13,458	0.45	0.502
Z	116	0.39	0.574**
	1250	0.44	0.628**
	13,458	0.41	0.622**
X	116	0.18	0.281
	1250	0.42	0.595**
	13,458	0.46	0.650**
θ	116	0.00	0.197
	1250	0.00	0.214
	13,458	0.03	0.267

The sensitivity scores, coefficients of determination with root dry mass (r^2), for each electrical variable in LCR meter conditions (test signal frequencies of 116, 1250 and 13,458 Hz, in 2T configuration). The highest sensitivity score is obtained by parallel capacitance (C_p) at 13,458 Hz

*** Linear regression is significant at the 0.01 level

** Linear regression is significant at the 0.05 level

make C_p measured at 13,458 Hz, the best choice in terms of sensitivity and precision for root biomass estimation in 2T configuration with handheld meters.

Effect of the growth media on root electrical relationship: data from literature

The sensitivity scores s obtained by previous studies are shown in Table 3 and the determination coefficients r^2 obtained in different growth media (including soils, potting substrates, hydroponics) are shown Fig. 4. The highest s and r^2 values are obtained in hydroponics ($s = 0.99$ – 0.64 , $r^2 = 0.99$ – 0.67), whereas artificial potting substrate (vermiculite, compost, sheep manure) had the lowest s values ($s = 0.30$ – 0.00). The experiments involving natural soils exhibited intermediate s values ($s = 0.51$ – 0.36), and strong r^2 values ($r^2 = 0.82$ – 0.50). Few data involve clay soils, while most studies focused on sandy to loamy soils.

Table 3 Compilation of linear regression parameters between parallel capacitance and root mass, and corresponding sensitivity scores from literature data

Publication	Species	Characteristic root mass m_0 (g)	$b/(a \times m_0)$	r^2	s	Growth media	Comments
Chloupek [17]	<i>Zea mays</i>	–	–	0.728	–	Sand	Dried
	<i>Allium cepa</i>	–	–	0.545	–	Sand	Dried
	<i>Helianthus annuus</i>	–	–	0.897	–	Sand	Dried
	<i>Avena sativa</i>	–	–	0.464	–	Clay soil	Dried
	<i>Helianthus annuus</i>	–	–	0.432	–	Clay soil	Dried
	<i>Brassica napus</i>	–	–	0.081	–	–	Fresh
Chloupek [37]	<i>Daucus carota</i>	–	–	0.514	–	Loam (field)	Fresh
	<i>Helianthus annuus</i>	–	–	0.566	–	Sand	Fresh
Kendall et al. [32]	<i>Medicago sativa</i>	0.2	0.03	0.50	0.48	Silt loam (field)	Dried
	<i>Trifolium Pratense</i>	–	–	0.67	–	Hydroponics	Dried
Dalton [18]	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	2	0.17	0.77	0.57	Hydroponics	Dried
van Beem et al. [24]	<i>Zea mays</i> L.	100	0.17	0.53	0.44	Loam (field)	Fresh
		5	1.33	0.73	0.00	Vermiculite	Fresh
Ozier-Lafontaine and Bajazet [23]	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	1	0.55	0.82	0.36	Clay loam	Dried
	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	1	0	0.99	0.99	Hydroponics	Dried
Aulen and Siple [19]	Herbaceous species	0.1	0	0.30	0.3	Compost	Dried
Dietrich et al. [25]	<i>Triticum aestivum</i> L.	1	0.32	0.75	0.51	Sand	Dried
Ellis et al. [36]	<i>Vicia faba</i> L.	10	0.48	0.31	0.16	Sheep manure	Fresh
Present study	<i>Triticum turgidum</i> L. ssp. <i>durum</i>	1	0.09	0.787	0.72	Silt loam, loam, sandy loam	Dried

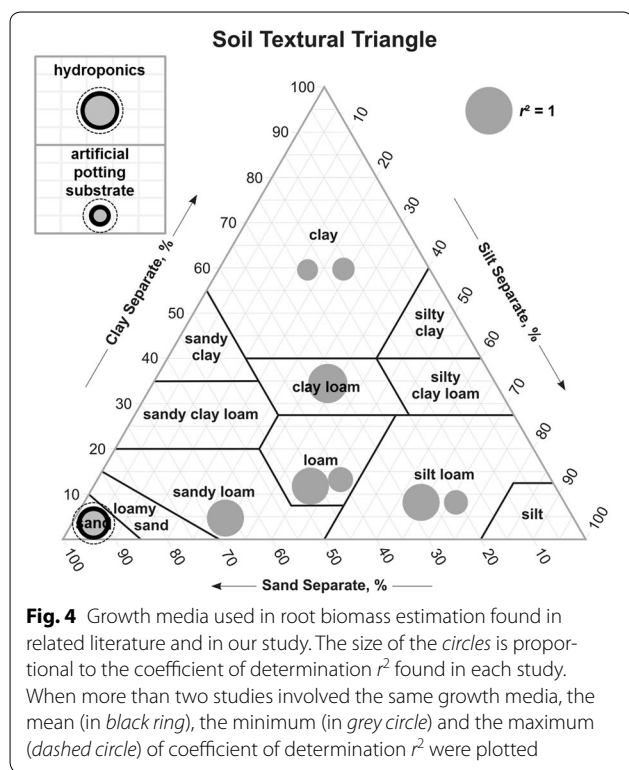
Discussion

This work shows that the accuracy of electrical variables used for predicting biomass is frequency-dependent. The best estimates were obtained within a specific frequency range, using parallel capacitance as a proxy for biomass estimator. Our experiments, like others from the literature, involve plant and soil electrical probing. In other words, soil electrical response is also measured and can interfere with plant response. Thus regarding the parallel capacitance, the frequency range where the r^2 values are low, may correspond to the frequency range where the soil electrical response is stronger than the plant electrical response. Soil texture induces variations of this frequency range (Fig. 2), supporting that the full electrical response spectrum is a combination of soil and plant responses. Furthermore, the frequency dependence of parallel capacitance implies that plant system cannot be simplified to a simple RC parallel circuit. In such circuit, C_p is constant over the whole frequency range. This implies that an electrical equivalent of plant–soil system is composed of several parallel RC circuits, exhibiting several relaxation times. This frequency dependence has also been reported on other plants than wheat, such as tomatoes [23].

Among factors affecting the electrical response of this soil–plant method, root type or soil conditions have been

shown to interact with the signal. Indeed, woody and non-woody roots may respond differently [33, 34] due to a difference in their inner root structure. Heterogeneity of the growing medium alters the electrical relation: non-homogeneous substrate (e.g. manure or compost) display the lowest coefficients of determination [19, 22, Fig. 4] and in a lesser extent, results may vary from hydroponics to real soils (Fig. 4), and from pot to field experiments [24]. Soil water content appears as the most influential environmental factor [25, 27, 32] and, consequently, as a major constituent in the reliability and accuracy of measurements when it varies. The soil water content effect was minimised in our study, since pots were adjusted at field capacity before measurements. However, this factor will undeniably add noise to the electrical relation if it is variable, particularly in the field [35].

In the range of low frequencies (<200 Hz), for plants like wheat, needle measurements only slightly differ from clamp measurements. This implies that the electrical current path is not mastered by the different contact types of these electrodes. Even if xylem is the best carrier of electrical current, it appears that stem impedance is small over the width of a clamp. Its additive effect on measured impedance is negligible in comparison with whole plant impedance. Furthermore, clamps are less destructive and more practicable than needles and could be preferred for



root capacitance measurements. At higher frequencies, needle and clamp measurements can exhibit discrepancies. This is particularly true for the 4T configuration, for which the relative difference between electrode types peaks at 180 %. 4T configuration is generally known for being more reliable. It eliminates contact impedance and enables precise measurements of impedance. Thus, the higher differences between needle and clamp measurements found with 4T, compared with 2T and 3T configurations in our experiment, could seem counter-intuitive. These larger differences found in 4T may have various causes.

Firstly, needle electrodes, implanted through the stem, are more invasive than clamp electrodes. Perturbation of the flow in the xylem can occur and modify the displacement of the electric charges between electrodes, creating a parasitic effect in the measured medium. This parasitic effect on the charge carrying medium is supported by the lower coefficients of determination with root dry mass found in 4T configuration.

Secondly, it has been shown that measured capacitance is very sensitive to electrode position on the stem [18, 36], in particular for electrode located close to the base of the stem. Our 4T configuration measurements involved electrode contact very close to the base of the stem (few mm). Thus a small deviation on the position of the electrode located at the base of the stem could imply a large difference in the measured capacitance.

In our experiments, 2T and 3T configurations are less sensitive to the stem electrode position. This electrode was located much higher (5 cm), and thus less sensible to a deviation on its position. In consequence, differences found between needle and clamp measurements in 2T and 3T configurations are much lower.

Depending on the type of terminal configuration, the measurements may be biased in different ways. For example, in 2T configuration, measurements could be biased by wire and contact impedance, while in 4T configuration, a more representative impedance, eliminating contacts and wire effects, of the device under test would be measured. The 3T configuration is an intermediate configuration, where only contact impedance of the plant electrode is involved. The lower correlations with root dry mass in 4T configuration than in 2T and 3T are probably due to plant electrode issues.

Finally, it appears that classical handheld LCR meter measurements could be revised in terms of frequency and electrical variable used. In the terminal configuration used by this kind of device, i.e. 2T configuration, C_p obtained the best sensitivity score at around 10 kHz. However, in these handheld LCR equivalent configurations, sensitivity scores obtained were significantly lower than sensitivity scores obtained with the optimal configuration, i.e. using a 3T configuration at 116 Hz.

As shown Table 3, hydroponics shows the best conditions for root biomass estimation using electrical C_p . This growth media exhibits an optimal contact with roots as well as homogeneity. In real soils, the root-medium contact is not controlled, the heterogeneity is greatly increased. This results in less precise root biomass estimations, but the electrical-root biomass relationship is still effective. This work enhances root biomass estimations under more representative conditions, by using various real soils instead of hydroponics, providing framework for agronomical relevant root studies.

Conclusions

In this study, we found that the estimation of wheat root biomass through electrical measurements would be more accurate when performed in 3T configuration with a 116 Hz frequency and using parallel capacitance as the electrical variable. With this measurement setting, low differences (6.7 %) were found when using clamp or needle as plant contact electrode. This result means that reliable measurements can be achieved by using clamps, which are more practicable and less destructive than needles through stem. We also found that a handheld LCR meter could result in better measurements when used at 10,000 Hz and measuring parallel capacitance, even though reactance obtained better determination coefficients from linear correlation with root dry mass. These

methodological optimizations strengthen the robustness of the electrical methodology to assess wheat root biomass and would be useful in pot studies and greenhouse/controlled conditions used in phenotyping. However, application to field trials requires the quantification of the impact of possible interfering factors. Our study was focused on a monocot crop grown in medium sized pots, measured during early growth stages with limited tillering and a moist soil. The electrical relations with root mass and our derived sensitivity score shall be tested with different species (particularly woody or non-woody species) and, more importantly, with contrasted soil water contents.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Sensitivity score details and linear regression parameters between root dry mass and each electrical variable. The table lists the maximum determination frequency (f_{max} , Hz), sensitivity scores, maximum of coefficient of determination with root dry mass (r_{max}^2), y-intercept of the linear regression (in standard unit of the related electrical variable) and slope (in standard unit of the related electrical variable per g) for parallel capacitance (C_p), serial capacitance (C_s), parallel resistance (R_p), serial resistance (R_s), conductance magnitude (G), impedance magnitude (Z), reactance (X) and impedance phase angle (θ) in 2T, 3T and 4T configurations, on average for 3 soil types.

Additional file 2: Figure S1. Coefficient of determination (r^2) between root dry mass and parallel capacitance, in 2T configuration. The semi-log plot of the determination coefficients (r^2) was obtained over a frequency range of 0.5 to 20,000 Hz (log scale), for plants grown in silt loam (+), loam (x), sandy loam (\blacktriangle), averaged for the three soil types (black dots).

Additional file 3: Figure S2. Coefficient of determination (r^2) between root dry mass and parallel capacitance, in 4T configuration. The semi-log plot of the determination coefficients (r^2) was obtained over a frequency range of 0.5 to 20,000 Hz (log scale), for plants grown in silt loam (+), loam (x), sandy loam (\blacktriangle), averaged for the three soil types (black dots).

Additional file 4: Figure S3. Illustration of a linear regression with high coefficient of determination and high sensitivity score s . Parallel capacitance measured at 116 Hz, rated as the best configuration obtained in this study. Data from plants grown in pots containing loam, measured in 3T configuration.

Additional file 5: Figure S4. Illustration of a linear regression with high coefficient of determination but low sensitivity score s . Due to its high r^2 , reactance measured at 20 kHz may turn out to be a good candidate, however its interception is largely greater than zero implying a lowered score. Data from plants grown in pots containing loam, measured in 3T configuration.

Additional file 6: Figure S5. Illustration of a linear regression with low coefficient of determination and low sensitivity score s . Low r^2 coupled with non-negligible intercept. Data from plants grown in pots containing sandy loam, measured in 3T configuration.

Authors' contributions

FP performed the experiments. FP and CD jointly conceptualized the study, analysed the data, and wrote the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ ARVALIS Institut du végétal, 75116 Paris, France. ² UMR EMMAH, INRA, UAPV, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France.

Acknowledgements

This work was supported by Grants from the FSOV (French fund for plant breeding number FSOV 2012) involving INRA and ARVALIS Institut du végétal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 March 2016 Accepted: 8 June 2016

Published online: 22 June 2016

References

1. FAO of the United Nations. Crop prospects and food situation. October (No. 3). Rome: FAO; 2014.
2. Brisson N, Gate P, Gouache D, Charmet G, Oury F-X, Huard F. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Res.* 2010;119:201–12.
3. Waines JG, Ehdaie B. Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Ann Bot.* 2007;100:991–8.
4. Zhan A, Schneider H, Lynch JP. Reduced lateral root branching density improves drought tolerance in maize. *Plant Physiol.* 2015;168:1603–15.
5. Passioura JB. Grain yield, harvest index, and water use of wheat. *J Aust Inst Agric Sci.* 1977;43:117–20.
6. Manschadi AM, Christopher J, deVoil P, Hammer GL. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Funct Plant Biol.* 2006;33:823.
7. Manschadi AM, Hammer GL, Christopher JT, deVoil P. Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil.* 2008;303:115–29.
8. Lilley JM, Kirkegaard JA. Benefits of increased soil exploration by wheat roots. *Field Crops Res.* 2011;122:118–30.
9. Ober ES, Werner P, Flatman E, Angus WJ, Jack P, Smith-Reeve L, et al. Genotypic differences in deep water extraction associated with drought tolerance in wheat. *Funct Plant Biol.* 2014;41:1078.
10. Bertholdsson N-O, Brantestam AK. A century of Nordic barley breeding—effects on early vigour root and shoot growth, straw length, harvest index and grain weight. *Eur J Agron.* 2009;30:266–74.
11. Araus JL, Cairns JE. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends Plant Sci.* 2014;19:52–61.
12. Comar A, Burger P, de Solan B, Baret F, Daumard F, Hanocq J-F. A semi-automatic system for high throughput phenotyping wheat cultivars in-field conditions: description and first results. *Funct Plant Biol.* 2012;39:914–24.
13. Trachsel S, Kaeppler SM, Brown KM, Lynch JP. Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant Soil.* 2011;341:75–87.
14. Wasson AP, Richards RA, Chatrath R, Misra SC, Prasad SS, Rebetzke GJ, et al. Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. *J Exp Bot.* 2012;63:3485–98.
15. Polomski J, Kuhn N. Root research methods. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, editors. *Plant Roots Hidden Half*. 3rd ed. Marcel Dekker NY Pub; 2002. pp 447–88.
16. Metzner R, Eggert A, van Dusschoten D, Pflugfelder D, Gerth S, Schurr U, et al. 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.* 2015;11:17.
17. Chloupek O. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biol Plant.* 1972;14:227–30.
18. Dalton FN. In-situ root extent measurements by electrical capacitance methods. *Plant Soil.* 1995;173:157–65.
19. Aulen M, Shipley B. Non-destructive estimation of root mass using electrical capacitance on ten herbaceous species. *Plant Soil.* 2012;355:41–9.
20. Cermak J, Radek U, Stranek Z, Koller J, Aubrecht L. Electrical measurement of tree root absorbing surfaces by the earth impedance method: 2. Verification based on allometric relationships and root severing experiments. *Tree Physiol.* 2006;26:1113–21.
21. Cseresnyes I, Rajkai K, Vozary E. Role of phase angle measurement in electrical impedance spectroscopy. *Int Agrophys.* 2013;27:377–83.

22. Ellis T, Murray W, Kavalieris L. Electrical capacitance of bean (*Vicia faba*) root systems was related to tissue density—a test for the Dalton Model. *Plant Soil*. 2013;366:575–84.
23. Ozier-Lafontaine H, Bajazet T. Analysis of root growth by impedance spectroscopy (EIS). *Plant Soil*. 2005;277:299–313.
24. van Beem J, Smith ME, Zobel RW. Estimating root mass in maize using a portable capacitance meter. *Agron J*. 1998;90:566–70.
25. Dietrich RC, Bengough AG, Jones HG, White PJ. Can root electrical capacitance be used to predict root mass in soil? *Ann Bot*. 2013;112:457–64.
26. Dietrich RC, Bengough AG, Jones HG, White PJ. A new physical interpretation of plant root capacitance. *J Exp Bot*. 2012;63:6149–59.
27. Nakhforoosh A, Grausgruber H, Kaul H-P, Bodner G. Wheat root diversity and root functional characterization. *Plant Soil*. 2014;380:211–29.
28. Heřmanská A, Středa T, Chloupek O. Improved wheat grain yield by a new method of root selection. *Agron Sustain Dev*. 2015;35:195–202.
29. Liao A, Zhou Q, Zhang Y. Application of 3D electrical capacitance tomography in probing anomalous blocks in water. *J Appl Geophys*. 2015;117:91–103.
30. Samouëlian A, Cousin I, Tabbagh A, Bruand A, Richard G. Electrical resistivity survey in soil science: a review. *Soil Tillage Res*. 2005;83:173–93.
31. Nyce DS. Linear position sensors: theory and application. Hoboken: Wiley-Interscience; 2004.
32. Kendall WA, Pederson GA, Hill RR. Root size estimates of red clover and alfalfa based on electrical capacitance and root diameter measurements. *Grass Forage Sci*. 1982;37:253–6.
33. Zanetti C, Weller A, Venetier M, Meriaux P. Detection of buried tree root samples by using geoelectrical measurements: a laboratory experiment. *Plant Soil*. 2011;339:273–83.
34. Cao Y, Repo T, Silvennoinen R, Lehto T, Pelkonen P. Analysis of the willow root system by electrical impedance spectroscopy. *J Exp Bot*. 2011;62:351–8.
35. Chloupek O, Dostál V, Středa T, Psota V, Dvořáčková O. Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. *Plant Breed*. 2010;129:630–6.
36. Ellis TW, Murray W, Paul K, Kavalieris L, Brophy J, Williams C, et al. Electrical capacitance as a rapid and non-invasive indicator of root length. *Tree Physiol*. 2013;33:3–17.
37. Chloupek O. Evaluation of the size of a plant's root system using its electrical capacitance. *Plant Soil*. 1977;48:525–32.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



**Chapitre 2 : Impact des systèmes racinaires de
différentes variétés de blé en conditions multi-
stressantes, mis en évidence à l'aide de
minirhizotrons à scanner**

**François Postic
Katia Beauchêne
David Gouache
Guillaume Meloux
Claude Doussan**

Ce deuxième chapitre s'intéresse à l'apport des minirhizotrons dans le cadre de comparaisons variétales pour des cultures de blé, en ce qui concerne la dynamique racinaire et la compréhension des variations de réactions face à des stress hydriques et/ou azotés. Les minirhizotrons modernes ont rarement été utilisés pour grande cultures, et ainsi, un essai agronomique a été mis en place à Gréoux-les-Bains en 2013–2014 et 2014–2015 sur 4 variétés de blé contrastées — comprenant un blé tendre, un blé dur, un blé synthétique et un blé hybride — cultivés sous 4 traitements différents (combinaison entre présence et absence de stress hydrique ou de stress azoté). La profondeur de sol de l'essai varie selon les situations, la zone irriguée et faiblement fertilisée ayant une faible profondeur de sol (cf. Figure S1 en annexe du chapitre 2).

Les résultats montrent que les minirhizotrons donnent des estimations biaisées de la masse racinaire superficielle (0–40 cm), mais semblent fiables pour les parties du système racinaire plus profondes (>40 cm). De plus, en conditions pluviales, les rendements obtenus sont positivement corrélés à la quantité de racines mesurée en profondeur.

Ce chapitre est un manuscrit formaté pour une pré-soumission qui suit les exigences du journal scientifique visé. Cet article a été soumis à *Field Crop Research*, qui demande d'intégrer une deuxième année d'expérimentation agronomique.

Scanner-based minirhizotrons evidenced the impact of root systems in various wheat cultivars under multi-stressed conditions

François Postic^{1,2,*}, Katia Beauchêne¹, David Gouache¹, Guillaume Meloux¹ and Claude Doussan²

¹ARVALIS Institut du végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75116 Paris, France.

²UMR EMMAH, INRA, UAPV, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France.

* Corresponding author: francois.postic@paca.inra.fr

Abstract

Adapting crops to climate change would greatly benefit breeding programs that can rely on root phenotyping tools in field conditions—and this particularly applies to wheat crops. Such in-field phenotyping necessitates the development of rapid and non-destructive measurement techniques for the screening of relevant root traits under sub-optimal conditions. In this study, we used scanner-based minirhizotrons to measure in situ the root length and volume densities of 4 wheat varieties, under 4 different growth conditions: irrigated and rainfed conditions coupled with optimal and sub-optimal N fertilization under a Mediterranean climate. These measurements were performed at 4 growth stages. For all the treatments, grain yield correlates with minirhizotron-based root surface density measured at anthesis ($r^2 = 0.48$). Irrigated and rainfed conditions led to contrasted relations between roots and grain yield: no correlation was found in irrigated plots, even if under rainfed conditions and sub-optimal fertilization, the higher yields were related to a higher root colonization of the deep soil layers ($r^2 = 0.40$). Shoot biomass was correlated to grain yield in irrigated conditions, but not in rainfed conditions. However, for the latter, the total root weight, the proportion of which being mainly located in the shallow soil layers, is not related to grain yield. We propose that high grain yield under stress condition are attained by a stress avoidance mechanism of the root system characterised by a higher root density in the deep soil layers. Thus, unlike shoot biomass measurements, scanner-based minirhizotron provides a essential tool to detect wheat genotypes with superior stress avoidance capability.

Keywords

Wheat, root, minirhizotron, drought resistance, nitrogen stress

Abbreviations

DOF – Depth of field Centimetres, cm

GY – Grain yield Tons per hectares, $t.ha^{-1}$

M_{h1} – Mean root mass of 10–20 cm samples from the central row Grams per metres squared, $g.m^{-2}$

M_{h2} – Mean root mass of 30–40 cm samples from the central row, $g.m^{-2}$

M_{h2i} – Mean root mass of 30–40 cm samples from the inter-row, $g.m^{-2}$

RDM – Total root dry mass density (auger and minirhizotron Tons per hectares, $t.ha^{-1}$

RDM_a – Root dry mass density from auger sampling Grams per metres squared, $g.m^{-2}$

RDM_m – Root dry mass density from minirhizotron data Grams per metres squared, $g.m^{-2}$

RLD – Root length density Millimetres per centimetres squared, $mm.cm^{-2}$

RLSD – Root surface length density, $mm.cm^{-2}$

R:S – Root to shoot ratio Dimensionless

SDM – Shoot dry mass Tons per hectares, $t.ha^{-1}$

SRL – Specific root length Metres per grams, $m.g^{-1}$

TRLSD – Total root length surface density, $mm.cm^{-2}$

$\mu_{1/2}$ – Median of the equivalent sampling thickness of minirhizotrons, m

ε – Equivalent sampling thickness of minirhizotrons, m

1. Introduction

Driven by a growing world population, cereal demand and production is predicted to increase by 30 to 50 % in 2050 relative to 2005 (Tilman *et al.*, 2011; Alexandratos and Bruinsma, 2012). Most of this increase is expected to come from an increase in yield and mostly from genetic improvement (Reynolds *et al.*, 2000; Langridge, 2005; Alexandratos and Bruinsma, 2012). However, climate change associated with increased uncertainty and variability in precipitations and increase of temperature challenges yield improvement. It is already the case in top producers of western Europe such as France where climate change, coupled with changes in agronomic policies, is identified in the contribution to wheat yield stagnation since 1995-1998 (Brisson *et al.*, 2010). Among climatic factors, spring droughts and high temperatures are the main abiotic stress that limits winter cereal crop productions. South and coastal regions of Europe could face a dramatic yield decrease caused by droughts during grain filling period, highly variable precipitation during spring and high temperatures during late spring (Iglesias *et al.*, 2012).

Concomitantly to climate change, intensive agricultural production is also faced to sustainability issues with increasing pressures on water resource and availability of fertilizers as well as environmental negative impacts.

More stressing conditions may impact large area in the future and there is a need to determine crop plant traits that would improve or maintain the yield. Historically, improvement of crops and agricultural techniques targeted on increasing shoot biomass and grain yield, while overlooking the root system in crop production. However, the root system ensures crucial functions, such as water and nutrient uptakes, and its role is determinant under limiting low inputs conditions (Waines and Ehdai, 2007; Herder *et al.*, 2010). The roots traits associated

in the efficient use of available water and fertilizers by crops, in possible variable deficit conditions, would be an important feature in the selection of the future phenotypes.

In relation with drought resistance, the roots traits can be identified at the vegetative or reproductive stages and defined from either local or global root system architecture (RSA) characteristics.

Crops differ in root system architecture and in water capture ability. A study showed that a straightforward factor that fit the whole root distribution is related to the efficiency in recovering water (Monti and Zatta, 2009). For example, the miscanthus concentrated top layers roots confer a higher efficiency in water use than sorghum, which root system is deeper.

In contrast, specific local traits, often measured on seedlings, such as the root angle can be also related to drought resistance, in generating a variable pattern of horizontal relative to vertical exploration of soil by roots (Manschadi *et al.*, 2008).

With the aim of identifying heritability and genetic determinants of root traits, mainly at relatively young stages, different types of root observation facilities have been developed in relation with high-throughput phenotyping requirements for modern breeding programs. Pot based experiment at the laboratory scale allow a high control of environmental conditions and repeatability with detailed investigations of the root systems through imaging techniques such as rhizo-ponics (Mathieu *et al.*, 2015), X-ray tomography (Mooney *et al.*, 2012), magnetic resonance imaging (Metzner *et al.*, 2015) or the growth and luminescence observatory (Rellán-Álvarez *et al.*, 2015). However, a major disadvantage of these techniques is that the container size has an effect on growth and the root phenes. On a greater spatial scale, but at the cost of development of heavy subterranean facilities, rhizolysimeters allow experiments with larger containers size that can be heavily equipped to monitor soil parameters and root development estimated with minirhizotron (Eberbach *et al.*, 2013).

However, in situ root development and functioning result from the expression of a myriad of genes triggered by interactions between the plant genome and the environment. Resulting from this G×E interaction, the screening of wheat root traits under controlled environment has been shown not always representative for field conditions (Watt *et al.*, 2013), which makes the genetic or molecular identification of beneficial root traits challenging for plant breeders. Field and soil environments are biologically, physically and chemically heterogeneous, that alter root growth response through plasticity of the root system. That is the case for the distribution of nutrients in the soil which affects the root distribution and, for example, shallow- or deep-distribution of nitrogen induces shallow- or deep-root systems (Sharma and Chaudhary, 1983).

Moreover, the interaction of multiple abiotic stresses in relation with roots functioning and development is rarely examined, particularly in the field, and most of the literature focuses on interaction involving temperature (Rich and Watt, 2013). For wheat, studies conducted under field and near-field conditions show that a water deficit induces a deeper rooting (Barraclough *et al.*, 1991). A low nitrogen fertilization can also induce a higher proportion of deep roots, especially when water table at seeding time is low (Kmocho *et al.*, 1957), while nitrogen fertilization increased the total root length by 30% (Barraclough *et al.*, 1991). Nonetheless, the combination of these two stresses—drought and nitrogen deficit—results in an overall lower root densities over the soil profile (Barraclough *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 2007).

Field-studies combine multiple interactions, with most of the soil environment being beyond control and a limited access to the quantification of occurring factors. Despite a lower control on growth conditions, such field-based studies are needed for identifying relevant root traits and are a necessary step for understanding the root system response to various soil conditions. Their major disadvantages lie in that they are labour and time expensive, mostly destructive, and affected by soil heterogeneity. For root quantification, soil coring, shovelomics (Trachsel

et al., 2011), and minirhizotrons (Maeght *et al.*, 2013) are the main techniques used. Beyond of their actual time-consumption, field sampling methods remain destructives, and can lead to oversized experimental installations (Polomski *et al.*, 2002).

Among existing sampling methods, minirhizotrons—an invasive, but not destructive techniques—allow the dynamic study of several root traits. This technique consists in observing roots in situ through a transparent tube inserted in the soil. Most minirhizotron applications used video recorders (BTX-100, Bartz Technology Company, Santa Barbara, CA, USA) capturing images of small surface area (4 cm²), which made the recording of a whole tube time-expensive and exposed to positional errors. As a recent technology, minirhizotrons can be now be imaged by a rotary scanner that captures 400 cm² images (CI-600, CID Bio-Science, Camas, WA, USA), so that the complete surface of a 20 cm long tube, with a 7 cm diameter, is obtained within a single scan. This better practicability could lead to an increase in the number of available observational data about plant roots. However, most root image processing softwares are not designed for images featuring a soil background, as found in the images from minirhizotrons. For example, beyond reported biases (Wang and Zhang, 2009), WhinRhizo—the most widely used software—features an automatic root detection conceived for white background images. Nevertheless, once roots are identified on the images, minirhizotrons allow rapid assessment of root diameter and root length, and thus, require less labour and time than other field-based techniques, particularly for deep root observation.

Minirhizotron studies based on this kind of large images obtain with a rotary scanner are few in the field of crop research. A rotary scanner minirhizotron was used in a prior study for evaluating the influence of tillage on wheat root system (Munoz-Romero *et al.*, 2010). With this technique, the authors obtained root data that successfully explained the higher rainfed

wheat productivity under no-tillage. However, to our knowledge, rotary scanner minirhizotron has not been yet employed to measure root systems of crops under nutrient- or water-stress conditions and the potential of this minirhizotron technique to screen for root characteristics remains unknown.

In this study, we propose to i) test a methodology to convert root length observed with minirhizotron into root mass found with standard auger sampling, ii) evaluate the root data in regard of the dynamics of physiological traits, iii) to examine the relevance of such minirhizotron measures of roots in multi-stress trial for various wheat cultivar.

2. Material and Methods

2.1. Localization of experiments

Field experiments were conducted in Gréoux-les-Bains, south-east France (43°7478 N, 5°8519E), on a heterogeneous Fluvisol with a silt Loam texture (Figure 1a). Located in the Mediterranean climatic region, the mean annual rainfall over the last 20 years is 650.3 mm (distributed as 32% in October–December; 18% in January–March; 28% in April–June; and 22% for July–September); the average annual potential evapotranspiration (PET) is 955.5 mm; and for temperature: mean annual temperature 12.68°C; average temperature of the coldest month 4.5°C; average temperature of the warmest month 21.8°C. The weather and temperature data (Figure 2) were obtained from a meteorological station located 700 m from the experimental plots. During the growth of winter wheat crop, sowing on 28th October 2014 and harvest on 01st July 2015, the cumulated rainfall was 539.7 mm while PET was 553.0 mm. The preceding crop on the trial site was durum wheat.

Electrical resistivity map of the experimental field is provided in Supplementary figure 1. Electrical resistivity correlates negatively with soil depth to the bedrock, thus low values denote deep soil (about 1–1.2 m), while high values correspond to shallow soil (0.4–0.5 m). Electrical resistivity data were produced using the Automatic Resistivity Profiling technique (Geocarta, France). The apparent resistivity was estimated down to 1.7 m and the position of plots was superimposed on this map. Estimations of the soil depth by coring coupled with the resistivity map indicated that the area of resistivity lower than 78 $\Omega\cdot\text{m}$ were deep soils area. The scale relating resistivity to soil depth is estimated as follows: 29–78 $\Omega\cdot\text{m}$ = 71–120 cm, 78–126 $\Omega\cdot\text{m}$ = 40–70 cm, 126–175 $\Omega\cdot\text{m}$ = 30–40 cm, and 175–275 $\Omega\cdot\text{m}$ < 30 cm.

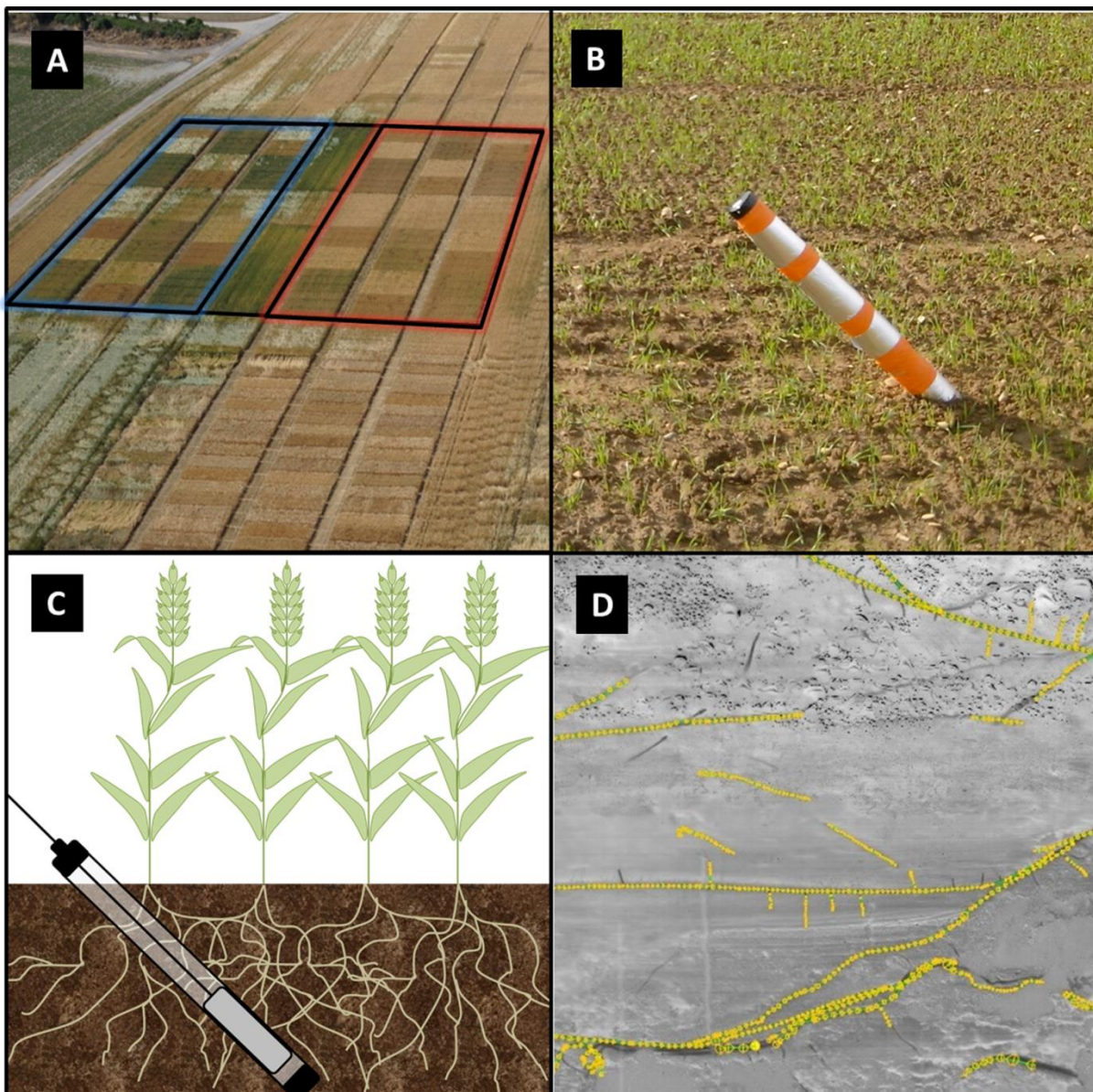


Figure 1. Illustration of in situ root measurements process. (a) Picture of the experimental field after anthesis. Irrigated plots are highlighted in blue, and rainfed plots are highlighted in red. (b) Picture of a minirhizotron installed after emergence. Covering thermal insulation material is maintained on the tube by orange tape. (c) Diagram of the minirhizotron principle. The clear plastic tube is inserted at a 45° angle, and root impacts on the tube are captured by a rotary scanner. (d) Screenshot of in-progress semi-automatic detection of root on captured images using Smartroot.



Figure 2. Plot of the weather data for the experimental period. From mid-October 2014 to mid-July 2015, monthly precipitations (mm) and ten days average air temperature (°C) are displayed. Over the experimental period, the cumulated rainfall was 537.9 mm.

2.2. Experimental design

The study took place over in 2014–2015. The winter wheat crops were submitted to contrasted water and N treatments including: optimal conditions: irrigation and N non-limiting (I^+N^+), irrigation with N limitation (I^+N^-), rainfed with N non-limiting (I^-N^+), rainfed and N limitation (I^-N^-). The precise N supply is described in the next section. The 4 wheat varieties were APACHE, HYSTAR, NOGAL (French elite bread wheats, *Triticum aestivum* L.) and MIRADOUX (French durum wheat, *Triticum durum* Desf.). The experimental design

was a randomized complete block with three replications. The area of each experimental plot was $9.5 \times 6.6 \text{ m}^2$.

2.3. Crop management

Wheat cultivars were sown in late October 2014 after ploughing (25 cm), and preparing the seed bed by disc harrowing and tilling with a vibrating tine cultivator. The four varieties were planted in 17.5 cm inter-rows at 300 grains per m^2 . During the wheat growing season, weed control was performed by aspersing four herbicides three times and fungicides were applied twice at flag leaf ligule and anthesis. Irrigation was applied on I^+N^+ and I^+N^- , six times totalizing 189 mm, while the rainfed plots received no irrigation. Nitrogen fertilizer application rates were designed accounting the differences in yield potential under drought conditions. Nitrogen fertilizer was applied at four different rates: I^+N^+ ($230 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, four applications); I^+N^- , ($100 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, two applications); I^-N^+ (150 kg ha^{-1} three applications) and I^-N^- (50 kg ha^{-1} , one application).

2.4. Shoot biomass and N measurements

Variations in shoot dry mass and nitrogen content of plants were determined at different growth stages. The growth stages of wheat were estimated using the Zadoks scale (Zadoks *et al.*, 1974) and destructive plant measurements were done at two unfolded leaf (Z12), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39), anthesis half-way (Z65) and ripening (Z91). Shoot biomass was sampled from a 0.70 m^2 area in each plot. Fresh and dry shoot mass were measured on an electronic scale and dry biomass was obtained by oven-drying at 80°C for 48h. Nitrogen content of shoot was performed by collecting two samples of plant material

from the 0.7 m² area. The level of nitrogen deficit was calculated with the nitrogen nutrition index (NNI, in %) for winter wheat (Justes *et al.*, 1994). The wheat grain yield (GY15, in t.ha⁻¹) was determined on 9.5 × 1.225 m² by using a combine harvester (ZURN 150).

2.5. Root measurements

2.5.1. Minirhizotron installation

Root imaging from minirhizotrons was performed with the CI-600 root scanner (CID Bio-Science, Camas, WA, USA), controlled by a laptop computer. The size of the recorded images was 21.59 cm × 19.56 cm, with a 300-dpi resolution (Figure 1d). Minirhizotron tubes were clear acrylic glass (PMMA) tubes of 2.0 m length, 6.3 cm inner diameter and 7.0 cm outer diameter. Minirhizotron tubes were inserted into the central sowing line of each plot, with a 45° angle, after plant emergence (Figure 1b). Soil drilling for tube installation was performed using a 7 cm diameter auger and a self-made 45° drilling frame. Tubes were inserted to a maximum vertical depth of 122 cm, depending on the gravel depth. The above-ground part of each tube was covered with thermal insulation foils, to prevent light, condensation and sun warming of the tube. Images were captured at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65).

2.5.2. Image processing of minirhizotron images

The images were processed using the Smartroot software (Lobet *et al.*, 2011): root length and root diameter were measured on every image (Figure 1d). Root length surface density along the tube (TRLSD, in mm.cm⁻²) was computed for each tube, according to their actual length over the tube surface area. The mean root length surface density profiles, for each wheat

variety and treatment, were obtained by averaging replicate RLSD profiles. Before averaging RLSD profiles, an interpolation was performed using a cubic Hermite spline in order to get the RLSD values at the same depths.

2.5.3. Auger sampling for root biomass

An auger (40 mm diameter) was used to collect two soil samples in the central row of each plot, and a third soil sample in the middle of the nearby inter-row at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65). Central rows were sampled at 10–20 cm and 30–40 cm depth, and inter-rows were sampled at 30–40 cm. Roots were washed from the soil for 10 min using a hydropneumatic elutriator, collected on 350 μm sieves, oven-dried at 70°C for 48h, and then weighted.

For each plot, the total root biomass from the surface to 40 cm depth was calculated by assuming biomass at 10–20 cm depth equals biomass from 0–10 cm and with linear interpolation of root biomass at 20–30 cm depth. The root dry mass density over 0–40 cm depth (RDM_a , g.m^{-2}) is estimated by:

$$RDM_a = 2 \times M_{h1} + \frac{M_{h2} + M_{h2i} + 2 \times M_{h1}}{4} + \frac{M_{h2} + M_{h2i}}{2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where M_{h1} is the mean root biomass (g.m^{-2}) of 10–20 cm samples from the central row, M_{h2} is the mean root biomass (g.m^{-2}) of 30–40 cm samples from the central row, M_{h2i} is the mean root biomass (g.m^{-2}) of 30–40 cm samples from the inter-row.

2.5.4. Conversion of root length surface density to root biomass

For converting root length surface density data from images to root biomass, we assumed that the soil volume sampled by the minirhizotron is a cylindrical shell. The inner radius of the shell is the tube outer radius and its thickness (ε) is the image depth of field of view of the scanner (Figure 3). This assumption implies that the root density measured in this soil volume sampled by the minirhizotron is the same as the root density measured in an extracted soil core.

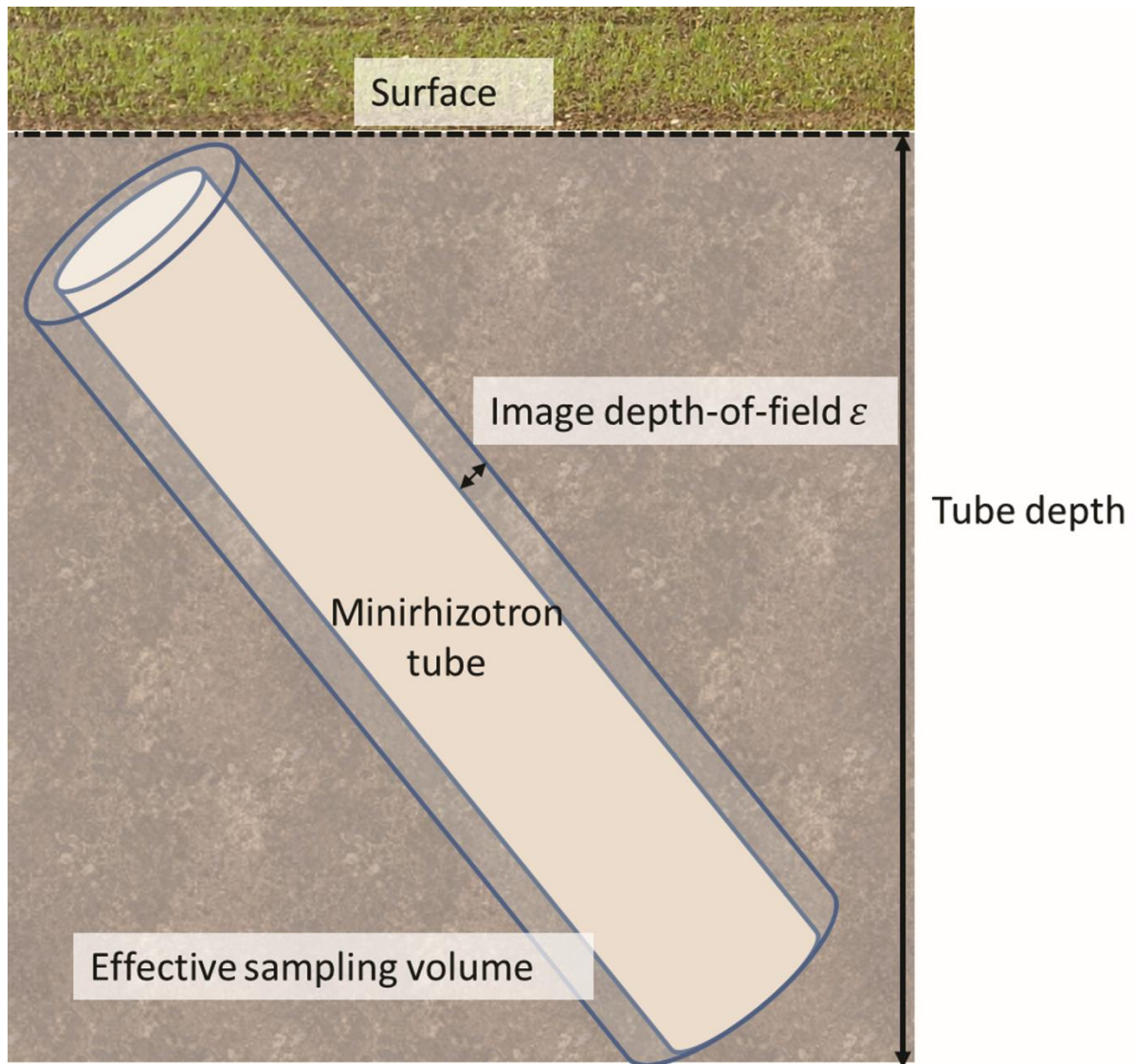


Figure 3. Principle of the conversion of root length surface density into root biomass. The minirhizotron tube is displayed in orange, surrounded by the effective sampling volume considered for the conversion of root length densities to root biomasses. This effective sampling volume, represented by a blue shade, is a cylindrical shell of inner radius equals to the tube outer radius and of thickness ε , *i.e.* the image depth-of-field acquired by the scanner-based minirhizotron.

Therefore, the relation between root length surface density measured over the minirhizotron surface ($RLSD$, in $\text{mm}\cdot\text{cm}^{-2}$) and root biomass (M_{root} , in $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) observed over the same soil

thickness (Δz , in m) for coring and minirhizotron tube, inserted into the soil at a specific angle (φ , in radian) is given by:

$$M_{root} = \frac{RLSD}{\varepsilon \times SRL} \times \Delta z \times \cos(\varphi) \quad (\text{Eq. 2})$$

Where SRL denotes the specific root length (m.g^{-1}). The values of the product $\varepsilon \times SRL$ —the conversion factor of root length into root mass—were obtained by using minirhizotron and soil sampling data of samples from soil layer at 30–40 cm depth. The median ($\mu_{1/2}$) value of the product $\varepsilon \times SRL$ is calculated using the mean specific root length observed in situ for winter wheat crops, *i.e.* $SRL = 180 \text{ m.g}^{-1}$ (Løes and Gahoonia, 2004).

Alternative approaches for converting root length surface density obtained by minirhizotron into equivalent cored values exist. A similar method of calibration used a zero intercept linear regression (Zhang *et al.*, 2008), instead of the distribution of conversion factors, while other approaches rely on on the maximum diameter of observed roots as DOF (Atkinson, 1985).

2.6. Root to shoot ratio

The root to shoot ratio (R:S) was calculated at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65) as the ratio between the total root dry mass (RDM, in t.ha^{-1}) and the shoot dry mass (SDM, in t.ha^{-1}). The total root mass was computed as the sum of the root biomass estimations by auger sampling (RDM_a , in g.m^{-2}), and the minirhizotron root length measurements converted into root biomass (RDM_m , in g.m^{-2}) (Eq 3). In order to prevent overlap of root data, only measurements of root length via minirhizotron deeper than 40 cm were considered.

$$RDM = RMD_a + RDM_m|z > 40\text{cm} \quad (\text{Eq. 3})$$

2.7. Statistical analyses

An analysis of variance (ANOVA) with a mixed linear effect model of grain yield (GY15), shoot dry mass (SDM) and root dry mass (RDM) was calculated using MATLAB. Genotype (G), nitrogen treatment (N) and irrigation treatment (I) were considered as fixed effect, and replicates were considered as random effect. The means of the minirhizotrons depth (due to soil depth variations) were compared using the Fischer's least significant difference test at 0.05 probability level. The correlations between the different root and shoot variables were computed with MATLAB, along with p -values of the slope of the regression line. Coefficient of determination values (r^2) were calculated using the squared Pearson product-moment correlation coefficient.

The $\alpha < 0.05$ confidence band for the median of the conversion factor ($\mu_{1/2}$) for RLSD to biomass ($\varepsilon \times SRL$) and for the mean of the root to shoot ratio (R:S) at the four growth stages, namely tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65), were computed using a non-parametric bootstrap with 100,000 paired sampled, drawn from the experimental pairs with replacement. The $\alpha/2$ and $1-\alpha/2$ quantiles of the bootstrapped distribution of $\mu_{1/2}$ and of R:S were considered for the limits of the confidence interval.

3. Results

3.1. Root length to biomass conversion factor and Root to Shoot ratio

The median value of the distribution of the root length to biomass factor ($\varepsilon \times SRL$) is $\mu_{1/2} = 0.61 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and the 95% confidence interval is [0.50, 0.73]. The distribution of the conversion factor ($\varepsilon \times SRL$), required to transform minirhizotrons data into equivalent root mass samples, from root data collected in the depth of 30–40 cm is shown in Supplementary figure 2. Assuming a SRL value of $180 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$ (Løes and Gahoonia, 2004), constant along the rooting depth (Zhang *et al.*, 2015), we estimate a depth-of-field of view ε of the scanner based minirhizotron equal to 3.5 mm, comprised between 2.8 and 4.1 mm for the 95% confidence interval.

With the median value of the conversion factor, the RLSD estimated by minirhizotron imaging is converted into root mass, and enables the calculation of the root to shoot ratio (R:S). The dynamic of the root to shoot ratio averaged over each sampled plot is presented in Figure 4. The R:S values decrease from 0.66, at tillering (Z25), to 0.13, at anthesis (Z65) with a dispersion that decreases from vegetative to latter stages (Z39, Z65). The obtained R:S values are close to the R:S ratio used in the APSIM model (McCown *et al.*, 1995) and show the consistency of the proposed root estimation approach.

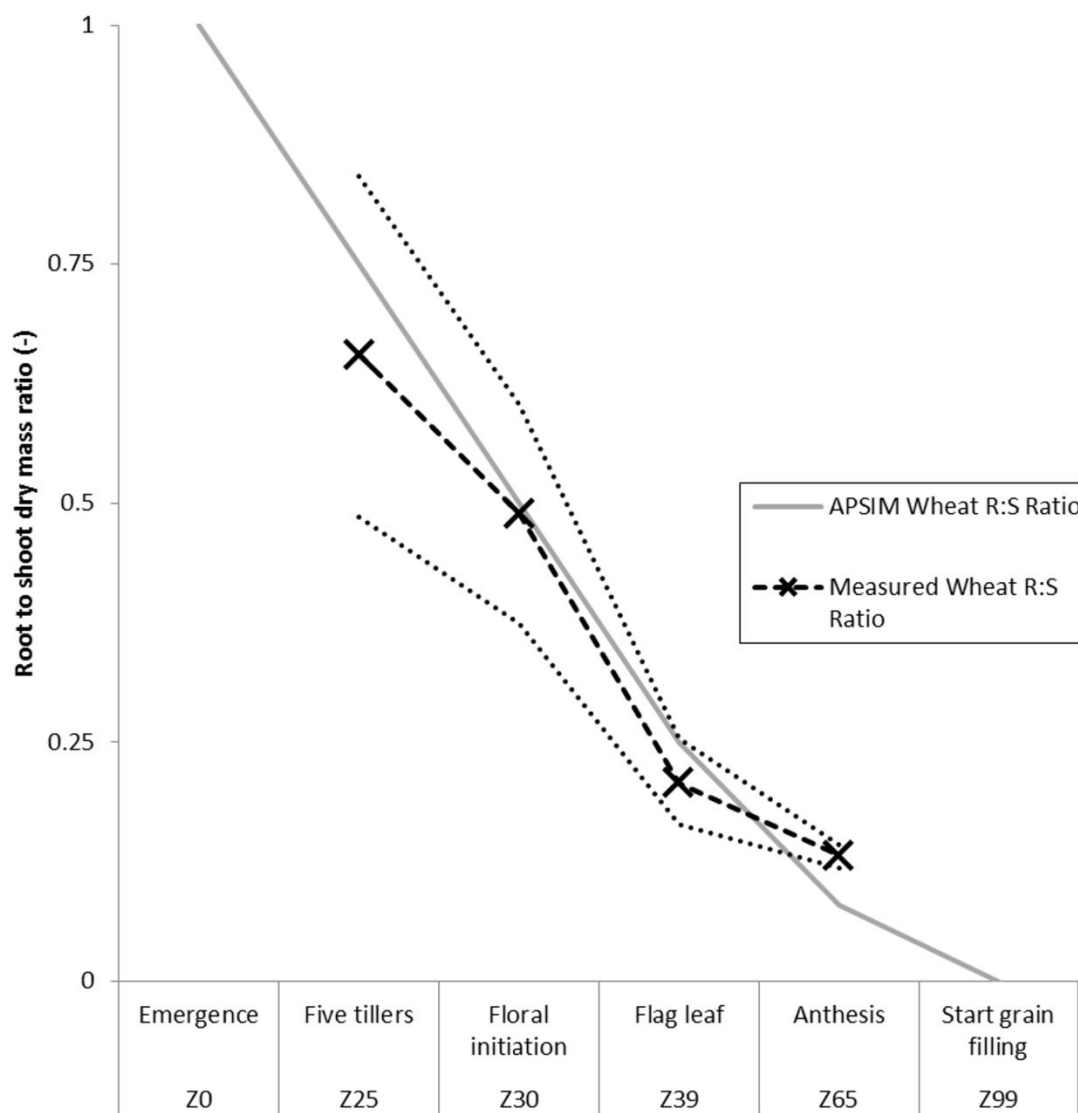


Figure 4. Dynamic of the root to shoot ratio obtained with minirhizotron. The root to shoot (R:S) ratio (x) obtained at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65) on average in the field trial is represented with the confidence interval at 95% level (dashed lines). The solid grey line is the R:S ratio used for modelling wheat growth in the APSIM model. Root biomasses result from the summation of the two different root sampling techniques, *i.e.* auger and minirhizotron sampling. The mean value of R:S ratio at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65) are 0.66 ± 0.17 , 0.49 ± 0.11 , 0.21 ± 0.05 and 0.13 ± 0.02 , respectively.

3.2. Root length surface density and grain yield

The correlation between grain yield and measured root length surface density average on the whole length of minirhizotrons tubes (TRLSD) is shown Figure 5. Grain yields range from 4.2 t/ha to 11.0 t/ha, and the TRLSD from 3.0 mm.cm⁻² to 12.6 mm.cm⁻², with the highest yields and the highest root length densities occurring in the irrigated plots. Grain yield increases with TRLSD ($r^2 = 0.48$, $p < 0.001$). This linear correlation considers only tubes located in a deep soil zone, the tube average depth equals 98 cm (further details for each treatment are shown in Table 3). All of the TRLSD measured in the shallow tubes are displayed on Figure 5 by red squares. Notably, all minirhizotron tubes of I⁺N⁻ group ($n = 4$) are shallow because of the limited soil depth, and all lie outside the $\alpha < 0.05$ confidence interval of the regression between average TRLSD and grain yield.

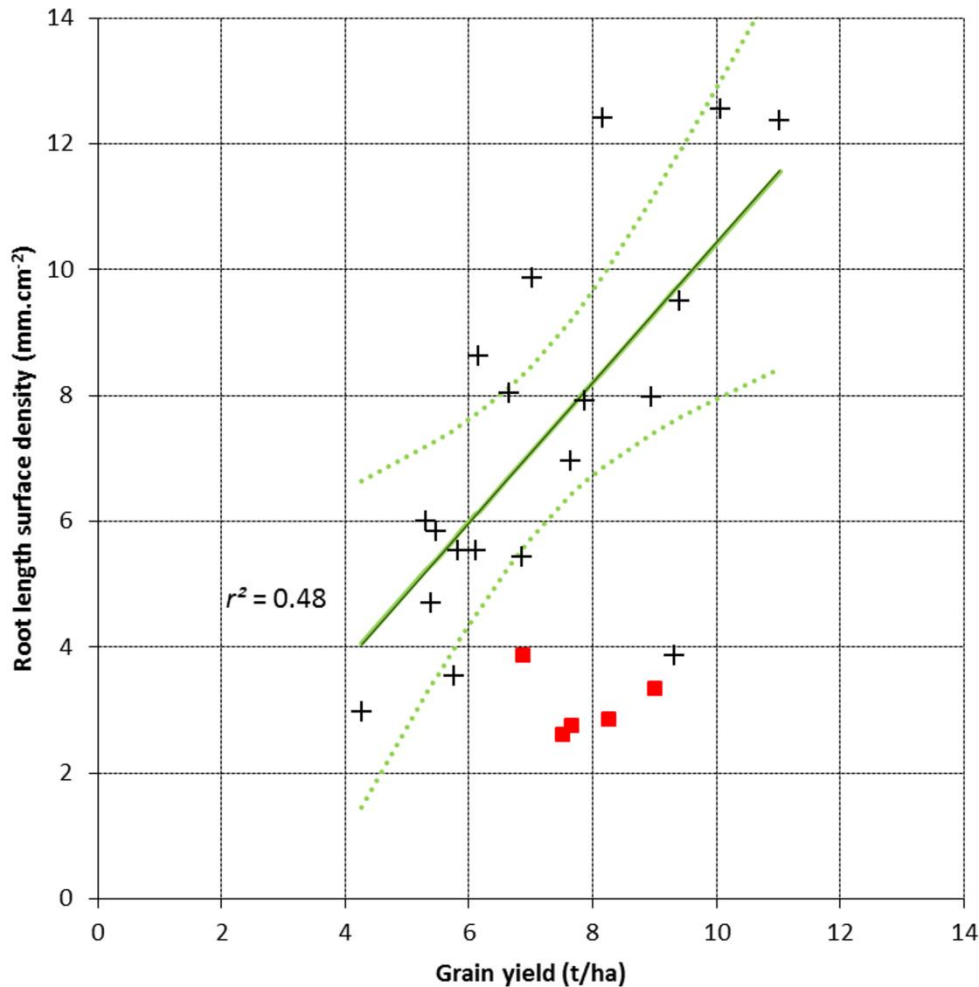


Figure 5. Correlation between grain yield ($\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$) and total root length surface density ($\text{mm}\cdot\text{cm}^{-2}$) at anthesis stage (Z65). Scatterplot and regression line with 95% confidence band are shown for deep minirhizotron tubes (depth $> 40\text{cm}$, $n = 19$) are shown. Data of the shallow minirhizotron tubes (depth $< 40\text{cm}$, $n = 5$) are displayed as red dots and were not considered in the regression. The equation of the regression line is $y = 1.1x - 0.7$.

3.3. Impact of different N and water treatments

Table 1 display grain yield, and values at anthesis (Z65) of shoot dry mass, root dry mass, and root to shoot ratio. Data are the average of 3 plots in the case of grain yield and 2 plots in the case of SDM, RDM and R:S. In irrigated conditions, average grain yields range from 9.32

t.ha⁻¹ to 8.16 t.ha⁻¹ in I⁺N⁺ and I⁺N⁻, respectively, while in rainfed conditions, average grain yields is lower and range from 5.62 t.ha⁻¹ to 6.67 t.ha⁻¹ in I⁻N⁺ and I⁻N⁻, respectively.

Table 2 shows the results of the analysis of variance (ANOVA) performed on grain yield (GY15), and shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM) and root to shoot ratio (R:S) measured at anthesis (Z65). The ANOVA was performed on these variables for the whole experimental field (shallow soil conditions included), and the different irrigation treatments (irrigated conditions and rainfed conditions). A significant effect on grain yield of the irrigation treatment, the genotype and interactions between fertilization and irrigation (both p -value < 0.001) is revealed. Fertilization has no significant effect on grain yield, unlike shoot dry mass, root dry mass and R:S ratio (p -values < 0.01). ANOVA results from rainfed conditions show a statistically significant effect of fertilization on grain yield and R:S ratio (p -value < 0.001 and <0.01, respectively), while no significant effect has been found on shoot dry mass and root dry mass. In addition, a significant interaction of genotype \times fertilization on root dry mass and R:S ratio (p -value < 0.001 and <0.01, respectively) is evidenced in rainfed conditions.

Table 1. Treatments effect on root and shoot variables at anthesis. The table shows the plot means values at anthesis of shoot dry mass (SDM, t.ha⁻¹), root dry mass (RDM, t.ha⁻¹) and root to shoot ratio (R:S, dimensionless), and the plot means values of the grain yield (GY15, t.ha⁻¹) at harvest.

Treatment	Genotype	GY15 (t.ha ⁻¹)	SDM (t.ha ⁻¹)	RDM (t.ha ⁻¹)	R:S (-)
I ⁺ N ⁺	Miradoux	8.79	10.53	1.56	0.15
	Apache	9.04	10.85	1.24	0.11
	Hystar	10.33	11.84	1.67	0.14
	Nogal	9.12	11.02	1.48	0.13
Mean I ⁺ N ⁺		9.32	11.06	1.49	0.13
I ⁺ N ⁻	Miradoux	7.12	8.22	0.88	0.11
	Apache	8.31	8.21	0.96	0.12
	Hystar	9.87	9.75	0.91	0.09
	Nogal	7.34	8.32	1.08	0.13
Mean I ⁺ N ⁻		8.16	8.62	0.96	0.11
I ⁻ N ⁺	Miradoux	4.91	8.30	1.13	0.14
	Apache	5.19	9.89	1.10	0.11
	Hystar	6.26	9.24	1.05	0.11
	Nogal	6.14	9.25	0.80	0.09
Mean I ⁻ N ⁺		5.62	9.17	1.02	0.11
I ⁻ N ⁻	Miradoux	5.79	7.50	0.91	0.12
	Apache	7.17	9.06	1.39	0.15
	Hystar	7.65	8.26	1.29	0.16
	Nogal	6.06	8.42	1.25	0.15
Mean I ⁻ N ⁻		6.67	8.31	1.21	0.14

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of the treatments on the measured variables (Yield: GY15, Shoot dry mass at anthesis: SDM, Root dry mass at anthesis: RDM, Root/shoot ratio at anthesis: R:S) for the 4 different treatments.

Treatment		GY15 (t.ha ⁻¹)	SDM (t.ha ⁻¹)	RDM (t.ha ⁻¹)	R:S (-)
Source of variance	Fertilization	NS	**	**	**
	Irrigation	***	NS	NS	NS
	G×N	**	NS	**	.
	G×I	.	.	.	***
	N×W	***	*	***	***
irrigated conditions	Genotype	*	NS	**	NS
	Fertilization	NS	*	*	NS
	G×N	NS	NS	*	.
rainfed conditions	Genotype	NS	.	NS	*
	Fertilization	***	NS	.	**
	G×N	*	NS	***	**

. p<0.1
 * p<0.05
 ** p<0.01
 *** p<0.001

Variation of Nitrogen nutrition index (NNI), mean root length surface density over minirhizotron tubes (TRLSD) and the depth the bottom of the minirhizotron tubes between the four (water, nitrogen) treatments is shown Table 3. NNI of N deprived treatments (I⁺N⁻ and IN⁻) are not significantly different, but differ from other treatments resulting in 3 different groups (Fischer test, $p < 5\%$). When excluding the zone of shallow soil of minirhizotron installation, excluding the I⁺N⁻ treatment, the other treatments do not differ in terms maximum depth of minirhizotron tubes. Mean root length densities over the minirhizotron depth were analysed at anthesis (Z65) only for those tubes of sufficient depths. The average TRLSD measurements at anthesis range from 4.3 mm.cm⁻² to 9.5 mm.cm⁻², similar to TRLSD measured in a previous experiment (Munoz-Romero *et al.*, 2010).

Table 3. Statistical analysis of the soil-related variables for the 4 different treatments. The table shows the plot mean values of the nitrogen nutrition index (NNI, %) at flag leaf ligule (Z39) and at anthesis (Z65) stages, and the minirhizotron tubes mean values of the root length surface density (TRLSD in, mm.cm^{-2}) and the maximum insertion depth (cm). Standard errors are presented in parentheses, and the sample size is denoted by n . Values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$).

	NNI 20/04/2015 (Z39)		NNI 10/05/2015 (Z65)		TRLSD (mm.cm^{-2})		Depth of minirhizotron tubes (cm)	
	Mean	n	Mean	n	Mean	n	Mean	n
I ⁺ N ⁺	1.19 (0.17) c	8	1.25 (0.13) c	8	9.5 (3.0) a	7	95 (16) a	7
I ⁺ N ⁻	0.84 (0.16) a	8	0.85 (0.23) a	8	-	-	-	-
I ⁻ N ⁺	0.98 (0.13) b	8	1.03 (0.12) b	8	4.3 (1.6) b	4	96 (21) a	4
I ⁻ N ⁻	0.77 (0.09) a	8	0.70 (0.05) a	8	7.2 (1.8) ab	8	106 (15) a	8

3.4. Variation and dynamics of the RLSD under the different water, N treatments

The RLSD profiles of Apache and Miradoux cultivar in I^+N^+ , IN^+ and IN^- treatments, at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65) are shown Figure 6 and Figure 7. In the case of Apache cultivar, differences in RLSD profiles between treatments appeared at stem elongation stage, which started on March 24. At flag leaf ligule stage, RLSD profiles are close to their maximal total root length occurring at anthesis. All RLSD profiles display a decrease of root density on the top soil layers. Similar biases were reported on graminaceous species (Gregory, 1979; Upchurch and Ritchie, 1983; Merrill *et al.*, 1987), and in our 45° angle oriented tubes, the bias is probably due to the illumination of the top of the tubes, as observed in prior experiments (Munoz-Romero *et al.*, 2010). Compared to the IN^+ treatment, I^+N^+ and IN^- treatments result in higher values of RLSD in the deep layers of soil (> 60 cm). Root length surface density profiles for I^+N^+ displays a maximum at 88 cm depth and then a decrease, whereas RLSD profiles at IN^- show a continuous increase over the length of the minirhizotron tubes.

RLSD profiles of the durum wheat cultivar Miradoux (Figure 7) display a different RSA. Similarly, the root system is less developed under IN^+ than under other conditions, especially in the deep soil, the highest value reached under 40cm depth being 4.5 mm.cm^{-2} . In contrast, no continuous increase of RLSD occurs in I^+N^+ , and the differentiation between treatment rises early as tillering (Z25).

The two other cultivars were measured under extreme opposite conditions (*i.e.* I^+N^+ and IN^-). Their RLSD plots are displayed in supplementary 3 and 4. The Hystar cultivar—a hybrid wheat of bread wheat Apache ascent—is comparable to Apache rooting pattern under the both treatments. On the opposite, the Nogal cultivar—a synthetic wheat—shows two different patterns, similar to Apache cultivar under I^+N^+ and related to Miradoux cultivar under IN^- .

The superposition of the 4 RLSD profiles under IN^- conditions is presented in Supplementary 5.

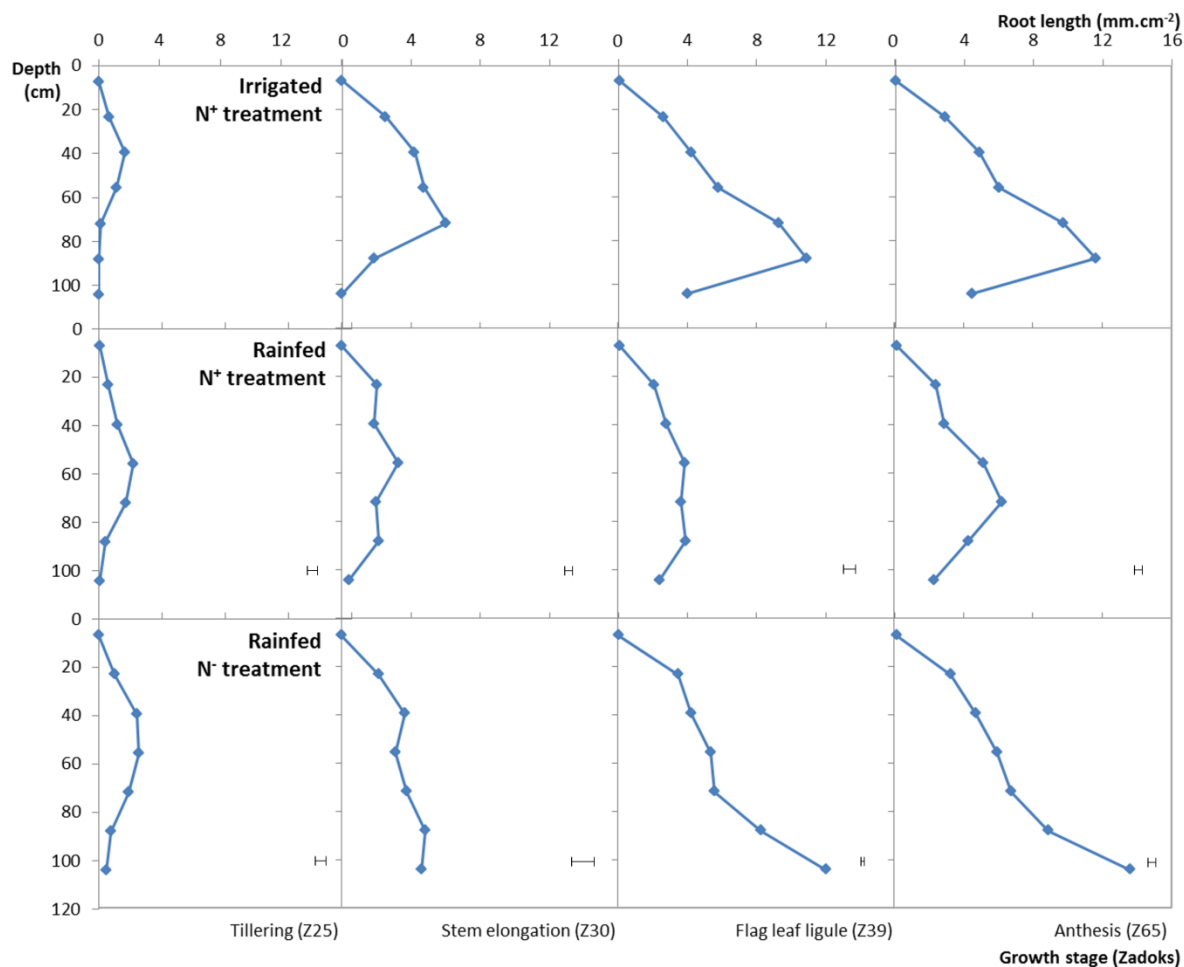


Figure 6. Treatments effects on the root length surface density profiles dynamic of the Apache bread wheat. The mean RLSD profiles (mm.cm^{-2}) of Apache wheat cultivar are shown at tillering (Z25), stem elongations (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) stages, with bars representing the median variation of RLSD. Fertilised plots in rainfed conditions (IN^+) display shallow root profiles, whereas IN^- plots exhibit a root system deeper developed. The latter yielded 1.9 t.ha^{-1} more than its counterpart under IN^+ conditions.

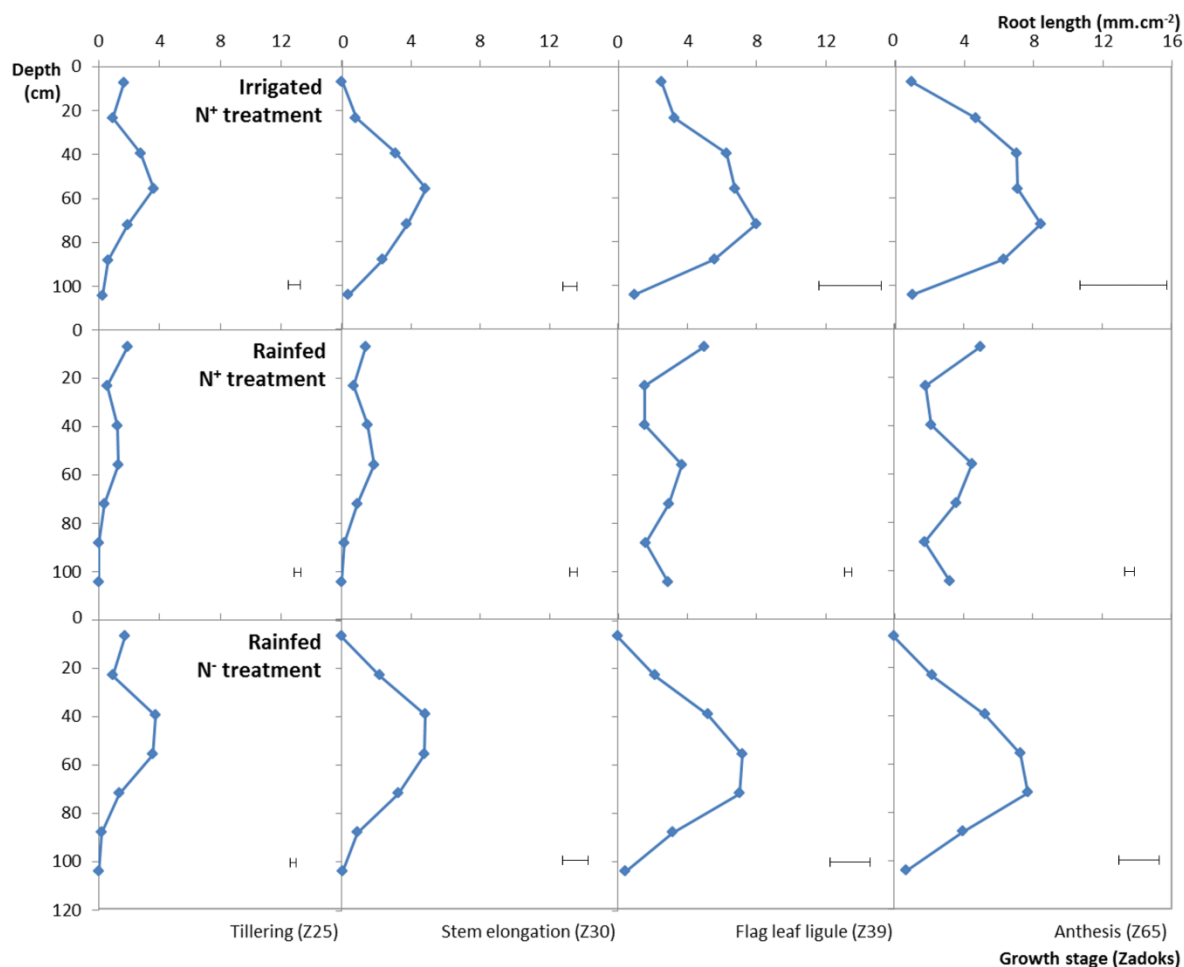


Figure 7. Treatments effects on the root length surface density profiles dynamic of the Miradoux durum wheat. The mean RLSD profiles ($\text{mm}\cdot\text{cm}^{-2}$) of Miradoux wheat cultivar are shown at tillering (Z25), stem elongations (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) stages, with bars representing the median variation of RLSD. Globally, root profiles obtained under all conditions are shallow, their maximum of RLSD occurring before 80 cm depth followed by a rapid decrease. At harvest, the mean grain yield difference between I^{N^+} and I^{N^-} is $0.92 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, smaller than the one obtained for the bread wheat Apache cultivar.

3.5. Allometric relation between plant traits

Figure 8 shows the relations between different plant traits at anthesis, including grain yield. Irrigated and rainfed conditions data are separated for regression. Coefficient of determination between yield and shoot dry mass (SDM) is $r^2 = 0.6$ in irrigated conditions, while no

correlation arises ($r^2 = 0.02$) from plots in rainfed conditions (Figure 8a). Similarly, shoot dry mass (SDM) and root dry mass (RDM) show a correlation in irrigated conditions $r^2 = 0.46$ which breaks down in rainfed conditions ($r^2 = 0.00$, Figure 8b).

Root dry mass (RDM) and grain yield are correlated neither in irrigated conditions nor in rainfed conditions (Figure 8c). In opposite, total root length surface density (TRLSD) is highly correlated to grain yield in rainfed conditions ($r^2 = 0.41$) unlike plots in irrigated conditions ($r^2 = 0.02$, Figure 8d).

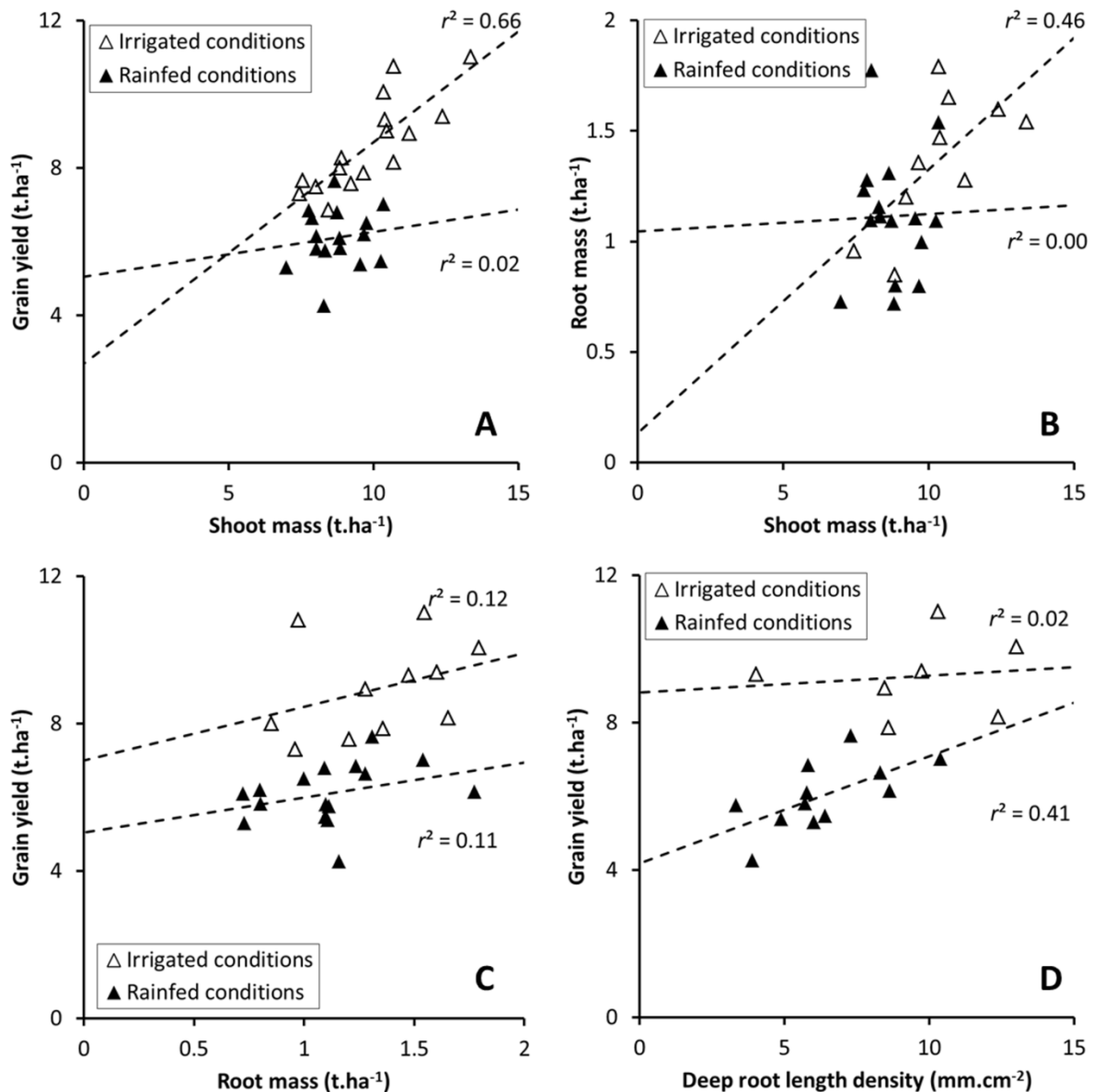


Figure 8. Relations between aerial traits and underground traits. Correlations between shoot mass ($t \cdot ha^{-1}$) and grain yield ($t \cdot ha^{-1}$) (a), shoot mass ($t \cdot ha^{-1}$) and root mass ($t \cdot ha^{-1}$) (b), root mass ($t \cdot ha^{-1}$) and grain yield ($t \cdot ha^{-1}$) (c), deep root length density ($mm \cdot cm^{-2}$) and grain yield ($t \cdot ha^{-1}$) (d), at anthesis (Z65), in irrigated (Δ) and rainfed (\blacktriangle) conditions. Determination coefficients are displayed on top right corner for irrigated and middle right for rainfed conditions. Since no correlation can be found between grain yield and shoot biomass under rainfed conditions, grain yield cannot be assessed from plant aerial characteristics before harvesting. In contrast, deep root length surface density is highly correlated to grain yield in rainfed conditions.

4. Discussion

4.1. Minirhizotron methodology reliability

The conversion of the minirhizotrons data to actual root mass is a complex problem, and the most straightforward solution is to consider an equivalent sampling volume. In our case, the conversion factor value proposed in our study appears to be in agreement with the depth-of-field previously estimated (Johnson *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008) at 2–3 mm. We found a close depth-of-field value ($\epsilon = 0.35$) using the mean SRL value for winter wheat crop cultivars (Løes and Gahoonia, 2004). However, SRL may vary with N soil content and genotype. Since it was not specifically measured, our estimation of DOP could be biased: higher values of SRL would lead to smaller DOP, and vice versa.

The heavy-tailed skewedness distribution of the conversion factor (Supplementary 2) is a result from the outliers in the RLSD measurements or from the auger sampling of root mass, producing high values of $\epsilon \times SRL$. Thus, the median of the distribution is preferred to the mean in order to have a statistic robust to outliers.

The model used for the root biomass profile in the shallow soil layers was affected by strong assumptions. We assumed that the root biomass profile is fitted by a sigmoid, which was approximated by 3 continuous affine functions. This estimated root biomass profile, coupled to minirhizotron measurements led to R:S values in the range of previous observations (Chaudhuri *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001; Allard *et al.*, 2013) at anthesis in different growth conditions. Moreover, the evolution with time of this R:S ratio is closely related to the R:S ratio used in crop growth modelling (Keating *et al.*, 2003) (Figure 4).

Our methodology differs from previous studies, by being less prone to the influence of outlying values. A common way to estimate this type of conversion factor is the use of a linear regression without y -intercept between minirhizotron data and gravimetric sampling

data. However, linear regressions are not robust to outliers, and coupled with the loss of accuracy linked to the imposition of zero intercept, are not informative about the dispersion of this conversion factor. A robust linear estimator, as the Theil-Sen estimator used in agrophysics (Fernandes and G. Leblanc, 2005), could solve the issues related to outliers, but not concerns about the y-intercept. The bootstrapping of the distribution of the individual conversion values has intrinsically a zero intercept, and allows the computation of a non-parametric confidence interval. Hence, this methodology does not rely on assumption on the normality of the error, and hence is more suited for this type of calibration.

In spite of these advantages, this methodology could be challenged by the variations of the SRL found variable among cultivars, among growth conditions (Løes and Gahoonia, 2004; Nakhforoosh *et al.*, 2014), *i.e.* not constant as we assumed. As a consequence, our R:S values are only estimations. Nevertheless, the major contribution of the root mass is given by the top layers root system, reducing the weight of the error on the estimation of root mass obtained by RLSD conversion of minirhizotron data.

It appears that bias recorded in the shallow soil layers is a major issue linked to this minirhizotron technique, and a special attention must be provided. Aluminium tapes could have partially prevented illumination. A solution could consist in adding a large amount of soil at the base of tube, and ensuring that plants centimeters around near tube base are anchored. Globally, a deep soil— at least 90 cm— is required for the usage of this technique.

Presently, the major bottleneck of the technique resides in the absence of automatic image processing. Even if accurate algorithm exists for washed roots imaged with flat scanners, they appears not suited for minirhizotrons images, as the heterogeneity of the background—the time-varying hue of the soil around the tube—prevents simple segmentation of roots. Nevertheless, minirhizotrons allow repetitions of sampling without apparent field destruction,

thus give access to fine dynamics, as rooting speed, or senescence after anthesis. Moreover, the large volume of sampling zone of scanner-based minirhizotron confers a relatively high accuracy.

4.2. Effect of multifactorial stress on grain yield and root system

Water was found as the principal limiting factor, as yield gaps (Δ GY) due to the different irrigation treatments were larger than gaps due to nitrogen treatments (Table 1). Nonetheless, the combination of nitrogen and water stress occurring at successive times produced indeed a positive effect on grain yields, yields in ΓN^- were higher than yields in ΓN^+ . The stresses due to water limitation occurred on early April, while deficiency in nitrogen took places on early January, contrasting with the yields obtained by a permanent severe drought coupled with nitrogen deficiency (Barraclough *et al.*, 1989).

This counter-intuitive effect of multi-stress conditions is not related to bad evaluation of nitrogen input (Sharma and Chaudhary, 1983), as supported by the NNI data—NNI of N- plots was <0.9 whereas NNI of N+ plots was >0.9 (Table 2) —, even if rainfed conditions display a significantly lower shoot nitrogen content.

The root growth measured with minirhizotrons followed a coherent with environmental factors dynamics, differences in RLD profiles arose when environment began to differ, *i.e.* at the beginning of nitrogen stress, at early Z30. Root measurement performed with minirhizotrons showed that, at anthesis, root systems were deeper in ΓN^- , than in ΓN^+ , which is actually an effect opposite to the consequence of a permanent severe water and nitrogen stress (Barraclough *et al.*, 1989).

Moreover, the yield gaps (Δ GY) between multi-stressed conditions (ΓN^-) and optimal conditions ($\Gamma^+\text{N}^+$) were smaller for the bread wheat cultivar than for the durum wheat cultivar

($\Delta\text{GY} = 1.87 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ and $\Delta\text{GY} = 3 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, for Apache and Miradoux cultivars, respectively), illustrating the better adaption of bread wheat cultivars to a combination of constant nitrogen stress and late stage drought.

Along with this yield gaps, it appears that durum and bread wheat have two different rooting patterns, notably under sub-optimal growth conditions. Under these multi-stressed conditions (I^-N^-), the bread wheat cultivar (Apache) displayed deep root system, whereas the root system of the durum wheat cultivar (Miradoux) was shallower (supplementary Figure 5). The root density of bread wheat cultivar didn't decrease before the bottom of the minirhizotron tubes, unlike durum wheat root systems which exhibited a significant decrease (Supplementary 5).

Thus, this deeper root system provided higher drought tolerance by increasing the capacity to capture water located in deep soil layers (Lopes and Reynolds, 2010), and finally, grain yields of Apache were higher than Miradoux under these multi-stressed conditions (I^-N^-).

The RLSD profiles appears to be cultivar dependent, and a parallel can be drawn between cultivars yield performance under multi-factorial stress and root architecture viewed through minirhizotrons, illustrated by the supplementary Figure 5. The Hystar cultivar—hybrid cultivar of Apache ascent—showed a similar root system architecture under optimal conditions (I^+N^+) and multi-stressed conditions (I^-N^-), denoting the same drought resistance traits than Apache, while a more complex relation ties the synthetic wheat cultivar and the durum wheat cultivar (Nogal and Miradoux). The synthetic wheat Nogal cultivar produced the same root system architecture than bread wheat Apache cultivar under optimal conditions (I^+N^+), whereas under multi-stressed conditions (I^-N^-) the Nogal and Miradoux had comparable shallow root system architectures.

Synthetic hexaploid wheats genotypes, developed to increase genetic variability in wheat, were not specifically screened for stress tolerance (Pradhan *et al.*, 2012). As a consequence,

the Nogal cultivar rooting pattern may not be adapted to suboptimal conditions, unlike bread wheats.

Even if these different rooting strategies were related to the different drought tolerance performance found in the IN⁻ plots, the root to shoot ratio at anthesis was not directly correlated to drought tolerance—usually, higher R:S marks higher drought resistance.

However other root traits and their related physiological functions, as the topology or the root diameter were not considered, even if the latter has been found constant with depth for sole cropping wheat. Similarly, the precise water consumption estimated by carbon isotope discrimination or by soil water content variations, both not evaluated, could help us in determine the role of shoot or root traits in the drought resistance. Nonetheless, it appears that stay-green phenotypes do not display a significant reduction of soil moisture, and thus, relation between root length density and soil water content variations could be complex (Christopher *et al.*, 2008). Nevertheless, such a minirhizotron technique enhances dramatically the practicability the measurements of root dynamics during the post-anthesis period, allowing direct and non-destructive access to the root system during its senescence.

4.3. Relevance of minirhizotron in field crop trails

In spite of the bias attached to the estimation with minirhizotron of the root system located in the shallow layers, we observed that TRLS_D at anthesis has a great impact on grain yield ($r^2 = 0.48$, Figure 5), regardless of treatment, and similar relation was observed on wheat crops with the same yield range (5–11 t.ha⁻¹), with a similar coefficient of determination ($r^2 = 0.56$) (Barraclough and Leigh, 1984), tough with an older technique.

The tubes considered for the regression between grain yield and deep root length (Figure 5) were buried at a similar depth (Table 3), preventing effects related to soil depth, and thus considering only deep soil plots. Along with electrical resistivity mapping of the plots (Supplementary 1), this confirms that the depth of silty soil was homogenous over the different plots.

Relevance of minirhizotron measurements at anthesis was different considering the different irrigation treatment. Indeed, we observed that RLSD is notably correlated with the grain yield in rainfed conditions ($r^2 = 0.41$, Figure 8d), whereas it shows no effect on grain yield in irrigated conditions ($r^2 = 0.00$, Figure 8d). This relevance of deep soil measurement is illustrated by the absence of correlation between the root dry mass (the total mass of root located along the tube) and the grain yield regardless of treatment ($r^2 = 0.01$ and $r^2 = 0.11$ under irrigated and rainfed conditions, respectively), as shown in Figure 8b. This illustrates the dependence of the root length allocation on the treatment applied, and its implication on the grain yield in case of late drought.

Moreover, it is worth noting that in rainfed conditions, the shoot biomass and grain yield are not correlated, unlike in irrigated conditions. In a similar way, in rainfed conditions the root mass does not correlate the above biomass, while the root mass could be estimated using the shoot mass in irrigated conditions. Thus, in our rainfed conditions, the above ground biomass at anthesis can give insights neither in the harvested grain yield, nor in the drought tolerance.

However, since the technique was not reliable on shallow soil, the results are applicable on deep soil conditions only. Even if auger sampling compensate this surface bias, the increase in shallow root densities (Knoch *et al.*, 1957; Herrera *et al.*, 2007) remains inaccessible to minirhizotrons. Another point concerns the impact of the soil texture on the measurement

bias, retraction of soil rich in clay would lead to larger gaps around tube, which would stimulates the root growth, and thus, increases biases.

However, even if wheat plants traits at anthesis could give large insights of grain yield, post-anthesis dynamic has high influence on the final grain yield (Passioura, 1977). Nevertheless, this technique can evaluate rooting strategies, making it a valuable tool for cultivar comparison, and for improving rooting models by in situ calibration.

5. Conclusion

In a Fluvisol limestone in a Mediterranean climate under irrigated and rainfed conditions, wheat root length surface density estimated with minirhizotrons was fairly correlated with the grain yield ($r^2 = 0.48$). Moreover, under rainfed conditions, we observed that nitrogen stressed plots exhibited higher grain yields, in correlation with larger root systems in deep soil ($r^2 = 0.41$), which was induced by a nitrogen deficiency before drought. In spite of biases in root measurement in shallow soil, the minirhizotron technique provided rapid root length density estimations, and with our non-parametric calibration methodology, its reliability has been supported by the estimated root to shoot ratio at the different growth stages. However, these biases prevent precise root length estimations, which require destructive measurements and, moreover, the image processing remains a major bottleneck, and substantial improvements in its automation would allow further exploitations of minirhizotron images. The assessment of wheat SRL through the root diameters would indeed help to reduce the amount of destructive sampling required, and thus, would greatly facilitate larger scale studies of root traits. Further studies are necessary to evaluate the contribution of minirhizotron in post-anthesis dynamics, which is substantially linked to crop grain yield. Nevertheless, this

technique would be a valuable tool in determining root traits of interest for drought resistance and in enhancing accessibility to root measurement for crop breeding programs.

Acknowledgements

We thank Stéphane Jezequel and Xavier Le Bris for their helpful comments on early drafts of this manuscript. We thank ARVALIS–Institut du végétal technical team located in Gréoux-les-Bains. Special thanks are also expressed to Arnaud Chapelet and Hanah Kuttler for their excellent assistance in the fieldwork.

Funding: This work was supported by grants from the FSOV [grant number FSOV-2012-E] (French fund for plant breeding) and ARVALIS Institut du végétal.

Additional files

Additional file 1: Figure S1(.Tif). Electrical resistivity ($\Omega.m$) map of the experimental field.

Green areas denote low electrical values, and red areas denote high electrical values. Positions of minirhizotron tubes are displayed by white triangles (Δ). Low values of resistivity means high soil depths, whereas high values of resistivity means low soil depths. Using soil coring samples and minirhizotron depths, the scale relating depth to resistivity is estimated as follows: 29–78 $\Omega.m = 71–120$ cm, 78–126 $\Omega.m = 40–70$ cm, 126–175 $\Omega.m = 30–40$ cm, and 175–275 $\Omega.m < 30$ cm.

Additional file 2: Figure S2(.Tif). Histogram of the conversion parameter ($\varepsilon \times SRL$) to a volumetric root biomass obtained with Eq. 2. The median value of the conversion parameter is $\mu_{1/2} = 0.62 \text{ m}^2.g^{-1}$, leading to a depth of field of view of 3.5 mm by considering a specific root length (SRL) value for winter wheat equals to 180 $m.g^{-1}$

Additional file 3: Figure S3(.Tif). Effect of the different treatments on the dynamic of the Hystar hybrid bread wheat root length surface density profiles ($mm.cm^{-2}$) at different stages.

Mean root length surface density profiles of the Hystar wheat cultivar are shown at tillering (Z25), stem elongations (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) stages. Under the two treatments monitored (optimal and water and nutrient coupled stress), both exhibit a deep rooting profile pattern, optimal conditions peaking at 17.35 $mm.cm^{-2}$ at anthesis(out of figure).

Additional file 4: Figure S4(.Tif). Effect of the different treatments on the dynamic of the Nogal synthetic wheat root length surface density profiles ($mm.cm^{-2}$) at different stages. Mean

root length surface density profiles of the Nogal synthetic wheat cultivar are shown at tillering (Z25), stem elongations (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) stages. Optimal and stressful conditions shows contrasted rooting pattern. Under optimal conditions, this synthetic

wheat cultivar exhibits a deep root profile, as measured for the bread wheat Apache cultivar. On the opposite, under stressful conditions, the root pattern developed is closer to the durum wheat Miradoux cultivar measured.

Additional file 5: Figure S5(.Tif). Comparison of the root length surface density profiles obtained with minirhizotron technique at anthesis half-way (Z65) on average for each cultivar under stressful conditions (IN⁻). Similarities are found in the rooting profiles of Apache and Hystar cultivars, and Miradoux and Nogal cultivars. A parallel may be drawn regarding their grain yield, higher yields obtained by Apache and Hystar cultivars (7.17 t.ha⁻¹, 7.65 t.ha⁻¹, respectively), lower yields obtained by Miradoux and Nogal cultivars (5.79 t.ha⁻¹, 6.06 t.ha⁻¹, respectively).

References

- Alexandratos N, Bruinsma J.** 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper Rome, FAO.
- Allard V, Martre P, Le Gouis J.** 2013. Genetic variability in biomass allocation to roots in wheat is mainly related to crop tillering dynamics and nitrogen status. *European Journal of Agronomy* 46, 68–76.
- Atkinson D.** 1985. Spatial and temporal aspects of root distribution as indicated by the use of a root observation laboratory. Special publications series of the British Ecological Society.
- Barraclough PB, Kuhlmann H, Weir AH.** 1989. The Effects of Prolonged Drought and Nitrogen Fertilizer on Root and Shoot Growth and Water Uptake by Winter Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 163, 352–360.
- Barraclough PB, Leigh RA.** 1984. The growth and activity of winter wheat roots in the field: the effect of sowing date and soil type on root growth of high-yielding crops. *The Journal of Agricultural Science* 103, 59–74.
- Barraclough PB, Weir AH, Kuhlmann H.** 1991. Factors Affecting the Growth and Distribution of Winter Wheat Roots Under Uk Field Conditions. In: McMichael BL,, In: Persson H, eds. *Plant Roots and their Environment. Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology.* Elsevier, 410–417.
- Brisson N, Gate P, Gouache D, Charmet G, Oury F-X, Huard F.** 2010. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* 119, 201–212.

- Chaudhuri UN, Kirkham MB, Kanemasu ET.** 1990. Root growth of winter wheat under elevated carbon dioxide and drought. *Crop Science* 30, 853–857.
- Christopher JT, Manschadi AM, Hammer GL, Borrell AK.** 2008. Developmental and physiological traits associated with high yield and stay-green phenotype in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 59, 354.
- Eberbach PL, Hoffmann J, Moroni SJ, Wade LJ, Weston LA.** 2013. Rhizo-lysimetry: facilities for the simultaneous study of root behaviour and resource use by agricultural crop and pasture systems. *Plant methods* 9, 3.
- Fernandes R, G. Leblanc S.** 2005. Parametric (modified least squares) and non-parametric (Theil–Sen) linear regressions for predicting biophysical parameters in the presence of measurement errors. *Remote Sensing of Environment* 95, 303–316.
- Gregory PJ.** 1979. A periscope method for observing root growth and distribution in field soil. *Journal of Experimental Botany* 30, 205–214.
- Herder GD, Van Isterdael G, Beeckman T, De Smet I.** 2010. The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science* 15, 600–607.
- Herrera JM, Stamp P, Liedgens M.** 2007. Dynamics of root development of spring wheat genotypes varying in nitrogen use efficiency. *Wheat Production in Stressed Environments*. Springer, 197–201.
- Iglesias A, Garrote L, Quiroga S, Moneo M.** 2012. A regional comparison of the effects of climate change on agricultural crops in Europe. *Climatic Change* 112, 29–46.
- Johnson MG, Tingey DT, Phillips DL, Storm MJ.** 2001. Advancing fine root research with minirhizotrons. *Environmental and Experimental Botany*, 263–289.
- Justes E, Mary B, Meynard J-M, Machet J-M, Thelier-Huche L.** 1994. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. *Annals of Botany* 74, 397–407.
- Keating B., Carberry P., Hammer G., et al.** 2003. An overview of APSIM, a model designed for farming systems simulation. *European Journal of Agronomy* 18, 267–288.
- Kmoch HG, Ramig RE, Fox RL, Koehler FE.** 1957. Root development of winter wheat as influenced by soil moisture and nitrogen fertilization. *Agronomy journal* 49, 20–26.
- Langridge P.** 2005. Molecular breeding of wheat and barley. In *the Wake of Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution*, 279–286.
- Li F-M, Liu X-L, Li S-Q.** 2001. Effects of early soil water distribution on the dry matter partition between roots and shoots of winter wheat. *Agricultural water management* 49, 163–171.
- Lobet G, Pages L, Draye X.** 2011. A Novel Image-Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture. *Plant Physiology* 157, 29–39.
- Løes A-K, Gahoonia TS.** 2004. Genetic variation in specific root length in Scandinavian wheat and barley accessions. *Euphytica* 137, 243–249.

- Lopes MS, Reynolds MP.** 2010. Partitioning of assimilates to deeper roots is associated with cooler canopies and increased yield under drought in wheat. *Functional Plant Biology* 37, 147.
- Maeght J-L, Rewald B, Pierret A.** 2013. How to study deep roots—and why it matters. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Manschadi AM, Hammer GL, Christopher JT, deVoil P.** 2008. Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil* 303, 115–129.
- Mathieu L, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C.** 2015. ‘Rhizoponics’: a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant methods* 11, 3.
- McCown RL, Hammer GL, Hargreaves JNG, Holzworth D, Huth NI.** 1995. APSIM: an agricultural production system simulation model for operational research. *Mathematics and computers in simulation* 39, 225–231.
- Merrill SD, Doering EJ, Reichman GA.** 1987. Application of a minirhizotron with flexible, pressurized walls to a study of corn root growth. *Minirhizotron Observation Tubes: Methods and Applications for Measuring Rhizosphere Dynamics*, 131–143.
- 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.
- Monti A, Zatta A.** 2009. Root distribution and soil moisture retrieval in perennial and annual energy crops in Northern Italy. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 132, 252–259.
- Mooney SJ, Pridmore TP, Helliwell J, Bennett MJ.** 2012. Developing X-ray computed tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. *Plant and soil* 352, 1–22.
- Munoz-Romero V, Benítez-Vega J, López-Bellido L, López-Bellido RJ.** 2010. Monitoring wheat root development in a rainfed vertisol: Tillage effect. *European journal of agronomy* 33, 182–187.
- Nakhforoosh A, Grausgruber H, Kaul H-P, Bodner G.** 2014. Wheat root diversity and root functional characterization. *Plant and soil* 380, 211–229.
- Passioura JB.** 1977. Grain yield, harvest index, and water use of wheat. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 43, 117–120.
- Polomski J, Kuhn N, Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U.** 2002. Root research methods. *Plant roots: The hidden half*, 295–321.
- Pradhan GP, Prasad PVV, Fritz AK, Kirkham MB, Gill BS.** 2012. Effects of drought and high temperature stress on synthetic hexaploid wheat. *Functional Plant Biology* 39, 190.
- Rellán-Álvarez R, Lobet G, Lindner H, et al.** 2015. Multidimensional mapping of root responses to soil environmental cues using a luminescence-based imaging system. *bioRxiv*, 16931.

- Reynolds MP, Pfeiffer WH, Royo C.** 2000. Applying physiological strategies to improve yield potential. Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges. *Options Méditerranéennes* 40, 95–103.
- Rich SM, Watt M.** 2013. Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *Journal of Experimental Botany* 64, 1193–1208.
- Sharma BR, Chaudhary TN.** 1983. Wheat root growth, grain yield and water uptake as influenced by soil water regime and depth of nitrogen placement in a loamy sand soil. *Agricultural Water Management* 6, 365–373.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL.** 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20260–20264.
- Trachsel S, Kaeppler SM, Brown KM, Lynch JP.** 2011. Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant and Soil* 341, 75–87.
- Upchurch DR, Ritchie JT.** 1983. Root observations using a video recording system in mini-rhizotrons. *Agronomy journal* 75, 1009–1015.
- Waines JG, Ehdaie B.** 2007. Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Annals of Botany* 100, 991–998.
- Wang M-B, Zhang Q.** 2009. Issues in using the WinRHIZO system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecologica Sinica* 29, 136–138.
- Watt M, Moosavi S, Cunningham SC, Kirkegaard JA, Rebetzke GJ, Richards RA.** 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, 447–455.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, et al.** 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed res* 14, 415–421.
- Zhang Z-S, Li X-R, Wang T, Wang X-P, Xue Q-W, Liu L-C.** 2008. Distribution and Seasonal Dynamics of Roots in a Revegetated Stand of *Artemisia ordosica* Kracsh. in the Tengger Desert (North China). *Arid Land Research and Management* 22, 195–211.
- Zhang X, Zhang X, Liu X, Shao L, Sun H, Chen S.** 2015. Incorporating root distribution factor to evaluate soil water status for winter wheat. *Agricultural Water Management* 153, 32–41.

Chapitre 3 : Un modèle étendu de l'impédance des plantes : détection in situ des racines

**François Postic
Philippe Hinsinger
Ran Erel
Claude Doussan**

Ce troisième chapitre porte sur l'application au champ de la méthode électrique, sur l'essai agronomique 2014–2015 de Gréoux-les-Bains à quatre stades de croissance. Il apparaît que la qualité de la capacité électrique en tant qu'estimateur de la masse racinaire décroît au cours de la campagne, notamment aux stades reproductifs. Par ailleurs, des mesures au champ pratiquées à Auzeville sur de jeunes plants de maïs, nous ont permis de montrer que l'impédance de ces derniers est décrite par un modèle de condensateur plan, les tissus végétaux formant un diélectrique imparfait, en accord avec le modèle de Dietrich (2012). A partir de ce modèle, nous proposons un autre estimateur de la masse racinaire (la réactance), et nous montrons qu'il détecte seulement les racines situées dans les couches superficielles et sèches du sol. Ce chapitre est un manuscrit formaté pour une soumission au journal *Plant & Soil*.

An extended model for plant impedance: in situ root sensing

François Postic^{1,2,*}, Philippe Hinsinger³, Ran Erel³ and Claude Doussan²

¹ARVALIS Institut du végétal, Paris, France.

²UMR EMMAH, INRA, UAPV, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France.

³ INRA, UMR Eco&Sols, Place Viala, 34060 Montpellier, France

*Corresponding author: francois.postic@paca.inra.fr

Tel.: +33432722266

Running title: Plant impedance for in situ root sensing

Submission date: 16 August 2016

Number of tables: 1

Number of figures: 6

Word count: 6495

Highlight

Plant tissues exhibit a dielectric loss like imperfect plate capacitors, and their reactance is an in situ proxy of root mass located in dry soil down to 40 cm.

Abstract

Measurement of plant electrical capacitance is reported as a fast and cost-effective method for estimating root system biomass. Recently, a new interpretation of the capacitance effect has been given. This study extends this new model and shows that the electrical response of the plant-soil system can be described by a plate capacitor separated by an imperfect dielectric characterized by a complex dielectric value.

In the field, electrical impedance measurements have been performed on maize plants at young stage (6-8 expanded leaves) and on wheat crop at four contrasted stages up to anthesis in contrasted soil and hydric conditions. Shoot and root biomass were also measured simultaneously.

Under well-watered conditions, in situ measurements on young maize satisfied the Dietrich model, with an allometric relation between stem section and root mass. Nonetheless, in accordance with our new model, in situ wheat root mass at late stage was linearly correlated with the electrical reactance, though only in dry soil conditions, down to 40 cm below the soil surface.

These results are consistent with our extension of the recent physical interpretation of plant capacitance, and delineate in which case electrical measurements can be applied to root sensing.

Key words

Root biomass, *Triticum* spp, *Zea mays*, electrical reactance, electrical capacitance, field measurement.

Abbreviations

i – Unit Imaginary, number Dimensionless

m – Plant mass, grams, g

A – Area of overlap, square meters, m²

C – Parallel capacitance, Farads, F

G – Conductance, Siemens, S

L – Plate separation, meters, m

R_p – Parallel resistance Ohms, Ω

S – Root section, square meters, m²

X – Reactance, Ohms, Ω

Y – Admittance, Siemens, S

ϵ^* – Complex permittivity of a material, F.m⁻¹

ϵ' – Real permittivity of a material, F.m⁻¹

ϵ'' – Imaginary permittivity of a material F.m⁻¹

ω – Angular frequency, radians per seconds, rad.s⁻¹

ω_0 – Cut-off angular frequency, radians per seconds, rad.s^{-1}

σ – Conductivity of a material, S.m^{-1}

τ – Relaxation time, Seconds, s

Introduction

The global crop demand is estimated to double by 2050 (Tilman *et al.*, 2011), while crop yields could stagnate due to climate change (Asseng *et al.*, 2014). Thus, the production of cereals will not meet the needs of the world's population, especially when considering the fertilizers crisis that could emerge—the prices of mineral phosphorus are increasingly volatile (FAO of the United Nations, 2015) and expected to further increase (Brunelle *et al.*, 2015), while the production peak may occur within a few decades (Cordell *et al.*, 2009) with the fast depletion of the known reserves of rock phosphate (Peñuelas *et al.*, 2013)—and the still uncertain effects of the climate change on low-fertility soil (Lynch and St.Clair, 2004).

To face the future potential stagnation of yields, breeding programs shall aim at enhancing the efficiency of crops under low soil fertility conditions (Lynch, 2007). Thus, the future breeding programs should aim at higher efficiency in nutrient capture, a function ensured by the root system of plants. Therefore, there is urgent need for identifying essential root traits in order to design novel strategies of breeding for enhanced nutrients acquisition efficiency. Unfortunately, all the current techniques to measure root traits in field-grown plants, although allowing accurate and comprehensive characterisations, are destructive and time consuming. In this context, a method that enhances the practicability of root measurement would be highly relevant.

Even if breeding programs concerning roots would use greenhouse facilities (Wasson *et al.*, 2012), thus benefiting from the current automated phenotyping systems (Jeudy *et al.*, 2016), the relevance of in situ conditions should be better exploited, for testing interactions between environmental factors and genetics, which is needed given the plasticity of root system architecture (Rich and Watt, 2013).

Bio-impedance based techniques, which are assumed to estimate the root mass using the electrical capacitance of the plant, would largely simplify root studies. Even if the root mass is a straightforward trait, it reveals the root to shoot ratio, a stress indicator induced by limited soil resources (Atkinson, 2000).

Plant capacitance measurement is fast and non-destructive, and has thus been proposed as a valuable tool for sensing root mass (Chloupek, 1972). Experiments applied to different species under greenhouse and laboratory conditions have been showing promising results (Chloupek, 1977; Kendall *et al.*, 1982; Dalton, 1995; van Beem *et al.*, 1998; Aulen and Shipley, 2012). The measurement is done with a LCR meter, by imposing an alternative current through the plant-soil system using two electrodes: the first electrode connected to the stem and the second positioned in the surrounding soil. Initially, an empirical linear relationship had been found between the root mass and the parallel capacitance (Chloupek, 1972). The capacitive effect appears when there is a polarisation of electrical charges through a dielectric medium (*i.e.* an insulator) that separates two conductive elements. In root tissues, it was hypothesized that the epidermis is the imperfect insulator of a bio-capacitor, while root internal medium and soil solution constitutes the two conductive elements (Dalton, 1995; Ellis *et al.*, 2013a), which has been conceptualised as an equivalent capacitance electrical circuit (Dalton, 1995), known as the Dalton model, explaining the proportionality between root mass and capacitance.

The quality of electrical root mass sensing depends on the growth media and its homogeneity. For example, the root mass of hybrid poplars (*Populus deltoids* × *P. nigra*) is more accurately estimated in hydroponics than in field conditions (Preston *et al.*, 2004). Experimental observations show that soil moisture induces large variations in the quality of the root mass estimation (Kendall *et al.*, 1982; Nakhforoosh *et al.*, 2014). It was hypothesized that low soil moisture reduces the contact surface between the roots and the soil solution. Alternatives to Dalton's model have been proposed, emphasizing the root surface or the active root area (Ellis *et al.*, 2013a).

Despite these limitations of the plant capacitance theory, developments have been accomplished concerning the measurement methodology (Postic and Doussan, 2016). This was generally accomplished by considering the spectral response (*i.e.* over a range of input signal frequencies) to isolate output from specific plant compartments (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005). Additionally, more applied usages of capacitance have been prospected, as its heritability after selection (Svačina *et al.*, 2014; Heřmanská *et al.*, 2015) or as in the detection of root related quantitative trait loci (Chloupek *et al.*, 2006).

Recently, a major competing hypothesis has been proposed. From opposite results obtained by the excision of roots in hydroponics (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005; Dietrich *et al.*, 2012), Dietrich *et al.* (2012) proposed a re-interpretation of the electrical capacitance signal from the plant-growth media system. Its model describes a parallel plate capacitor (PPC), in which the first plate is the plant electrode, and the second is the plant cross-sectional area at the water table level, where plates are separated by a perfect dielectric medium. This PPC model states that (i) the capacitance correlates linearly with the sum of root cross-sectional areas at the water table level, (ii) the capacitance is inversely proportional to the root mass, and (iii) the roots under the water table (*i.e.* under the water surface in hydroponics) could not be sensed. Moreover, along with a physical explanation of the cause of this phenomenon, this

new theory gives insights on the soil moisture effect on the electrical response in such experiments.

The disagreements between the two theories (Dalton, 1995; Dietrich *et al.*, 2012) leaves many questions unsolved, since the issues related to *in situ* conditions—variability of soil moisture and plant phenology—have not been yet tested. Furthermore, field application of bio-impedance techniques to monitor the dynamics of root growth in crops has not been explored yet, since there are currently no reports on the *in situ* application of such electrical measurements at contrasted plant growth stages. Moreover the parallel-plate capacitor (PPC) model proposed by Dietrich *et al.* (2012) does not include the resistive part of the output signal and its variations as related to the measurement setup (Dalton, 1995).

In this study, we propose to i) extend the PPC model to full complex impedance and apply it to young well-watered maize (*Zea mays* L.) plants, ii) test the applicability of capacitance to a field survey on bread and durum wheat (*Triticum aestivum* L. and *Triticum turgidum durum* L.) crop, from tillering to anthesis, iii) determine the required conditions for efficient root measurement in the frame of the new theory, and finally iv) deducing depth of electrical measurement with regards to root depth.

Theory

Extension of the PPC model for root impedance

Several explanations of the root capacitance have been proposed (Dalton, 1995; Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005; Ellis *et al.*, 2013b). In their revised model, Dietrich *et al.* (2012) describe a physically equivalent electrical model for the root capacitance. In hydroponics, they demonstrated that the emerged part of the root system is equivalent to a

parallel-plate capacitor, *i.e.* two conductive plates oriented horizontally in the plane of the water table surface, with the root system acting as the dielectric material. A first plate is orthogonal to the stem at the location of the plant electrode, and a second at the surface of the water table. It is worth to notice that the orientation of the capacitor is orthogonal to the root axes, which is opposite to the former Dalton's and Ellis' models (Dalton, 1995; Ellis *et al.*, 2013a).

Since the initial design of the PPC model emphasized the capacitance—to discuss the efficiency of the capacitance as a root mass estimator—, it did not consider the resistive component of the plant tissues. In such a PPC model, the calculations consider a lossless dielectric medium—like in an ideal capacitor —, thus the resistive component of the system impedance cannot be represented. An extension to full complex impedance is introduced with the imperfect parallel-plate capacitor model (IPPC), where a conductive loss component is added and expressed in the complex permittivity ε^* of the dielectric medium:

$$\varepsilon^* = \varepsilon' + \varepsilon'' \quad (1)$$

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - i \frac{\sigma}{\omega} \quad (2)$$

where ε' and ε'' describe the real and imaginary parts of the permittivity (Eq. 1), respectively, and the electrical leaking current, which depends on the angular frequency (ω), is formalised by a conductivity term σ (Eq.2). The application of this complex dielectric constant ε^* to a parallel-plate capacitor with an area of plate overlap A with a separation L (Figure 1), is most simply expressed by its admittance (inverse of impedance):

$$Y = i\omega\varepsilon^* \frac{A}{L} \quad (3)$$

$$Y = \sigma \frac{A}{L} + i\omega\varepsilon' \frac{A}{L} \quad (4)$$

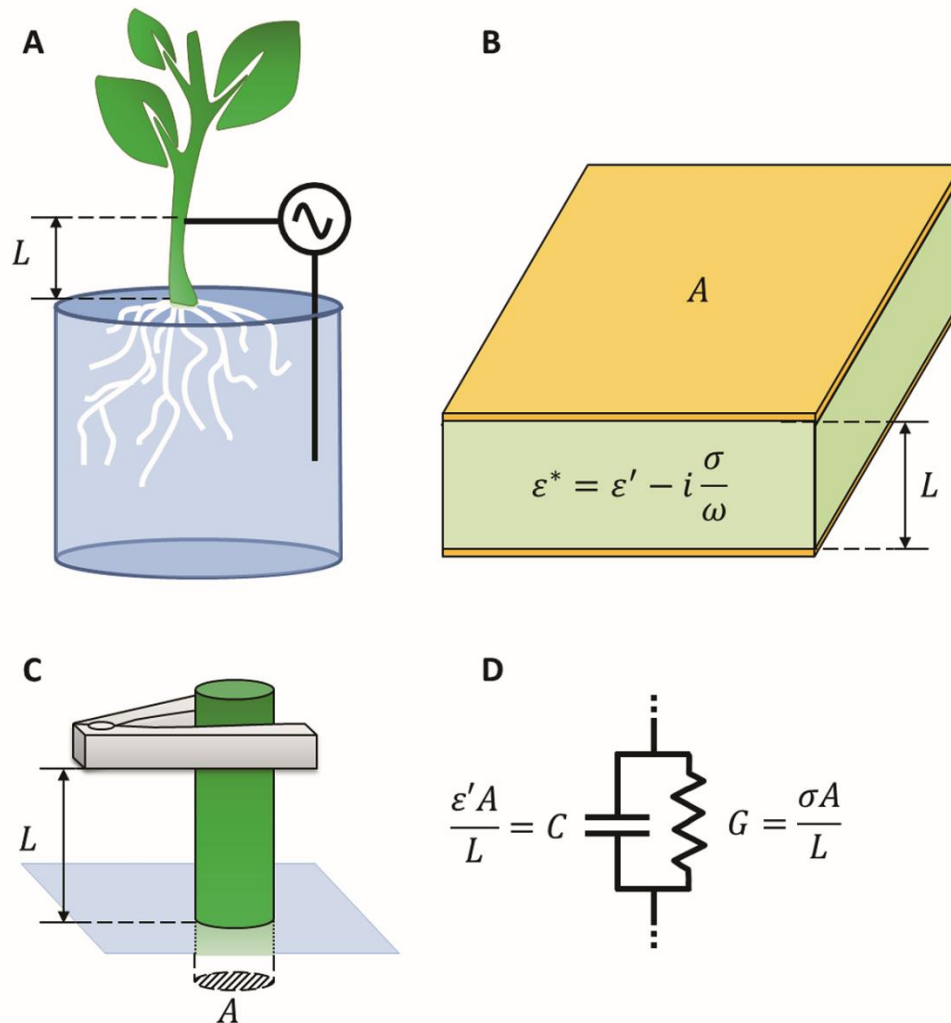


Figure 1. Extended Dietrich's model of plant impedance and its associated electric circuit. A typical root sensing via electrical capacitance experiment produces measurements of the plant tissues between the electrode and the water table in hydroponics (A), separated by a distance L . The plant-soil system is described by a parallel-plate capacitor with an area of overlap A and a plate separation L , with an insulating dielectric material described by a complex permittivity ϵ^* (B). This imaginary part of permittivity catches the displacement current, formalised for calculus convenience as the ratio of the conductive loss σ and the angular frequency ω . This parallel-plate capacitor corresponds to the plant tissue between stem electrode and water table (C). The associated electrical circuit admittance is a conductance–capacitance (G-C) parallel circuit (or alternatively a RC parallel circuit), where the components' values are expressed on the lower part of the figure (D).

The admittance has a real and an imaginary components and represents an electrical circuit with a conductor (G , in S—or expressed more classically as a resistance R_p , in Ω) and a capacitor (C , in S) in parallel, identified by:

$$G = \sigma \frac{A}{L} = 1/R_p \quad (5) \text{ and } C = \varepsilon' \frac{A}{L} \quad (6)$$

These relations (Eq. 5 and Eq.6) give us insights into the effects of the variation of the system's characteristic sizes on the electrical variables. Eq. 5 describes the effect of the position of the stem electrode on the measured conductance and Eq. 6 on the capacitance.

The equations 5 and 6 state that an increase in the electrode distance to the base of the stem L implies a decrease of both conductance G and capacitance C with L . As the resistance is the inverse of the conductance, the resistance R_p increases linearly with L . Such behaviours have been measured in previous experiments (Dalton, 1995) on bean (*Phaseolus vulgare* L.) plants grown in hydroponics for both resistance and capacitance, by varying the stem electrode position. Furthermore, a generalisation of this result on capacitance has been obtained (Dietrich *et al.*, 2012) on barley (*Hordeum vulgare* L.) plants by raising the plant tissues out of hydroponic solutions, and thus increasing their plate separation L , *i.e.* the distance between the stem electrode and the water table.

In the same manner, the effect of the variation of the area of overlap A is also given by these equations, which describe a positive linear relation between area of plates overlap and both conductance (Eq.5) or capacitance (Eq.6)

A more general property of the system is found by considering the relaxation time τ of the equivalent circuit with the conductor (G) and a capacitor (C) in parallel:

$$\tau = \frac{1}{G} \times C \quad (7)$$

Replacing Eq.5 and Eq.6 into Eq.7 results to:

$$\tau = \frac{\varepsilon'}{\sigma} \quad (8)$$

By assuming that the permittivity is constant along the plant tissue and does not vary with the section—more formally that the permittivity (both real and imaginary components) is not function of L or A —, the partial derivatives of Eq. 12 with respect to either L or A give the same relation:

$$\frac{\partial \tau}{\partial L} = \frac{\partial \tau}{\partial A} = 0 \quad (9)$$

Therefore, the relaxation time of the system would not vary with the system area (A) or the electrode position (L).

Dietrich (2012) suggests that an allometric relation exists between the stem section (A) intersecting the water table in hydroponics (or soil's surface for a moist soil) and the root mass (m). This allometric relationship can be expressed as a linear function f :

$$A = f(m) = \alpha_1 + \alpha_2 \times m \quad (10)$$

with α_1 and α_2 positive, and ideally α_1 negligible compared to α_2 . By replacing the above equation in Eq.5, Eq.6 and Eq.9, we obtain:

$$G = \frac{\sigma}{L} \times (\alpha_1 + \alpha_2 \times m) \quad (11)$$

$$C = \frac{\varepsilon'}{L} \times (\alpha_1 + \alpha_2 \times m) \quad (12)$$

$$\frac{\partial \tau}{\partial m} = 0 \quad (13)$$

For instance, the Eq.12 describes the root capacitance effect observed in various experiments, while Eq.11, involving the conductance, provides a second linear relation related to the root mass m .

We concede that the frequency dependence of the permittivity was not considered in the above equations. However, this frequency dependence of permittivity expresses the superimposition of several dispersion phenomena that are not the topic of this study.

Application to in situ root measurement

For a single root, the PPC model (and our proposed extension: the IPPC model) describes an equivalent plate-capacitor with plate separation equal to the length of emerged roots (l_i), and an area of overlap equal to the root section (S_i). The generalisation to several roots considers a sum of the ratio of individual root length and individual root section (Dietrich *et al.*, 2012), and the capacitance C of the plant–soil system is expressed by:

$$C \propto \left(\sum \frac{l_i}{S_i} \right)^{-1} \quad (14)$$

The IPPC model can be derived by considering the serial reactance X of an equivalent circuit that features a conductive leakage term, i.e. a resistor in parallel (R), implicitly describing the imperfection of the root tissue for insulation. In this formalism, the serial reactance (X) (Eq.15), that is inversely proportional to parallel capacitance C (Eq.15), gives a direct relation with the emerged root length (Eq. 17):

$$X = \frac{(\omega/\omega_0)^2}{1+(\omega/\omega_0)^2} \times C^{-1} \quad (15)$$

$$\omega_0 = \frac{1}{R \times C} \quad (16)$$

$$X \propto \frac{(\omega/\omega_0)^2}{1+(\omega/\omega_0)^2} \times \sum \frac{l_i}{S_i} \quad (17)$$

where ω is the angular frequency and ω_0 is the cut-off frequency given by Eq. 16.

In the case of electrical measurements performed at a constant frequency, which is the common protocol for such measurements, coupled with the assumption of a constant section among roots, denoted S , the reactance X is directly proportional to the sum of the root lengths:

$$X \propto \frac{1}{S} \times \sum l_i \quad (18)$$

By assuming also that root linear mass density—or its inverse, the so-called specific root length (*SRL*)—does not vary along the root system, reactance is a proxy of the emerged root mass m_i :

$$X \propto \frac{1}{S \times SRL} \times \sum l_i \propto \sum m_i \quad (19)$$

The generalisation to other substrates than hydroponics is done by considering the electrical conductivity of the involved media. For pot grown plants, a dry soil acts as a poor conductor, like air over water in hydroponics, while a wet soil act as a good conductor like the water in hydroponics.

In crops, unlike in trees, root diameter classes have a narrow range of variation. Thus reactance (X , in Ω) should be a proxy of the root mass between soil surface and the depth where soil is wet.

Material and methods

In situ experiments on wheat

The experimental site is located in Gréoux-les-Bains (South of France). Four bread and durum wheat cultivars (Miradoux, Apache, Hystar, Nogal) were sown in late October 2014 in $9.5 \times 6.6 \text{ m}^2$ plots at a sowing density of 300 seeds per m^2 . Plots were divided to four treatments, combining irrigation treatments (irrigated or rainfed, thereafter called I^+ and I^- , respectively) and nitrogen fertilization levels (optimal or sub-optimal, thereafter called N^+ and N^- , respectively). For the I^+ treatments, a total of 189 mm water was applied in six intervals from 15 April to 3 June 2015.

Electrical measurements—magnitude of impedance and phase angle—were performed on 28 January, 18 March, 4 April and 5 May 2015 corresponding to the 4 growth stages—tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65)—with 3 plants per plot and 2 replicated plots. Acquisition was done with a SIP Fuchs III at 1 V input voltage and 2 Hz frequency in a 3T configuration, merging input current (C1) and first potential electrode (P1). Electrode C1–P1 was an alligator clamp (4 mm wide) positioned on the plant (stem or leaf) 5 cm above the ground, the second potential electrode (P2) and the output current electrode (C2), stainless rods (4 mm diameter) inserted 5 cm in the ground, at a 20 cm and 30 cm radial distance, respectively, see illustration in Figure 1.

Surface root sampling was performed in the same plot just after electrical measurements. Augers (40 mm diameter) were used to collect root sample in the same area as that of electrical measurements, with two samples in the rows and a third between the rows. The depth of sampling was 0–40 cm, and a sigmoid curve was used for root density estimation. Central rows were sampled at 10–20 cm and 30–40 cm depth, and inter-rows were sampled at 30–40 cm. This sampling scheme was designed to integrate intra-row and inter-row variability of the crop plots into the root measurement, while minimizing the number of sample. Roots

were washed from the soil for 10 min using a hydropneumatic elutriator, collected on 350 μm sieves, oven dried at 70°C for 48h, and then weighted.

Deeper root mass (> 40 cm) were estimated using minirhizotrons tubes, that were imaged with a CI-600 root scanner (CID Bio-Science, Camas, WA, USA) down to 110 cm below the surface. The root length was measured and converted into root mass by using a specific root length (SRL) equal to 180 m.g^{-1} (Løes and Gahoonia, 2004) and depth-of-field of 3 mm (Zhang *et al.*, 2008). Twenty-four plots were equipped: Hystar and Nogal cultivars were equipped only in extreme conditions, i.e. I^+N^+ and IN^- .

Volumetric soil water content was measured weekly with a portable TDR (Time Domain Reflectometry) PICO TRIME IPH64 over the period from 12 April 2015 to 10 May 2015—i.e. between Z39 and Z65. Twenty-four tubes were installed in the same pattern as described for the minirhizotron tubes, in the central row of plots, allowing the measurements every 10 cm. The median of the soil water content of the plots in the irrigated and rainfed situations was computed for each layer.

In situ experiments on maize

The experimental site is located in the long term P-fertilizer trial of Auzeville (South-west of France). Eight maize hybrids, having contrasting root traits, were sown in May 2015 with two P fertilization levels at 6.7 grains per m^2 . The whole plot was irrigated according to the common agricultural practice.

Electrical measurements of parallel capacitance (C) and parallel resistance (R_p) were performed using a portable LCR meter Agilent U1732A at 1V in a 2 terminals configuration, at 1 kHz frequency. Electrode C1–P1 was an alligator clamp positioned 5 cm on the stem

above the ground, and electrode C2–P2, a stainless steel rod (4 mm diameter), was inserted at 10 cm with depth 10 cm. 222 plants were measured over the period of 9 to 12 June 2015, corresponding to 6-8 leaf stage for different maize hybrids and P levels.

Plant and young root system were excavated with a shovel and roots separated from soil by immersion in water and washing the root system. Roots and shoots were separated, weighted for fresh weight and then dried at 60°C for dry weight determination.

Gravimetric soil water content of the 112 plots was measured the day of experiment, over the 0–15 cm depth horizon.

Statistical analyses

For the maize experiment, the coefficient of determination R^2 (the square of the Pearson product-moment correlation) was obtained by least-square linear regressions, between root dry mass and electrical capacitance. For wheat experiments, an efficient robust linear regression (the Theil-Sen estimator) applied to biophysical sensing in presence of measurement errors (Fernandes and G. Leblanc, 2005) was used for the linear relation between root dry mass and electrical capacitance. The Theil-Sen estimator (Theil, 1950; Sen, 1968), was computed, and residuals beyond the estimator maximum breakpoint were discarded. This was achieved by computing the distribution of the residuals, used to determine sample points belonging to the $1 - \frac{1}{\sqrt{2}} \approx 29.3\%$ tails of their distribution, identified as outliers. The determination coefficient R^2 (the square of the Pearson product-moment correlation) was calculated with the remaining points.

Results

In-situ maize electrical response and root measurements

Figure 2 shows scatterplots with linear regression lines between root and shoot dry mass to conductance or parallel capacitance. Water content at time of measurements was relatively high with a mean gravimetric soil water of 0.25 g.g^{-1} . The mean root dry mass was 0.70 g, with a standard deviation (SD) of 0.31 g, and the mean shoot dry mass was 3.79 g, with a SD of 2.50 g. Strong correlations were obtained in each case. Both electrical variables had better correlation to the shoot dry mass ($R^2 = 0.83$ for G and $R^2 = 0.85$ for C) than to the root dry mass ($R^2 = 0.62$ for G and $R^2 = 0.69$ for C).

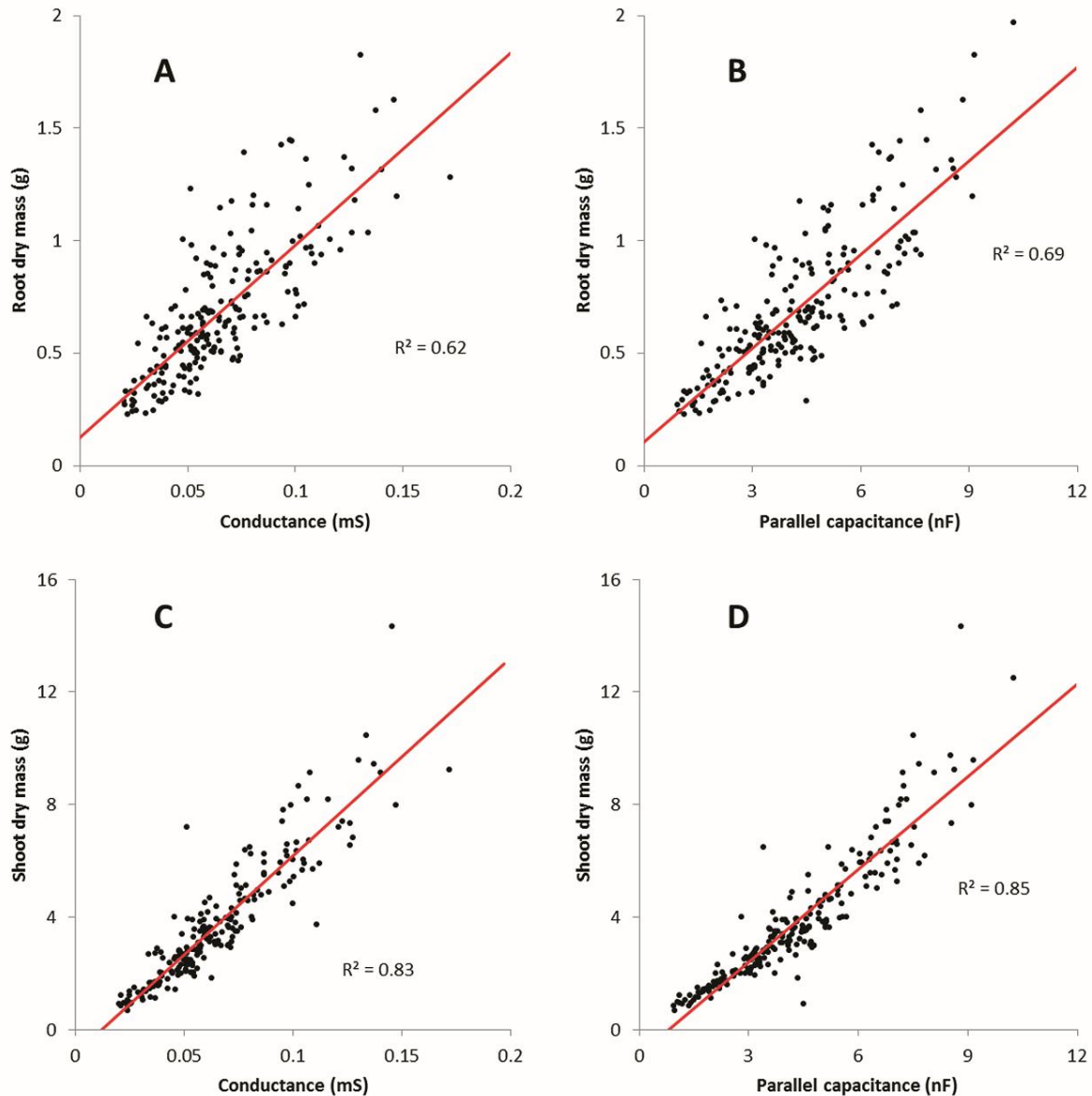


Figure 2. In situ electrical response of 6-8 leaf maize plants in wet soil conditions. Correlation between root dry mass and conductance (A) or parallel capacitance (B), and between shoot dry mass and conductance (C) or parallel capacitance (D). The linear least square regression is represented by solid lines and R^2 denotes the coefficient of determination. High, significant, positive correlations were obtained in all cases. During the experiments, the gravimetric soil water content was 0.25 g.g^{-1} .

Effect of biomass on the relaxation time τ

Figure 3 presents the correlations between the relaxation time τ estimated from Eq. 8 and the root dry mass (Figure 3a) and shoot dry mass (Figure 3b). The mean τ value was $65 \mu\text{s}$ with a SD of $15 \mu\text{s}$ and it was similar for root and shoot. No significant correlation was found in both cases, and slopes were not significant at 5% level.

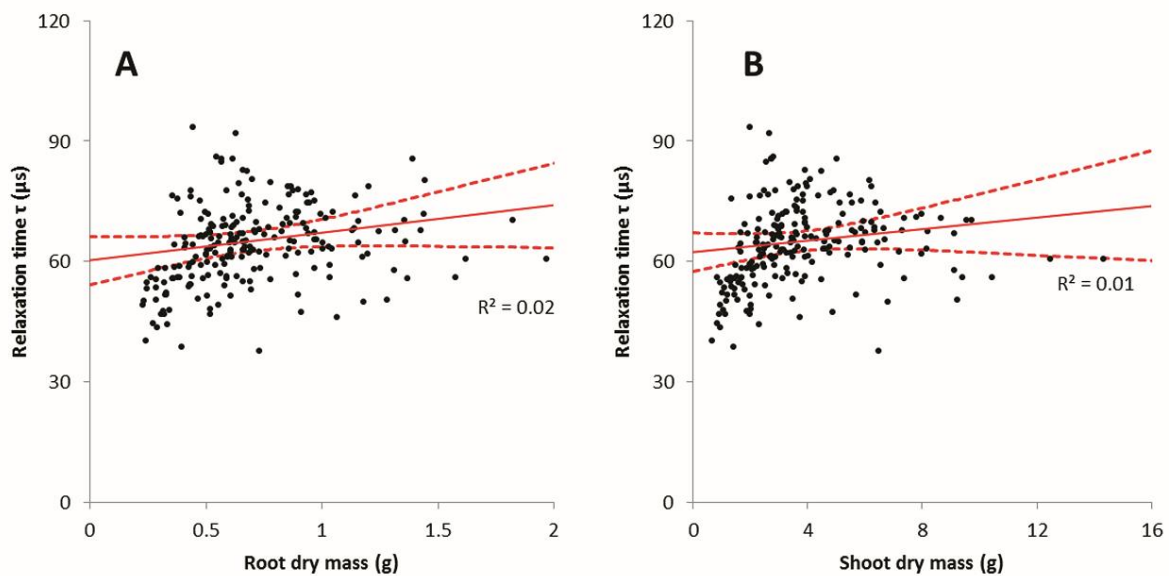


Figure 3. Characteristic relaxation time τ of the plant-soil system determined from in situ electrical measurements on 6-8 leaf maize plants. The value of τ as a function of the root dry mass (A) and the shoot dry mass (B) is shown. Solid lines represent the linear regression, and dashed lines represent the 95% confidence band. In a parallel-plate capacitor model with a complex insulating dielectric, a constant τ implies that the real part of permittivity and the conductive loss term do not vary with the size of the system. This constant τ value with respect to the plant mass indirectly suggests the existence of a linear allometric relationship between stem section and plant mass.

In-situ Wheat Capacitance measurements and root sensing efficiency of capacitance at different growth stages

A scatterplot of the parallel capacitance measurements at tillering (Z25, Zadok scale), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65) growth stages is presented in Figure 4a. The median value of the parallel capacitance measurement at each stage is displayed by a dashed line. Over the duration of the experimental campaign, impedance of 264 plants was acquired. The median of the parallel capacitance of plots increased from 0.11 nF at Z25 to 2.9 nF at Z39, and was followed by a decrease to 1.9 nF at Z65. The determination coefficients R^2 of the Theil-Sen estimator for each condition, for the different depth compartments of root mass (total, shallow and deep root mass) are presented in Table 1 for each given growth stages. The coefficient of determination R^2 of the Theil-Sen estimator between parallel capacitance and wheat root dry mass at each growth stage is displayed Figure 4b. High R^2 values were found at Z25 and Z30 growth stages ($R^2 = 0.66$ and $R^2 = 0.35$, respectively), whereas low R^2 values were found at Z39 and Z65 growth stages ($R^2 = 0.10$ and $R^2 = 0.30$, respectively).

Table 1. In situ performance of parallel capacitance (C) and reactance (X) in the estimation of the total, shallow and deep root mass. The Determination coefficient R^2 was computed with the Theil-Sen estimator for each condition at different growth stages, for the different depth compartments of root mass (total, shallow and deep root mass).

Treatment	Variable	Growth stage	Determination coefficient R^2		
			Total root mass	Shallow root mass	Deep soil root mass
Irrigated	C	Z25	0.86	0.86	0.72
		Z30	0.83	0.83	0.44
		Z39	0.19	0.27	0.34
		Z65	0.36	0.17	0.31
	X	Z25	0.79	0.84	0.69
		Z30	0.78	0.78	0.54
		Z39	0.12	0.34	0.25
		Z65	0.50	0.33	0.24
Rainfed	C	Z25	0.34	0.20	0.91
		Z30	0.54	0.53	0.32
		Z39	0.28	0.32	0.08
		Z65	0.18	0.37	0.07
	X	Z25	0.65	0.47	0.86
		Z30	0.89	0.89	0.23
		Z39	0.35	0.39	0.14
		Z65	0.47	0.63	0.29
Both	C	Z25	0.66	0.64	0.56
		Z30	0.35	0.35	0.21
		Z39	0.10	0.29	0.05
		Z65	0.30	0.14	0.17
	X	Z25	0.39	0.32	0.65
		Z30	0.31	0.31	0.27
		Z39	0.32	0.33	0.09
		Z65	0.17	0.38	0.08

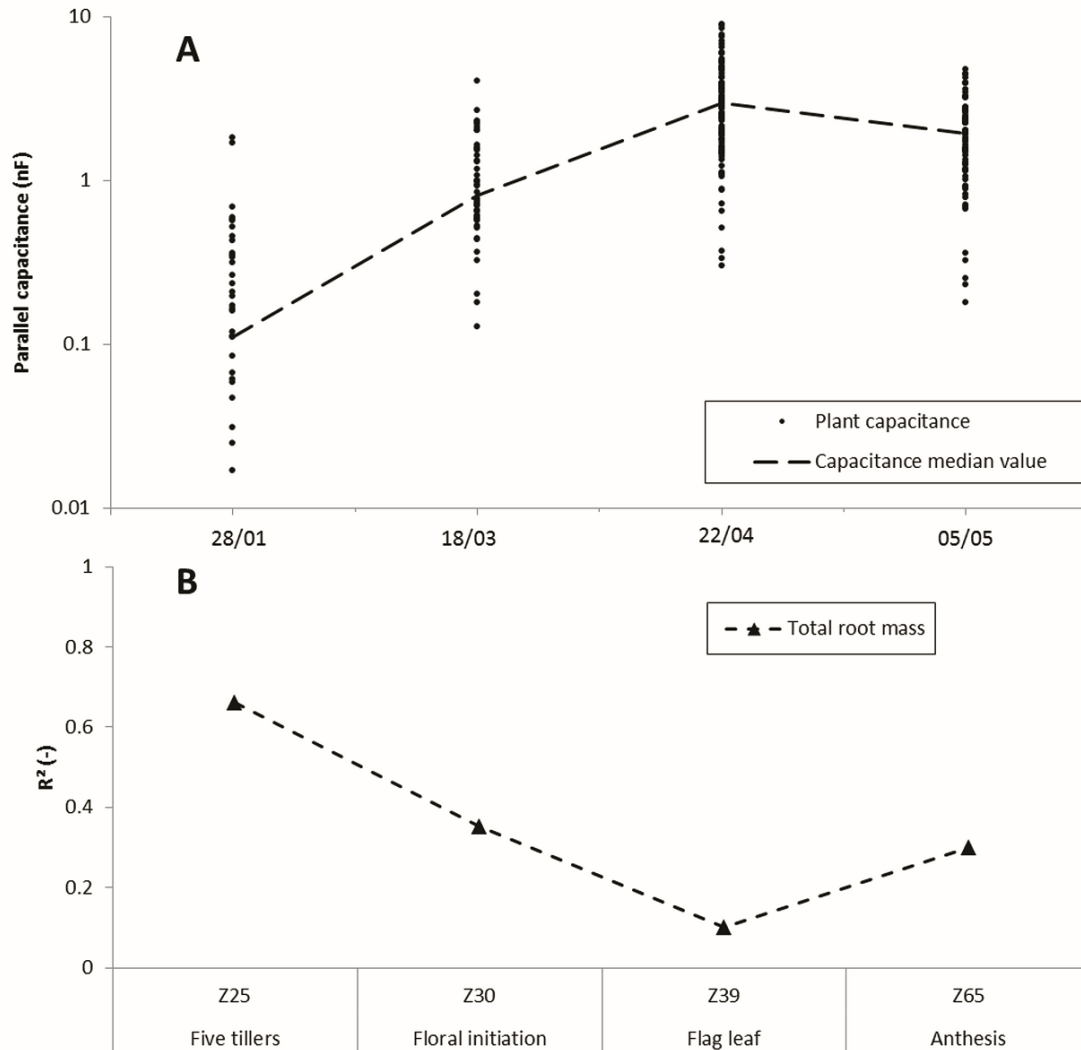


Figure 4. In situ variation and performance of capacitance for root dry mass estimation during wheat growth. (A) Semilog plot of the plant capacitance (C , in Farad) measured over experimental plots (dots), with the dashed line representing the median value at each sampling date, corresponding to the four contrasted developmental stages. The median values (and standard deviation) of C are 0.11 (0.4), 0.81 (0.75), 2.97 (2.27) and 1.92(1.11) nF, at tillering (Z25), stem elongation (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis half-way (Z65), respectively. (B) The data used for regression include irrigated and rainfed plots (drought began at Z39 stage). Changes in the determination coefficient R^2 (solid black triangles) obtained with the Theil-Sen estimator show that good estimations in the root mass occurred in early growth stages, before drought (Z25 and Z30 growth stages), whereas poor estimates arose during the dry period (Z39 and Z65 growth stages).

Effect of soil moisture on efficiency of the electrical root estimators

A bar plot of the coefficient of determination R^2 of the Theil-Sen estimator between the root dry mass and parallel capacitance C , and between the root dry mass and reactance (X), under irrigated and rainfed conditions at Z39 and Z65 growth stages is shown in Figure 5. At flag leaf ligule growth stage (Z39), the coefficients of determination R^2 show that under rainfed conditions, reactance (X) was a better indicator for root mass than capacitance (C), while under irrigated conditions both gave poorer predictors. At anthesis growth stage (Z65), capacitance was a better predictor of the root dry mass in irrigated conditions than in rainfed conditions, as shown by R^2 coefficients ($R^2 = 0.36$ and $R^2 = 0.18$, respectively), but reactance was better performing than capacitance for both treatments with no effect of the irrigation treatment on the coefficients of determination R^2 ($R^2 = 0.50$ and $R^2 = 0.47$, for irrigated and rainfed conditions, respectively).

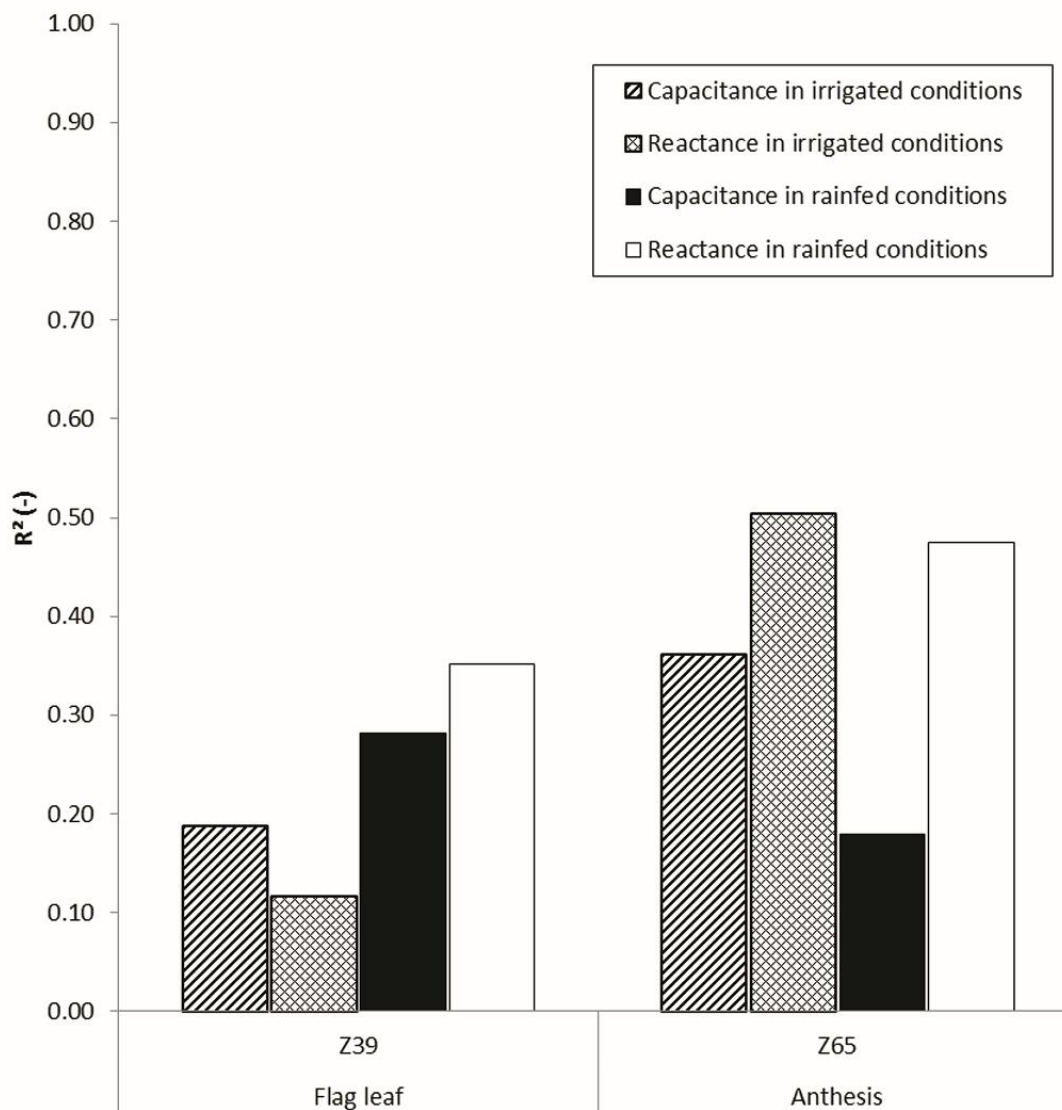


Figure 5. Effect of the soil moisture on the estimation performance with Capacitance or Reactance of total root mass at late growth stage. A bar plot of R^2 values for rainfed (plain bars) and irrigated (dashed bars) conditions of parallel capacitance (C) and serial reactance (X) is presented for the Z39 and Z65 growth stages. Reactance displays higher coefficients of determination than parallel capacitance. The coefficients of determination of the reactance in rainfed conditions ($R^2 = 0.35$ at Z39 and $R^2 = 0.47$ at Z65) were higher or comparable to reactance measured in irrigated conditions ($R^2 = 0.12$ at Z39 and $R^2 = 0.50$ at Z65). For parallel capacitance, coefficients of determination were low at Z39 ($R^2 = 0.28$ in rainfed conditions, and $R^2 = 0.19$ in irrigated conditions), and considerably lower than reactance at Z65.

Reactance as a root mass proxy and depth of sensing in soil

Figures 6a and 6b show the R^2 obtained by the Theil-Sen estimator between reactance (X) and the total root mass, the shallow root mass (0–40 cm), and the deep soil root mass (40–120 cm) under irrigated and rainfed conditions at flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) growth stages. The variations of volumetric soil water content during this period between 12 April (Z39) and 10 May (Z65) 2015 are presented in Figures 6c and 6d, under irrigated and rainfed conditions respectively, when the shallow soil horizons were drying. The coefficients of determination R^2 obtained by reactance and capacitance at tillering (Z25) and stem elongation (Z30) for each root compartment are also presented in Table 1.

For given root depth and irrigation treatment, the R^2 tended to increase between stages Z39 and Z65. In rainfed conditions, shallow root mass was better estimated ($R^2 = 0.63$) than total root mass ($R^2 = 0.47$) or deep soil root mass ($R^2 = 0.29$). Under irrigated conditions, a similar pattern occurred at Z39, while at anthesis stage an opposite trend was observed, the total root mass displaying the highest R^2 values ($R^2 = 0.50$).

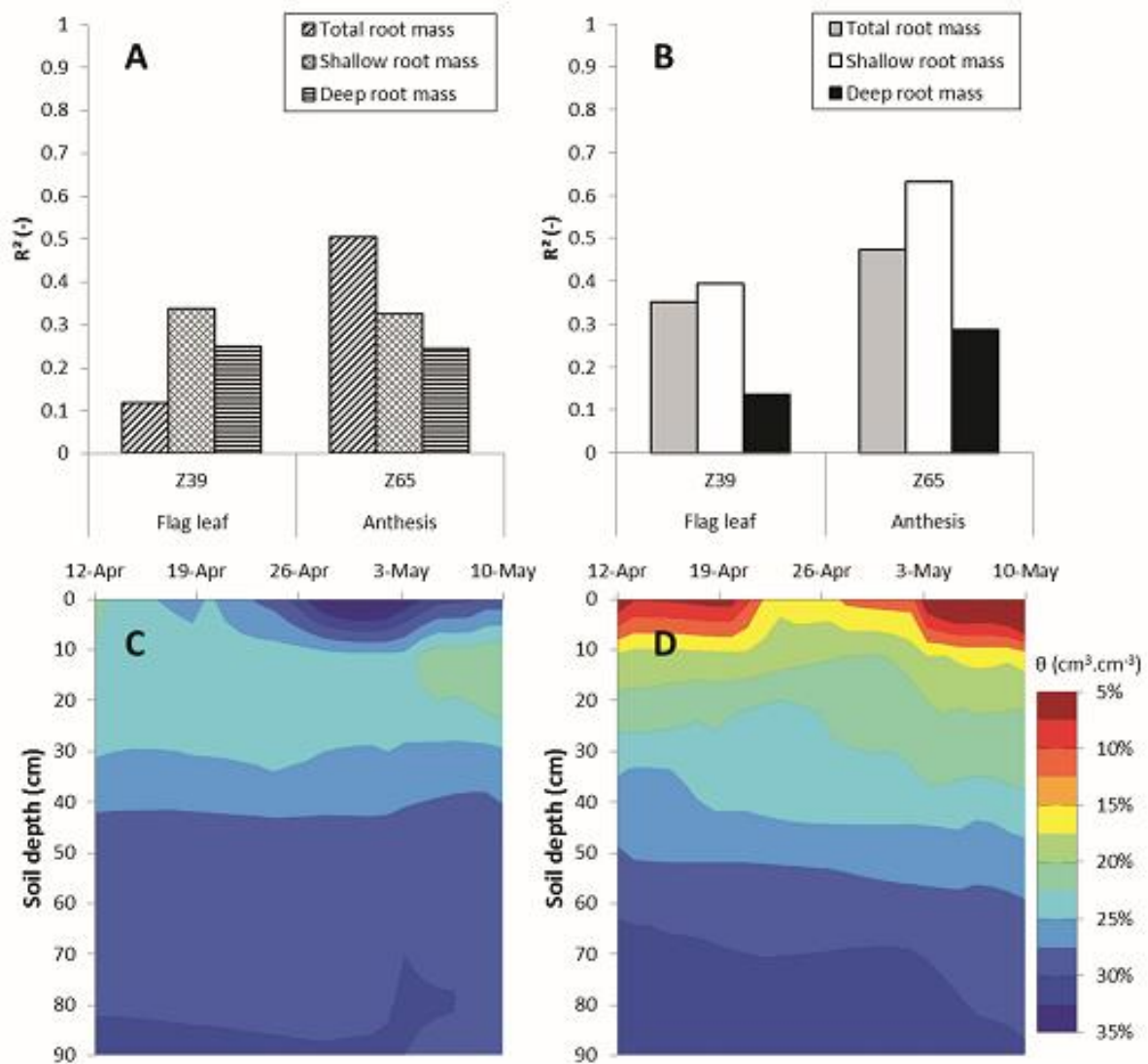


Figure 6. Sensing performance of reactance of root biomass in relation to soil depth. Determination coefficients R^2 of the relations between reactance and the different soil depths, namely the total root mass over the soil profile (about 1 meter), the shallow root mass (0–40 cm) and the deep root mass (40–120 cm) are shown for irrigated (A) and rainfed (B) conditions. The variation of the volumetric soil water content over the period from 12 April to 10 May 2015 is shown for irrigated (C) and rainfed (D) conditions. Globally, the R^2 obtained with each root mass depth increment in irrigated conditions were lower than those obtained in rainfed conditions. As drought increased (from Z39 to Z65), the R^2 increased in rainfed conditions, and the R^2 associated with shallow root mass was notably higher, allowed by the accentuated top soil drought. In contrast, the deep root mass was poorly estimated in each case, due to the high soil water content found in the deep soil throughout this period.

Discussion

Interactions of soil moisture and growth stage with capacitance

Electrical capacitance seemed to present a clear link to root mass only under precise conditions. It appears that high soil water content coupled with early plant development stage were the best conditions to obtain significant relations. In our experiments, the fair performance of capacitance (C) for the root mass estimation on young maize plants (Figure 2a) and on young wheat plants (Figure 4b) supported Dalton's model during early growth stages and wet conditions. However, in the case of maize plants, the conductance (G) correlated with the root mass as well (Figure 2b), and, moreover, we found that C or G were better estimators of the shoot biomass (Figure 2a and 2c). This supports the hypothesis that the aerial part of plants has a significant contribution in the capacitance effect when the soil is at field capacity. It challenges the previous hypothesis stating that roots would contribute a large fraction of the output signal under wet soil conditions, since it maximises the fraction of root in contact with soil water (Dalton, 1995).

In previous studies (van Beem *et al.*, 1998; Cseresnyés *et al.*, 2016), the capacitance measurements have been mostly performed on well-watered plant or on plants watered just before the measurements, ensuring a high soil water content of the top soil layers. It has been recently shown that under these conditions, the capacitance is more determined by the cross-sectional area of root or stem with soil at the soil surface than by root tissues under the wet soil surface (PPC model, Dietrich *et al.*, 2012). The relation of capacitance with root biomass would arise then from the allometric relation between stem section and plant mass. Such linear relation between stem diameter and biomass has been reported across annual plant species (Weiner and Thomas, 1992). However, cross-sectional area of stem and roots with

soil interface is extremely difficult to measure in the field and was thus not estimated in the present study.

Implications of the IPPC model under wet soil conditions

The characterisation of plant tissue dielectric properties by a complex permittivity seems validated from our results.

Firstly, Figures 2a and 2b support both the existence of an imaginary component permittivity term—as shown by the occurrence of a capacitive and a conductive effect of the sensed plant tissues. The increasing linear relations found for both electrical parameters satisfy Eq.11 and Eq.12, for both root mass and shoot mass. The conductance and the parallel capacitance were indeed more correlated with the shoot mass (Figure 2c and Figure 2d) than with the root mass. This relation satisfies Eq.10, and thus, it indicates an allometric linear relation between stem section and both root and shoot mass. The latter being more related to the stem, it would produce higher correlations.

However, the non-null y-intercept of the linear relations found ($p < 0.001$ in each case) is not explained by the admittance in Eq.4, and its origin could lie in the prominence of soil in the response of the equivalent plant–soil system electrical circuit. This statement was the aim of a previous study, which identified the soil characteristics' response (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005), modelled by a single resistive component connected to several parallel RC circuit in series. If soil is the source of non-null intercept, which is probable, growing plants in substrates with contrasted electrical properties would show variations in the linear relation between C (or G) and root mass (or shoot mass)

The second evidence of the complex permittivity of plant tissue is illustrated by Figures 3a and 3b. The results corroborate the relation derived in Eq.13, which establishes the independence of the relaxation time from plant mass, for root and shoot parts, respectively. We can assume that the dielectric medium properties do not vary with the plant mass at a given developmental stage, since plants inner structure would not greatly vary. The flow of current within the plant is not well established presently. Current could be transmitted within the inner part of the stem (xylem and phloem) or at the surface of the stem (epidermis), or both. However, it is probable that the source of conductive loss could originate from the xylem or phloem vessels, which are filled continuously with ion-rich solutions, while the epidermis could act as a perfect dielectric medium.

Moreover, the time relaxation τ found in our experiments was comparable to previous estimates (Ozier-Lafontaine and Bajazet, 2005), and was notably comparable to the characteristic time relaxation τ of the electrical equivalent circuit relating root mass and C .

Unexplained variance in electrical estimation of root mass

In spite of ensuring a constant electrode placement (position on the stem, distance from the base of the stem), and beyond the inherited error of in-situ estimation of the root density using auger for woody species (Levillain *et al.*, 2011), we found that outliers of electrical values can have a high frequency of occurrence in such a type of electrical estimation. This is illustrated by the dispersion of C measures at the 4 growth stages, which range over two orders of magnitude (Figure 4), whereas such a broad dispersion is not expected in the roots. A robust linear estimator, as the Theil-Sen estimator, was required to obtain significant correlations. Nevertheless, the high number of sample allowed us to discard a number of observations up to

the breakpoint limit of the Theil-Sen estimator without leading to systematic, artificial correlation.

Application of capacitance for in situ root development monitoring

Determination of capacitance only appears to be a poorly effective tool for monitoring in situ root development in heterogeneous soil. In fact, the efficiency, estimated from correlation R^2 of parallel capacitance with root mass, varied with time (Figure 4b), and decreased after Z30, showing non-significant correlation ($R^2 = 0.10$ at Z39, and $R^2 = 0.30$ at Z65). In addition, the trend of the parallel capacitance at growth stages between Z39 and Z65 (Figure 4a) did not fit with the general root growth curve. Thus, a direct comparison between electrical measurements performed at different plant developmental stages may not lead to reliable estimates of root mass change. Interestingly, our conclusions about the performance of capacitance for monitoring the root development differ from recent pot experiments (Cseresnyés *et al.*, 2016). An important difference with our experiments concerns the soil water content during the measurements. Pots were watered at their base just before capacitance measurements, whereas our in situ measurements were performed within a large range of soil moisture levels.

These implications of the effect of the soil moisture and growth stages on electrical measurements could challenge conclusions of previous in situ experiments on wheat (Nakhforoosh *et al.*, 2014; Svačina *et al.*, 2014; Heřmanská *et al.*, 2015), because wet soil conditions were used on fully grown plants, i.e. in the measurement conditions leading to the poorest capacitance-based estimates of root mass in our field experiments. However, beyond the fact that capacitance is a proxy of the plant cross-sectional area at the water table, our conclusion on the minimum soil moisture required to perform accurate root estimation must

be ascertained. The soil electrical conductivity is linearly related to soil water content (Samouëlian *et al.*, 2005), but also to clay content (Shevvin *et al.*, 2007)—and related to its structure. Variations in the clay content can induce large variations in the conductivity. Lower clay content could greatly increase the maximum threshold of soil moisture, and give access to root sensing for roots located in wetter (or deeper) soil layers.

Application of IPPC model for root estimation through electrical method

In accordance with our IPPC model, the root mass was better sensed by reactance than capacitance at anthesis (Figure 5). This estimation of the root mass was enhanced by the low soil water content found in rainfed conditions (Figure 6d), leaving the shallow soil roots within an electrically resistive soil. Furthermore, as the water deficit increased, the performance of reactance as a proxy of the shallow root mass increased (Figure 6b). In contrast, under irrigated conditions, this performance of reactance for the shallow root biomass was lower, due to the higher electrical conductivity of soil.

These observations would imply that conductivity of root tissues is higher than conductivity of the dry soil. Surprisingly, the total root mass at anthesis under irrigated conditions displayed significant correlation with reactance ($R^2 = 0.50$). A sufficient difference between the conductivities of the soil and the root tissues could explain such a correlation. Although, in these irrigated conditions, the shallow root mass was indeed poorly estimated, even if the driest soil layers were located in the 0–40 cm.

Using reactance as a root mass proxy relies on the assumption that the root diameter does not vary significantly (eq. 23). In wheat crops, the mean root section does not greatly vary with depth (Fan *et al.*, 2016) and, its variance remains small (Munoz-Romero *et al.*, 2010). Thus,

with this low variance of root diameter, reactance remains a reliable proxy of root mass located in poorly conductive soil.

Depth of sensing in different soil conditions

The effect of soil moisture is shown through the comparison of irrigated and rainfed conditions, and by considering the surface and deep compartments of the root system. Accuracy of root estimation is poor in irrigated conditions, for shallow and deep roots. On the contrary, under rainfed conditions, the soil moisture was low in the 0–40 cm (mean moisture $\theta = 15.6 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$, Figure 6d), while significantly higher in the deeper soil layers. In these dry top soil conditions, the reactance estimation of root mass was highest ($R^2 = 0.63$), while in deep soil layer prediction was poorer ($R^2 = 0.29$). This efficiency in the shallow layers shows that root sensing via reactance requires a low conductivity medium, like a dry soil. Unfortunately, it appears that deep soil root mass would not be accessible to the electrical methods in this setting, due to the high conductivity of the surrounding soil because of its high water content.

It is worth to notice that estimation of the total root mass was fairly good. Indeed, the total root mass is dominated by the upper part of the root system (Fan *et al.*, 2016), and thus, largely estimated by the reactance of shallow root mass in dry soils. Thus, for sensing roots located deeper in deeper soil layers, forced dehydration might be a practical tool (via manipulations of irrigation, climatic conditions or by using a rain shelter). Additionally, in sandy soils exhibiting a low clay content, predictions of deep roots mass are expected to be more accurate.

In situ and greenhouse limitations for electrical root sensing

The growth stage seems a dominant factor in the accuracy of C as root mass estimator. Our experiments show that early—before Z39—wheat root mass was highly correlated to C . Soil water content was the second main factor in the accuracy of estimation. Most of the studies claim that C measurements must be performed with adjunction of water at the base of the stem, ensuring higher C values. In our experiments, early stage measurements were performed under wet soil conditions, whereas measurements at later stages were also performed under dry soil conditions, notably in the top soil.

Therefore, the design of electrical measurement campaign must consider the growth stage and the soil water content, as discussed below. In greenhouse conditions, when early growth stages representative of in-situ conditions and allometric relationship between characteristic dimensions of plants—are prominent, it appears that parallel capacitance should be used as a root mass sensor, in wet soil conditions only. In situ, later growth stages are accessible and allometric relationships involving root mass can differ depending on the applied treatment. Thus, if dry soil conditions can be achieved in the upper soil horizons, reactance could provide a valuable estimation of the shallow root mass.

However, in greenhouse conditions root studies could also rely on the use of large scale rhizotrons (Jeudy *et al.*, 2016), providing reliable and numerous rooting information. In situ surveys often emphasize the acquisition of deep soil moisture and nutrients (Manschadi *et al.*, 2010)—by roots at depth where this electrical method seems blind—, even though reduction of the shallow root mass could be aimed as a trait for drought resistance (Zhu *et al.*, 2005).

The use of electrical capacitance as a root estimator, and the derived methods proposed for crop breeding (Chloupek *et al.*, 2006; Svačina *et al.*, 2014; Heřmanská *et al.*, 2015), could be challenged by the IPPC model and our study showed that (i) the capacitance was related to the

plant cross-sectional area at the water table, (ii) the capacitance was poorly correlated with root mass at later developmental stages and (iii) the requirements of the IPPC model, namely a dry growth medium, were probably not attained since the soil was well watered before measurements. These innovative breeding results could have screened plant stem diameters, as found by Dietrich, and thus, indirectly of the root masses.

Nevertheless, this kind of electrical method, using the reactance as a proxy of root mass, would be applicable under drought conditions. This would make a valuable tool for breeding crops for drought resistance, applicable to rain-shelter studies for simulating drought or to drought-affected regions of the world such as the Mediterranean areas and semi-arid tropics. Moreover, these results suggest that alternative measurement setups should be considered to increase the fraction of output electrical current that have actually flowed through the roots, by for example, placing a point electrode (instead of a rod) deeper in the soil.

Conclusion

By considering also the resistive component, and emphasising the linear relation between electrical reactance and the total length of roots (a proxy of biomass for crops) located in low-conductivity soil layers (i.e. dry soil layers), we showed here that the new physical approach of the model is applicable to in situ wheat plants at reproductive stages. Under given circumstances, electrical reactance reached a determination coefficient on root mass equal to $R^2 = 0.63$, contributed mostly by the shallow roots (0–40 cm). Furthermore, electrical capacitance was poorly correlated with root mass at reproductive stages. In situ, the conditions required for a correlation with capacitance were a high soil moisture content coupled to measurement of plants at a relatively young stage of growth. Besides, it appears that the electrical capacitance was more correlated to shoot than to root mass.

By measuring impedance of young field-grown maize plants, we show that under wet soil conditions and at early developmental stage, the extended electrical model involving a complex permittivity medium was able to explain previously published results and satisfied a linear relation between plant material and the electrical conductance. Moreover, the relaxation time did not vary significantly with the plant mass, as predicted by the model. This indirectly supports the allometric origin of the relation between root mass and capacitance under these specific conditions.

Pot experiments with electrically contrasted substrates are required for the understanding of the variations in the linear relation involving capacitance effect. Moreover, greenhouse and in situ experiments should be designed for identifying requirement of the extended model to drought conditions' measurements, by quantifying precise soil conductivity threshold, and then the precise soil moisture threshold of this method for a given soil texture.

Nevertheless, the encouraging results with reactance for estimating shallow root mass under in situ drought conditions make the electrical reactance a valuable tool to be further studied and tested in plant breeding programs for drought resistance.

Acknowledgments

FP was funded by grants from the FSOV (French fund for plant breeding number FSOV 2012) involving INRA and ARVALIS–Institut du Végétal. The maize experiment was conducted with funding from the European Community Seventh Framework Programme FP7-KBBE-2011-5 under the grant agreement no.289300 (EURoot project). The authors thank the ARVALIS–Institut du Végétal technical team located in Gréoux-les-Bains as well as the

technical staff of the INRA UE Auzeville. Special thanks are also expressed to Arnaud Chapelet, Hanah Kuttler and Guillaume Meloux for their excellent assistance in the fieldwork and during the numerous root washing sessions at Gréoux-les-Bains, and to Didier Arnal and Esther Guillot at Auzeville.

References

- Asseng S, Ewert F, Martre P, et al.** 2014. Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature Climate Change* 5, 143–147.
- Atkinson D.** 2000. Root characteristics: why and what to measure. In: Smit AL., In: **Bengough AG, In: Engels C, In: van Noordwijk M., In: Pellerin S., In: van de Geijn SC, eds.** *Root methods: a handbook.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1–32.
- Aulen M, Shipley B.** 2012. Non-destructive estimation of root mass using electrical capacitance on ten herbaceous species. *Plant and Soil* 355, 41–49.
- van Beem J, Smith ME, Zobel RW.** 1998. Estimating root mass in maize using a portable capacitance meter. *Agronomy Journal* 90, 566–570.
- Brunelle T, Dumas P, Souty F, Dorin B, Nadaud F.** 2015. Evaluating the impact of rising fertilizer prices on crop yields. *Agricultural Economics* 46, 653–666.
- Chloupek O.** 1972. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum* 14, 227–230.
- Chloupek O.** 1977. Evaluation of size of a plants root-system using its electrical capacitance. *Plant and Soil* 48, 525–532.
- Chloupek O, Forster BP, Thomas WT.** 2006. The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 779–786.
- Cordell D, Drangert J-O, White S.** 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19, 292–305.
- Cseresnyés I, Rajkai K, Takács T.** 2016. Indirect monitoring of root activity in soybean cultivars under contrasting moisture regimes by measuring electrical capacitance. *Acta Physiologiae Plantarum* 38.
- Dalton FN.** 1995. In-situ root extent measurements by electrical capacitance methods. *Plant and Soil* 173, 157–165.
- Dietrich RC, Bengough AG, Jones HG, White PJ.** 2012. A new physical interpretation of plant root capacitance. *Journal of Experimental Botany* 63, 6149–6159.
- Ellis T, Murray W, Kavalieris L.** 2013a. Electrical capacitance of bean (*Vicia faba*) root systems was related to tissue density—a test for the Dalton Model. *Plant and Soil* 366, 575–584.
- Ellis TW, Murray W, Paul K, Kavalieris L, Brophy J, Williams C, Maass M.** 2013b. Electrical capacitance as a rapid and non-invasive indicator of root length. *Tree Physiology* 33, 3–17.
- Fan J, McConkey B, Wang H, Janzen H.** 2016. Root distribution by depth for temperate agricultural crops. *Field Crops Research* 189, 68–74.
- FAO of the United Nations.** 2015. *World fertilizer trends and outlook to 2018.* Rome: Food & Agriculture Organization of United Nations.

- Fernandes R, G. Leblanc S.** 2005. Parametric (modified least squares) and non-parametric (Theil–Sen) linear regressions for predicting biophysical parameters in the presence of measurement errors. *Remote Sensing of Environment* 95, 303–316.
- Heřmanská A, Středa T, Chloupek O.** 2015. Improved wheat grain yield by a new method of root selection. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 195–202.
- Judy C, Adrian M, Baussard C, et al.** 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.
- Kendall WA, Pederson GA, Hill RR.** 1982. Root size estimates of red clover and alfalfa based on electrical capacitance and root diameter measurements. *Grass and Forage Science* 37, 253–256.
- Levillain J, Thongo M’Bou A, Deleporte P, Saint-Andre L, Jourdan C.** 2011. Is the simple auger coring method reliable for below-ground standing biomass estimation in Eucalyptus forest plantations? *Annals of Botany* 108, 221–230.
- Løes A-K, Gahoonia TS.** 2004. Genetic variation in specific root length in Scandinavian wheat and barley accessions. *Euphytica* 137, 243–249.
- Lynch JP.** 2007. TURNER REVIEW No. 14. Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany* 55, 493.
- Lynch JP, St.Clair SB.** 2004. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crops Research* 90, 101–115.
- Manschadi AM, Christopher JT, Hammer GL, Devoil P.** 2010. Experimental and modelling studies of drought-adaptive root architectural traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 144, 458–462.
- Munoz-Romero V, Benítez-Vega J, López-Bellido L, López-Bellido RJ.** 2010. Monitoring wheat root development in a rainfed vertisol: Tillage effect. *European journal of agronomy* 33, 182–187.
- Nakhforoosh A, Grausgruber H, Kaul H-P, Bodner G.** 2014. Wheat root diversity and root functional characterization. *Plant and soil* 380, 211–229.
- Ozier-Lafontaine H, Bajazet T.** 2005. Analysis of root growth by impedance spectroscopy (EIS). *Plant and Soil* 277, 299–313.
- Peñuelas J, Poulter B, Sardans J, et al.** 2013. Human-induced nitrogen–phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature Communications* 4.
- Postic F, Doussan C.** 2016. Benchmarking electrical methods for rapid estimation of root biomass. *Plant Methods* 12.
- Preston GM, McBride RA, Bryan J, Candido M.** 2004. Estimating root mass in young hybrid poplar trees using the electrical capacitance method. *Agroforestry Systems* 60, 305–309.

- Rich SM, Watt M.** 2013. Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *Journal of Experimental Botany* 64, 1193–1208.
- Samouëlian A, Cousin I, Tabbagh A, Bruand A, Richard G.** 2005. Electrical resistivity survey in soil science: a review. *Soil and Tillage Research* 83, 173–193.
- Sen PK.** 1968. Estimates of the Regression Coefficient Based on Kendall's Tau. *Journal of the American Statistical Association* 63, 1379–1389.
- Shevnin V, Mousatov A, Ryjov A, Delgado-Rodriguez O.** 2007. Estimation of clay content in soil based on resistivity modelling and laboratory measurements. *Geophysical Prospecting* 55, 265–275.
- Svačina P, Středa T, Chloupek O.** 2014. Uncommon selection by root system size increases barley yield. *Agronomy for sustainable development* 34, 545–551.
- Theil H.** 1950. A Rank Invariant Method of Linear and Polynomial Regression Analysis. *Nederlandse Akademie Wetenschappen Series A.* 53, 386–392.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL.** 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20260–20264.
- Wasson AP, Richards RA, Chatrath R, Misra SC, Prasad SS, Rebetzke GJ, Kirkegaard JA, Christopher J, Watt M.** 2012. Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. *Journal of experimental botany* 63, 3485–3498.
- Weiner J, Thomas SC.** 1992. Competition and allometry in three species of annual plants. *Ecology*, 648–656.
- Zhang Z-S, Li X-R, Wang T, Wang X-P, Xue Q-W, Liu L-C.** 2008. Distribution and Seasonal Dynamics of Roots in a Revegetated Stand of *Artemisia ordosica* Kracsh. in the Tengger Desert (North China). *Arid Land Research and Management* 22, 195–211.
- Zhu J, Kaeppler SM, Lynch JP.** 2005. Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*). *Functional Plant Biology* 32, 749–762.

Résultats complémentaires

L'échantillonnage de biomasse racinaire par prélèvements étant lui-même sujet à une certaine variabilité, la puissance d'estimation de la biomasse racinaire à partir de la réactance pourrait être en réalité plus grande. En utilisant la réactance en tant que proxy de la biomasse racinaire, nous pouvons évaluer la pertinence de son utilisation en conditions pluviales ou irriguées, et nous pouvons juger de la quantité de répliques à effectuer pour discriminer des effets liés aux génotypes ou aux traitements de fertilisation.

La variabilité intra-groupe (plantes du même génotype cultivées dans les mêmes conditions) de ces mesures de réactance peut être jugée à travers une analyse de variance (ANOVA), à un stade donné, par exemple ici floraison. En supposant que la distribution des valeurs de réactance dans une parcelle suit une distribution normale, on constate que les données permettent de déterminer un effet de la variété sur la réactance uniquement en pluvial (Tableau Supp.1). Ceci indique que la variance des mesures est suffisamment faible pour distinguer au moins deux groupes parmi les variétés. Dans notre cas seul Apache obtient des mesures statistiquement différentes des trois autres variétés. En extrapolant les résultats pour un nombre plus grand d'échantillons, qui suivent la même distribution statistique que nos mesures expérimentales, il est possible d'évaluer l'effet de l'augmentation du nombre de mesures par parcelle sur la possibilité de distinguer des génotypes (Tableau Supp.1).

À floraison, la réactance est un estimateur de la biomasse, uniquement en conditions de sol peu humide. En effet, en conditions irriguées, nous constatons une absence d'effets significatifs du génotype ou de la fertilisation sur les mesures de réactance. Ceci est caractéristique d'une variabilité élevée des mesures de réactance dans une même situation. Nous pouvons en déduire que les mesures de réactance sont dominées par d'autres facteurs (erreurs de mesures liées au mauvais contraste électrique) que le génotype et l'apport en

intrants. Dans ces conditions irriguées, il est alors impossible d'estimer des valeurs de réactance spécifiques à des génotypes, empêchant toute forme de sélection avec un critère basé sur la réactance.

L'analyse de variance des mesures de réactance en conditions pluviales donne les limites de la précision actuelle de cette méthode. En effet, l'apport d'azote induit une augmentation de la masse racinaire superficielle, et devrait avoir un effet significatif sur les mesures de réactance — celle-ci étant un estimateur de la biomasse racinaire des couches superficielles du sol. En conditions pluviales, nous constatons un effet significatif de l'azote sur nos mesures de réactance, issues de 6 mesures par situation. Toutefois, en simulant les tirages aléatoires, il devrait être impossible de constater un effet de l'apport azoté avec 6 échantillons. Il est probable que nos 6 mesures représentent le cas où la dispersion des mesures est faible. D'après nos tirages aléatoires en conditions pluviales, un effet significatif de l'azote serait mesurable à partir de 16 échantillons. Afin de réduire la source inexplicée de la variance des mesures, il faut améliorer la corrélation entre réactance et masse racinaire. Celle-ci est dominée par le contraste électrique sol–racine, qui dépend principalement de l'humidité du sol. L'utilisation de la réactance doit donc tenir compte des variations locales d'humidités.

Tableau Supp.1. Analyse de variance ANOVA de l'effet du génotype (G), de la fertilisation azotée (N) et de l'irrigation (I) sur la réactance échantillonnée au champ (†) et sur des échantillons simulés. La population de mesures de réactance simulées suit une distribution normale ayant pour moyenne et écart type celle de la population mesurée au champ. Les résultats présentés sont des moyennes sur 100 tirages aléatoires.

Traitement		Nombre de mesures <i>n</i> par parcelle					
		6 [†]	6	9	12	16	21
Source de la variance	Génotype	NS	NS	.	.	*	*
	Fertilisation	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Irrigation	**	**	***	***	***	***
	G×N	NS	.	*	**	**	***
	G×I	.	**	**	**	***	***
	N×I	*	.	.	*	*	**
	G×N×I	NS	NS	*	**	**	**
Conditions irriguées	Génotype	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Fertilisation	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	G×N	.	*	**	***	***	***
Conditions pluviales	Génotype	*	**	***	***	***	***
	Fertilisation	*	.	.	.	*	**
	G×N	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NS	non significatif						
.	p < 0.1						
*	p < 0.05						
**	p < 0.01						
***	p < 0.001						
†	Mesures in situ						

Conclusions

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du développement méthodologique d'outils de phénotypage racinaire, destinés à la sélection végétale du blé au champ. Les points déjà abordés dans la discussion des chapitres précédents ne sont pas tous repris dans cette partie. L'accent est mis ici sur l'apport des méthodes exposées à la caractérisation des traits racinaires, sur la fiabilité de ces méthodes et sur les développements à réaliser pour une utilisation à plus grande échelle. Enfin quelques résultats complémentaires, non-publiés, sont présentés afin de montrer des perspectives d'application à la sélection végétale.

Bien que les minirhizotrons soient des outils invasifs, ils permettent un suivi direct des dynamiques de croissance des systèmes racinaires. Ils nous ont ainsi permis de mettre en évidence la réaction du système racinaire du blé en condition de faible apport en azote, à l'aide de suivis de croissance dans des situations de cultures contrastées.

Les expériences menées sur le site expérimental de Gréoux-les-Bains durant la saison 2014-2015 montrent un résultat étonnant concernant les rendements : les rendements en conditions de stress hydrique seul sont inférieurs à ceux obtenus s'il y a à la fois stress hydrique et azoté. À travers les données racinaires fournies par les minirhizotrons, il apparaît que l'apparition d'un stress de fertilisation azoté pendant la période végétative peut induire, suivant les variétés, la mise en place d'un système racinaire colonisant plus la profondeur. La distribution des racines, notamment celle des racines profondes, semble être liée à la capacité des plantes à résister à la sécheresse (Lopes M.S. and Reynolds M.P., 2010). Ce type de phénomène a pu être quantifié et mesuré grâce à l'aspect non destructif de cette méthode.

La fiabilité de l'estimation de la masse racinaire, au-delà de la couche 0-30 cm, à partir des minirhizotrons à capteurs CCD de type scanner pourrait être conférée par la possibilité d'échantillonner un grand volume de sol, sans qu'il soit nécessaire de corriger les aberrations

optiques des caméras vidéo grand angle utilisées dans les technologies précédentes. De plus, la conversion de ces mesures en une mesure équivalente en prélèvement de biomasse semble simple, à condition de réduire les biais inhérents à la méthode. La conversion des mesures surfaciques des racines issues des minirhizotrons, basée sur un concept de mesure de volume équivalent, nous a permis d'évaluer une dynamique cohérente d'allocation du carbone entre les parties aériennes et les parties souterraines, à travers le ratio masse racinaire/masse aérienne. Néanmoins, il est confirmé ici un problème récurrent de l'utilisation des minirhizotrons dans les cultures qui est l'aspect biaisé des données obtenues dans les couches les plus superficielles du sol (Liao et al., 2015; Munoz-Romero et al., 2010), les racines situées dans les couches de sols situés à 0–30 cm de la surface étant largement sous-estimées. Ce biais est probablement dû à la méthode d'installation des tubes minirhizotrons et peut avoir plusieurs sources : un interstice en surface entre tube et trou, créé lors du forage, laisserait pénétrer de la lumière induisant une inhibition de la croissance racinaire près du tube ; l'échauffement de la partie émergée des tubes exposés aux rayons lumineux pourrait provoquer un contraste thermique entre le tube et le sol perturbant la croissance racinaire ; enfin les plants situés à proximité de la zone d'insertion du tube pourraient être perturbés par la présence du tube à cause d'une compaction locale du sol. Dans nos essais, afin d'éviter les effets liés à la radiation solaire (lumière et échauffement), les tubes ont été isolés thermiquement à l'aide de matériaux isolants et réfléchissants à l'extérieur des tubes et avec des mousses isolantes placées à l'intérieur des tubes sur les 40 premiers centimètres. Malgré ces contre-mesures, les minirhizotrons sous-estiment largement les systèmes racinaires sur les 30 premiers centimètres.

Les traits observables à travers les minirhizotrons sont principalement liés à la morphologie, la distribution et la croissance du système racinaire dans le sol mais concernent peu sa physiologie. En particulier, cette technique facilite l'accès à ces traits morphologiques et de

croissance pour les couches profondes du sol. Chez les céréales, notamment le blé, cette partie profonde du système racinaire est jugée cruciale dans la résistance à la sécheresse, comme cela a été abordé dans le deuxième chapitre. Quantifier les racines profondes est important pour des problématiques autres que la résistance au stress hydrique, tels le stockage du carbone dans le sol pour lequel la mortalité des racines est un élément essentiel (Rytter and Hansson, 1996), ou l'étude de la plasticité du système racinaire face au stress azoté (Rasmussen et al., 2015). Le diamètre des racines est lui aussi quantifiable, même à basse résolution (300 ppp). Cela permet de remonter à la fois à des traits liés à la capacité d'extraction des nutriments et de l'eau du sol (à travers la surface racinaire) et à la plasticité (avec la distribution des diamètres en fonction de la longueur) et également de fournir un apport dans la modélisation de l'architecture racinaire où les diamètres sub-apicaux et le ratio de diamètres entre une ramification et sa racine mère sont des indicateurs de la potentialité de croissance des racines et des paramètres de modèle d'architecture racinaire tel ArchiSimple (Pagès et al., 2014).

Cependant plusieurs limites techniques freinent l'emploi à grande échelle des minirhizotrons modernes de type scanner pour du phénotypage. Ces limites sont de différents ordres : la pose des tubes, l'acquisition des images, le traitement des images. Ce dernier est le goulet d'étranglement majeur à un tel emploi. Malgré l'existence de nombreux algorithmes de détection automatique (Clark et al., 2011; Galkovskyi et al., 2012; Pierret et al., 2013; Bucksch et al., 2014) des systèmes racinaires en milieux artificiels (permettant un contraste maximal entre les racines et le fond de l'image), aucun n'est vraiment applicable à la détection de racines sur des images acquises *in situ*, en particulier pour les images de grandes dimensions acquises par les minirhizotrons modernes. Les algorithmes d'aide aux tracés (Lobet et al., 2011) réduisent tout de même le temps de traitement par rapport aux outils de

tracés manuels (Le Bot et al., 2009), mais ce procédé semi-automatique reste cependant chronophage.

Au-delà de la détection automatique, il n'existe pas encore de solution prête à l'emploi pour l'exploitation des données issues du traitement d'image, malgré la standardisation de la nomenclature des images collectées. La quantité de données issue d'un seul tube est telle qu'il est absolument nécessaire au chercheur d'implémenter un traitement automatisé. En effet, le logiciel Smartroot (Lobet et al., 2011) utilisé pour nos tracés semi-automatique de racines n'est pas conçu pour les minirhizotrons. L'ajout de quelques fonctionnalités dans le traitement des données issues du traçage est nécessaire pour une application aux données de minirhizotrons. Nous avons dû concevoir une chaîne de traitement qui concatène les longueurs mesurées sur les images issues de chaque tube, afin de reconstruire les profils d'enracinement. La concaténation donne ici des mesures avec un pas de profondeur égal à la taille de fenêtre de mesure. Néanmoins, un pas plus petit est envisageable en exploitant les données de position de chaque racine issues du traçage. L'effort de standardisation du format des données de traçage (Lobet et al., 2015) s'inscrit déjà dans une volonté de simplifier la conception de chaînes de traitement.

Les défis posés par le traitement des images issues des scans des tubes ne sont pas encore résolus. Le défi principal réside en la présence d'éléments du sol, ayant des teintes et des diamètres similaires à ceux des racines, qui sont détectés à tort comme des racines, engendrant des faux positifs. Afin de poursuivre la segmentation, les caractéristiques des faux positifs (et des vrais positifs) pourraient être déterminées à l'aide des méthodes d'apprentissage machine supervisé utilisées dans d'autres problématiques de traitement d'image (Sommer and Gerlich, 2013). Les tracés effectués sur nos nombreuses images (environ 1000 images) peuvent servir de base d'apprentissage afin d'ajuster les paramètres d'algorithmes de traitement créés par le chercheur (apprentissage statistique) ou ceux

d'algorithmes d'apprentissage automatique (apprentissage profond). En plus de la quantification de la densité de longueur, de la surface et de la distribution de diamètres, la détection automatique des racines pourrait permettre un suivi de leur mortalité, à l'aide des changements de teintes au cours du temps, par exemple dans la phase post-floraison du blé, pour suivre les effets du changement d'allocation vers le grain des assimilats issus de la photosynthèse et des réserves carbonées situées dans les racines (Gebbing et al., 1998).

La mise en place des dispositifs de mesure demande aussi à être automatisée afin de pouvoir être déployée à plus grande échelle. La variabilité dans le forage du sol effectué par les différents expérimentateurs à la tarière manuelle peut provoquer des artéfacts dans la densité racinaire mesurée. La mécanisation des forages pourrait pallier ce défaut, en augmentant la répétabilité (et la vitesse), à condition de forer en biais. L'utilisation de machines impliquera que la pose des tubes devra être effectuée peu de temps après le semis, afin d'éviter de perturber le sol des parcelles et d'écraser les plants ou de recourir à un dispositif spécifique (chenillette par exemple).

Il reste une grande marge de progression pour le déploiement à plus grande échelle des techniques minirhizotrons. Les objectifs de suivis dynamiques impliquent d'avoir au moins un capteur sur chaque parcelle instrumentée, ce qui nécessite d'adapter les outils existant à des fins de monitoring. Le matériel de mesure, aujourd'hui utilisé, met en œuvre des capteurs très répandus. Ces capteurs CCD sont précisément ceux disponibles dans les scanners d'imprimantes de bureau, montés sur un moteur rotatif instrumenté par un ordinateur portable.

Pour adapter cette méthode à une utilisation en suivi automatisé, il est nécessaire, d'une part, de mettre au point un système de position automatique afin d'obtenir des prises de vues sur tout le long de l'axe des tubes (cette manœuvre étant actuellement effectuée par l'opérateur)

et d'autre part, de doter les capteurs minirhizotrons d'une capacité de communication des données. Ces évolutions semblent possibles, compte tenu du développement des objets connectés et de l'automatisation, à l'instar des plateformes de réseaux de capteurs mesurant l'humidité du sol et la température de l'air et du sol (Bitella et al., 2014), développés pour l'agriculture de précision.

Les données des profils racinaires sont riches en informations et ne forment pas un paramètre/indice unique. Une approche similaire à celle utilisée dans le domaine du phénotypage des parties aériennes pourrait simplifier l'utilisation de ces données, en réduisant leur dimension, autrement dit en réduisant un vecteur de points qui caractérisent un profil racinaire en un scalaire ou un indice. Ces profils sont l'équivalent des spectres issus de l'imagerie des parties aériennes. La réduction de tels profils à quelques traits caractéristiques simplifierait leur utilisation en sélection végétale.

L'observation des profils racinaires indique que la distribution en profondeur des racines, et pas seulement leur quantité totale, est un paramètre important.

En considérant la profondeur médiane de densité racinaire observée en minirhizotrons (autrement dit, la profondeur à partir de laquelle 50% des racines ont été observées) une analyse de variance (ANOVA) fait apparaître un effet lié à la variété et à son interaction avec le traitement azoté, invisible en ne considérant que la densité moyenne de racines (Tableau 1). Par exemple, l'essai 2015 montre que certaines variétés résistent mieux à la sécheresse, notamment lorsqu'elles sont privées d'apport en azote.

Ici très peu de réplifications sont considérées. Avec une plus grande variété d'enracinements et de réplifications, il serait possible d'utiliser des paramètres/descripteurs qui pourraient décrire les aspects d'amplitude, de localisation, d'asymétrie des profils d'enracinement, à l'image des techniques de statistique descriptive.

L'extension de minirhizotrons à un contexte de monitoring à plus grande échelle, pour des applications de phénotypage « moyen débit » semble donc envisageable. Une fois les algorithmes de traitement d'image conçus, les traits globaux des systèmes racinaires seraient plus aisés d'accès. La pertinence des traits visés dans un contexte de sélection donné (résistance à la sécheresse, réduction/augmentation de la taille des systèmes racinaires) pourra être évaluée à partir de modèles de culture incluant une modélisation du compartiment racinaire. Toutefois, les structures les plus fines des systèmes racinaires, par exemple les mycorhizes et poils racinaires, restent difficiles d'accès et la biomasse n'est estimée qu'à travers le volume des racines. Pour l'heure, aucun moyen de mesure adapté à une utilisation au champ ne permet la mesure simultanée de la masse et de la morphologie du système racinaire. Néanmoins, des prélèvements destructifs peuvent être complémentaires des mesures minirhizotron. Les prélèvements destructifs permettent de mesurer la masse linéique des racines et l'enracinement superficiel, pendant que les minirhizotrons donnent accès aux couches profondes en apportant un aspect dynamique. De plus une calibration à une profondeur donnée entre la masse racinaire obtenue par prélèvement destructif et le volume des racines mesuré au minirhizotron permet d'estimer la masse des racines situées en couches profondes.

Tableau 1. Analyse de variance ANOVA de l'effet du génotype (G) et de la fertilisation azotée (N) sur la densité surfacique de longueur racinaire moyennée sur la longueur de chaque tube minirhizotron et sur la profondeur médiane des profils racinaires. Effectuée sur les données du chapitre 2 uniquement sur Miradoux (*Triticum durum*) et Apache (*Triticum aestivum*).

Traitement		Densité surfacique de longueur racinaire	Profondeur médiane
Source de la variance	Génotype	NS	*
En Conditions pluviales uniquement	Fertilisation	.	NS
	G×N	NS	*
NS	non significatif		
.	p < 0.1		
*	p < 0.05		
**	p < 0.01		
***	p < 0.001		

Les méthodes basées sur les propriétés électriques des plantes ont l'avantage d'être non-invasives et non destructives, mais la fiabilité de ces mesures et des théories sous-jacentes sont mises en question.

D'après nos expériences *in situ* (cf. chapitre 3) et de récentes études, la capacité électrique ne serait pas un estimateur direct de la biomasse de racine, mais reposerait plutôt sur une relation allométrique entre la section de la base de la tige et la masse du système racinaire. Dans ce

cas, la relation allométrique reliant la capacité électrique à la biomasse racinaire semble être variable *in situ*, en particulier une fois le stade végétatif dépassé. Dans nos mesures, l'absence de relation entre la capacité électrique et la masse racinaire aux stades reproductifs rend alors discutable l'usage de la capacité électrique pour prédire la biomasse racinaire. Ce type de résultats remet en cause la fiabilité de la théorie principale élaborée par Dalton (1995) à partir des résultats empiriques de Chloupek (1977). Toutefois, en exploitant la théorie formulée par Dietrich (2012), dans le chapitre 3, nous montrons que la réactance pourrait être un estimateur de la biomasse racinaire, principalement dans les couches superficielles du sol, lorsque l'humidité du sol est faible, et que le diamètre des racines a une assez faible variance. De plus, les résultats complémentaires du chapitre 3 indiquent que la variabilité intra-cultivar de la réactance est suffisamment faible pour que l'on puisse identifier des effets liés au génotype.

Le développement des techniques basées sur l'impédance nous semble limité actuellement en raison de l'absence d'un modèle électrique complet d'une plante en situation de culture. L'impédance des différents tissus composant la plante n'est pas déterminée, à l'instar du passage exact du courant dans un sol hétérogène partiellement asséché. Une mesure du spectre électrique des tissus racinaires de la plante ajouterait à l'élaboration et la compréhension d'un modèle électrique équivalent. Ce dernier pourrait permettre d'identifier les composantes du spectre les plus en lien avec la masse racinaire. En ayant en complément un modèle de variation d'impédance (principalement de résistivité) des sols en fonction de leur teneur en eau, il sera possible de définir la plage d'humidité dans laquelle le contraste électrique est suffisant pour prédire la biomasse racinaire. Les développements sur l'utilisation du spectre électrique fait partie des objectifs du chapitre 1, à travers l'étude de l'effet de la fréquence sur la corrélation entre biomasse racinaire et capacité (et les autres variables électriques). Cependant les mesures ont été effectuées sur des plantes dans un sol humide, cette configuration donnant un poids primordial à la partie proximale des racines à

cause de la forte conductivité du sol. Les spectres électriques ne pourraient concerner alors principalement les tissus de la base de la tige et la partie proximale du système racinaire. La variation de la qualité de l'estimation de la masse racinaire en fonction de la fréquence du courant proviendrait alors pour partie de la variation de la relation allométrique liant la section de la tige et des racines à sa base et la capacité mais également du fait, dans des plages de fréquences où le sol contribue plus fortement à la capacité totale, d'une moindre sensibilité de la relation section de tige et racines à la base – capacité électrique. Malgré ces limitations relatives aux méthodes expérimentales et à la théorie utilisée, plusieurs études ont eu pour objet l'application de la technique (en utilisant la capacité électrique) à des fins de monitoring ou de sélections. Récemment, la capacité électrique a été utilisée pour le suivi de la biomasse racinaire de plants de soja, cultivés en pots, pour suivre l'effet du stress hydrique sur la dynamique de croissance du système racinaire (Cseresnyés et al., 2016). Dans un cadre de sélection variétale, une analyse de variance (Chloupek et al., 2006) sur 158 génotypes d'orges (*Hordeum vulgare*), avec seulement 3 répétitions de mesures de capacité électrique — jugée dans l'étude comme un estimateur fiable de la biomasse racinaire — par génotype a permis de déterminer des locus de caractères quantitatifs (QTL) liés aux mesures de capacité électrique. Il ressort que les QTLs détectés par ces mesures de capacité sont des zones du génome associées à des traits aériens (notamment nanisme et rapport grain sur paille). De même, la sélection sur ce même critère de capacité électrique (C_p), montre que le caractère lié à des valeurs de C_p élevées chez les plantes est transmissible de façon héréditaire chez le blé (Heřmanská et al., 2015) et l'orge (Svačina et al., 2014). Les auteurs constatent que les lignées à haute capacité électrique possèdent aussi de meilleur rendement en conditions optimales.

Ces expérimentations sont effectuées systématiquement dans des sols humides. Ceci implique que la capacité électrique est un estimateur du diamètre de la tige à sa base ou de la section

des racines à l'interface sol air, et non directement de la biomasse des racines d'une plante (Dietrich et al., 2012). Donc les traits transmis, et les QTLs détectés pourraient être en lien avec le diamètre de la tige ou la partie proximale du système racinaire. La corrélation entre les rendements des plants de blé et les mesures de capacité pourraient s'expliquer par l'inter-corrélation de plusieurs traits. Chez le blé, la masse des parties aériennes est corrélée au rendement (Reynolds et al., 1999), et plus largement il existe une relation allométrique entre diamètre de la tige et biomasse des plantes (Niklas, 1993).

À l'inverse des mesures de capacité électrique, la réactance est un estimateur direct de la longueur racinaire, et par extension de la biomasse. L'application au champ de la réactance en tant qu'estimateur de biomasse, requiert des informations sur l'état d'humidité du sol, et son efficacité *in situ* est dépendante des conditions climatiques en l'absence de mise à l'abri de la pluie. Bien que la technique actuelle ne soit pas automatisée, plusieurs plantes pourraient être suivies en multiplexant les mesures d'impédance sur des plantes localisées autour d'un pont de mesure RLC et des (micro)parcelles expérimentales pourraient être équipées de ce type de système au même titre que des capteurs environnementaux.

Dans le premier chapitre de la thèse, nous avons identifié quelques aspects expérimentaux pratiques de la méthode basée sur l'impédance — il n'est pas nécessaire d'utiliser des aiguilles pour transmettre le courant — et nous avons évalué l'effet des sols de classes texturales différentes sur l'estimation de la biomasse racinaire par mesure électrique. Ces développements sur la méthodologie contribuent à son extension comme moyen de mesure à plus grande échelle. Le matériel de mesure électrique nécessaire, un pont RLC portable programmable tel le Red Pitaya, est actuellement disponible à un coût relativement faible. Puisqu'un système de mise en contact électrique mobile est difficilement concevable, l'utilisation d'un réseau de capteurs fixes au sol est à préférer à l'embarquement de capteurs dans un véhicule de phénotypage.

D'après nos résultats, la réactance est un proxy de la biomasse racinaire applicable uniquement en conditions de sécheresse, mesurant plutôt la partie superficielle du système racinaire dans la zone sèche. À première vue, la réactance paraît inadaptée dans les études sur la résistance à la sécheresse du blé, puisque celles-ci se focalisent souvent sur l'acquisition par le système racinaire de l'humidité et des nutriments situés plus en profondeur (Manschadi et al., 2010). Cependant, chez le maïs, il apparaît qu'une réduction de la masse racinaire superficielle pourrait induire une résistance à la sécheresse (Zhu et al., 2005). Ce type de mécanisme pourrait être présent chez le blé, faisant ainsi de la réactance un outil intéressant de sélection des cultures pour la résistance à la sécheresse. La technique pourrait être applicable aux études utilisant des abris anti pluie pour simuler des sécheresses ou aux régions touchées par la sécheresse, telles que les zones méditerranéennes et tropicales semi-arides.

Au final, les mesures de propriétés des systèmes racinaires en plein champ par des méthodes indirectes ne peuvent pas s'affranchir d'un effet sol. En effet, dès que l'on utilise un signal injecté : propagation d'onde (ondes électromagnétiques, comme le géoradar, ou mécaniques, comme en sismique) ou une conduction (conductivité électrique en tomographie de résistivité électrique, ou mesures capacitives...), le sol va fortement conditionner le signal transmis et donc le contraste et la résolution des mesures en relation avec les racines. Ainsi, l'humidité du sol joue un rôle prépondérant dans la détection des racines à l'aide d'ondes électromagnétiques ou avec les méthodes capacitives et il en est de même pour la teneur en argile des sols. À l'avenir, pour la quantification *in situ* des racines, il serait nécessaire d'avoir une caractérisation plus fine des propriétés physiques des sols afin d'évaluer l'influence du sol sur l'emploi des techniques électriques indirectes et ainsi mieux définir les situations propices à la détection de racines.

Les mesures invasives, mais plus directes, étant moins sujettes à l'hétérogénéité physique du sol semblent pour leur part plus à même de contribuer rapidement à la sélection variétale. Aux stades jeunes de développement, la croissance et la morphologie des systèmes racinaires sont en train de devenir accessibles avec les serres automatisées et des phénotypes racinaires peuvent déjà être testés dans ces conditions. Le test au champ de ces phénotypes en nombre plus réduit, sur des durées plus longues, en situations de multi-contraintes pour la plante et sur des stades plus avancés pourra s'enrichir des données racinaires avec ces méthodes plus invasives, telles que les minirhizotrons. Cependant, ceci serait à pondérer en fonction d'une possible faible héritabilité des traits racinaires, où de multiples gènes pourraient entrer en jeu, nécessitant un débit expérimental (en nombre d'individus plantes et parcelles) pour identifier les gènes liés aux traits d'intérêts dépassant les possibilités actuelles des méthodes invasives.

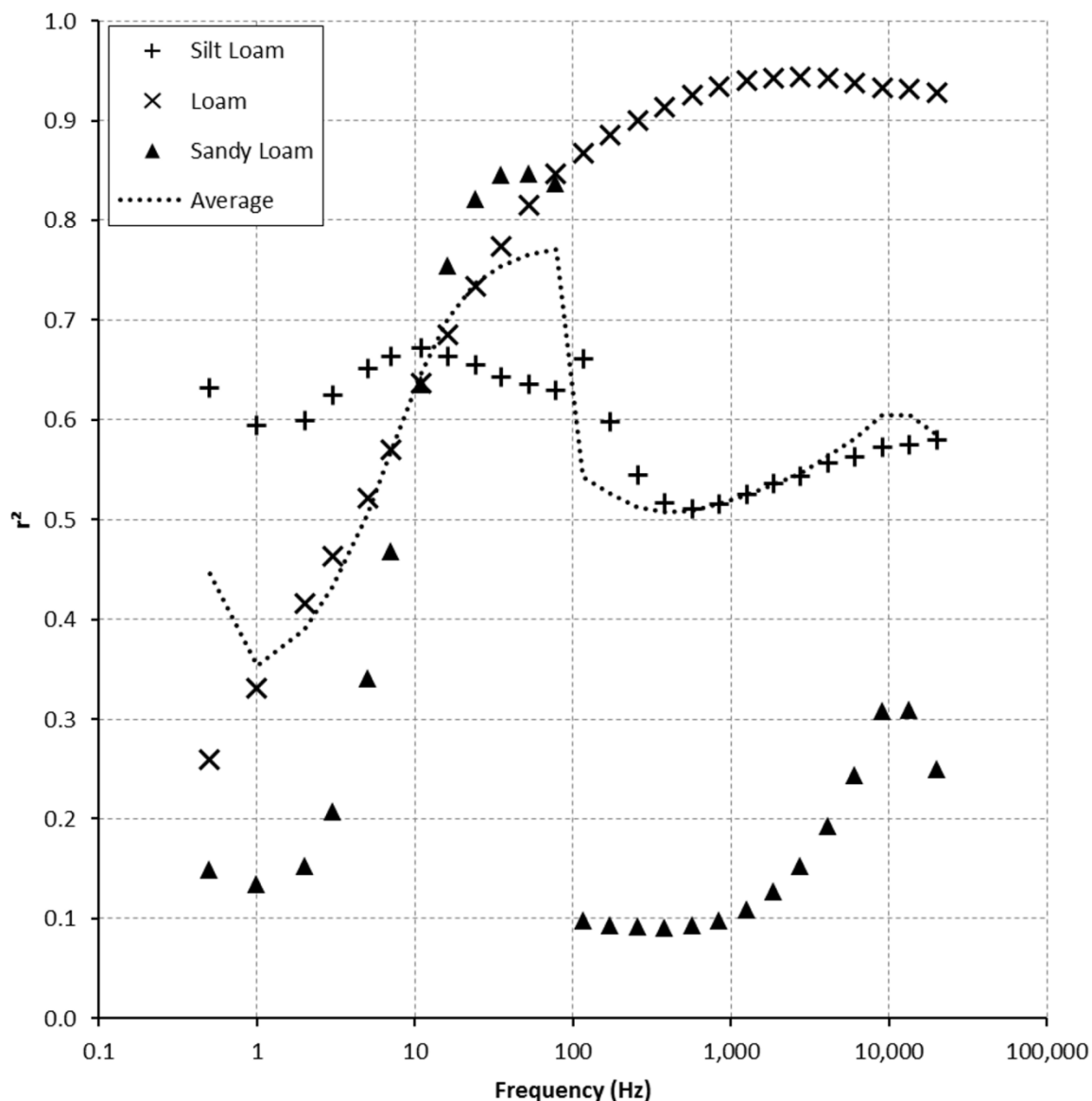
Annexes

Annexe au chapitre 1

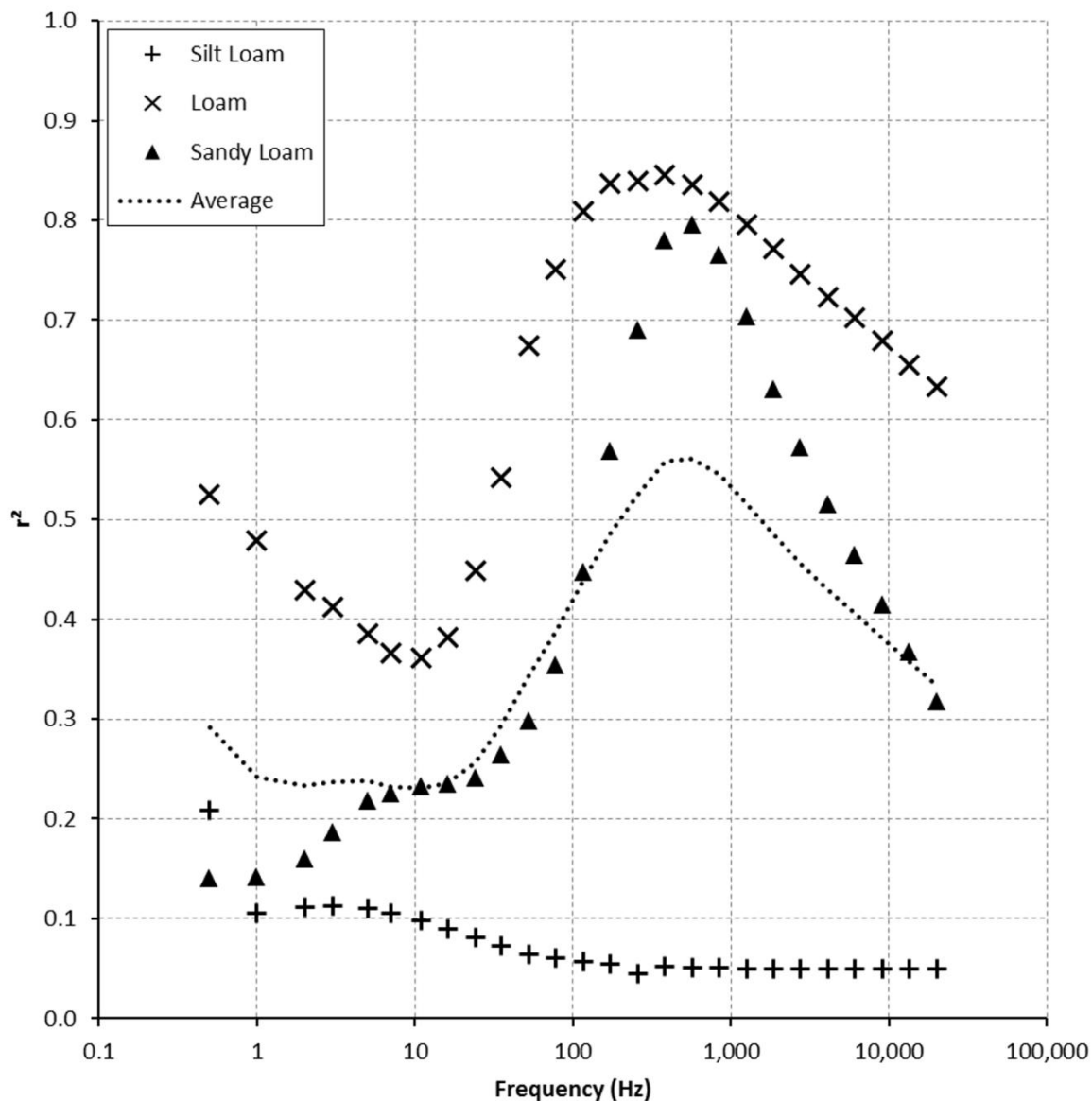
Additional file 1: Table S1 (.doc). Sensitivity score details and linear regression parameters between root dry mass and each electrical variable. The table lists the maximum determination frequency (f_{max} , Hz), sensitivity scores, maximum of coefficient of determination with root dry mass (r^2_{max}), y-intercept of the linear regression (in standard unit of the related electrical variable) and slope (in standard unit of the related electrical variable per g) for parallel capacitance (Cp), serial capacitance (Cs), parallel resistance (Rp), serial resistance (Rs), conductance magnitude (G), impedance magnitude (Z), reactance (X) and impedance phase angle (θ) in 2T, 3T and 4T configurations, on average for 3 soil types.

Table S1.

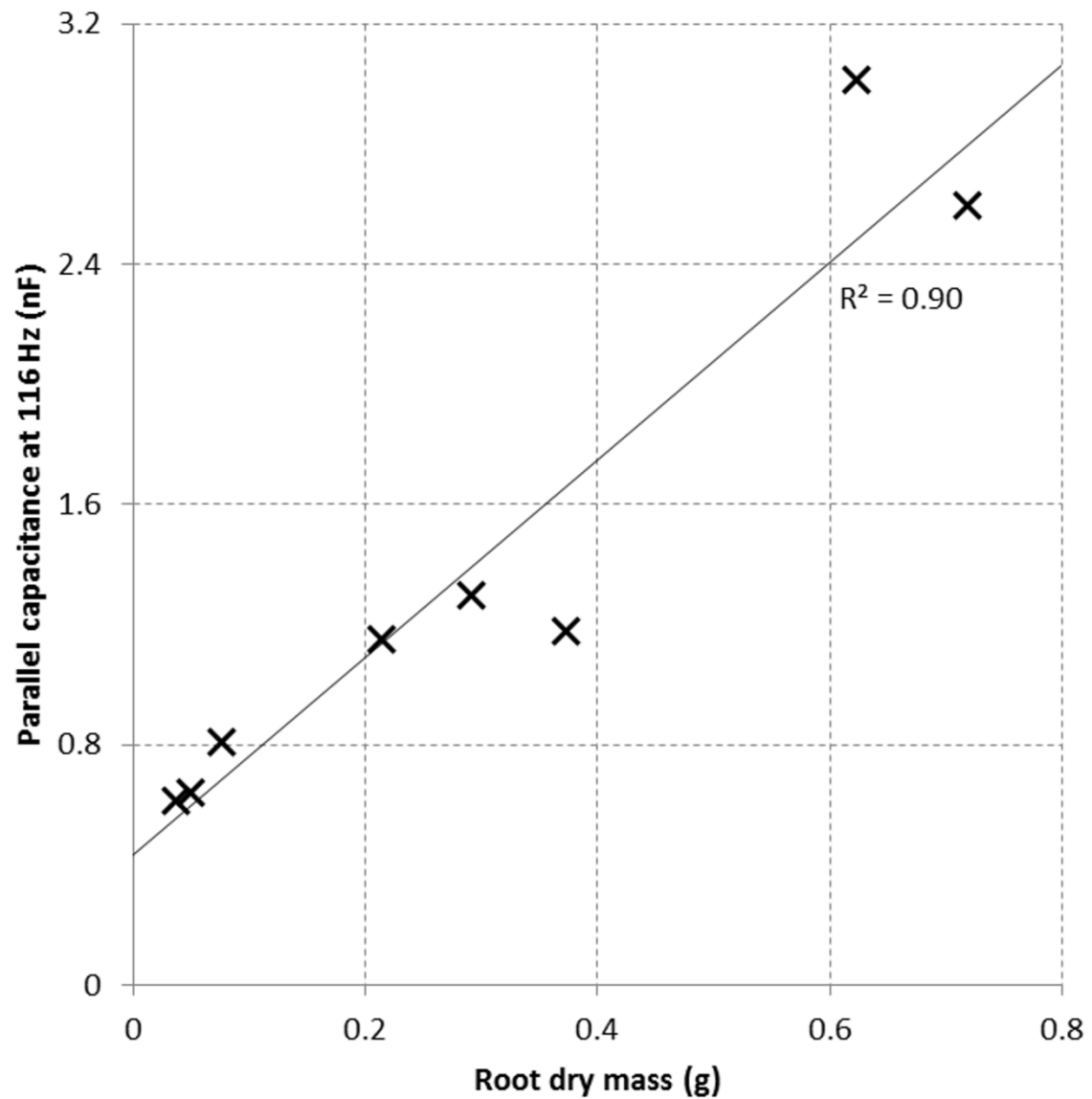
Electrical variable	Terminal configuration	f_{max} (Hz)	r^2_{max}	Sensitivity score	y-Intercept	Slope
Cp	2T	78	0.771	0.71	3.8E-10	4.6E-09
	3T	116	0.787	0.72	3.7E-10	4.2E-09
	4T	566	0.560	0.45	1.3E-08	-6.6E-08
Cs	2T	3	0.520	0.48	1.4E-06	1.7E-05
	3T	6,094	0.754	0.69	2.0E-10	2.3E-09
	4T	20,000	0.353	0.28	7.7E-09	-3.6E-08
Rp	2T	78	0.657	0.44	6.0E+05	-1.8E+06
	3T	841	0.797	0.53	3.1E+05	-9.5E+05
	4T	9,056	0.377	0.00	1.6E+04	-7.3E+03
Rs	2T	9,056	0.642	0.45	1.9E+05	-6.4E+05
	3T	4,101	0.791	0.54	2.5E+05	-8.0E+05
	4T	20,000	0.348	0.00	1.8E+04	-8.8E+03
G	2T	78	0.585	0.52	1.4E-06	1.4E-05
	3T	4,101	0.751	0.68	3.3E-06	3.4E-05
	4T	20,000	0.398	0.31	3.4E-04	-1.5E-03
Z	2T	78	0.645	0.43	6.1E+05	-1.8E+06
	3T	1,857	0.795	0.53	2.6E+05	-7.9E+05
	4T	13,458	0.357	0.00	1.6E+04	-7.3E+03
X	2T	20,000	0.653	0.46	-6.3E+04	2.2E+05
	3T	6,094	0.794	0.55	-1.1E+05	3.4E+05
	4T	20,000	0.330	0.00	-8.6E+03	5.0E+03
θ	2T	20,000	0.331	0.05	-35.53	41.19
	3T	20,000	0.752	0.10	-51.21	59.08
	4T	0.5	0.374	0.26	-3.23	10.20



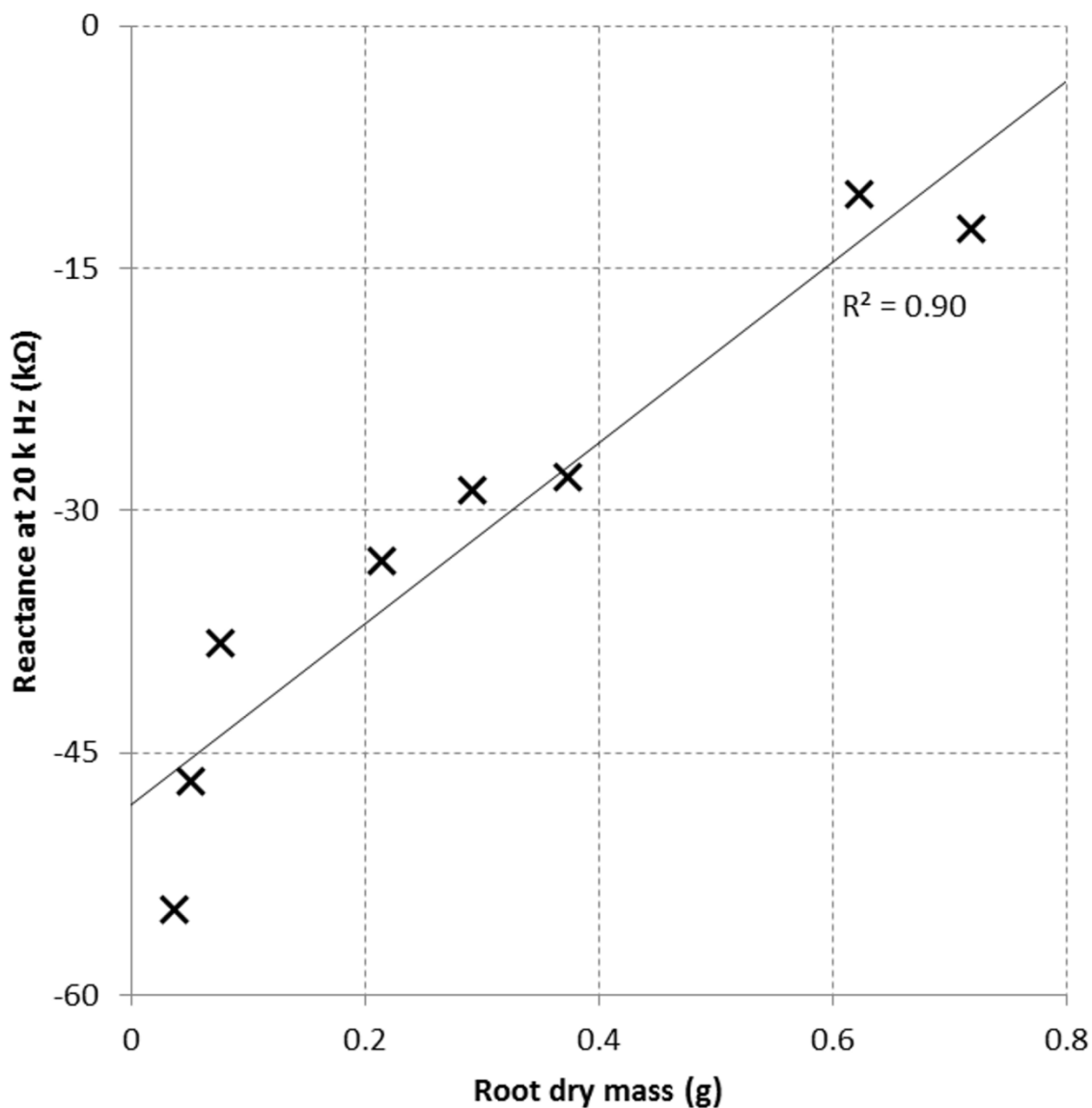
Additional file 2: Figure S1 (.Tif). Coefficient of determination (r^2) between root dry mass and parallel capacitance, in 2T configuration. The semi-log plot of the determination coefficients (r^2) was obtained over a frequency range of 0.5 to 20,000 Hz (log scale), for plants grown in silt loam (+), loam (x), sandy loam (▲), averaged for the three soil types (black dots)



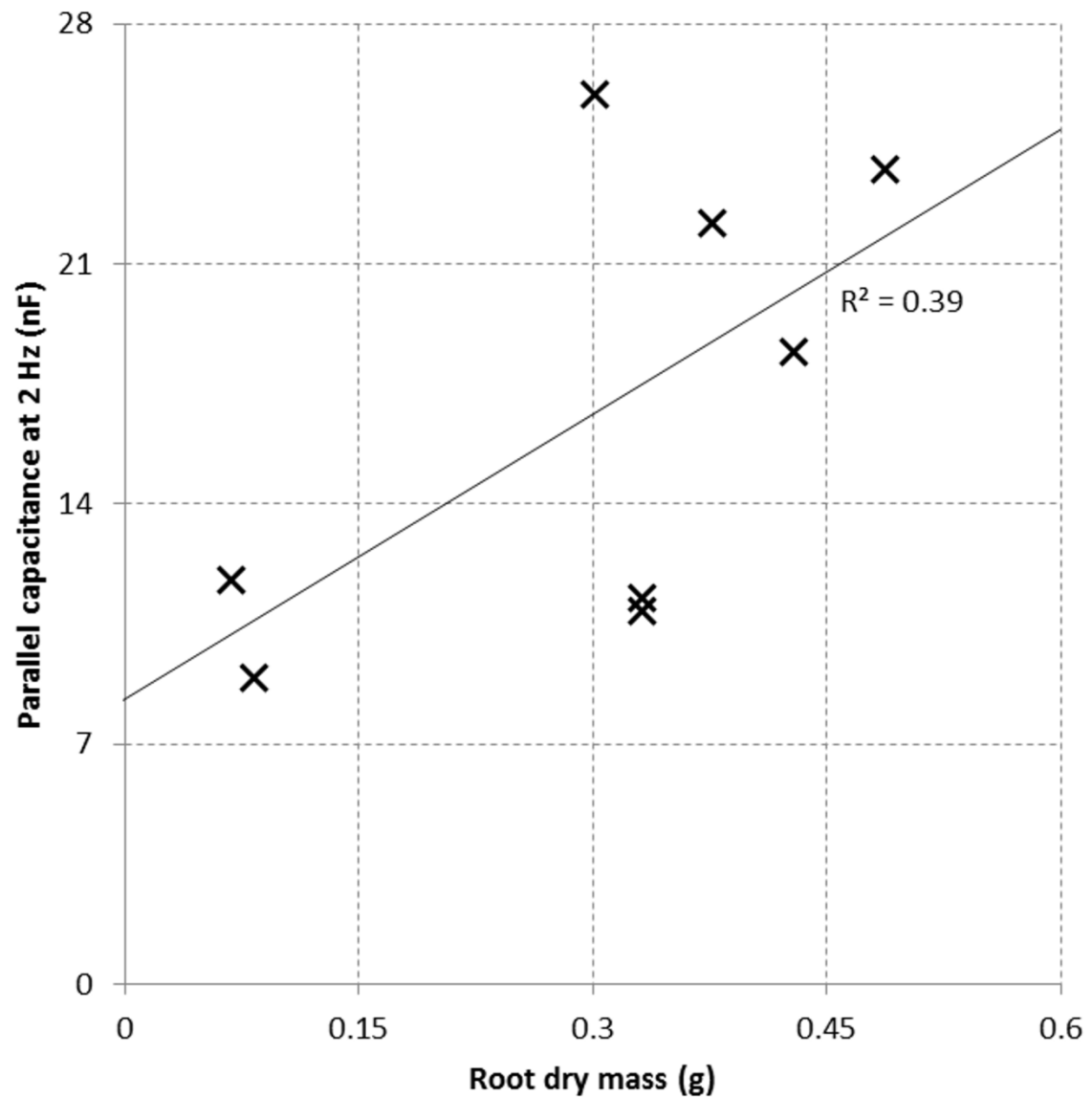
Additional file 3: Figure S2 (.Tif). Coefficient of determination (r^2) between root dry mass and parallel capacitance, in 4T configuration. The semi-log plot of the determination coefficients (r^2) was obtained over a frequency range of 0.5 to 20,000 Hz (log scale), for plants grown in silt loam (+), loam (x), sandy loam (▲), averaged for the three soil types (black dots).



Additional file 4: Figure S3 (.Tif). Illustration of a linear regression with high coefficient of determination and high sensitivity score s . Parallel capacitance measured at 116 Hz, rated as the best configuration obtained in this study. Data from plants grown in pots containing loam, measured in 3T configuration.

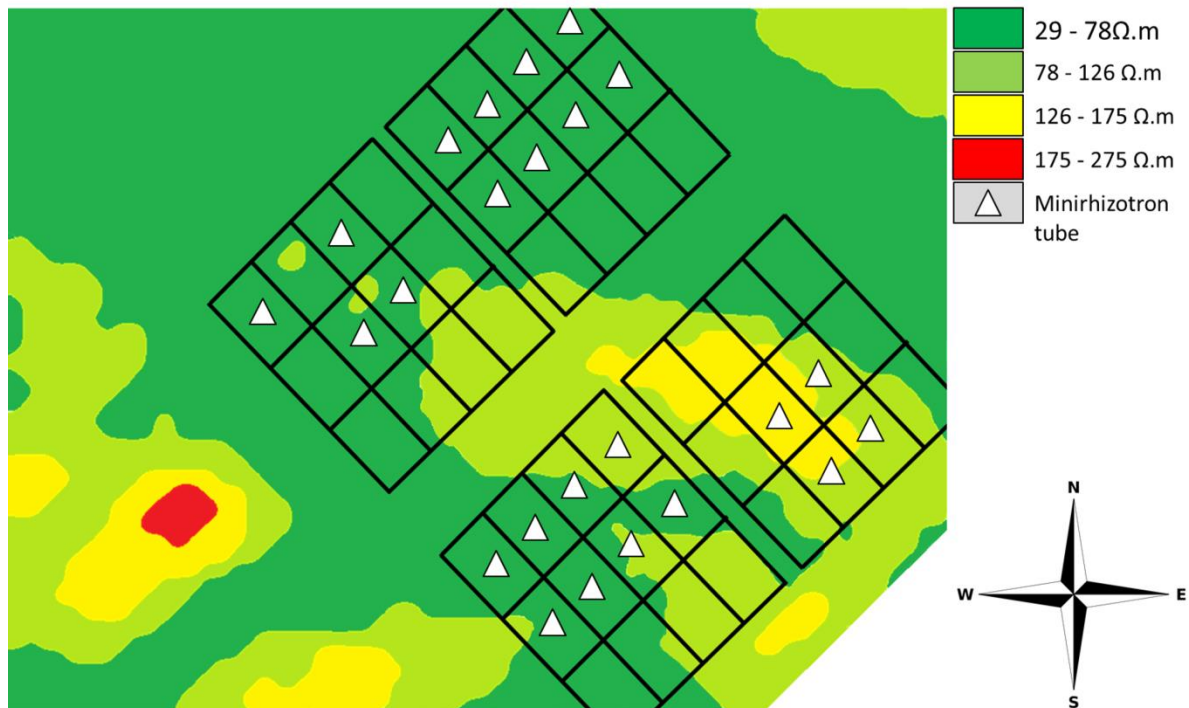


Additional file 5: Figure S4 (.Tif). Illustration of a linear regression with high coefficient of determination but low sensitivity score s . Due to its high r^2 , reactance measured at 20 kHz may turn out to be a good candidate, however its interception is largely greater than zero implying a lowered score. Data from plants grown in pots containing loam, measured in 3T configuration.

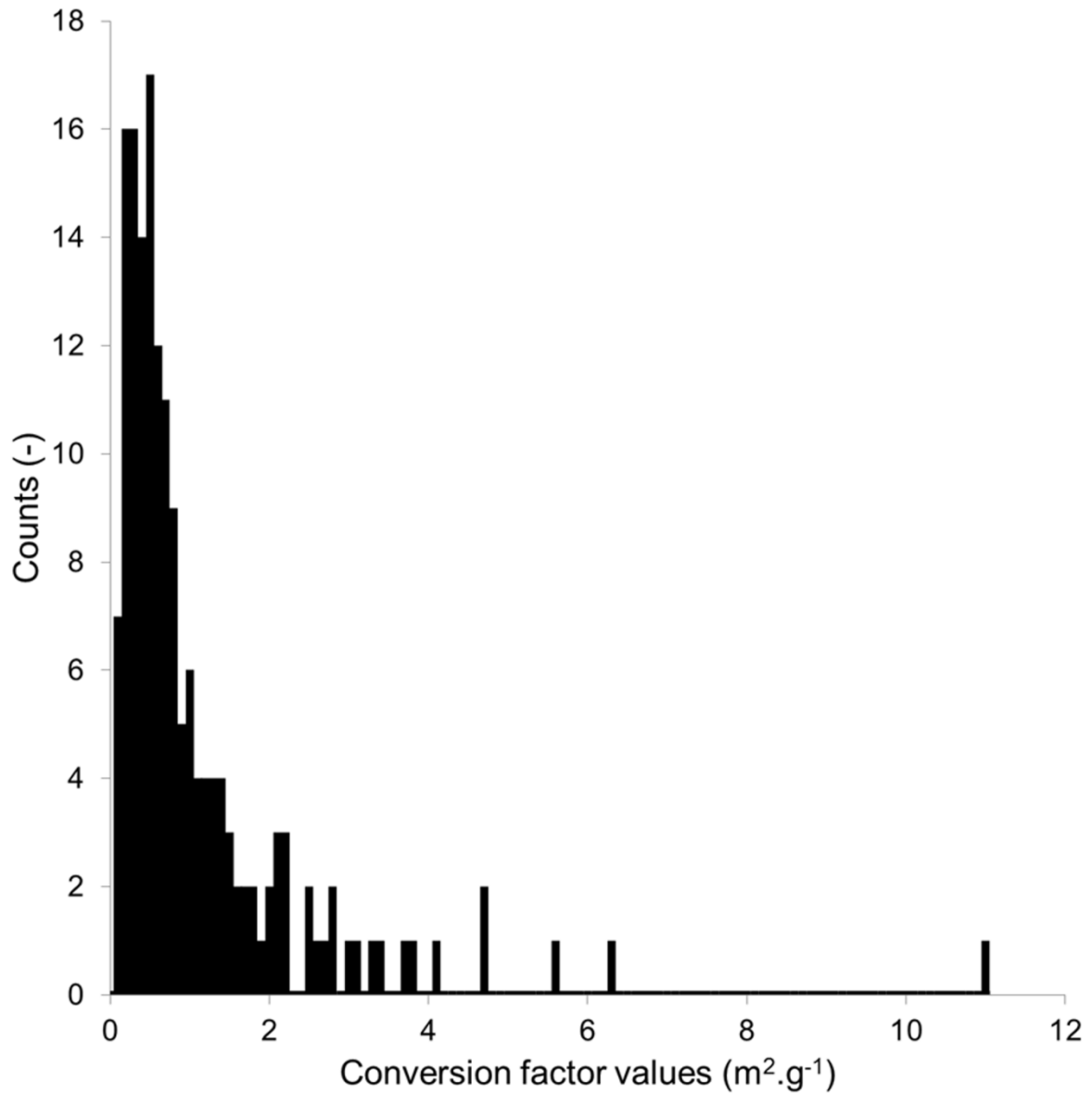


Additional file 6: Figure S5 (.Tif). Illustration of a linear regression with low coefficient of determination and low sensitivity score s . Low r^2 coupled with non-negligible intercept. Data from plants grown in pots containing sandy loam, measured in 3T configuration.

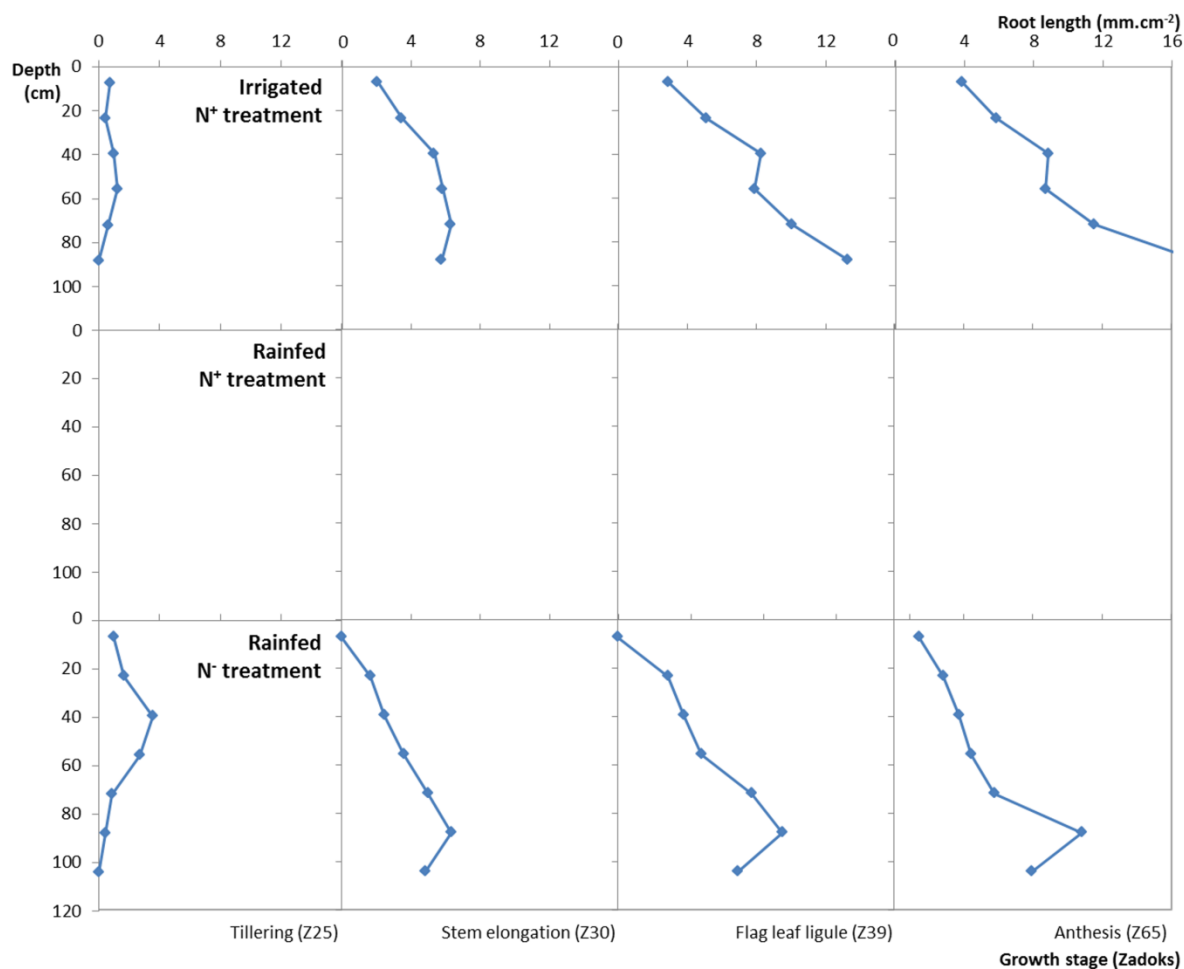
Annexe au chapitre 2



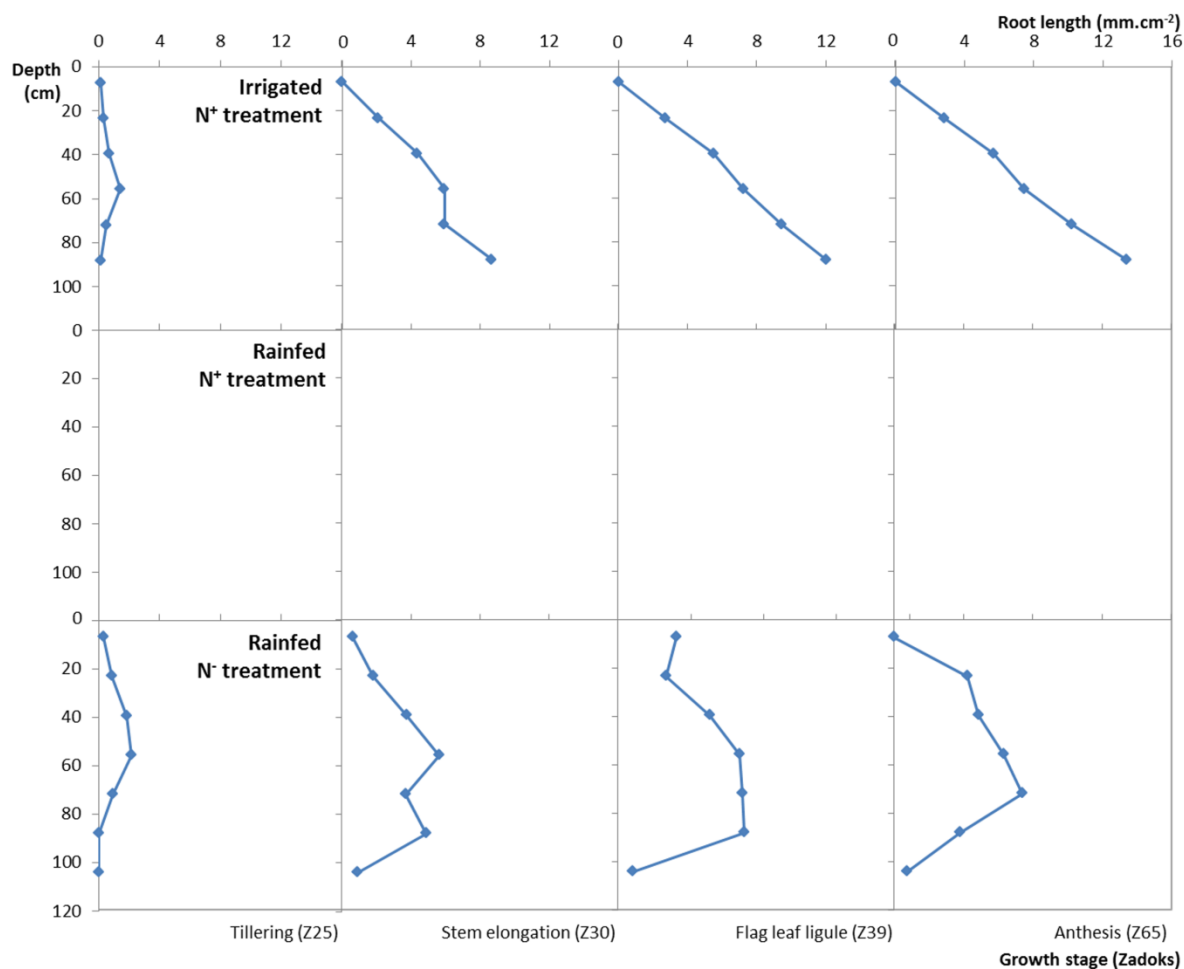
Additional file 1: Figure S1(.Tif). Electrical resistivity ($\Omega.m$) map of the experimental field. Green areas denote low electrical values, and red areas denote high electrical values. Positions of minirhizotron tubes are displayed by white triangles (Δ). Low values of resistivity means high soil depths, whereas high values of resistivity means low soil depths. Using soil coring samples and minirhizotron depths, the scale relating depth to resistivity is estimated as follows: $29-78 \Omega.m = 71-120 \text{ cm}$, $78-126 \Omega.m = 40-70 \text{ cm}$, $126-175 \Omega.m = 30-40 \text{ cm}$, and $175-275 \Omega.m < 30 \text{ cm}$.



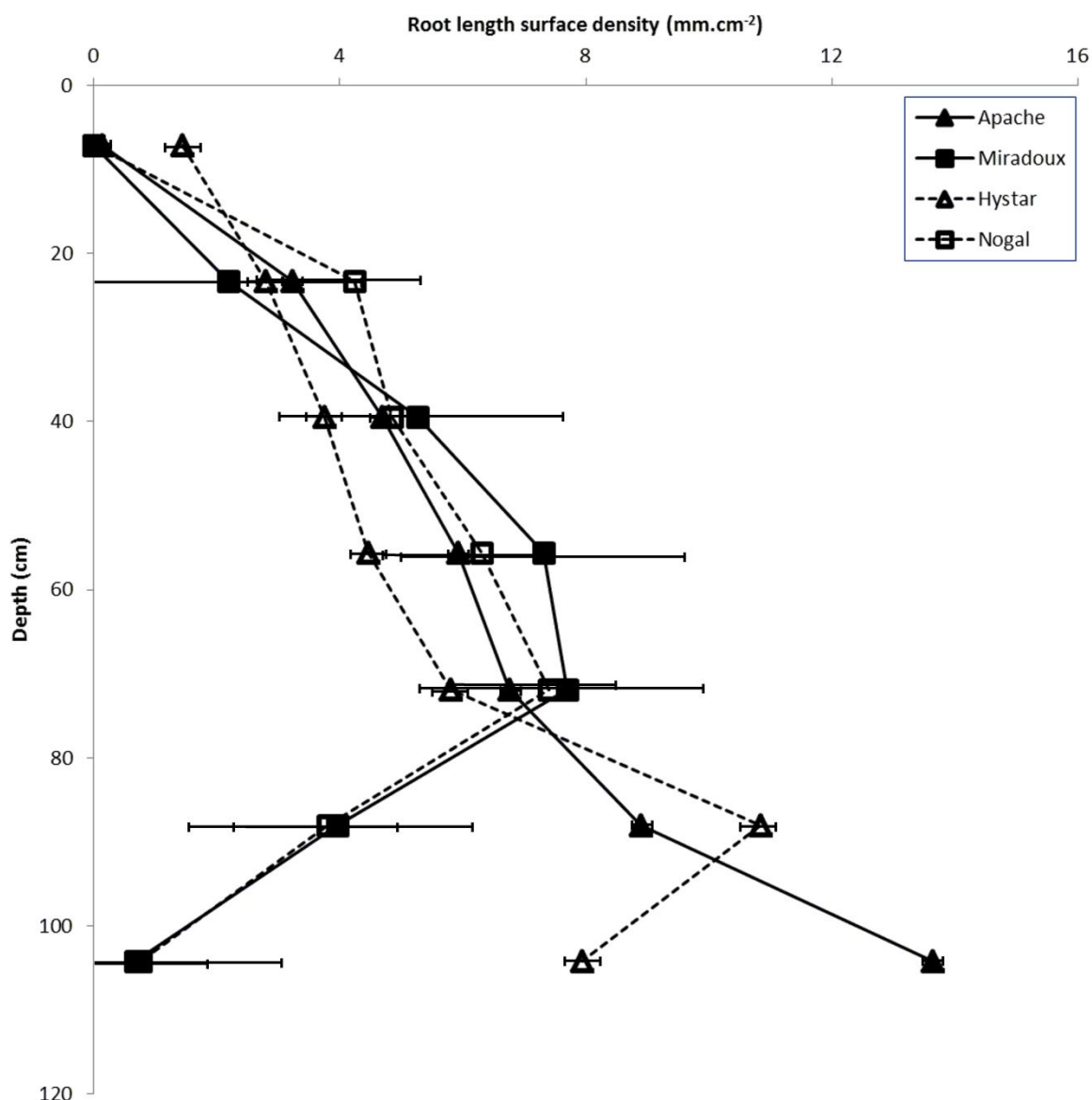
Additional file 2: Figure S2(.Tif). Histogram of the conversion parameter ($\varepsilon \times SRL$) to a volumetric root biomass obtained with Eq. 2. The median value of the conversion parameter is $\mu_{1/2} = 0.62 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, leading to a depth of field of view of 3.5 mm by considering a specific root length (SRL) value for winter wheat equals to $180 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$



Additional file 3: Figure S3(.Tif). Effect of the different treatments on the dynamic of the Hystar hybrid bread wheat root length surface density profiles (mm.cm⁻²) at different stages. Mean root length surface density profiles of the Hystar wheat cultivar are shown at tillering (Z25), stem elongations (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) stages. Under the two treatments monitored (optimal and water and nutrient coupled stress), both exhibit a deep rooting profile pattern, optimal conditions peaking at 17.35 mm.cm⁻² at anthesis(out of figure).



Additional file 4: Figure S4(.Tif). Effect of the different treatments on the dynamic of the Nogal synthetic wheat root length surface density profiles (mm.cm^{-2}) at different stages. Mean root length surface density profiles of the Nogal synthetic wheat cultivar are shown at tillering (Z25), stem elongations (Z30), flag leaf ligule (Z39) and anthesis (Z65) stages. Optimal and stressful conditions shows contrasted rooting pattern. Under optimal conditions, this synthetic wheat cultivar exhibits a deep root profile, as measured for the bread wheat Apache cultivar. On the opposite, under stressful conditions, the root pattern developed is closer to the durum wheat Miradoux cultivar measured.



Additional file 5: Figure S5(.Tif). Comparison of the root length surface density profiles obtained with minirhizotron technique at anthesis half-way (Z65) on average for each cultivar under stressful conditions (IN). Similarities are found in the rooting profiles of Apache and Hystar cultivars, and Miradoux and Nogal cultivars. A parallel may be drawn regarding their grain yield, higher yields obtained by Apache and Hystar cultivars ($7.17 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, $7.65 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, respectively), lower yields obtained by Miradoux and Nogal cultivars ($5.79 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, $6.06 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, respectively).

Annexe au chapitre 3

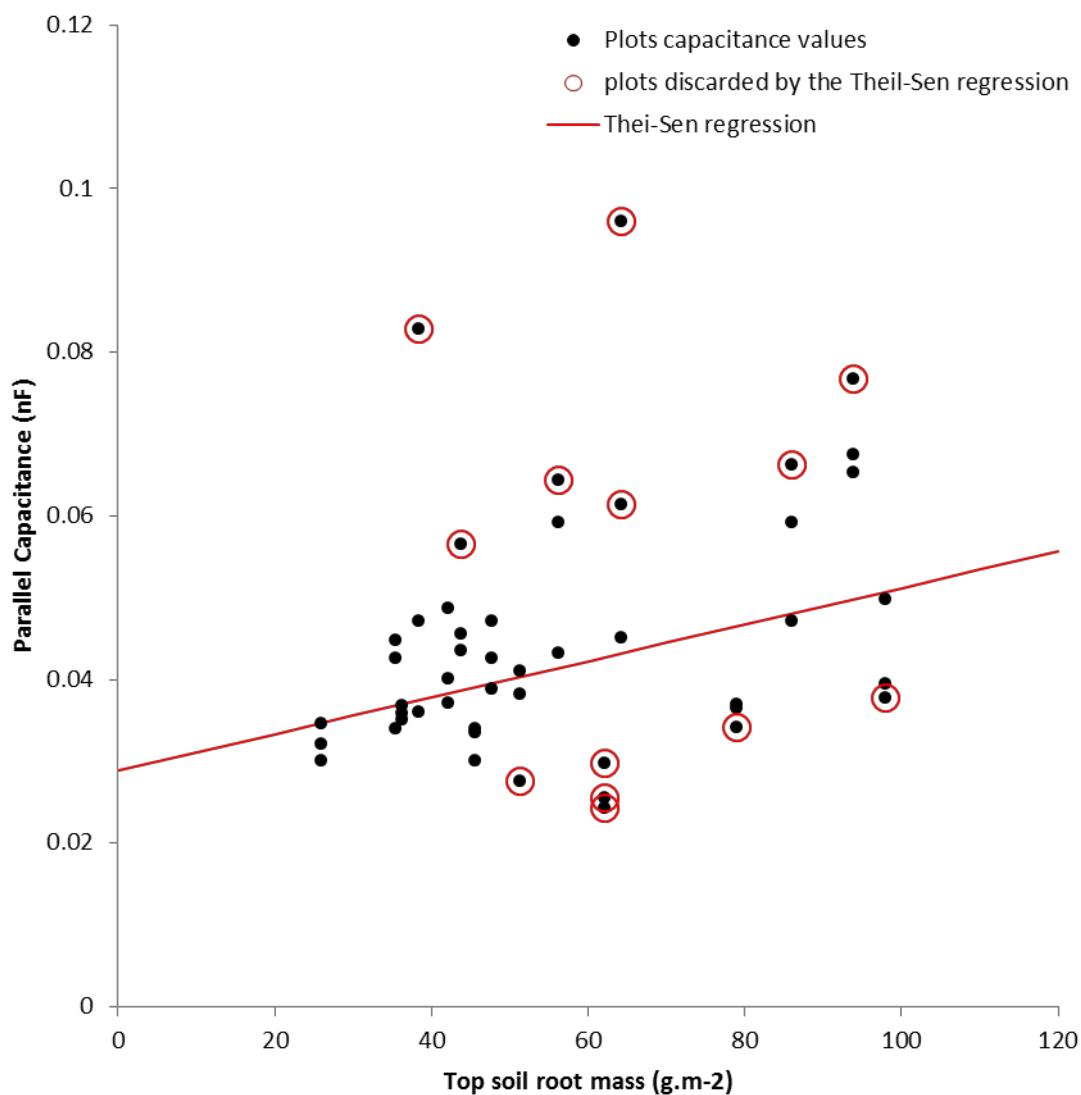


Figure additionnelle 1. Exemple d'application de la méthode de Theil-Sen. Corrélation entre la masse racinaire superficielle (0–40cm) et les mesures de capacité électrique sur des plants de blés à tallage (Z25) en conditions pluviale. La droite rouge représente la régression linéaire obtenue avec la méthode de Theil-Sen, et les points encerclés sont les points exclus par la méthode de Theil-Sen. Le coefficient de détermination est $r^2 = 0,34$.

Références

- Alexandratos N, Bruinsma J.** 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper Rome, FAO.
- Allard V, Martre P, Le Gouis J.** 2013. Genetic variability in biomass allocation to roots in wheat is mainly related to crop tillering dynamics and nitrogen status. *European Journal of Agronomy* **46**, 68–76.
- Amato M, Basso B, Celano G, Bitella G, Morelli G, Rossi R.** 2008. In situ detection of tree root distribution and biomass by multi-electrode resistivity imaging. *Tree physiology* **28**, 1441–1448.
- Araus JL, Cairns JE.** 2014. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science* **19**, 52–61.
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C.** 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* **89**, 925–940.
- Asseng S, Ewert F, Martre P, et al.** 2014. Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature Climate Change* **5**, 143–147.
- Atkinson D.** 1985. Spatial and temporal aspects of root distribution as indicated by the use of a root observation laboratory. Special publications series of the British Ecological Society.
- Atkinson D.** 2000. Root characteristics: why and what to measure. In: Smit AL,, In: Bengough AG,, In: Engels C,, In: van Noordwijk M,, In: Pellerin S,, In: van de Geijn SC, eds. *Root methods: a handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1–32.
- Attia Al Hagrey S.** 2007. Geophysical imaging of root-zone, trunk, and moisture heterogeneity. *J Exp Bot* **58**, 839–54.
- Aulen M, Shipley B.** 2012. Non-destructive estimation of root mass using electrical capacitance on ten herbaceous species. *Plant and Soil* **355**, 41–49.
- Barraclough PB, Kuhlmann H, Weir AH.** 1989. The Effects of Prolonged Drought and Nitrogen Fertilizer on Root and Shoot Growth and Water Uptake by Winter Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* **163**, 352–360.
- Barraclough PB, Leigh RA.** 1984. The growth and activity of winter wheat roots in the field: the effect of sowing date and soil type on root growth of high-yielding crops. *The Journal of Agricultural Science* **103**, 59–74.
- Barraclough PB, Weir AH, Kuhlmann H.** 1991. Factors Affecting the Growth and Distribution of Winter Wheat Roots Under Uk Field Conditions. In: McMichael BL,, In: Persson H, eds. *Plant Roots and their Environment*. Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology. Elsevier, 410–417.
- van Beem J, Smith ME, Zobel RW.** 1998. Estimating root mass in maize using a portable capacitance meter. *Agronomy Journal* **90**, 566–570.
- Berhongaray G, King JS, Janssens IA, Ceulemans R.** 2013. An optimized fine root sampling methodology balancing accuracy and time investment. *Plant and Soil* **366**, 351–361.
- Bertholdsson N-O, Brantestam AK.** 2009. A century of Nordic barley breeding — effects on early vigour root and shoot growth, straw length, harvest index and grain weight. *European journal of agronomy* **30**, 266–274.
- Bitella G, Rossi R, Bochicchio R, Perniola M, Amato M.** 2014. A Novel Low-Cost Open-Hardware Platform for Monitoring Soil Water Content and Multiple Soil-Air-Vegetation Parameters. *Sensors* **14**, 19639–19659.
- Bock CH, Poole GH, Parker PE, Gottwald TR.** 2010. Plant Disease Severity Estimated

- Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**, 59–107.
- Borch K, Bouma TJ, Lynch JP, Brown KM.** 1999. Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant, Cell & Environment* **22**, 425–431.
- Borlaug NE, Finlay KW, Shepherd KW.** 1968. Wheat breeding and its impact on world food supply. Canberra: Australian Academy of Science, 1–36.
- Box JE, Smucker AJM, Ritchie JT.** 1989. Minirhizotron installation techniques for investigating root responses to drought and oxygen stresses. *Soil Science Society of America Journal* **53**, 115–118.
- Brisson N, Gate P, Gouache D, Charmet G, Oury F-X, Huard F.** 2010. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* **119**, 201–212.
- Brunelle T, Dumas P, Souty F, Dorin B, Nadaud F.** 2015. Evaluating the impact of rising fertilizer prices on crop yields. *Agricultural Economics* **46**, 653–666.
- Bucksch A, BurrIDGE J, York LM, Das A, Nord E, Weitz JS, Lynch JP.** 2014. Image-Based High-Throughput Field Phenotyping of Crop Roots. *PLANT PHYSIOLOGY* **166**, 470–486.
- Cao Y, Repo T, Silvennoinen R, Lehto T, Pelkonen P.** 2011. Analysis of the willow root system by electrical impedance spectroscopy. *J Exp Bot* **62**, 351–8.
- Carberry PS, Liang W, Twomlow S, Holzworth DP, Dimes JP, McClelland T, Huth NI, Chen F, Hochman Z, Keating BA.** 2013. Scope for improved eco-efficiency varies among diverse cropping systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 8381–8386.
- Cermak J, Radek U, Stranek Z, Koller J, Aubrecht L.** 2006. Electrical measurement of tree root absorbing surfaces by the earth impedance method: 2. Verification based on allometric relationships and root severing experiments. *Tree Physiology* **26**, 1113–1121.
- Chaudhuri UN, Kirkham MB, Kanemasu ET.** 1990. Root growth of winter wheat under elevated carbon dioxide and drought. *Crop Science* **30**, 853–857.
- Chloupek O.** 1972. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum* **14**, 227–230.
- Chloupek O.** 1977. Evaluation of the size of a plant's root system using its electrical capacitance. *Plant and Soil* **48**, 525–532.
- Chloupek O, Dostál V, Středa T, Psota V, Dvořáčková O.** 2010. Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. *Plant Breeding* **129**, 630–636.
- Chloupek O, Forster BP, Thomas WT.** 2006. The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 779–786.
- Christidis N, Jones GS, Stott PA.** 2014. Dramatically increasing chance of extremely hot summers since the 2003 European heatwave. *Nature Climate Change* **5**, 46–50.
- Christopher JT, Manschadi AM, Hammer GL, Borrell AK.** 2008. Developmental and physiological traits associated with high yield and stay-green phenotype in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **59**, 354.
- Clark RT, MacCurdy RB, Jung JK, Shaff JE, McCouch SR, Aneshansley DJ, Kochian LV.** 2011. Three-Dimensional Root Phenotyping with a Novel Imaging and Software Platform. *PLANT PHYSIOLOGY* **156**, 455–465.

- Colombi T, Kirchgessner N, Marié CAL, York LM, Lynch JP, Hund A.** 2015. Next generation shovelomics: set up a tent and REST. *Plant and Soil* **388**, 1–20.
- Comar A, Burger P, de Solan B, Baret F, Daumard F, Hanocq J-F.** 2012. A semi-automatic system for high throughput phenotyping wheat cultivars in-field conditions: description and first results. *Functional Plant Biology* **39**, 914–924.
- Cordell D, Drangert J-O, White S.** 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* **19**, 292–305.
- Coumou D, Rahmstorf S.** 2012. A decade of weather extremes. *Nature Climate Change*.
- Cseresnyés I, Rajkai K, Takács T.** 2016. Indirect monitoring of root activity in soybean cultivars under contrasting moisture regimes by measuring electrical capacitance. *Acta Physiologiae Plantarum* **38**.
- Cseresnyes I, Rajkai K, Vozary E.** 2013. Role of phase angle measurement in electrical impedance spectroscopy. *International Agrophysics* **27**, 377–383.
- Dalton FN.** 1995. In-situ root extent measurements by electrical capacitance methods. *Plant and Soil* **173**, 157–165.
- De Smet I, White PJ, Bengough AG, et al.** 2012. Analyzing Lateral Root Development: How to Move Forward. *The Plant Cell* **24**, 15–20.
- Deak KI, Malamy J.** 2005. Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* **43**, 17–28.
- Devienne-Barret F, Richard-Molard C, Chelle M, Maury O, Ney B.** 2006. Ara-Rhizotron: An Effective Culture System to Study Simultaneously Root and Shoot Development of *Arabidopsis*. *Plant and Soil* **280**, 253–266.
- Dietrich RC, Bengough AG, Jones HG, White PJ.** 2012. A new physical interpretation of plant root capacitance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6149–6159.
- Dietrich RC, Bengough AG, Jones HG, White PJ.** 2013. Can root electrical capacitance be used to predict root mass in soil? *Annals of Botany* **112**, 457–464.
- Dubach M, Russelle MP.** 1995. Reducing the Cost of Estimating Root Turnover with Horizontally Installed Minirhizotrons. *Agronomy Journal* **87**, 258.
- Eberbach PL, Hoffmann J, Moroni SJ, Wade LJ, Weston LA.** 2013. Rhizo-lysimetry: facilities for the simultaneous study of root behaviour and resource use by agricultural crop and pasture systems. *Plant methods* **9**, 3.
- Eizenberg H.** 2005. A New Method for in-situ Monitoring of the Underground Development of *Orobanche cumana* in Sunflower (*Helianthus annuus*) with a Mini-rhizotron. *Annals of Botany* **96**, 1137–1140.
- Ellis T, Murray W, Kavalieris L.** 2013a. Electrical capacitance of bean (*Vicia faba*) root systems was related to tissue density—a test for the Dalton Model. *Plant and Soil* **366**, 575–584.
- Ellis TW, Murray W, Paul K, Kavalieris L, Brophy J, Williams C, Maass M.** 2013b. Electrical capacitance as a rapid and non-invasive indicator of root length. *Tree Physiology* **33**, 3–17.
- Ephrath JE, Silberbush M, Berliner PR.** 1999. Calibration of minirhizotron readings against root length density data obtained from soil cores. *Plant and Soil* **209**, 201–208.
- Fan J, McConkey B, Wang H, Janzen H.** 2016. Root distribution by depth for temperate agricultural crops. *Field Crops Research* **189**, 68–74.

- FAO of the United Nations.** 2014. Crop prospects and food situation. October(No. 3). Rome: FAO.
- FAO of the United Nations.** 2015. World fertilizer trends and outlook to 2018. Rome: Food & Agriculture Organization of United Nations.
- Fernandes R, G. Leblanc S.** 2005. Parametric (modified least squares) and non-parametric (Theil–Sen) linear regressions for predicting biophysical parameters in the presence of measurement errors. *Remote Sensing of Environment* **95**, 303–316.
- Fiorani F, Schurr U.** 2013. Future Scenarios for Plant Phenotyping. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 267–291.
- Fischer RA, Byerlee D, Edmeades G.** 2014. Crop yields and global food security. ACIAR: Canberra, ACT.
- Fischer RA, Rees D, Sayre KD, Lu Z-M, Condon AG, Saavedra AL.** 1998. Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. *Crop science* **38**, 1467–1475.
- Fitter A.** 2002. Characteristics and Functions of Root Systems. In: Kafkafi U., In: Waisel Y., In: Eshel A, eds. *Plant Roots*. CRC Press, 15–32.
- Fitter AH, Graves JD, Self GK, Brown TK, Bogie DS, Taylor K.** 1998. Root production, turnover and respiration under two grassland types along an altitudinal gradient: influence of temperature and solar radiation. *Oecologia* **114**, 20–30.
- Fitter A, Williamson L, Linkohr B, Leyser O.** 2002. Root system architecture determines fitness in an Arabidopsis mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**, 2017–2022.
- Flavel RJ, Guppy CN, Tighe M, Watt M, McNeill A, Young IM.** 2012. Non-destructive quantification of cereal roots in soil using high-resolution X-ray tomography. *Journal of Experimental Botany*, err421.
- Food and Agriculture Organization.** 2007. Commission on genetic resources for food and agriculture. Rome.
- Galkovskyi T, Mileyko Y, Bucksch A, et al.** 2012. GiA Roots: software for the high throughput analysis of plant root system architecture. *BMC plant biology* **12**, 1.
- Gebbing T, Schnyder H, Kühbauch W.** 1998. Carbon mobilization in shoot parts and roots of wheat during grain filling: assessment by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ steady-state labelling, growth analysis and balance sheets of reserves. *Plant, Cell & Environment* **21**, 301–313.
- van Ginkel M, Ogonnaya F.** 2007. Novel genetic diversity from synthetic wheats in breeding cultivars for changing production conditions. *Field Crops Research* **104**, 86–94.
- Gregory PJ.** 1979. A periscope method for observing root growth and distribution in field soil. *Journal of Experimental Botany* **30**, 205–214.
- Gregory PJ, McGowan M, Biscoe PV, Hunter B.** 1978. Water relations of winter wheat: 1. Growth of the root system. *The Journal of Agricultural Science* **91**, 91.
- Harker FR, Maindonald JH.** 1994. Ripening of Nectarine Fruit (Changes in the Cell Wall, Vacuole, and Membranes Detected Using Electrical Impedance Measurements). *Plant Physiology* **106**, 165–171.
- Hendrick RL, Pregitzer KS.** 1992. Spatial variation in tree root distribution and growth associated with minirhizotrons. *Plant and Soil* **143**, 283–288.

- Herder GD, Van Isterdael G, Beeckman T, De Smet I.** 2010. The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science* **15**, 600–607.
- Heřmanská A, Středa T, Chloupek O.** 2015. Improved wheat grain yield by a new method of root selection. *Agronomy for Sustainable Development* **35**, 195–202.
- Herrera JM, Stamp P, Liedgens M.** 2007. Dynamics of root development of spring wheat genotypes varying in nitrogen use efficiency. *Wheat Production in Stressed Environments*. Springer, 197–201.
- Hochholdinger F, Tuberosa R.** 2009. Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 172–177.
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M.** 2009. Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil* **321**, 153–187.
- Hummel, J.W., Levan M.A. and Sudduth K.A.** 1989. Minirhizotron installation in heavy soils. *Trans. ASAE* **32**, 770–776.
- Iglesias A, Garrote L, Quiroga S, Moneo M.** 2012. A regional comparison of the effects of climate change on agricultural crops in Europe. *Climatic Change* **112**, 29–46.
- J. W. Hummel, M. A. Levan, K. A. Sudduth.** 1989. Minirhizotron Installation in Heavy Soils. *Transactions of the ASAE* **32**, 0770–0776.
- Judy C, Adrian M, Baussard C, et al.** 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**.
- Johnson MG, Tingey DT, Phillips DL, Storm MJ.** 2001. Advancing fine root research with minirhizotrons. *Environmental and Experimental Botany*, 263–289.
- Justes E, Mary B, Meynard J-M, Machet J-M, Thelier-Huche L.** 1994. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. *Annals of Botany* **74**, 397–407.
- Keating B., Carberry P., Hammer G., et al.** 2003. An overview of APSIM, a model designed for farming systems simulation. *European Journal of Agronomy* **18**, 267–288.
- Kendall WA, Pederson GA, Hill RR.** 1982. Root size estimates of red clover and alfalfa based on electrical capacitance and root diameter measurements. *Grass and Forage Science* **37**, 253–256.
- Kirkegaard JA, Lilley JM, Howe GN, Graham JM.** 2007. Impact of subsoil water use on wheat yield. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**, 303.
- Kloppel BD, Gower ST.** 1995. Construction and installation of acrylic minirhizotron tubes in forest ecosystems. *Soil Science Society of America Journal* **59**, 241–243.
- Kmoch HG, Ramig RE, Fox RL, Koehler FE.** 1957. Root development of winter wheat as influenced by soil moisture and nitrogen fertilization. *Agronomy journal* **49**, 20–26.
- Koppán A, Fenyvesi A, Szarka L, Wesztergom V.** 2002. Measurement of electric potential difference on trees. 7th Hungarian Congress on Plant Physiology. *Acta Biologica Szegediensis*, 37–38.
- Kutschera-Mitter L.** 1960. *Wurzelatlas mitteleuropäischer Ackerunkrauter und Kulturpflanzen*. DGL. Frankfurt/Main. Verlags-GmbH.
- Le Bot J, Serra V, Fabre J, Draye X, Adamowicz S, Pagès L.** 2009. DART: a software to analyse root system architecture and development from captured images. *Plant and Soil* **326**, 261–273.
- Le Gouis J, Béghin D, Heumez E, Pluchard P.** 2000. Genetic differences for nitrogen

- uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* **12**, 163–173.
- Levan MA, Ycas JW, Hummel JW.** 1987. Light leak effects on near-surface soybean rooting observed with minirhizotrons. *Minirhizotron Observation Tubes: methods and applications for measuring rhizosphere dynamics*, 89–98.
- Levillain J, Thongo M'Bou A, Deleporte P, Saint-Andre L, Jourdan C.** 2011. Is the simple auger coring method reliable for below-ground standing biomass estimation in Eucalyptus forest plantations? *Annals of Botany* **108**, 221–230.
- Li F-M, Liu X-L, Li S-Q.** 2001. Effects of early soil water distribution on the dry matter partition between roots and shoots of winter wheat. *Agricultural water management* **49**, 163–171.
- Liao R, Bai Y, Liang H, An S, Ren S, Cao Y, Le Z, Lu J, Liu J.** 2015a. Root growth of maize as studied with minirhizotrons and monolith methods. *Archives of Agronomy and Soil Science* **61**, 1343–1356.
- Liao A, Zhou Q, Zhang Y.** 2015b. Application of 3D electrical capacitance tomography in probing anomalous blocks in water. *Journal of Applied Geophysics* **117**, 91–103.
- Lilley JM, Kirkegaard JA.** 2011. Benefits of increased soil exploration by wheat roots. *Field Crops Research* **122**, 118–130.
- Lobell DB, Gourdji SM.** 2012. The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity. *PLANT PHYSIOLOGY* **160**, 1686–1697.
- Lobet G, Pages L, Draye X.** 2011. A Novel Image-Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture. *Plant Physiology* **157**, 29–39.
- Lobet G, Pound MP, Diener J, et al.** 2015. Root System Markup Language: Toward a Unified Root Architecture Description Language. *Plant Physiology* **167**, 617–627.
- Løes A-K, Gahoonia TS.** 2004. Genetic variation in specific root length in Scandinavian wheat and barley accessions. *Euphytica* **137**, 243–249.
- Lopes MS, Reynolds MP.** 2010. Partitioning of assimilates to deeper roots is associated with cooler canopies and increased yield under drought in wheat. *Functional Plant Biology* **37**, 147.
- Lopes MS, Reynolds MP, Manes Y, Singh RP, Crossa J, Braun HJ.** 2012. Genetic Yield Gains and Changes in Associated Traits of CIMMYT Spring Bread Wheat in a 'Historic' Set Representing 30 Years of Breeding. *Crop Science* **52**, 1123.
- Lynch J.** 1995. Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* **109**, 7–13.
- Lynch JP.** 2007. TURNER REVIEW No. 14. Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany* **55**, 493.
- Lynch JP, St.Clair SB.** 2004. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crops Research* **90**, 101–115.
- Maeght J-L, Rewald B, Pierret A.** 2013. How to study deep roots — and why it matters. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Majdi H., Nylund JE, Ågren G.I.** 2007. Root respiration data and minirhizotron observations conflict with root turnover estimates from sequential soil coring. *Scandinavian Journal of Forest Research* **22.4**, 299–303.
- Manschadi AM, Christopher J, deVoil P, Hammer GL.** 2006. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Functional Plant*

Biology **33**, 823.

Manschadi AM, Christopher JT, Hammer GL, Devoil P. 2010. Experimental and modelling studies of drought-adaptive root architectural traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **144**, 458–462.

Manschadi AM, Hammer GL, Christopher JT, deVoil P. 2008. Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil* **303**, 115–129.

Manschadi A, Manske G, Vlek P. 2013. Root Architecture and Resource Acquisition: Wheat as a Model Plant. In: Beeckman T, ed. *Plant Roots*. CRC Press, 22-1-22–18.

Mathieu L, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C. 2015. ‘Rhizoponics’: a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant methods* **11**, 3.

McCown RL, Hammer GL, Hargreaves JNG, Holzworth D, Huth NI. 1995. APSIM: an agricultural production system simulation model for operational research. *Mathematics and computers in simulation* **39**, 225–231.

McMichael BL, Persson H, International Society of Root Research (Eds.). 1991. *Plant roots and their environment: proceedings of an ISRR-Symposium, August 21st-26th, 1988, Uppsala, Sweden*. Amsterdam: Elsevier.

Merrill SD, Doering EJ, Reichman GA. 1987. Application of a minirhizotron with flexible, pressurized walls to a study of corn root growth. *Minirhizotron Observation Tubes: Methods and Applications for Measuring Rhizosphere Dynamics*, 131–143.

Merrill SD, Upchurch DR. 1994. Converting root numbers observed at minirhizotrons to equivalent root length density. *Soil Science Society of America Journal* **58**, 1061–1067.

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.

Monti A, Zatta A. 2009. Root distribution and soil moisture retrieval in perennial and annual energy crops in Northern Italy. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **132**, 252–259.

Mooney SJ, Pridmore TP, Helliwell J, Bennett MJ. 2012. Developing X-ray computed tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. *Plant and soil* **352**, 1–22.

Munoz-Romero V, Benítez-Vega J, López-Bellido L, López-Bellido RJ. 2010. Monitoring wheat root development in a rainfed vertisol: Tillage effect. *European journal of agronomy* **33**, 182–187.

Nakhforoosh A, Grausgruber H, Kaul H-P, Bodner G. 2014. Wheat root diversity and root functional characterization. *Plant and soil* **380**, 211–229.

Niklas KJ. 1993. The Allometry of Plant Reproductive Biomass and Stem Diameter. *American Journal of Botany* **80**, 461.

Nyce DS. 2004. *Linear position sensors: theory and application*. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.

Ober ES, Werner P, Flatman E, Angus WJ, Jack P, Smith-Reeve L, Tapsell C. 2014. Genotypic differences in deep water extraction associated with drought tolerance in wheat. *Functional Plant Biology* **41**, 1078.

- Ortiz R, Braun H-J, Crossa J, et al.** 2008. Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). *Genetic Resources and Crop Evolution* **55**, 1095–1140.
- Ortiz-Monasterio R, Sayre KD, Rajaram S, McMahan M, others.** 1997. Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four nitrogen rates. *Crop Science* **37**, 898–904.
- Ozier-Lafontaine H, Bajazet T.** 2005. Analysis of root growth by impedance spectroscopy (EIS). *Plant and Soil* **277**, 299–313.
- Pagès L, Bécel C, Boukcim H, Moreau D, Nguyen C, Voisin A-S.** 2014. Calibration and evaluation of ArchiSimple, a simple model of root system architecture. *Ecological Modelling* **290**, 76–84.
- Pagès L, Bengough AG.** 1997. Modelling minirhizotron observations to test experimental procedures. *Plant and soil* **189**, 81–89.
- Palta J, Watt M.** 2009. Vigorous crop root systems: form and function for improving the capture of water and nutrients. *Crop Physiology—Applications for genetic improvement and agronomy*, Elsevier, San Diego.
- Passioura JB.** 1977. Grain yield, harvest index, and water use of wheat. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **43**, 117–120.
- Passioura JB.** 1983. Roots and drought resistance. *Agricultural water management* **7**, 265–280.
- Passioura J.** 1991. Soil structure and plant growth. *Australian Journal of Soil Research* **29**, 717.
- Passioura JB, Angus JF.** 2010. Improving Productivity of Crops in Water-Limited Environments. *Advances in Agronomy*. Elsevier, 37–75.
- Peñuelas J, Poulter B, Sardans J, et al.** 2013. Human-induced nitrogen–phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature Communications* **4**.
- Pierret A, Capowicz Y, Belzunces L, Moran CJ.** 2002. 3D reconstruction and quantification of macropores using X-ray computed tomography and image analysis. *Geoderma* **106**, 247–271.
- Pierret A, Gonkhamdee S, Jourdan C, Maeght J-L.** 2013. IJ_Rhizo: an open-source software to measure scanned images of root samples. *Plant and Soil* **373**, 531–539.
- Pilon R, Picon-Cochard C, Bloor JMG, Revaillet S, Kuhn E, Falcimagne R, Balandier P, Soussana J-F.** 2012. Grassland root demography responses to multiple climate change drivers depend on root morphology. *Plant and Soil* **364**, 395–408.
- Polomski J, Kuhn N, Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U.** 2002. Root research methods. *Plant roots: The hidden half*, 295–321.
- Poorter H, Bühler J, van Dusschoten D, Climent J, Postma JA.** 2012. Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Functional Plant Biology* **39**, 839.
- Postic F, Doussan C.** 2016. Benchmarking electrical methods for rapid estimation of root biomass. *Plant Methods* **12**.
- Pradhan GP, Prasad PVV, Fritz AK, Kirkham MB, Gill BS.** 2012. Effects of drought and high temperature stress on synthetic hexaploid wheat. *Functional Plant Biology* **39**, 190.

- Preston GM, McBride RA, Bryan J, Candido M.** 2004. Estimating root mass in young hybrid poplar trees using the electrical capacitance method. *Agroforestry Systems* **60**, 305–309.
- Pretty JN.** 1995. *Regenerating agriculture: policies and practice for sustainability and self-reliance.* Joseph Henry Press.
- Pritchard SG, Strand AE.** 2008. Can you believe what you see? Reconciling minirhizotron and isotopically derived estimates of fine root longevity. *New Phytologist* **177**, 287–291.
- Rascher U, Blossfeld S, Fiorani F, et al.** 2011. Non-invasive approaches for phenotyping of enhanced performance traits in bean. *Functional Plant Biology* **38**, 968.
- Rasmussen IS, Dresbøll DB, Thorup-Kristensen K.** 2015. Winter wheat cultivars and nitrogen (N) fertilization — Effects on root growth, N uptake efficiency and N use efficiency. *European Journal of Agronomy* **68**, 38–49.
- Ray DK, Ramankutty N, Mueller ND, West PC, Foley JA.** 2012. Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nature communications* **3**, 1293.
- Rellán-Álvarez R, Lobet G, Lindner H, et al.** 2015. Multidimensional mapping of root responses to soil environmental cues using a luminescence-based imaging system. *bioRxiv*, 16931.
- Repo T., Cao Y., Silvennoinen R. Ozier-Lafontaine H.** 2012. *Electrical impedance spectroscopy and roots.* Measuring Roots, 25–49, Springer Berlin Heidelberg
- Rewald B, Ephrath JE.** 2012. *Minirhizotron technique.* Plant roots: the hidden half, 4th edn. CRC Press, New York.
- Reynolds MP, Acevedo E, Sayre KD, Fischer RA.** 1994. Yield potential in modern wheat varieties: its association with a less competitive ideotype. *Field Crops Research* **37**, 149–160.
- Reynolds MP, Pfeiffer WH, Royo C.** 2000. Applying physiological strategies to improve yield potential. *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges.* Options Méditerranéennes **40**, 95–103.
- Reynolds MP, Rajaram S, Sayre KD.** 1999. Physiological and Genetic Changes of Irrigated Wheat in the Post–Green Revolution Period and Approaches for Meeting Projected Global Demand. *Crop Science* **39**, 1611.
- Rich SM, Watt M.** 2013. Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1193–1208.
- Richards, R. A., Passioura J. B.** 1989. A breeding program to reduce the diameter of the major xylem vessel in the seminal roots of wheat and its effect on grain yield in rain-fed environments. *Crop and Pasture Science* **40.5**, 943–950.
- Rowse HR, Goodman D.** 1981. Axial Resistance to Water Movement in Broad Bean (*Vicia faba*) Roots. *Journal of Experimental Botany* **32**, 591–598.
- Rummukainen M.** 2014. *Climate projections for 2050. Climate Change Impact and Adaptation in Agricultural Systems.* CABI, 7.
- Rytter R-M, Hansson A-C.** 1996. Seasonal amount, growth and depth distribution of fine roots in an irrigated and fertilized *Salix viminalis* L. plantation. *Biomass and Bioenergy* **11**, 129–137.
- Rytter R-M, Rytter L.** 1998. Growth, decay, and turnover rates of fine roots of basket willows. *Canadian Journal of Forest Research* **28**, 893–902.

- Salzmann M.** 2016. Global warming without global mean precipitation increase? *Science Advances* **2**, e1501572–e1501572.
- Samouëlian A, Cousin I, Tabbagh A, Bruand A, Richard G.** 2005. Electrical resistivity survey in soil science: a review. *Soil and Tillage Research* **83**, 173–193.
- Sayre KD, Rajaram S, Fischer RA.** 1997. Yield Potential Progress in Short Bread Wheats in Northwest Mexico. *Crop Science* **37**, 36.
- Schwan HP.** 1959. Alternating current spectroscopy of biological substances. *Proceedings of the IRE* **47**, 1841–1855.
- Segal E, Kushnir T, Mualem Y, Shani U.** 2008. Water Uptake and Hydraulics of the Root Hair Rhizosphere. *Vadose Zone Journal* **7**, 1027.
- Semenov MA, Stratonovitch P, Alghabari F, Gooding MJ.** 2014. Adapting wheat in Europe for climate change. *Journal of Cereal Science* **59**, 245–256.
- Sen PK.** 1968. Estimates of the Regression Coefficient Based on Kendall's Tau. *Journal of the American Statistical Association* **63**, 1379–1389.
- Sharma BR, Chaudhary TN.** 1983. Wheat root growth, grain yield and water uptake as influenced by soil water regime and depth of nitrogen placement in a loamy sand soil. *Agricultural Water Management* **6**, 365–373.
- Shearman VJ, Sylvester-Bradley R, Scott RK, Foulkes MJ.** 2005. Physiological processes associated with wheat yield progress in the UK. *Crop Science* **45**, 175–185.
- Shevnin V, Mousatov A, Ryjov A, Delgado-Rodriguez O.** 2007. Estimation of clay content in soil based on resistivity modelling and laboratory measurements. *Geophysical Prospecting* **55**, 265–275.
- Sommer C, Gerlich DW.** 2013. Machine learning in cell biology - teaching computers to recognize phenotypes. *Journal of Cell Science* **126**, 5529–5539.
- Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex B, Midgley BM.** 2013. IPCC, 2013: climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
- Stover DB, Day FP, Butnor JR, Drake BG.** 2007. Effect of Elevated Co₂ on Coarse-Root Biomass in Florida Scrub Detected by Ground-Penetrating Radar. *Ecology* **88**, 1328–1334.
- Stuppy WH, Maisano JA, Colbert MW, Rudall PJ, Rowe TB.** 2003. Three-dimensional analysis of plant structure using high-resolution X-ray computed tomography. *Trends in Plant Science* **8**, 2–6.
- Sultan SE.** 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**, 537–542.
- Svačina P, Středa T, Chloupek O.** 2014. Uncommon selection by root system size increases barley yield. *Agronomy for sustainable development* **34**, 545–551.
- Taylor BN, Beidler KV, Cooper ER, Strand AE, Pritchard SG.** 2013. Sampling volume in root studies: the pitfalls of under-sampling exposed using accumulation curves. *Ecology Letters* **16**, 862–869.
- Theil H.** 1950. A Rank Invariant Method of Linear and Polynomial Regression Analysis. *Nederlandse Akademie Wetenschappen Series A.* **53**, 386–392.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Belfort BL.** 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20260–

20264.

Tingey DT, Phillips DL, Johnson MG, Storm MJ, Ball JT. 1997. Effects of elevated CO₂ and N fertilization on fine root dynamics and fungal growth in seedling *Pinus ponderosa*. *Environmental and Experimental Botany* **37**, 73–83.

Trachsel S, Kaeppler SM, Brown KM, Lynch JP. 2011. Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant and Soil* **341**, 75–87.

Trethowan RM, van Ginkel M, Rajaram S. 2002. Progress in breeding wheat for yield and adaptation in global drought affected environments. *Crop Science* **42**, 1441–1446.

Trnka M, Rötter RP, Ruiz-Ramos M, Kersebaum KC, Olesen JE, Žalud Z, Semenov MA. 2014. Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. *Nature Climate Change* **4**, 637–643.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables*.

Upchurch DR, Ritchie JT. 1983. Root observations using a video recording system in minirhizotrons. *Agronomy journal* **75**, 1009–1015.

Volkmar KM. 1993. A comparison of minirhizotron techniques for estimating root length density in soils of different bulk densities. *Plant and Soil* **157**, 239–245.

Waines JG, Ehdai B. 2007. Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Annals of Botany* **100**, 991–998.

Wang M-B, Zhang Q. 2009. Issues in using the WinRHIZO system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecologica Sinica* **29**, 136–138.

Wasson AP, Richards RA, Chatrath R, Misra SC, Prasad SS, Rebetzke GJ, Kirkegaard JA, Christopher J, Watt M. 2012. Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. *Journal of experimental botany* **63**, 3485–3498.

Watt M, Moosavi S, Cunningham SC, Kirkegaard JA, Rebetzke GJ, Richards RA. 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**, 447–455.

Webster PL, MacLeod RD. 1980. Characteristics of root apical meristem cell population kinetics: A review of analyses and concepts. *Environmental and Experimental Botany* **20**, 335–358.

Weiner J, Thomas SC. 1992. Competition and allometry in three species of annual plants. *Ecology*, 648–656.

Wilcox CS, Ferguson JW, Fernandez GC., Nowak RS. 2004. Fine root growth dynamics of four Mojave Desert shrubs as related to soil moisture and microsite. *Journal of Arid Environments* **56**, 129–148.

Withington JM, Elkin AD, Bulaj B, et al. 2003. The impact of material used for minirhizotron tubes for root research. *New Phytologist* **160**, 533–544.

Young IM, Crawford JW, Nunan N, Otten W, Spiers A. 2008. Chapter 4 Microbial Distribution in Soils: Physics and Scaling. In: *Agronomy B-A* in, ed. Academic Press, 81–121.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed res* **14**, 415–421.

- Zanetti C, Weller A, Vennetier M, Meriaux P.** 2011. Detection of buried tree root samples by using geoelectrical measurements: a laboratory experiment. *Plant and Soil* **339**, 273–283.
- Zang U, Goisser M, Häberle K-H, Matyssek R, Matzner E, Borken W.** 2014. Effects of drought stress on photosynthesis, rhizosphere respiration, and fine-root characteristics of beech saplings: A rhizotron field study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **177**, 168–177.
- Zhan A, Schneider H, Lynch JP.** 2015. Reduced Lateral Root Branching Density Improves Drought Tolerance in Maize. *Plant Physiology* **168**, 1603–1615.
- Zhang Z-S, Li X-R, Wang T, Wang X-P, Xue Q-W, Liu L-C.** 2008. Distribution and Seasonal Dynamics of Roots in a Revegetated Stand of *Artemisia ordosica* Kracsh. in the Tengger Desert (North China). *Arid Land Research and Management* **22**, 195–211.
- Zhang MIN, Willison JHM.** 1992. Electrical impedance analysis in plant tissues: the effect of freeze-thaw injury on the electrical properties of potato tuber and carrot root tissues. *Canadian Journal of Plant Science* **72**, 545–553.
- Zhang X, Zhang X, Liu X, Shao L, Sun H, Chen S.** 2015. Incorporating root distribution factor to evaluate soil water status for winter wheat. *Agricultural Water Management* **153**, 32–41.
- Zhu S, Huang C, Su Y, Sato M.** 2014. 3D Ground Penetrating Radar to Detect Tree Roots and Estimate Root Biomass in the Field. *Remote Sensing* **6**, 5754–5773.
- Zhu J, Kaeppler SM, Lynch JP.** 2005. Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*). *Functional Plant Biology* **32**, 749–762.
- Zhu J, Lynch JP.** 2004. The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*) seedlings. *Functional Plant Biology* **31**, 949–958.

Résumé

Pour soutenir la demande en denrées alimentaires d'une population mondiale croissante, les rendements des productions en céréales, notamment du blé, doivent être améliorés par sélection végétale. À cause du changement climatique et de l'épuisement des ressources fossiles, les systèmes racinaires des futures variétés de blé devront être adaptés aux épisodes de sécheresse et aux sols peu fertiles. Il est donc crucial de développer des outils de mesure de traits racinaires au champ répondant aux exigences de la sélection variétale. Ainsi, la pertinence des minirhizotrons et de l'impédance électrique des plantes a été évaluée en essai agronomique sur des variétés de blé, conçu pour obtenir un panel varié d'enracinement.

Nous avons montré que les minirhizotrons fournissent une quantification dynamique et pertinente de la longueur de racines profondes, qui jouent rôle majeur dans les rendements obtenus en conditions pluviales. Malgré une sous-estimation de la partie superficielle des systèmes racinaires, la conversion volumétrique des données issues des minirhizotrons basée sur une profondeur de champ, et à l'aide de prélèvements pour les horizons de surface, a permis une estimation du ratio de masse racinaire sur masse aérienne.

À travers une étude méthodologique en laboratoire, nous avons déterminé le montage optimal de mesure d'impédance électrique sur des plants de blé. Son application au champ montre que la qualité de l'estimation diminue au cours de la croissance et dépend de l'humidité du sol. Nous avons montré que l'impédance des plants de blé est décrite par un modèle de condensateur plan, les tissus végétaux formant un diélectrique imparfait. Ainsi, la réactance est un prédicteur de la masse racinaire, uniquement dans les couches superficielles et sèches du sol.

Mots clés : biomasse racinaire, triticum spp, blé, minirhizotron, impédance, mesures au champ

Ensuring the food supply of an increasing world population could be achieved by improving crop yields through plant breeding. Due to the climate change and the rarefaction of fossil resources, the root systems of the future wheat cultivars should be adapted to low soil moisture and low soil fertility. Developing tools for in situ root traits measurements fulfilling the high throughput requirement of modern breeding is crucial. For this purpose, an agronomic trial was conducted on wheat cultivars to evaluate the relevance of minirhizotrons and plant electrical impedance on assessing varied rooting architecture.

We showed that minirhizotrons provide dynamic and relevant quantifications of deep root lengths, which was a key factor in crop yield under rainfed conditions. In spite of underestimated lengths in the shallow part of the root systems, a volumetric conversion of minirhizotron data using a depth-of-field criterion, coupled with auger sampling for surface layers, allowed fairly estimation root to shoot ratio at different growth stages.

We determined the optimal setup of plant impedance measurements by a methodological study performed under laboratory conditions. The application of this optimal setup to an in situ survey showed that the quality of the predictions decreased at later growth stages and under low soil wetness. The plant impedance was described by an imperfect parallel-plate capacitor mode, where plant tissues acted as the separating medium. Consequently, electrical reactance is a root biomass sensor, but only in surface soil layers at low water content.

Keywords: root biomass, wheat, triticum spp, minirhizotron, electrical impedance, field measurement.