



Développement d'un capteur RMN portable pour évaluer in situ l'état hydrique des racines de plantes prairiales

Magali Nuixe

► To cite this version:

Magali Nuixe. Développement d'un capteur RMN portable pour évaluer in situ l'état hydrique des racines de plantes prairiales. Sciences du Vivant [q-bio]. UCA, 2023. Français. NNT : . tel-04117099

HAL Id: tel-04117099

<https://hal.science/tel-04117099>

Submitted on 5 Jun 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT**

Thèse

Présentée par

Magali NUIXE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Clermont Auvergne

Spécialité : Génie biologique

**Développement d'un capteur RMN portable pour évaluer *in situ*
l'état hydrique des racines de plantes prairiales**

Soutenue publiquement le 7 mars 2023

Thèse dirigée par Dr. Amidou TRAORÉ et Dr. Catherine PICON-COCHARD

Composition du jury :

DOUSSAN Claude, Chargé de recherche, INRAE Avignon	Examineur
FARJON Jonathan, Directeur de recherche, Université de Nantes-CNRS	Membre invité
GOZE-BAC Christophe, Directeur de recherche, Université de Montpellier-CNRS	Rapporteur
LEGUÉ Valérie, Professeure des universités, Université Clermont Auvergne	Présidente
MUSSE Maja, Chargée de recherche, INRAE Rennes	Rapporteuse
PICON-COCHARD Catherine, Directrice de recherche, INRAE Clermont-Ferrand	Directrice
TRAORÉ Amidou, Ingénieur de recherche, INRAE Clermont-Ferrand	Directeur

Thèse préparée au sein de l'ISC AgroResonance, UR QuaPA, INRAE Clermont-Ferrand-Theix et de l'UREP, INRAE Clermont-Ferrand-Crouël.

Remerciements

Je tiens en tout premier lieu à remercier les membres du jury. Je remercie ainsi vivement Madame Maja Musse et Monsieur Christophe Goze-Bac d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Madame Valérie Legué, Monsieur Claude Doussan et Monsieur Jonathan Farjon d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'examiner ce travail.

Ma gratitude va envers toutes les personnes qui m'ont accompagnée tout au long de cette aventure qu'est la thèse, en particulier Catherine Picon-Cochard et Amidou Traoré, mes directeurs de thèse, ainsi que Guilhem Pagés, mon encadrant de thèse. Je les remercie chaleureusement pour leur disponibilité, le partage de leurs connaissances, leurs conseils, l'aide qu'ils m'ont apportée ainsi que le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de ces trois et quelques années. Un grand merci à vous.

Je remercie également mes collègues de l'unité QuaPA et d'AgroResonance pour leur accueil et leur disponibilité. Je remercie notamment Abdlatif (Abdel) Benmoussa pour son aide avec le dispositif RMN (et pour les pauses-café à discuter films et musique) et Jean-Marie Bonny pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse, le partage de ses connaissances ainsi que ses conseils. Merci également à Robert Falcimagne et David Colosse pour leur aide lors des expérimentations à Crouël, notamment avec la chambre climatique. Un très grand merci à mes collègues des « forces vives » et plus particulièrement à :

Nour, Roxane et Shannan. Partager le « bureau des stagiaires » avec vous fut un véritable plaisir. Votre bonne humeur est communicative et je vous remercie pour tout. Merci les filles pour les sorties que nous avons pu faire durant ces trois années. Merci Nour pour les découvertes de films et de quelques mots arabes. Grâce à toi, je peux me présenter (même si je reste bloquée sur le chiffre 23...). Merci Roxane pour toutes les bonnes adresses clermontoises, tu es mon guide Michelin attitré ! Merci Shannan pour ton aide précieuse en anglais (j'ai appris bon nombre d'expressions dont certaines sont surprenantes...) et pour le partage de musiques (vive les comédies musicales !).

Aline et Anne. Faire partie du binôme devenu trinôme des représentantes des forces vives de l'unité QuaPA fut également une belle aventure. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Ce fut un plaisir d'organiser la journée annuelle des forces vives avec vous, que ce soit sur un thème Disney ou Astérix.

Enfin, un immense merci à mes proches, ma famille et mes amis. Merci pour le soutien que vous m'apportez depuis de nombreuses années maintenant et pour tous les moments partagés ensemble que ce soit en Auvergne, aux quatre coins de la France (dont mon merveilleux Sud), à l'étranger ou même à distance (pandémie oblige). En vérité, je pense que je n'arriverais jamais à vous faire ressentir à quel point je vous suis reconnaissante et je suis chanceuse de vous avoir à mes côtés. Merci pour tout.

*Je dédie en particulier ma thèse à
mes grands-parents,
mes parents,
mon frère.*

Résumé

Les écosystèmes prairiaux sont un des principaux écosystèmes terrestres permettant de limiter le réchauffement climatique grâce à leur forte capacité à séquestrer le carbone. Les flux de sève ascendant et descendant jouent un rôle primordial dans ce processus en amenant l'eau nécessaire à la réalisation de la photosynthèse puis en transportant les produits carbonés vers les puits de carbone. Dans le cas des prairies, cette séquestration a principalement lieu dans le sol sous forme de matières organiques issues de l'accumulation et de la décomposition de la biomasse racinaire. Les racines, qui permettent d'absorber l'eau du sol et de répondre à la demande transpiratoire, ont donc un rôle primordial dans ce processus de séquestration. Dans le contexte actuel de changement climatique, une meilleure compréhension de ces mécanismes de transport est indispensable pour s'assurer que ces écosystèmes puissent continuer à jouer leur rôle.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode non destructive, non invasive et non ionisante qui permet notamment l'étude des noyaux d'hydrogène de l'eau permettant ainsi la caractérisation de l'état hydrique des plantes. Grâce à la diversité des paramètres mesurables comme les temps de relaxation longitudinale et transversale ou le coefficient de diffusion, la distribution de l'eau ou encore sa mobilité peuvent être caractérisées selon les différentes populations d'eau présentes dans les tissus biologiques. Par ailleurs, la RMN n'est pas limitée par l'opacité des milieux. Ainsi, elle peut être employée pour étudier les organes souterrains des plantes. Toutefois, la majorité des dispositifs RMN de laboratoire ne permet pas de réaliser ces mesures dans l'environnement naturel des plantes, i.e., *in situ*.

Mon travail de thèse a donc été de démontrer la faisabilité et l'intérêt de l'IRM portable, à bas champ magnétique, pour caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales. Pour cela, des rhizotrons contenant des monocultures d'herbacées ont été étudiés en conditions environnementales contrôlées. Il a ainsi été démontré que l'IRM portable permet (i) d'estimer la quantité d'eau dans les racines, (ii) de révéler un rythme nyctéméral du signal RMN provenant des racines en lien avec la transpiration, (iii) de mettre en évidence les effets d'un stress hydrique intense sur ce signal et (iv) de suivre la réhydratation d'une plante après application d'un stress hydrique.

Mots-clés : Bas champ magnétique, écophysiologie, herbacées, IRM portable, prairies, profils, racines, rhizotron, T_2

Abstract

Grassland ecosystems are one of the most important terrestrial ecosystems for mitigating global warming because of their strong capacity to sequester carbon. The upward and downward flow of sap play a key role in this process by bringing water necessary for photosynthesis and then transporting the carbon products to the carbon sinks. In the case of grasslands, this sequestration takes place mainly in the soil organic matter originated from accumulation and decomposition of root biomass. The roots, which allow to absorb water from the soil, thus answering the transpiration demand, have a primordial role in this sequestration process. In the current context of climate change, a better understanding of these transport mechanisms is essential to ensure that these ecosystems can continue to play their role.

Nuclear magnetic resonance (NMR) is a non-destructive, non-invasive and non-ionizing method that allows the study of the hydrogen nuclei of water, thus allowing the characterization of the water status of plants. Thanks to the diversity of measurable parameters such as longitudinal and transverse relaxation times or the diffusion coefficient, the distribution of water or its mobility can be characterized according to the different water populations present in biological tissues. Moreover, NMR is not limited by the opacity of the media. Thus, it can be used to study the underground organs of plants. However, the majority of laboratory NMR devices do not allow to perform these measurements in the natural environment of plants, i.e., *in situ*.

My thesis work was therefore to demonstrate the feasibility and the interest of portable MRI to characterize the water status of grassland plant roots. For this purpose, rhizotrons containing monocultures of herbaceous species were studied under controlled environmental conditions. It was demonstrated that portable MRI allows to (i) estimate the amount of water in roots, (ii) reveal a nycthemeral rhythm of the root NMR signal in relation with transpiration, (iii) show the effects of intense water stress on this signal and (iv) follow the rehydration of a plant after a hydric stress.

Keywords: Ecophysiology, grasslands, herbaceous species, low magnetic field, portable MRI, profiles, rhizotron, roots, T_2

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	2
RÉSUMÉ.....	4
ABSTRACT	5
SOMMAIRE	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	8
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	11
INTRODUCTION	13
CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART	15
I.1. CONTEXTE	15
<i>I.1.1. Biome prairial</i>	<i>15</i>
<i>I.1.2. Définition et impacts du réchauffement climatique sur les écosystèmes.....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.3. Régulation du changement climatique par la séquestration de carbone.....</i>	<i>19</i>
I.2. L'EAU DANS LES PLANTES.....	23
<i>I.2.1. Notion de potentiel hydrique</i>	<i>23</i>
<i>I.2.2. Transport de l'eau dans la plante</i>	<i>24</i>
<i>I.2.3. Absorption de l'eau par les racines.....</i>	<i>27</i>
<i>I.2.4. Principaux déterminants des flux d'eau et de l'absorption racinaire</i>	<i>31</i>
<i>I.2.5. Stratégies d'utilisation de l'eau</i>	<i>35</i>
<i>I.2.6. Principales méthodes permettant l'étude des racines du point de vue de l'eau</i>	<i>39</i>
I.3. LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE	52
<i>I.3.1. Principes.....</i>	<i>52</i>
<i>I.3.2. Mécanismes de relaxation.....</i>	<i>54</i>
<i>I.3.3. Principales séquences de mesure.....</i>	<i>56</i>
<i>I.3.4. RMN portable</i>	<i>61</i>
I.4. OBJECTIFS DE LA THÈSE	87
CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	89
II.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL	89
<i>II.1.1. Espèces cultivées.....</i>	<i>89</i>
<i>II.1.2. Modèle de rhizotron et chambre climatique</i>	<i>90</i>
II.2. CAPTEURS POUR ÉTUDIER LES PLANTES	93
<i>II.2.1. RMN.....</i>	<i>93</i>
<i>II.2.2. Humidité du sol.....</i>	<i>93</i>
<i>II.2.3. Psychromètres</i>	<i>94</i>
<i>II.2.4. Poromètres</i>	<i>95</i>
II.3. MESURES DES TRAITS MORPHOLOGIQUES	96
<i>II.3.1. Traits foliaires</i>	<i>96</i>
<i>II.3.2. Traits racinaires</i>	<i>96</i>
II.4. TRAITEMENTS DES DONNÉES	97
<i>II.4.1. Décalage des profils.....</i>	<i>97</i>
<i>II.4.2. Analyse des T_2.....</i>	<i>97</i>
<i>II.4.3. Analyses statistiques.....</i>	<i>100</i>
CHAPITRE III. PREUVE DE CONCEPT DE LA FAISABILITÉ DE L'IRM PORTABLE POUR L'ÉTUDE DES SYSTÈMES RACINAIRES	101

CHAPITRE IV. EXPLORATION PAR IRM PORTABLE DE LA STRUCTURE-FONCTION POUR L'UTILISATION DE L'EAU PAR LES RACINES	118
CHAPITRE V. CARACTÉRISATION PAR IRM PORTABLE DES RACINES DE PLANTES PRAIRIALES SOUMISES À UN STRESS HYDRIQUE	147
V.1. INTRODUCTION	147
V.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	149
V.2.1. <i>Plantes et conditions environnementales</i>	149
V.2.2. <i>Traits et mesures écophysologiques</i>	150
V.2.3. <i>Mesures RMN</i>	151
V.3. RÉSULTATS	152
V.3.1. <i>Chambre climatique</i>	152
V.3.2. <i>Traits foliaires et racinaires</i>	153
V.3.3. <i>Profils RMN</i>	155
V.3.4. <i>Évolution temporelle des signaux RMN et écophysologiques</i>	157
V.3.5. <i>Évolution de l'amplitude et des T_2 selon les conditions hydriques</i>	159
V.4. DISCUSSION	160
V.4.1. <i>Impact d'un stress hydrique sévère sur la répartition de l'eau dans les racines</i>	160
V.4.2. <i>Impact d'un stress hydrique sévère sur la fonction des racines</i>	163
V.4.3. <i>Effet de la réhydratation sur <i>R. acetosa</i></i>	164
V.5. CONCLUSION	165
CHAPITRE VI. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	167
ANNEXES.....	176
ANNEXE 1. MATÉRIELS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE « <i>CIRCADIAN VARIATION OF ROOT WATER STATUS IN THREE HERBACEOUS SPECIES ASSESSED BY PORTABLE NMR</i> »	176
ANNEXE 2. MATÉRIELS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE « <i>ROOT STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN WATER USE FOR SEVERAL HERBACEOUS SPECIES REVEALED BY PORTABLE NMR</i> »	178
ANNEXE 3. MATÉRIELS SUPPLÉMENTAIRES CHAPITRE 5.....	186
ANNEXE 4. VÉRIFICATION DE L'EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LE T_2	190
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	191

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1. Distribution des prairies, en vert, dans les régions tempérées et tropicales du globe (Buisson et al., 2022). Les lettres en noir et en bleu correspondent aux prairies représentées sur des photographies présentes dans l'article de Buisson et al. (2022)	16
Figure 2. Évolution de la concentration moyenne des principaux gaz à effet de serre (CO_2 en vert, CH_4 en orange et N_2O en rouge) depuis la période préindustrielle. La concentration en CO_2 est exprimée en ppm (partie par millions) tandis que les concentrations en CH_4 et en N_2O sont exprimées en ppb (partie par milliards). (Pachauri et al., 2015).	17
Figure 3. Évolution de la température moyenne à la surface du globe (noir) et de la température de l'air à la surface du sol (gris) depuis la moitié du XIX ^e siècle (Shukla et al., 2019).	18
Figure 4. Stock de carbone (GT C) dans la végétation (vert) et dans les sols jusqu'à un mètre de profondeur (jaune) des principaux biomes terrestres (figure adaptée de Watson et al., 2000). Forêts temp. = forêts tempérées, Forêts trop. = forêts tropicales et Forêts bor. = forêts boréales.	20
Figure 5. Schéma représentant les principaux flux de carbone entre les biomes terrestres et l'atmosphère dans le cas du cycle rapide du carbone (schéma adapté de https://www.energy.gov/science/doe-explainsthe-carbon-cycle , dernière consultation le 04/01/2023).	21
Figure 6. Schéma représentant le transport de l'eau dans la plante. Sous l'impulsion de la transpiration, l'eau est acheminée des racines jusqu'aux feuilles par le xylème. Une fois la photosynthèse effectuée, les sucres nouvellement formés sont redistribués aux puits de carbone par le phloème (G. Pagés & C. Doussan).	23
Figure 7. Flux d'eau à travers le continuum sol-plante-atmosphère. Déplacement du potentiel hydrique le plus élevé (sol) vers le potentiel hydrique le plus faible (atmosphère) (Lobet et al., 2014)	24
Figure 8. En haut, schéma représentant l'organisation des principaux tissus composant le limbe d'une feuille de dicotylédone (Nabors 2008) et en bas, coupe anatomique d'une feuille de monocotylédone (https://webapps.fundp.ac.be/umdb/histoplantvasc/mode_atlas/img106.htm , dernière consultation le 04/01/2023).	25
Figure 9. Représentation schématisée longitudinale d'une racine (Nabors, 2008)	27
Figure 10. Représentation schématisée transversale d'une racine et de la circulation de l'eau et des nutriments dans la racine (figure adaptée de Nabors, 2008)	28
Figure 11. En haut, schéma simplifié des caractéristiques anatomiques des racines de trois groupes de plante (Lys (Lilies) ; Monocotylédones (Grasses) ; Dicotylédones (Forbs)) dont le diamètre de la stèle (cercle vert), l'épaisseur du cortex (ligne en tiret bleue) et les vaisseaux (cercles rouges) (Zhou et al., 2021). En bas, pour chaque groupe de plante, une coupe anatomique des racines de premier ordre (a, c et e) et de troisième ordre (b, d et f) pour chaque groupe de plante avec C, cortex ; En, endoderme ; Ep, épiderme ; Pc, cellules de passage ; Sp, phloème secondaire et Sx, xylème secondaire (Zhou et al., 2022).	29
Figure 12. Exemples d'architectures racinaires chez une dicotylédone (<i>Arabidopsis</i>) et deux monocotylédones (Riz (rice) et Maïs (maize)) selon le stade de développement de la plante. Les différents types de racines sont indiqués par les flèches blanches. PR, racine primaire; SR, racines séminales ; LR, racines latérales ; CR, « crown roots », BR, « brace roots » (G. Viana et al., 2022).	30
Figure 13. Schéma illustrant les trois voies pour le transport de l'eau et des minéraux de l'extérieur de la racine vers le xylème. (a) la voie apoplasmique, (b) la voie symplasmique et (c) la voie transcellulaire. Les voies (b) et (c) sont souvent nommées ensemble comme étant la voie de cellule à cellule ou protoplasmique (Steudle, 2001).	31
Figure 14. Représentation schématisée des stratégies mises en place par les plantes pour faire face à un stress hydrique (Volaire, 2018).	35
Figure 15. Variations au cours d'une journée de la transpiration (T) et du flux de sève mesuré dans les branches (SFC), dans le tronc (SFS) et dans une racine (SFR) de <i>Quercus robur</i> en (a) octobre, (b) novembre, (c et d) avril, (e) août et (f) septembre (Ziegler et al., 2009).	41
Figure 16. Spectres NIRS obtenus entre 1100 et 2500 nm pour différents teneurs en eau de racines de <i>Dactylis glomerata</i> (Arnault, 2021).	43

Figure 17. Variations de la teneur en eau au cours du temps dues à l'absorption racinaire par des lupins ayant A, un système racinaire pivotant et B, un système racinaire fasciculé (Garrigues et al., 2006).	44
Figure 18. Suivi longitudinal par tomographie du système racinaire d'un lupin après injection d'eau deutérée dans le bas de l'échantillon. Visualisation de la montée du front d'eau (bleu) poussée par l'eau deutérée (Tötzke et al., 2017).	45
Figure 19. Évolution de la teneur en eau dans un rhizotron contenant un lupin avec un système racinaire pivotant. L'absorption racinaire est visible par une diminution de la teneur en eau moyenne au cours du temps (Doussan et al., 2006).	47
Figure 20. Simulation de la variation de la teneur en eau du sol (a) et de la densité de flux d'eau dans les racines (b) sur la base des résultats de l'imagerie par rayons X de la Figure 19 (Doussan et al., 2006).	48
Figure 21. Visualisation des structures internes d'une racine de patate douce sur deux coupes (B, C et D, E) grâce à des cartes T_2 (temps de relaxation transversale). Sur la sous-figure C, observation du xylème (X, flèche rouge), du phloème (Ph, flèche bleue), du parenchyme (Pa) et du cambium (Ca, flèche blanche) (Metzner et al., 2014).	49
Figure 22. Évolution des temps de relaxation selon le temps de corrélation τ_c . $\omega_0 = 2\pi f_0$	55
Figure 23. Décroissances obtenues avec une séquence CP (a) et une séquence CPMG (b). L'erreur cumulative visible sur la première décroissance disparaît sur la seconde (Meiboom and Gill, 1958)	58
Figure 24. Observation de l'image RMN d'une tige avec visualisation du xylème en hypersignal (a). Propagateur moyen mesuré dans la tige d'un peuplier (b) et des distributions associées à l'eau stationnaire (c, bleu) et circulante (c, rouge) (Windt et al., 2011).	60
Figure 25. Visualisation de différents dispositifs à bas champ magnétique mentionnés dans le tableau précédent. De la gauche vers la droite : le NMR CUFF (Windt et al., 2011), le dispositif utilisé par Kimura et al. (2011), le Tree Hugger (Jones et al., 2012) et le dispositif utilisé par Nagata et al. (2016).	85
Figure 26. Visualisation à gauche du Profile NMR-MOUSE et à droite du schéma décrivant la composition du dispositif (Rata et al., 2006).	87
Figure 27. Schéma de l'obtention du profil d'un échantillon grâce à la présence d'un ascenseur de précision qui permet de déplacer l'aimant ainsi que l'antenne RF, et donc le volume sensible au sein de l'échantillon. Une antenne de gradient de champ magnétique permet de réaliser des mesures de flux dans l'échantillon.	87
Figure 28. Visualisation de l'organisation du rhizotron. 1. Plaque transparente, 2. Toile, 3. Contenant. Le compartiment « racines » est situé entre la plaque transparente et la toile (entre 1 et 2) et le compartiment « sol » dans l'espace restant (entre 2 et 3).	90
Figure 29. Étapes de la mise en place d'une plante entière dans un rhizotron, exemple de <i>R. acetosa</i>	91
Figure 30. Exemple de plantes une fois positionnées dans les rhizotrons : 1) <i>R. acetosa</i> , 2) <i>D. glomerata</i> , 3) <i>F. arundinacea</i> , 4) <i>T. repens</i> et 5) <i>P. lanceolata</i>	92
Figure 31. Photographies du capteur EC-5 (https://www.hoskin.qc.ca/catalog/index.php?main_page=product_info&cPath=1_61_156&products_id=306 , dernière consultation le 09/01/2023) et de celui-ci inséré dans le sol (photographie prise au moment du prélèvement des racines à la fin des expériences).	94
Figure 32. Photographies du psychromètre PSY1 positionné sur une feuille de <i>T. repens</i> à gauche et de la chambre du psychromètre avec visualisation des thermocouples C et S (flèches blanches) à droite (adaptée de https://ictinternational.com/products/psy1/psy1-stem-psychrometer/ , dernière consultation le 09/01/2023).	95
Figure 33. Exemple d'images microscopiques de stomates ($\times 16$) de <i>R. acetosa</i> (face abaxiale) à gauche et de <i>D. glomerata</i> (face abaxiale) à droite. Les flèches blanches pointent vers des stomates.	96
Figure 34. Étapes de l'analyse NNLS. A. Décroissance transversale complète. B. Décroissance filtrée. C. Ajustement NNLS (rouge) superposé à la décroissance filtrée (vert). D. Distribution des T_2 obtenus à la suite de l'analyse NNLS.	99
Figure 35. Évolution temporelle de la concentration en CO_2 (A), de l'humidité relative de l'air (B), de la température de l'air (C) et du rayonnement photosynthétiquement actif (D) dans la chambre climatique durant les expérimentations sur <i>D. glomerata</i> en jaune, <i>M. sativa</i> en rose et <i>R. acetosa</i> en vert. L'alternance des rectangles blancs et gris représente le cycle jour/nuit dont la photopériode est de 14 heures.	153
Figure 36. Proportion cumulée de volume racinaire par classe de diamètre des racines (mm) présentes dans la fenêtre de mesure RMN de <i>D. glomerata</i> (jaune), <i>R. acetosa</i> (vert) et <i>M. sativa</i> (rose)	155
Figure 37. Profils acquis sur <i>D. glomerata</i> , <i>R. acetosa</i> et <i>M. sativa</i> en période d'hydratation (WW en vert), après trois semaines sans arrosage (période de stress hydrique, WD en jaune) et à la fin de la période de réhydratation	

(RW en bleu). Les plantes présentaient un LWP entre -0.04 et -0.32 MPa en période d'hydratation. Les profils présentés en période de stress hydrique et de réhydratation sont des profils acquis au milieu de la nuit aux alentours de 03:00. 156

Figure 38. Évolution du potentiel hydrique foliaire et de la conductance stomatique (A), de l'intégrale de la zone racine et du signal RMN moyen du sol (B et C respectivement) et de l'humidité du sol (D) pour *D. glomerata*, *M. sativa* et *R. acetosa* selon le cycle hydratation (vert), déshydratation (jaune) et réhydratation (bleu). La conductance stomatique est représentée par les losanges orange. 158

Figure 39. Moyenne et écart-type de l'amplitude (A), du T_2 et du produit des deux paramètres précédents (AT_2) mesurés la nuit selon les conditions hydriques et les espèces. 160

Figure 40. Relation entre l'intégrale de la zone racine des profils et le volume racinaire pour l'ensemble des espèces étudiées dans les chapitres 4 (cercle plein) et 5 (cercle vide). 168

Figure 41. Comparaison des T_2 moyens mesurés chez les espèces étudiées à la fois dans le chapitre 4 (rose) et dans le chapitre 5 (jaune) dans des conditions hydriques similaires. 169

Liste des tableaux

Tableau 1. Objectifs de mesure, avantages et inconvénients des principales méthodes employées pour étudier l'eau dans les racines. 50

Tableau 2. Exemples des fréquences de Larmor et d'aimantation pour le noyau d'hydrogène pour différents champs magnétiques B_0 à température ambiante (298 K soit 25°C). L'aimantation, soit la différence de population entre les deux niveaux d'énergie (ppm) est calculée à partir de l'équation 7. 53

Tableau 3. Caractéristiques d'aimants à bas champ magnétique ayant été conçus pour une application à destination des végétaux (liste non exhaustive). 85

Tableau 4. Caractéristiques des aimants à bas champ magnétiques considérés par la plateforme pour l'étude des végétaux à l'extérieur du laboratoire. 86

Abréviations et acronymes

2D : bidimensionnel	CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill
3D : tridimensionnel	D : coefficient de diffusion
γ : rapport gyromagnétique nucléaire	dpi : dot per inch (point par pouce, mesure de la résolution du scanner)
δ : durée d'application des gradients	$E_{\text{cuticulaire}}$: transpiration foliaire cuticulaire
Δ : durée d'évolution du signal dans la séquence PFG	$E_{\text{stomatique}}$: transpiration foliaire stomatique
ΔB : inhomogénéités des champs magnétiques	E_{totale} : transpiration foliaire totale
μ : moment magnétique nucléaire	f_0 : fréquence de Larmor
Π : pression osmotique	g : intensité de gradients de champ magnétique
ρ : relaxivité de surface	$G_{x,y \text{ ou } z}$: direction des gradients de champ magnétique, x, y ou z indiquant la direction dans le plan
σ : coefficient directeur de la relation affine qui relie le potentiel hydrique foliaire de mi-journée en fonction du potentiel hydrique foliaire de fin de nuit	GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat
τ : temps d'évolution du signal	GPP : Gross Primary Production
τ_c : temps de corrélation	Gs : conductance stomatique
Ψ : potentiel hydrique	Gy : Gray, unité dérivée de dose absorbée (énergie d'un rayonnement ionisant apportant une énergie d'un joule à un milieu homogène d'une masse d'un kilogramme)
Ψ_π : potentiel osmotique	h : constante de Planck ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)
Ψ_g : potentiel lié à la gravité	^1H : atome d'hydrogène
Ψ_{MD} : potentiel hydrique de mi-journée (md, midday)	H_2O : eau
Ψ_P : potentiel de turgescence	IR : inversion-récupération
Ψ_{PD} : potentiel hydrique foliaire de fin de nuit (pd, pre-dawn)	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
A : amplitude du signal RMN	k_b : constante de Boltzmann ($1.381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
ABA : acide abscissique	l : dimension de l'antenne RMN
B_0 : champ magnétique principal	LA : surface foliaire
B_1 : champ magnétique perturbateur	LWP : potentiel hydrique foliaire
C : carbone	M_0 : aimantation initiale
CCD : Charge-Coupled Device, capteur photographique	MPa : Méga Pascal (10^6 pascals)
CH_4 : méthane	
CO_2 : dioxyde de carbone	

N_{α} : population de spins à l'état d'énergie inférieur (α)

N_{β} : population de spins à l'état d'énergie supérieur (β)

NA : non-applicable

NIRS : Near InfraRed Spectroscopy

NMR-MOUSE : Nuclear Mobile Universal Surface Explorer

NNLS : Non-Negative Least Square

N_2O : protoxyde d'azote

O_2 : dioxygène

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

PFG : Pulsed Field Gradient

PIPs : Plasma membrane Intrinsic Proteins

ppb : partie par milliards

ppm : partie par millions

PRG : pouvoir de réchauffement global

r : position initiale d'une molécule

r' : position d'une molécule à la fin de la séquence RMN

R_{cuticule} : résistance cuticulaire

R_{stomate} : résistance stomatique

RF : radiofréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RWC : teneur en eau des racines

S : surface

S : signal RMN

SE : spin echo

SLA : surface spécifique foliaire

SNR : rapport signal sur bruit

SR : saturation-récupération

SRL : longueur spécifique de racines

STE : stimulated spin echo

SWC : teneur en eau du sol

T_1 : temps de relaxation longitudinale

T_2 : temps de relaxation transversale

TE : temps d'écho

TIPs : Tonoplast Intrinsic Proteins

TR : temps de répétition

VPD : Vapour Pressure Deficit

Introduction

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) est une méthode d'analyse répandue, employée dans des domaines variés tels que la médecine, l'agroalimentaire, l'héritage culturel ou encore l'agronomie. Elle exploite le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) des noyaux possédant un spin non nul placés dans un champ magnétique. Bien qu'ayant une sensibilité considérée comme faible au regard d'autres techniques analytiques (spectrométrie de masse, fluorométrie...) ou d'imagerie (imagerie nucléaire), elle est attrayante en raison de son caractère non destructif, non invasif et non ionisant. Le noyau généralement étudié et le plus sensible en RMN est le noyau d'hydrogène (^1H). Les tissus biologiques étant majoritairement composés d'eau (et donc de ^1H), l'IRM est une méthode de choix pour étudier les matrices biologiques dont les végétaux.

Dans ce domaine, l'IRM portable, à bas champ magnétique (intensité du champ magnétique principal inférieur à 1 T) est particulièrement attractive car elle permet de sortir du laboratoire pour étudier l'objet d'intérêt dans son environnement naturel tout en ayant un coût inférieur à des dispositifs à haut champ magnétique. Cette mobilité du dispositif présente ainsi un intérêt non négligeable pour l'étude des plantes *in situ*. L'IRM est notamment intéressante pour l'étude des racines car elle permet leur caractérisation en dépit de l'opacité du sol. L'IRM portable est donc une méthode attractive pour l'étude de ces organes souterrains à l'extérieur du laboratoire. Or, jusqu'à présent, les principales études réalisées sur les racines ont été effectuées à haut champ magnétique afin de révéler l'architecture racinaire et de visualiser l'absorption de l'eau. Au moment des premières expérimentations en 2020, un article venait de paraître dans la littérature (Bagnall et al., 2020). Celui-ci traitait de la capacité de l'IRM bas champ à visualiser les racines dans le sol mais il n'étudiait pas les racines du point de vue de la physiologie de la plante. Ce constat a ainsi constitué le point de départ de la thèse qui a été découpée en trois objectifs liés à la mesure de l'état hydrique des racines de plantes cultivées dans un modèle de rhizotron en conditions environnementales contrôlées.

Ainsi, le premier objectif a été d'apporter la preuve de concept que l'IRM portable permet de caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales en suivant différentes espèces sur plusieurs jours. En effet, en raison de leur fonctionnement (transpiration), l'état hydrique des plantes évolue au cours de la journée. Des variations des paramètres RMN sont donc attendues. De ce premier objectif est ensuite apparue la question de savoir si nous pouvions intégrer les mesures RMN dans l'analyse des relations structure-fonction liées à

l'utilisation de l'eau par les plantes. En effet, ces dernières présentent des systèmes racinaires variés mais aussi des fonctionnements contrastés selon leur stratégie d'utilisation des ressources ou encore leur âge. Des différences inter-espèces des paramètres RMN sont donc escomptées. Le troisième objectif a été d'étudier la capacité de l'IRM portable à caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales soumises cette fois-ci à un stress hydrique. En effet, en présence d'un stress hydrique, la teneur en eau et la physiologie des espèces sont affectées et sont donc susceptibles d'entraîner des variations des paramètres RMN. Par ailleurs, la diminution de la présence d'eau peut entraîner des problèmes de sensibilité de la mesure. Ce faisant, ce troisième objectif permet également de caractériser la sensibilité de notre capteur.

Le manuscrit est ainsi organisé en cinq chapitres. Le Chapitre 1 présente l'état de l'art qui permet de contextualiser la thèse avec une présentation du contexte actuel de changement climatique et de son impact sur les végétaux, ainsi que des éléments de biologie végétale qui permettent d'interpréter les résultats du point de vue de la physiologie de la plante. Une présentation de la RMN et de l'application de dispositifs à bas champ magnétique sur des modèles végétaux est également présente dans ce premier chapitre. Le Chapitre 2 présente les matériels et les méthodes utilisés lors des expérimentations de manière plus détaillée que dans les articles qui constituent le corps de ce manuscrit.

Les chapitres 3 à 5 correspondent au corps de ce manuscrit et permettent chacun de répondre à un des objectifs présentés précédemment. Ils correspondent à des articles publiés, soumis ou en préparation. Le Chapitre 3 permet de répondre au premier objectif de la thèse et de démontrer la faisabilité de l'IRM portable pour étudier l'état hydrique des racines de plantes prairiales. Le Chapitre 4 découle du chapitre précédent et a pour objectif d'évaluer la capacité de l'IRM portable à restituer les différences structurelles et fonctionnelles dans l'utilisation de l'eau par différentes espèces d'herbacées. Le Chapitre 5 permet quant à lui de montrer la capacité de l'IRM portable à étudier l'état hydrique des racines de plantes prairiales soumises à un stress hydrique. Enfin, une discussion générale qui permet de faire le bilan des études menées dans le cadre de la thèse, de mettre en évidence l'apport de l'IRM portable pour l'étude des racines mais aussi des limites observées, clôt ce manuscrit.

Chapitre I. État de l'art

I.1. Contexte

I.1.1. Biome prairial

La biosphère peut être stratifiée selon des unités spatiales et fonctionnelles, les biomes. Un biome occupe une large zone à l'échelle continentale ou sous-continentale et est caractérisé par une faune et une flore spécifiques ainsi que par des conditions environnementales (humidité, sol...) et climatiques (tropicales, tempérées, boréales...) (Mucina, 2019). Bien que différentes classifications existent (Beierkuhnlein and Fischer, 2021), les principaux biomes terrestres sont les forêts tropicales, boréales et tempérées, les savanes, les prairies, les déserts, les toundras, les zones humides et les terres cultivées (Watson et al., 2000).

Il existe de nombreuses définitions des prairies en raison notamment de la difficulté à caractériser leurs limites, de leur présence dans un continuum entre les forêts et les déserts ainsi que de la présence de nombreuses perturbations (Dixon et al., 2014). De manière générale, les prairies sont définies comme des terres dédiées à la production de fourrage ou à d'autres fins agricoles. Leur existence dépend également de perturbations d'origine non anthropique comme le feu ou encore le pâturage par la faune sauvage (Allen et al., 2011; Peeters et al., 2014). Elles se composent d'herbacées dont des graminées et des dicotylédones dont des légumineuses. Des arbres peuvent également être présents (Allen et al., 2011; Dixon et al., 2014; Peeters et al., 2014). Les prairies se distinguent selon leur origine (naturelle, semi-naturelle ou culture), leur mode d'exploitation (fauchage et/ou pâturage) et leur âge (annuelle ou permanente). En 2014, Dixon *et al.* proposent une définition générale qui englobe les différents types de prairies afin de les cartographier. Les prairies sont ainsi définies comme étant un type de zone non humide avec une couverture végétale d'au moins 10%, dominée par les graminées. Les graminées ont une couverture d'au moins 25% et peuvent être codominées par d'autres plantes herbacées. Les arbustes ont une couverture inférieure à 25% et les arbres forment une canopée simple. Dans les zones tempérées, la couverture végétale des arbres est inférieure à 10% avec une hauteur inférieure à 5 mètres. Dans les zones tropicales, la couverture végétale des arbres est inférieure à 40% avec une hauteur inférieure à 8 mètres. Ainsi, les prairies représentent entre 25 et 40% de la couverture terrestre mondiale (Bai and Cotrufo, 2022; Buisson et al., 2022; Strömberg and Staver, 2022) (**Figure 1**) et, suivant la définition de Dixon *et al.* (2014), 49% (en 2019, <https://lcviewer.vito.be/2019>) de la couverture terrestre de la France.

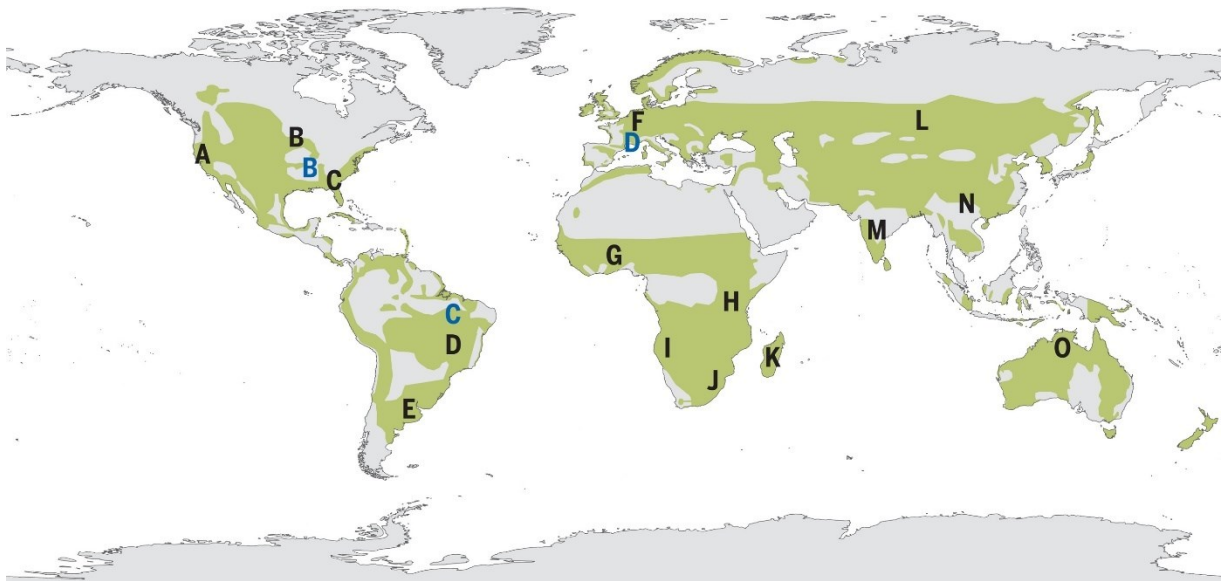


Figure 1. Distribution des prairies, en vert, dans les régions tempérées et tropicales du globe (Buisson et al., 2022). Les lettres en noir et en bleu correspondent aux prairies représentées sur des photographies présentes dans l'article de Buisson *et al.* (2022)

Comme tout écosystème, les prairies fournissent trois principaux services : les services (i) culturels, (ii) d'approvisionnement et (iii) de régulation et de support (Sala et al., 2017; Bengtsson et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Les services culturels correspondent aux bénéfices non matériels dont peut bénéficier l'Homme. Ces bénéfices peuvent relever de l'esthétique, de la spiritualité, de la santé, de l'éducation ou encore du divertissement (Lindemann-Matthies et al., 2010; Sandifer et al., 2015; Nowak-Olejnik et al., 2020). Les activités concernées relèvent par exemple de randonnées, d'équitation, d'ornithologie, d'observation de paysages ou encore d'écotourisme (Fernández-Juricic et al., 2005; Li et al., 2022a).

Les services d'approvisionnement correspondent aux produits alimentaires et non alimentaires obtenus à partir des écosystèmes. Les produits alimentaires regroupent ceux à destination des herbivores par la production de fourrage et ceux à destination de l'Homme, les plantes médicinales (Žuna Pfeiffer et al., 2018), la production de miel (Affek, 2018), de bétail (Stampfli and Zeiter, 2010; Blair et al., 2014) ou de produits issus du bétail tels que le lait par exemple (Leaver, 1985). Les produits non alimentaires comprennent ceux issus des animaux tels que le cuir et la laine mais aussi ceux issus de la végétation tels que le bois ou le fuel (Boval and Dixon, 2012; Peri et al., 2021).

Les services de régulation et de support correspondent aux bénéfices obtenus par l'Homme et les autres écosystèmes de la régulation de processus. Ces services comprennent notamment la préservation de la biodiversité de la flore et de la faune tels que les insectes pollinisateurs (Werling et al., 2014; Bubová et al., 2015; Orford et al., 2016; Affek, 2018). Ils

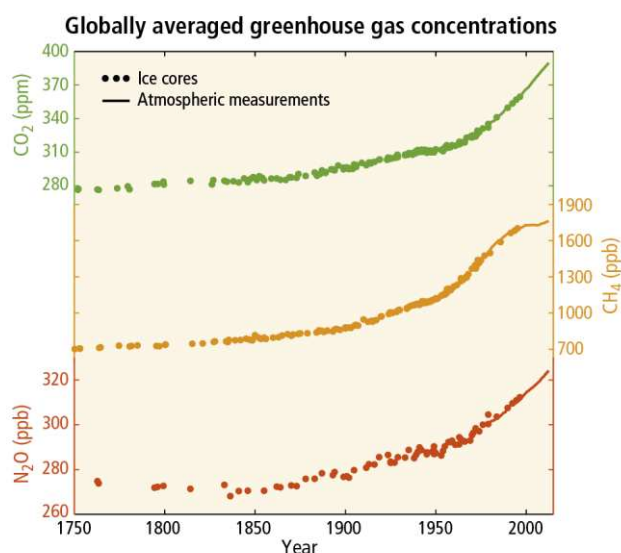
comprennent également la régulation des flux d'eau par la transpiration, l'interception des pluies et la facilitation de l'infiltration de l'eau dans le sol par le biais des macropores créés par la pénétration des racines. Le contrôle de l'érosion des sols par l'augmentation de la densité du sol et le renforcement du sol par les racines est un autre service procuré par les prairies (Gyssels et al., 2005). Les prairies jouent également un rôle important dans la régulation du climat grâce au stockage de carbone dans les sols (Watson et al., 2000). Ce dernier service est particulièrement intéressant dans le contexte actuel de réchauffement climatique dû à l'accumulation de gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Entre 20 et 34% des stocks terrestres de carbone seraient assurés par les prairies (Beer et al., 2010; Bai and Cotrufo, 2022; Strömberg and Staver, 2022) contribuant ainsi à diminuer l'impact du réchauffement climatique.

1.1.2. Définition et impacts du réchauffement climatique sur les écosystèmes

Les gaz à effet de serre sont des gaz présents dans l'atmosphère qui absorbent et réémettent une partie des rayonnements infrarouges d'origine solaire permettant ainsi de réchauffer l'atmosphère. Ces gaz peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Les principaux gaz à effet de serre naturels sont le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4) et le protoxyde d'azote (N_2O). La capacité de ces gaz à absorber et réémettre les rayonnements solaires correspond au pouvoir de réchauffement global (PRG). Le CO_2 , qui sert de référence, a un PRG de 1 tandis que le méthane a un PRG de 25 et le protoxyde d'azote un PRG de 298.

Depuis la période préindustrielle, en raison des activités industrielles et agricoles, les émissions de CO_2 , de CH_4 et de N_2O ont augmenté de 40%, 150% et 20% respectivement (**Figure 2**) (Pachauri et al., 2015).

Figure 2. Évolution de la concentration moyenne des principaux gaz à effet de serre (CO_2 en vert, CH_4 en orange et N_2O en rouge) depuis la période préindustrielle. La concentration en CO_2 est exprimée en ppm (partie par millions) tandis que les concentrations en CH_4 et en N_2O sont exprimées en ppb (partie par milliards). (Pachauri et al., 2015).



Ces augmentations des concentrations des gaz à effet de serre dans l'atmosphère ont entraîné une hausse de la température de la Terre de 1.5°C et de manière globale, en incluant les océans, de 1°C (**Figure 3**) (Shukla et al., 2019).

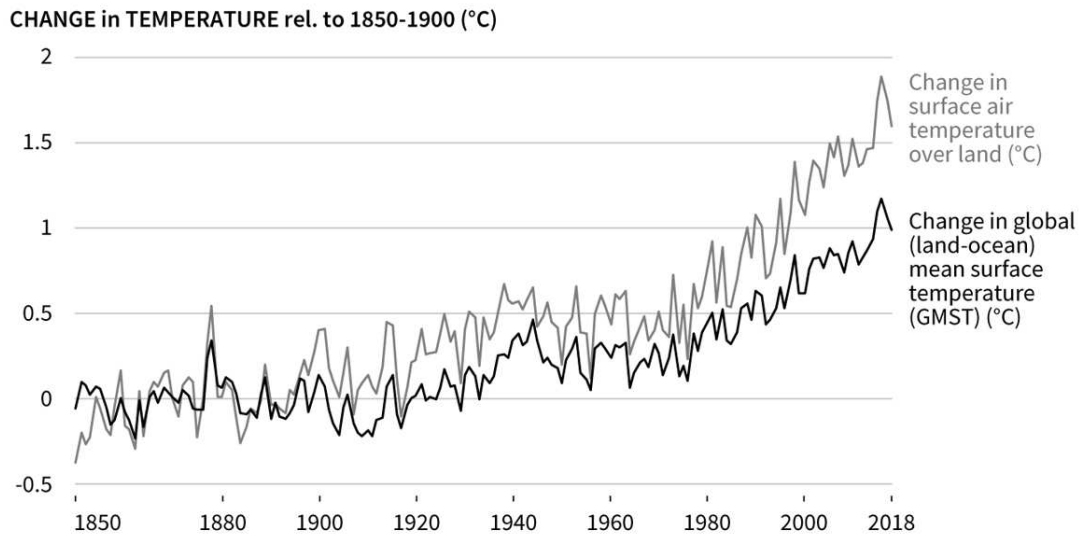


Figure 3. Évolution de la température moyenne à la surface du globe (noir) et de la température de l'air à la surface du sol (gris) depuis la moitié du XIX^e siècle (Shukla et al., 2019).

Ce réchauffement climatique entraîne des changements météorologiques avec une augmentation de la fréquence des phénomènes extrêmes tels que des épisodes de précipitations abondantes, de sécheresse ou encore des extrêmes de chaleur. Il entraîne également une diminution de la couverture des neiges et des glaciers, une augmentation du niveau des mers et des océans ainsi qu'une acidification de ces eaux du fait de l'absorption de CO₂ (Pachauri et al., 2015).

Le changement climatique affecte aussi la biodiversité en entraînant une augmentation de la vulnérabilité des espèces végétales et animales pouvant aller jusqu'à l'extinction de certaines d'entre elles (Thomas et al., 2004; Thuiller et al., 2005). Dans une méta-analyse, Piseddu *et al.* (2021) ont montré qu'un réchauffement de l'air compris entre 0.15 et 4.10°C réduisait le nombre d'espèces dans les prairies de 13% par rapport à la température ambiante, et ce d'autant plus qu'elles se situaient en altitude (>1000 m au-dessus du niveau de la mer). Ceci indique que les espèces végétales adaptées aux basses températures ont tendance à être plus sensibles au réchauffement climatique en raison d'une niche thermique (température optimale ou gamme de température dans laquelle une plante peut se développer avec succès) plus étroite. D'après cette étude, la disparition des espèces serait liée à l'exclusion compétitive qui se met en place lorsque les interactions plantes-plantes (compétition pour les ressources aériennes et édaphiques) sont fortes, comme dans les couverts denses en végétation par

exemple. Mais ce travail n'intègre pas les effets conjoints des sécheresses édaphiques. Allen *et al.* (2010) ont présenté trois autres mécanismes possibles pouvant augmenter la mortalité des espèces végétales : la cavitation des vaisseaux de xylème (présence d'air dans les vaisseaux), la privation de carbone et de composés organiques par la diminution de la photosynthèse, et une vulnérabilité accrue aux insectes et mycètes. La distribution géographique des espèces animales et végétales peut également être modifiée, celles-ci migrant dans des zones aux conditions plus favorables à leur physiologie (Root *et al.*, 2003). De même, leur phénologie est influencée par le changement climatique. Une précocité dans la reproduction des grenouilles, la nidification des oiseaux, la floraison des arbres ou encore l'arrivée des papillons et oiseaux migrateurs a ainsi été observée (Parmesan and Yohe, 2003). Le changement climatique influe également sur la productivité des cultures terrestres et aquatiques (Tubiello *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2019; Simionov *et al.*, 2021). Ces variations de la productivité des différentes cultures, qui peuvent accentuer la pauvreté de certaines populations, ainsi que l'impact négatif du réchauffement climatique sur la santé (Bunyavanich *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 2005; Bayram and Öztürk, 2014) peuvent entraîner des mouvements permanents ou temporaires des populations, celles-ci cherchant à éviter des zones à risque ou dépourvues de ressources (risque de famine) (Myers, 2002). Le changement climatique peut toutefois être atténué grâce à, entre autres, la capacité des écosystèmes à séquestrer le carbone (Watson *et al.*, 2000).

I.1.3. Régulation du changement climatique par la séquestration de carbone

Le cycle du carbone décrit les flux de carbone qui ont lieu entre l'atmosphère, les océans, la biosphère terrestre et la lithosphère. La séquestration du carbone est une des composantes de ce cycle (Friedlingstein *et al.*, 2022) et une étape-clé pour limiter le réchauffement climatique. Le cycle du carbone comprend une composante lente et une composante rapide.

Le cycle lent du carbone correspond aux mouvements de carbone entre la lithosphère, les océans et l'atmosphère (Farmer and Cook, 2013; Hilton and West, 2020). Brièvement, en raison des pluies et de l'érosion, des cations tels que le calcium sont libérés des roches et sont transportés via les cours d'eau vers les océans. Dans les océans, ces ions calcium vont s'associer aux ions bicarbonate pour former du carbonate de calcium. Par sédimentation, des roches vont se former stockant le carbone et aboutissant progressivement à la formation de réserves d'hydrocarbures. Ce carbone est ensuite libéré sous forme de CO₂, hors activité anthropique, par la fonte des roches lors d'éruption volcanique ou d'activité tectonique.

Le cycle rapide du carbone correspond quant à lui aux échanges ayant lieu entre l'atmosphère, les océans et la biosphère terrestre. Bien que les océans stockent environ 90% du carbone sous forme organique ou inorganique, nous nous intéressons ici aux biomes terrestres (Crisp et al., 2022). En 2000, le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) a recensé les stocks de carbone présents dans la végétation et les sols jusqu'à un mètre de profondeur des principaux biomes terrestres (Watson et al., 2000). Ces stocks sont essentiellement dans les sols, jusqu'à plus de 97% pour les prairies et les cultures (**Figure 4**).

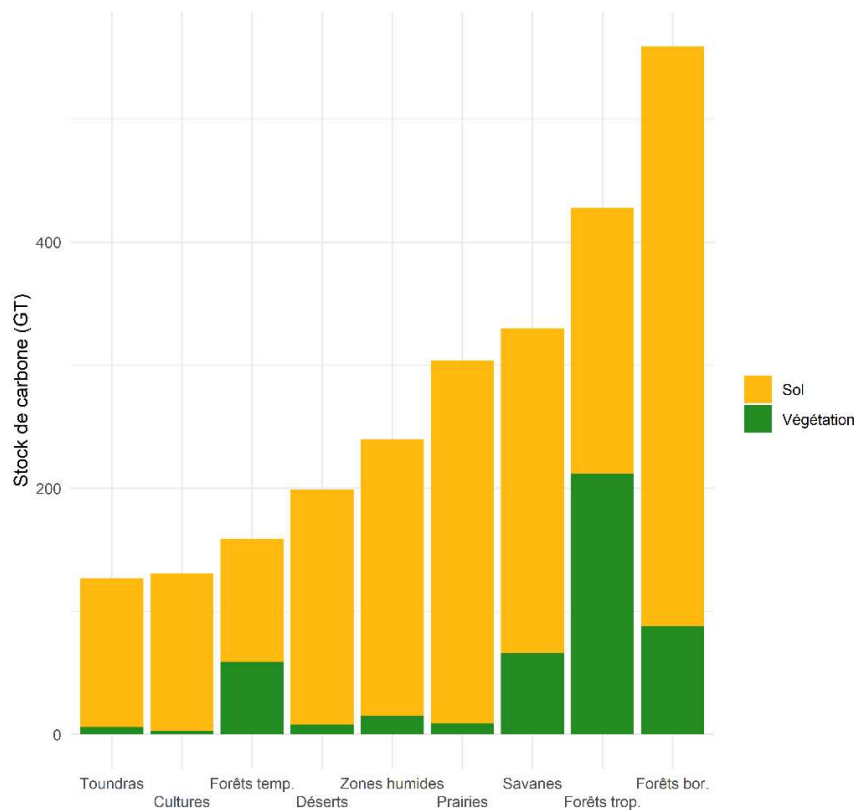


Figure 4. Stock de carbone (GT C) dans la végétation (vert) et dans les sols jusqu'à un mètre de profondeur (jaune) des principaux biomes terrestres (figure adaptée de Watson *et al.*, 2000). Forêts temp. = forêts tempérées, Forêts trop. = forêts tropicales et Forêts bor. = forêts boréales.

Les flux de carbone ayant lieu entre les biomes terrestres et l'atmosphère résultent des activités humaines telles que les activités agricoles ou encore la combustion de carburant, et des processus naturels. Le bilan de carbone dépend de l'acquisition du carbone et de son stockage dans les puits de carbone, et de son relargage dans l'atmosphère. Les activités humaines, la respiration autotrophe et la photorespiration dans le cas des organismes photosynthétiques ainsi que la respiration hétérotrophe (décomposition de la matière organique assurée par les micro-organismes) constituent les principales sources de carbone. Le stockage du carbone dépend essentiellement de la photosynthèse qui permet de fixer le carbone atmosphérique et de le réduire sous forme de glucides permettant la formation de biomasse. À l'échelle d'un biome,

cette absorption correspond à la production primaire (GPP, Gross Primary Production). Le GPP global, tout biome terrestre considéré, est d'environ 122 Pg de carbone par an. Les biomes qui contribuent le plus au GPP global sont les forêts tropicales et les savanes (33.5% et 25.7% respectivement). Les prairies tempérées et les cultures contribuent quant à elles à 7.0% et 12.2% du GPP global soit un total de 19.2% (Beer et al., 2010; Strömberg and Staver, 2022). Ces valeurs seraient cependant sous-estimées (Strömberg and Staver, 2022). Ainsi, d'autres auteurs suggèrent que 34% des stocks terrestres de carbone sont assurés par les prairies (Bai and Cotrufo, 2022).

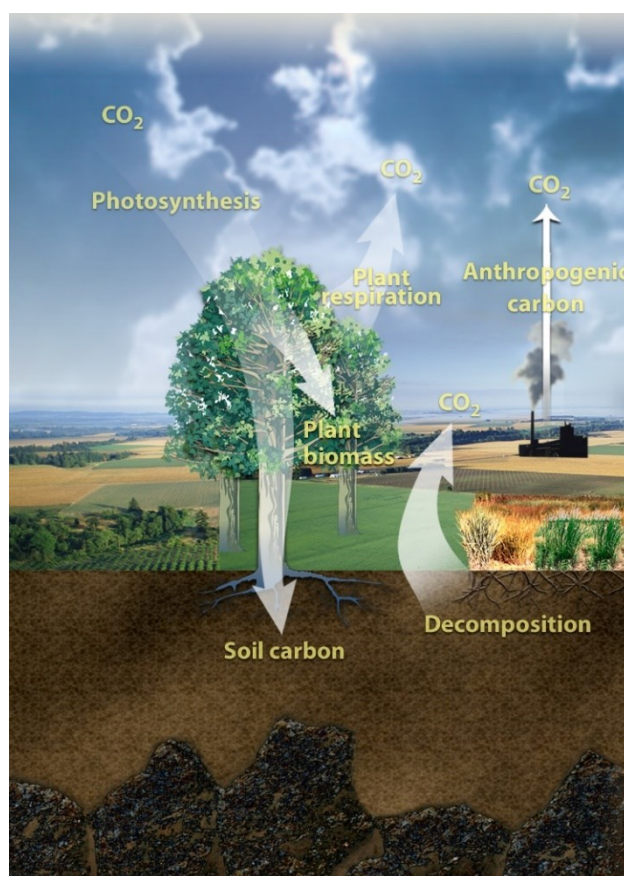


Figure 5. Schéma représentant les principaux flux de carbone entre les biomes terrestres et l'atmosphère dans le cas du cycle rapide du carbone (schéma adapté de <https://www.energy.gov/science/doe-explainsthe-carbon-cycle>, dernière consultation le 04/01/2023).

Avec le réchauffement climatique, une augmentation de l'intensité et de la fréquence des événements extrêmes est attendue (Solomon et al., 2007). En 2008, Arnone III *et al.* ont montré qu'un événement extrême tel que la sécheresse de 2003 impactait la séquestration du carbone sur l'année en cours mais également sur les années suivantes. En effet, par rapport à l'échantillon de prairie sans stress, le réchauffement avait réduit la séquestration de carbone de 68% (708 ± 57 vs 228 ± 165 g C m⁻² sur trois ans) (Arnone III et al., 2008). Cependant, lors de cette expérimentation, seule la température avait été augmentée. Or, il a été démontré qu'il

existe des interactions entre les différents paramètres climatiques et qu'une concentration élevée en CO₂ entraîne une augmentation des stocks de carbone y compris en présence d'une hausse de la température et d'une sécheresse (Roy et al., 2016; Dietzen et al., 2019). Ainsi, alors que dans le cas de l'association concentration en CO₂ ambiant/événements extrêmes (réchauffement + stress) la prairie devenait une source de carbone, dans le cas de l'association concentration en CO₂ élevée/événements extrêmes, la prairie demeurait un puits de carbone (Roy et al., 2016). En dépit des effets de la température, cela serait dû à une augmentation de la photosynthèse, en raison d'une plus grande disponibilité de CO₂, qui pourrait donc augmenter la production de biomasse (Dusenge et al., 2019). Cependant, les effets de la combinaison de ces paramètres dépendent des espèces. En 2018, Kurepin *et al.* ont étudié l'effet de ces paramètres sur l'activité photosynthétique de deux arbres présents dans les forêts boréales. Alors que *Pinus sylvestris* s'était acclimaté aux conditions testées avec un maintien de l'absorption du CO₂ atmosphérique, *Picea abies* s'était peu acclimaté entraînant alors un déclin de son activité photosynthétique, et donc de l'absorption de carbone (Kurepin et al., 2018). Les effets positifs de la concentration élevée en CO₂ dépendent également de la disponibilité en eau et nutriments. Ainsi, en présence d'un déficit en eau et en azote, l'augmentation de la production de biomasse sous une atmosphère enrichie en CO₂ n'a pas été observée chez des espèces prairiales (Reich et al., 2014). De ce fait, le devenir du bilan de carbone dépendrait de la tolérance des espèces à faire face à un stress et à l'intensité de celui-ci. Dans le cadre de la thèse, nous nous intéressons plus particulièrement au stress hydrique, et donc à l'eau présente dans le sol et dans les plantes.

En effet, le cycle du carbone est couplé au cycle de l'eau. Les plantes constituent un maillon du continuum sol-plante-atmosphère. La sève brute composée d'eau et d'ions est transportée par le xylème des racines aux feuilles. La majeure partie du volume d'eau transporté, environ 95%, est perdue lors de la pénétration du CO₂ nécessaire à la photosynthèse (Pallardy, 2010). Pour une molécule de CO₂ qui pénètre dans la plante, des centaines de molécules d'eau s'évaporent par les stomates. La transpiration permet de refroidir les feuilles et seulement une faible proportion de l'eau transportée par le xylème, environ 1%, est utilisée pour réaliser la photosynthèse tandis que la partie restante est destinée aux cellules et à l'ensemble des réactions physiologiques (Sperry, 2011). À l'issue de la photosynthèse, la sève élaborée, qui contient les sucres nouvellement formés, est redistribuée par le phloème, tissu conducteur spécialisé dans le flux descendant, aux cellules et aux différents puits de carbone (Figure 6).

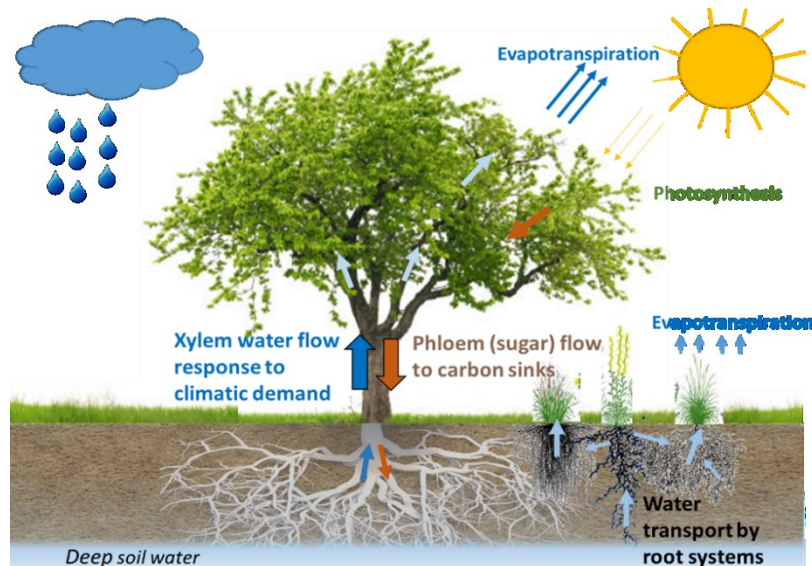


Figure 6. Schéma représentant le transport de l'eau dans la plante. Sous l'impulsion de la transpiration, l'eau est acheminée des racines jusqu'aux feuilles par le xylème. Une fois la photosynthèse effectuée, les sucres nouvellement formés sont redistribués aux puits de carbone par le phloème (G. Pagés & C. Doussan).

I.2. L'eau dans les plantes

I.2.1. Notion de potentiel hydrique

L'état de l'eau dans une partie ou dans l'entièreté de la plante est décrit par le potentiel hydrique (Ψ , MPa). Celui-ci caractérise l'intensité de la liaison de l'eau avec son environnement. Plus le potentiel hydrique est élevé, plus la facilité de l'eau à se mouvoir augmente. Le potentiel hydrique dans la plante correspond à la somme du potentiel de turgescence (Ψ_p), du potentiel osmotique (Ψ_π) et du potentiel lié aux forces gravitationnelles (Ψ_g).

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_\pi + \Psi_g \quad [1]$$

Le potentiel de turgescence Ψ_p rend compte de la turgescence des cellules qui est due à la présence d'une paroi cellulaire dans les cellules végétales. Lorsque la cellule est bien hydratée, l'eau exerce une force qui pousse la membrane cellulaire contre la paroi. Le potentiel de turgescence est alors élevé.

Le potentiel osmotique Ψ_π peut être décrit par son opposé, la pression osmotique ($\Pi = -\Psi_\pi$). Cette pression osmotique est due à la présence de solutés dans les cellules qui limitent la diffusion de l'eau du compartiment le plus concentré vers le moins concentré favorisant ainsi l'entrée de l'eau dans le compartiment concentré. Plus la concentration en solutés augmente, plus le potentiel osmotique diminue.

Le potentiel lié aux forces gravitationnelles Ψ_g rend compte de l'influence de l'altitude sur les mesures de potentiel hydrique. À moins que l'étude ne porte sur des grands arbres, cette composante est généralement négligée, Ψ_g n'augmentant que de 0.01 MPa m^{-1} (Jones, 2014).

I.2.2. Transport de l'eau dans la plante

Le transport de l'eau dans la plante est gouverné par la différence de potentiel hydrique entre deux systèmes et la somme des résistances présentes entre ces systèmes. Il s'effectue selon le gradient de potentiel hydrique, du sol vers l'atmosphère. Le flux d'eau dans la plante est décrit comme étant le produit de la différence de potentiel hydrique entre deux systèmes et la conductance (inverse de la résistance) de ces systèmes. Ces systèmes peuvent être le sol, le système racinaire, le système foliaire ou encore l'atmosphère.

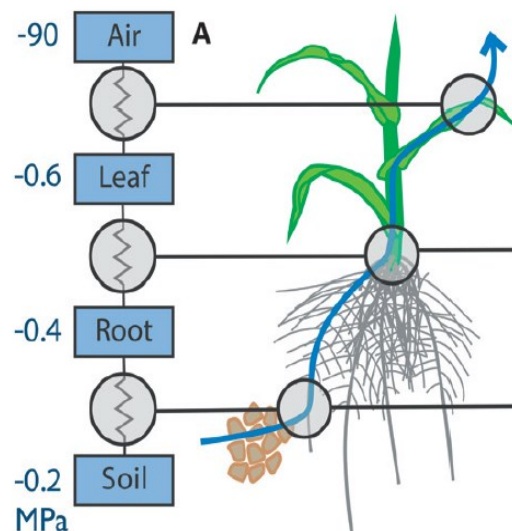


Figure 7. Flux d'eau à travers le continuum sol-plante-atmosphère. Déplacement du potentiel hydrique le plus élevé (sol) vers le potentiel hydrique le plus faible (atmosphère) (Lobet et al., 2014)

La transpiration foliaire, perte d'eau sous forme de vapeur au niveau des stomates, est le principal moteur du transport de l'eau dans la plante. La feuille est généralement connectée à la plante par un pétiole et est constituée d'un limbe plus ou moins étalé. Le limbe est constitué de nombreux tissus dont les principaux sont, de la face supérieure vers la face inférieure, la cuticule, l'épiderme supérieur, le parenchyme palissadique, le parenchyme lacuneux et l'épiderme inférieur recouvert également de cuticule. Entre les parenchymes se situent les faisceaux conducteurs qui permettent le transport de l'eau et de la sève issue de la photosynthèse. Dans l'épiderme se trouvent les stomates (**Figure 8**).

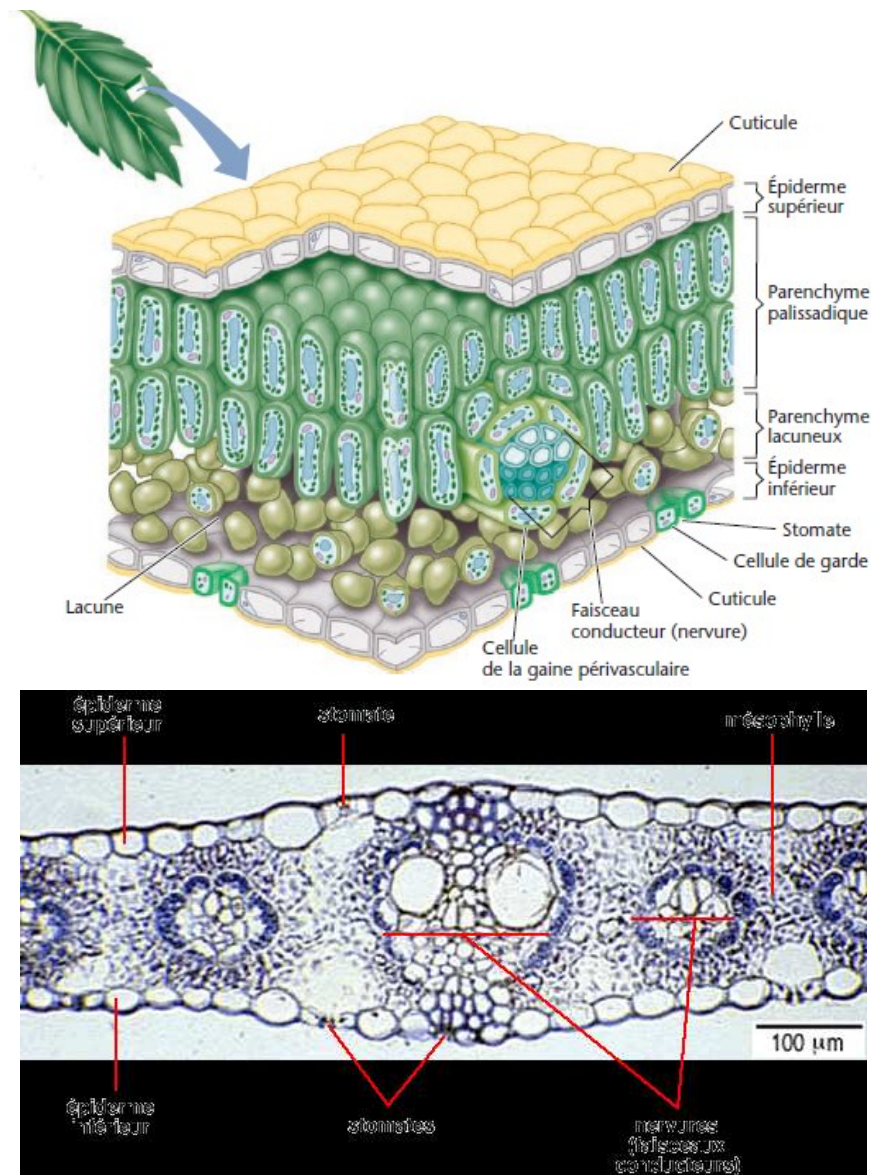


Figure 8. En haut, schéma représentant l'organisation des principaux tissus composant le limbe d'une feuille de dicotylédone (Nabors 2008) et en bas, coupe anatomique d'une feuille de monocotylédone (https://webapps.fundp.ac.be/umdb/histoplantvasc/mode_atlas/img106.htm, dernière consultation le 04/01/2023).

Les épidermes de la feuille, constitués d'une monocouche cellulaire, assurent la protection de celle-ci contre les agressions extérieures mécaniques (abrasions) et biologiques (champignons et bactéries pathogènes). Une cuticule composée de cire et de cutine les recouvre et permet de les imperméabiliser afin de limiter les pertes en eau par évaporation directe. La présence de stomates permet aux épidermes de réguler les échanges d'eau, sous forme de vapeur, et de gaz tels le dioxyde de carbone et le dioxygène (O_2). Les stomates sont formés de deux cellules de garde qui sont séparées par un espace appelé l'ostiole. Ils permettent la pénétration à l'intérieur des feuilles du CO_2 nécessaire à la réalisation de la photosynthèse qui s'effectue dans le mésophylle, composé du parenchyme palissadique et du parenchyme lacuneux, tandis que du dioxygène et de l'eau en sortent. Selon les besoins de la plante, le

dioxygène, qui est nécessaire à la respiration, peut également pénétrer à l'intérieur de la feuille. Enfin, les faisceaux conducteurs, ou faisceaux cribrovasculaires, correspondent à la continuité des tissus conducteurs de la tige. Ces faisceaux sont visibles sur le limbe sous forme de nervures. Une nervation parallèle est principalement retrouvée chez les Monocotylédones tandis qu'une nervation réticulée est principalement retrouvée chez les Dicotylédones.

La transpiration s'effectue en deux temps : (i) par évaporation de l'eau des parois cellulaires aux espaces intercellulaires puis (ii) par diffusion de la vapeur d'eau dans l'atmosphère. Elle est donc guidée par la différence de concentration en vapeur d'eau entre la plante et l'air extérieur (Vapour Pressure Deficit, VPD) et par la conductance foliaire. La transpiration foliaire totale (E_{totale}) correspond à la somme de la transpiration stomatique ($E_{stomatique}$) et de la transpiration cuticulaire ($E_{cuticulaire}$).

$$E_{totale} = E_{stomatique} + E_{cuticulaire} = VPD/R_{stomate} + VPD/R_{cuticule} \quad [2]$$

La majeure partie de la transpiration foliaire s'effectue par les stomates qui présentent une faible résistance (R) lorsqu'ils sont ouverts (Pallardy, 2010).

La circulation de l'eau dans la plante s'effectue dans le xylème présent dans tous les tissus conducteurs de la plante. Le xylème est constitué de deux types de tissus, le parenchyme et le sclérenchyme (Mencuccini, 2003). Le parenchyme est composé de cellules vivantes qui permettent notamment le transport et le stockage de nutriments et de carbohydrates ainsi que la production de molécules de défense. Le sclérenchyme est quant à lui constitué de cellules mortes dont les fonctions principales sont le transport de l'eau et des nutriments, et le stockage de l'eau. La circulation de l'eau dans le xylème repose sur la théorie de la tension-cohésion (Dixon and Joly, 1895), un mécanisme passif qui ne nécessite pas d'énergie métabolique, et sur les propriétés des molécules d'eau. Le long du vaisseau, l'eau adhère aux parois par établissement de liaisons hydrogène. Au niveau du ménisque situé à l'interface eau-air, une tension de surface due à la pression négative permet, en l'absence de transpiration, d'équilibrer la force de la gravité. Lorsque la plante transpire, des molécules d'eau s'évaporent au niveau du ménisque entraînant une diminution de la pression. Sous l'effet de cette tension supplémentaire et grâce à la cohésion entre les molécules d'eau, un flux se crée tout en permettant le maintien d'une continuité hydraulique dans la plante (Mencuccini, 2003; Kim et al., 2014). Ce flux généralement laminaire est, d'après la loi de Poiseuille, proportionnel au

rayon du vaisseau à la puissance quatre. Pour les herbacées, sa vitesse peut aller jusqu'à 100 m h⁻¹ soit 27.8 mm s⁻¹ (Mencuccini, 2003).

I.2.3. Absorption de l'eau par les racines

I.2.3.1. Anatomie des racines

Le long de l'axe longitudinal, son axe de croissance, de la partie proximale la plus mature vers la partie distale la plus jeune, la racine est discriminée en quatre zones : la zone de différenciation, d'élongation, méristématique et la coiffe (**Figure 9**).

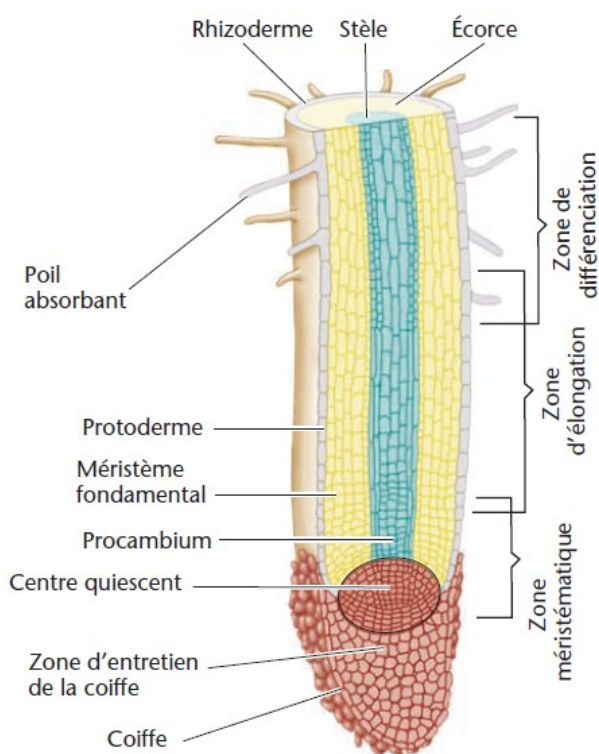


Figure 9. Représentation schématique longitudinale d'une racine (Nabors, 2008)

La croissance racinaire s'effectue à l'extrémité distale de la racine au niveau du méristème apical dans le centre quiescent. Par mitose des cellules dites initiales, de nouvelles cellules sont produites. Certaines demeureront des cellules initiales tandis que d'autres se différencieront après s'être allongées. Au-dessus du centre quiescent, la zone méristématique se divise en trois parties : le protoderme dont les cellules une fois différenciées donnent naissance au rhizoderme, le méristème fondamental et le procambium dont la différenciation des cellules aboutit à la formation des tissus conducteurs. La zone méristématique est protégée lors de la pénétration de la racine dans le sol par la coiffe. Celle-ci permet également de faciliter cette pénétration dans le sol grâce à la sécrétion de mucilage qui favorise le contact entre le sol et les racines (Nazari, 2021). Dans la zone de différenciation, certaines cellules du rhizoderme

forment des poils absorbants. Grâce à leur faible diamètre, ils peuvent pénétrer dans les pores du sol trop petits pour être pénétrés facilement par les racines. En contact direct avec le sol, ils permettent d'augmenter la surface d'échange entre le sol et la plante, et de faciliter l'absorption de l'eau et des nutriments en diminuant la distance que ces derniers doivent parcourir pour atteindre la surface racinaire. Au-dessus de cette zone pilifère, les tissus matures présentent une couche de subérine, substance organique imperméable, qui imprègne les parois des cellules végétales.

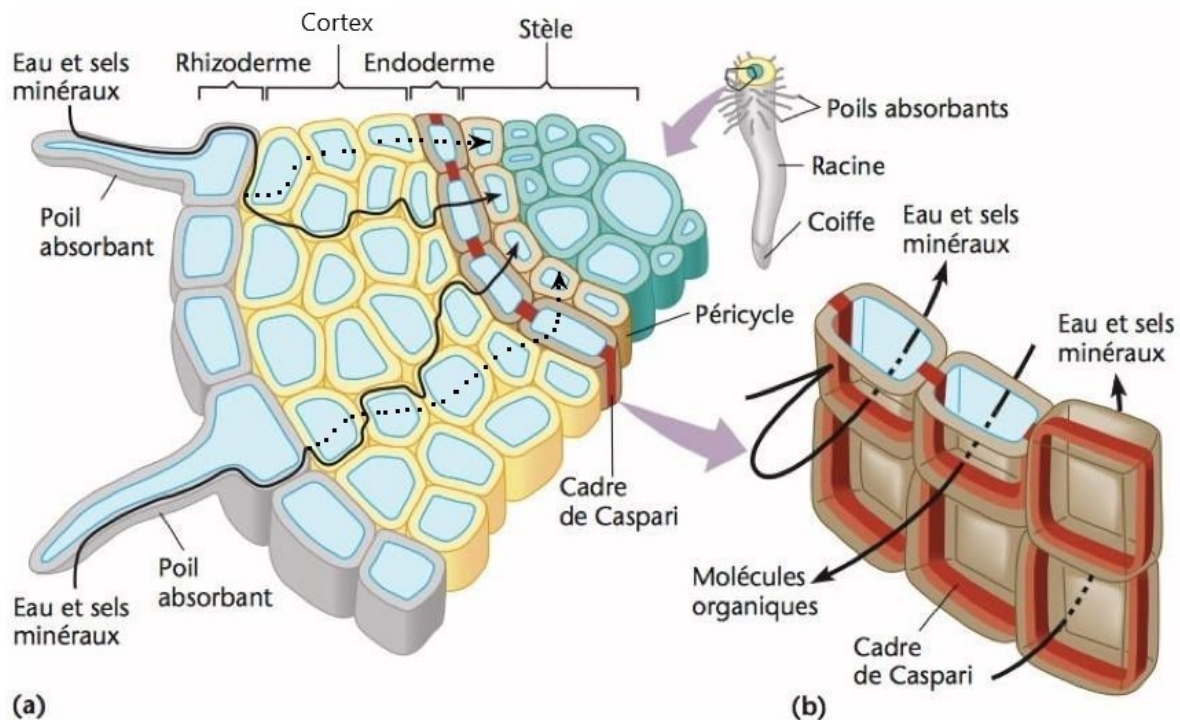


Figure 10. Représentation schématique transversale d'une racine et de la circulation de l'eau et des nutriments dans la racine (figure adaptée de Nabors, 2008)

La **Figure 10** permet une description de l'anatomie racinaire selon l'axe transversal. Au centre de la racine se trouve la stèle. La stèle correspond à l'ensemble des tissus conducteurs, le xylème et le phloème. La stèle est entourée par le péricycle dont les cellules peuvent se différencier pour former des racines latérales. Bien que localement les tissus soient désorganisés à cause de la formation des racines latérales, les vaisseaux de la nouvelle racine sont en continuité avec ceux de la racine d'origine. L'endoderme, dont la principale fonction est de réguler l'entrée de l'eau et des sels minéraux provenant du cortex ainsi que la sortie des molécules organiques issues du métabolisme de la plante, entoure la stèle. Cette régulation est due à la présence des bandes de Caspari qui sont issues de la subérisation des parois des cellules de l'endoderme. Les proportions des deux principaux tissus composant la racine, la stèle et le

cortex, peuvent varier de manière importante entre les espèces (**Figure 11**) (Guerrero-Ramírez et al., 2021; Zhou et al., 2021; Zhou et al., 2022).

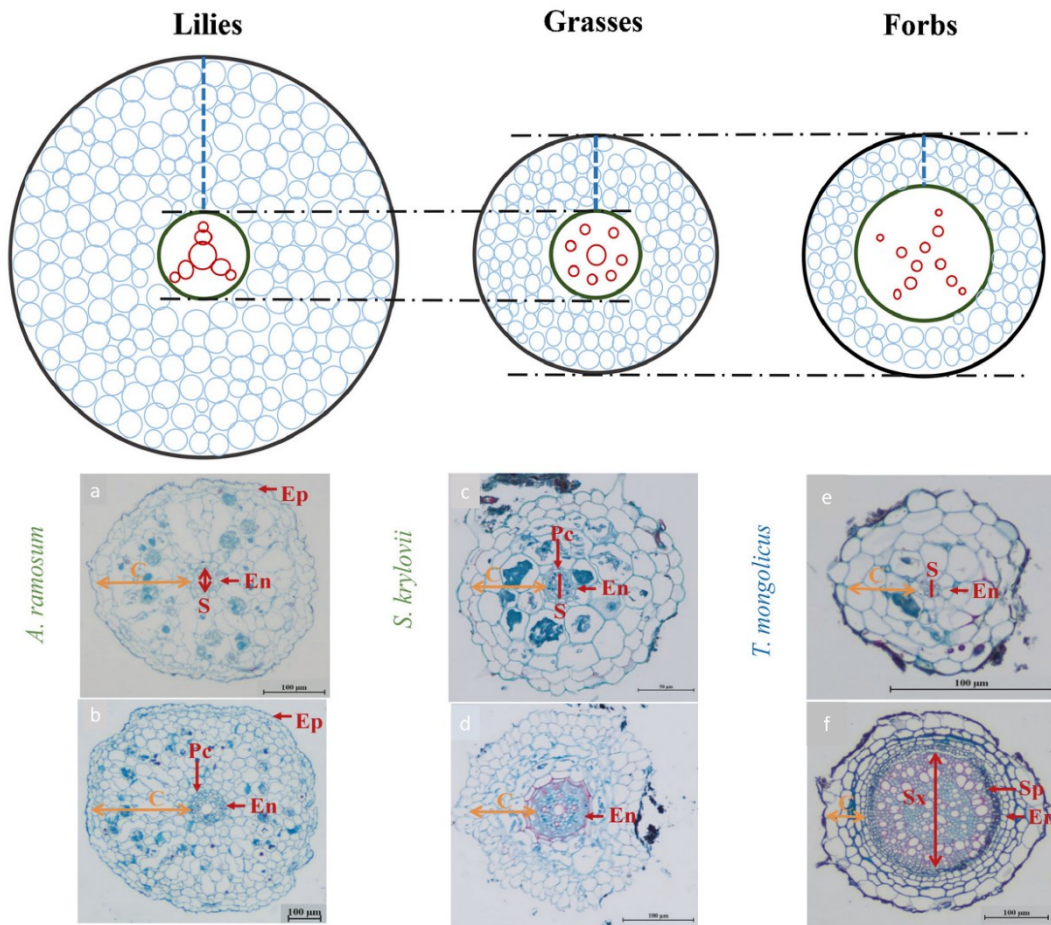


Figure 11. En haut, schéma simplifié des caractéristiques anatomiques des racines de trois groupes de plante (Lys (Lilies) ; Monocotylédones (Grasses) ; Dicotylédones (Forbs)) dont le diamètre de la stèle (cercle vert), l'épaisseur du cortex (ligne en tiret bleue) et les vaisseaux (cercles rouges) (Zhou et al., 2021). En bas, pour chaque groupe de plante, une coupe anatomique des racines de premier ordre (a, c et e) et de troisième ordre (b, d et f) pour chaque groupe de plante avec C, cortex ; En, endoderme ; Ep, épiderme ; Pc, cellules de passage ; Sp, phloème secondaire et Sx, xylème secondaire (Zhou et al., 2022).

1.2.3.2. Architecture du système racinaire

Les racines peuvent être différenciées selon leur développement (durant ou après l'embryogénèse) et selon leur localisation (G. Viana et al., 2022). Parmi ces types de racines, on retrouve la racine primaire, les racines séminales, les racines latérales et les racines nodales. La racine primaire est issue de la radicule embryonnaire et croît dans le sol. Les racines séminales, dont le diamètre est inférieur à celui de la racine primaire, émergent également durant la phase embryonnaire. Cependant, elles sont issues de la jonction système aérien-système souterrain. Les racines nodales sont quant à elles d'origine post-embryogénèse et se développent à l'intersection du système aérien et du système souterrain. Selon leur localisation, on parle de « brace roots » ou de « crown roots ». Les « brace roots » se situent au-dessus de la

surface du sol tandis que les « crown roots » se trouvent sous terre. L'ensemble de ces racines est ensuite capable de se ramifier. Les racines issues de ces ramifications sont appelées racines latérales. La présence de ces types de racines ainsi que leur organisation dans l'espace dépendent des espèces. Ainsi les « crown roots » ne sont retrouvées que chez les herbacées (G. Viana et al., 2022). Deux principaux types de système racinaire existent : (i) le système pivotant principalement retrouvé chez les Dicotylédones et qui s'organise autour de la racine primaire, appelée également racine pivot, d'où les racines latérales vont émerger, et (ii) le système fasciculé généralement retrouvé chez les Monocotylédones et qui présente plusieurs racines dominantes (Papy et al., 1997; Freschet et al., 2021; G. Viana et al., 2022).

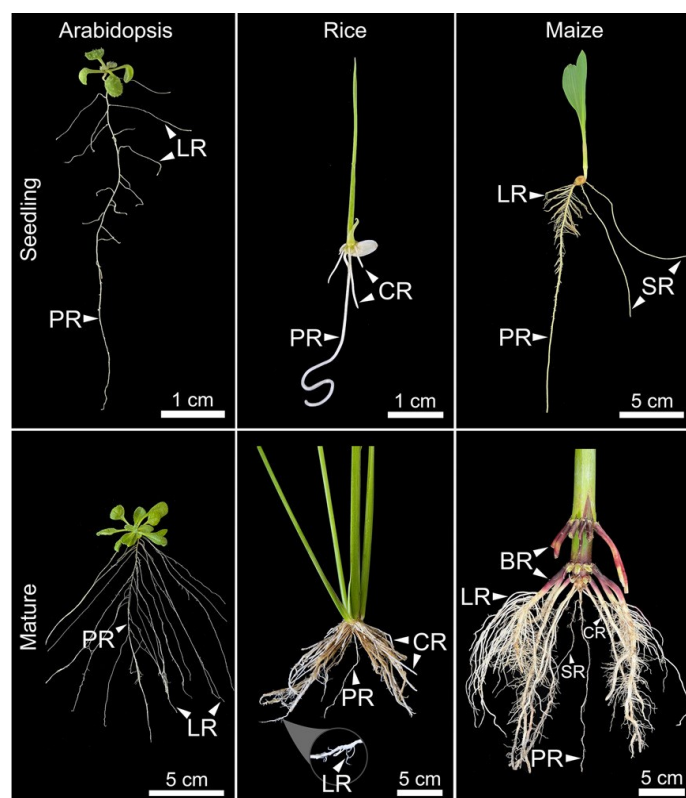


Figure 12. Exemples d'architectures racinaires chez une dicotylédone (*Arabidopsis*) et deux monocotylédones (*Riz* (*rice*) et *Maïs* (*maize*)) selon le stade de développement de la plante. Les différents types de racines sont indiqués par les flèches blanches. PR, racine primaire; SR, racines séminales; LR, racines latérales; CR, « crown roots », BR, « brace roots » (G. Viana et al., 2022).

I.2.3.3. Absorption de l'eau

L'eau qui circule dans la plante est prélevée dans le sol par les racines. Au sein des racines, trois voies de transport sont possibles pour assurer cette fonction d'absorption : (i) la voie apoplasique qui permet le passage de l'eau et des solutés par l'apoplasme, compartiment issu de la continuité des parois pectocellulosiques, (ii) la voie symplasmique qui permet le passage de l'eau et des solutés par les plasmodesmes, et donc par les compartiments cytoplasmiques et (iii) la voie transcellulaire qui permet le passage de l'eau et des solutés de

membrane à membrane (**Figure 13**). Les deux dernières voies sont souvent décrites ensemble comme étant la voie protoplasmique ou de cellule à cellule (Steudle, 2001).

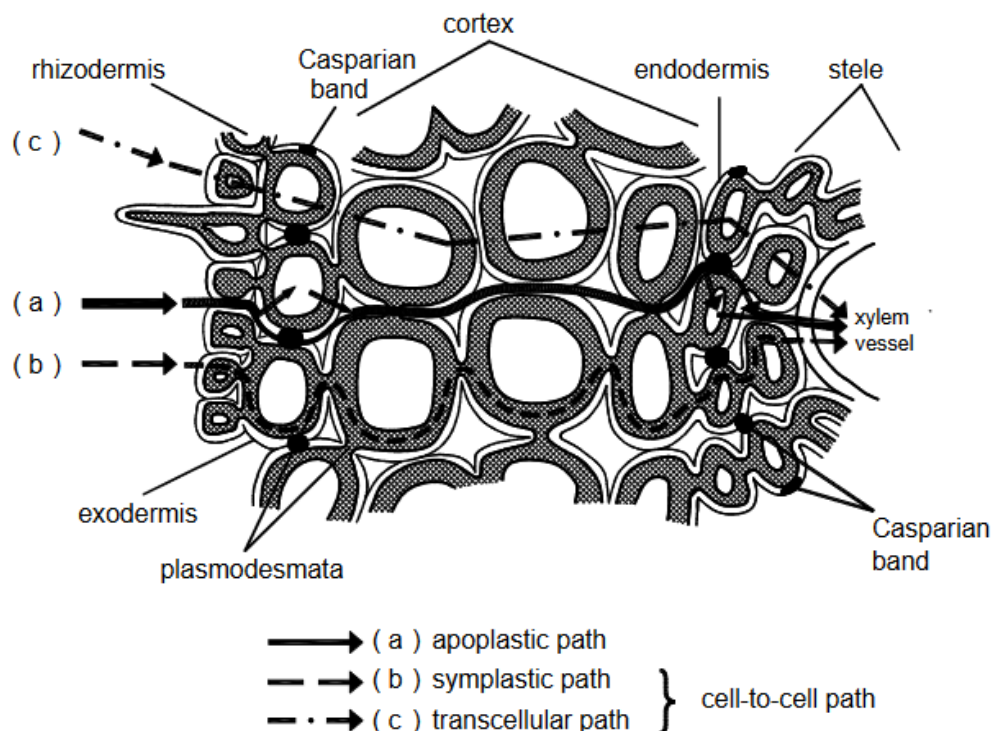


Figure 13. Schéma illustrant les trois voies pour le transport de l'eau et des minéraux de l'extérieur de la racine vers le xylème. (a) la voie apoplasme, (b) la voie symplasmique et (c) la voie transcellulaire. Les voies (b) et (c) sont souvent nommées ensemble comme étant la voie de cellule à cellule ou protoplasmique (Steudle, 2001).

Selon le gradient responsable du transport de l'eau, potentiel hydrique ou osmotique, des voies sont privilégiées par rapport à d'autres. Ainsi, si le gradient principal est une différence de pression due à la transpiration des feuilles, l'eau circule préférentiellement à travers la voie apoplasme en raison de sa faible résistance hydraulique (Steudle, 2001). Il a été observé chez des lupins que, bien qu'il représente une faible portion de la surface racinaire (autour de 5%), plus de la moitié du transport de l'eau dans la racine avait lieu dans l'apoplasme (Zarebanadkouki et al., 2019). Cette voie de passage peut toutefois être limitée par la présence des bandes de Caspary qui entraînent une imperméabilisation de l'endoderme (Steudle, 2001; Zarebanadkouki et al., 2019).

1.2.4. Principaux déterminants des flux d'eau et de l'absorption racinaire

L'absorption racinaire et les flux d'eau dans la plante dépendent des paramètres pouvant affecter la différence de potentiel hydrique entre le sol et l'atmosphère, et la conductance hydraulique de la plante. Les facteurs peuvent être d'origine endogène ou environnementale, bien qu'il existe des interactions entre ces derniers.

Les flux d'eau sont affectés par la structure des organes qui va influencer leur conductance hydraulique. Ainsi, la surface de conduction, la longueur et le diamètre des vaisseaux de xylème vont influencer positivement sur la conductance hydraulique (Gleason et al., 2012). La densité des vaisseaux au niveau des feuilles de même que la surface foliaire, la taille et la densité stomatique vont également influencer positivement la conductance hydraulique foliaire (Brodribb, 2009). La conductance hydraulique des vaisseaux de xylème varie aussi selon l'âge, et donc la maturité d'un organe (Brodribb, 2009; Vetterlein and Doussan, 2016). Le fonctionnement des organes telles l'ouverture et la fermeture des stomates affectent également les flux d'eau. Ce fonctionnement dépend d'une part de paramètres externes :

- Les radiations lumineuses, en particulier bleues et rouges, favorisent l'ouverture stomatique (Roelfsema and Hedrich, 2005; Shimazaki et al., 2007) qui influence positivement la quantité d'eau perdue (McAusland et al., 2016).
- L'humidité relative de l'air, ratio entre la quantité de vapeur d'eau dans l'air et la quantité de vapeur d'eau dans l'air à saturation, impacte également la transpiration. Il a été observé dans divers types de plantes (maïs, tomate, rose...) que, sous une humidité de l'air élevée, la conductance stomatique était élevée mais que la transpiration était faible. À l'inverse, sous une faible humidité de l'air, la conductance stomatique était faible mais la transpiration était élevée (Ben-Asher et al., 2013; Suzuki et al., 2015; Fanourakis et al., 2019). Cela est dû à l'effet du VPD (cf. équation 2). L'humidité de l'air et sa température sont liées, une augmentation de la température de l'air entraînant une diminution de l'humidité relative par l'augmentation de la valeur à saturation. Une réduction de l'humidité de l'air entraîne une augmentation du VPD. Or, une augmentation du VPD entraîne majoritairement une augmentation de la transpiration (Grossiord et al., 2020).
- La vitesse du vent affecte également la transpiration bien que son effet dépende de la valeur de la conductance stomatique (Schymanski and Or, 2016). Deux flux de température sont présents dans les feuilles leur permettant de réguler leur température, le flux de chaleur sensible (conduction, convection) et le flux de chaleur latente (évaporation, vaporisation). Tandis que la chaleur sensible correspond uniquement à une modification de la température de l'eau, la chaleur latente modifie également son état physique comme, par exemple, lors de l'évaporation des molécules d'eau. Alors que la vitesse du vent affecte ces deux flux de manière similaire (positivement, de grandes vitesses de vent entraînant une augmentation de ces flux, et donc un refroidissement des feuilles), la conductance stomatique découple leurs effets (Schymanski and Or, 2016). Lorsque la conductance stomatique est faible, le flux de chaleur sensible est dominant par

rapport au flux de chaleur latente et le vent a alors un effet négligeable sur ce dernier. Ainsi, en raison de l'augmentation du refroidissement de la température de la feuille, la transpiration diminue avec l'augmentation de la vitesse du vent (Dixon and Grace, 1984; Schymanski and Or, 2015; Schymanski and Or, 2016). Cette dissociation selon la valeur de la conductance stomatique explique les résultats variés observés dans la littérature sur l'effet de la vitesse du vent sur la transpiration.

- La concentration atmosphérique de CO₂ influence également la régulation de l'ouverture des stomates. Il a ainsi été observé qu'une concentration élevée en CO₂ entraînait une diminution de la conductance stomatique par la fermeture des stomates et une diminution de la transpiration (Ainsworth and Rogers, 2007; Qaderi et al., 2019). Bien qu'elle ait été plus marquée chez les graminées que chez d'autres plantes tels les arbres ou les arbustes, une diminution globale de 22% de la conductance stomatique avait ainsi été observée pour une concentration en CO₂ autour de 567 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Ainsworth and Rogers, 2007).

D'autre part, le fonctionnement des organes dépend également de paramètres internes tels que le rythme circadien. Ce rythme affecte la conductance hydraulique des feuilles et des racines (Resco de Dios and Gessler, 2018). Cette variation serait liée à l'expression des aquaporines. Les aquaporines sont des protéines canaux transmembranaires qui permettent le transport de l'eau et de petits solutés, et qui sont réparties en famille selon leur localisation au sein de la cellule. Les principales sont les PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins) localisées majoritairement au niveau de la membrane plasmique et les TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins) situées généralement au niveau de la membrane vacuolaire. Ainsi, la présence importante d'aquaporines au niveau des racines matures permet de pallier la diminution de la perméabilité due à la présence des bandes de Caspari (Maurel et al., 2008).

L'absorption de l'eau par le système racinaire varie également selon le type de racine, l'âge de la plante ou encore la profondeur racinaire. La conductance hydraulique correspond à l'ensemble des conductances hydrauliques axiales et radiales. Au sein d'une racine, ces conductances axiales et radiales varient. Une conductivité hydraulique radiale plus faible est ainsi retrouvée dans la partie mature de la racine du fait de la présence de barrières apoplasmiques et de subérine (Vetterlein and Doussan, 2016). Contrairement à la conductivité hydraulique radiale, la conductivité hydraulique axiale augmente avec l'âge de la racine en raison de vaisseaux de xylème plus matures (Vetterlein and Doussan, 2016). Alors que la conductivité hydraulique radiale détermine principalement l'absorption racinaire, la conductivité hydraulique axiale détermine principalement le transfert de l'eau au sein de la racine (Doussan et al., 2006). Cette conductivité hydraulique varie ainsi avec l'anatomie des

racines, une corrélation négative ayant été observée entre cette conductivité et le diamètre des racines ainsi qu'avec l'épaisseur de cortex (Rieger and Litvin, 1999). Des différences anatomiques ont été mises en évidence entre des racines de différents ordres indiquant que la fonction de ces racines varie également. Guo *et al.* (2008) ont observé chez des racines d'arbres que 75% de la longueur racinaire totale des racines des cinq premiers ordres était liée à la capacité d'absorption. Les racines d'ordre les plus faibles étaient ainsi caractérisées par une proportion élevée de cortex et un faible rapport des diamètres stèle/racine. À partir des troisièmes et quatrièmes ordres, ce ratio augmentait, de même que la proportion de cortex diminuait entraînant un décalage de la fonction vers une capacité de transport. Des résultats similaires ont été observés chez des plantes herbacées, monocotylédones et dicotylédones (Zhou et al., 2022). Alors que l'évolution de la fonction des racines de dicotylédones selon l'ordre de ramification était semblable à celle observée sur les arbres (Guo et al., 2008; Zhou et al., 2022), les racines de différents ordres chez les monocotylédones avaient des fonctions similaires, toutes les racines étant absorptives avec une légère augmentation de la capacité de transport avec l'ordre des racines (Zhou et al., 2022). L'absorption de l'eau par les plantes dépend également de la taille du système racinaire qui augmente le volume de sol qui peut être exploité, la taille de l'interface sol-racines et la conductance hydraulique racinaire totale (Vetterlein and Doussan, 2016). Le type de racines impliquées dans l'absorption varie également selon l'âge de la plante. Ainsi, il a été observé chez un jeune lupin (2,5 - 3 semaines) et un jeune maïs (2 semaines) que l'absorption avait lieu principalement dans les racines latérales (Zarebanadkouki et al., 2013; Ahmed et al., 2016) tandis que chez un maïs mature (5 semaines) l'absorption avait lieu principalement dans les racines nodales (Ahmed et al., 2018). Par ailleurs, quelle que soit l'architecture du système racinaire, pivotant ou fasciculé, l'absorption de l'eau est plus importante dans les couches supérieures du sol (Doussan et al., 2006; Zarebanadkouki et al., 2013; Ahmed et al., 2016). La texture du sol influence aussi l'absorption racinaire, l'extraction d'eau étant plus prononcée dans des sols sableux par exemple (Doussan et al., 2006). La conductivité hydraulique du sol influe également. Le mucilage, gel sécrété par les racines et composé d'environ 78.4% de polysaccharides, de 7.3% de protéines, de 5.6% de minéraux et de 3.1% de lipides (Nazari, 2021), permet de maintenir les racines en contact avec le sol et, pouvant adsorber 25 à 600 fois son poids sec en eau (Nazari, 2021), d'augmenter la capacité de rétention d'eau du sol, augmentant ainsi sa conductance hydraulique (Ahmed et al., 2014). La présence de lipides dans le mucilage permet de diminuer la tension de surface et de faciliter le drainage des pores de petite taille (Read et al., 2003). Cependant, il a également été observé qu'une fois sec, le mucilage devient plus visqueux et

hydrophobe, entraînant une diminution de la conductance hydraulique du sol (Carminati et al., 2016). La balance entre augmentation et diminution de la conductance hydraulique du sol dépend de la teneur en eau dans le mucilage et de la teneur en eau dans le sol. En effet, ces auteurs ont observé que durant une période sans arrosage, la teneur en eau à proximité des racines (rhizosphère) était supérieure à celle du reste du sol. Après réhydratation, la tendance inverse a été observée avant que la teneur en eau dans la rhizosphère soit à nouveau supérieure à celle du sol. Cet équilibre permet, pendant les périodes de sécheresse, de favoriser la disponibilité de l'eau pour les racines et de limiter son entrée lorsque celle-ci est apportée en grande quantité, limitant ainsi la survenue d'un choc osmotique (Carminati et al., 2010). Cependant, cette hydrophobicité de la rhizosphère due à la déshydratation du mucilage impacte le transport de l'eau à l'interface sol-racines en limitant temporairement son absorption, et donc la réhydratation des racines (Zarebanadkouki et al., 2018).

1.2.5. Stratégies d'utilisation de l'eau

Afin de survivre et de se reproduire, les plantes développent des stratégies pour s'adapter aux épisodes de sécheresse. Ces stratégies dépendent notamment de l'intensité du stress hydrique et du stade de développement de la plante (respectivement axe des abscisses et axe des ordonnées sur la **Figure 14**).

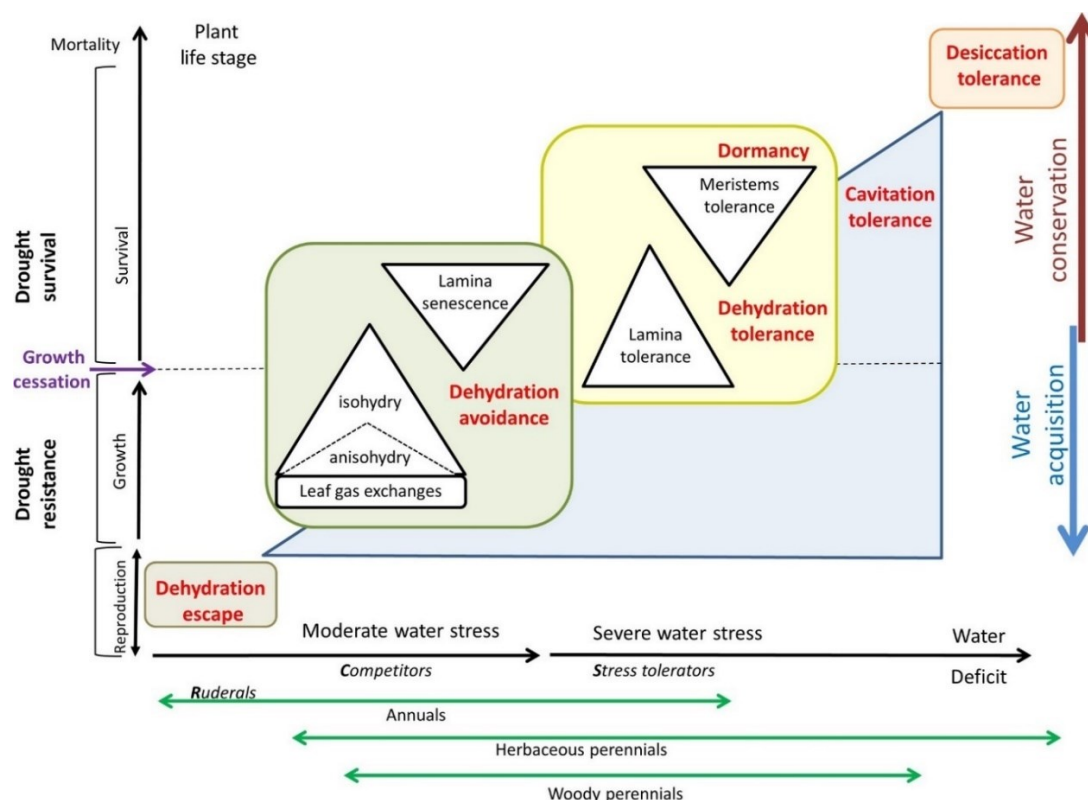


Figure 14. Représentation schématique des stratégies mises en place par les plantes pour faire face à un stress hydrique (Volaire, 2018).

Les principales stratégies d'adaptation sont (i) l'échappement, (ii) l'évitement et (iii) la tolérance à la sécheresse (Fang and Xiong, 2015; Volaire, 2018).

La stratégie d'échappement consiste en un ajustement du cycle de vie ou de reproduction de la plante pour que la phase de croissance ait lieu avant la période de stress hydrique (Fang and Xiong, 2015).

La stratégie d'évitement consiste au maintien des processus physiologiques et de potentiels hydriques élevés lorsque les plantes sont soumises à un stress hydrique léger à modéré. Ce maintien peut être dû à une augmentation du prélèvement de l'eau du sol par un système racinaire développé. Une corrélation positive a ainsi été observée chez *Phaseolus acutifolius* entre le degré de résistance à la sécheresse et la capacité de pénétration des racines dans le sol (Mohamed et al., 2002). Le maintien des processus physiologiques et de potentiels hydriques élevés peut également être dû à une diminution de la perte en eau par une accumulation de cire sur les feuilles, un enroulement de ces dernières ou encore à la fermeture précoce des stomates afin d'éviter la déshydratation des feuilles (Fang and Xiong, 2015).

La stratégie de tolérance permet de maintenir les activités physiologiques par la régulation de voies métaboliques pour diminuer les effets ou réparer les dommages causés par un stress hydrique sévère. Elle se caractérise ainsi par une ouverture stomatique plus longue qui permet de maintenir la photosynthèse tout en tolérant une déshydratation des tissus. Un des mécanismes est l'ajustement osmotique qui consiste en l'accumulation de substances organiques et inorganiques (sucres, acides aminés, ions...) à l'intérieur des cellules. Cela permet de réduire le potentiel osmotique et ainsi d'améliorer la rétention de l'eau cellulaire. Fang et Xiong (2015) indiquent que l'ajustement osmotique a été décrit comme permettant de maintenir la structure cellulaire et la photosynthèse à de faibles valeurs de potentiel hydrique, de favoriser la croissance racinaire et de différer la mort cellulaire et la sénescence des feuilles. Un autre mécanisme est la présence d'un système de défense à la fois enzymatique et non enzymatique contre les radicaux d'oxygène libres qui s'accumulent en présence de sécheresse et qui peuvent entraîner des déstructurations des membranes cellulaires, des protéines et des enzymes, des perturbations métaboliques voire la mort de la plante (Fang and Xiong, 2015). Enfin, la production de phytohormones telle l'ABA permet à la plante de réguler l'expression des aquaporines et l'ouverture des stomates, et donc de conserver l'eau (Fang and Xiong, 2015; Maurel et al., 2016; Singh et al., 2020).

Une autre terminologie, le concept d'isohydrie/anisohydrie, qui décrit la régulation du potentiel hydrique notamment foliaire par la régulation des stomates a été proposée par Berger-

Landefeldt (1936) et adaptée par Tardieu et Simonneau (1998). Les espèces anisohydriques présentent un potentiel hydrique foliaire diurne qui varie significativement avec la demande évaporative et le potentiel hydrique du sol. Les espèces isohydriques quant à elles présentent un potentiel hydrique foliaire diurne relativement stable en dépit de la diminution du potentiel hydrique du sol. Bien que répandu, ce concept est sujet à caution. En effet, la dichotomie ne rend pas compte de la variabilité des comportements rencontrés (Klein, 2014; Meinzer et al., 2016; Hochberg et al., 2018). Le degré d'isohydrie d'une espèce existe ainsi au sein d'un continuum et peut varier selon les conditions environnementales ou le stade de développement de l'espèce (Klein, 2014; Meinzer et al., 2016; Hochberg et al., 2018; Feng et al., 2019). D'autre part, différentes définitions sont apportées à l'isohydrie/anisohydrie (Martínez-Vilalta and Garcia-Forner, 2017; Hochberg et al., 2018). Selon les définitions qui le nécessitent, le potentiel hydrique foliaire minimum est approximé par le potentiel hydrique de mi-journée (Ψ_{MD}) et le potentiel hydrique du sol est approximé par le potentiel hydrique foliaire de fin de nuit (Ψ_{PD}). Alors que Tardieu et Simonneau caractérisent le degré d'isohydrie d'une espèce selon la stabilité du potentiel hydrique foliaire diurne en réponse à une diminution du potentiel hydrique du sol, Klein définit ce degré selon la valeur de la différence de potentiel hydrique foliaire de fin de nuit et de mi-journée. Ainsi, plus cette différence est faible, plus l'espèce est isohydrique (Klein, 2014). Également en 2014, Martínez-Vilalta *et al.* ont proposé de caractériser l'isohydrie d'une espèce selon la valeur du coefficient directeur (σ) de la relation affine qui relie le potentiel hydrique foliaire de mi-journée en fonction du potentiel hydrique foliaire de fin de nuit. Ainsi, un σ égal à 0 implique une isohydrie stricte tandis qu'un σ égal à 1 implique une anisohydrie stricte. Les espèces ayant une valeur de σ intermédiaire sont caractérisées par une isohydrie partielle alors que celles ayant un σ supérieur à 1 sont définies comme extrêmement anisohydriques (Martínez-Vilalta et al., 2014). En 2016, Meinzer *et al.* ont caractérisé le degré d'isohydrie d'une espèce par la valeur de « l'hydroscape ». L'hydroscape est défini comme étant l'aire d'un triangle compris entre la régression affine de Martínez-Vilalta *et al.* (2014), l'axe des ordonnées et la fonction identité sur un graphe Ψ_{MD} versus Ψ_{PD} . Cette définition permet de caractériser la gamme des valeurs de potentiel hydrique sur laquelle les stomates sont capables de réguler l'état hydrique des espèces. Ainsi, plus la valeur de l'hydroscape est élevée plus l'espèce est anisohydrique (Meinzer et al., 2016). Récemment Jiang *et al.* (2021) ont montré que le degré d'isohydrie était associé à la capacité de stockage de l'eau et de carbohydrates. Ainsi, les espèces avec un degré d'isohydrie élevé sont caractérisées par une capacité de stockage de l'eau plus importante et une capacité de stockage de carbohydrates plus faible que les espèces avec un degré d'isohydrie faible (Jiang et al., 2021).

La préférence pour l'une ou l'autre de ces stratégies dépend des stratégies d'acquisition des ressources par les plantes : d'une part, les espèces à croissance et à acquisition de ressources rapides (Competitors sur la **Figure 14**) et d'autre part, les espèces à croissance lente avec une stratégie de conservation des ressources (Stress tolerators sur la **Figure 14**). Ces stratégies d'acquisition des ressources sont liées à la position des plantes sur le spectre économique des différents organes, c'est-à-dire selon leurs traits fonctionnels (Grime et al., 1997; Westoby et al., 2002; Wright et al., 2004; Reich et al., 2014). Selon Violle *et al.* (2007) les traits fonctionnels sont définis comme des traits morpho-physio-phénologiques qui impactent la croissance, la reproduction et la survie des plantes. Des syndromes de traits foliaires ont ainsi été mis en évidence. Les espèces à croissance rapide sont caractérisées par des valeurs faibles de densité de tissus et de matière sèche. Elles présentent en revanche des valeurs élevées de teneur en eau et de nutriments tels que l'azote, de surface spécifique foliaire (SLA) et de taux de photosynthèse (Garnier and Laurent, 1994; Grime et al., 1997; Westoby et al., 2002; Wright et al., 2004; Pierce et al., 2007; de la Riva et al., 2019). Des syndromes de traits racinaires ont également été mis en évidence. Les racines des espèces à croissance rapide, et donc avec une stratégie d'acquisition rapide des ressources, sont caractérisées par des valeurs faibles de densité de tissus (Wahl and Ryser, 2000; Hummel et al., 2007), de matière sèche (Prieto et al., 2015; Roumet et al., 2016) et de diamètre (Prieto et al., 2015; Fort et al., 2017). A contrario, ces espèces présentent des valeurs élevées de longueur spécifique racinaire (SRL) (Prieto et al., 2015; Roumet et al., 2016; Fort et al., 2017). Des corrélations négatives entre le diamètre racinaire et la proportion de stèle (Wahl and Ryser, 2000; Hummel et al., 2007) ainsi qu'avec la conductivité hydraulique racinaire (Rieger and Litvin, 1999) ont été mises en évidence. Masumoto *et al.* (2022) ont également observé sur des fines racines d'arbres que la conductivité hydraulique racinaire était corrélée positivement avec la densité de tissus suggérant que la conductivité hydraulique représentait davantage la capacité de transport des racines. Par ailleurs, une interdépendance entre les traits foliaires et les traits racinaires existent (Grime et al., 1997; Zhou et al., 2021). Zhou *et al.* (2021) ont ainsi observé que la transpiration et la conductance stomatique étaient inversement corrélées avec l'épaisseur du cortex et positivement avec le diamètre de la stèle des racines absorbantes. Ainsi, les espèces à croissance rapide présentent une capacité d'exploitation des ressources du sol (SRL) et de la lumière (SLA) ainsi qu'une capacité de transport plus élevées que les espèces à croissance lente. Cependant, ces dernières sont plus à même de faire face à un stress hydrique, une stratégie de conservation des ressources ayant été liée à la tolérance face à un stress hydrique (Grime et al., 1997; Reich et al., 2014; Volaire, 2018).

I.2.6. Principales méthodes permettant l'étude des racines du point de vue de l'eau

I.2.6.1. Pesées

La pesée permet de déterminer la teneur en eau des racines. La masse fraîche (masse des racines obtenue après prélèvement et lavage pour enlever l'excédent de sol afin ne pas biaiser la mesure) et la masse sèche (masse des racines obtenue après passage à l'étuve) des racines sont mesurées.

$$Teneur\ en\ eau = \frac{(Masse\ fraîche - Masse\ sèche)}{Masse\ fraîche} \times 100 \quad [3]$$

La teneur en eau relative peut également être calculée après avoir pesé les racines à turgescence, à la suite d'une réhydratation. La formule de calcul est alors :

$$Teneur\ en\ eau\ relative = \frac{(Masse\ fraîche - Masse\ sèche)}{(Masse\ à\ turgescence - Masse\ sèche)} \times 100 \quad [4]$$

La pesée est une méthode de référence pour mesurer la teneur en eau et est couramment utilisée en laboratoire. Elle est facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, cependant, elle est destructive.

La pesée peut également s'effectuer à l'échelle de la plante entière, et non d'un organe comme vu précédemment. Cette méthode permet alors de mesurer la transpiration d'une plante. Elle consiste en des mesures répétées de la masse de plantes cultivées en pot ou en rhizotron. Ce faisant, les plantes sont pesées avec le compartiment sol. Afin de limiter l'influence de l'évaporation dans ce compartiment, le sol est recouvert. Ainsi, la quantité d'eau perdue représente seulement l'eau utilisée par la plante. Cette méthode est non destructive, couramment utilisée en laboratoire, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Néanmoins, elle permet d'étudier l'utilisation de l'eau à l'échelle de la plante et n'est pas focalisée sur l'utilisation à l'échelle racinaire.

I.2.6.2. Mesure de la conductivité hydraulique racinaire

La conductivité hydraulique racinaire peut être mesurée grâce à un dispositif de pression. Pour cela, une racine excisée est connectée de part et d'autre à une sonde de pression (Steudle et al., 1987; Zhu and Steudle, 1991). La différence de pression ainsi que le flux d'eau sont ensuite mesurés (Sperry et al., 1988), la conductivité hydraulique étant déterminée par le rapport entre le flux d'eau et la différence de pression. Cette méthode a permis de mesurer à la fois le flux hydrostatique (déplacement du ménisque dans le segment de racine) et le flux

osmotique (variation de la pression osmotique), et de mettre en évidence des différences entre les deux conductivités (Steudle et al., 1987). Ainsi, Zhu et Steudle (1991) ont mis en évidence chez le maïs une différence de conductivité hydraulique d'un ordre de grandeur entre la conductivité hydrostatique ($1.2 \text{ à } 2.3 \cdot 10^{-7} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) et la conductivité osmotique ($1.6 \text{ à } 2.8 \cdot 10^{-8} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$), bien que cette différence ne soit pas présente chez toutes les espèces comme dans le cas de l'orge (Steudle et al., 1987). Cette méthode a également permis de mesurer la cavitation dans le xylème (Sperry et al., 1988; Cochard et al., 2013).

Cette technique est peu couteuse et permet de remonter à des paramètres hydrauliques racinaires nécessaires dans de nombreux modèles numériques qui permettent d'estimer le flux dans les racines. Étant destructive, elle est cependant destinée au laboratoire. Par ailleurs, elle permet de travailler uniquement sur un segment de racine et non sur une racine entière, et à fortiori un système racinaire complet. En plus de la limite de l'excision des racines, Steudle *et al.* (1987) ont soulevé la problématique de l'application de pressions uniquement positives qui, bien qu'elles soient présentes dans les phénomènes de guttation (rosée du matin), ne rendent pas compte des pressions négatives intervenant lors de la transpiration des plantes.

I.2.6.3. Capteurs de flux de sève

Différentes méthodes permettent de mesurer le flux de sève dans les racines. La plupart de ces méthodes utilise la chaleur comme « traceur » du flux. Les méthodes à impulsion de chaleur et par dissipation thermique font partie des méthodes les plus employées (Burgess et al., 2000). La méthode à impulsion de chaleur consiste en l'insertion de deux électrodes positionnées de manière asymétrique de part et d'autre d'une électrode qui est chauffée par une rapide impulsion de chaleur. Cette chaleur est transportée par conduction (en amont de l'électrode chauffée) et par convection (en aval) vers les deux autres sondes. Lorsque les deux sondes atteignent la même température, l'impulsion est considérée comme étant à mi-chemin entre celles-ci. Ainsi, connaissant la distance entre les sondes et le temps t nécessaire pour atteindre la même température, la vitesse du flux peut être calculée, celle-ci étant inversement proportionnelle au temps t . La méthode de dissipation thermique est fondée sur la différence de température entre une électrode chauffée et une électrode non chauffée positionnées dans le xylème. Sous l'effet du flux, la chaleur est dissipée par convection et la différence de température entre les deux électrodes diminue. Ainsi, le flux est inversement proportionnel à la différence de température. Ces mesures de flux de sève ont permis de montrer l'existence du continuum sol-plante-atmosphère par l'observation de corrélations entre la transpiration et le

flux de sève mesuré dans une branche, le tronc et une racine d'un arbre (**Figure 15**), et de modifications de ces flux selon les paramètres climatiques et les saisons (Ziegler et al., 2009; Bretfeld et al., 2017). Ces méthodes ont également été utilisées pour étudier les effets sur les flux d'un assèchement partiel de la zone racinaire. Il a ainsi été montré que les flux d'eau étaient plus élevés dans la zone irriguée que dans la zone sèche. De même, les flux mesurés dans la zone irriguée étaient plus élevés dans le cas d'une irrigation partielle de la zone racinaire que dans le cas d'une irrigation homogène (Kang et al., 2003). Par ailleurs, grâce à ces méthodes, l'existence d'un flux racinaire bidirectionnel entre deux ramets interconnectés de *Populus tremuloides* et ses variations selon l'atteinte d'un des systèmes racinaires ont été mises en évidence (Bretfeld et al., 2017).

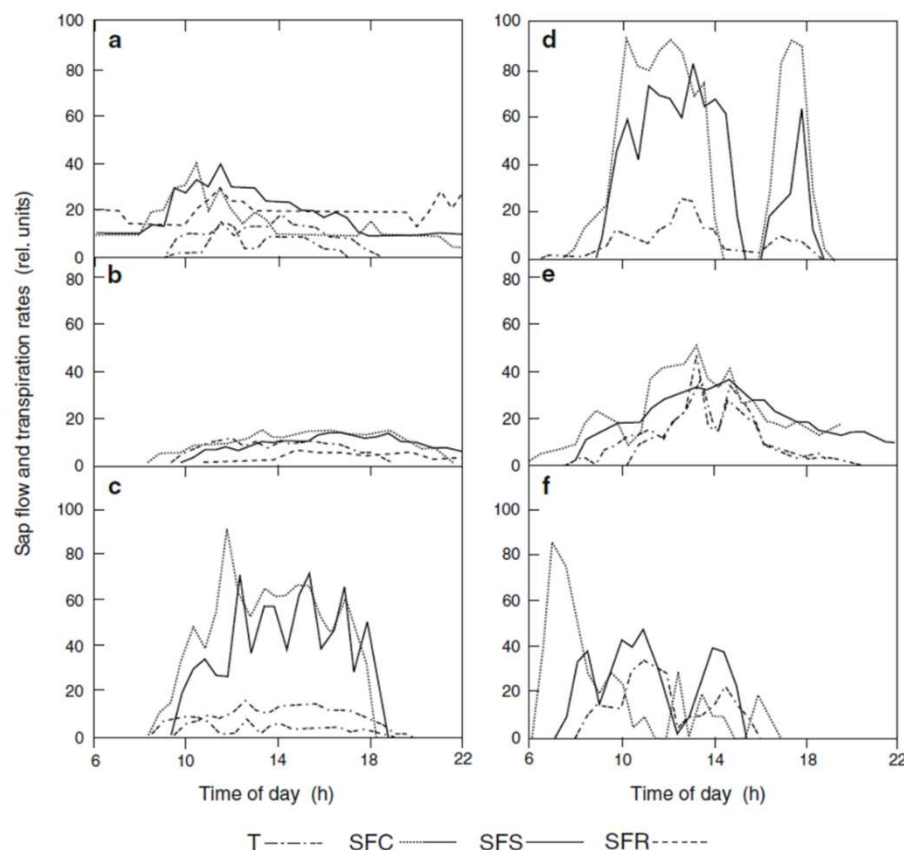


Figure 15. Variations au cours d'une journée de la transpiration (T) et du flux de sève mesuré dans les branches (SFC), dans le tronc (SFS) et dans une racine (SFR) de *Quercus robur* en (a) octobre, (b) novembre, (c et d) avril, (e) août et (f) septembre (Ziegler et al., 2009).

Ces méthodes de mesure de flux de sève sont faciles à mettre en œuvre, utilisables en extérieur et peu coûteuses. Cependant, la majorité de ces méthodes est invasive, nécessitant l'implantation des capteurs dans le xylème, et limitée à des espèces présentant de larges diamètres de racines. Ainsi, la plupart des racines étudiées sont des racines d'arbres bien développées.

I.2.6.4. Marquage isotopique

Le marquage isotopique repose sur l'étude des concentrations en isotopes stables de l'eau ($^1\text{H}_2^{16}\text{O}$, $^1\text{H}_2^{18}\text{O}$ et $^1\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$) dans les compartiments du continuum sol-plante-atmosphère. Cette méthode a permis l'étude de l'absorption racinaire en déterminant notamment la profondeur à laquelle les racines prélevaient l'eau du sol et comment cette profondeur évoluait avec le développement de la plante (Bariac et al., 1989; Bariac et al., 1994; Wu et al., 2018; Liu et al., 2020). Il a ainsi été observé que les plantes prélevaient dans un premier temps l'eau présente dans les couches superficielles du sol puis que cette absorption se propageait vers les couches les plus profondes. Le marquage isotopique a également permis d'étudier la distribution de l'eau au sein des racines lorsqu'une partie du système racinaire était soumise à un déficit hydrique. La composition isotopique des différentes couches de sol ainsi que de la plante était alors mesurée. En particulier, afin de s'assurer de mesurer l'ensemble de l'eau collectée par la plante, cette composition isotopique était mesurée dans un organe qui ne transpire pas tel que la base de la tige par exemple (Picon-Cochard et al., 2001). Le phénomène d'ascenseur hydraulique (Prieto et al., 2012), soit une redistribution de l'eau des parties irriguées vers les parties sèches, a ainsi été mis en évidence (Liu et al., 2014; Hafner et al., 2017). Une différence dans le transport de l'eau entre les deux zones a également été observée, avec un transport de l'eau d'abord dans les racines absorbantes puis de diamètre croissant dans la partie irriguée du système racinaire alors que pour les zones privées d'irrigation, le transport s'effectuait dans le sens inverse (Liu et al., 2014).

Le marquage isotopique est une méthode rapide et réalisable à l'extérieur du laboratoire. Néanmoins, elle est destructive et difficile à mettre en œuvre, l'apport des produits marqués sur le terrain étant localisé et leur devenir dans le sol n'étant pas maîtrisé. Par ailleurs, cette méthode peut être onéreuse en raison du coût des produits marqués et des analyses en spectrométrie de masse. L'analyse des résultats en elle-même peut présenter des difficultés, l'utilisation de modèle étant nécessaire.

I.2.6.5. Spectroscopie proche infrarouge

La spectroscopie proche infrarouge (ou NIRS pour Near Infra Red Spectroscopy) permet d'estimer la présence de molécules organiques dans un échantillon d'intérêt par l'étude des liaisons chimiques qui les composent. La gamme de longueurs d'ondes utilisée s'étend de 800 à 2500 nm, bien que certains instruments NIRS aient une gamme de longueurs d'ondes débutant à 350 nm. La méthode NIRS repose sur la vibration d'une liaison chimique due à

l'absorption d'un photon par un électron impliqué dans la liaison. Cette vibration est caractérisée par une fréquence fondamentale et des fréquences harmoniques, multiples de la fréquence fondamentale. Au sein d'une molécule, différentes liaisons peuvent vibrer. Il est alors possible de retrouver, dans le spectre, des bandes d'absorption dites de combinaison. Ces bandes de combinaison apparaissent à la fréquence qui correspond à la combinaison linéaire des fréquences fondamentales des liaisons impliquées. Généralement, le spectre proche infrarouge est constitué des bandes d'absorption correspondant aux harmoniques et aux combinaisons. Une molécule, du fait de sa composition, possède donc un spectre qui lui est propre. Sa concentration dans un échantillon est proportionnelle à l'absorption et peut être estimée grâce à la loi de Beer-Lambert. Bien que cette méthode ait notamment été appliquée sur les feuilles (Jin et al., 2017; Ma et al., 2019; Torres et al., 2019; Wang et al., 2022), elle est prometteuse pour estimer la teneur en eau des racines. Il a en effet été montré lors d'un stage réalisé en 2021 que la diminution de la teneur en eau dans les racines à la suite d'un stress hydrique s'accompagnait d'une augmentation de la réflectance (**Figure 16**, Arnault, 2021). Ce résultat était en accord avec ce qui avait été observé par ailleurs sur les feuilles (Hunt Jr and Rock, 1989).

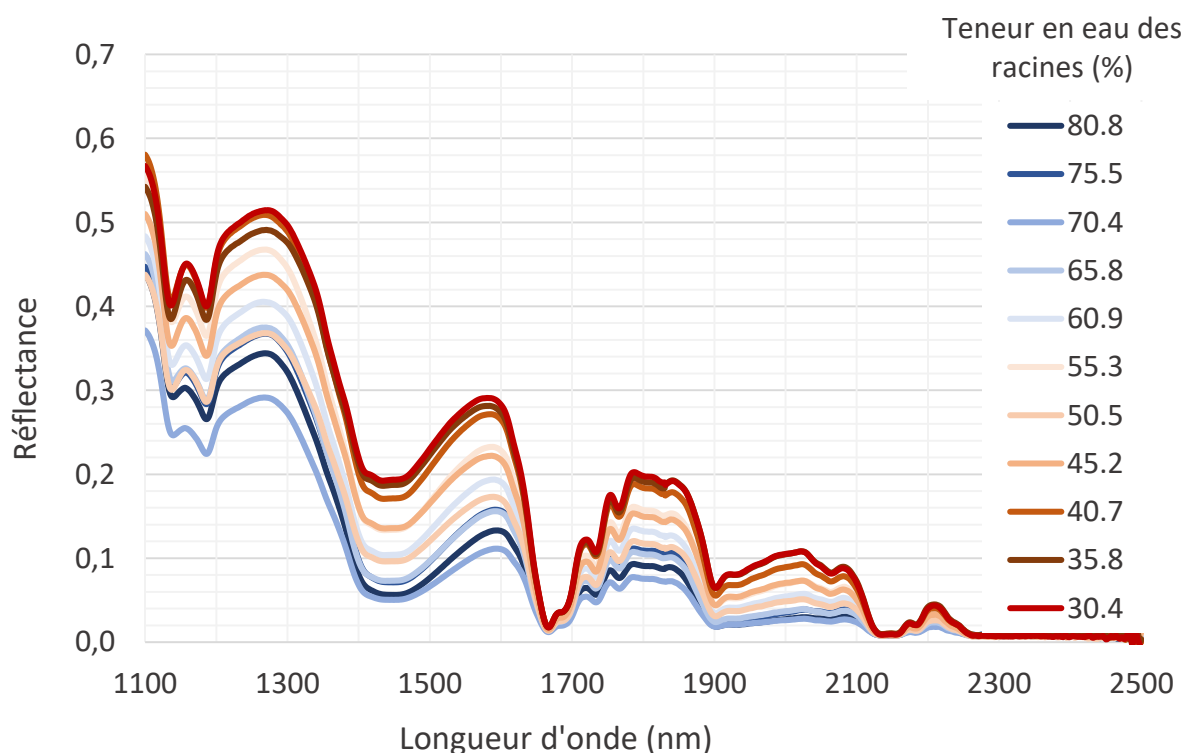


Figure 16. Spectres NIRS obtenus entre 1100 et 2500 nm pour différentes teneurs en eau de racines de *Dactylis glomerata* (Arnault, 2021).

Le NIRS est une technique non invasive, non destructive et non ionisante. Elle permet des mesures rapides et localisées pour un coût avantageux, et peut être emmenée à l'extérieur

du laboratoire. Cependant, pour pouvoir estimer la teneur en eau d'un échantillon, elle nécessite une calibration qui est destructive, les organes d'intérêt étant prélevés et pesés.

I.2.6.6. Imagerie à transmission de lumière

L'imagerie à transmission de lumière s'effectue sur des rhizotrons remplis d'un milieu sableux dans lequel l'espèce étudiée est plantée. Une source lumineuse placée à proximité du rhizotron émet un rayonnement incident qui traverse l'échantillon. La lumière transmise est captée et enregistrée par des caméras CCD positionnées à quelques mètres du rhizotron (Doussan et al., 2006; Garrigues et al., 2006). L'intensité de la lumière transmise dépend du facteur de transmission de la lumière aux interfaces sable-eau et sable-air. Ce facteur étant plus élevé pour l'interface sable-eau (0.991) que pour l'interface sable-air (0.946), l'intensité de la lumière transmise augmente avec la quantité d'eau (Tidwell and Glass, 1994). Cette méthode permet d'étudier l'absorption racinaire temporellement mais aussi spatialement. Elle a notamment permis de suivre l'extraction de l'eau par des plants de lupin ayant des architectures racinaires différentes, l'un présentant un système pivotant et l'autre un système fasciculé (Garrigues et al., 2006). La formation d'un front d'extraction d'eau proche de la surface du sol et sa propagation vers les zones plus profondes ont ainsi été mises en évidence. De même, une différence d'extraction entre les deux types d'architecture a été observée, avec une extraction plus importante pour le système pivotant mais localisée sur la moitié supérieure alors que pour l'architecture fasciculée l'extraction était plus homogène (**Figure 17**, Garrigues et al., 2006).

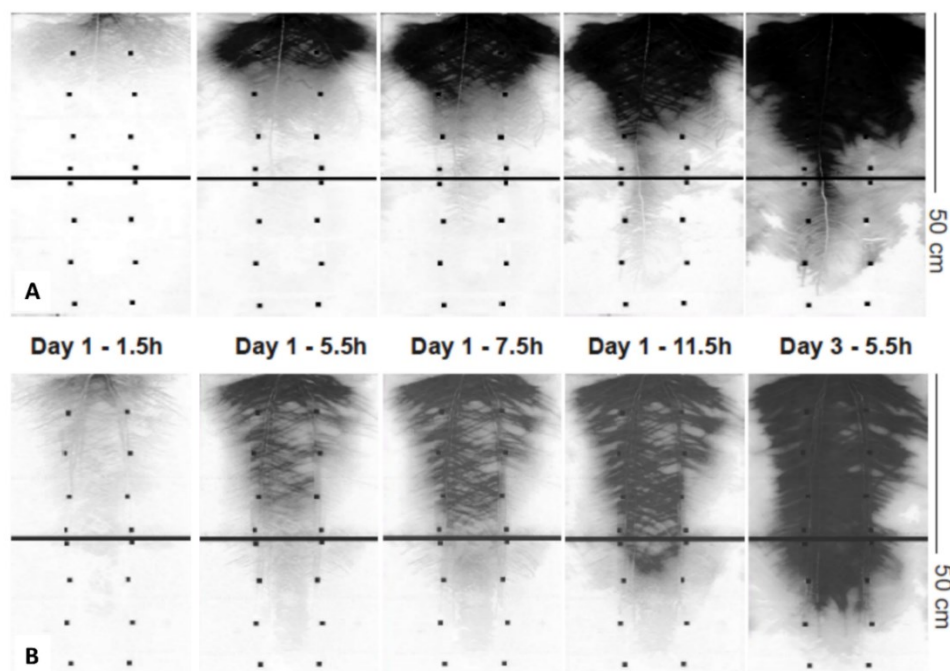


Figure 17. Variations de la teneur en eau au cours du temps dues à l'absorption racinaire par des lupins ayant A, un système racinaire pivotant et B, un système racinaire fasciculé (Garrigues et al., 2006).

L'imagerie par transmission de lumière est non invasive, non destructive et non ionisante. Par ailleurs, le matériel nécessaire à sa mise en œuvre est facile à se procurer et peu coûteux. Une résolution spatiale entre 200 et 500 μm peut être obtenue. Cependant, l'épaisseur du rhizotron est limitée à quelques centimètres et le sol utilisé est spécifique afin de favoriser la transmission de lumière et le contraste. Ainsi, un milieu opaque ne peut pas être utilisé (Doussan and Garrigues, 2019).

I.2.6.7. Radiographie/Tomographie à neutrons

La radiographie/tomographie à neutrons repose sur l'interaction des neutrons avec les noyaux des atomes composant l'échantillon étudié. Un flux de neutrons incident est émis en direction de l'échantillon. Lorsque les neutrons traversent l'échantillon, une partie du flux de neutrons est absorbée ou dispersée. Ce phénomène est appelé atténuation et son intensité est caractérisée par un coefficient d'atténuation. Ce coefficient varie entre atomes, et donc molécules, mais également entre les isotopes. Par exemple, le coefficient d'atténuation de l'eau ($^1\text{H}_2\text{O}$) est de 3.65 cm^{-1} tandis que celui de l'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) est de 0.61 cm^{-1} (Cai et al., 2022). Le flux sortant, atténué, est capté par un scintillateur qui convertit les neutrons en lumière qui est enregistrée par des caméras CCD afin d'obtenir une image (Moradi et al., 2013; Cai et al., 2022). Cette méthode permet l'étude de la teneur en eau des racines et de la rhizosphère (Esser et al., 2010; Moradi et al., 2011), de l'absorption racinaire (Zarebanadkouki et al., 2013; Ahmed et al., 2016; Ahmed et al., 2018; Cai et al., 2022) et du transport de l'eau dans les racines (Tötze et al., 2017; Zarebanadkouki et al., 2019).

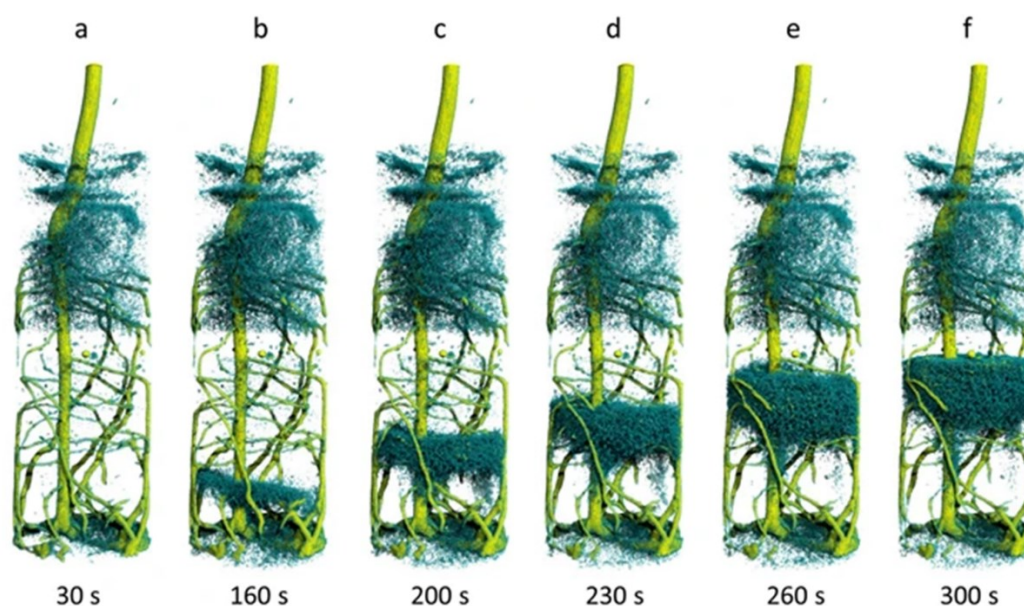


Figure 18. Suivi longitudinal par tomographie du système racinaire d'un lupin après injection d'eau deutérée dans le bas de l'échantillon. Visualisation de la montée du front d'eau (bleu) poussée par l'eau deutérée (Tötze et al., 2017).

La radiographie/tomographie à neutrons présente différents avantages tels qu'une résolution spatiale de l'ordre de la centaine de micromètres et une résolution temporelle entre 1 et 30 secondes pour la radiographie (2D), et entre 2 et 5 heures pour la tomographie (3D). Par ailleurs, il s'agit d'une méthode non invasive et non destructive. Cependant, elle est limitée à des applications en laboratoire. L'épaisseur des contenants est également limitée (entre la dizaine de millimètres et quelques centimètres) afin que le flux de neutrons puisse traverser tout l'échantillon. De même, la texture du sol influence la qualité des images obtenues. De ce fait, la majorité des études a été menée sur des sols sableux, notamment de sable quartz, qui présentent une faible rétention de l'eau et de faibles coefficients d'atténuation (0.13 cm^{-1}). Par ailleurs, il a été observé que l'irradiation des plantes par les neutrons pouvait affecter l'expression des gènes ou encore la concentration en chlorophylle. De même, selon la concentration et la fréquence d'injection, l'ajout d'eau deutérée pour étudier le transport de l'eau peut impacter la croissance de la plante (Cai et al., 2022).

I.2.6.8. Radiographie/tomographie à rayons X

La radiographie/tomographie à rayons X, rayonnements électromagnétiques de longueur d'onde comprise entre 0.03 et 10 nm, repose sur l'atténuation de ces rayons lorsqu'ils traversent un échantillon. La source de rayons X est constituée d'une cathode et d'une anode. Lorsqu'un courant électrique élevé est appliqué entre les deux électrodes, les électrons sont accélérés et émettent des rayons X. Lorsque ce rayonnement traverse l'échantillon, une partie est absorbée par l'échantillon tandis qu'une autre est dispersée et détectée. Cette méthode est principalement employée pour visualiser l'architecture racinaire et étudier les interactions sol-racines (Mooney et al., 2012). L'absorption racinaire et le transport de l'eau dans la rhizosphère peuvent également être étudiés (Pierret et al., 2003; Doussan et al., 2006; Daly et al., 2018; Jung et al., 2020). Des mesures ayant été réalisées autour de la coiffe ont ainsi montré que, dans la rhizosphère, le transport de l'eau était davantage influencé par la présence de mucilage alors que dans le sol, il était davantage influencé par la gravité (Jung et al., 2020). L'effet d'un déficit hydrique sur les plantes a également pu être observé. Ainsi, Khalil *et al.* (2020) ont montré une diminution du volume racinaire avec la diminution de la disponibilité en eau dans le sol.

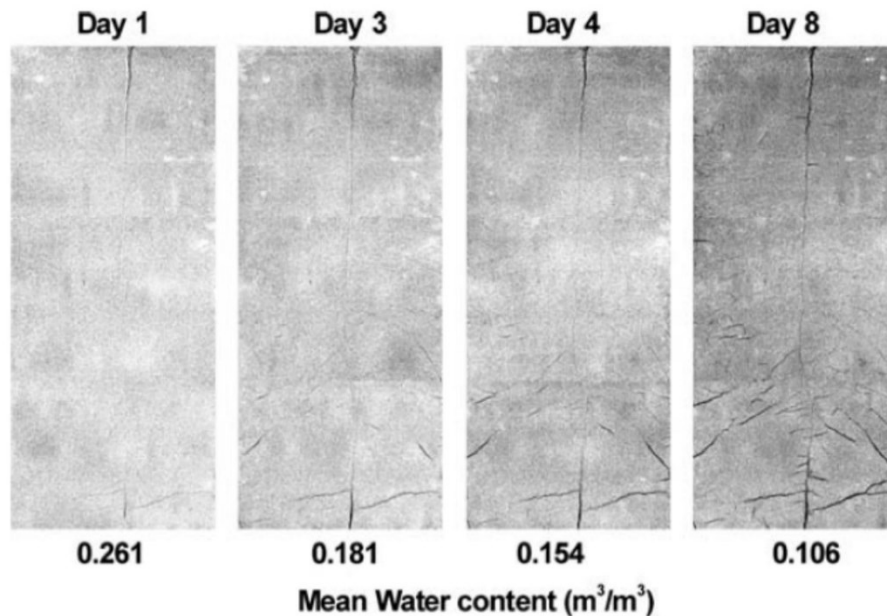


Figure 19. Évolution de la teneur en eau dans un rhizotron contenant un lupin avec un système racinaire pivotant. L'absorption racinaire est visible par une diminution de la teneur en eau moyenne au cours du temps (Doussan et al., 2006).

La radiographie/tomographie à rayons X est une technique non invasive et non destructive qui permet d'obtenir des images avec de hautes résolutions spatiales (entre 50 et 100 μm) et temporelles (de l'ordre de la dizaine de secondes pour un scan). Une résolution spatiale inférieure au micromètre peut être obtenue avec l'utilisation de la microtomographie. Néanmoins, l'utilisation de cette méthode est limitée à un usage en laboratoire et à des échantillons de diamètre de l'ordre de quelques centimètres. Par ailleurs, il s'agit d'une méthode ionisante qui peut avoir des effets sur les plantes. Pour de faible dose de rayons X (<30 Gy), Zappala *et al.* (2013) ont recensé, sur la base d'une revue de la littérature et d'une expérimentation sur du riz, aucun effet délétère sur la croissance des plantes. Cependant, il s'avère que cela dépend de l'espèce étudiée. Blaser *et al.* (2018) ont ainsi constaté un effet dose sur la croissance des racines de *Vicia faba* et une absence d'effet sur celles de *Hordeum vulgare*. Cet effet était d'autant plus important que la fréquence des scans était élevée.

Couplées à des modélisations, l'imagerie à transmission de lumière, la radiographie/tomographie à neutrons et à rayons X permettent également d'estimer le flux dans les racines et d'obtenir une distribution de ces flux (**Figure 20**).

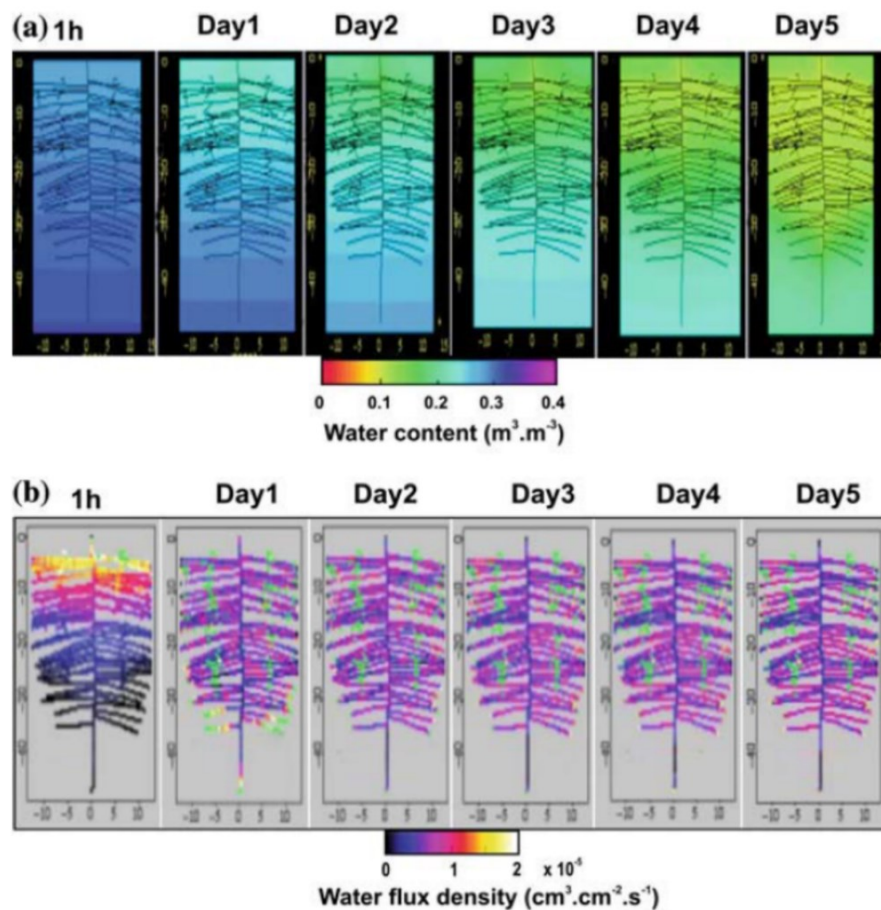
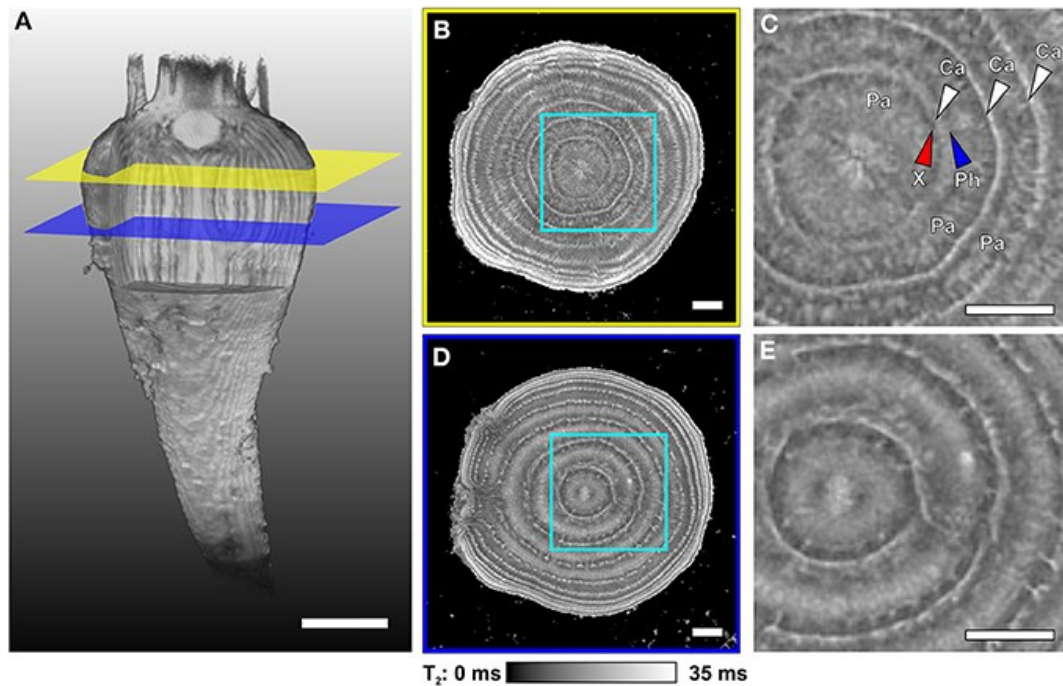


Figure 20. Simulation de la variation de la teneur en eau du sol (a) et de la densité de flux d'eau dans les racines (b) sur la base des résultats de l'imagerie par rayons X de la **Figure 19** (Doussan et al., 2006).

I.2.6.9. Imagerie par Résonance Magnétique à haut champ

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) repose sur l'étude des propriétés magnétiques de certains noyaux tels que celui d'hydrogène. Le principe de cette méthode sera un peu plus détaillé dans la partie **I.3. La Résonance Magnétique Nucléaire**. Grâce à la présence de gradients de champ magnétique dans les trois dimensions (x, y et z) qui permettent de faire varier linéairement le champ magnétique, des images peuvent être obtenues. L'IRM permet de mesurer la teneur en eau des racines (Haber-Pohlmeier et al., 2019) et d'étudier l'absorption racinaire (Bottomley et al., 1986; Pohlmeier et al., 2008; Pohlmeier et al., 2010; Haber-Pohlmeier et al., 2017). Il a ainsi été observé que cette absorption n'était pas uniformément répartie au sein du système racinaire, une plus grande quantité d'eau étant absorbée dans les couches supérieures du sol et cela, quelle que soit l'architecture du système racinaire (Bottomley et al., 1986; Pohlmeier et al., 2008; Pohlmeier et al., 2010). L'IRM permet également de visualiser la structure interne des racines et ainsi de localiser les vaisseaux conducteurs de xylème et de phloème (**Figure 21**, Metzner et al., 2014).



L'IRM est une méthode non destructive, non invasive et non ionisante qui permet un panel de mesures variées. Cependant, dans la majorité des études, notamment réalisées à haut champ magnétique, la taille de l'échantillon est limitée pour pouvoir être introduit dans l'ouverture de l'imager. Par ailleurs, la nature du sol impacte la qualité des résultats obtenus (Rogers and Bottomley, 1987; Pohlmeier et al., 2008; Pflugfelder et al., 2017). Ces instruments à haut champ magnétique sont coûteux et leur usage limité au laboratoire. Un moyen de contourner ce problème est de s'orienter vers des dispositifs portables, à bas champ magnétique.

Le **Tableau 1** ci-après récapitule les objectifs, les avantages et les inconvénients des méthodes présentées précédemment. Il est suivi par une partie détaillant le principe et les mesures RMN qui font l'objet de cette thèse.

Tableau 1. Objectifs de mesure, avantages et inconvénients des principales méthodes employées pour étudier l'eau dans les racines.

Méthode		Objectifs	Avantages	Inconvénients
Invasive et/ou destructive	Pesée (des racines)	Teneur en eau	• Méthode de référence • Coût • Facile à mettre en œuvre	• Destructive • Précision de la balance (doit être suffisante pour de petits échantillons) • Limitée au laboratoire (besoin d'étuve, de balance)
	Sonde de pression	Conductivité hydraulique	• Coût • Différenciation flux osmotique/flux hydrostatique	• Destructive • Inadaptée pour de très fines racines peu lignifiées • Limitée à des segments de racines • Limitée à des pressions positives
	Capteur de flux de sève	Flux d'eau	• Coût • Facile à mettre en œuvre • Utilisable à l'extérieur du laboratoire	• Invasif • Limité aux grosses racines, essentiellement sur les arbres
	Marquage isotopique	Absorption racinaire	• Rapide • Utilisable à l'extérieur du laboratoire	• Destructif • Coût • Difficile à mettre en œuvre
Non invasive, non destructive	Pesée (de la plante avec le sol)	Flux d'eau (transpiration)	• Méthode de référence • Coût • Facile à mettre en œuvre	• Mesure à l'échelle de la plante • Précision de la balance par rapport aux flux d'eau • Limitée au laboratoire (plante transplantée)
	Spectroscopie proche infrarouge	Teneur en eau	• Non ionisant • Coût • Rapide • Utilisable à l'extérieur du laboratoire	• Calibration nécessaire (et destructive) • Fenêtre de mesure limitée
	Imagerie à transmission de lumière	• Teneur en eau • Absorption racinaire	• Non ionisant • Résolution spatiale (~200-500 μm) • Coût	• Limitée au laboratoire • Épaisseur des contenants • Sol spécifique

Méthode		Objectifs	Avantages	Inconvénients
				• Pas d'autres sources de lumière que celle de l'instrument pendant les mesures • Amplification/accélération des processus d'absorption
	Radiographie/tomographie à neutron	• Absorption racinaire • Flux d'eau • Teneur en eau	• Résolution temporelle • Résolution spatiale (~100 µm)	• Limitée au laboratoire • Épaisseur des contenants • Dépend de la texture du sol (essentiellement dans du sable quartz (sable>90%)) • Irradiation des plantes qui peut affecter l'expression des gènes ou encore la concentration en chlorophylle • Impact du D₂O sur la croissance de la plante (selon la concentration et la fréquence d'injection) • Coût
	Radiographie/tomographie à rayons X	• Absorption racinaire • Teneur en eau	• Résolution temporelle • Résolution spatiale (~50-100 µm)	• Limitée au laboratoire • Taille de l'échantillon • Effet dose (quantité de rayons, fréquence d'exposition...) • Coût
	Imagerie par Résonance Magnétique (haut champ)	• Absorption racinaire • Teneur en eau	• Non ionisant • Résolution spatiale (~100 µm)	• Limitée au laboratoire • Taille de l'échantillon • Impact de la nature du sol • Coût

I.3. La Résonance Magnétique Nucléaire

I.3.1. Principes

Le moment magnétique nucléaire, propriété indispensable pour les mesures par RMN, a été découvert en 1938 par Isaac Rabbi. Cette découverte a permis de réaliser les premières expériences de RMN en 1946 par deux groupes de manière indépendante, Félix Bloch à Stanford et Edward Purcell à Harvard (Bloch, 1946; Purcell et al., 1946). Cette méthode permet l'étude non invasive de toute matière composée d'atomes aux noyaux possédant des propriétés magnétiques. Ces propriétés magnétiques sont liées au nombre de spin nucléaire I selon la relation :

$$\vec{\mu} = \gamma \frac{h}{2\pi} \vec{I} \quad [5]$$

avec $\vec{\mu}$ le moment magnétique, γ le rapport gyromagnétique ($\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$), h la constante de Planck ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$) et $\vec{I}$ le spin nucléaire. D'après l'équation 5, il apparaît que seuls les noyaux possédant des spins nucléaires non nuls, entier ou demi-entier, peuvent être étudiés par RMN. Lorsque les spins sont soumis à un champ magnétique externe $\mathbf{B}_0$, ils précessent à la fréquence de Larmor

$$f_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad [6]$$

Le noyau le plus étudié est celui de l'hydrogène ^1H , de spin $\frac{1}{2}$, car il présente des propriétés avantageuses qui font de lui le noyau le plus sensible en RMN : (i) son rapport gyromagnétique est le plus élevé ($268 \cdot 10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$) et (ii) son abondance isotopique est importante (99.98%). Le nombre de spin détermine le nombre de niveaux d'énergie pouvant être occupés par les noyaux, celui-ci correspondant à $2I + 1$. Ainsi, dans le cas de la RMN de l'hydrogène aussi appelée RMN du proton, deux niveaux d'énergie existent, le niveau de basse énergie (α) et le niveau de haute énergie (β). Lorsque les spins sont soumis à un champ magnétique externe $\mathbf{B}_0$ (par convention le long de l'axe z), ils se répartissent selon ces niveaux d'énergie. Cette répartition est caractérisée par la distribution de Boltzmann et n'est pas strictement équivalente, le niveau de plus basse énergie étant favorisé. Le rapport de la répartition des spins selon ces deux états correspond à :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp\left(-\frac{hf_0}{k_b T}\right) \quad [7]$$

avec T la température (K), k_b la constante de Boltzmann ($1.381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) et f_0 la fréquence de Larmor déterminée suivant l'équation 6 (s^{-1} ou Hz).

Dans le tableau 2, des exemples d'aimantation pour l'hydrogène à différents champs magnétiques $\mathbf{B}_0$ à température ambiante sont présentés. Il apparaît que, bien que l'augmentation du champ magnétique $\mathbf{B}_0$ permette l'augmentation de la sensibilité de la mesure RMN, l'aimantation est, de manière générale, faible.

Tableau 2. Exemples des fréquences de Larmor et d'aimantation pour le noyau d'hydrogène pour différents champs magnétiques $\mathbf{B}_0$ à température ambiante (298 K soit 25°C). L'aimantation, soit la différence de population entre les deux niveaux d'énergie (ppm) est calculée à partir de l'équation 7

$\mathbf{B}_0$ (T)	Fréquence de Larmor f_0 (MHz) (cf. équation 6)	Aimantation (ppm)
0.3 (NMR-MOUSE)	12,80	1
3 (Hôpital)	127,96	10
4.7 (Recherche)	200,47	16
11.7 (Recherche)	499,05	40
28.1 (Spectromètre au champ $\mathbf{B}_0$ le plus élevé)	1200	97

Au niveau macroscopique, cette distribution des spins se traduit par une aimantation résiduelle (M_0) le long de $\mathbf{B}_0$. Les descriptions qui vont suivre se feront en considérant le principe de la RMN d'un point de vue macroscopique et en ne travaillant qu'à partir de cette aimantation résiduelle. De l'énergie est fournie au système par une impulsion radiofréquence (RF) à la fréquence f_0 de résonance des noyaux afin de perturber le système. Cette impulsion RF produit un champ magnétique $\mathbf{B}_1$, perpendiculaire au champ magnétique $\mathbf{B}_0$, qui entraîne une transition des spins de l'état de basse énergie vers celui de haute énergie. Au niveau macroscopique cela se traduit par un basculement du vecteur d'aimantation M_0 dans le plan xy . À l'arrêt du champ magnétique $\mathbf{B}_1$ par l'arrêt de l'impulsion RF, les spins nucléaires retournent à leur état initial et le vecteur d'aimantation redevient colinéaire avec le champ $\mathbf{B}_0$. Un champ électromagnétique restituant l'énergie fournie précédemment est alors émis. Ce phénomène est appelé relaxation et l'onde émise est enregistrée par une antenne donnant ainsi le signal RMN. Ce signal S peut être décrit comme suit :

$$S(t) \propto \left(1 - e^{-t/T_1}\right) \left(e^{-t/T_2}\right) \quad [8]$$

avec t le temps d'évolution du signal, T_1 le temps de relaxation longitudinale et T_2 le temps de relaxation transversale. La relaxation longitudinale correspond au retour à l'état fondamental des noyaux c'est-à-dire au retour du vecteur d'aimantation le long de l'axe z . Le temps de relaxation longitudinale T_1 correspond au temps nécessaire pour que le signal RMN atteigne 63% de l'aimantation initiale M_0 . La relaxation transversale correspond au déphasage des spins nucléaires. Le temps de relaxation transversale T_2 correspond au temps pour lequel l'intensité du signal RMN décroît de 63% de sa valeur initiale M_0 dans le plan xy . Ces phénomènes de

relaxation ayant une part importante dans mes travaux, ils sont décrits plus en détail dans la partie suivante.

I.3.2. Mécanismes de relaxation

La relaxation correspond au retour à la position initiale M_0 des spins (position d'équilibre). Les temps de relaxation (ou leurs inverses, les vitesses de relaxation) peuvent être influencés par les mouvements moléculaires et les interactions des molécules avec leur environnement tels que le transfert d'aimantation, la rotation ou encore la translation des molécules (Levitt, 2006; Keeler, 2007). Il est pertinent de connaître ces différents mécanismes afin de concevoir des protocoles expérimentaux permettant de hiérarchiser leur influence dans les systèmes étudiés. Dans le cadre de la thèse, nous nous intéressons principalement à la relaxation transversale, et donc au T_2 . Celle-ci correspond à la décroissance de l'aimantation sur le plan transversal en raison de « la perte de mémoire » de phase des spins. De ce fait, tout mécanisme induisant un déphasage des spins est un potentiel mécanisme de relaxation. Nous allons donc traiter principalement de la composante T_2 et de l'effet que les mécanismes de relaxation ont sur sa valeur.

I.3.2.1. Interactions dipôle-dipôle

Dans le cas de spins $\frac{1}{2}$, le mécanisme majoritaire est le mécanisme dipôle-dipôle (interactions entre spins). Les interactions entre spins génèrent des champs magnétiques locaux fluctuants dont les intensités sont largement inférieures aux intensités des champs B_0 et B_1 . Ces champs locaux varient en intensité et en orientation selon l'agitation thermique des molécules et diminuent avec la distance entre les noyaux. Les temps de relaxation dépendent du temps de corrélation τ_c (Bloembergen et al., 1948). Celui-ci est défini comme étant le temps moyen pour un spin de se réorienter de 1 radian par rapport à sa position d'origine.

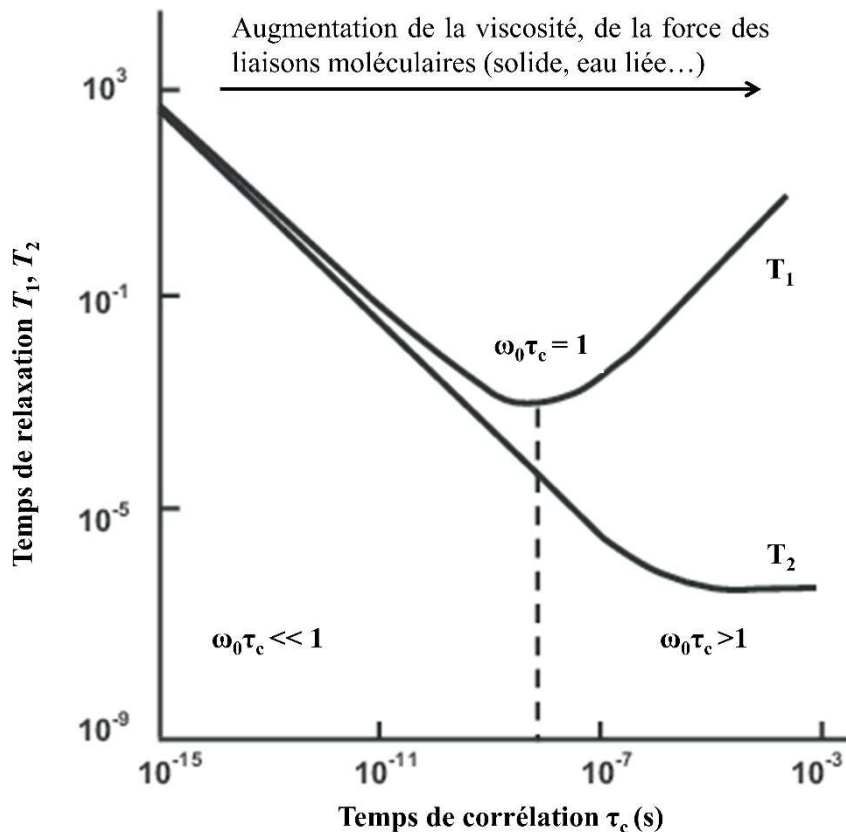


Figure 22. Évolution des temps de relaxation selon le temps de corrélation τ_c . $\omega_0 = 2\pi f_0$.

Selon la valeur de ce temps de corrélation par rapport à la fréquence de Larmor, différents régimes peuvent être observés (**Figure 22**). Si les mouvements moléculaires sont rapides (τ_c faible), les champs locaux vus par les noyaux changent régulièrement. À l'échelle de temps de la RMN, cela se comporte comme un champ local homogène. De ce fait, plus la vitesse de rotation moléculaire est élevée, plus cette contribution sur la relaxation diminue. Ainsi, les mouvements rapides sont caractérisés par des T_2 longs (**Figure 22**, cas $\omega_0 \tau_c \ll 1$). A contrario, dans le cas des mouvements lents (τ_c élevé) les champs locaux moyens sont plus dispersés et donc la relaxation est plus rapide. Les T_2 sont alors courts (**Figure 22**, cas $\omega_0 \tau_c > 1$). D'autres mécanismes, dont les principaux sont présentés ci-après, influencent la relaxation transversale. Ainsi, le T_2 mesuré correspond à un T_2 apparent.

I.3.2.2. Inhomogénéités du champ magnétique B_0

Théoriquement, le champ magnétique B_0 est homogène. Cependant, en pratique, il présente des hétérogénéités (ΔB_0) non maîtrisées par l'utilisateur. Les hétérogénéités de B_0 sont dues aux irrégularités même du champ magnétique et sont d'autant plus importantes que le champ magnétique est élevé. Ces inhomogénéités des champs magnétiques contribuent à la relaxation transversale selon :

$$\frac{1}{T_{2\text{ inh}}} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma}{2\pi} \Delta B_0 \quad [9]$$

I.3.2.3. Particules paramagnétiques

Le paramagnétisme est observé dans le cas de particules contenant des électrons célibataires. Or, ces électrons possèdent un spin et génèrent ainsi des champs locaux. Ces derniers étant plus élevés que les champs locaux générés par les noyaux, ils constituent une source importante de relaxation y compris lorsque les particules paramagnétiques sont en faible concentration. L'aluminium, les ions potassium et magnésium, que l'on peut retrouver dans le sol, ou encore l'oxygène gazeux, qui peut être présent dans des vaisseaux de xylème lorsque ces derniers s'embolisent, font partie de ces substances paramagnétiques.

I.3.2.4. Relaxation surfacique

Dans le cas de milieux poreux ou des tissus biologiques, les molécules d'eau peuvent interagir avec la surface des pores ou des compartiments cellulaires entraînant une contribution supplémentaire à la relaxation (Brownstein and Tarr, 1979; Washburn, 2014). Celle-ci dépend de la surface (S) et du volume (V) du compartiment considéré et de la relaxivité de surface (ρ). La relaxivité de surface est une constante de proportionnalité qui caractérise l'efficacité de la relaxation induite par les interactions des noyaux du fluide considéré avec les interfaces du compartiment.

$$\frac{1}{T_{2\text{ surf}}} = \frac{1}{T_2} + \rho \frac{S}{V} \quad [10]$$

Il apparaît que les différents mécanismes de relaxation présentés ici entraîne un T_2 apparent plus court que le T_2 initial. Selon ce que l'on souhaite étudier, l'objectif est de limiter l'influence de certains mécanismes de relaxation. Cette limitation s'effectue par le choix des paramètres des séquences de mesure. La hiérarchisation des mécanismes de relaxation peut également se faire par le conditionnement de l'échantillon et des conditions environnementales.

I.3.3. Principales séquences de mesure

Les séquences de mesure se décomposent en deux parties : une période de préparation du signal et une période de détection du signal. Ci-après sont présentées les séquences les plus

généralement utilisées pour mesurer les temps de relaxation T_1 et T_2 ainsi que les déplacements des molécules comme la diffusion translationnelle et le flux.

I.3.3.1. Mesure du T_1

Les séquences d'inversion-récupération (IR) et de saturation-récupération (SR) sont les séquences les plus utilisées pour mesurer le T_1 . La séquence d'inversion-récupération correspond à une impulsion 180° espacée par un temps d'évolution τ d'une impulsion 90° de lecture. La séquence de saturation-récupération diffère de la séquence IR par sa période de préparation du signal. En effet, au lieu d'une impulsion 180° , une succession d'impulsions 90° est appliquée. Ces séquences sont répétées en faisant varier le temps d'évolution et la composante T_1 est obtenue grâce à l'ajustement de la courbe expérimentale avec un modèle exponentiel de la forme

$$S(\tau) \propto (1 - e^{-\tau/T_1}) \quad [11]$$

pour la séquence SR et de la forme

$$S(\tau) \propto (1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad [12]$$

pour la séquence IR.

I.3.3.2. Mesure du T_2

Les T_2 sont généralement mesurés grâce à la séquence de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Meiboom and Gill, 1958). Cette séquence se fonde sur l'écho de Hahn (Hahn, 1950). L'écho de Hahn consiste en l'application d'une impulsion 90° suivi par un temps τ d'une impulsion 180° ($90^\circ - \tau - 180^\circ$). Pour obtenir une décroissance, n échos de Hahn sont appliqués en faisant varier τ . En 1954, Carr et Purcell (CP) ont proposé une variante de l'écho de Hahn. Ils ont étudié l'effet de la diffusion sur le signal qui est toujours présent en raison des gradients de champ magnétique (gradients d'imagerie ou inhomogénéités de l'échantillon) et qui entraîne une accélération de la décroissance RMN. Son influence pouvait toutefois être diminuée par l'utilisation d'un temps τ court et d'un nombre élevé (n) d'impulsions 180° comme le montre l'équation 13.

$$S(t) = S_0 \exp\left(\frac{-t}{T_2} + \frac{-\gamma^2 G^2 \tau^3 D}{12n^2}\right) \quad [13]$$

Ainsi, la séquence CP consiste en l'application d'une seule impulsion 90° suivie par un train d'impulsions 180° : $90_x^\circ - (\tau - 180_x^\circ - \tau)_n$ (Carr and Purcell, 1954). En 1958, Meiboom et Gill ont montré que dans la séquence de Carr et Purcell une faible déviation de l'impulsion 180°

avait une forte influence sur le T_2 en raison de l'effet cumulatif et délétère de la refocalisation incomplète des spins qui entraîne une accélération de la relaxation transversale (**Figure 23.a**). Ils ont ainsi proposé de décaler la phase de l'impulsion 180° de $\pi/2$ par rapport à la phase de l'impulsion 90° (Meiboom and Gill, 1958). Ainsi, la séquence CPMG correspond à $90_x^\circ - (\tau - 180_y^\circ - \tau)_n$. Cette modification rend la séquence CPMG résiliente à l'imperfection des impulsions de refocalisation. En effet, même avec une impulsion de 171° (**Figure 23.b**), la polarisation se retrouve parfaitement sur le plan transversal tous les échos pairs.

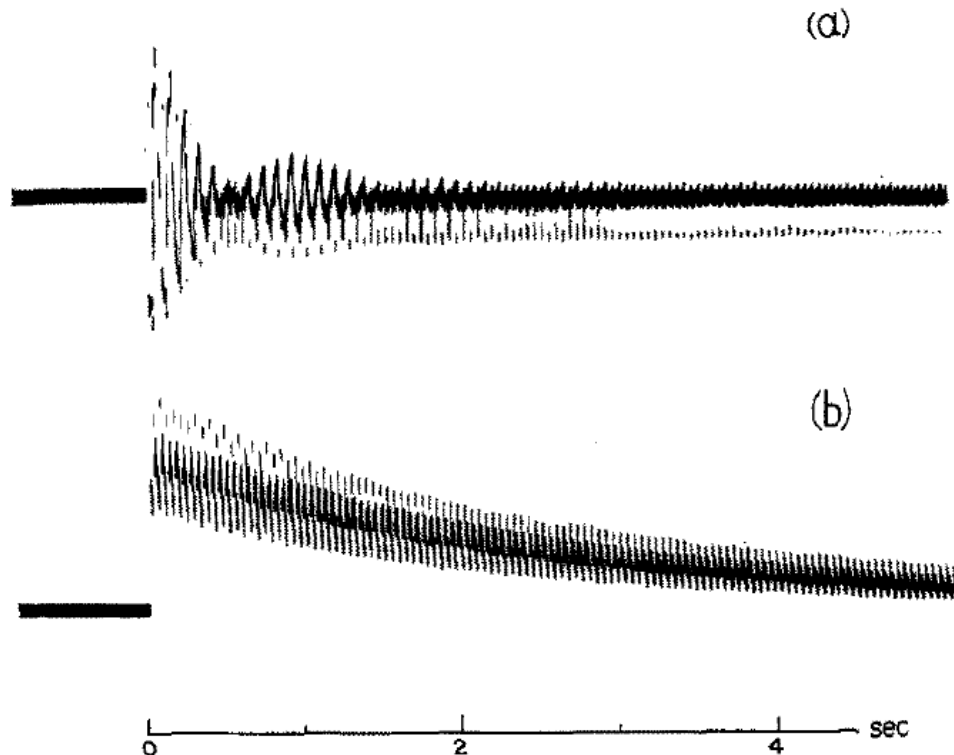


Figure 23. Décroissances obtenues avec une séquence CP (a) et une séquence CPMG (b). L'erreur cumulative visible sur la première décroissance disparaît sur la seconde (Meiboom and Gill, 1958)

I.3.3.3. Mesure des déplacements moléculaires

Les déplacements moléculaires peuvent être incohérents, i.e., la diffusion ou mouvement Brownien, ou cohérents, i.e., les flux qui correspondent à une translation des molécules sous l'effet d'un gradient physique (chimique, électrique, de pression...). Il existe trois grandes catégories de mesures de flux par RMN : (i) les méthodes d'encodage de phase, (ii) les méthodes d'entrée et de sortie des molécules de la zone de mesure et (iii) les méthodes de temps de vol (Pope and Yao, 1993).

Les méthodes d'encodage de phase font intervenir l'utilisation de gradients de champ magnétique dans la direction du flux et permettent à la fois de mesurer les flux et la diffusion. Les séquences principalement employées sont les séquences utilisant des gradients pulsés

(PFG, Pulsed Field Gradient). Celles-ci comprennent au minimum deux impulsions de gradients dont les effets sont opposés : l'un code la position spatiale des spins tandis que le second la décode. Ainsi, la phase finale des spins est liée au déplacement des molécules, et donc à leur vitesse (Callaghan and Xia, 1991; Pope and Yao, 1993; Johnson, 1999). La séquence PFG, qui est une des plus communément utilisée, comprend deux impulsions de gradients similaires (même durée d'application δ et valeurs absolues d'amplitudes g) aux effets opposés séparées par un temps de diffusion Δ . Les deux impulsions de gradient sont séparées soit par une impulsion 180° (cas de la séquence avec spin écho, PFG-SE), soit par deux impulsions 90° (cas de la séquence avec écho stimulé, PFG-STE) (Johnson, 1999). Cette séquence est répétée en faisant varier l'aire des gradients (généralement g) ou le temps Δ . Dans le cas de systèmes biologiques pour lesquels $T_2 \ll T_1$, il est préférable d'utiliser la méthode PFG-STE car l'information est stockée dans le plan longitudinal (90° après le premier 90°). Dans ces cas-là, Δ est limité par le T_1 et peut être augmenté par rapport à une séquence basée sur l'écho de spin (Johnson, 1999; Casanova et al., 2004). La diffusion (D) peut être extraite par application d'un modèle exponentiel directement sur les signaux mesurés après une première transformée de Fourier selon l'équation 14 avec Δ' , le temps de diffusion dont l'expression dépend de la séquence utilisée.

$$S(g) = S_0 \exp^{-(\gamma g \delta)^2 D \Delta'} \quad [14]$$

En présence d'un flux de vitesse v , l'équation 14 devient :

$$S(g) = S_0 \exp^{-(\gamma g \delta)^2 D \Delta' + i v \gamma g \delta \Delta'} \quad [15]$$

La mesure des flux nécessite alors l'application d'une transformée de Fourier supplémentaire afin de tenir compte de la phase (équation 15) et d'obtenir un propagateur moyen (**Figure 24**). Celui-ci donne la probabilité pour qu'une molécule présente dans l'échantillon se soit déplacée d'une quantité $r' - r$ durant le temps Δ , avec r' , la position de la molécule à la fin de la séquence et r , la position initiale de la molécule. Ainsi, en absence de flux, l'action du premier gradient est totalement compensée par l'application du second, ce qui se traduit par un propagateur en forme de gaussienne centrée autour de 0. Si un flux est présent, la gaussienne est centrée autour de $r' - r$ qui est égal à $\bar{v} \Delta$, avec $\bar{v}$ la vitesse moyenne du flux (Callaghan and Xia, 1991). Dans le cas des plantes, il est nécessaire de tenir compte de l'eau stationnaire présente dans les structures extérieures aux vaisseaux et dans le sol afin d'obtenir le profil de vitesse moyenne de l'eau circulante. En effet, les vaisseaux conducteurs peuvent être fins, de l'ordre de la centaine de micromètres avec une épaisseur potentiellement inférieure à la résolution spatiale de l'appareil (Metzner et al., 2015; van Dusschoten et al., 2016; Pflugfelder et al., 2017). Aussi, l'eau

stationnaire peut être prise en compte reléguant l'eau circulante à ne représenter qu'une fraction, quelques pourcents, de l'eau mesurée (Kuchenbrod et al., 1996; Van As et al., 2009). Pour obtenir ce profil de vitesse moyenne, le signal dans la direction opposée au flux est mis en miroir par rapport à 0 puis soustrait au signal mesuré dans la direction du flux (Callaghan and Xia, 1991; Casanova et al., 2004; Van As et al., 2009).

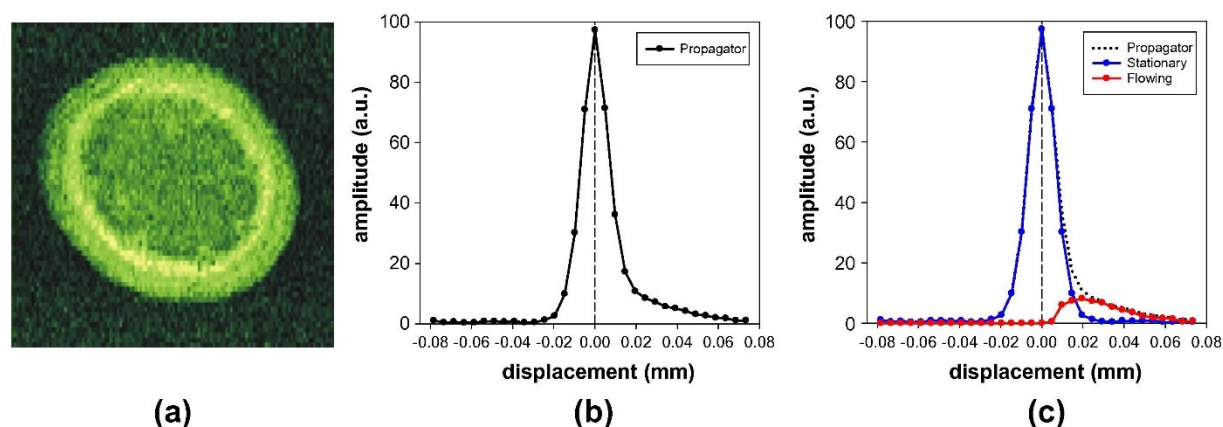


Figure 24. Observation de l'image RMN d'une tige avec visualisation du xylème en hypersignal (a). Propagateur moyen mesuré dans la tige d'un peuplier (b) et des distributions associées à l'eau stationnaire (c, bleu) et circulante (c, rouge) (Windt et al., 2011).

Les méthodes d'entrée et de sortie des molécules de la zone de mesure et les méthodes de temps de vol permettent quant à elles de mesurer uniquement le flux.

Les premières méthodes se fondent sur les changements d'intensité du signal dus à l'entrée (groupe 1) ou à la sortie (groupe 2) des spins de la zone de mesure (coupe sélectionnée) ou plus généralement de l'antenne. Pour celles du premier groupe, les spins présents dans la zone de mesure sont saturés tandis que les spins situés à l'extérieur sont à l'état d'équilibre. Ainsi, sous l'effet du flux, les spins mobiles non saturés entrent dans la zone de mesure et lorsqu'ils sont excités produisent plus de signal que les spins qui étaient déjà présents et étaient rendus invisibles par la saturation (Suryan, 1951; Buy et al., 2018). Celles du second groupe sont réalisées sur des spins à leur état d'équilibre avec des séquences fondées sur l'écho de spin. Ainsi, l'impulsion 90° entraîne le basculement du vecteur d'aimantation dans le plan transversal. Or, sous l'effet du flux, des spins peuvent sortir de la fenêtre de mesure tandis que des spins non soumis à l'impulsion 90° peuvent entrer avant l'impulsion 180° ou durant le train d'impulsion 180° dans le cas d'une CPMG, et donc avant l'obtention des échos. Dans ces cas-là, le flux entraîne une diminution de l'intensité et/ou des T_2 (Hemminga et al., 1977; Osán et al., 2011; Richard and Newling, 2019).

Les méthodes de temps de vol se différencient des méthodes d'entrée et de sortie dans le sens où la région excitée est différente de la région détectée. Alors que la région excitée est

perpendiculaire à la direction principale du flux, la région détectée peut être parallèle ou perpendiculaire au flux. Dans le premier cas, avec une région détectée parallèle au flux, une distribution des déplacements, et donc des vitesses, est obtenue. Dans le second cas, avec une région détectée perpendiculaire au flux, une distribution des molécules allant à une vitesse particulière est obtenue (Pope and Yao, 1993).

La gamme des vitesses de flux mesurables est déterminée par la dimension l de l'antenne ou de la zone de mesure pour la limite haute ($v_{\max} = l/\Delta$) et par la diffusion des molécules pour la limite basse (résolution de la mesure) (Pope and Yao, 1993). Si des flux lents doivent être mesurés, des gradients (g, δ) et/ou des durées d'encodage Δ élevés sont nécessaires. Or, Δ est limité par la relaxation des molécules tandis que g et δ sont limités par la puissance délivrée par l'amplificateur de gradients et celle que les bobines de gradients peuvent supporter. Les méthodes d'entrée et de sortie des molécules de la zone de mesure et les méthodes de temps de vol sont dans ces cas intéressantes.

I.3.4. RMN portable

Afin de réaliser des mesures à l'extérieur du laboratoire sur des plantes, la RMN compacte, hormis celle de paillasse qui est limitée par des ouvertures étroites (tube RMN), doit être envisagée. Cependant, cette RMN est généralement à bas champ magnétique. La RMN bas champ est définie par l'utilisation d'aimants dont l'intensité du champ B_0 est inférieure à 1 T (Mitchell et al., 2014; Marques et al., 2019). Cette définition est celle retenue pour la suite de ce manuscrit. Par rapport à la RMN haut champ, elle présente de plus faibles rapports signal-sur-bruit (SNR) dus à une plus faible aimantation (**Tableau 2**). Dans le cas d'utilisation d'aimants permanents, elle est également plus sensible à des variations de température qui entraînent des variations de B_0 (loi de Curie). Cependant, elle est plus économique à l'achat et à la maintenance. Par ailleurs, les dispositifs à bas champ magnétique sont généralement plus légers que les dispositifs à haut champ rendant cette technologie plus facilement transportable. Enfin, et selon la configuration de l'aimant, l'utilisation n'est pas limitée par la taille de l'échantillon. C'est notamment le cas des aimants unilatéraux.

I.3.4.1 Application de l'IRM portable pour l'étude des végétaux

Le corps de cette sous partie correspond à la revue « *Portable MRI in Plant Physiology* » qui est en cours de préparation et peut donc différer de la version finale. Cette revue traite de

l'application de l'IRM portable pour étudier la physiologie des plantes et de ses avantages et inconvénients par rapport à d'autres méthodes utilisées dans le domaine.

Résumé de la revue :

L'eau dans les plantes et sa dynamique sont au cœur de la physiologie des plantes. Pouvoir l'étudier dans des conditions *in situ*, c'est-à-dire dans l'environnement naturel des plantes, permettrait de mieux comprendre leurs comportements notamment dans des conditions de stress. L'IRM portable, étant constituée de dispositifs légers à bas champ magnétique et étant non invasive et non destructive, pourrait répondre à ce besoin. Cette méthode a d'ores et déjà été appliquée sur diverses plantes afin de :

(i) Visualiser la structure des organes. L'IRM portable a ainsi permis de visualiser différents tissus tels que le xylème, le phloème et le cortex de manière non destructive contrairement aux coupes histologiques colorées. Malgré une faible résolution spatiale comparée à celle d'autres méthodes d'imagerie telles que la microtomographie à rayons X ou la radiographie à neutron, elle a également permis de visualiser les racines dans le sol sans être contrainte par l'opacité de ce dernier.

(ii) Mesurer les flux de xylème et de phloème. Les méthodes usuelles telles que les capteurs de flux ou encore la gravimétrie sont répandues et utilisées en routine pour mesurer les flux de xylème. Cependant, ces méthodes sont limitées par la taille de l'organe (capteurs de flux) ou par le poids du dispositif (limite de la balance pour la gravimétrie). Pour pallier ces limitations, d'autres méthodes telles que le traçage isotopique ou de colorant existent. Or, ces dernières sont destructives. L'IRM portable peut être une alternative pour réaliser des mesures de flux de xylème à l'intérieur et/ou à l'extérieur du laboratoire. Elle a ainsi permis la mise en évidence d'une variation intra-espèce de ces flux (cycle diurne, variations saisonnières) mais également inter-espèce (entre 1.6 mm s^{-1} pour le peuplier et 5.10 mm s^{-1} pour la tomate par exemple). Le phloème quant à lui est plus délicat à mesurer. Il n'y a pas de méthodes communément utilisées et on peut retrouver parmi celles-ci la mesure par les aphides, les radiotraceurs et les méthodes de dilution. Cependant, ces méthodes sont soit limitées à un nombre restreint d'espèces (aphides), soit destructives (radiotraceurs) ou sujettes à de grandes marges d'erreurs (aphide, technique de dilution). L'IRM portable a permis de réaliser des mesures de phloème sur diverses espèces (entre 0.25 mm s^{-1} pour le ricin et 0.40 mm s^{-1} pour la tomate par exemple) et de mettre en évidence des variations diurnes de ces flux.

(iii) Suivre des processus physiologiques. Le suivi longitudinal des paramètres RMN a permis d'étudier des processus physiologiques tels que le cycle diurne lié à la transpiration, les

variations saisonnières, la croissance d'un organe, la senescence des feuilles ou encore la maturation de fruits.

(iv) Étudier l'impact d'une maladie ou d'un stress. Une absence de cycle diurne chez des plantes soumises à un stress hydrique a ainsi été mise en évidence, de même que la formation et la propagation d'embolie. Contrairement aux méthodes usuellement utilisées pour l'étude de la cavitation telles que la coloration, l'IRM portable est non destructive. Cependant, comme vu précédemment, par rapport à d'autres méthodes d'imagerie elle est limitée par sa résolution spatiale.

Il apparaît que l'IRM portable est de plus en plus utilisée dans la communauté végétale bien que pour l'instant la majorité des espèces étudiées soit des arbres et les organes étudiés soient des organes aériens. En dépit de certaines limites (résolution spatiale et sensibilité), l'IRM portable permet avec un seul instrument diverses applications, de l'étude de la structure au suivi de processus physiologiques sur des périodes allant de quelques heures à plusieurs mois. Enfin et surtout, la possibilité de transporter les instruments à bas champ magnétique à l'extérieur du laboratoire fait de cette technique une méthode particulièrement intéressante pour la communauté végétale.

Portable MRI in Plant Physiology

Authors (in alphabetical order) : Blystone S.*, Nuix M.*, Cochard H., Pagés G., Picon-Cochard C., and Traoré A.

* Two first co-authors

I. Introduction

Plant water dynamics are central to understanding plant biology and functioning. Photosynthesis, which is requisite to plant growth, implies heavy water consumption. For every mole of CO₂ sequestered as a result of photosynthesis, around 200 moles of water are lost to transpiration through stomata that are open for gas exchange (Schulze *et al.*, 2019). Thus, a plant must balance its need for CO₂ with the water loss that necessarily occurs with its uptake. To fulfill this need, water is absorbed from the soil by the roots, and then is transferred to other plant organs through the xylem. The coupling of water and carbon cycles is at the foundation of plant ecological and physiological functioning, and renders the understanding of plant water dynamics vital.

One of the difficulties in the plant sciences is being capable of measuring water dynamics non-invasively and outside in a plant's natural environment, i.e. *in situ*. In this work, we review the application of portable magnetic resonance imaging (MRI) as a solution to this challenge. Our review will be limited to the use of such devices applied to intact plants, and to the study of detached plant organs offering physiological insight into whole-plant processes.

II. Brief presentation of MRI

MRI, the imaging counterpart of nuclear magnetic resonance (NMR), is the analytical technique of choice to image water (more precisely hydrogen atoms) and its properties without ionizing or degrading the object. To perform MRI, the sample is placed inside a magnetic field and a coil excites the spins, which leads to the detection of a signal. A stronger magnetic field leads to higher MRI sensitivity, e.g. a better signal to noise ratio (SNR) or image resolution. However, such instruments are typically limited to laboratory use and are expensive to maintain. Depending on the MRI experiment, information regarding the water quantity, mobility or interactions with tissues can be obtained. In this review, we will not explain the physical principles of NMR or MRI. The interested reader can refer to any textbook.

MRI permits the measurement of water content through proton density measurements, as the signal is directly proportional to the quantity of water within the sample. MRI also permits the analysis of the state of water within tissues. Longitudinal and transverse relaxation times, the T_1 and T_2 , are influenced by the environment of the water molecules, and, in particular, their interactions with it. Water molecules bound to macromolecules or surfaces will exhibit shorter T_2 relaxation times than more freely moving water molecules. The measurement of these relaxation times thus makes it possible to study the structure of organs or even individual cells (Hills and Duce, 1990; Van As 2007). MRI also offers the possibility of spatially labeling water molecules to measure their apparent diffusion coefficient (ADC) or the probability of the average velocity of flowing water, enabling the measurement of water dynamics (Figure 1. According to the weighting of the NMR decay, different parameters can be measured such as proton density (A); longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times, diffusion (ADC) and flux. Subset A represents amplitude and T_2 maps acquired on a *Fagus sylvatica* stem (Meixner et al., 2020). For the amplitude map, the grey scale corresponds to the amount of water, whereas for the T_2 map, it corresponds to the value of the T_2 . Subset B represents an ADC map acquired on a control pear tree by Kimura *et al.*, (2011). A zone with high ADC values (red pixels) is clearly defined. Subset C represents an example of flux measurements. It corresponds to the average linear velocity map of a poplar tree (Windt et al., 2006). The red scale corresponds to the velocity measured in the phloem, while the blue scale corresponds to the velocity measured in the xylem.

). For example laboratory MRI, which is characterized by a magnetic field higher than 1 T, has long been used to measure the water dynamics of plants, follow growth, or understand plant structure (Köckenberger *et al.*, 1997; Pohlmeier *et al.*, 2008; Van As *et al.*, 2009; Gruwel 2014). However, the incapacity to measure plants *in situ* has also made laboratory MRI a tool of limited use in the plant sciences as the environment of a plant is primordial to its physiological functioning (Figure 1).

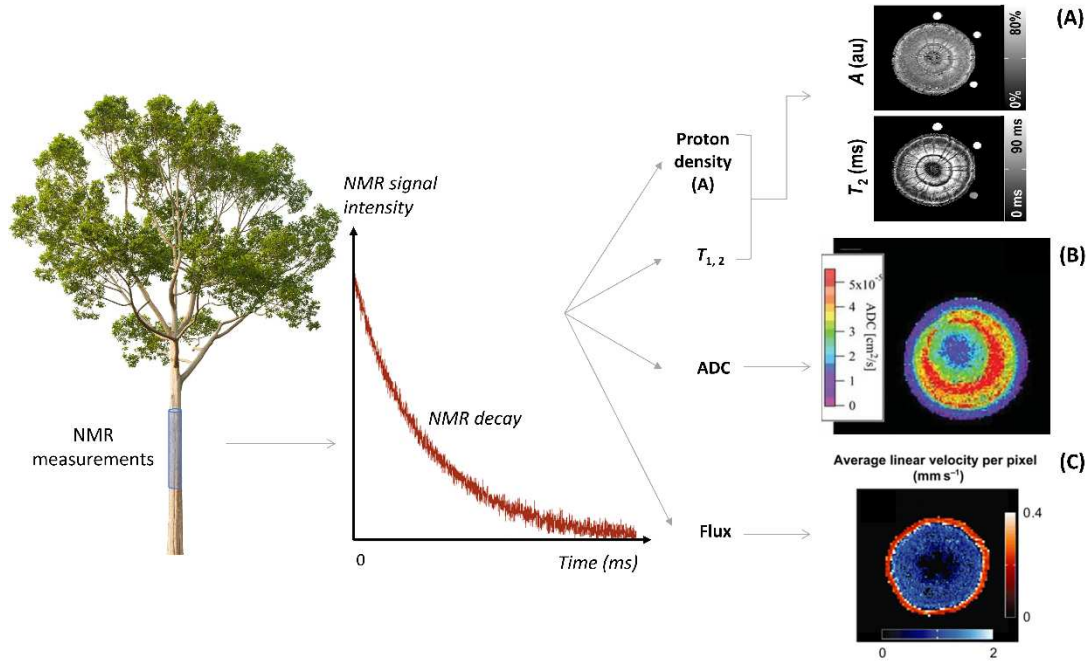


Figure 1. According to the weighting of the NMR decay, different parameters can be measured such as proton density (A); longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times, diffusion (ADC) and flux. Subset A represents amplitude and T_2 maps acquired on a *Fagus sylvatica* stem (Meixner et al., 2020). For the amplitude map, the grey scale corresponds to the amount of water, whereas for the T_2 map, it corresponds to the value of the T_2 . Subset B represents an ADC map acquired on a control pear tree by Kimura et al., (2011). A zone with high ADC values (red pixels) is clearly defined. Subset C represents an example of flux measurements. It corresponds to the average linear velocity map of a poplar tree (Windt et al., 2006). The red scale corresponds to the velocity measured in the phloem, while the blue scale corresponds to the velocity measured in the xylem.

To measure plants in their natural environment, a portable MRI device must be used. Such instruments exist but are mostly made in-house. As lightweight magnets must be used, the magnetic field strengths of portable devices are generally lower than 1 T, leading to a decrease in the SNR and directly impacting the experimental temporal and/or image resolution. Another challenge in portable MRI, beyond reducing magnet size, is optimizing magnet shape for a variety of samples. C-shaped, U-shaped and Halbach magnets enclose the magnetic field, offering field homogeneity, and Halbach magnets in particular offer the highest field strength per mass of material. However, all of these magnets are limited by their internal diameter and accessibility. Unilateral magnet designs have the advantage of being able to accommodate samples of any size and shape, however, the measurement depth is limited so that only a small part of a larger sample can be measured. Magnet choice is thus a compromise between the desired resolution, portability, and accessibility, and an ideal magnet will depend upon the experiment and the sample. Portable magnets have been developed that are suitable for outdoor environments, and previous works have shown that portable MRI stands as an interesting analytical tool to investigate water status and movement in plants *in situ*. In this paper, we will

review these different applications and demonstrate the interest of having NMR as another analytical tool in the ecophysiological scientist's toolbox.

III. Measurements of plant anatomy and dynamics

In the next section of this review, we will focus on what portable MRI, brings to the study of plant water dynamics, plant structure, and evolution compared to alternative methods. The advantages and disadvantages of each method discussed in this review are summarized in Table 1. . We defined a method as not easily accessible when it requires constraining laboratory equipment, such as specific lead shields, as is the case with the use of X-ray imagers, or when the access for plant work is difficult (geometry and orientation of the device). We considered a method as easy to perform when the execution of the experiment requires few steps. And finally, we consider a method as non-invasive when it does not entail equipment entering the sample body or compromising its integrity.

Table 1. Advantages and inconveniences of alternative methods used to measure water content, plant structure, xylem and phloem fluxes and cavitation.

Parameter measured	Method	Advantages	Disadvantages
Anatomy	Microscopy	Affordable; easy to perform	Invasive; only a small portion of sample can be observed at once
	X-ray (μ)tomography	High spatial resolution; non-invasive	Limited to laboratory; possible impact of ionizing radiation; expensive; not easily accessible
	Neutron radiography	High spatial resolution; non-invasive; sensitive to water; adapted to dense materials	Limited to laboratory; limited number of machines and labs; cost of measurement time; not easily accessible
	Dye tracing	Affordable; easy to perform	Destructive
	High-field MRI	Non-invasive; high spatial and temporal resolution	Limited to laboratory; expensive equipment and maintenance; not easily accessible
Water content	Fresh weight/Dry weight	Easy to perform	Destructive; time consuming (overnight drying required)
	NIRS	Non-invasive; can be used outside of laboratory; affordable; easy to perform	Indirect, results must be interpreted through models; calibration particularities for a given species
	High-field MRI	Non-invasive; high spatial and temporal resolution	Limited to laboratory; expensive equipment and maintenance; not easily accessible
Xylem flux	Sap flow meters	Can be used outside of laboratory; affordable; easy to perform	Invasive
	Porometers	Can be used outside of laboratory; affordable; easy to perform	Indirect, large margin of error in estimating sap flow due to variation between leaves

Parameter measured	Method	Advantages	Disadvantages
	2D light transmission	Non-invasive; offers real-time data on water uptake by roots	Indirect, limited to laboratory use; limited to certain plants and sandy soil
	Gravimetric	Affordable; easy to perform	Indirect, limited to laboratory use
	Isotopic tracing	Can be used outside of laboratory	Destructive; results must be interpreted through models
	Dye tracing	Affordable; easy to perform	Destructive
	High-field MRI	Non-invasive, high spatial and temporal resolution	Limited to laboratory; expensive equipment and maintenance; not easily accessible
Phloem flux	Aphids	Affordable	Indirect, limited to certain plant species; approximative with large margin of error; can be complicated to execute
	¹¹ C PET imaging	Non-invasive; high temporal resolution	Limited to laboratory; expensive and cumbersome equipment; possible impact of ionizing radiation
	High-field MRI	Non-invasive, high spatial and temporal resolution	Limited to laboratory; expensive equipment and maintenance; not easily accessible
Cavitation	Acoustic emissions	Can be used outside of the laboratory	Indirect, more qualitative than quantitative; invasive
	Dye tracing	Affordable; easy to perform	Destructive
	Xylem Embolism Meter	Affordable; easy to perform	Indirect, Destructive; limited to laboratory use
	Microscopy	Affordable; easy to perform	Destructive; only a small portion of sample can be observed at once

Parameter measured	Method	Advantages	Disadvantages
	X-ray (μ)tomography	High spatial resolution; non-invasive	Limited to laboratory; possible impact of ionizing radiation; expensive; not easily accessible
	Neutron radiography	High spatial resolution; non-invasive; sensitive to water	Limited to laboratory; not easily accessible
	High-field MRI	Non-invasive; high spatial and temporal resolution	Limited to laboratory; expensive equipment and maintenance; not easily accessible

III.1. Measurements of plant anatomy and water content

Beyond MRI techniques, there are several methods to study plant structure and root system architecture, all with various advantages and disadvantages. Dye tracing, microscopy techniques, X-ray tomography (Mooney et al., 2012; Cochard et al., 2015), neutron radiography (Esser et al., 2010; Tötze et al., 2013; Cai et al., 2022) and 2D-light transmission imaging are among these methods (Doussan et al., 2006; Garrigues et al., 2006). Microscopy enables the acquisition of images on a fine scale, at the subcellular level, however, microscopy techniques are destructive (Utsumi et al., 1998), as are dye tracing techniques. X-ray and neutron tomography are both non-invasive imaging methods with high spatial (1-50 μm) and temporal resolutions. Nonetheless, due to ionizing radiation, X-ray tomography can impact natural processes within the plant (Blaser et al., 2018). Microscopy techniques, 2D-light transmission imaging, X-ray tomography and neutron radiography are all limited to laboratory use. 2D-light transmission imaging is especially limited as it cannot be used with an opaque medium (Doussan and Garrigues, 2019) such as the soil found in a plant's natural environment. It also requires the use of a very thin rhizotron which limits the plant species that can be studied. Portable MRI is an interesting technique to study aerial plant structure and root systems as it overcomes many of the limitations of these traditionally used methods.

The most frequently used methods to measure plant water content are either destructive or indirect. For example, water content is traditionally measured by taking fresh and dry weights of plant matter (Jones, 2007). From the fresh and dry weights and the inclusion of turgid weight as a variable, one can directly estimate a plant's relative water content (RWC). This method normalizes data to account for differences in morphology between plants and it has the advantage of being direct and quantitative but it is forcibly destructive. RWC can also be estimated using near infrared spectroscopy (NIRS). NIRS enables RWC measurements non-destructively and *in situ* but it is indirect as the method relies upon calibration models which need validation for each species tested in order to interpret spectra; the interpretation of spectra can be difficult due to the fact that a variety of spectral information on pigment uptake, diffusion and leaf structure can obscure water information (Zhang et al., 2012).

MRI techniques use signal amplitude, which is directly related to water content, and relaxation times to obtain structural information. Using NMR relaxation times, T_2 -weighted maps make it possible to observe different tissue compartments, at the intracellular or intratissue scale (Figure 2. Amplitude (A) and transversal relaxation time (T_2) maps acquire with a 0.25T-MRI, and microscopy images of the stem of three *Fagus sylvatica* samples (B1, B2, B3). The amplitude is related to water content (%) (Meixner et al., 2020).

). At present, using portable devices, this has been done primarily on deciduous tree branches (Nagata et al., 2016; Meixner et al., 2020; Meixner et al., 2021) and fruits (Baek et al., 2020). Growth rings, xylem and phloem distribution have been successfully imaged, in addition to the observation of higher water content in the phloem of mangrove trees (*Avicennia officinalis*), putting in evidence a water storage capacity (Robert et al., 2014). At the level of underground plant organs, the difference in relaxation times between the soil and the roots permitted the direct imaging of roots within intact soil and to observe their distribution (Bagnall et al., 2020; Bagnall et al., 2022).

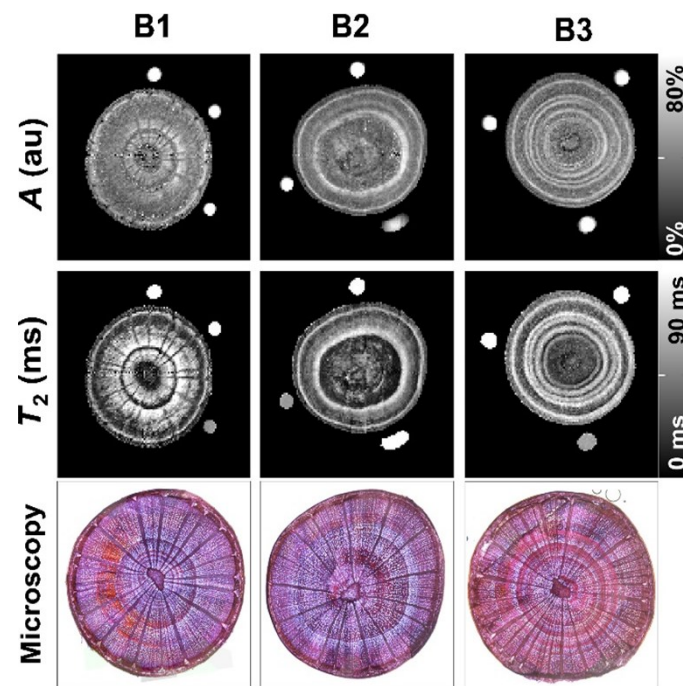


Figure 2. Amplitude (A) and transversal relaxation time (T_2) maps acquire with a 0.25T-MRI, and microscopy images of the stem of three *Fagus sylvatica* samples (B1, B2, B3). The amplitude is related to water content (%) (Meixner et al., 2020).

III.2. Water dynamics and evolutive processes

III.2.1. Flow measurements

Plant water fluxes, the xylem and phloem fluxes, can be quantified according to flow rate ($\text{mm}^3 \text{s}^{-1}$) and velocity (mm s^{-1}).

Xylem flow can be measured in several ways. Dye tracing (Varney and Canny, 1993) can be used to measure xylem flow velocity by observing the time taken for dye to cross two points on a trajectory. While this method is inexpensive and easy to implement, it is destructive as plant organs must be sampled to measure dye accumulation. The deuterium isotope can be used to plot xylem velocity and dynamic water distribution. The advantage of this system is that it can be used *in situ*, but the method is invasive and relies on models to interpret the results

(Seeger and Weiler, 2021). Information on xylem flow can also be obtained with sap flow meters using a variety of heat pulse-based methods. This method can be used *in situ*, in the natural environment of a plant, however, the disadvantage of this technique is that it is invasive (Green and Clothier, 1988). Non-destructive and non-invasive methods exist such as gravimetric analysis which consist of following the evolution of the weight of potted plants to measure the loss of water by transpiration, considering the evaporation of the soil by covering it; and porometers can non-destructively provide indirect estimates of whole plant transpiration by measuring stomatal conductance. However, gravimetric methods require the plant to be in a container that can be placed on a scale, eliminating the possibility of monitoring a plant in its natural environment. While porometers can be used outdoors in a plant's natural environment, the estimation of plant transpiration comes with a large margin of error due to variation between leaves and location within the canopy. Laboratory MRI velocimetry has been used to measure xylem flow for decades, in addition to phloem flow, with the limitation that it cannot be taken into the field (Köckenberger et al., 1997; Homan et al., 2007).

Besides laboratory MRI, established and reliable methods to measure phloem flow are less numerous. ^{11}C PET imaging can be used to follow the flow of radiotracers in order to obtain information about phloem. This technique extrapolates flow information by measuring the time it takes for radiotracers to pass two points along a pathway. While the method is non-invasive and direct, its use is limited due to the necessity of expensive and cumbersome laboratory equipment which is needed to generate the radiotracers (De Schepper et al., 2013; Hubeau and Steppe, 2015). Phloem flow rate can also be estimated by exploiting the ability of aphids to penetrate phloem tissues in certain plant organs. By using radiolabeled CO_2 and placing several aphid stylets along a plant organ, one can extrapolate pressure differences which can be used to calculate phloem flow rate. The disadvantage of this method is that it is very limited to plant species with a corresponding insect host, and to tissues in which the aphid can penetrate. It is also difficult to accurately measure the rate of phloem transport because the phloem quantities are in the nanoliter range and evaporation has a significant impact on the measurements (Palmer et al., 2013).

MRI is an exceptionally interesting tool to measure plant water dynamics because it enables the measurement of both the xylem and phloem fluxes, and this has been demonstrated using portable devices. Using such a device, Windt *et al.* (2006) measured the xylem and phloem fluxes of four different plant species, including poplar trees, tomato, tobacco and castor bean. They were able to observe that the speed, i.e., the average velocity, of the phloem is not very substantial compared to the xylem, regardless of species, measured between 0.25 mm s^{-1} and

0.40 mm s⁻¹, while that of the xylem is higher and more differentiated, from 1.6 mm s⁻¹ for poplar to 5.10 mm s⁻¹ for tomato. They also noticed a variation of the fluxes according to the diurnal cycle, the average speed of the fluxes decreasing at night regardless of the vessel studied. Nagata *et al.* (2016) measured xylem flux in a tree (Zelkova) outside the laboratory. They showed this same day/night cycle in connection with measurements of sap flow carried out elsewhere, and an evolution of these fluxes according to the season, the latter decreasing in autumn and winter due to the loss of leaves.

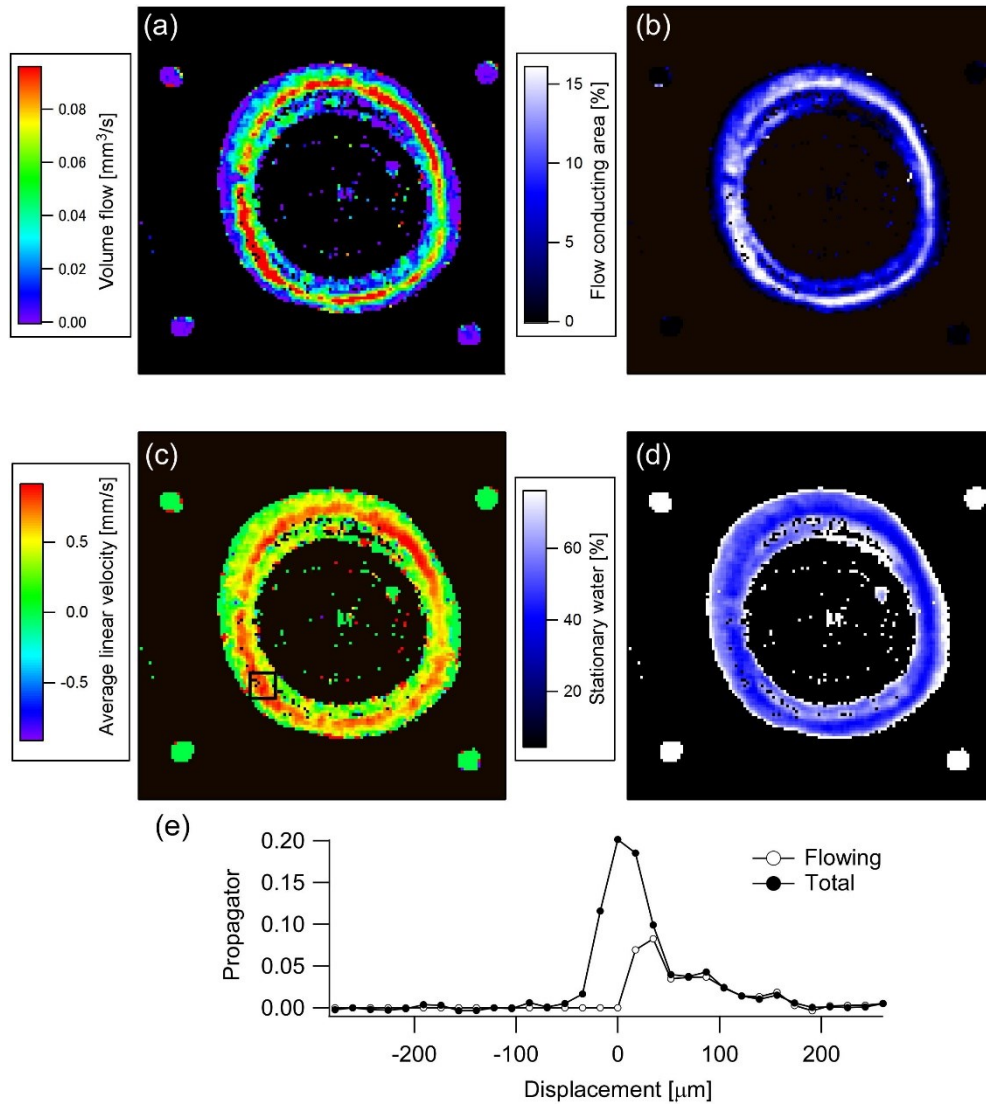


Figure 3. Flow parameters (volume flow (a); flow conducting area (b); average linear velocity (c) and amount of stationary water (d)). The propagator displayed (e) was measured in the pixel represented by a black square in (c). These measurements were acquired with a 0.2 T-MRI on a Zelkova tree *in situ* (Nagata *et al.*, 2016).

III.2.2. Measurements of physiological processes

Non-invasive imaging methods, such as 2D-light transmission imaging, X-ray and neutron tomography, and MRI, permit the study of physiological processes such as root water uptake, growth, fruit maturation, senescence of organs and stress responses.

Root water uptake has been studied by X-ray (Daly et al., 2018; Jung et al., 2020) and neutron tomography (Zarebanadkouki et al., 2013; Ahmed et al., 2018; Zarebanadkouki et al., 2019; Cai et al., 2022) and also by 2D-light transmission imaging (Doussan et al., 2006; Garrigues et al., 2006). These methods enable a spatially resolved study of root water uptake. It has been shown that regardless of root system architecture, root water uptake is more abundant in the superficial layers of the soil than in the deeper layer (Garrigues et al., 2006; Zarebanadkouki et al., 2013; Ahmed et al., 2016). Uptake also depends upon the age and root type. Indeed, it has been observed on a young maize plant that uptake occurred mainly in lateral roots (Ahmed et al., 2016) whereas for a mature maize plant it occurred mainly in nodal roots (Ahmed et al., 2018). As far as we know, spatially resolved root water uptake has not yet been studied with portable MRI. Nonetheless, diurnal variations of proton density and relaxation times have been observed in the roots of herbaceous species (Nuixé et al., 2021). Such variations of proton density were also observed in the stems of trees (Windt et al., 2011; Meixner et al., 2021). In the cited studies, NMR parameters were elevated at the end of the night and decreased during the day. This evolution was consistent with the physiology of the plant which transpired during the day.

Organ growth has also been successfully studied by monitoring MRI parameters. Windt *et al.* (2011) showed that there is a change in the amount of water in trees at night, with an observation of the growth of the trunk after a few days. At night, the quantity of water in the tree increased, then a portion was used at the beginning of the day, and finally the quantity of water present in the trunk stabilized. As the days passed, the overall amount of water present in the trunk increased, reflecting growth of the trunk. Similar results were observed in oak with an increase in water uptake at night. A link between the diameter of the stem and the amount of water absorbed has also been established, the latter being greater when the diameter of the stem increases (Windt and Blümler, 2015). While these studies were conducted in a climate chamber, Nagata *et al.* (2016) followed the growth of a tree outside the laboratory, in the plant's natural environment. They observed that tree growth was rapid during the spring and summer months via the visualization of growth rings. Growth slowed after the summer months, and stopped completely during the winter months, until the following summer with a slight increase in trunk diameter (Figure 4).

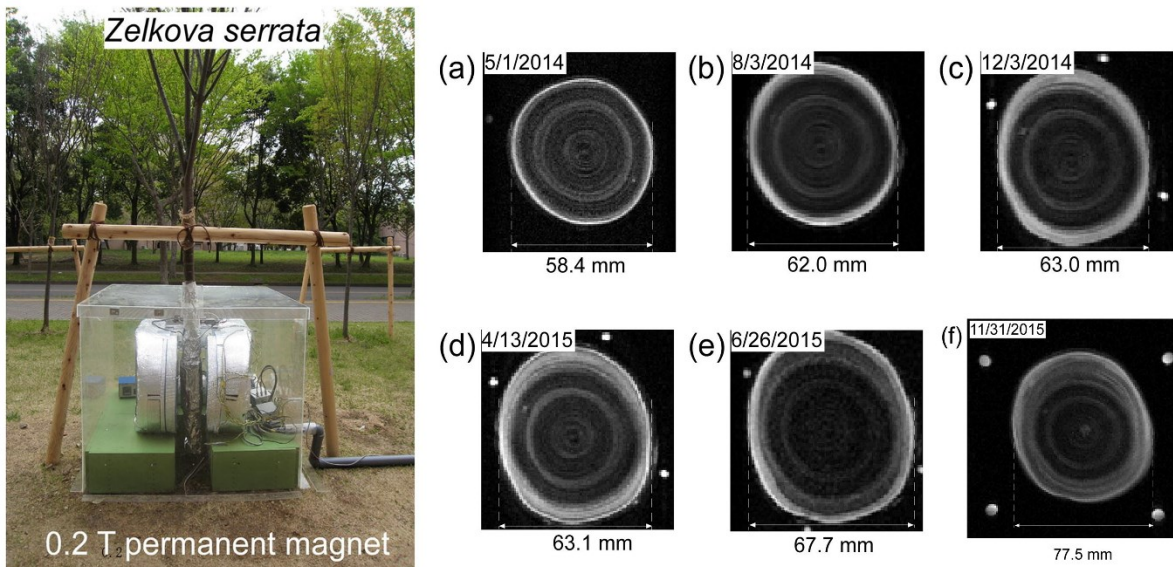


Figure 4. 0.2T-MRI positioned outside the laboratory on the stem of *Zelkova serrata*. Images (a) to (f) shows the growth of the stem, an increase of the stem diameter being observed (adapted from (Nagata et al., 2016)).

Physiological processes, such as growth, have been studied with direct measurements (visualization of growth rings or variation of the amount of water), but they can also be studied indirectly with the evolution of relaxation times which can be related to the evolution of the structure and/or function of organs, as relaxation times give information on the water molecules' environment and are influenced by molecular motion. Using a portable device, growth and senescence processes have been studied on leaves using relaxation times. Musse *et al.* (2013) demonstrated that three or four T_2 relaxation times were present depending upon leaf phenology. These relaxation times were attributed to cellular compartments such as the vacuole, the cell wall or even the dry matter. While the shorter relaxation times disappeared with increasing levels of development, the longer relaxation times increased in proportion. This was due to the increase in the size of the vacuole (Musse et al., 2013). At a certain stage, the long relaxation time split into two components. This has been attributed to tissue heterogeneity, namely, palisade cells (Sorin et al., 2015; Musse et al., 2017). Relaxation times and other NMR parameters have also been used to study the growth of fruits. Geya *et al.*, (2013) showed an increase in the value of relaxation times and apparent diffusion coefficients in conjunction with increasing fruit weight. Another study followed the maturation of tomatoes and showed that three structures composing the fruit were visible at the beginning of the experiment (pericarp, loculus and placenta), while the pericarp and loculus were no longer distinguishable at the end of the experiment on mature fruit. The level of ripening could also be quantified due to the pericarp/locule ratio which increased with the maturity of the fruit (Baek et al., 2020).

III.2.3. Assessment of the impacts of stress and disease

Within the context of climate change, it is of interest to study the impact of water stress on plant physiology. Stress can lead to cavitation, the breaking of the water column within the xylem due to air bubbles, which occurs as a result of drought or cold stress and which can lead to embolism.

Methods mentioned in part *III.1* discussing measurements of plant anatomy can be used to elucidate the impact of drought on root water uptake and on the rhizosphere (Carminati et al., 2010; Zarebanadkouki et al., 2018). They can also be used to study cavitation by allowing contrasts within the xylem tissue (Tötzke et al., 2013; Cochard et al., 2015). There are a couple of methods used to measure cavitation uniquely, alternative to MRI. One of these methods, developed in our laboratory, uses a xylem embolism meter, the XYL'EM device, to study the relationship between xylem conductance and cavitation (Cochard et al., 2013). The level of cavitation of a branch can be estimated by measuring the conductivity of water moving through the branch just after being cut and then on the same branch at full saturation after removing the air bubbles. The weakness of this system is that it is destructive, it must be carried out in the laboratory, and it only gives information on one branch. There are methods using the production of acoustic emissions to measure cavitation, however, these methods are limited in that they are more qualitative than quantitative. Linking acoustic emissions to the amount of cavitation in a sample relies on the assumption that the plant vulnerability curve has a perfect sigmoid shape, and also that the end point, where there is 100% cavitation loss, is known (De Roo et al., 2016), providing results with a large margin of error.

Portable MRI enables the study of the impact of hydric stress and the monitoring of water dynamics in plants submitted to drought conditions. As observed in Figure .A and B, which presents profiles, i.e. the signal intensity in function of depth, acquired with a commercial, unilateral portable MRI, there is a decrease in the signal intensity as plant water content decreases (Blystone *et al.*, unpublished). The profiles permit to visualize the distribution of water as the plant dehydrates, and how this change manifests in both xylem and phloem tissues. Besides birch tree branches and the roots of herbaceous species (Nuixé *et al.*, unpublished), similar results were observed in leaves, stems and branches of other herbaceous plants and trees (Capitani et al., 2009; Yoder et al., 2014; Malone et al., 2016; Sidi-Boulénouar et al., 2019; Meixner et al., 2020). Contrary to hydrated plants, there are no more observable nycthemeral variations in the NMR signal in the presence of water stress (Yoder et al., 2014; Malone et al., 2016, Nuixé *et al.*, unpublished). In addition to signal intensity, drought impact can be studied with transversal relaxation times. A decrease in mean T_2 has been demonstrated in leaves,

branches and roots (Capitani et al., 2009; Sorin et al., 2018; Meixner et al., 2020, Nuix *et al.*, unpublished). Portable MRI has also been used to study embolism formation and spreading. It has been shown that embolism begins in the oldest xylem vessels before spreading to the youngest (Fukuda et al., 2015; Meixner et al., 2020). A good correlation has been observed between the areas of xylem filled with water and the areas with the highest signal on the MRI, and between the curves of vulnerability and the embolized area, giving the possibility of estimating the areas of xylem impelling water movement (Fukuda et al., 2015).

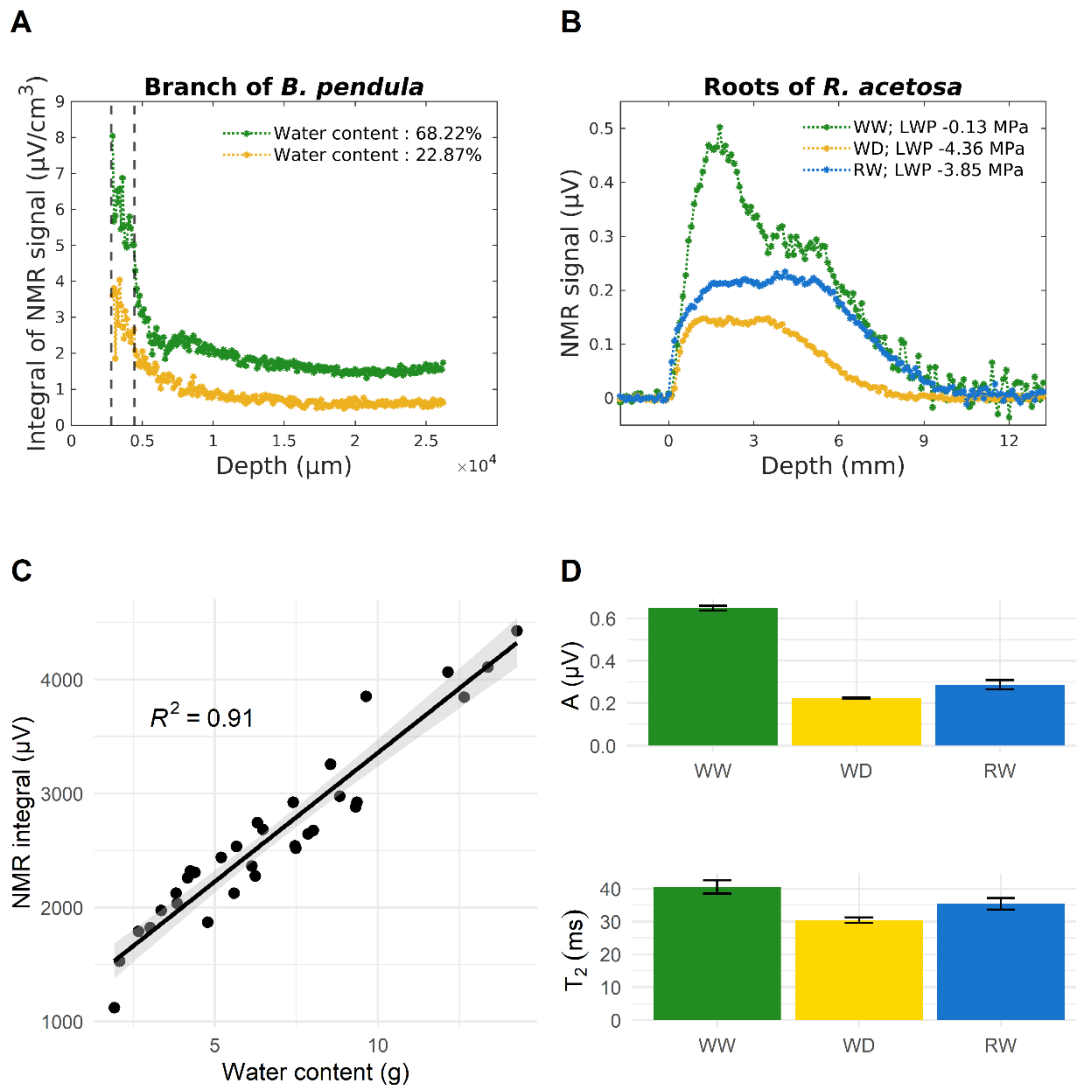


Figure 5. Profiles acquired on (A) the branch of a birch tree, *B. pendula* (Blystone *et al.*, unpublished). As branches have a curved geometry, the signal was normalized in subset A by the effective volume of the branch in the measurement slice. The peak between the dashed lines corresponds to the bark zone, including the phloem tissue, while the broader peak at greater depths corresponds to xylem tissue; (B) roots of an herbaceous species, *R. acetosa* (Nuix *et al.*, unpublished). The curved zone corresponds to the root compartment of the rhizotron model while the flat zone with positive depths corresponds to the soil compartment. For both profiles, the green profile corresponds to the well-watered (WW) plant while the yellow profile corresponds to the plant suffering a water-deficit (WD). The blue profile corresponds to the plant after rehydration (RW). (C) A linear regression between the integral of the profiles, taken through time, as displayed in subset (A) and the water content measured on branches of silver birch trees. There is an excellent positive correlation between these two measurements. (D) Evolution of the mean amplitude and of the mean T_2 measurement at five positions in roots displayed in subset (B).

Besides studying drought impact, portable MRI has also been used to study the influence of diseases on anatomy and water flow in plants. In 2011, Japanese researchers developed a portable MRI device to characterize the physiological differences between the branch of a healthy pear tree and the branch of a pear tree affected by dwarfism (Kimura et al., 2011).

IV. Conclusion

Portable MRI is an interesting tool to study plant water dynamics. It has mainly been used on trees, but applications can be found on other types of plants, such as herbaceous species. It enables the non-invasive and non-destructive study of plant physiology. Imaging based upon proton density and relaxation times can offer information about plant structure, physiological processes and disease. Moreover, flow measurements can be taken in precise locations within the sample to differentiate conductive tissues and to measure their average flow velocity. Thus, portable MRI is capable of extracting a multitude of information using one method, whereas multiple alternative laboratory methods would otherwise have to be used in combination. Finally, certain low-field devices (Casanova et al., 2011) have been designed with unilateral magnet shapes, making it possible to overcome limitations regarding sample size and shape. With innovative magnet shapes and the possibility to take measurements *in situ*, portable MRI stands as a promising method to characterize plant water dynamics.

V. References

- Ahmed MA, Zarebanadkouki M, Kaestner A, Carminati A** (2016) Measurements of water uptake of maize roots: the key function of lateral roots. *Plant Soil* 398: 59–77
- Ahmed MA, Zarebanadkouki M, Meunier F, Javaux M, Kaestner A, Carminati A** (2018) Root type matters: measurement of water uptake by seminal, crown, and lateral roots in maize. *Journal of Experimental Botany* 69: 1199–1206
- Baek S, Lim J, Lee JG, McCarthy MJ, Kim SM** (2020) Investigation of the Maturity Changes of Cherry Tomato Using Magnetic Resonance Imaging. *Applied Sciences* 10: 5188
- Bagnall GC, Altobelli SA, Conradi MS, Fabich HT, Fukushima E, Koonjoo N, Kuethe DO, Rooney WL, Stupic KF, Sveinsson B, et al** (2022) Design and demonstration of a low-field magnetic resonance imaging rhizotron for in-field imaging of energy sorghum roots. *The Plant Phenome Journal* 5: e20038

333 **Bagnall GC, Koonjoo N, Altobelli SA, Conradi MS, Fukushima E, Kuethe DO, Mullet JE,**
334 **Neely H, Rooney WL, Stupic KF, et al** (2020) Low-field magnetic resonance imaging of roots
335 in intact clayey and silty soils. *Geoderma* 370: 114356

336 **Blaser SRGA, Schlüter S, Vetterlein D** (2018) How much is too much?—Influence of X-ray
337 dose on root growth of faba bean (*Vicia faba*) and barley (*Hordeum vulgare*). *PLoS ONE* 13:
338 e0193669

339 **Cai G, Tötze C, Kaestner A, Ahmed MA** (2022) Quantification of root water uptake and
340 redistribution using neutron imaging: a review and future directions. *The Plant Journal*
341 tpj.15839

342 **Capitani D, Brilli F, Mannina L, Proietti N, Loreto F** (2009) In Situ Investigation of Leaf
343 Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol* 149: 1638–
344 1647

345 **Carminati A, Moradi AB, Vetterlein D, Vontobel P, Lehmann E, Weller U, Vogel H-J,**
346 **Oswald SE** (2010) Dynamics of soil water content in the rhizosphere. *Plant Soil* 332: 163–176

347 **Casanova F, Perlo J, Blümich B, eds** (2011) Single-Sided NMR. doi: 10.1007/978-3-642-
348 16307-4

349 **Cochard H, Badel E, Herbette S, Delzon S, Choat B, Jansen S** (2013) Methods for measuring
350 plant vulnerability to cavitation: a critical review. *Journal of Experimental Botany* 64: 4779–
351 4791

352 **Cochard H, Delzon S, Badel E** (2015) X-ray microtomography (micro-CT): a reference
353 technology for high-resolution quantification of xylem embolism in trees. *Plant, Cell &*
354 *Environment* 38: 201–206

355 **Daly KR, Tracy SR, Crout NMJ, Mairhofer S, Pridmore TP, Mooney SJ, Roose T** (2018)
356 Quantification of root water uptake in soil using X-ray computed tomography and image-based
357 modelling. *Plant, Cell & Environment* 41: 121–133

358 **De Roo L, Vergeynst L, De Baerdemaeker N, Steppe K** (2016) Acoustic Emissions to
359 Measure Drought-Induced Cavitation in Plants. *Applied Sciences* 6: 71

360 **De Schepper V, Bühler J, Thorpe M, Roeb G, Huber G, van Dusschoten D, Jahnke S,**
361 **Steppe K** (2013) 11C-PET imaging reveals transport dynamics and sectorial plasticity of oak
362 phloem after girdling. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2013.00200

363 **Doussan C, Garrigues E** (2019) Measuring and Imaging the Soil-root-water System with a
364 Light Transmission 2D Technique. *Bio-protocol* 9: e3190

365 **Doussan C, Pierret A, Garrigues E** (2006) Water uptake by plant roots: II – Modelling of
366 water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system –
367 Comparison with experiments. *Plant and Soil* 283: 99–117

368 **Esser HG, Carminati A, Vontobel P, Lehmann EH, Oswald SE** (2010) Neutron radiography
369 and tomography of water distribution in the root zone. *Z Pflanzenernähr Bodenk* 173: 757–764

370 **Fukuda K, Kawaguchi D, Aihara T, Ogasa MY, Miki NH, Haishi T, Umebayashi T** (2015)
371 Vulnerability to cavitation differs between current-year and older xylem: non-destructive
372 observation with a compact magnetic resonance imaging system of two deciduous diffuse-
373 porous species. *Plant, Cell & Environment* 38: 2508–2518

374 **Garrigues E, Doussan C, Pierret A** (2006) Water Uptake by Plant Roots: I – Formation and
375 Propagation of a Water Extraction Front in Mature Root Systems as Evidenced by 2D Light
376 Transmission Imaging. *Plant Soil* 283: 83–98

377 **Geya Y, Kimura T, Fujisaki H, Terada Y, Kose K, Haishi T, Gemma H, Sekozawa Y**
378 (2013) Longitudinal NMR parameter measurements of Japanese pear fruit during the growing
379 process using a mobile magnetic resonance imaging system. *Journal of Magnetic Resonance*
380 226: 45–51

381 **Green SR, Clothier BE** (1988) Water Use of Kiwifruit Vines and Apple Trees by the Heat-
382 Pulse Technique. *J Exp Bot* 39: 115–123

383 **Gruwel MLH** (2014) In Situ Magnetic Resonance Imaging of Plant Roots. *Vadose Zone*
384 *Journal* 13: 1–8

385 **Hills BP, Duce SL** (1990) The influence of chemical and diffusive exchange on water proton
386 transverse relaxation in plant tissues. *Magnetic Resonance Imaging* 8: 321–331

387 **Homan NM, Windt CW, Vergeldt FJ, Gerkema E, Van As H** (2007) 0.7 and 3 T MRI and
388 Sap Flow in Intact Trees: Xylem and Phloem in Action. *Appl Magn Reson* 32: 157–170

389 **Hubeau M, Steppe K** (2015) Plant-PET Scans: In Vivo Mapping of Xylem and Phloem
390 Functioning. *Trends in Plant Science* 20: 676–685

391 **Jones HG** (2007) Monitoring plant and soil water status: established and novel methods
392 revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*
393 58: 119–130

394 **Jones M, Aptaker PS, Cox J, Gardiner BA, McDonald PJ** (2012) A transportable magnetic
395 resonance imaging system for in situ measurements of living trees: The Tree Hugger. *Journal*
396 *of Magnetic Resonance* 218: 133–140

397 **Jung SY, Lee SJ, Park H** (2020) Investigation of water transport around the root for a plant
398 using X-ray imaging technique. *Measurement* 151: 107159

399 **Kimura T, Geya Y, Terada Y, Kose K, Haishi T, Gemma H, Sekozawa Y** (2011)
400 Development of a mobile magnetic resonance imaging system for outdoor tree measurements.
401 Review of Scientific Instruments 82: 053704

402 **Köckenberger W, Pope JM, Xia Y, Jeffrey KR, Komor E, Callaghan PT** (1997) A non-
403 invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear
404 magnetic resonance microimaging. Planta 201: 53–63

405 **Malone MW, Yoder J, Hunter JF, Espy MA, Dickman LT, Nelson RO, Vogel SC, Sandin**
406 **HJ, Sevanto S** (2016) In vivo Observation of Tree Drought Response with Low-Field NMR
407 and Neutron Imaging. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2016.00564

408 **Meixner M, Kochs J, Foerst P, Windt CW** (2021) An integrated magnetic resonance plant
409 imager for mobile use in greenhouse and field. Journal of Magnetic Resonance 323: 106879

410 **Meixner M, Tomasella M, Foerst P, Windt CW** (2020) A small-scale MRI scanner and
411 complementary imaging method to visualize and quantify xylem embolism formation. New
412 Phytol 226: 1517–1529

413 **Mooney SJ, Pridmore TP, Helliwell J, Bennett MJ** (2012) Developing X-ray Computed
414 Tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. Plant Soil 352: 1–
415 22

416 **Musse M, De Franceschi L, Cambert M, Sorin C, Le Caherec F, Burel A, Bouchereau A,**
417 **Mariette F, Leport L** (2013) Structural Changes in Senescing Oilseed Rape Leaves at Tissue
418 and Subcellular Levels Monitored by Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry through Water
419 Status. Plant Physiol 163: 392–406

420 **Musse M, Leport L, Cambert M, Debrandt W, Sorin C, Bouchereau A, Mariette F** (2017)
421 A mobile NMR lab for leaf phenotyping in the field. Plant Methods 13: 53

422 **Nagata A, Kose K, Terada Y** (2016) Development of an outdoor MRI system for measuring
423 flow in a living tree. Journal of Magnetic Resonance 265: 129–138

424 **Nuix M, Traoré AS, Blystone S, Bonny J-M, Falcimagne R, Pagès G, Picon-Cochard C**
425 (2021) Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by
426 Portable NMR. Plants 10: 782

427 **Palmer LJ, Palmer LT, Pritchard J, Graham RD, Stangoulis JC** (2013) Improved
428 techniques for measurement of nanolitre volumes of phloem exudate from aphid stylectomy.
429 Plant Methods 9: 18

430 **Pohlmeier A, Oros-Peusquens A, Javaux M, Menzel MI, Vanderborght J, Kaffanke J,**
431 **Romanzetti S, Lindenmair J, Vereecken H, Shah NJ** (2008) Changes in Soil Water Content

Resulting from Ricinus Root Uptake Monitored by Magnetic Resonance Imaging. *Vadose Zone Journal* 7: 1010–1017

Robert E, Schmitz N, Copini P, Gerkema E, Vergeldt F, Windt C, Beeckman H, Koedam N, Van As H (2014) Visualization of the stem water content of two genera with secondary phloem produced by successive cambia through Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Journal of Plant Hydraulics* e0006

Schulze E-D, Beck E, Buchmann N, Clemens S, Müller-Hohenstein K, Scherer-Lorenzen M (2019) Water Deficiency (Drought). In E-D Schulze, E Beck, N Buchmann, S Clemens, K Müller-Hohenstein, M Scherer-Lorenzen, eds, *Plant Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 165–202

Seeger S, Weiler M (2021) Temporal dynamics of tree xylem water isotopes: in situ monitoring and modeling. *Biogeosciences* 18: 4603–4627

Sidi-Boulénouar R, Cardoso M, Coillot C, Rousset S, Nativel E, Charbit A, Baptiste C, Alibert E, Gatineau F, Verdeil J-L, et al (2019) Multiscale NMR investigations of two anatomically contrasted genotypes of sorghum under watered conditions and during drought stress. *Magn Reson Chem* 57: 749–756

Sorin C, Mariette F, Musse M, Leport L, Cruz F, Yvin J-C (2018) Leaf Development Monitoring and Early Detection of Water Deficiency by Low Field Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in *Nicotiana tabacum* Plants. *Applied Sciences* 8: 943

Sorin C, Musse M, Mariette F, Bouchereau A, Leport L (2015) Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. *Planta* 241: 333–346

Tötzke C, Miranda T, Konrad W, Gout J, Kardjilov N, Dawson M, Manke I, Roth-Nebelsick A (2013) Visualization of embolism formation in the xylem of liana stems using neutron radiography. *Annals of Botany* 111: 723–730

Utsumi Y, Sano Y, Fujikawa S, Funada R, Ohtani J (1998) Visualization of Cavitated Vessels in Winter and Refilled Vessels in Spring in Diffuse-Porous Trees by Cryo-Scanning Electron Microscopy. *Plant Physiology* 117: 1463–1471

Van As H (2007) Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *Journal of Experimental Botany* 58: 743–756

Van As H, Scheenen T, Vergeldt FJ (2009) MRI of intact plants. *Photosynth Res* 102: 213–222

Varney GT, Canny MJ (1993) Rates of water uptake into the mature root system of maize plants. *New Phytologist* 123: 775–786

466 **Windt CW, Blümner P** (2015) A portable NMR sensor to measure dynamic changes in the
467 amount of water in living stems or fruit and its potential to measure sap flow. *Tree Physiology*
468 35: 366–375

469 **Windt CW, Soltner H, Dusschoten D van, Blümner P** (2011) A portable Halbach magnet that
470 can be opened and closed without force: The NMR-CUFF. *Journal of Magnetic Resonance* 208:
471 27–33

472 **Windt CW, Vergeldt FJ, De Jager PA, Van As H** (2006) MRI of long-distance water
473 transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar,
474 castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ* 29: 1715–1729

475 **Yoder J, Malone MW, Espy MA, Sevanto S** (2014) Low-field nuclear magnetic resonance
476 for the in vivo study of water content in trees. *Review of Scientific Instruments* 85: 095110

477 **Zarebanadkouki M, Ahmed M, Hedwig C, Benard P, Kostka SJ, Kastner A, Carminati**
478 **A** (2018) Rhizosphere hydrophobicity limits root water uptake after drying and subsequent
479 rewetting. *Plant Soil* 428: 265–277

480 **Zarebanadkouki M, Kim YX, Carminati A** (2013) Where do roots take up water? Neutron
481 radiography of water flow into the roots of transpiring plants growing in soil. *New Phytol* 199:
482 1034–1044

483 **Zarebanadkouki M, Trtik P, Hayat F, Carminati A, Kaestner A** (2019) Root water uptake
484 and its pathways across the root: quantification at the cellular scale. *Sci Rep* 9: 12979

485 **Zhang Q, Li Q, Zhang G** (2012) Rapid Determination of Leaf Water Content Using VIS/NIR
486 Spectroscopy Analysis with Wavelength Selection. *Spectroscopy: An International Journal* 27:
487 93–105

I.3.4.2 Choix de l'aimant à bas champ magnétique utilisé dans le cadre de la thèse

Différents dispositifs RMN à bas champ magnétique ont été développés pour l'étude des végétaux. Le **Tableau 3** ci-dessous regroupe les principales caractéristiques de certains d'entre eux.

Tableau 3. Caractéristiques d'aimants à bas champ magnétique ayant été conçus pour une application à destination des végétaux (liste non exhaustive).

Nom	Champ B_0 (T)	Diamètre interne (mm)	Homogénéité B_0 ($\Delta B/B_0$, ppm)	Références
-	0.72	50		(Windt et al., 2006)
-	0.3	20	60 ppm sur un volume sphérique de 30 mm de diamètre	(Kimura et al., 2011)
NMR-CUFF	0.57		200 ppm (<50 ppm après shim) sur un volume sphérique de 5 mm de diamètre	(Windt et al., 2011)
Tree Hugger	0.025	<140	2000 ppm sur un volume sphérique de 140 mm de diamètre	(Jones et al., 2012)
-	0.2	160	34.6 ppm dans un volume ellipsoïdal de 20 cm x 20 cm x 12 cm	(Nagata et al., 2016)
-	0.25	15		(Meixner et al., 2020)



Figure 25. Visualisation de différents dispositifs à bas champ magnétique mentionnés dans le tableau précédent. De la gauche vers la droite : le NMR CUFF (Windt et al., 2011), le dispositif utilisé par Kimura *et al.* (2011), le Tree Hugger (Jones et al., 2012) et le dispositif utilisé par Nagata *et al.* (2016).

Ces dispositifs ont permis l'étude de la structure et des flux dans les plantes, principalement sur les arbres et les organes étudiés étaient des organes aériens. Par ailleurs, ces dispositifs ont été développés pour les études dans lesquelles ils ont été utilisés. Ils ne sont pas commercialisés et ne sont donc pas généralisables à l'ensemble de la communauté.

Le **Tableau 4** recense les dispositifs à bas champ magnétique commercialisés considérés par la plateforme au moment de l'acquisition (2017) d'un aimant à bas champ

magnétique afin d'étudier à terme les plantes à l'extérieur du laboratoire. Il apparaît que le NMR-MOUSE permet de s'affranchir de la limite de la taille de l'échantillon et de la problématique de l'introduction de la plante dans l'aimant, celui-ci étant un aimant unilatéral tandis que les autres sont des dispositifs avec une ouverture de diamètre limité.

Tableau 4. Caractéristiques des aimants à bas champ magnétiques considérés par la plateforme pour l'étude des végétaux à l'extérieur du laboratoire.

Nom	Champ B_0 (T)	Diamètre interne (mm)	Homogénéité B_0 (ppm)	Constructeur
NMR Permanent Magnet	Entre 0.39 et 0.51	Entre 20 et 30	100 ppm	Spincore (https://www.spincore.com/products/Magnets/ , dernière consultation le 04/01/2023)
SLK-MRI- 1400	Entre 0.21 et 0.30	Entre 25 et 102		Spinlock (https://www.spinlock.com.ar/slk-mri-1400-en/ , dernière consultation le 04/01/2023)
Terranova- MRI	Terrestre	<75		Magritek (https://ugc-inno-nehu.com/Terranova-MRI.pdf , dernière consultation le 04/01/2023)
NMR- MOUSE	Entre 0.3 et 0.71	NA		Magritek (https://magritek.com/products/nmr-mouse/ , dernière consultation le 04/01/2023)

I.3.4.3 Caractéristiques du NMR-MOUSE Profile PM25

Le NMR-MOUSE pour Nuclear Magnetic Resonance Mobile Universal Surface Explorer est un appareil bas champ unilatéral (0.3 T) commercialisé par Magritek (Wellington, NZ). Ce dispositif est constitué d'une plateforme en fer sur laquelle sont positionnés quatre aimants permanents en néodyme (NdFeB). La polarisation de ces aimants permet la production d'un champ magnétique statique B_0 au-dessus des aimants, parallèle à la surface du capteur (Eidmann et al., 1996; Blümich et al., 1998). Grâce à sa forte perméabilité magnétique, la plateforme en fer sert de guide pour les lignes de champ créant ainsi une incrémentation de la force du champ magnétique (**Figure 26**) (Casanova et al., 2011), soit un gradient B_0 de $\sim 7.5 \text{ T m}^{-1}$ dans notre cas. Par l'optimisation de la disposition des blocs aimants, un champ B_0 constant de 0.3 T est situé à une distance donnée (25 mm pour la version PM25 du NMR-MOUSE). Une antenne RF opérant dans le cas de l'hydrogène à 13.23 MHz est positionnée entre les quatre blocs et permet la production d'un champ magnétique B_1 perpendiculaire au champ B_0 . L'antenne utilisée ici est une antenne $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ et les coupes sont généralement de $100 \text{ }\mu\text{m}$

d'épaisseur. Aussi, le volume sensible dans lequel s'effectue les mesures RMN est de $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm} \times 100 \text{ }\mu\text{m}$, soit 0.16 cm^3 .

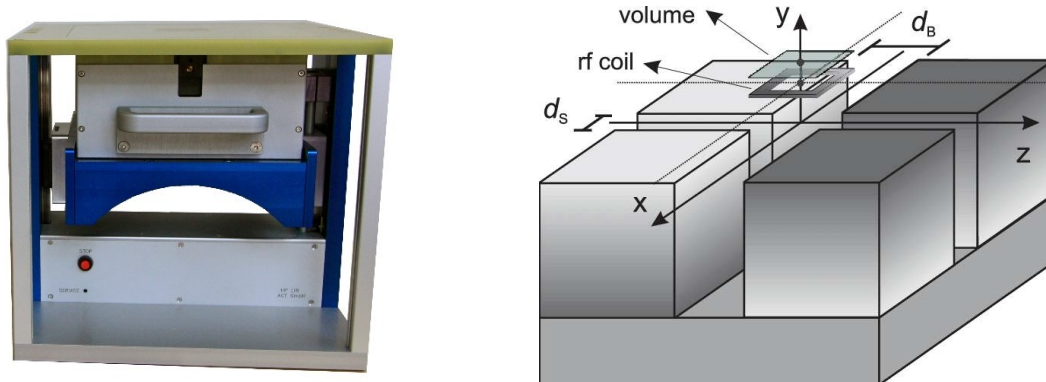


Figure 26. Visualisation à gauche du Profile NMR-MOUSE et à droite du schéma décrivant la composition du dispositif (Rata et al., 2006).

Le Profile NMR-MOUSE permet le profilage d'un échantillon en réalisant des mesures en fonction de la profondeur. Alors que les premières procédures pour obtenir un profil était de modifier la fréquence pour balayer l'échantillon, il est préférable d'utiliser un ascenseur de précision dont la résolution est de quelques dizaines de μm (**Figure 27**). Cela permet de déplacer l'aimant, et donc le volume sensible au sein de l'échantillon sans modifier la fréquence de résonance (Perlo et al., 2005; Casanova et al., 2011). Une antenne de gradient de champ magnétique peut être ajoutée afin de réaliser des mesures de flux dans l'échantillon étudié.

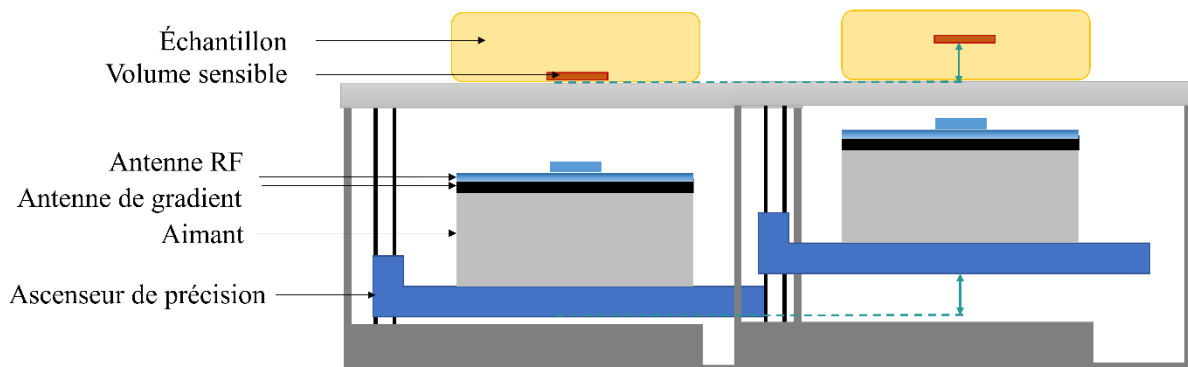


Figure 27. Schéma de l'obtention du profil d'un échantillon grâce à la présence d'un ascenseur de précision qui permet de déplacer l'aimant ainsi que l'antenne RF, et donc le volume sensible au sein de l'échantillon. Une antenne de gradient de champ magnétique permet de réaliser des mesures de flux dans l'échantillon.

I.4. Objectifs de la thèse

Dans cette partie introductive, j'ai démontré l'intérêt de pouvoir mesurer de manière non invasive et non destructive des informations liées à la quantité et à la mobilité de l'eau dans les racines. Pour ce faire, il apparaît que la RMN est une méthode de choix. Cependant, pour

pouvoir amener l'instrument de mesure sur le terrain, il est indispensable de le rendre transportable.

Le but de ma thèse est donc d'évaluer l'intérêt d'utiliser une IRM transportable, à bas champ magnétique, pour étudier l'eau dans les racines. Pour cela, j'avais trois objectifs principaux :

- (i) Apporter la preuve de concept que l'IRM portable, avec le NMR-MOUSE, permet de caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales (Chapitre 3) ;
- (ii) Déterminer si le NMR-MOUSE peut fournir des marqueurs de la relation structure-fonction dans l'utilisation de l'eau par les plantes (Chapitre 4) ;
- (iii) Caractériser la sensibilité de l'IRM portable et étudier l'évolution des paramètres RMN lorsque les plantes sont soumises à un stress hydrique (Chapitre 5).

Chapitre II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Espèces cultivées

Dix espèces prairiales recouvrant différents types de plantes herbacées ont été cultivées en monoculture dans le cadre de la thèse. Celles-ci correspondent (i) aux monocotylédones *Dactylis glomerata* et *Festuca arundinacea*, (ii) aux dicotylédones non fixatrices d'azote *Plantago lanceolata*, *Rumex acetosa*, *Taraxacum officinale* et (iii) aux dicotylédones fixatrices d'azote (légumineuses) *Lupinus angustifolius*, *Medicago sativa*, *Onobrychis viciifolia*, *Trifolium pratense* et *Trifolium repens*.

Dactylis glomerata et *Festuca arundinacea* sont deux graminées tolérantes à la sécheresse (Rognli et al., 2010; Sanada et al., 2010; Holloway-Phillips and Brodribb, 2011). Elles sont caractérisées par un système racinaire fasciculé ainsi qu'une densité racinaire et une profondeur d'enracinement élevées (Zwicke et al., 2015).

Le système racinaire de *Plantago lanceolata* est caractérisé par de nombreuses racines fibreuses en surface et un enracinement en profondeur dans le sol grâce à des racines pivotantes (Pol et al., 2021). Espèce anisohydrique (Van den Berge et al., 2014; Van De Velde et al., 2015), *P. lanceolata* se caractérise par une croissance rapide (Pol et al., 2021). *Rumex acetosa* et *Taraxacum officinale* sont des espèces tolérantes à la sécheresse ayant un pivot racinaire (Houssard et al., 1992; Stewart-Wade et al., 2002; Molina-Montenegro et al., 2018). *R. acetosa* présente une transpiration et une consommation d'eau du sol faibles (Houssard et al., 1992). *T. officinale* se caractérise par une stratégie dite Jack-and-Master. Celle-ci signifie que cette espèce est capable de survivre et de maintenir sa biomasse dans des conditions défavorables mais aussi d'augmenter sa valeur adaptative, c'est-à-dire sa capacité à se reproduire, dans des conditions favorables (Molina-Montenegro et al., 2018).

Lupinus angustifolius est une espèce caractérisée par un système racinaire s'organisant autour d'un pivot avec de nombreuses racines latérales primaires et peu de secondaires concentrées principalement en surface (Clements et al., 1993). Il s'agit d'une espèce sensible à la sécheresse qui présente une diminution marquée de la conductance stomatique avant même que le potentiel hydrique foliaire ne diminue (Turner and Henson, 1989; Palta et al., 2007). *L. angustifolius* se caractérise par une stratégie d'échappement à la sécheresse qui se traduit par un stade reproductif précoce par rapport à des conditions optimales d'irrigation (Palta et al., 2007; Matesanz et al., 2020). *Trifolium repens* et *Trifolium pratense* sont des espèces réputées

pour être sensibles à la sécheresse (Dodd and Orr, 1995; Signarbieux and Feller, 2012). Espèces à croissance rapide (Dodd and Orr, 1995), elles présentent en période de stress hydrique une faible réduction de la transpiration et un faible ajustement de la conductance stomatique. La perte des feuilles entraîne alors la réduction de la transpiration. En raison de son système racinaire superficiel, *T. repens* est plus sensible à la sécheresse que *T. pratense* qui présente un ancrage racinaire profond avec un pivot racinaire (Haughey et al., 2020). *Medicago sativa* se caractérise par un enracinement profond pivotant et une stratégie d'évitement du stress hydrique (Luo et al., 2020; Norton et al., 2021). Ainsi, cette espèce présente une accumulation de la biomasse souterraine avec le développement de racines latérales qui lui permet d'augmenter le volume de sol exploité malgré la diminution de la transpiration (Luo et al., 2020; Norton et al., 2021). *Onobrychis viciifolia* est une espèce tolérante à la sécheresse caractérisée par un système racinaire pivotant. Celui-ci lui permet un accès à l'eau présente dans les couches profondes du sol (Mora-Ortiz and Smith, 2018). La fermeture rapide de ses stomates en présence d'un déficit hydrique lui permet de conserver l'eau (Huang et al., 2020).

II.1.2. Modèle de rhizotron et chambre climatique

II.1.2.1. Mise en place des monocultures

Chaque espèce a été cultivée en monoculture dans un modèle de rhizotron avec toile afin de séparer physiquement le système racinaire du sol tout en permettant le transfert de l'eau et des nutriments. Ce modèle est constitué d'un contenant en PVC de 95 cm × 40 cm × 5 cm dont une des faces correspond à une plaque transparente en Plexiglass. À l'intérieur, une toile en nylon polyamide de 60 µm d'épaisseur avec des pores de 30 µm de diamètre et une ouverture de 20% est tendue et permet d'obtenir deux espaces distincts, le compartiment « racines » et le compartiment « sol » (**Figure 28**).



Figure 28. Visualisation de l'organisation du rhizotron. 1. Plaque transparente, 2. Toile, 3. Contenant. Le compartiment « racines » est situé entre la plaque transparente et la toile (entre 1 et 2) et le compartiment « sol » dans l'espace restant (entre 2 et 3).

Afin de pouvoir positionner le NMR-MOUSE directement sur la plaque transparente, sans espace entre les deux surfaces, celle-ci a été fraisée à l'endroit où sont positionnées les vis, et des vis à têtes plates ont été utilisées pour visser la plaque transparente au contenant.

Dans chaque rhizotron, 800 g de pouzzolane ont été placés au fond du compartiment « sol » et des trous ont été percés en amont afin de permettre le drainage de l'eau. Du sol provenant d'une prairie de moyenne montagne (Theix, 900 m), tamisé à 7 mm ($\text{pH} \cong 6.5$) et composé de 12% d'argile, 17% de limon, 59% de sable et 13% de matière organique, a été utilisé pour les rhizotrons accueillant la majorité des espèces à l'exception de celui destiné au sainfoin (*O. viciifolia*). Celui-ci a été rempli avec un mélange (60/40) du sol de Theix avec du sol de Limagne (sol de plaine argileuse) au pH plus neutre, le sainfoin grandissant préférentiellement dans des sols au pH supérieur à 6.5 (Mora-Ortiz and Smith, 2018). De l'engrais retard sous forme de granules (NPK 14-7-14, Multicote 12, Haïfa, Israël) a été ajouté aux deux types de sol avant leur mise en place dans les rhizotrons avec une concentration finale de 5 g L^{-1} . Des sondes d'humidité du sol ont été positionnées dans le compartiment « sol » avant la mise en place des plantes dans les rhizotrons (cf. **II.2.2. Humidité du sol**).

Après avoir sélectionné et sorti la plante de son contenant (**Figure 29.1**), son système racinaire a été rincé afin d'enlever le sol (**Figure 29.2**). La plante a ensuite été positionnée dans le rhizotron, dans le compartiment « racines ». Une fois cela effectué, les racines et le sol ont été arrosés (**Figure 29.4**) et un film plastique opaque a été placé sur la plaque transparente afin de protéger les racines de la lumière (**Figure 29.5**). Si la plante avait une taille importante comme par exemple *R. acetosa* ci-contre, la plaque transparente était dévissée et un peu de sol était retiré. La toile était ensuite remise en place, la plante positionnée dans l'espace créé et la plaque transparente était finalement revissée (**Figure 29.3**).



Figure 29. Étapes de la mise en place d'une plante entière dans un rhizotron, exemple de *R. acetosa*.



Figure 30. Exemple de plantes une fois positionnées dans les rhizotrons : 1) *R. acetosa*, 2) *D. glomerata*, 3) *F. arundinacea*, 4) *T. repens* et 5) *P. lanceolata*.

I.1.2.2. Dans la chambre climatique

Avant les expérimentations, les rhizotrons ont été placés à l'extérieur et arrosés régulièrement. Ils ont ensuite été positionnés au moment des expériences dans une chambre climatique. Les conditions environnementales ont été enregistrées toutes les 30 secondes (CR6-Wifi, Campbell Scientific Ltd., Loughborough, UK) et moyennées sur 5 minutes pour la luminosité ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, PAR, JYP1000, SDEC, Reignac sur Indre, France) et la concentration en CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$, CARBOCAP, GMP343, Vaisala, Finlande). La température ($^{\circ}\text{C}$) et l'humidité relative de l'air (%) ont été enregistrées toutes les 10 minutes avec un enregistreur HOBO (ONSET, Bourne, MA, USA). Un cycle jour/nuit a été instauré avec une photopériode de 14 heures et une thermopériode de 21°C le jour et 18°C la nuit.

Dans le cas des chapitres 3 et 4, l'eau a été apportée en quantité suffisante pour maintenir les plantes dans de bonnes conditions d'hydratation. La fréquence et la quantité d'eau apportée ont été adaptées à chaque espèce. Dans le cas du chapitre 5, les conditions hydriques ont été identiques quelle que soit l'espèce testée. 250 mL d'eau ont ainsi été apportés deux fois par jour, le matin et le soir, durant la période d'hydratation. À l'issue de cette période, les arrosages ont cessé pendant 26 jours puis les plantes ont été réhydratées en apportant 200 mL d'eau trois fois par jour pendant trois jours.

II.2. Capteurs pour étudier les plantes

II.2.1. RMN

La version Profile PM25 du NMR-MOUSE (Magritek, Wellington, NZ) a été utilisée. Il s'agit d'un aimant unilatéral de 0.3 T couplé à une antenne RF de surface de taille 4 cm × 4 cm. Les principales mesures effectuées étaient des profils (intensité du signal RMN en fonction de la profondeur par pas de 100 µm) et des mesures de T_2 à une position donnée. Ces mesures ont été systématiquement acquises avec la séquence CPMG dont le temps d'écho correspondait au temps d'écho minimum (100 µs). Plus de détails sur les paramètres de mesures RMN sont présents dans les matériels et méthodes des articles qui composent les chapitres expérimentaux (Chapitres 3, 4 et 5).

II.2.2. Humidité du sol

L'humidité du sol (SWC, %, m³ m⁻³) a été mesurée toutes les quinze minutes à l'aide de sondes EC-5 (Meter Group, Pullman, WA, USA) (**Figure 31**). Elles ont été positionnées au moment du montage des rhizotrons horizontalement à 16 cm et à 61 cm à partir du haut des rhizotrons et ont été connectées à un système d'acquisition des données (EM50, Meter Group, Pullman, WA, USA). Ces sondes mesurent la constante diélectrique du sol par le biais de la capacitance (C) en déterminant le temps de charge d'un condensateur qui utilise le sol comme diélectrique pour atteindre une charge V en réponse à un échelon de fréquence de 70 MHz (Bogena et al., 2007). La capacité d'un condensateur est liée à sa géométrie et à la constante diélectrique du milieu, ici du sol. Celle-ci peut donc être déterminée. La constante diélectrique de l'eau (~80) étant très grande devant celle de l'air et des autres constituants du sol (<5), il existe une relation forte entre la constante diélectrique du sol et sa teneur en eau. Par ailleurs, la fréquence de 70 MHz permet de minimiser les effets de la salinité et de la texture du sol sur la mesure (Kizito et al., 2008).



Figure 31. Photographies du capteur EC-5 (https://www.hoskin.qc.ca/catalog/index.php?main_page=product_info&cPath=1_61_156&products_id=306, dernière consultation le 09/01/2023) et de celui-ci inséré dans le sol (photographie prise au moment du prélèvement des racines à la fin des expériences).

II.2.3. Psychromètres

Le potentiel hydrique foliaire (LWP, MPa) a été mesuré à l'aide d'un psychromètre à point de rosée (PSY1-Stem, ICT International, Armidale, Australie) (**Figure 32**). Celui-ci est composé d'une chambre en laiton chromé qui permet de dissiper la chaleur pour assurer une stabilité thermique pendant la mesure. Deux thermocouples en constantan-chromel (chrome et nickel) sont présents dans cette chambre, l'un qui mesure la température de l'air (C) et l'autre au contact de l'échantillon (S). La différence de température entre ces deux thermocouples est mesurée afin de pouvoir corriger l'influence de ce gradient de température sur la mesure du potentiel hydrique. Un thermocouple en constantan-cuivre est également présent dans la chambre de mesure afin de relever la température de l'instrument et corriger la mesure pour la ramener à une mesure acquise à 25°C. Un courant est généré pour induire un effet Peltier au niveau du thermocouple C où l'eau va condenser. Six secondes après la fin du refroidissement, la température à laquelle l'eau condensée sur le thermocouple C s'évapore est lue et corrigée. Elle est ensuite convertie en potentiel hydrique grâce à la droite d'étalonnage issue de la calibration de l'instrument.



Figure 32. Photographies du psychromètre PSY1 positionné sur une feuille de *T. repens* à gauche et de la chambre du psychromètre avec visualisation des thermocouples C et S (flèches blanches) à droite (adaptée de <https://ictinternational.com/products/psyl/psyl-stem-psychrometer/>, dernière consultation le 09/01/2023).

Afin de faciliter les échanges entre la feuille et la chambre de mesure, les cuticules ont été enlevées par frottement avec de la poudre de carbone. Les mesures de potentiel hydrique foliaire ont été acquises toutes les quinze minutes sur une à trois feuilles selon les espèces et les valeurs obtenues ont été moyennées.

II.2.4. Poromètres

La conductance stomatique (G_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a été mesurée avec un poromètre AP4 (Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK) dans le cas des chapitres 3 et 4, et un poromètre/fluorimètre Li-600 (Licor, Lincoln, NE, USA) dans le cas du chapitre 5. Les mesures ont été effectuées sur trois feuilles par espèce, trois fois par jour, le matin, en début d'après-midi et en début de soirée (environ 9:00/10:00 ; 13:00/14:00 ; 17:00).

Dans le cas des chapitres 3 et 4, la conductance stomatique a été mesurée sur la face abaxiale des feuilles. L'AP4 permet de remonter à la conductance stomatique en mesurant le temps nécessaire à la feuille pour entraîner une variation fixe de l'humidité relative de l'air dans la chambre de mesure du poromètre. Cette valeur est comparée ensuite aux valeurs issues de la calibration effectuée en amont de la mesure qui relie ce temps à la résistance stomatique.

Dans le cas du chapitre 5, en raison de différence de densité stomatique selon les faces des feuilles, la conductance stomatique a été mesurée sur les faces abaxiales et adaxiales des feuilles. La conductance stomatique est calculée à partir de la transpiration mesurée dans la cuvette de mesure du Li-600. La transpiration correspond à la différence d'eau présente dans le flux de vapeur circulant entre l'extérieur et la feuille. Une moyenne de ces conductances a été effectuée pour obtenir une conductance moyenne.

II.3. Mesures des traits morphologiques

II.3.1. Traits foliaires

La surface foliaire totale (LA, cm^2) a été mesurée sur la totalité des feuilles vertes des plantes grâce à un planimètre (Li-3100, Licor, Lincoln, NE, USA). La surface spécifique foliaire (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a été calculée à partir des mesures de surface foliaire de trois feuilles saines et de leur masse sèche. La densité stomatique (stomates mm^{-2}) a été mesurée sur chaque plante grâce à la méthode des empreintes stomatiques sur trois feuilles vertes, côté abaxial et adaxial. Un mélange de solutions de silicone Wirosil a été effectué (Wirosil 1, Wirosil 2, 50/50, BEGO GmbH & Co. KG, Bremen, Allemagne) et appliqué sur les faces des feuilles sélectionnées. Après séchage, le mélange a été prélevé à l'aide d'une pince à épiler puis mis sur un support plat. Du vernis transparent a ensuite été posé sur les empreintes. Une fois le vernis sec, les empreintes ont été prélevées avec du scotch et placées sur une lame de verre pour être observées au microscope (Zeiss Axio Scope A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH., Jéna, Allemagne) avec deux grossissements, $\times 16$ ou $\times 40$ selon la taille des stomates (**Figure 33**). Les clichés obtenus ont été capturés puis analysés grâce au logiciel ZEN 2 Lite (Carl Zeiss Microscopy GmbH., Jéna, Allemagne).

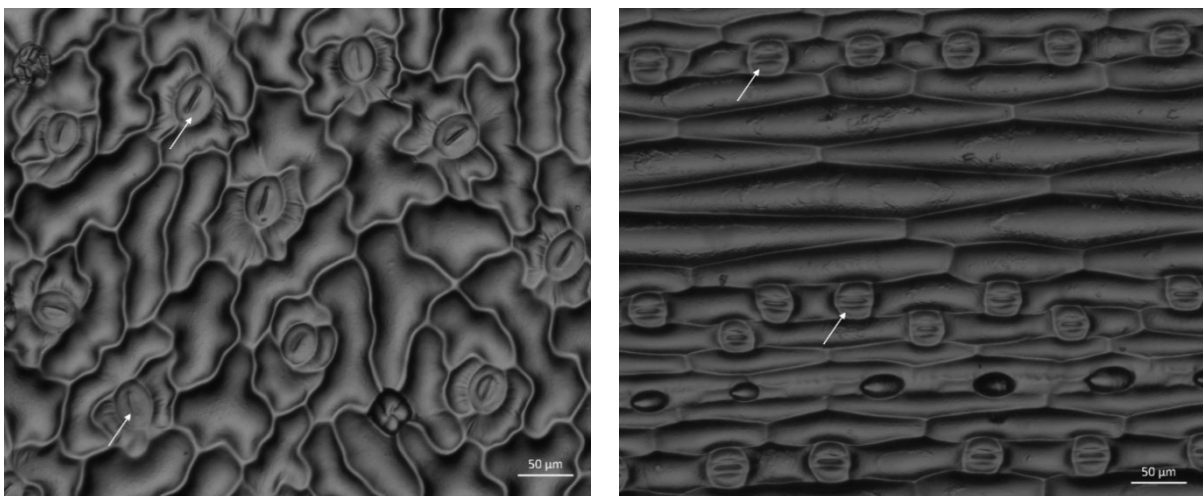


Figure 33. Exemple d'images microscopiques de stomates ($\times 16$) de *R. acetosa* (face abaxiale) à gauche et de *D. glomerata* (face abaxiale) à droite. Les flèches blanches pointent vers des stomates.

II.3.2. Traits racinaires

À la fin des expériences, les racines ont été prélevées par strates de 20 cm (de 0 à 20 cm, de 20 à 40 cm, de 40 cm à 60 cm et de 60 cm à la fin du rhizotron). Au niveau de la strate 0-20 cm, les racines présentes dans la fenêtre de mesure RMN ont été séparées des autres, lavées puis congelées à -18°C . La teneur en eau moyenne des racines (RWC, g g^{-1}) a été calculée sur les quatre strates et le prélèvement RMN selon l'équation 3 (**page 39**). Pour cela, la masse

fraîche (m_{frais} , g) et la masse sèche (m_{sec} , g) de ces racines ont été mesurées. La masse sèche a été pesée après séchage des racines dans une étuve pendant 48 heures à 60°C.

Les traits morphologiques ont été mesurés sur les racines présentes dans la fenêtre de mesure RMN après décongélation à température ambiante. Afin d'améliorer le contraste, elles ont été teintées avec du bleu de méthylène (5 g L^{-1}) pendant au moins 15 minutes à température ambiante. Elles ont ensuite été rincées puis séparées en grosses (diamètre supérieur à 1 mm) et en fines racines, placées dans une cuve remplie d'eau puis étalées pour les séparer. Un film transparent a été positionné sur les racines afin de les stabiliser et éviter qu'elles sèchent pendant le scan. Le surplus d'eau dans la cuve a été aspiré avec une seringue. Les racines ont été scannées (EPSON perfection V700; Seiko Epson Corp., Suwa, Japon) avec une résolution de 800 dpi. Pour chaque espèce, 6 à 10 images ont été enregistrées et analysées par le logiciel WinRhizoPRO (V2012b, Régent Instruments, Québec, Canada) afin de déterminer la longueur racinaire (m), le diamètre moyen (mm) et le volume racinaire (cm^3) par classe de diamètre des racines. Enfin, les racines de chaque scan ont été prélevées, séchées (48h à 60°C) puis pesées pour déterminer leur masse sèche.

II.4. Traitements des données

II.4.1. Décalage des profils

Le NMR-MOUSE étant constitué d'un aimant permanent, l'intensité de son champ magnétique dépend de sa température. La position de mesure dépendant du gradient de champ magnétique, celle-ci varie en fonction de la température de l'aimant. Il a été montré que cette variation est de l'ordre de $50 \text{ } \mu\text{m } ^\circ\text{C}^{-1}$ (Traoré et al., 2019). Afin d'être sûr de ne prendre en compte que des profondeurs de la zone racine et de ne pas être biaisé par les variations de température de l'aimant qui peuvent décaler la position de la mesure, des points de part et d'autre de la zone racine n'ont pas été retenus dans les analyses. Par exemple, dans le cas des expériences menées dans le cadre de la thèse, un delta de température extérieure de 3°C a été appliqué. Un delta de $150 \text{ } \mu\text{m}$ étant attendu et la résolution de la profondeur de mesure étant de $100 \text{ } \mu\text{m}$, deux à trois profondeurs de part et d'autre de la zone racine n'ont pas été prises en compte dans le traitement des données des profils.

II.4.2. Analyse des T_2

De fortes oscillations en début de décroissances sont présentes sur les signaux mesurés avec le NMR-MOUSE (**Figure 34.A**). Ces oscillations sont dues aux inhomogénéités des

champs magnétiques $\mathbf{B}_0$ et $\mathbf{B}_1$ qui entraînent une distribution nette des fréquences de précession. Ainsi, lorsqu'une impulsion RF est appliquée, une partie de l'aimantation est basculée dans le plan transversal tandis qu'une autre partie demeure sur le plan longitudinal. À l'impulsion suivante, l'aimantation qui était présente sur le plan longitudinal s'ajoute à l'aimantation présente sur le plan transversal expliquant la plus haute amplitude du deuxième écho (écho stimulé) par rapport au premier écho. Au fur et à mesure de la séquence CPMG utilisée pour acquérir les signaux RMN, la moyenne des fréquences de précession tend à devenir nulle. Ainsi la contribution des inhomogénéités des champs magnétiques diminuent de sorte que les oscillations s'estompent (Casanova et al., 2011).

II.4.2.1. Décroissances longues (2048 échos, Chapitres 3 et 4)

Afin de limiter l'influence du bruit et des oscillations présentes en début des décroissances, celles-ci ont été filtrées avec la suppression des neuf premiers échos et des échos suivants le premier écho dont l'amplitude est négative (**Figure 34.B**). La méthode NNLS (Non Negative Least Square) a ensuite été employée pour analyser les T_2 . Dans des systèmes complexes tels que des tissus biologiques, le signal peut être décomposé en une somme d'exponentielles et exprimé comme suit :

$$S(t_i) = \sum_{j=1}^M A_j e^{-t_i/T_{2j}} \quad i = 1, 2, \dots, N \quad [16]$$

avec t_i le temps de mesure, N le nombre total d'échos, M le nombre d'exponentielles composant le signal, A_j l'amplitude de l'exponentielle ayant pour T_2 , T_{2j} (Whittall and MacKay, 1989).

L'algorithme NNLS permet une analyse sans a priori sur le nombre d'exponentielles présentes dans le signal RMN en imposant une contrainte de positivité des amplitudes A_j . Une base comprenant un T_2 minimum, un T_2 maximum et un nombre suffisamment grand (entre 100 et 200) de T_2 possibles doit être fournie pour l'analyse. Ici, la base correspondait à 150 T_2 espacés logarithmiquement de 3 ms à 1000 ms. Le modèle retenu correspond aux couples A_j/T_{2j} qui minimisent l'écart entre le modèle et la décroissance acquise y_i .

$$\sum_{i=1}^N \left| \sum_{j=1}^M A_j e^{-t_i/T_{2j}} - y_i \right|^2 \quad [17]$$

Pour obtenir un modèle plus réaliste de la distribution des T_2 de l'eau dans les tissus biologiques qui présente un spectre continu et rendre la solution NNLS plus robuste, un

paramètre de régularisation dont la valeur était comprise entre 1.0025 et 1.0030 a été appliqué (Whittall and MacKay, 1989; Bjarnason et al., 2010).

Une à quatre composantes T_2 ont été obtenues suivant les décroissances. Dans le cas où une composante était trouvée, un ajustement mono-exponentiel était effectué sur la décroissance filtrée. Dans les autres cas, les valeurs de T_2 ainsi que leurs amplitudes étaient étudiées. Des valeurs très élevées (4 à 8 fois supérieures aux valeurs moyennes de T_2 long) mais présentant des amplitudes très faibles (10 fois inférieures aux amplitudes des autres T_2) étaient supprimées. Des valeurs proches étaient moyennées afin d'obtenir à la fin deux valeurs de T_2 , l'un court, de l'ordre de l'unité (<10 ms), et l'autre long, de l'ordre de dizaines de millisecondes, l'hypothèse de travail retenue étant qu'il y a deux fractions principales d'eau dans les racines, une eau « liée » caractérisée par un T_2 court et une eau mobilisable/libre caractérisée par un T_2 long.

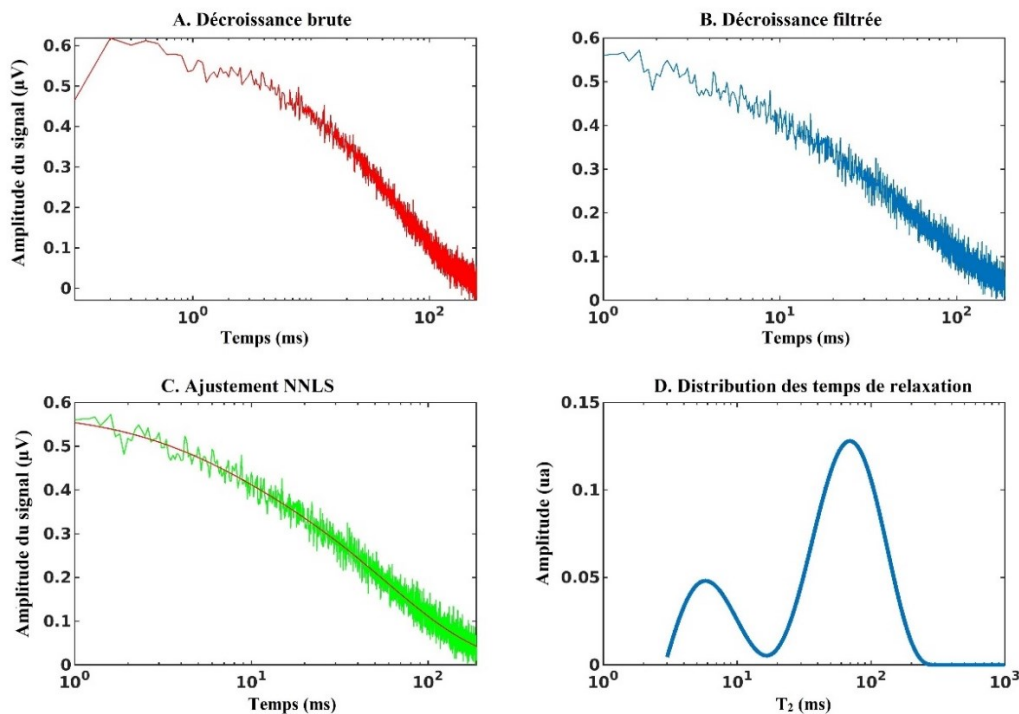


Figure 34. Étapes de l'analyse NNLS. A. Décroissance transversale complète. B. Décroissance filtrée. C. Ajustement NNLS (rouge) superposé à la décroissance filtrée (vert). D. Distribution des T_2 obtenus à la suite de l'analyse NNLS.

II.4.2.2. Décroissances courtes (256 échos, Chapitre 5)

En raison de l'application d'un stress hydrique sur les plantes dans le chapitre 5, et donc d'un faible signal RMN, les T_2 ont, dans ce chapitre, été mesurés à partir des décroissances profils, sur 256 échos. Afin de pouvoir observer l'évolution des T_2 , cette analyse a été effectuée sur les décroissances acquises à chaque profondeur pour construire les profils quelle que soit la

condition hydrique. Afin de favoriser le rapport signal sur bruit, les cinq décroissances correspondant aux cinq profondeurs autour de la profondeur présentant le maximum de signal ont été moyennées. La décroissance moyenne obtenue a été filtrée en supprimant les deux premiers échos et en appliquant un filtre rloess. Celui-ci correspond à un ajustement local, un point de la courbe étant prédit par rapport à ses voisins, les plus proches étant plus pondérés. Un polynôme est ensuite appliqué pour ajuster les nouveaux points prédits. Cette régression des décroissances a été effectuée sous Matlab avec un filtre rloess et une fenêtre de voisinage de 0.2, soit 20% des points. Ce filtre a été utilisé car cela facilitait l'analyse (stabilité des résultats) sans dénaturer les résultats obtenus (en période de conditions hydriques non limitantes, le T_2 moyen obtenu était proche de celui que l'on pouvait calculer à partir des fractions et des valeurs des T_2 courts et longs obtenus dans les chapitres 3 et 4). Les T_2 et leurs amplitudes ont ensuite été obtenus par application d'un ajustement mono-exponentiel. Afin d'améliorer le contraste entre les différentes conditions hydriques, la valeur du T_2 a été pondérée par l'amplitude du signal (AT_2) (Meixner et al., 2020).

II.4.3. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés comme étant la moyenne plus ou moins l'écart type. Des corrélations (significativité pour p-value inférieur à 0.05) ainsi qu'une analyse par composantes principales (ACP, Chapitre 4) ont été effectuées afin de rechercher et d'analyser les relations existant entre les paramètres RMN et les traits écophysiologiques et morphologiques. Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R (R.4.2.1 software, R Core Team, 2022) et notamment des packages Hmisc pour les corrélations et FactoMineR pour l'ACP.

Chapitre III. Preuve de concept de la faisabilité de l'IRM portable pour l'étude des systèmes racinaires

Le corps de ce chapitre correspond à l'article « *Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by Portable NMR* » paru dans le journal *Plants* en avril 2021 (DOI : [10.3390/plants10040782](https://doi.org/10.3390/plants10040782)).

Résumé de l'article :

L'état hydrique des racines, organes souterrains prélevant notamment l'eau du sol avant que celle-ci ne soit transférée via le xylème aux autres organes de la plante, est couramment estimé de manière indirecte ou destructive. La RMN, non invasive et sensible aux noyaux d'hydrogène, est une technique de choix pour étudier la quantité et la dynamique de l'eau présente dans les plantes. Pour pouvoir à moyen terme réaliser ces mesures dans l'environnement naturel des plantes, la RMN portable doit être utilisée. Or, jusqu'à présent, peu d'études utilisant cette technique ont été menées sur des racines. L'objectif ici a donc été d'apporter la preuve de faisabilité de cette méthode pour caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales. Pour cela, des profils et des mesures de relaxation transversale ont été acquis avec le NMR-MOUSE sur trois plantes prairiales contrastées cultivées en rhizotron. En parallèle, des mesures écophysiologiques de potentiel hydrique foliaire et d'humidité du sol ont été réalisées.

Dans un premier temps, les zones constituant le modèle de rhizotron (la plaque transparente, les racines et le sol) ont été retrouvées sur les profils (Figure 2 de l'article). Sur ces derniers, un décalage en profondeur entre le jour et la nuit était visible et cohérent avec la littérature. Celui-ci était dû à la variation de la température de l'aimant (i.e., variation du champ magnétique), elle-même due à la variation de la température extérieure. Un décalage en intensité était également présent, le signal RMN étant alors plus faible le jour que la nuit. Cette différence jour/nuit était liée à l'augmentation de la mobilité de l'eau (diffusion et/ou flux transpiratoire) le jour par rapport à la nuit. Pour étudier plus précisément cette variation et l'évolution temporelle des signaux, les moyennes des points de la zone des racines et de la zone du sol ont été calculées et tracées au cours du temps pour chaque plante (Figure 3 de l'article). Une variation diurne des signaux RMN a ainsi été mise en évidence. Celle-ci était cohérente avec les variations des mesures écophysiologiques et était liée à la présence ou non du flux transpiratoire. En effet, le jour, sous l'effet de l'ouverture des stomates, les plantes se

déshydrataient entraînant une diminution du potentiel hydrique foliaire. Afin de se maintenir hydratées, elles prélevaient l'eau disponible dans le sol entraînant alors une diminution de l'humidité et du signal RMN du sol. La présence du flux transpiratoire expliquait ainsi la diminution du signal observée le jour au niveau des racines. La nuit, la fermeture des stomates entraînait la réhydratation des feuilles, visible par l'augmentation du potentiel hydrique foliaire, et la diminution voire l'arrêt du flux transpiratoire. Ceci, ajouté au fait que les plantes n'avaient alors plus besoin de prélever l'eau du sol, expliquait l'absence de variation du signal RMN la nuit dans le compartiment racinaire et dans le compartiment sol. Dans un second temps, afin de corroborer l'explication des variations des signaux par la présence d'un flux en journée, les décroissances T_2 acquises en continu ont été analysées. L'hypothèse était que deux fractions principales d'eau sont présentes dans les racines : l'une correspondant à l'eau liée, et donc avec un T_2 court, et l'autre correspondant à l'eau libre, qui se met en mouvement sous l'effet de la transpiration, et donc avec un T_2 plus long. Une variation des T_2 long a été observée pour deux des trois espèces étudiées (Figure 4 de l'article), avec une diminution de la valeur le jour, passant de 80 ms à 60 ms environ. Cette diminution était probablement due, en plus de la diffusion, à la présence du flux transpiratoire.

Ainsi, cette première étude a permis de démontrer la faisabilité de la RMN portable pour caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales et visualiser son évolution selon un rythme diurne.

Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by Portable NMR

Magali Nuix^{1,2,3}, Amidou Sissou Traoré^{1,2,*}, Shannan Blystone^{1,2,3}, Jean-Marie Bonny^{1,2}, Robert Falcimagne³, Guilhem Pagès^{1,2} and Catherine Picon-Cochard^{3,*}

¹ INRAE, UR QuaPA, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France; magali.nuix@inrae.fr (M.N.); shannan.blystone@inrae.fr (S.B.); jean-marie.bonny@inrae.fr (J.-M.B.); guilhem.pages@inrae.fr (G.P.)

² INRAE, PROBE Research Infrastructure, AgroResonance Facility, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

³ INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UREP, F-63000 Clermont-Ferrand, France; robert.falcimagne@inrae.fr

* Correspondence: amidou.traore@inrae.fr (A.S.T.); catherine.picon-cochard@inrae.fr (C.P.-C.); Tel.: +33-(0)4-7362-4629 (A.S.T.); +33-(0)4-4376-1615 (C.P.-C.)



check
for

updates

Citation: Nuix, M.; Traoré, A.S.; Blystone, S.; Bonny, J.-M.; Falcimagne, R.; Pagès, G.; Picon-Cochard, C. Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by Portable NMR. *Plants* **2021**, *10*, 782. <https://doi.org/10.3390/plants10040782>

Received: 15 March 2021

Accepted: 14 April 2021

Published: 16 April 2021

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



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

Abstract: Roots are at the core of plant water dynamics. Nonetheless, root morphology and functioning are not easily assessable without destructive approaches. Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and particularly low-field NMR (LF-NMR), is an interesting noninvasive method to study water in plants, as measurements can be performed outdoors and independent of sample size. However, as far as we know, there are no reported studies dealing with the water dynamics in plant roots using LF-NMR. Thus, the aim of this study is to assess the feasibility of using LF-NMR to characterize root water status and water dynamics non-invasively. To achieve this goal, a proof-of-concept study was designed using well-controlled environmental conditions. NMR and ecophysiological measurements were performed continuously over one week on three herbaceous species grown in rhizotrons. The NMR parameters measured were either the total signal or the transverse relaxation time T_2 . We observed circadian variations of the total NMR signal in roots and in soil and of the root slow relaxing T_2 value. These results were consistent with ecophysiological measurements, especially with the variation of fluxes between daytime and nighttime. This study assessed the feasibility of using LF-NMR to evaluate root water status in herbaceous species.

Keywords: *Dactylis glomerata*; leaf water potential; low-field NMR; *Medicago sativa*; *Plantago lanceolata*; rhizotron; soil humidity; time domain NMR

1. Introduction

Grasslands sequester high amounts of carbon in their soils [1–3], enabling them to potentially mitigate the concentration of greenhouse gases in the atmosphere [4]. The first step of this process is carbon fixation by photosynthesis in plant leaves, which is tightly coupled, at the leaf level, with transpiration, i.e., the outgoing flux of water in a plant. Thus, carbon sequestration processes depend on plant's water fluxes in the soil–plant–atmosphere continuum.

On the scale of individual plants, water is moved through the soil–plant–atmosphere continuum via a variation in water potentials, the cohesion of water molecules and the regulation of stomatal aperture. Thus, under optimal edaphic water conditions, water flows from areas of higher water potential (soil) to areas of lower water potential (air) [5]. This differential of water potential pulls water from the soil into plant roots, up through the vascular system, and out of stomata in the leaves, thereby impacting the entire water status of the plant. Plant water fluxes also vary according to external parameters like radiation, soil water availability or plant characteristics such as total leaf area, root density, root conductance, root phenology, as well as circadian rhythm [5].

Roots are at the core of plant water dynamics and water status by enabling water uptake from the soil. During the day, water flows through the root cortex, via both the symplastic and apoplastic pathways, and then into the xylem upon entering the stele. During the night, the water flux is lower than during the day [6]. Nonetheless, root morphology and functioning are not easily assessable without destructive approaches, e.g., excavation and washing. The estimation of their water dynamics often requires indirect measurements on soil or leaves. Currently, only a few non-invasive methods exist to visualize root architecture and to study water uptake, such as 2D light transmission imaging combined with modelling [7,8], neutron radiography [9,10], X-ray tomography [11] and high field magnetic resonance imaging (HF-MRI) [11–17]. However, such measurements are performed on very simplified models, e.g., gel or sand to mimic the soil, and on a limited number of species.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and its imaging counterpart (MRI), are interesting noninvasive approaches to study water status in plants. Indeed, by studying the most abundant molecule in living systems, i.e., water, NMR sensitivity issues can be overcome. ^1H NMR is a quantitative method allowing the determination of water content, signal amplitude being directly related to the amount of water protons. By exploiting the high dependence of NMR parameters (relaxation times T_1 and T_2 , diffusion coefficients) on how the water molecule is translationally hindered and rotationally bound, NMR stands as a valuable method to probe the multiscale status of water and its distribution in plants. For example, the water associated with tissues shows a low mobility and so a short relaxation time T_2 , whereas water which can be transported has a longer T_2 [18,19]. Furthermore, thanks to the noninvasiveness of the method, follow-up studies aimed at characterizing changes in tissue structure and local water distribution can be conducted, either in response to water deprivation [20,21] or during the transformation of plant-based foods [22].

Unfortunately, it is impossible to perform acquisition *in situ*, i.e., directly in the plant's natural environment with standard MRI systems, as they are not mobile. To displace the magnet, a low field MRI (LF-MRI) with a static magnetic field (B_0) lower than 1 Tesla (T) must be considered. LF-MRI has been applied to plants to perform several analyses in the laboratory such as the visualization of organ structure [23,24] or phloem and xylem flux measurements [6,25–28]. For example, in 2006, Windt *et al.* [6] used a 0.72 T NMR spectrometer to measure xylem and phloem fluxes in four different species: poplar, castor bean, tomato and tobacco. They observed differences concerning the diurnal cycle, fluxes being slower at night than during the day and phloem flux being slower than the xylem flux. They also showed that the linear velocity and volumetric flow, especially of the xylem, vary greatly between species. LF-MRI permits the study of plant dysfunctions, such as vascular embolism, and their impact on the fluxes and the distribution of water in plants [24,29]. In addition to these indoor studies, others have been performed outdoors, in the plant's natural environment [29–31]. However, with these previous magnets, the sample diameter was limited by the magnet bore. Unilateral magnets like the Nuclear Magnetic Resonance Mobile Universal Surface Explorer (NMR-MOUSE[®]) permit the study of a sample regardless of its size [32]. Even if the measurement depth is limited because of the sensitivity decrease with increasing distance from the surface of the magnet, plant organs other than stems or seeds can be explored using these instruments, e.g., leaves [21]. Despite this, roots are still under-studied. Recently, Bagnall *et al.* used LF-MRI to image roots in different types of soil, enabling the visualization of root architecture and morphology in the field and the characterization of the NMR properties of soil and roots [33]. They reported a difference in relaxation times between root and soil water, but also between the different types of soil. In addition, they observed an increase of soil water relaxation times with an increase in soil water content, regardless of the soil used. As plant roots are localized in soil, a challenge is the differentiation of water in both compartments. Thanks to the difference in relaxation times between soil and root water [15,33], the differentiation of these two compartments can be achieved. Here, we overcame this problem by using a model consisting of a rhizotron with a soft, thin textile in order to physically separate

roots from soil while still enabling water and nutrient exchanges (for more details about the experimental design, see the description in Material and Methods).

To the best of our knowledge, there is no publication addressing the circadian variations of water status in plant roots using LF-MRI. Therefore, the aim of our study was to assess the feasibility of using a portable NMR spectrometer to characterize water status in roots by studying three herbaceous species grown in rhizotrons, having contrasting structure–function relationships. We seek to validate NMR measurements by comparing them to root morphologies and ecophysiological methods. In addition, we investigated the transverse relaxation time evolutions to have a better understanding of the dynamic of the water in roots.

2. Results

2.1. Climatic Chamber

Figure 1 shows the temporal evolution of the climatic chamber environmental parameters. A 14 h light cycle was applied with lamps on from 8:00 a.m. to 10:00 p.m., and an intensity of photosynthetic active radiation (PAR) of $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and off during 10 h. Relative air humidity ranged from 48–53% during the day to 75–78% at night, whereas air temperature was, on average, 21°C during the day and 18°C at night for the three species. Air CO_2 concentration was more variable due to entry into the chamber to perform ecophysiological measurements. It varied, on average, between $410 \mu\text{mol mol}^{-1}$ during the day and $550 \mu\text{mol mol}^{-1}$ at night.

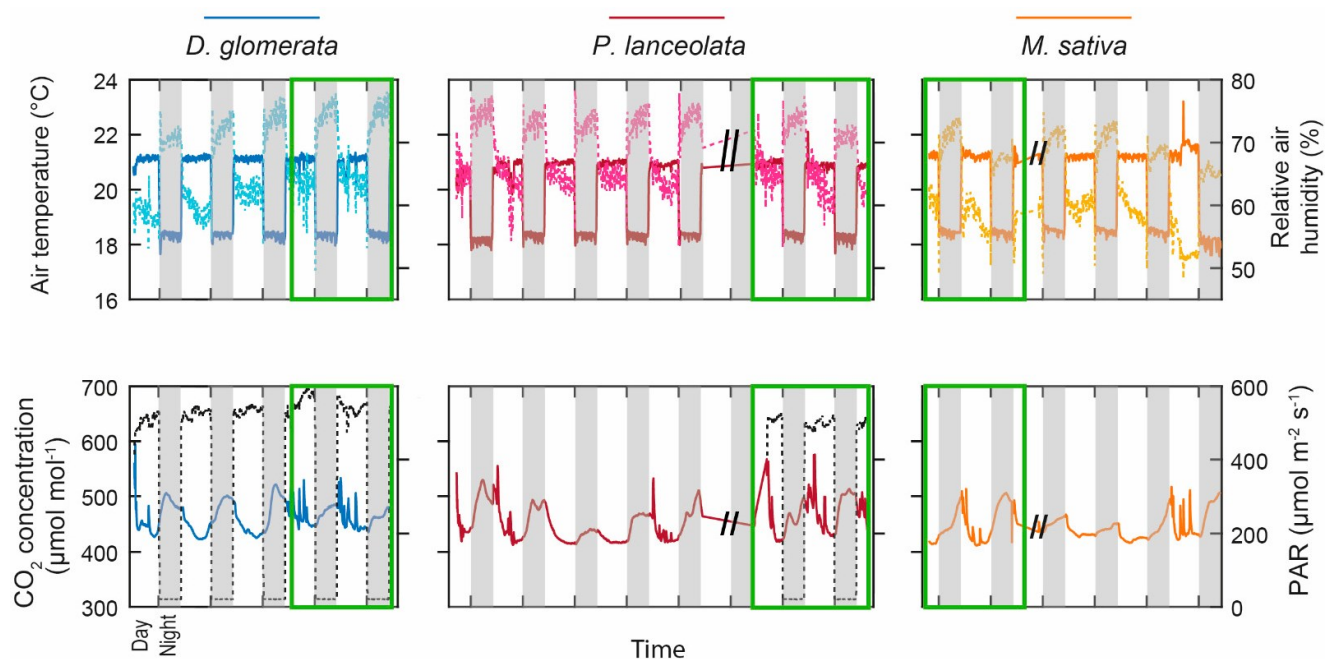


Figure 1. Climatic chamber parameters as a function of time during the experiment on the three species: *D. glomerata* in blue, *P. lanceolata* in red, and *M. sativa* in orange. The topmost plot represents the air temperature and the relative air humidity (solid and dotted light lines, respectively) and the bottom plot represents the CO_2 concentration and the photosynthetic active radiation (PAR) in black dotted lines. The white and grey boxes represent the presence (8:00 a.m. to 10:00 p.m.) and the absence of light (10:01 p.m. to 7:59 a.m.), respectively. The green boxes correspond to the period of T_2 measurements while the other data were obtained during the NMR profile measurements.

2.2. NMR Profiles within the Three Rhizotrons

Figure 2 shows day-versus-night signal intensity profiles, i.e., the NMR signal intensities (the mean of all 256 echoes of the decay curves) as a function of the measurement depths, for the three species one day after watering. In Figure 2, the profiles clearly displayed a “1D image” of water in each rhizotron.

Indeed, proton status in roots and soil yielded an imaging contrast, allowing the unambiguous attribution of water signal coming from each system. For clarity purposes, we only kept five points in the transparent wall (with signal void). For all species, the highest water signal intensity was observed in the roots (see Material and Methods). Thus, knowing the rhizotron organization, the remaining zone on the right of the roots with a signal slightly higher than zero corresponded to the soil. It is also noteworthy that each species displayed a distinct characteristic feature in their water signal profile. Firstly, a bimodal shape was clearly observed for the three species, with a maximum signal intensity of 0.09 and 0.18 for the left and right peaks of *D. glomerata*, of 0.09 and 0.11 for the left and right peaks of *P. lanceolata* and, of 0.27 and 0.18 for the left and right peaks of *M. sativa* (daytime). A sharp inflexion was only observed for *D. glomerata* and *M. sativa* at depths of 1.5 mm and 5.8 mm respectively. Secondly, the highest peak appeared to the right near the textile for *D. glomerata* and *P. lanceolata*, while the inverse was observed for *M. sativa*. Finally, *D. glomerata* and *P. lanceolata* displayed a thickness of 2.8 mm and 2.3 mm respectively, whereas the thickness of *M. sativa* was over 7 mm. The figure overlaid on each graph presents the root architecture within the measurement window (Figure 2). Figure 2 also shows that the profiles recorded during the day were slightly shifted in depth and had a lower amplitude than those acquired at night, regardless of the species.

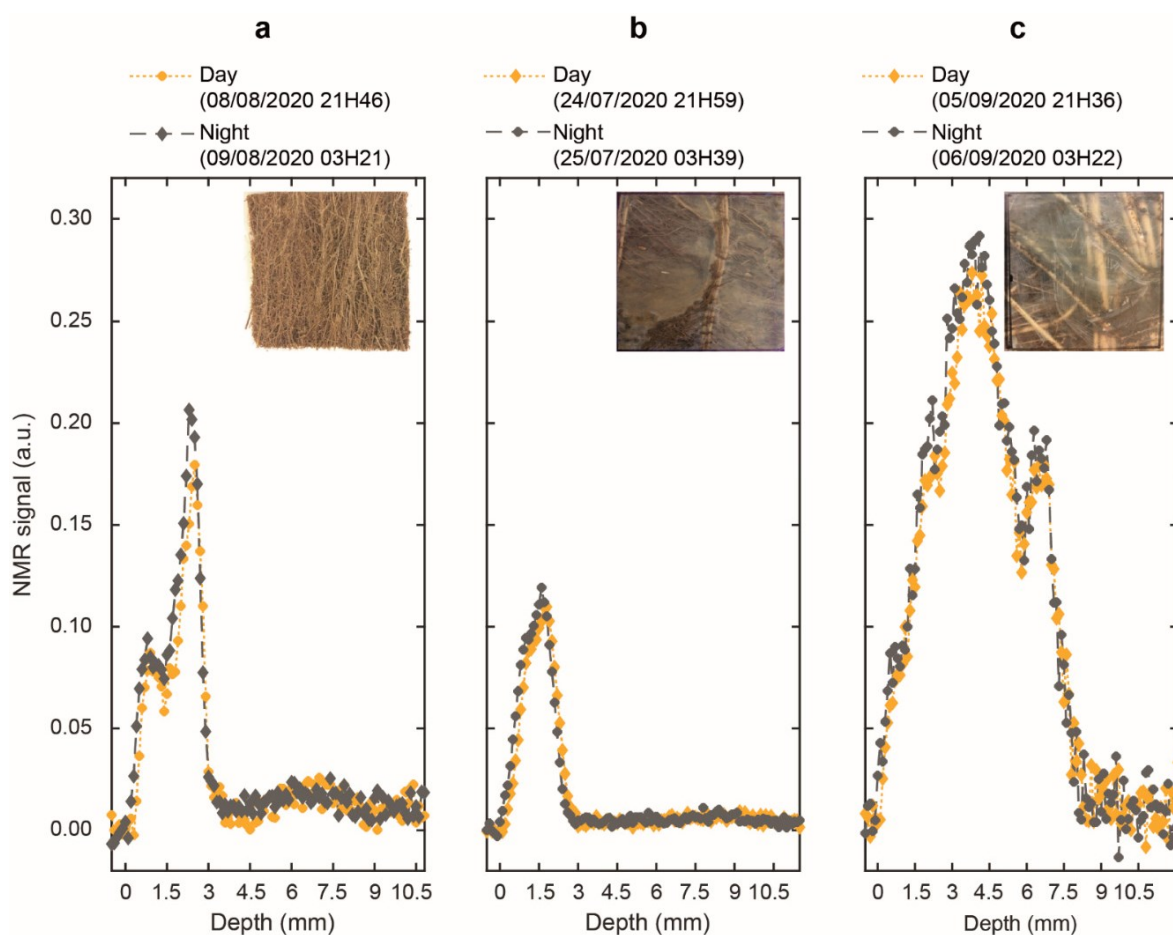


Figure 2. Day and night NMR signal intensity profiles (in yellow and grey, respectively) of (a) *D. glomerata*, (b) *P. lanceolata* and (c) *M. sativa* measured one day after watering. Overlaid on each graph, a picture showing the roots present within the NMR measurement window (outer section of 5 × 5 cm) with a sensitive (coil section) section of 4 × 4 cm.

2.3. Circadian Ecophysiological Measurements and NMR Signals in Roots and Soil

In order to observe the temporal evolution of the NMR water signal, a mean signal for both root and soil zones was calculated for each profile. The temporal evolutions of the leaf water potential (LWP), soil water content, and mean NMR water signal intensity in the roots and in the soil of the three species are presented in Figure 3.

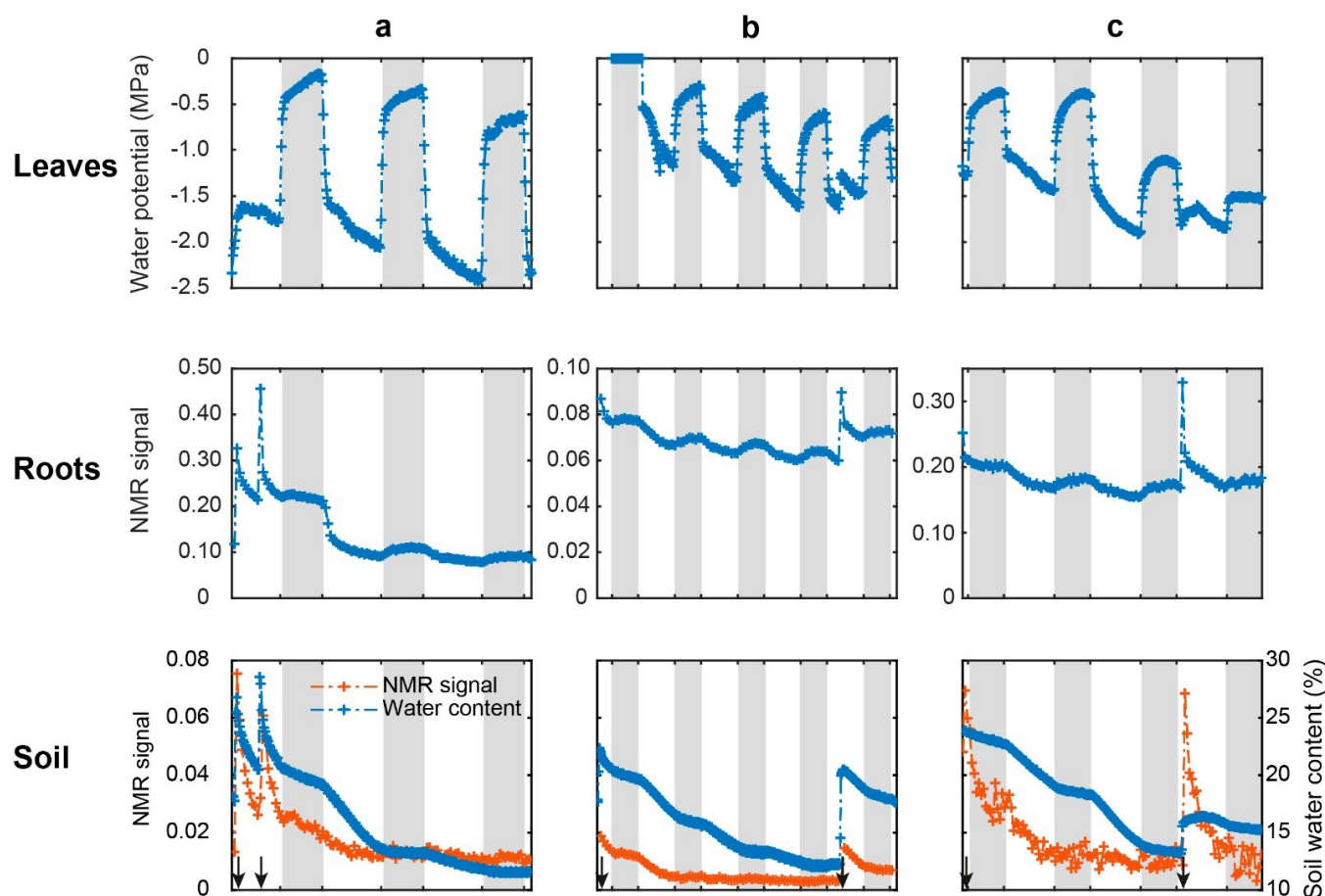


Figure 3. Evolution of the leaf water potential (top), the average NMR signal intensity measured in roots (middle) and in soil (bottom, orange) and soil volumetric water content (bottom, blue) measured in (a) *D. glomerata*, (b) *P. lanceolata*, and (c) *M. sativa*. The white and grey boxes represent the day and night periods, respectively and the black arrows at the bottom represent watering events.

The leaf water potential (Figure 3, top row) showed high variation between end-of-night (range of -0.18 MPa to -1.15 MPa) and end-of-day measurements (range of -1.16 MPa to -2.41 MPa), regardless of the species. At night, water potential increased (less negative values), corresponding to leaf rehydration when stomata were closed, and decreased (more negative values) during the day because of leaf transpiration. *D. glomerata* showed the highest fluctuations between day and night (mean calculated on day 2 and day 3: 1.98 MPa), whereas *P. lanceolata* had twice fewer fluctuations (~ 0.86 MPa). In the case of *M. sativa*, on day 3, a moderate drought effect was observed as water potential measured at the end of the night reached -1.5 MPa. Close to irrigation events (black arrows), ecophysiological variables (leaf water potential, soil volumetric water content), as well as NMR signals in roots and soil, changed quickly, with pronounced peaks.

Over the full follow-up period, the root water signal intensity of the three species displayed similar patterns, with a decrease during the day and a slight increase at night (Figure 3, middle row). The decrease in the signal was more pronounced for *D. glomerata* the day following watering. Afterwards, a similar circadian variation, i.e., a decrease

during the day followed by an increase during the night, was observed for the three species with an overall decrease in time.

The soil water signal intensity displayed globally similar circadian patterns as the root water signal intensity (Figure 3, bottom row) except that the water signal evolved in a plateau at night. Whatever the day and species, the NMR signal of the soil was always lower than that of the roots (10 times less). The figure shows the soil humidity whose evolution displayed a constant decrease over the whole follow-up period with a marked decrease during the day and a slow decrease at night.

2.4. Root Morphological Traits and Leaf Area

The three species showed contrasting morphologies. *M. sativa* differed from the two others with the highest root volume, root diameter and root mass, but the lowest root water content and intermediate total leaf area (Table 1). *D. glomerata* had the highest root length and leaf area, and the lowest root diameter. *P. lanceolata* had the lowest root length, root volume, root mass, and leaf area, but showed the highest root water content.

Table 1. Root morphological traits extracted from the roots present inside the NMR measurement volume and the total leaf area (rhizotron scale) measured at the end of the NMR experiment during plant harvest for the three species.

Variables	<i>D. glomerata</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>M. sativa</i>
Total root length (m)	56.237	17.498	46.137
Total root volume (cm ³)	2.431	0.780	5.647
Total root dry mass (g)	0.507	0.132	1.634
Mean root diameter (mm)	0.223	0.270	0.432
Mean root water content (g g ⁻¹) *	0.772	0.808	0.675
Total leaf area (cm ²)	6055.8	2166.6	4976.9

* roots were washed before weighing the fresh root mass.

2.5. T_2 Results

To complement circadian root water signal analysis, we performed T_2 measurements by positioning the sensor at the depth displaying the maximum signal intensity in the profile of each rhizotron. Data analysis yielded two components. Figure 4 shows the time evolution of the two T_2 values and their amplitudes over a 3-day-2-night follow-up period for the three species. For *D. glomerata* and *P. lanceolata* (Figure 4a,b), the fast-relaxing T_2 component (short T_2) relaxed with values around 5 ms, while the relaxation times for the slow relaxing component (long T_2) varied between 60 and 80 ms. For these two species, the slow relaxing component represented the major fraction (from 70% to 95%). For these two species, only the long T_2 value displayed a circadian rhythm with an increase during the night and a decrease during the day (from ~60 ms to ~80 ms). In contrast, the T_2 analysis results for *M. sativa* showed different characteristics (Figure 4c). Firstly, the acquired echo decays were noisier than for the two other species. Consequently, only the first 30 CPMG signal decays (2 days/night periods) satisfied the signal-to-noise ratio (SNR) condition for NNLS analysis (see Figure S1) [34]. Secondly, while these inversions also resulted in two components, the slow relaxing one displayed lower T_2 values, compared to the other two species, of around 50 ms. Thirdly, the two population fractions were closer together than those of the two other species. Finally, no visible circadian change was observed in any of the four parameters for *M. sativa*. During the T_2 measurements, a high variation in LWP was still observed between the end of night (range of -0.5 MPa to 0 MPa) and the end of day for *D. glomerata* and *P. lanceolata* (-1.77 MPa to -0.53 (Figure 4a,b third column)) with similar amplitudes to those observed during the signal profile measurements (Figure 3, top row). For *M. sativa*, whilst the data were truncated at the beginning due to sensor problems, the LWP increased to -0.4 MPa at the end of the second night, indicating that the plant was not in drought conditions.

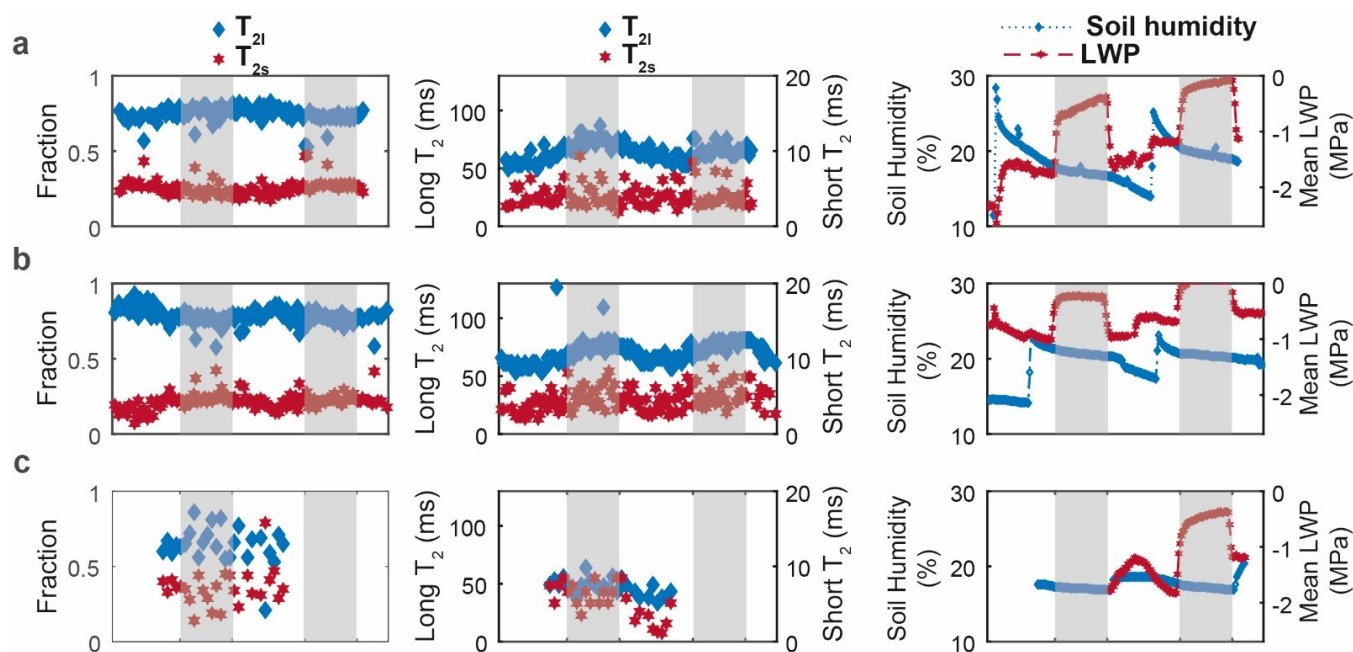


Figure 4. Evolution of the T_2 proportions (first column) and of the T_2 values (second column) in the root compartment, and of soil humidity and mean leaf water potential in blue and red, respectively (third column) for (a) *D. glomerata* (b), *P. lanceolata*, and (c) *M. sativa* (T_{2s} : short T_2 ; T_{2l} : long T_2). The white and grey boxes represent the presence and the absence of light, respectively.

3. Discussion

Our rhizotron model with a soft and thin textile enabled us to reduce the complexity of the study by separating roots from the soil, thus avoiding analysis of soil–root interactions, i.e., rhizosphere complexity [12,14,33], while getting closer to reality compared to other models such as hydroponics or agar plates cultures [35]. As the textile is very soft and weakly hydrophilic, the contacts between the roots, the textile and the soil are very high with no clear impact of the textile on plant development and morphology. Moreover, the use of a unilateral magnet, which is able to discriminate the different parts of our model, enabled us to be free of limitations imposed by model size and soil complexity.

The NMR-MOUSE is able to reveal a 1D image of water in the sample. Indeed, in agreement with the absence of any mobile protons in the transparent wall, the corresponding signal is void. Figure 2 also shows the depth profiles of water in the soil with a markedly lower signal intensity compared to the roots. The amount of water within the two compartments cannot fully explain this great difference in signal amplitude. Indeed, the roots of the three species were composed of an average of 75% water (Table 1), whereas the soil had a water content between 15–20% (Figure 3), yielding a ratio of approximately 4–5:1. This result was in line with previous studies obtained with high and low field NMR [14,33,36,37]. In Figure 2, we observed, on average, a ratio of 1:10 between the soil signal amplitude and the root signal amplitude. Therefore, we attributed this lower level of signal intensity in the soil as being a result of an interplay between the water binding capacity of the soil (which contains clay) and the effect of magnetic susceptibility inhomogeneity related to the heterogeneous structure of the soil. As each point of the profile corresponds to the mean of the 256 echoes of the decay curves, the profiles are also T_2 weighted. The differences between root and soil NMR signals can be explained by the increased structure of water in a clay system versus a root system. On the other hand, water diffusion through the porous structure of the soil, combined with the strong magnetic field gradient of the NMR-MOUSE is known to have a deleterious effect on the acquired signal [14,15,33].

The photos in Figure 2 and the morphological data in Table 1 highlighted a great contrast in root architecture between the three species. Indeed, it appeared that *M. sativa*

presented more coarse roots than the other plants as revealed by a higher mean root diameter (+75%) than *P. lanceolata* and *D. glomerata*. In addition, it had a total root mass that was 12.4 times and 3.2 times greater than *P. lanceolata* and *D. glomerata*, respectively, and a total root volume that was 7.2 times and 2.3 times greater than *P. lanceolata* and *D. glomerata*, respectively (Table 1). The higher proportion of coarse roots could explain why *M. sativa* had the lowest value of water content (12.6% and 16.5% lower than the mean water content of *D. glomerata* and *P. lanceolata*, respectively) as emphasized by some studies [38,39]. Therefore, the features of the depth profiles of the root water signal could be attributed to the root morphological traits of each plant. Indeed, the signal intensity at each depth is obtained by averaging the 256 echoes acquired with the CPMG pulse sequence to improve the SNR as commonly used in the inhomogeneous field [40]. These echoes are equivalent to the first 256 echoes of the CPMG acquisitions for T_2 measurements. As will be discussed later, the amplitude of the signal at these early echoes is more weighted by water fractions in close interaction with root tissue, which is more abundant in *M. sativa*, in agreement with its high root mass and diameter. Furthermore, as watering was done in the soil compartment, and because roots use soil water, a water gradient from the edge of the soil to the transparent wall may be expected. Depending on the total root number present in the NMR window, roots localized close to the transparent wall were more disconnected from soil water than the ones in contact with the textile. Such a gradient, along with the proportion of small-sized (fine) roots, may potentially explain the bimodal shape of the *M. sativa* and *D. glomerata* root profiles. Considering potential differential root water contents of fine and coarse roots, we expect that the highest peak may be attributed to a higher proportion of fine roots while the inflection may originate from a higher proportion of coarse roots as observed in some grass species [38] or in diverse plant communities across different climatic zones [39].

The shifts in depth profiles between days and nights were related to an increase in the temperature of the magnet. Indeed, the well-known and strong temperature dependency of low field magnets results in the linear displacement of the measured volume. In our case, a shift of $\sim 50 \mu\text{m}/^\circ\text{C}$ was determined [41]. This agrees with the $200 \mu\text{m}$ shift observed in the present study as a consequence of the $\sim 3^\circ\text{C}$ ($18\text{--}21^\circ\text{C}$) difference between the nighttime and the daytime. In addition, the reduction of the signal amplitude observed during the daytime is attributed, on the one hand, to the slight increase in the self-diffusion of water with an increase in temperature and, on the other hand, as will be discussed below, by an increase in water flux to satisfy plant transpiration.

Considering these day-night temperature effects, root and soil water signal variations can be monitored. With LF-NMR, we showed for the first time a circadian cycle measured in both roots and soil (Figure 3). Soil water NMR signal variation was consistent with soil humidity dynamics. The parallel evolution of the two parameters demonstrates that the NMR-MOUSE was able to monitor water status in the soil. Moreover, the circadian evolution of the root NMR signal was mirrored by the dynamics of leaf water potential and of soil-water content induced by plant transpiration. During the day, the upward transport of water, due to the transpiration flux, caused the decline in root NMR signal, whereas the root water uptake caused the decrease in soil NMR signal. Indeed, as leaves dehydrate during the day (decline of LWP), a similar diurnal pattern is expected for the roots, as shown by Huck *et al.* [42]; this is consistent with the presence of the soil-plant-atmosphere continuum. Moreover, nighttime evolution of all measurements corroborated this interpretation. Indeed, at night, water fluxes are slower than during the day [6] and the potential evapotranspiration is close to zero, explaining the increase of LWP near 0 MPa and the leaf and root rehydration. As a consequence, plants no longer absorb water, explaining the plateau of the soil NMR signal, soil humidity and the slight increase of root water NMR signal, which may be due to the decrease in proton mobility.

Our results also show that, besides these global traits shared by the three species, the NMR-MOUSE was also able to reveal specific structural and functional characteristics of each of the herbaceous plants. Indeed, as can be seen in Figure 3 on the middle row, the day

after watering, root water signal amplitude declined by ~57% for *D. glomerata*, by ~9% for *P. lanceolata* and by ~18.5% for *M. sativa*, corresponding to a variation of LWP between the end of night and the end of day of -1.9 MPa, -0.8 MPa, and -1.1 MPa, respectively. These water signal changes were consistent with root morphological traits and with the total leaf area of each plant. *P. lanceolata*, having the lowest total leaf area, had a transpiration flux which was expected to be smaller than the flux of *D. glomerata*, which had a leaf area and root length almost three times greater.

In complement with the depth profile analysis, we performed transversal relaxation, T_2 , analysis. T_2 stands as the NMR parameter that most strongly indicates the contribution of different water fractions in the signal of complex systems like plants, and particularly the roots. By nature, the measured echo decays with the NMR-MOUSE are affected by the instrumental imperfections, as well as by the diffusion properties of the sample [43], resulting only in an effective relaxation time ($T_{2\text{eff}}$) rather than a “true” T_2 . The distribution of T_2 relaxation obtained with the regularized NNLS inversion [44–46] of the transversal decay signal of a complex system may be used to quantitatively analyze the state of water in each subsystem. Considering our model separating roots from soil, along with the root structure and function, the fast-relaxing T_2 and its population fraction can be attributed to the water fraction in close interaction with root tissue, while the slow-relaxing T_2 and its population fraction to the more mobile water fraction, i.e., water available to satisfy plant transpiration. Similar distribution was reported by Capitani *et al.* in their outdoor study using a unilateral NMR instrument to detect the water status in the leaves of different plants in stressed and unstressed conditions [21]. Because the T_2 values of the slow relaxing water fraction of *D. glomerata* and *P. lanceolata* displayed a circadian feature and their population did not change, their variations could be ascribed to the daytime increase in water fluxes due to plant transpiration. Indeed, due to the strong magnet inhomogeneity, T_2 measurements are highly sensitive to both coherent and incoherent water motions, and so the resulting incomplete refocalisation of spins (to the echo formation) leads to either signal and/or T_2 reductions. The dependence of the CPMG echoes amplitude on diffusion and flow is well known since the discovery of the spin-echo for T_2 measurement by Hahn in 1950 [47] and the paper by Carr and Purcell in 1954 [48]. Here, our analysis was limited with regard to the qualitative interpretations, the detailed analysis of the contribution of each phenomenon (i.e., flow and diffusion) being out of the scope of this paper and may be found in the above-cited articles as well as in others [49,50]. Conversely, the T_2 value was higher at night as both temperature and plant transpiration decreased, whereas the absence of a clear variation observed for the short T_2 agreed with the high interaction of this water fraction with root tissue. The effect of daytime flow was also clearly illustrated in the CPMG maximum signal amplitude of both *D. glomerata* and *P. lanceolata*, which clearly displayed a circadian variation (Figure S1). The fact that the main root water signal (up to 90%) of these two species is represented by this slow-relaxing water fraction (with a T_2 value changing according to transpiration fluxes) along with the absence of any variation in the fast-relaxing (T_2 and population) fraction stand as indicators of the well-watered status of these root tissues. This assumption is further reinforced by the results obtained on *M. sativa*. Indeed, either the SNR of the T_2 signal decay (Figure S1) or the relatively high population of the fast-relaxing water fraction seems to indicate that this species was in a different hydric state to the two other species. The absence of any circadian change might be explained by perturbations in the transpiration function related to its water status.

To conclude, we assessed the feasibility of portable MRI to characterize the circadian dynamics of root water in three contrasted herbaceous species grown in rhizotrons, NMR measurements being validated with regards to the current ecophysiological reference methods. More studies are necessary to compare a wider range of species in order to define root water strategies in well-watered and droughted conditions. This study opens the opportunity to work with a rhizotron system in which roots are growing in the soil in order to better approximate the natural growing conditions.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

4.1.1. Rhizotrons

In November 2019, 3 flat parallelipedic containers called rhizotrons (95 x 40 x 5 cm), each with one transparent wall (in Plexiglass), were filled with a dried air granitic brown soil (12% clay, 17% silt, 59% sand, 13% organic matter), extracted from an upland grassland (St Genès Champanelle, 45.43°N, 03°10 E, 890 m a.s.l.) and sieved at 7 mm (pH $\approx$ 6.5). Before filling the rhizotrons, the soil was filled with slow-release fertilizer (35 kg m⁻³ NPK 14-7-14, Multicote 12, Haifa, Israel). Holes were also drilled at the bottom of each rhizotron and a pozzolan layer was added to allow for drainage.

A thin (60 μ m) and soft tissue (Nylon Polyamide made, 100 x 45 cm) with a mesh of 30 μ m and with a 20% open area of the pores was placed between the soil and the transparent wall in order to separate the roots from the soil, but allowing the transfer of water and nutrients. The transparent wall (4 mm thick) allowed closure of the rhizotrons with screws with the box and was then covered with black plastic between observations to shield the roots from light.

4.1.2. Plant Material

One *Plantago lanceolata* plant and three tillers of *Dactylis glomerata* were transplanted from the site of St Genès Champanelle. Three *Medicago sativa* (Maga variety) plants were germinated from seeds. The rhizotrons were left outside during the winter and spring seasons before starting measurements in a climatic chamber during the summer season. A first cut of the plants at a height of 5 cm occurred on the 13 April in order to regenerate the leaves, as it occurs in mown grassland.

4.1.3. Climatic Chamber

Climatic chamber environmental conditions were monitored and recorded at 30-s intervals with a data logger (CR6-Wifi, Campbell Scientific Ltd., Loughborough, UK) and averaged over 5-min periods for radiation and CO₂ concentration (CARBOCAP, GMP343, Vaisala, Finland) and with a HOBO data logger (ONSET, Bourne, MA, USA) every ten minutes for relative air humidity and temperature. The chamber had a day and night cycle, with lights turning on at 8:00 a.m. and turning off at 10:00 p.m. Temperatures were maintained at around 21°C during the day and 18°C at night. Light values were measured with a PAR (JYP1000, SDEC, Reignac sur Indre, France).

4.2. Ecophysiological Measurements

4.2.1. Leaf Water Potential

Psychrometers (PSY1-Stem, ICT International, Armidale, Australia) were used to measure leaf water potential (MPa). These measurements provided an insight into the daily oscillations of leaf water potentials under normal water conditions with regard to the magnitude of change between day and night measurements and with regard to inter-daily fluctuations. Measurements were made for each species on the following periods: 23 July–5 August 2020: *P. lanceolata*; 7–12 August 2020: *D. glomerata*; 31 August–8 September 2020: *M. sativa*. Measurements were made on two leaves for each species and the values were averaged.

4.2.2. Soil Humidity

One 5-cm long sensor (EC-5, Meter Group, Pullman, WA, USA) was placed horizontally at one depth (16 cm) and connected to a datalogger (EM50, Meter Group, Pullman, WA, USA) to measure soil humidity continuously every 15 min, in all rhizotrons.

4.2.3. Destructive Samplings

During the total sampling of the rhizotron after the NMR experiment, the total leaf area of green leaves was measured with an area meter (Licor 3100, Licor, Lincoln, NE, USA).

After finishing all measurements on each species, the rhizotrons were harvested and plants were cut and sorted by organ type: leaves, stems, floral organs, and dead matter for each. In addition, roots were also sampled. Roots present inside the NMR measurement window (5 × 5 cm) were collected, washed and stored in a plastic bag (−18°C) before performing root morphology measurements. For the evaluation of the root water content, fresh and dry roots were weighed separately. All fresh organs were oven-dried (48 h at 60°C) and weighed to determine their dry mass (g). Mean root water content (RWC) was calculated as $RWC = \frac{(fresh\ mass - dry\ mass)}{fresh\ mass} (g\ g^{-1})$.

4.2.4. Root Morphology

To increase the contrast for scanning, the defrosted roots were stained with methylene blue dye (5 g L^{−1}) by soaking them for at least one hour at ambient temperature. After rinsing in water to remove the excess stain, the roots were carefully separated into coarse (>1 mm) and fine roots and spread separately in a layer of water 1–3 mm deep, in a glass tray, using mounted needles. They were scanned with a flatbed scanner (EPSON perfection V700; Seiko Epson Corp., Suwa, Japan) at a resolution of 800 dots per inch, using the transparent mode. For each species, 6 to 10 images were recorded and thereafter analyzed with WinRhizoPRO software (V2012b, Régent Instruments, Québec, QC, Canada) to determine root length (m), average root diameter (mm), and root volume (cm³) by diameter class (10 classes of 0.1 mm-wide increments). The root volume was calculated as the sum of each volume by diameter class to avoid bias due to a skewed root diameter distribution [51].

4.3. NMR Experiments and Signal Analysis

4.3.1. NMR-MOUSE System

NMR measurements were performed using a 0.3 T NMR-MOUSE (Magritek, Wellington, NZ) spectrometer. The full design of this low field system NMR sensor operating at a ¹H resonance frequency of approximately 13.23 MHz, can be found elsewhere [32]. Briefly, this sensor is equipped with a permanent magnet whose configuration results in a strong gradient of approximately 7.5 T/m along the **B**₀-(z)-direction, out from the surface of the magnet. Combined with a linear surface coil for radiofrequency (RF) transmission and signal reception, this linear gradient allows a selective signal measurement within a flat sensitive volume (on-resonance frequency) of a few tens of micrometers at a fixed distance of 25 mm from the magnet surface. In our configuration, a 4 × 4 cm RF coil (defining the spatial Field of View of the sensitive slice) was placed on top of a 10-mm thick spacer, which was positioned on top of the magnet, resulting in a distance of 15 mm between the coil and the sensitive volume. Measurements of different depths were possible via a high precision lift, which moved both the magnet and the RF coil downward along the z-direction from 0 to minus 15 mm, shifting therefore the measurement slice inside the sample from 15 mm to 0 (the sample/NMR-MOUSE interface). The NMR-MOUSE was fixed on a vector specifically designed for either transportation or to easily position it in contact with the sample thanks to the screws within the crank.

4.3.2. Intensity Profile Measurements and Signal Analysis

For each rhizotron, the targeted measurement zone was selected visually through the transparent wall according to its root density. The NMR-MOUSE was then positioned in contact with the wall with its measurement window in front of the targeted measurement zone. The system was then securely clamped. The depth profiling protocol consisted of continuously acquiring the signal from the initial depth of 14.7 mm (the maximum measurement depth) to the final depth of 0 mm (the surface of the spectrometer) with a resolution of 0.1 mm by shifting the lift position in −0.1 mm-steps, resulting therefore in a total of 148 points for each profile. The signal of each depth consisted of the acquisition of 256 echoes using the CPMG pulse sequence with the following parameters: excitation pulse 15 μs, echo time 113 μs, repetition time 3000 ms. Each measurement was repeated

4 times for signal averaging at the exception of *P. lanceolata* for which 8 accumulations were performed, resulting in a duration of 37 min to record one profile for *D. glomerata* and *M. sativa* and of 1h10 for *P. lanceolata*. All acquisition parameters being identical, the NMR signal of *P. lanceolata* was divided by two to be compared to the others profiles. A gap of 1 min was set between two successive profiles to allow the lift to return to its initial position. To construct the signal profile, the signal intensity at each position was derived by the mean of the 256 echoes. An example of the result of the 3-day acquisition for the *D. glomerata* sample is presented in Figure 5. All of these profiles clearly display three spatially separated parts attributed to the soil, roots and the transparent wall according to the dimensional characteristics of the sample. Indeed, from 0 to 4 mm, the null signal intensity (noise) perfectly reflects the absence of any mobile protons in the 4 mm-transparent wall. The signal increase observed in the forward depths corresponded to the protons (mainly from water) in the roots. The signal decrease (the average of the 256 echoes) observed at 7.5 mm due to the textile followed by a low flat signal assigned to the water in the soil.

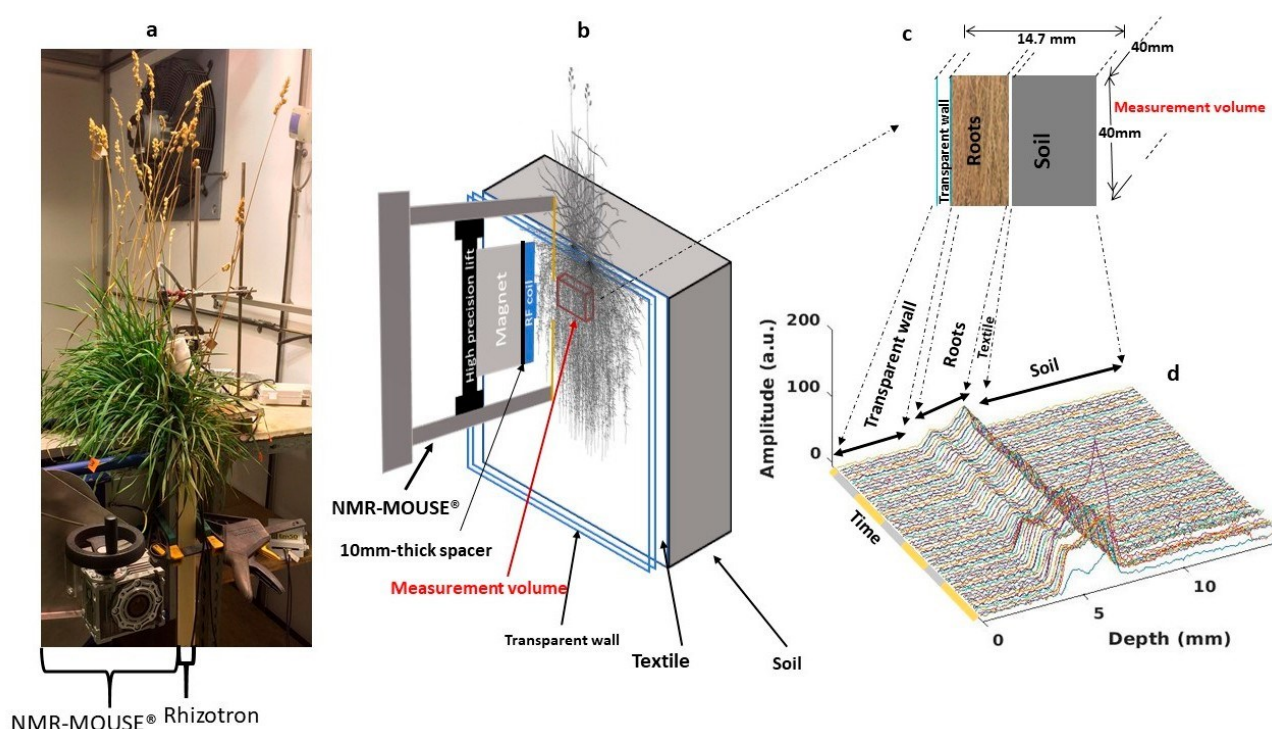


Figure 5. (a) Experimental setup in the climatic chamber (case of *D. glomerata*). (b) Schematic representation of the magnet in contact with a rhizotron and of the position of the NMR sensitive volume (or slice) (red rectangular parallelepiped). (c) Illustration drawing of different structures in the measurement window. (d) 3-day (daytime in yellow and nighttime in gray) profile, i.e., signal intensity (average of 256 echoes) at each depth, cycle. Soil, roots and transparent wall compartments are clearly revealed in each profile whereas no clear feature can be attributed to the textile as described in the text.

4.3.3. T_2 Measurements and Fitting

T_2 measurements were performed at one unique position for each sample for the three species. After the profile measurements, the lift was shifted to the measurement volume corresponding to the position in the roots displaying the maximum signal intensity. The full transversal decay curve for that position was then obtained by recording 2800 echoes for *D. glomerata* and *M. sativa* and, 2500 echoes for *P. lanceolata* using the CPMG pulse sequence with the following parameters: excitation pulse 12 μ s, echo time 100 μ s and repetition time 12 s for *D. glomerata* and *M. sativa*, and 10 s for *P. lanceolata*. To improve the signal-to-noise ratio (SNR), each echo was averaged 128 times for *D. glomerata* and *P. lanceolata* and 256 times for *M. sativa*. Assuming that the measured echo decays consisted of a superposition

of exponential decays, data analysis was performed in terms of a distribution of relaxation times. The T_2 distribution functions were extracted from the experimental data using an in-house implementation in MATLAB® (MathWorks, Natick, MA, USA) of the NNLS inversion algorithm using a regularization parameter to control the trade-off between stability and bias (Figure S2). When more than two peaks were present (that was the case for less than 5% of the data), and because we hypothesized a bi-exponential relaxation curve, a mean between values of the same order of magnitude was calculated.

Supplementary Materials:

The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants10040782/s1>, Figure S1: CPMG decay curves of each species; Methods S1: Processing of the transverse relaxation decay curves; Figure S2: Flow of NNLS inversion of the transversal relaxation decay curves.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.T. and C.P.-C.; methodology, M.N., A.S.T., R.F., G.P. and C.P.-C.; software, M.N., A.S.T. and R.F.; validation, A.S.T., G.P. and C.P.-C.; formal analysis, M.N.,

A.S.T. and C.P.-C.; investigation, M.N., A.S.T., S.B., R.F. and C.P.-C.; resources, J.-M.B., R.F. and C.P.-C.; data curation, A.S.T. and R.F.; writing—original draft preparation, M.N., A.S.T., G.P. and C.P.-C.; writing—review and editing, M.N., A.S.T., S.B., J.-M.B., R.F., G.P. and C.P.-C.; visualization, M.N., A.S.T., G.P. and C.P.-C.; supervision, A.S.T. and C.P.-C.; project administration, A.S.T. and C.P.-C.; funding acquisition, A.S.T., J.-M.B. and G.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25) through the M.N.'s PhD grant and by the ANR project OutLabMRI (ANR-19-CE04-0006).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in Data IN-RAE (<https://data.inrae.fr/>, accessed on 12 March 2021) repository at <https://doi.org/10.15454/NWRHDA> (accessed on 12 March 2021).

Acknowledgments: We would like to thank David Colosse, Patrick Pichon and Alexandre Salcedo for taking care of the plants and Abdlatif Benmoussa for his technical support and assistance with the NMR spectrometer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Friedlingstein, P.; Jones, M.W.; O'Sullivan, M.; Andrew, R.M.; Hauck, J.; Peters, G.P.; Peters, W.; Pongratz, J.; Sitch, S.; Le Quéré, C.; et al. Global Carbon Budget 2019. *Earth Syst. Sci. Data* **2019**, *11*, 1783–1838. [\[CrossRef\]](#)
2. Lal, R. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. *Science* **2004**, *304*, 1623–1627. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Dangal, S.R.S.; Tian, H.; Pan, S.; Zhang, L.; Xu, R. Greenhouse Gas Balance in Global Pasturelands and Rangelands. *Environ. Res. Lett.* **2020**, *15*, 104006. [\[CrossRef\]](#)
4. IPCC. *Land Use, Land-Use Change, and Forestry: Summary for Policymakers: A Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*; WMO (World Meteorological Organization): Geneva, Switzerland; UNEP (United Nations Environment Programme): Geneva, Switzerland, 2000; ISBN 978-92-9169-114-2.
5. Jones, H.G. *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2014; ISBN 978-0-521-27959-8.
6. Windt, C.W.; Vergeldt, F.J.; De Jager, P.A.; Van As, H. MRI of Long-Distance Water Transport: A Comparison of the Phloem and Xylem Flow Characteristics and Dynamics in Poplar, Castor Bean, Tomato and Tobacco. *Plant Cell Environ.* **2006**, *29*, 1715–1729. [\[CrossRef\]](#)
7. Garrigues, E.; Doussan, C.; Pierret, A. Water Uptake by Plant Roots: I-Formation and Propagation of a Water Extraction Front in Mature Root Systems as Evidenced by 2D Light Transmission Imaging. *Plant Soil* **2006**, *283*, 83–98. [\[CrossRef\]](#)
8. Doussan, C.; Pierret, A.; Garrigues, E. Water Uptake by Plant Roots: II-Modelling of Water Transfer in the Soil Root-System with Explicit Account of Flow within the Root System—Comparison with Experiments. *Plant Soil* **2006**, *283*, 99–117. [\[CrossRef\]](#)

9. Zarebanadkouki, M.; Kim, Y.X.; Carminati, A. Where Do Roots Take up Water? Neutron Radiography of Water Flow into the Roots of Transpiring Plants Growing in Soil. *New Phytol.* **2013**, *199*, 1034–1044. [\[CrossRef\]](#)
10. Tötze, C.; Kardjilov, N.; Manke, I.; Oswald, S.E. Capturing 3D Water Flow in Rooted Soil by Ultra-Fast Neutron Tomography. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6192. [\[CrossRef\]](#)
11. Metzner, R.; Eggert, A.; van Dusschoten, D.; Pflugfelder, D.; Gerth, S.; Schurr, U.; Uhlmann, N.; Jahnke, S. 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. [\[CrossRef\]](#)
12. Pohlmeier, A.; Oros-Peusquens, A.; Javaux, M.; Menzel, M.I.; Vanderborght, J.; Kaffanke, J.; Romanzetti, S.; Lindenmair, J.; Vereecken, H.; Shah, N.J. Changes in Soil Water Content Resulting from *Ricinus* Root Uptake Monitored by Magnetic Resonance Imaging. *Vadose Zone J.* **2008**, *7*, 1010–1017. [\[CrossRef\]](#)
13. Pohlmeier, A.; Vergeldt, F.; Gerkema, E. MRI in Soils: Determination of Water Content Changes Due to Root Water Uptake by Means of a Multi-Slice-Multi-Echo Sequence (MSME). *Open Magn. Reson. J.* **2010**, *3*, 69–74. [\[CrossRef\]](#)
14. Gruwel, M.L.H. In Situ Magnetic Resonance Imaging of Plant Roots. *Vadose Zone J.* **2014**, *13*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
15. Pflugfelder, D.; Metzner, R.; van Dusschoten, D.; Reichel, R.; Jahnke, S.; Koller, R. Non-Invasive Imaging of Plant Roots in Different Soils Using Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Plant Methods* **2017**, *13*, 102. [\[CrossRef\]](#)
16. Haber-Pohlmeier, S.; Tötze, C.; Oswald, S.E.; Lehmann, E.; Blümich, B.; Pohlmeier, A. Imaging of Root Zone Processes Using MRI T1 Mapping. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *269*, 43–46. [\[CrossRef\]](#)
17. Haber-Pohlmeier, S.; Tötze, C.; Lehmann, E.; Kardjilov, N.; Pohlmeier, A.; Oswald, S.E. Combination of Magnetic Resonance Imaging and Neutron Computed Tomography for Three-Dimensional Rhizosphere Imaging. *Vadose Zone J.* **2019**, *18*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
18. Van As, H.; Scheenen, T.; Vergeldt, F.J. MRI of Intact Plants. *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 213–222. [\[CrossRef\]](#)
19. Van As, H.; van Duynhoven, J. MRI of Plants and Foods. *J. Magn. Reson.* **2013**, *229*, 25–34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Barigah, T.S.; Bonhomme, M.; Lopez, D.; Traore, A.; Douris, M.; Venisse, J.-S.; Cochard, H.; Badel, E. Modulation of Bud Survival in *Populus nigra* Sprouts in Response to Water Stress-Induced Embolism. *Tree Physiol.* **2013**, *33*, 261–274. [\[CrossRef\]](#)
21. Capitani, D.; Brilli, F.; Mannina, L.; Proietti, N.; Loreto, F. In Situ Investigation of Leaf Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1638–1647. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Leca, A.; Clerjon, S.; Bonny, J.-M.; Renard, C.; Traoré, A. Multiscale NMR Analysis of the Degradation of Apple Structure Due to Thermal Treatment. *J. Food Eng.* **2021**, *294*, 110413. [\[CrossRef\]](#)
23. Koizumi, M.; Naito, S.; Ishida, N.; Haishi, T.; Kano, H. A Dedicated MRI for Food Science and Agriculture. *FSTR* **2008**, *14*, 74–82. [\[CrossRef\]](#)
24. Meixner, M.; Tomasella, M.; Foerst, P.; Windt, C.W. A Small-scale MRI Scanner and Complementary Imaging Method to Visualize and Quantify Xylem Embolism Formation. *New Phytol.* **2020**, *226*, 1517–1529. [\[CrossRef\]](#)
25. Van As, H.; Reinders, J.E.A.; de Jager, P.A.; van de Sanden, P.A.C.M.; Schaafsma, T.J. In Situ Plant Water Balance Studies Using a Portable NMR Spectrometer. *J. Exp. Bot.* **1994**, *45*, 61–67. [\[CrossRef\]](#)
26. Homan, N.M.; Windt, C.W.; Vergeldt, F.J.; Gerkema, E.; Van As, H. 0.7 and 3 T MRI and Sap Flow in Intact Trees: Xylem and Phloem in Action. *Appl. Magn. Reson.* **2007**, *32*, 157–170. [\[CrossRef\]](#)
27. Windt, C.W. A Portable Halbach Magnet That Can Be Opened and Closed without Force: The NMR-CUFF. *J. Magn. Reson.* **2011**, *208*, 27–33. [\[CrossRef\]](#)
28. Windt, C.W.; Blümmler, P. A Portable NMR Sensor to Measure Dynamic Changes in the Amount of Water in Living Stems or Fruit and Its Potential to Measure Sap Flow. *Tree Physiol.* **2015**, *35*, 366–375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Kimura, T.; Geya, Y.; Terada, Y.; Kose, K.; Haishi, T.; Gemma, H.; Sekozawa, Y. Development of a Mobile Magnetic Resonance Imaging System for Outdoor Tree Measurements. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 053704. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Jones, M.; Aptaker, P.S.; Cox, J.; Gardiner, B.A.; McDonald, P.J. A Transportable Magnetic Resonance Imaging System for in Situ Measurements of Living Trees: The Tree Hugger. *J. Magn. Reson.* **2012**, *218*, 133–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Nagata, A.; Kose, K.; Terada, Y. Development of an Outdoor MRI System for Measuring Flow in a Living Tree. *J. Magn. Reson.* **2016**, *265*, 129–138. [\[CrossRef\]](#)
32. Eidmann, G.; Savelsberg, R.; Blümmler, P.; Blümich, B. The NMR MOUSE, a Mobile Universal Surface Explorer. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *122*, 104–109. [\[CrossRef\]](#)
33. Bagnall, G.C.; Koonjoo, N.; Altobelli, S.A.; Conradi, M.S.; Fukushima, E.; Kueth, D.O.; Mullet, J.E.; Neely, H.; Rooney, W.L.; Stupic, K.F.; et al. Low-Field Magnetic Resonance Imaging of Roots in Intact Clayey and Silty Soils. *Geoderma* **2020**, *370*, 114356. [\[CrossRef\]](#)
34. Bonny, J.; Traore, A.; Bouhrara, M.; Spencer, R.G.; Pages, G. Parsimonious Discretization for Characterizing Multi-exponential Decay in Magnetic Resonance. *NMR Biomed.* **2020**, *33*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Atkinson, J.A.; Pound, M.P.; Bennett, M.J.; Wells, D.M. Uncovering the Hidden Half of Plants Using New Advances in Root Phenotyping. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *55*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Rogers, H.H.; Bottomley, P.A. In Situ Nuclear Magnetic Resonance Imaging of Roots: Influence of Soil Type, Ferromagnetic Particle Content, and Soil Water. *Agron. J.* **1987**, *79*, 957–965. [\[CrossRef\]](#)

37. Van Dusschoten, D.; Metzner, R.; Kochs, J.; Postma, J.A.; Pflugfelder, D.; Bühler, J.; Schurr, U.; Jahnke, S. Quantitative 3D Analysis of Plant Roots Growing in Soil Using Magnetic Resonance Imaging1 [OPEN]. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 1176–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Picon-Cochard, C.; Pilon, R.; Tarroux, E.; Pagès, L.; Robertson, J.; Dawson, L. Effect of Species, Root Branching Order and Season on the Root Traits of 13 Perennial Grass Species. *Plant Soil* **2012**, *353*, 47–57. [[CrossRef](#)]
39. Prieto, I.; Roumet, C.; Cardinael, R.; Dupraz, C.; Jourdan, C.; Kim, J.H.; Maeght, J.L.; Mao, Z.; Pierret, A.; Portillo, N.; et al. Root Functional Parameters along a Land-Use Gradient: Evidence of a Community-Level Economics Spectrum. *J. Ecol.* **2015**, *103*, 361–373. [[CrossRef](#)]
40. Blümich, B.; Perlo, J.; Casanova, F. Mobile Single-Sided NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2008**, *52*, 197–269. [[CrossRef](#)]
41. Traoré, A.; Aliouissi, R.; Benmoussa, A.; Pagès, G.; Bonny, J.-M. Profiling the Temperature Dependent Frequency of an Open- Magnet for Outdoor Applications. In Proceedings of the 15th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy (ICMRM), Paris, France, 18–22 August 2019.
42. Huck, M.G.; Klepper, B.; Taylor, H.M. Diurnal Variations in Root Diameter. *Plant Physiol.* **1970**, *45*, 529–530. [[CrossRef](#)]
43. Blümich, B.; Blümler, P.; Eidmann, G.; Guthausen, A.; Haken, R.; Schmitz, U.; Saito, K.; Zimmer, G. The NMR-Mouse: Construction, Excitation, and Applications. *Magn. Reson. Imaging* **1998**, *16*, 479–484. [[CrossRef](#)]
44. Lawson, C.L.; Hanson, R.J. *Solving Least Squares Problems*; Classics in Applied Mathematics: 15; SIAM: Philadelphia, PA, USA, 1995; ISBN 0-89871-356-0.
45. Bjarnason, T.A.; McCreary, C.R.; Dunn, J.F.; Mitchell, J.R. Quantitative T2 Analysis: The Effects of Noise, Regularization, and Multivoxel Approaches. *Magn. Reson. Med.* **2010**, *63*, 212–217.
46. Whittall, K.P.; MacKay, A.L. Quantitative Interpretation of NMR Relaxation Data. *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 134–152. [[CrossRef](#)]
47. Hahn, E.L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580–594. [[CrossRef](#)]
48. Carr, H.Y.; Purcell, E.M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630–638. [[CrossRef](#)]
49. Hahn, E.L. Detection of Sea-Water Motion by Nuclear Precession. *J. Geophys. Res.* **1960**, *65*, 776–777. [[CrossRef](#)]
50. Packer, K.J.; Rees, C.; Tomlinson, D.J. Studies of Diffusion and Flow by Pulsed NMR Techniques. *Adv. Mol. Relax. Process.* **1972**, *3*, 119–131. [[CrossRef](#)]
51. Ryser, P. The Mysterious Root Length. *Plant Soil* **2006**, *286*, 1–6. [[CrossRef](#)]

Chapitre IV. Exploration par IRM portable de la structure-fonction pour l'utilisation de l'eau par les racines

Le corps de ce chapitre correspond à l'article « *Root structure-function relationships in water use for several herbaceous species revealed by portable NMR* » qui est en processus de soumission.

Résumé de l'article :

Les plantes peuvent être caractérisées par leur stratégie d'acquisition des ressources. Ces stratégies évoluent sur un spectre allant de l'acquisition rapide des ressources, caractéristique d'une stratégie d'acquisition, à l'acquisition lente, caractéristique d'une stratégie de conservation. Ces stratégies sont définies sur la base des traits foliaires et des traits racinaires tels que la densité de tissus, la surface spécifique foliaire ou encore la longueur spécifique des racines, et des mesures fonctionnelles telles que la conductance stomatique. Néanmoins, bien que ces stratégies soient bien définies pour des ressources carbonées ou azotées, elles restent peu décrites pour l'acquisition de l'eau. La RMN est une technique de choix pour étudier la quantité et la dynamique de l'eau présente dans les plantes. Précédemment, nous avons montré que l'IRM portable permet la caractérisation hydrique des racines d'herbacées dans un environnement contrôlé. L'objectif ici a été de déterminer si, à partir de cette caractérisation hydrique par RMN, la relation structure-fonction pour l'utilisation de l'eau par les racines pouvait être explorée et si cela pouvait nous permettre d'analyser les stratégies d'acquisition de l'eau des plantes testées en conditions hydriques non limitantes. Pour cela, dix plantes prairiales contrastées ont été cultivées en rhizotron avec toile. Des profils et des mesures de relaxation transversale ont été acquis avec le NMR-MOUSE. En parallèle, des mesures écophysiologiques de potentiel hydrique foliaire, de conductance stomatique et d'humidité du sol ont été réalisées. Des traits morphologiques foliaires et racinaires ont également été mesurés.

Il a ainsi été observé que les profils RMN reflétaient la diversité des racines dans la zone de mesure étudiée. Des points d'inflexion présents sur certains profils pourraient être dus à l'arrangement spatial des racines de gros et de faibles diamètres et/ou à la présence d'un gradient d'eau entre la toile et la plaque transparente. L'intégrale de la zone des racines variait entre espèces et était liée à des traits quantitatifs racinaires tels que le volume racinaire. La quantité d'eau dans la zone racinaire a pu être estimée à partir de cette intégrale et une variation de cette quantité selon un cycle diurne, avec une diminution le jour et une stabilisation la nuit

(figure supplémentaire 3, en jaune), a été observée. Cette variation diurne a également été observée chez certaines espèces au niveau des mesures de T_2 . Il est également apparu que la valeur et la proportion des T_2 étaient liées négativement à la densité des tissus racinaires et pouvaient renseigner sur le rapport cortex/stèle, liant les paramètres T_2 à une exploration de la fonction de transport de l'eau des racines. Ainsi, ces variations de quantité d'eau et de T_2 n'étaient pas liées aux variations de température entre le jour et la nuit mais à la fonction des plantes (flux d'eau lié à la transpiration des plantes).

Cette deuxième étude a permis de montrer que l'IRM portable permet de caractériser la structure globale des racines d'herbacées présentes dans la fenêtre de mesure RMN ainsi que leur fonction d'utilisation de l'eau. Elle confirme également que l'IRM portable peut détecter le cycle diurne de transpiration des plantes. Par ailleurs, elle montre qu'il existe une relation entre l'intégrale de la zone des racines et les traits quantitatifs racinaires, et que le T_2 long est lié négativement au RTD, notamment des fines racines. Ainsi, le T_2 pourrait être lié à la proportion de stèle, et donc à la conductivité hydraulique des racines et, de fait, à leur capacité de transport.

Root structure-function relationships in water use for several herbaceous species revealed by portable NMR

Magali Nuix^{1,2,3}, Amidou Sissou Traoré^{1,2}, Shannan Blystone^{1,2,3}, Jean-Marie Bonny^{1,2}, Guilhem Pagés^{1,2} and Catherine Picon-Cochard^{3,*}

¹ INRAE, UR QuaPA, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France ;

² INRAE, PROBE research infrastructure, AgroResonance facility, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

³ Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UREP, 63000 Clermont-Ferrand, France;

* Correspondence should be addressed to catherine.picon-cochard@inrae.fr, Tel.: +33(0)-443-761-615 (C.P.-C.);

ORCID numbers :

M.N. : <https://orcid.org/0000-0003-0960-8525>

A.S. T.: <https://orcid.org/0000-0002-3574-3475>

S.B.: <https://orcid.org/0000-0002-8494-2411>

J.-M.B. : <https://orcid.org/0000-0003-2858-7459>

G.P. : <https://orcid.org/0000-0001-9368-5237>

C.P.-C. : <https://orcid.org/0000-0001-7728-8936>

Running title

Root structure-function characterized by LF-NMR.

One-sentence summary

Portable NMR is a suitable tool to characterize non-invasively the root structure-function of herbaceous species and to reveal their water use strategies.

Abstract

Low-field proton nuclear magnetic resonance is an interesting tool to study water in plant roots, as it is non-invasive and allows measurements outside the laboratory. The objective of this study was to analyse the structure-function relationships of roots in water use by a set of approaches including portable nuclear magnetic resonance, ecophysiological and morphological measurements. Thus, ten herbaceous species grown in rhizotrons were studied under controlled environmental conditions. The nuclear magnetic resonance signal of root water as a function of measurement depth, and the transverse relaxation time, which gives information on water mobility, were acquired with a single-sided nuclear magnetic resonance sensor. Positive relationships between the root signal intensity and quantitative root characteristics, such as root volume and water quantity, were observed. The temporal evolution of root water quantity, as well as the diurnal variations of the transverse relaxation time, were consistent with ecophysiological measurements and thus with plant physiology, especially with transpiration flux. Furthermore, transverse relaxation time was negatively related to fine root tissue density, a proxy for stele percentage. Our results revealed three types of structure-function relationships in water use, (i) species that follow the root economic spectrum (acquisitive, conservative), (ii) those that show contrasting water transport (high and low fine root tissue density and water mobility), and (iii) those that are intermediate. This study showed that low-field nuclear magnetic resonance is a promising analytical tool to characterize the overall structure of the root system as well as its function in water use.

Keywords

Dicots, Leaf water potential, Monocots, Root traits, Single-sided NMR, Soil humidity, Stomatal conductance

INTRODUCTION

In plant ecology, the functional approach has revealed a continuous fundamental trade-off between leaf traits associated with resource acquisition (fast, acquisitive) and resource conservation (slow, conservative) (Grime et al., 1997; Westoby et al., 2002; Reich, 2014). Some studies have suggested that this trade-off could be extended to root traits (Prieto et al., 2015; Roumet et al., 2016; Fort et al., 2017). However, little is known about structure-function relationships in plant roots (Wahl and Ryser, 2000; Hummel et al., 2007; Zhou et al., 2022). Their localisation in a complex medium, namely the soil, has consequences on the plasticity of root traits such as diameter, specific root length (SRL) and root tissue density (RTD). Moreover, within the same root system, the position of the roots within the architecture, i.e., the order of branching, strongly modifies the values of the traits (Picon-Cochard et al., 2012; McCormack et al., 2015). The root economic spectrum was developed for carbon and nitrogen and not for water use, and it is unclear how it is applicable to plant water use. Characterizing the structure-function relationship of plant roots from a water use point of view is important to better understand their water use strategy.

On one end of this trade-off, fine root trait values such as small values of average root diameter and RTD and high values of SRL are associated with rapid acquisition strategies as they allow soil exploration for nutrients and water at a fine scale without a high carbon investment per unit of root length. On the other end, coarse roots with dense tissues are associated with resource conservation strategies (Hummel et al., 2007; Picon-Cochard et al., 2012; Fort et al., 2017) along with higher hydraulic conductivity (Rieger and Litvin, 1999; Masumoto et al., 2022; Zhou et al., 2022). Root water use can be divided into two components: (i) radial transfer of water within the roots through the cortex to the stele, and (ii) axial transfer of water within the stele, which depends on transpiration and anatomical traits such as the size and the number of vessels. Studies have highlighted the fact that anatomical features of the roots, such as the size of the cortex and stele, can reflect both absorption and transport functions (Rieger and Litvin, 1999; Masumoto et al., 2022; Zhou et al., 2022). Nonetheless, it appears that a root economic spectrum for water use based on root diameter is not accurate. Indeed, Zhou *et al.* (2021) demonstrated that root diameter is not always linked with stele diameter and that for the same value of root diameter, cortex and stele proportions can vary across species. Moreover, a trade-off between root water uptake and root water transport has been observed according to root order but also along a root segment with an evolution of cortex and stele proportions (Heymans et al., 2020; Heymans et al., 2021; Masumoto et al., 2022; Zhou et al., 2022). Even if root diameter and RTD could be a proxy of root hydraulic conductivity without giving information

on the vessels' size and number (Zhou et al., 2021), it seems that RTD is a better proxy to estimate root water use than root diameter as it is related to stele proportion (Wahl and Ryser, 2000; Hummel et al., 2007; Masumoto et al., 2022), and so it could be used as the basis of a root economic spectrum for water use. However, it is not possible to measure this trait without destructing the roots and it would be interesting to have a method to estimate it in an intact plant. Imaging methods including visible light imaging, positron emissions, neutron or X-ray tomography, or magnetic resonance imaging (MRI) can be valuable tools to study the structure and/or function of plants. For example, they were used to visualize root system architecture as well as its water uptake (Doussan et al., 2006; Pohlmeier et al., 2008; Zarebanadkouki et al., 2013), the water distribution in leaves, and to estimate the leaf area or growth (Defraeye et al., 2014; Itakura and Hosoi, 2018; Pfeifer et al., 2018). Among these imaging methods, nuclear magnetic resonance (NMR) presents several advantages. Indeed, as it is non-destructive and non-invasive, ^1H -NMR stands as well-suited to study the state of water in intact plants. Depending on the NMR acquisition parameters, different contrasts can be chosen like proton density, longitudinal (T_1) or transverse (T_2) relaxation times (Van As, 2007). Whereas the proton density gives information on the amount of water, relaxation times, especially transversal relaxation, give information on water mobility. Indeed, high T_2 values are associated with mobile water while low T_2 values with water molecules in a restricted state, such as the ones present in the cell wall compartment (Van As, 2007). NMR spectrometers are mostly laboratory instruments. However, it is possible to displace some low-field instruments (spectrometers with a static magnetic field lower than 1 Tesla). These instruments should be considered to study plants outside the laboratory, directly in the plant's natural environment, i.e., *in situ*. Organ structure and function have been studied with this approach inside and outside the laboratory, under well-watered and hydric stress conditions. The structure of stems (Kimura et al., 2011; Nagata et al., 2016; Terada et al., 2020), the daily or monthly evolution of fluxes in xylem and phloem tissues (Windt et al., 2006; Terada et al., 2020), the seasonal growth of a tree stem (Nagata et al., 2016), the formation of xylem embolism (Meixner et al., 2020) and the evolution of the water content under well-watered and water limited conditions (Malone et al., 2016) have been examined. Nonetheless, these experiments were mainly performed on plant stems, the size of which was limited by the magnet bore diameter. Unilateral magnets make it possible to overcome this limitation, permitting the study of a sample regardless of its size, and so the study of other organs, like leaves (Capitani et al., 2009) or roots (Nuixé et al., 2021). In our previous study, the suitability of such a device, i.e., the NMR-MOUSE (Mobile Universal Surface Explorer) to characterize root water status of three herbaceous species was

demonstrated across day-and-night cycles (Nuix et al., 2021). Here, we investigated if low-field NMR measurements performed *in situ* on roots can be used to infer root structure-function relationships in a range of herbaceous species having contrasted root traits to understand herbaceous water acquisition strategies. We assume that (i) NMR profiles acquired with this unilateral MRI will allow measuring the root water quantity in the spanned volume while (ii) changes in the dynamics of plant water use will be correlated with the measured T_2 , as well as RTD.

RESULTS

NMR profiles

NMR-MOUSE profiles correspond to the NMR signal intensity in function of the measurement depth. Figure 1 shows a profile recorded for each species when they experienced a similar end-of-night leaf water potential (between 0 and -0.38 MPa, Table 1). On these profiles, the different compartments composing the rhizotron model were found. The zone with a high NMR signal amplitude starting at 0 mm with one or more peaks corresponded to the root zone and varied according to the species. Then, a zone with a low NMR signal amplitude (<0.01 to 0.06 μV) was observed, except for *R. acetosa*, and corresponded to the soil compartment. For ease of comparison, the signal from the transparent wall was removed for all the profiles to begin with the root zone at 0 mm (for visualization of the raw data, cf. Supplementary Figure S1).

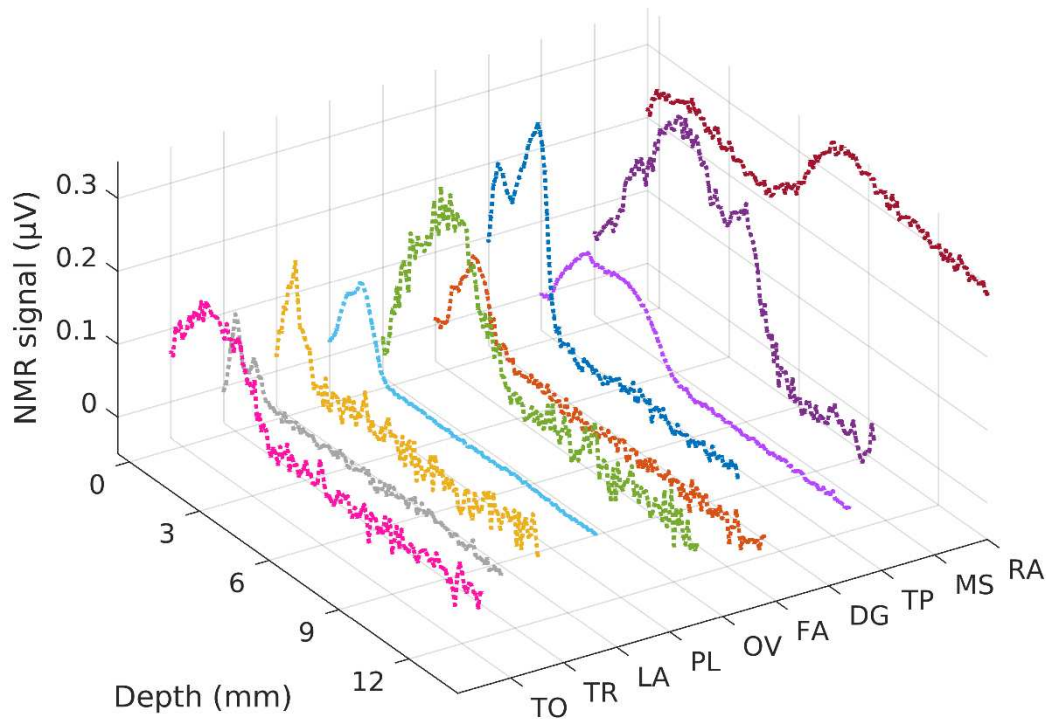


Figure 1. NMR profiles of *T. officinale* (TO), *T. repens* (TR), *L. angustifolius* (LA), *P. lanceolata* (PL), *O. viciifolia* (OV), *F. arundinacea* (FA), *D. glomerata* (DG), *T. pratense* (TP), *M. sativa* (MS) and *R. acetosa* (RA) acquired at equivalent end-of-night LWP, between 0 and -0.38 MPa (Table 1). The zone with a high signal amplitude corresponds to the roots and the zone with a low signal amplitude to the soil.

The profiles were contrasted in signal intensity. While the root zone peaks of *T. pratense*, *T. repens*, *F. arundinacea* and *P. lanceolata* barely reached 0.1 μV , that of *R. acetosa* was always near 0.3 μV , with a maximum at 0.35 μV . They also differed in the width of the root zone, from 1.6 mm for *L. angustifolius* and *T. repens* to 14.7 mm for *R. acetosa*, leading to large variation in root NMR integrals (Table 1). The highest value integral (*R. acetosa*, 6186 μV) was nearly 45 times higher than the lowest (*T. repens*, 138 μV). *T. repens*, *L. angustifolius*, *P. lanceolata* and *F. arundinacea* had the lowest root NMR integral values (<500 μV). *T. pratense*, *T. officinale*, *D. glomerata* and *O. viciifolia* had intermediate values (between 500 and 1000 μV). *M. sativa* and especially *R. acetosa* had the highest root NMR integral (>1500 μV), with the integral value of *R. acetosa* being nearly three times (2.7) higher than that of *M. sativa* (2285 μV).

Some profiles had an inflection point separating the root zone into two peaks (inflection point positioned at 1.1 mm for *T. repens*, 1.1 mm for *D. glomerata*, 2.4 mm for *T. pratense*, 5.5 mm for *M. sativa* and 5.4 mm for *R. acetosa*, Figure 1 & Table 1).

Table 1. Total and peak root NMR integrals observed on the profiles presented in Figure 1.

Species	Root NMR integral (μV)	Peak integral near 0 mm (μV)	Peak integral near soil (μV)	Profile mean LWP (MPa)
<i>T. officinale</i>	830			-0.20
<i>T. repens</i>	138	81	57	-0.17
<i>L. angustifolius</i>	210			
<i>P. lanceolata</i>	259			0.00
<i>O. viciifolia</i>	958			-0.20
<i>F. arundinacea</i>	267			-0.14
<i>D. glomerata</i>	892	361	532	-0.17
<i>T. pratense</i>	552	221	331	-0.17
<i>M. sativa</i>	2285	1791	495	-0.37
<i>R. acetosa</i>	6186	1824	4362	0.00

Leaf and root morphological and ecophysiological traits

Table 2 summarizes all the traits. Leaf area (LA) ranged from 0.01 m² for *L. angustifolius* to 0.62 m² for *T. officinale*. Specific leaf area (SLA) varied by a factor of 2.5 between species, from 91.7 cm² g⁻¹ for *L. angustifolius* to 232.6 cm² g⁻¹ for *T. officinale*. Stomatal conductance (Gs) differed greatly among species, ranging from an average of 104 mmol m⁻² s⁻¹ for *D. glomerata* to 953 mmol m⁻² s⁻¹ for *T. officinale*. *O. viciifolia* and the two monocots (*D. glomerata* and *F. arundinacea*) had values below 200 mmol m⁻² s⁻¹ while the other species had values above 350 mmol m⁻² s⁻¹. *R. acetosa* and *O. viciifolia* showed the smallest variation of leaf water potential (ΔLWP) between night and day (-0.36 and -0.53 MPa respectively). *D. glomerata*, *T. officinale*, *T. repens* and *M. sativa* showed the largest fluctuations with a difference between -1.06 and -1.82 MPa. The others species showed an average of -0.7 MPa (cf. also to Supplementary Figure S2). All species had a soil water content (SWC) between 10% and 30%, which displayed the same temporal evolution with a decrease during the day and a constant value at night (cf. Supplementary Figure S3). *O. viciifolia*, *R. acetosa* and *T. pratense* showed the smallest variation of SWC (ΔSWC) between night and day (between -0.4 and -0.99%). *P. lanceolata*, *M. sativa* and *T. repens* had intermediate values (between -1.79 and -2.05%), while *D. glomerata*, *F. arundinacea* and *T. officinale* showed the largest fluctuations with a difference between -2.51 and -3.80%.

Root morphological traits were measured in the zone where the NMR measurements were performed. Table 2 summarizes the values for these different parameters, namely, root volume (RootV), mean root diameter (RootD), specific root length (SRL), root tissue density for all root types (RTD) and for roots having a diameter lower than 1 mm (97% of the total volume of the scan considered except for *L. angustifolius* where only a scan was acquired and for which fine roots represented 63% of the total root volume) (FineRTD), root mass (RootM), and root

189 water content (RootWC). Highly contrasting root characteristic values were observed. Indeed,
 190 there was a factor of around 220 between the lowest and highest value of root volume (0.08
 191 cm³ for *T. officinale* and 18.27 cm³ for *R. acetosa*). The mean root diameter ranged between
 192 0.16 mm for *T. officinale* to 0.76 mm for *O. viciifolia*. *T. officinale*, *T. repens* and the two
 193 monocots had the lowest values of mean root diameter, around 0.2 mm. *R. acetosa*, *O. viciifolia*
 194 and *L. angustifolius* had the lowest values of SRL, around 53 m g⁻¹, while *T. officinale* had the
 195 highest, with 277 m g⁻¹. The RTD ranged between 0.061 g cm⁻³ for *L. angustifolius* and 0.292
 196 g cm⁻³ for *M. sativa*, meaning that there was a factor of 4.8 separating the lowest value from the
 197 highest. *T. officinale*, *F. arundinacea* and *P. lanceolata* had an RTD between 0.150 g cm⁻³ and
 198 0.200 g cm⁻³, whereas *D. glomerata*, *T. pratense* and *O. viciifolia* had an RTD between 0.200
 199 g cm⁻³ and 0.250 g cm⁻³. *T. repens*, *R. acetosa* and *M. sativa* had an RTD higher than 0.250 g
 200 cm⁻³. The RTD of fine roots ranged from 0.061 g cm⁻³ for *L. angustifolius* to 0.259 g cm⁻³ for
 201 *T. repens*. *L. angustifolius* and *P. lanceolata* had the lowest values, FineRTD being lower than
 202 0.150 g cm⁻³. *T. officinale*, *R. acetosa*, *O. viciifolia*, *T. pratense* and *F. arundinacea* had a
 203 FineRTD between 0.150 g cm⁻³ and 0.200 g cm⁻³. *M. sativa*, *D. glomerata* and *T. repens* had
 204 the highest values, with more than 0.200 g cm⁻³. The root mass was widely distributed with a
 205 factor of 380 between the lowest and highest values (0.01 g for *T. officinale* and 4.96 g for *R.*
 206 *acetosa*). *M. sativa* and *R. acetosa* had one of the highest mean root diameters, volumes, and
 207 masses, but the lowest root water content (<0.70). *L. angustifolius* and *T. officinale* had the
 208 highest values of root water content, around 0.84. Root water quantity (RWQ), calculated as
 209 the product of the root mass and the root water content, ranged between 0.01 g for *T. officinale*
 210 and 3.22 g for *R. acetosa*. In addition, *T. officinale*, *L. angustifolius* and *T. repens* had an RWQ
 211 lower than 0.1 g. *P. lanceolata*, *O. viciifolia*, *F. arundinacea*, *D. glomerata* and *T. pratense* had
 212 an intermediate RWQ (between 0.1 g and 1 g). *M. sativa* and *R. acetosa* had the highest values,
 213 with 1.1 g and 3.22 g, respectively.

214 **Table 2.** Leaf morphological and ecophysiological traits and root morphological traits of the 10 species. “–” corresponds to the absence of data.

Species	LA (m ²)	SLA (cm ² g ⁻¹)	Gs (mmol m ⁻² s ⁻¹)	ΔLWP (MPa)	ΔSWC (%)	Root V (cm ³)	Root D (mm)	SRL (m g ⁻¹)	RTD (g cm ⁻³)	FineRTD (g cm ⁻³)	Root M (g)	RWC (g g ⁻¹)	RWQ (g)
<i>T. officinale</i>	0.62	232.57	952.78	-1.48	-3.80	0.08	0.16	277.2	0.157	0.157	0.01	0.83	0.01
<i>T. repens</i>	0.24	147.12	366.57	-1.39	-2.05	0.15	0.22	98.0	0.263	0.259	0.04	0.73	0.03
<i>L. angustifolius</i>	0.013	91.73	-	-	-	0.38	0.51	54.4	0.061	0.061	0.02	0.85	0.02
<i>P. lanceolata</i>	0.22	183.45	444.07	-0.93	-1.79	0.78	0.27	202.8	0.176	0.136	0.13	0.81	0.11
<i>O. viciifolia</i>	0.54	104.39	122.55	-0.53	-0.40	1.46	0.76	50.6	0.234	0.177	0.31	0.79	0.25
<i>F. arundinacea</i>	0.17	145.66	199.13	-0.41	-2.51	2.10	0.23	158.3	0.160	0.198	0.35	0.77	0.27
<i>D. glomerata</i>	0.61	107.66	104.10	-1.82	-2.51	2.43	0.22	133.2	0.203	0.220	0.51	0.77	0.39
<i>T. pratense</i>	0.22	192.30	-	-0.81	-0.83	3.11	0.30	108.4	0.217	0.182	0.69	0.79	0.54
<i>M. sativa</i>	0.5	163.34	-	-1.09	-1.83	5.65	0.43	105.1	0.292	0.212	1.63	0.68	1.10
<i>R. acetosa</i>	0.36	207.47	396.49	-0.36	-0.99	18.27	0.66	53.5	0.275	0.174	4.96	0.65	3.22

215

Figure 2 represents a more detailed analysis of the root volume by considering the proportion of the different root diameters. It shows that 94%, 77% and 58% of the root volume of *R. acetosa*, *M. sativa* and *T. pratense*, respectively, was due to coarse roots i.e., roots having a diameter greater than 1 mm. Conversely, 67%, 55% and 53% of the root volume of *T. officinale*, *P. lanceolata* and *T. repens*, respectively, was due to very fine roots, i.e., with a diameter lower than 0.4 mm. The two monocots did not have roots larger than 2 mm in diameter and had a homogeneous distribution of root volume according to root diameter.

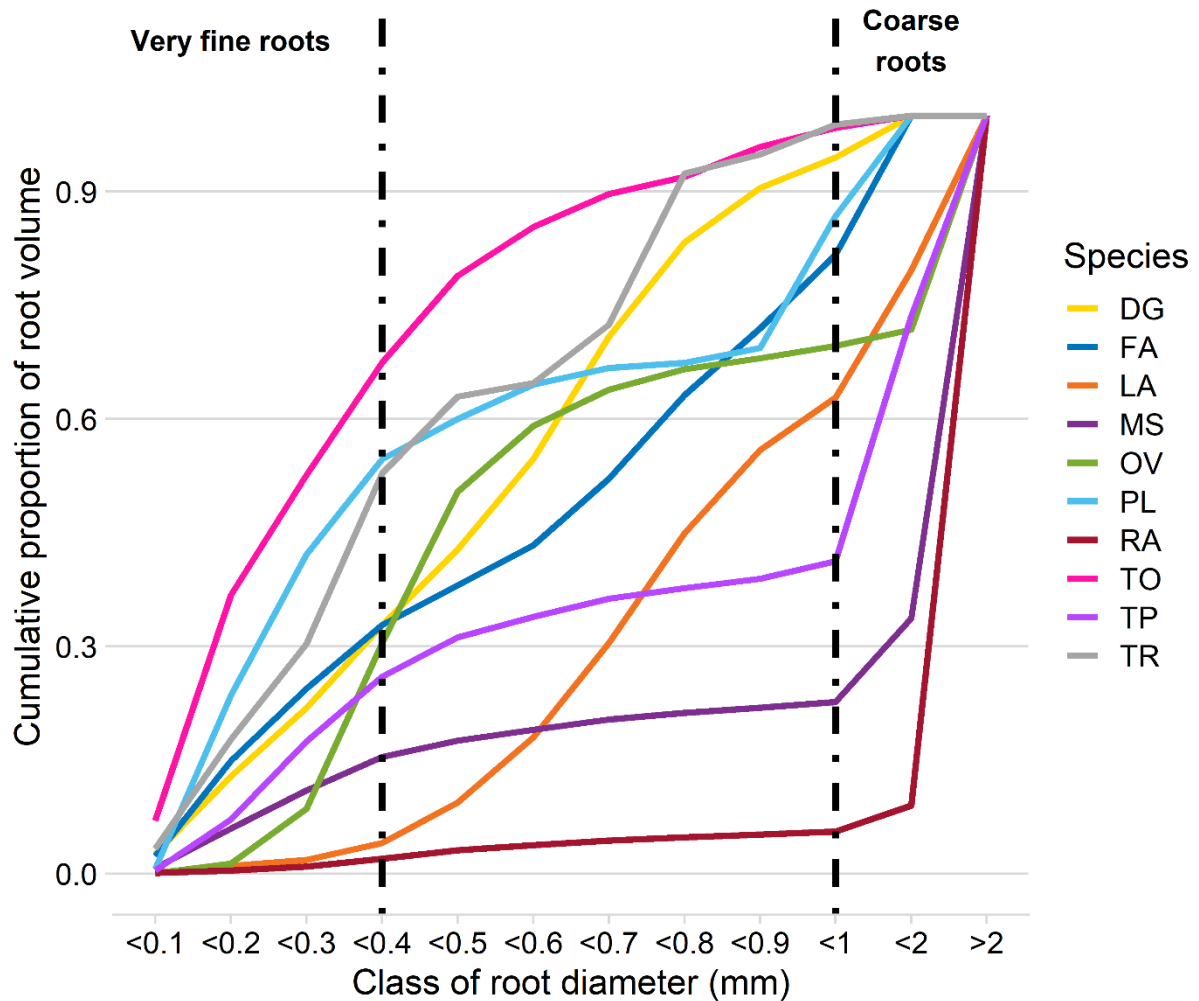


Figure 2. Cumulative proportion of root volume per class of root diameter (mm) measured within the NMR measurement zone for each species.

Links between morphological, ecophysiological traits and NMR profiles

Root NMR integrals correlated with quantitative root traits. Excellent positive correlations between root NMR integrals, root volume and root water quantity were highlighted ($r^2 = 0.96$, p -values < 0.05 , Figure 3 for the latter). In the NMR window pictures of *T. pratense* and *M. sativa* (cf. Supplementary Figure S4), it appeared that coarse roots were mainly localized

against the transparent wall and fine roots were more against the textile. From the data used to produce Table 2, the coarse root volume was extracted (4.277 cm³ for *M. sativa* and 1.031 cm³ for *T. pratense*) and was plotted against the root NMR integral of the peak near the transparent wall. These data pairs agreed well in the relationship observed between the root NMR integral and the root volume (cf. Supplementary Figure S5).

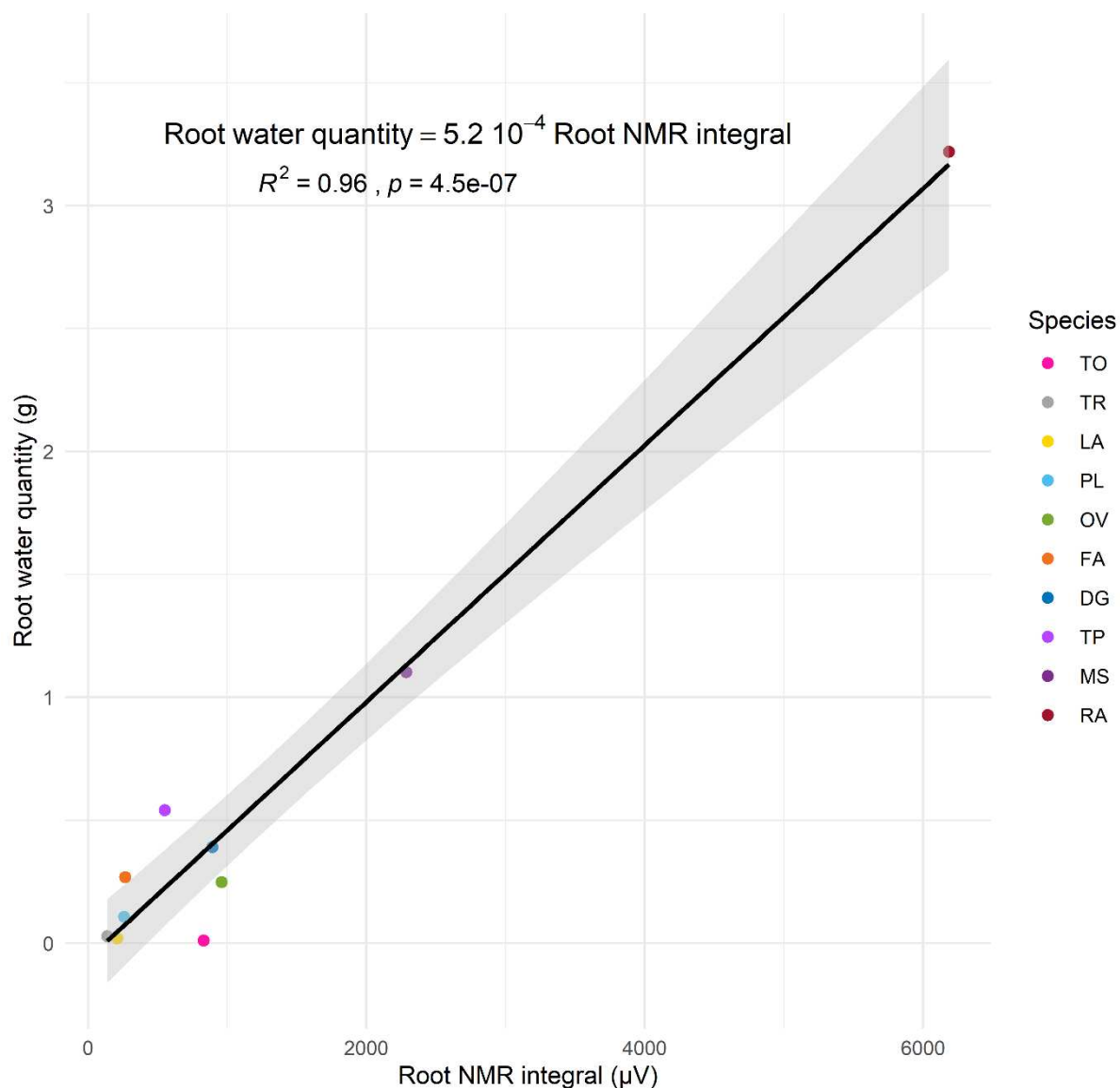


Figure 3. Linear relationship observed between the root water quantity and the root NMR integral calculated from the profiles shown in Figure 1.

The equation derived from the linear regression between root water quantity and the root NMR integral (Figure 3) made it possible to calculate the amount of root water for each profile. For all species, we observed a decrease of the root water quantity during the day and a plateau

during the night in agreement with the ecophysiological measurements (cf. Supplementary Figures S2 and S3, RWQ is represented on figure S3 in yellow).

Temporal evolution of the transversal relaxation times (T_2) measured in roots

Figure 4 represents the temporal evolution of the values of both transversal relaxation times for the different species. For all nine species the measured short T_2 value displayed moderate intra and inter-species changes with a mean value around 5.0 ms. Conversely, higher amplitude variations were observed for the long T_2 value between species. Indeed, at night, the long T_2 value varied between a mean value of 29.9 ms for *F. arundinacea* to 75.9 ms for *P. lanceolata*. During the day, the mean long T_2 value ranged from 31.7 ms for *F. arundinacea* to 66.0 ms for *O. viciifolia*. Globally, four species had mean long T_2 values greater than 50 ms (*T. officinale*, *D. glomerata*, *O. viciifolia*, and *P. lanceolata*). A significant day-night variation of the long T_2 value could be observed in Figure 4 (green boxes) for four out of nine species. For these four species, the value of the T_2 at night was systematically higher than the value of the T_2 during the day. The increase ranged from 7.3% for *O. viciifolia* to 34.7% for *T. repens*, through 11.3% for *D. glomerata* and 15.7% for *P. lanceolata*. Whereas the proportion of short and long T_2 values did not vary between day and night for each species, the proportion of T_2 values varied greatly between species (cf. Supplementary Materials Table S1).

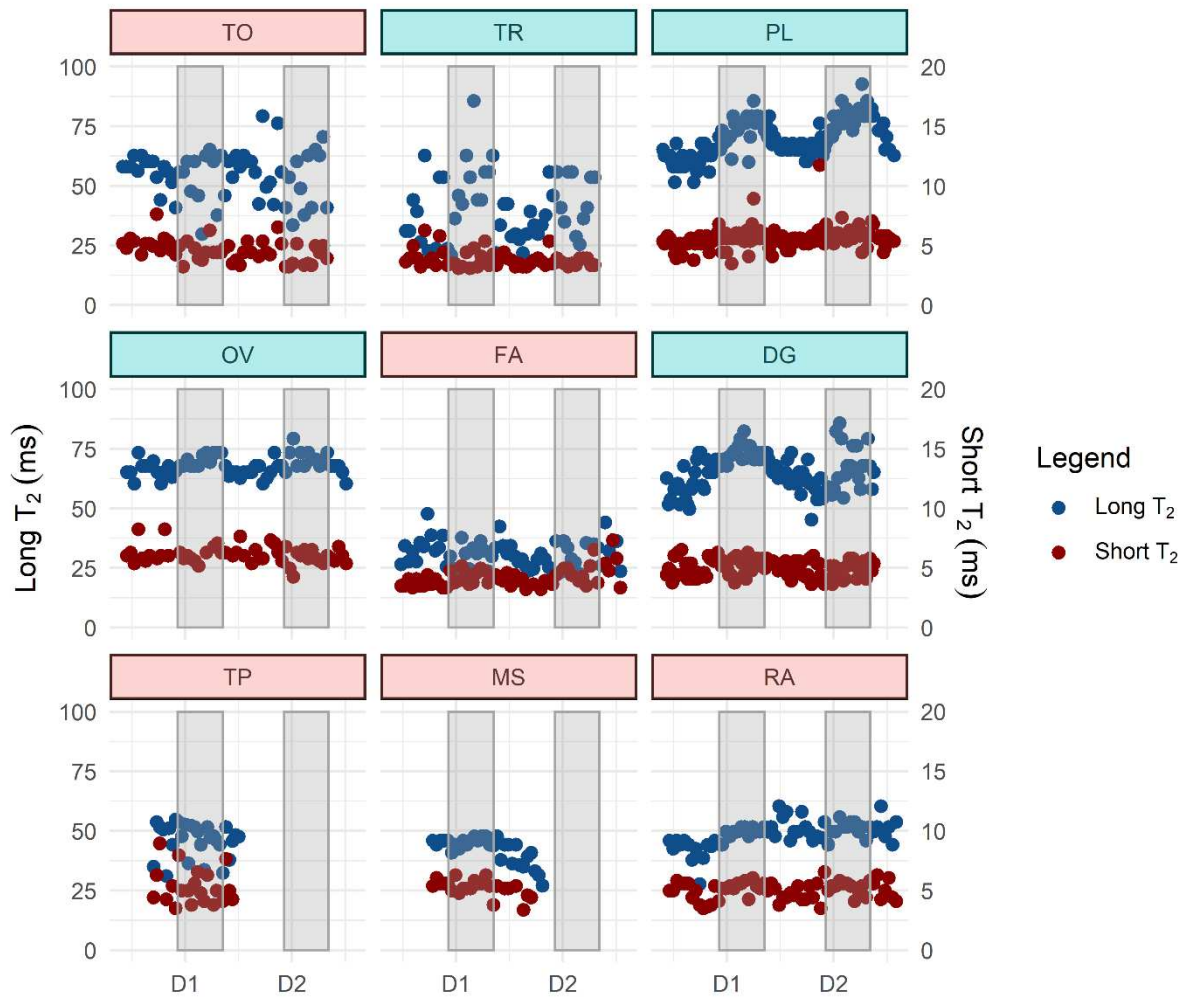


Figure 4. Temporal evolution of short (red) and long (blue) T_2 values for all species measured at one specific depth.

Links between morphological, ecophysiological traits and T_2 results

A principal component analysis (PCA) was performed in order to investigate relationships between plant traits (RootWC, SRL, global RTD (RTD) and RTD of fine roots (FineRTD), RootV), average ecophysiological parameters (DeltaLWP and DeltaSWC) and NMR measurements (proportion of long $T_{2, \text{day}}$ (PropLongT2d) and root NMR integral (RootIntegral)) (Figure 5). 74.7% of the total variance was explained by the two first components. Component 1 explained 49.4% of the total variance and was mainly represented by SRL, the root water content, the root volume, RTD, the root NMR integral and the delta of soil water content. Component 2 explained 25.3% of the total variance and was mostly represented by the proportion of long $T_{2, \text{day}}$ and FineRTD. *T. officinale*, *M. sativa* and *R. acetosa* were well represented on the first axis while *T. repens* and *P. lanceolata* were best represented on the second axis. In contrast, monocots, *O. viciifolia* and *T. pratense* were poorly represented on

these two axes. All numerical PCA results are summarized in Supplementary Materials Table 2.

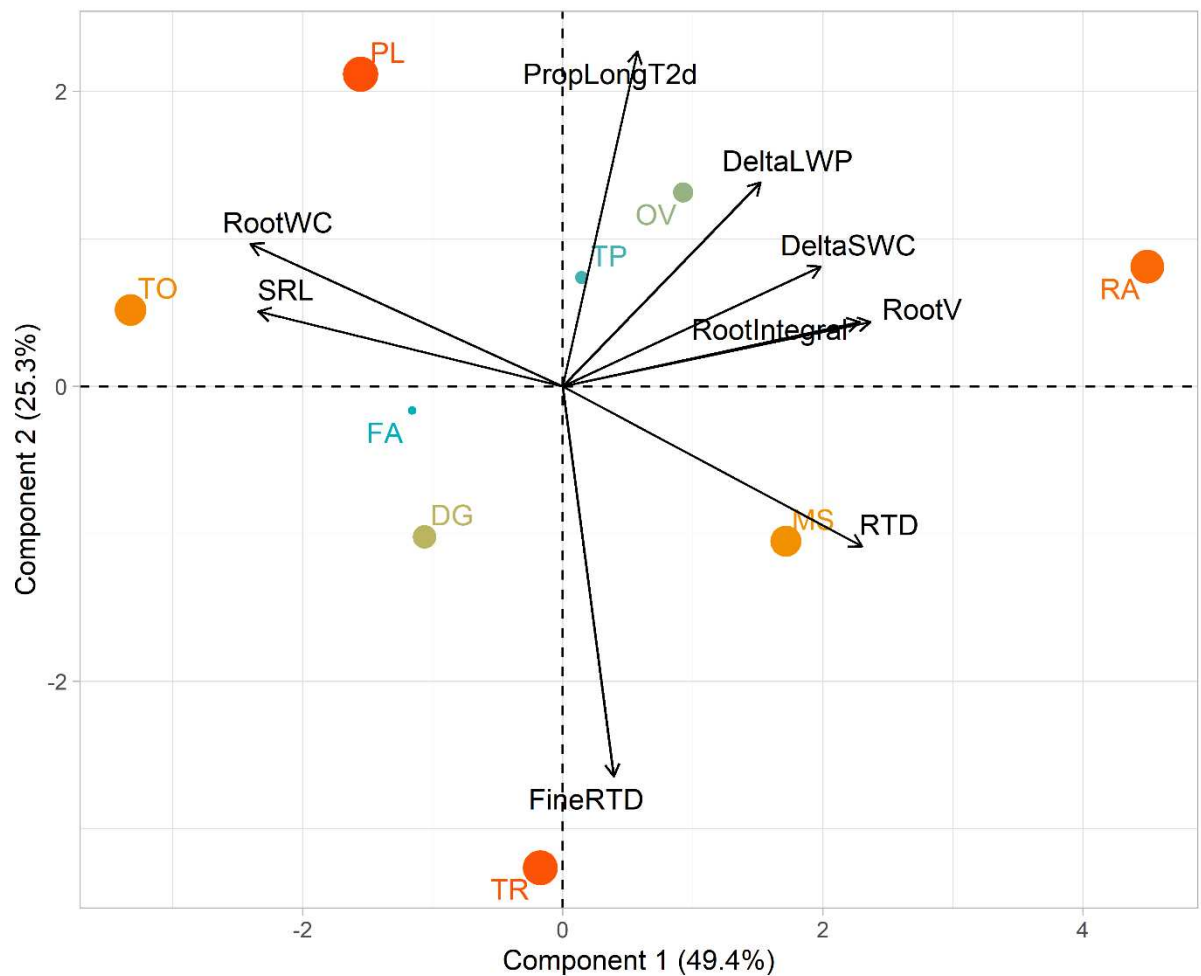


Figure 5. Principal component analysis (PCA) performed with root traits, ecophysiological and NMR parameters. Colors and point size represented the quality of the representation of individuals on the axes; the redder and bigger the point is, the better the plant is represented.

DISCUSSION

NMR profiles reveal the root water quantity of ten herbaceous species in a non-destructive way

The NMR profiles were constructed by averaging the signal from the 256 echoes of the NMR decay acquired at each depth, leading to profiles weighted in both proton density and transversal relaxation times. These ponderations allowed a clear differentiation of soil and roots (Nuix et al., 2021). Indeed, NMR signal intensity is much lower in soil than in roots due to both differences in water content, so in proton density, and in T_2 . Soil is a heterogeneous medium (texture, porosity, impurities, ...), and coupled with the strong magnetic field gradient of the spectrometer, it has a deleterious effect on the NMR signal (Gruwel, 2014; Pflugfelder et al.,

2017; Bagnall et al., 2020). Here, as we were not interested by the water inside the soil, we took advantage of this rapid signal loss, compared to roots, to segment the compartments. This is an interesting property to consider in future studies in which roots and soil will be mixed. This has been used to image root architecture with both high-field and low-field MRI (Pflugfelder et al., 2017; Bagnall et al., 2020) and to study root water uptake at high magnetic field strength (Pohlmeier et al., 2008).

As the plants were well-hydrated, these profiles provided information on the total amount of water in the roots localized in the measurement zone. Unlike species such as *T. officinale*, which had a sparse and homogeneous root system composed essentially of fine roots, some species showed an inflection point on their profile (Figure 1). Two hypotheses can be raised. The first one deals with the spatial arrangement of fine and coarse roots in the NMR window as observed for *T. pratense* and *M. sativa*. This hypothesis is supported by a simple visual analysis of the root pictures of these species (cf. Supplementary Figure S4 F and G), showing a dominant presence of coarse roots near the transparent wall, and the fact that the integral of their first peak was mainly related to the presence of coarse roots (cf. Supplementary Figure S5). Nonetheless, as a profile gives an overall image of the water present within the investigated volume but not its distribution, and to go further with this hypothesis, 3D methods such as MRI (Gruwel, 2014) or X-ray tomography (Mooney et al., 2012) should be considered. The second hypothesis is that there is a water gradient in the roots between the textile (high water content) and the transparent wall (low water content) that is intensified by the species' water consumption. Due to this water gradient, roots spatially located near the textile would be more hydrated and would display a higher NMR signal than those near the transparent wall which would dehydrate more rapidly. This could be the case of the evenly distributed roots of *D. glomerata*, which had a high water consumption (high Δ LWP and Δ SWC, Table 2), and where the highest peak in the profile was located near the textile.

The NMR profile (both amplitude and integral) varied significantly between species with *R. acetosa*, *M. sativa* and *O. viciifolia* exhibiting the highest signal amplitude. These species presented a significant proportion of roots having a diameter higher than 1 mm. It was shown in herbaceous and tree species that mean root diameter is related to cortex width (Rieger and Litvin, 1999; Wahl and Ryser, 2000; Kong et al., 2014). Moreover, the Groot database (Guerrero-Ramírez et al., 2021) provides, among other measurements, the root stele fraction for eight out of ten of our species (exception are *L. angustifolius* and *T. officinale*). Using this database, it appears that this root stele fraction is related positively with our RTD, especially with FineRTD (cf. Supplementary Figure S6), being consistent with what was expected

(Hummel et al., 2007). *R. acetosa*, *O. viciifolia* and *T. pratense* were among species having a low root stele fraction and/or RTD. Therefore, it seems that the higher the signal amplitude is, the lower the root stele fraction and/or the RTD are. Despite its root diameter repartition and its low RTD, *L. angustifolius* had a low NMR signal. This can be attributed to the weak number of roots present in our measurement zone and so to the sensitivity of NMR measurements. Indeed, the global root volume and mass were very low compared to the other species having high root diameters. Still, the NMR signal being sensitive to the hydrogen in water, we were able to correlate this signal to the water quantity in the roots for the first time. It also led to a relationship with root volume (cf. Supplementary Figure S5).

Relaxation times give information on root function

Relaxation times are influenced by the interactions of water molecules with their environment. Water molecules bound to macromolecules or surfaces have shorter relaxation times than free water molecules (Van As, 2007). In the analysis of T_2 relaxation times of leaves, Musse *et al.* (2017) found a short T_2 value around 3 ms and they assigned it to the water pool bound to macromolecules and cell walls. Similarly, Jones *et al.* (2012) assigned similar T_2 values in wood to bound water. Thus, we attributed short T_2 values to all the tissue-bound water (independent of the tissue type) whereas long ones were assigned to free and/or mobilizable water. Furthermore, as neither short T_2 values nor their population fractions varied for each species, we concluded that plants were well hydrated. Contrary to short T_2 , long T_2 values varied across species between approximately 30 and 76 ms and with a clear day and night cycle for *P. lanceolata*, *T. repens*, *O. viciifolia* and *D. glomerata*. Those values are comparable with the ones found in the literature on trees (long T_2 in sapwood and heartwood, Jones *et al.* 2012; stem tissues, Meixner *et al.* 2021) and in the cortex and stele of carrot taproot (Sibgatullin et al., 2010).

Because we tested contrasting root systems with different architectures (fibrous; tap-rooted) coming from species of different plant groups (legumes, grasses, forbs) and so with different cortex to stele ratios as reported in the GRoot database (Guerrero-Ramírez et al., 2021), we expected a correlation between RTD and the proportion of T_2 values, as these variables reflect tissue organization through either the density or the water pools. Such a correlation was observed in the case of fine roots. For a high RTD, a higher proportion of bound water, and therefore a lower proportion of free water, is observed. In addition, thanks to MRI, Meixner *et al.* (2021) reported T_2 values in wood of 40, 80, 70-100 and 145 ms for bark, cambium, xylem and pith, respectively. Despite the fact that we cannot compare the T_2 values measured in our

study with the values found by Meixner (due to different magnetic fields, to the strong inhomogeneity of the magnet used in this study), we can note (i) the order of magnitude around tens of ms and (ii) the values vary within a limited range. The root long T_2 times must then be interpreted as a weighted time encompassing both the cortex and stele T_2 values. The species having long T_2 values that are shorter than 50 ms, particularly *R. acetosa*, *M. sativa* and *T. pratense*, were among those with a significant proportion of coarse roots and a high RTD, between 0.19 and 0.24. Therefore, it seems that lower the T_2 value is, the denser the root tissues are. In addition, because there is a positive relationship between RTD and root stele fraction, T_2 values might give information on the stele fraction, with a lower value indicating a higher root stele fraction.

A diurnal variation of the long T_2 values was observed for several species, especially *O. viciifolia*, *P. lanceolata* and *D. glomerata*, with a decline during the day (Figure 4). Water movements, either coherent (directional flux) or incoherent (diffusion), lead to a decrease in NMR signal intensity and relaxation times (Hahn, 1950; Edzes et al., 1998). Here, because the systematic decrease in the long T_2 value during the day was not observed for all species despite the same climatic chamber conditions, we considered the influence of diffusion as weak. Therefore, the decrease in T_2 relaxation times during the day is mainly attributed to the coherent motions that are involved in plant transpiration. The absence of diurnal variation in the long T_2 values observed for *T. officinale*, *F. arundinacea*, *T. pratense*, *M. sativa* and *R. acetosa* can be explained by the origin itself of this T_2 time. Indeed, we previously explained that the value of this relaxation time is weighted by the fraction of cortex and stele. A low relaxation time is characteristic of denser tissues which are correlated with a high root stele fraction. Nonetheless, these fractions of stele do not give us information on the number of vessels inside the stele. It is then possible that, for these species, a low proportion of water flowing in the stele leads to a less sensitive measurement and a possible absence of observation of diurnal cycle. Further studies are needed to explore this hypothesis.

Plant strategies for water use

A principal component analysis was performed to look for revealing water use strategies in a range of herbaceous species using trait syndromes, in well-watered conditions. The first principal component axis highlighted the plant economics spectrum with the expected acquisition (fast)/conservation (slow) resource strategies trade-off (Moreno-Gutiérrez et al., 2012). SRL and the root water content (left part), the root volume, the global RTD and the root NMR integral (right part) contributed the most to this axis. *P. lanceolata* and *T. officinale* are

following an acquisitive resource strategy in agreement with the literature (Molina-Montenegro et al., 2018; Pol et al., 2021) while *R. acetosa* and *M. sativa* are following a conservative one. Although these species are both on the conservative end of the spectrum, they differed in the leaf area, SRL and the difference of leaf water potential and soil water content (Table 2). Those measurements are higher for *M. sativa* than *R. acetosa*. Besides, mean long T_2 values measured during the day, when transpiration occurred, were lower for *M. sativa* than for *R. acetosa*. Therefore, it seems that these conservative species, based on diameter and root volume, showed different speeds of water use, *M. sativa* consumption being faster than that of *R. acetosa*, as underlined by delta LWP and delta SWC (Table 2).

The second principal component followed an axis of water transport capacity, with high contribution of the daily long transversal relaxation time proportion and the RTD of fine roots, both being negatively related. Our results are consistent with those obtained recently by Masumoto *et al.* (2022) showing that root hydraulic conductivity is positively correlated with RTD across tree species. This suggests that root hydraulic conductivity increases with increasing fine root transport capacity, because high RTD values correspond to a high proportion of stele within the root tissues (Wahl and Ryser, 2000; Hummel et al., 2007), which is the main conductive tissue. Thus, fine roots with high stele ratios are considered to have a high transport capacity (Guo et al., 2008; Wang et al., 2016). The stele being denser than the cortex, a high proportion of stele is consistent with a high proportion of short T_2 values (and so a low proportion of long T_2). Therefore, it seems that the long transversal relaxation time components (value and proportion) are negatively related to hydraulic conductivity.

The absence of direct correlations between delta LWP, which is related to transpiration, and the transversal relaxation time component LongT2 could be explained by the lack of synchronization of measurements. Nevertheless, both *T. repens* and *P. lanceolata* were well represented on this second major axis on opposite sides. *T. repens* was characterized by a higher RTD, a lower value and proportion of long $T_{2, \text{day}}$ and a greater difference in water potential and soil water content than *P. lanceolata*. This observation characterized *T. repens* as a higher transpiring species than *P. lanceolata*. This is consistent with the literature as *T. repens* is known to not well regulate its water use by stomata closure (Lucero et al., 2000) and to be drought sensitive (Signarbieux and Feller, 2012).

In conclusion, we showed, for the first time, that low-field MRI is an analytical tool of choice to characterize the overall structure of roots as well as their function. Indeed, we were able to estimate the amount of water in roots, and we confirmed our previous observations that low-

field MRI can detect plant nychthemeral cycles on a larger range of herbaceous species with contrasting water use strategies. In addition, we showed that root long T_2 components are negatively related to RTD, and this could give insights on root hydraulic conductivity as RTD is related to the root stele fraction. In a future study, it could be interesting to focus on root water fluxes and how they evolve during an edaphic drought.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and environment

Three *Medicago sativa* (Maga variety) (MS), one *Lupinus angustifolius* (LA) and four *Onobrychis viciifolia* (Perly ecotype) (OV) plants were germinated from seeds. One *Rumex acetosa* (RA), one *Taraxacum officinale* (TO), one *Plantago lanceolata* (PL), three *Trifolium repens* (TR), three *Trifolium pratense* (TP) plants and three tillers of *Dactylis glomerata* (DG) and *Festuca arundinacea* (FA) were transplanted from the site of Saint-Genès-Champanelle (France). Plants were cultivated in monoculture in rhizotrons. Rhizotrons are parallelepipedic containers (95 cm (height) $\times$ 40 cm (width) $\times$ 5 cm (thickness)) with one face corresponding to a transparent wall, and having holes at the bottom where a pozzolan layer (800 g) was placed to allow for drainage. Nine of the rhizotrons were filled with an upland grassland soil sieved at 7 mm (pH $\cong$ 6.5) and which consisted of 12% of clay, 17% of silt, 59% of sand and 13% of organic matter. The last rhizotron, the one intended for *O. viciifolia*, was filled with a mix of the previous soil and a Limagne soil with a ratio of 60/40 in order to increase the pH. Both soil types were mixed with a slow release fertilizer with a final concentration of 5 g L⁻¹ (NPK 14-7-14, Multicote 12, Haifa, Israel). A textile (Nylon Polyamide made, 100 cm $\times$ 45 cm $\times$ 60 μ m) with a mesh of 30 μ m and with a 20% open area of the pores was positioned between the transparent wall and the soil to separate the root system from the soil while still allowing the transfer of nutrients and water. Rhizotrons with plants inside were then left outside during the winter and the spring before starting measurements in a climatic chamber during the summer.

A day-and-night cycle was applied in the climatic chamber with lights on from 8 am to 10 pm and an ambient temperature of 21°C during the day and of 18°C at night. Environmental conditions were monitored and recorded at 30s-intervals with a data logger (CR6-Wifi, Campbell Scientific Ltd., Loughborough, UK) and averaged over 5-min periods for CO₂ concentration (CARBOCAP, GMP343, Vaisala, Finland) and with a HOBO data logger (ONSET, Bourne, MA, USA) every ten minutes for relative air humidity and temperature. Environmental conditions were the same for all the species (cf. Supplementary Figure S7).

Measurements on rhizotrons were performed throughout the following periods: 9 – 15 July 2020 for *T. pratense*; 23 July – 5 August 2020 for *P. lanceolata*; 7–12 August 2020 for *D. glomerata*; 19 – 24 August 2020 for *T. officinale*; 24 – 30 August 2020 for *T. repens*; 31 August – 8 September 2020 for *M. sativa*; 14 – 21 September 2020 for *O. viciifolia*; 29 September – 5 October 2020 for *F. arundinacea* and 6 – 12 October 2020 for *R. acetosa*.

Ecophysiology and traits

Leaf water potential (LWP, MPa) was measured every fifteen minutes using a psychrometer (PSY1-Stem, ICT International, Armidale, NSW, Australia). Measurements were performed on one, two or three leaves and the values were averaged. We have no LWP measurements for *L. angustifolius* due to the impossibility to correctly position the psychrometer on the narrow leaves. During the experiments (profiles and T_2), for the majority of species, the pre-dawn LWP (blue in Figure S2) was greater than -0.5 MPa. Exceptions included *P. lanceolata*, which reached -0.7 MPa at the end of the night on day 4. Mean variation of leaf water potential (Δ LWP) was calculated as the difference between the minimum day LWP and the end-of-night LWP to analyze for water consumption.

Abaxial stomatal conductance (G_s , $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) was measured with a porometer (AP4, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK) on each species on three leaves, three times per day: morning, midday and afternoon. For the same reason that we were not able to obtain an LWP measurement, *L. angustifolius*' G_s was not recorded.

Soil water content (SWC, $\text{m}^3 \text{ m}^{-3}$, %) was measured at one depth (16 cm) every fifteen minutes in all rhizotrons using a 5-cm long sensor (EC-5, DecagonMeter Group, Pullman, WA, USA) which was placed horizontally before plant installation and connected to a data logger (EM50, DecagonMeter Group, Pullman, WA, USA). SWC measurements failed in the case of *L. angustifolius*. Mean variation of soil water content (Δ SWC) was calculated as the difference between the minimum day SWC and the end-of-night SWC to analyze for water consumption.

At the end of experiments, rhizotrons were harvested and plants were cut and sorted by organ type. The total leaf area (m^2) of green leaves was measured with a leaf area meter (Licor 3100, Licor, Lincoln, NE, USA). Roots present inside the NMR measurement window were also collected. They were washed and frozen in a plastic bag (-18°C) before performing root morphology measurements. After defrosting, roots were stained with methylene blue dye (5 g

L⁻¹) by soaking them for at least 15 minutes at ambient temperature. They were then rinsed in water to remove the stain excess and separated into coarse (>1 mm) and fine roots. The roots were spread in a glass tank containing a small amount of water and then covered with a transparent film to avoid their dehydration during the scan. Then, they were scanned with a flatbed scanner (EPSON perfection V700; Seiko Epson Corp., Suwa, Japan) using the transparent mode at a resolution of 800 dpi. For each species, 6 to 10 images were recorded and thereafter analyzed with WinRhizoPRO software (V2012b, Régent Instruments, Québec, Canada) to determine root length (m), average root diameter (mm), and root volume (cm³) by diameter class (12 classes including 10 classes of 0.1 mm-wide increments from 0 mm to 1 mm, one class for diameters between 1 mm and 2 mm and one class for diameters higher than 2 mm). To avoid bias due to a skewed root diameter distribution, the root volume was calculated as the sum of each volume by diameter class. Root water content (g g⁻¹) was calculated as (fresh mass - dry mass) / (dry mass). The dry mass was obtained by oven-drying the fresh roots (48 hours at 60°C). Specific root length (SRL) was calculated as the average of the ratio of length to dry mass (m g⁻¹); root tissue density (RTD) measured for all root types was calculated as the ratio of dry mass to volume (g cm⁻³); RTD was calculated for fine roots only (< 1mm).

NMR experiments

The NMR experiments were conducted with the same protocol as described in our previous study (Nuix et al., 2021). Briefly, NMR measurements were performed with a 0.3T PM25 NMR-MOUSE spectrometer (Magritek, Wellington, NZ) equipped with a magnet coupled with a 4 cm × 4 cm surface radiofrequency coil placed at 10-mm from the magnet surface due to a spacer having this thickness and positioned on a high precision lift. The surface of the spectrometer was positioned in contact with the transparent wall of the rhizotron with the radiofrequency coil in front of the targeted measurement zone, and was clamped to the rhizotron. With this configuration, the maximum measurement depth was 15 mm and the thickness of the measurement volume was 100 µm.

Profiles were acquired continuously by shifting the NMR measurement volume, from 14.7 mm to 0 mm with a 0.1-mm step of the lift. The signal, expressed in µV, was acquired at each depth with a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence with the following parameters: 256 echoes, an excitation pulse duration of 15 µs, an echo time of 113 µs, and a repetition time of 3000 ms. At the exception of *T. pratense* and *P. lanceolata*, for which eight accumulations were performed (before the protocol was settled), each measurement was repeated four times for

signal averaging (beneficial level of signal/acquisition duration balance). To compare profiles between species and because all acquisition parameters were identical, the NMR signal of *T. pratense* and *P. lanceolata* was divided by the ratio of the accumulations (8/4). Profiles were then obtained by averaging, at each depth, the 256 echoes. To obtain quantitative results and remove the T_2 ponderation in these profiles, the NMR signal (256 echoes recorded at each depth) was fitted with a mono-exponential decay. The amplitude at $t=0$ s was used to calculate the NMR integral values.

Transversal relaxation time (T_2) measurements were also performed. They were recorded for each species at the depth displaying the maximum of signal in the root zone with a CPMG pulse sequence with the following parameters: 2800 echoes, an excitation pulse duration of 12 μ s, an echo time of 100 μ s and a repetition time of 12 s for all species with the exception of *P. lanceolata*. For this species, the different acquisition parameters were 2500 echoes and a repetition time of 10 s. 128 accumulations were performed for *D. glomerata* and *P. lanceolata* and 256 accumulations for the others species. As in our previous study, T_2 values were obtained using a homemade implementation of the Non-Negative Least Square (NNLS) inversion algorithm in Matlab® (MathWorks, Natick, MA, USA). The signal decays were first preprocessed by removing the nine first echoes and the first with a negative amplitude along with all the following. The NNLS algorithm was fed with the decomposition basis of 150 T_2 logarithmically spaced from T_2 min = 3 ms to T_2 max = 1000 ms. A regularization parameter alpha between 1.0025 and 1.0030 was used to control the trade-off between stability and bias. Because we hypothesized a bi-exponential relaxation curve, a mean between values of the same order of magnitude was calculated when more than two pools were obtained. If only a single value was obtained, a mono-exponential fit was performed on the concerned decay.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R.4.2.1 software (R Core Team, 2022). Correlations and principal component analyses were performed to search for and analyze relationships between NMR parameters and morphological and/or ecophysiological measurements. Correlations and PCA were performed with the packages Hmisc and FactoMineR, respectively. *L. angustifolius* was excluded from the PCA because we did not have LWP, SWC and T_2 values. Figures were then produced using the packages ggplot2 and factoextra.

Acknowledgments

We would like to thank David Colosse, Patrick Pichon and Alexandre Salcedo for taking care of the plants. We are also grateful to Abdlatif Benmoussa for his technical support and assistance with the NMR spectrometer and Robert Falcimagne for his help with the climatic chamber.

Author Contributions

A.S.T., G.P. and C.P.-C. designed the research; A.S.T. and C.P.-C. supervised the experiments; M.N., A.S.T., S.B. and C.P.-C. performed the experiments; M.N., A.S.T. and C.P.-C. analyzed the data; M.N., A.S.T., S.B., J.-M.B., G.P. and C.P.-C. wrote the manuscript.

Email addresses: magali.nuix@inrae.fr (M.N.); amidou.traore@inrae.fr (A.T.); shannan.blystone@inrae.fr (S.B.); jean-marie.bonny@inrae.fr (J.-M.B.); guilhem.pages@inrae.fr (G.P.); catherine.picon-cochard@inrae.fr (C.P.-C.)

Funding information

This research was funded by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25) through the M.N.'s PhD grant and by the ANR project OutLabMRI (ANR-19-CE04-0006).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Bagnall GC, Koonjoo N, Altobelli SA, Conradi MS, Fukushima E, Kuethe DO, Mullet JE, Neely H, Rooney WL, Stupic KF, et al (2020) Low-field magnetic resonance imaging of roots in intact clayey and silty soils. *Geoderma* 370: 114356
- Capitani D, Brilli F, Mannina L, Proietti N, Loreto F (2009) In Situ Investigation of Leaf Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol* 149: 1638–1647
- Defraeye T, Derome D, Aregawi W, Cantré D, Hartmann S, Lehmann E, Carmeliet J, Voisard F, Verboven P, Nicolai B (2014) Quantitative neutron imaging of water distribution, venation network and sap flow in leaves. *Planta* 240: 423–436

601 **Doussan C, Pierret A, Garrigues E** (2006) Water uptake by plant roots: II – Modelling of
602 water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system –
603 Comparison with experiments. *Plant and Soil* 283: 99–117

604 **Edzes HT, van Dusschoten D, Van As H** (1998) Quantitative T2 Imaging of Plant Tissues By
605 Means Of Multi-Echo MRI Microscopy. *Magnetic Resonance Imaging* 16: 185–196

606 **Fort F, Volaire F, Guillioni L, Barkaoui K, Navas M-L, Roumet C** (2017) Root traits are
607 related to plant water-use among rangeland Mediterranean species. *Functional Ecology* 31:
608 1700–1709

609 **Grime JP, Thompson K, Hunt R, Hodgson JG, Cornelissen JHC, Rorison IH, Hendry**
610 **GAF, Ashenden TW, Askew AP, Band SR, et al** (1997) Integrated Screening Validates
611 Primary Axes of Specialisation in Plants. *Oikos* 79: 259

612 **Gruwel MLH** (2014) In Situ Magnetic Resonance Imaging of Plant Roots. *Vadose Zone*
613 *Journal* 13: 1–8

614 **Guerrero-Ramírez NR, Mommer L, Freschet GT, Iversen CM, McCormack ML, Kattge**
615 **J, Poorter H, Plas F, Bergmann J, Kuyper TW, et al** (2021) Global root traits (GRooT)
616 database. *Global Ecol Biogeogr* 30: 25–37

617 **Guo D, Xia M, Wei X, Chang W, Liu Y, Wang Z** (2008) Anatomical traits associated with
618 absorption and mycorrhizal colonization are linked to root branch order in twenty-three Chinese
619 temperate tree species. *New Phytologist* 180: 673–683

620 **Hahn EL** (1950) Spin Echoes. *Phys Rev* 80: 580–594

621 **Heymans A, Couvreur V, LaRue T, Paez-Garcia A, Lobet G** (2020) GRANAR, a
622 Computational Tool to Better Understand the Functional Importance of Monocotyledon Root
623 Anatomy. *Plant Physiol* 182: 707–720

624 **Heymans A, Couvreur V, Lobet G** (2021) Combining cross-section images and modeling
625 tools to create high-resolution root system hydraulic atlases in *Zea mays*. *Plant Direct* 5: e00290

626 **Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier É, Roumet C** (2007)
627 Relating root structure and anatomy to whole-plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean
628 species. *New Phytologist* 173: 313–321

629 **Itakura K, Hosoi F** (2018) Automatic Leaf Segmentation for Estimating Leaf Area and Leaf
630 Inclination Angle in 3D Plant Images. *Sensors* 18: 3576

631 **Jones M, Aptaker PS, Cox J, Gardiner BA, McDonald PJ** (2012) A transportable magnetic
632 resonance imaging system for in situ measurements of living trees: The Tree Hugger. *Journal*
633 *of Magnetic Resonance* 218: 133–140

634 **Kimura T, Geya Y, Terada Y, Kose K, Haishi T, Gemma H, Sekozawa Y** (2011)
635 Development of a mobile magnetic resonance imaging system for outdoor tree measurements.
636 Review of Scientific Instruments 82: 053704

637 **Kong D, Ma C, Zhang Q, Li L, Chen X, Zeng H, Guo D** (2014) Leading dimensions in
638 absorptive root trait variation across 96 subtropical forest species. New Phytol 203: 863–872

639 **Lucero DW, Grieu P, Guckert A** (2000) Water deficit and plant competition effects on growth
640 and water-use efficiency of white clover (*Trifolium repens*, L.) and ryegrass (*Lolium perenne*,
641 L.). Plant and Soil 227: 1–15

642 **Malone MW, Yoder J, Hunter JF, Espy MA, Dickman LT, Nelson RO, Vogel SC, Sandin
643 HJ, Sevanto S** (2016) In vivo Observation of Tree Drought Response with Low-Field NMR
644 and Neutron Imaging. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2016.00564

645 **Masumoto T, Ito T, Akatsuki M, Makita N** (2022) Fine root hydraulic conductivity relates
646 to root functional traits in four coniferous species. Rhizosphere 21: 100489

647 **McCormack ML, Dickie IA, Eissenstat DM, Fahey TJ, Fernandez CW, Guo D,
648 Helmisaari H-S, Hobbie EA, Iversen CM, Jackson RB, et al** (2015) Redefining fine roots
649 improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. New
650 Phytologist 207: 505–518

651 **Meixner M, Kochs J, Foerst P, Windt CW** (2021) An integrated magnetic resonance plant
652 imager for mobile use in greenhouse and field. Journal of Magnetic Resonance 323: 106879

653 **Meixner M, Tomasella M, Foerst P, Windt CW** (2020) A small-scale MRI scanner and
654 complementary imaging method to visualize and quantify xylem embolism formation. New
655 Phytol 226: 1517–1529

656 **Molina-Montenegro MA, del Pozo A, Gianoli E** (2018) Ecophysiological basis of the Jack-
657 and-Master strategy: *Taraxacum officinale* (dandelion) as an example of a successful invader.
658 JPECOL 11: rtw121

659 **Mooney SJ, Pridmore TP, Helliwell J, Bennett MJ** (2012) Developing X-ray Computed
660 Tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. Plant Soil 352: 1–
661 22

662 **Moreno-Gutiérrez C, Dawson TE, Nicolás E, Querejeta JI** (2012) Isotopes reveal
663 contrasting water use strategies among coexisting plant species in a Mediterranean ecosystem.
664 New Phytologist 196: 489–496

665 **Musse M, Leport L, Cambert M, Debrandt W, Sorin C, Bouchereau A, Mariette F** (2017)
666 A mobile NMR lab for leaf phenotyping in the field. Plant Methods 13: 53

Nagata A, Kose K, Terada Y (2016) Development of an outdoor MRI system for measuring flow in a living tree. *Journal of Magnetic Resonance* 265: 129–138

Nuixé M, Traoré AS, Blystone S, Bonny J-M, Falcimagne R, Pagès G, Picon-Cochard C (2021) Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by Portable NMR. *Plants* 10: 782

Pfeifer J, Mielewczik M, Friedli M, Kirchgessner N, Walter A (2018) Non-destructive measurement of soybean leaf thickness via X-ray computed tomography allows the study of diel leaf growth rhythms in the third dimension. *J Plant Res* 131: 111–124

Pflugfelder D, Metzner R, van Dusschoten D, Reichel R, Jahnke S, Koller R (2017) Non-invasive imaging of plant roots in different soils using magnetic resonance imaging (MRI). *Plant Methods* 13: 102

Picon-Cochard C, Pilon R, Tarroux E, Pagès L, Robertson J, Dawson L (2012) Effect of species, root branching order and season on the root traits of 13 perennial grass species. *Plant Soil* 353: 47–57

Pohlmeier A, Oros-Peusquens A, Javaux M, Menzel MI, Vanderborght J, Kaffanke J, Romanzetti S, Lindenmair J, Vereecken H, Shah NJ (2008) Changes in Soil Water Content Resulting from Ricinus Root Uptake Monitored by Magnetic Resonance Imaging. *Vadose Zone Journal* 7: 1010–1017

Pol M, Schmidtke K, Lewandowska S (2021) *Plantago lanceolata* – An overview of its agronomically and healing valuable features. *Open Agriculture* 6: 479–488

Prieto I, Roumet C, Cardinael R, Dupraz C, Jourdan C, Kim JH, Maeght JL, Mao Z, Pierret A, Portillo N, et al (2015) Root functional parameters along a land-use gradient: evidence of a community-level economics spectrum. *J Ecol* 103: 361–373

Reich PB (2014) The world-wide ‘fast–slow’ plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology* 102: 275–301

Rieger M, Litvin P (1999) Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy. *Journal of Experimental Botany* 50: 201–209

Roumet C, Birouste M, Picon-Cochard C, Ghestem M, Osman N, Vrignon-Brenas S, Cao K, Stokes A (2016) Root structure–function relationships in 74 species: evidence of a root economics spectrum related to carbon economy. *New Phytol* 210: 815–826

Sibgatullin TA, Vergeldt FJ, Gerkema E, Van As H (2010) Quantitative permeability imaging of plant tissues. *Eur Biophys J* 39: 699–710

Signarbieux C, Feller U (2012) Effects of an extended drought period on physiological properties of grassland species in the field. *J Plant Res* 125: 251–261

Terada Y, Horikawa Y, Nagata A, Kose K, Fukuda K (2020) Dynamics of xylem and phloem sap flow in an outdoor zelkova tree visualized by magnetic resonance imaging. *Tree Physiology* 40: 290–304

Van As H (2007) Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *Journal of Experimental Botany* 58: 743–756

Wahl S, Ryser P (2000) Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist* 148: 459–471

Wang Y, Dong X, Wang H, Wang Z, Gu J (2016) Root tip morphology, anatomy, chemistry and potential hydraulic conductivity vary with soil depth in three temperate hardwood species. *Tree Physiol* 36: 99–108

Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ (2002) Plant Ecological Strategies: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annu Rev Ecol Syst* 33: 125–159

Windt CW, Vergeldt FJ, De Jager PA, Van As H (2006) MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ* 29: 1715–1729

Zarebanadkouki M, Kim YX, Carminati A (2013) Where do roots take up water? Neutron radiography of water flow into the roots of transpiring plants growing in soil. *New Phytol* 199: 1034–1044

Zhou M, Bai W, Li Q, Guo Y, Zhang W-H (2021) Root anatomical traits determined leaf-level physiology and responses to precipitation change of herbaceous species in a temperate steppe. *New Phytologist* 229: 1481–1491

Zhou M, Guo Y, Sheng J, Yuan Y, Zhang W, Bai W (2022) Using anatomical traits to understand root functions across root orders of herbaceous species in a temperate steppe. *New Phytologist* 234: 422–434

Chapitre V. Caractérisation par IRM portable des racines de plantes prairiales soumises à un stress hydrique

V.1. Introduction

À l'échelle d'une plante, l'eau est transportée à travers le continuum sol-plante-atmosphère par le biais de la variation du potentiel hydrique, de la cohésion des molécules d'eau et de la régulation de l'ouverture des stomates (Pickard, 1981). Dans des conditions optimales d'hydratation, l'eau du sol (potentiel hydrique élevé) est absorbée par les racines puis transportée à travers le système vasculaire jusqu'aux feuilles d'où elle s'échappe dans l'air (potentiel hydrique faible) sous forme de vapeur d'eau. Les flux d'eau dans la plante varient selon des facteurs externes tels que les radiations lumineuses (Shimazaki et al., 2007) ou la disponibilité de l'eau dans le sol (Draye et al., 2010), et de facteurs internes tels que la surface foliaire (Brodribb, 2009), la conductance racinaire (Vetterlein and Doussan, 2016) ou encore le rythme circadien (Takase et al., 2011).

Les racines sont au cœur de cette dynamique en permettant l'absorption de l'eau et son transfert du sol vers les autres organes de la plante. L'eau pénètre dans les racines par le biais des aquaporines. Les aquaporines sont des protéines de transport transmembranaires localisées majoritairement dans la membrane plasmique et dans la membrane vacuolaire (Maurel et al., 2008). Leur synthèse est régulée par des facteurs internes tels que le rythme circadien mais aussi externes tels qu'un déficit hydrique (Maurel et al., 2008; Singh et al., 2020). Au sein des racines, dans le cortex, deux voies de transport sont empruntées pour assurer cette fonction d'absorption : (i) la voie apoplasique qui permet le passage d'eau et de solutés par l'apoplasme, compartiment issu de la continuité des parois pectocellulosiques, et (ii) la voie symplasmique qui permet le passage d'eau par les plasmodesmes, et donc par les compartiments cytoplasmiques (Steudle, 2001). L'eau se propage ainsi du cortex vers la stèle où se trouvent les tissus conducteurs incluant le xylème pour le flux ascendant et le phloème pour le flux descendant. La stèle est entourée par l'endoderme dont la principale fonction est de réguler l'entrée de l'eau et des sels minéraux ainsi que la sortie des molécules organiques issues du métabolisme de la plante. Cette régulation est due à la présence des bandes de Caspari qui sont issues de la subérisation des parois des cellules de l'endoderme et qui diminuent la conductivité hydraulique (Steudle, 2001; Vetterlein and Doussan, 2016; Zarebanadkouki et al., 2019).

Avec le réchauffement climatique, une augmentation de l'intensité et de la fréquence des événements extrêmes tels que les sécheresses est attendue (Solomon et al., 2007; Pachauri et al., 2015). Le changement climatique affecte entre autres choses la biodiversité en entraînant une augmentation de la vulnérabilité des espèces végétales (Thuiller et al., 2005; Harrison et al., 2020; Piseddu et al., 2021). Trois mécanismes possibles pouvant augmenter la mortalité des espèces végétales ont été évoqués: la cavitation des vaisseaux de xylème, la privation de carbone et de composés organiques par la diminution de la photosynthèse, et une vulnérabilité accrue aux maladies et aux insectes (Allen et al., 2010). Ces changements affectent ainsi le service de régulation du climat joué par les prairies en réduisant leur capacité à séquestrer le carbone dans le sol (Bai and Cotrufo, 2022).

La première étape de cette séquestration est la photosynthèse qui est couplée avec la transpiration, le flux d'eau sortant de la plante. Lorsque la disponibilité en eau est réduite, le potentiel hydrique du sol diminue restreignant la mobilité de l'eau, et donc son absorption par les racines. Par ailleurs, le mucilage, gel sécrété par les racines afin de les maintenir en contact avec le sol, permet, dans des conditions optimales d'hydratation, d'augmenter la conductance hydraulique du sol (Ahmed et al., 2014). Or, à la suite d'un stress hydrique, le mucilage devient plus visqueux et hydrophobe entraînant une diminution de cette conductance hydraulique (Carminati et al., 2016). L'hydrophobicité de la rhizosphère due à la déshydratation du mucilage impacte ainsi le transport de l'eau à l'interface sol-racines en limitant temporairement son absorption (Zarebanadkouki et al., 2018). De même, en présence d'un stress hydrique, les racines sécrètent une hormone, l'acide abscissique ou ABA. Celle-ci permet de signaler la sécheresse dans la plante et d'entraîner la fermeture partielle des stomates en inhibant leurs aquaporines (Maurel et al., 2016), réduisant ainsi la transpiration (Draye et al., 2010). Une subérisation de l'endoderme, couche la plus interne du cortex (Enstone et al., 2002; Henry et al., 2012) et une lignification de la stèle (Hazman and Brown, 2018) se mettent également en place en présence d'un stress hydrique. Enfin, une perte de turgescence (Huang and Fry, 1998) voire la senescence des cellules corticales qui affecte plus rapidement les fines racines (Cuneo et al., 2016) peuvent survenir réduisant ainsi la conductance hydraulique racinaire. En cas de stress hydrique intense, des phénomènes de cavitation peuvent se produire diminuant la conductance hydraulique, et donc les flux d'eau. L'activité des aquaporines peut également être diminuée dans les racines afin d'éviter le reflux de l'eau des racines vers le sol (Singh et al., 2020). Ainsi, la capacité de séquestration du carbone est intimement liée à la disponibilité en eau du sol et aux flux d'eau dans la plante, et il est alors important de mieux comprendre la dynamique de l'eau dans les plantes dans des conditions de stress hydrique.

Dans nos précédentes études, nous avons montré que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) portable permet la caractérisation hydrique de la structure et de la fonction des racines de plantes herbacées dans des conditions hydriques non limitantes (Nuix et al., 2021, Chapitre 4). En effet, l'IRM permet d'obtenir de manière non destructive et non invasive des informations sur la quantité d'eau par le biais de la densité de protons (^1H) et sur la mobilité de ces molécules par le biais de la mesure des temps de relaxation longitudinale T_1 et transversale T_2 (Van As, 2007). En particulier, des valeurs élevées de T_2 sont associées à de l'eau libre tandis que des valeurs faibles sont associées à de l'eau liée telle celle présente dans la paroi cellulaire par exemple (Van As, 2007). L'objectif de cette étude a donc été de déterminer si l'IRM portable permet de caractériser l'état hydrique des racines de plantes prairiales soumises à un stress hydrique et d'étudier les différences d'état hydrique entre des conditions hydriques non limitantes et de déficit hydrique. Nous supposons que (i) les plantes présentant des fines racines sont plus sensibles au stress hydrique que celles présentant de grosses racines, et que (ii) la présence d'un stress hydrique entraînant des variations de la transpiration et le T_2 ayant été lié à la capacité de transport de l'eau dans les racines (Chapitre 4), celui-ci peut être un indicateur du stress hydrique.

V.2. Matériels et Méthodes

V.2.1. Plantes et conditions environnementales

Trois plantes de *Medicago sativa* (MS), deux plantes de *Rumex acetosa* (RA) et trois talles de *Dactylis glomerata* (DG) ont été cultivées en monoculture dans des rhizotrons avec toile. Les rhizotrons sont des contenants parallélépipédiques (95 cm (hauteur) $\times$ 40 cm (largeur) $\times$ 5 cm (profondeur)) dont l'une des faces correspond à une plaque transparente. Le fond du rhizotron a été percé et une couche de pouzzolane (800 g) a été déposée afin de faciliter le drainage. Du sol de prairie de moyenne montagne, tamisé à 7 mm, d'un pH égal à 6.5 et qui consiste en 12% d'argile, 17% de limon, 59% de sable et 13% de matière organique, a été mélangé avec un engrais-retard dont la concentration finale était de 5 g L⁻¹ (NPK 14-7-14, Multicote 12, Haifa, Israel). Un tissu en nylon polyamide (100 cm $\times$ 45 cm $\times$ 60 μm) avec des pores de 30 μm de diamètre et d'ouverture égale à 20% a été placé entre la plaque transparente et le sol afin de séparer le système racinaire du sol tout en permettant le transfert de l'eau et des nutriments.

Les trois rhizotrons ont ensuite été positionnés dans une chambre climatique dans laquelle un cycle jour/nuit d'une photopériode de 14 heures et une température ambiante de

21°C a été programmé. Pendant la nuit (de 22 heures à 08 heures), la température était programmée sur 16°C. La concentration en CO₂ (CARBOCAP, GMP343, Vaisala, Finland), le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR), la température et l'humidité de l'air ont été enregistrés toutes les 30 secondes (CR6-Wifi, Campbell Scientific Ltd., Loughborough, UK) et moyennés sur des périodes de 5 minutes.

Les plantes ont été soumises à différentes conditions hydriques. La première période, période d'hydratation (WW), consistait en l'apport de 250 mL d'eau deux fois par jour, en début de matinée et de soirée. Cette période a été suivie d'une période de déshydratation (WD) qui consistait en l'arrêt des arrosages pendant 26 jours. Une période de réhydratation (RW) qui consistait en l'apport de 200 mL d'eau trois fois par jour pendant trois jours a eu lieu pour *R. acetosa* et *M. sativa*. Cependant, durant les trois derniers jours d'expérimentation sur *M. sativa*, la chambre climatique a rencontré des défauts de régulation de la température qui a augmenté à partir de la fin de D26 jusqu'à atteindre 30°C (**Figure 35**). La sécurité de la chambre s'étant activée, les lumières se sont éteintes expliquant la perte du cycle jour/nuit entre D27 et D28 (absence de luminosité entre 08:00 et 22:00). Aussi, et seulement pour *M. sativa*, les journées 27 et 28 n'ont pas été retenues dans les analyses. Ainsi, l'effet de la réhydratation a été étudié uniquement sur *R. acetosa*.

V.2.2. Traits et mesures écophysologiques

Le potentiel hydrique foliaire (LWP, MPa) a été mesuré en continu sur une ou deux feuilles grâce à un psychromètre (PSY1-Stem, ICT International, Armidale, NSW, Australie). Dans le cas de plusieurs mesures en parallèle, les valeurs de LWP ont été moyennées (Annexe 3, Matériels Supplémentaires Figure S1).

La conductance stomatique (Gs, mmol m⁻² s⁻¹) a été mesurée avec un poromètre (Li-600, LI-COR, Lincoln, NE, USA) sur trois feuilles, trois fois par jour, le matin, le midi et en début de soirée. Afin de mesurer toutes les sorties d'eau des feuilles, nous avons mesuré la conductance stomatique sur chaque face (abaxiale et adaxiale) et moyenné les deux mesures (Annexe 3, Matériels Supplémentaires Figure S1).

La teneur en eau du sol (SWC, m³ m⁻³, %) a été mesurée à une profondeur (16 cm) tous les quarts d'heure grâce à un capteur d'humidité du sol placé horizontalement lors de la préparation des rhizotrons (EC-5, Meter Group, Pullman, WA, USA) (Annexe 3, Matériels Supplémentaires Figure S2).

À la fin des expérimentations les plantes ont été prélevées et les organes ont été triés. La surface foliaire totale (LA, m²) a été mesurée avec un planimètre (Licor 3100, Licor, Lincoln, NE, USA). La densité stomatique (mm⁻²), moyenne de la densité abaxiale et adaxiale, a été mesurée avec la méthode des empreintes stomatiques. Les lames obtenues ont été observées avec un microscope (Zeiss Axio Scope.A1, Oberkochen, Allemagne) avec un grossissement $\times 16$ ou $\times 40$ selon l'espèce. Les racines présentes dans le volume de mesure RMN ont également été prélevées. Elles ont été lavées puis congelées dans un sac plastique à -18°C avant de réaliser les mesures de morphologie racinaire. Après décongélation, les racines ont été colorées en les trempant dans une solution de bleu de méthylène (5 g L⁻¹) pendant au moins 15 minutes à température ambiante. L'excès de colorant a ensuite été enlevé en rinçant les racines avec de l'eau. Celles-ci ont été séparées en grosses (diamètre supérieur à 1 mm) et en fines racines, étalées dans une cuve en verre pour les séparer puis scannées (EPSON perfection V700; Seiko Epson Corp., Suwa, Japon) en utilisant le mode transparent avec une résolution de 800 dpi (Annexe 3, Matériels Supplémentaires Figure S3). Pour chaque espèce, entre 6 et 14 images ont été enregistrées et analysées par le logiciel WinRhizoPRO (V2012b, Régent Instruments, Québec, Canada) afin de déterminer la longueur racinaire (m), le diamètre moyen des racines (mm) et le volume racinaire (cm³), calculé par la somme des volumes par classe de diamètre (10 classes allant de 0 mm à 1 mm avec un incrément de 0.1 mm, une classe pour les diamètres entre 1 mm et 2 mm et une dernière classe pour les diamètres supérieurs à 2 mm). La teneur en eau des racines (RWC, g g⁻¹) a été calculée comme étant (masse fraîche – masse sèche) / (masse sèche). La masse sèche a été obtenue par pesée des racines après leur passage dans une étuve (48 heures à 60°C).

V.2.3. Mesures RMN

Les mesures RMN ont été réalisées avec le PM25 NMR-MOUSE (Magritek, Wellington, NZ) qui consiste en un aimant de 0.3 T couplé à une antenne radiofréquence de surface de 4 cm $\times$ 4 cm. L'aimant a été positionné de sorte qu'il soit en contact avec la plaque transparente et que l'antenne se trouve en face de la zone de mesure repérée (cf. Annexe 3, Matériels Supplémentaires Figure S4).

Des profils ont été acquis en continu en déplaçant le volume de mesure entre 0 et 14.9 mm avec un incrément de 0.1 mm grâce à un ascenseur de précision. Le signal a été mesuré à chaque profondeur avec la séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) dont les paramètres étaient 256 échos, durée de l'impulsion 14 μ s, temps d'écho 116 μ s, temps de répétition 3000

ms. Chaque mesure a été répétée quatre fois afin d'améliorer le rapport signal sur bruit (SNR) durant la période d'hydratation alors que pour les périodes de déshydratation et réhydratation le signal a été accumulé huit fois. Afin de comparer les conditions hydriques entre elles et car tous les paramètres d'acquisition étaient identiques, les décroissances acquises durant WD et RW ont été divisées par le ratio des nombres de scans, soit par deux. Les profils présents sur la **Figure 37** ont été obtenus en moyennant à chaque profondeur les 256 échos, les pondérant ainsi à la fois en densité de protons et en temps de relaxation transversale (T_2). Les intégrales de la zone des racines ont été calculées à partir de profils pondérés uniquement en densité de protons. Ces derniers ont été obtenus en ajustant les décroissances à chaque profondeur avec un modèle mono-exponentiel et en considérant l'amplitude pour $t = 0$ ms.

Étant donné que durant la période de déshydratation la quantité de signal était insuffisante pour acquérir de longues décroissances et afin de pouvoir comparer les différentes conditions hydriques, les mesures de T_2 ont été réalisées à partir des décroissances des profils, sur 256 échos. Afin d'améliorer le SNR, les cinq décroissances autour de la profondeur présentant le maximum de signal ont été moyennées. Cette décroissance moyenne a ensuite été filtrée en supprimant les deux premiers échos et en appliquant un filtre rloess avec une fenêtre de 0.2 (Matlab®, MathWorks, Natick, MA, USA). Une inspection visuelle des décroissances a été réalisée afin de ne pas tenir compte des décroissances aberrantes. Par ailleurs, afin que les variations diurnes n'influencent pas les comparaisons entre conditions hydriques, seules les mesures acquises la nuit ont été retenues. Ainsi, le jeu de données final était de 16 décroissances moyennes pour DG-WW, 18 pour DG-WD, 9 pour MS-WW, 8 pour MS-WD, 16 pour RA-WW, 8 pour RA-WD et 17 pour RA-RW. Un ajustement mono-exponentiel a enfin été appliqué afin d'extraire le T_2 et l'amplitude (A) du signal à $t = 0$ ms. Par ailleurs, afin d'améliorer le contraste entre les différentes conditions hydriques, nous avons également étudié le produit du T_2 obtenu par son amplitude (Meixner et al., 2020).

V.3. Résultats

V.3.1. Chambre climatique

La **Figure 35** montre l'évolution temporelle des paramètres de la chambre climatique durant les expérimentations sur *D. glomerata* en jaune, *M. sativa* en rose et *R. acetosa* en vert. Les dates ont été regroupées afin de faciliter la lecture. Ainsi, la période où les plantes étaient correctement hydratées (WW) correspond à D1 (D pour day) tandis que la période de stress hydrique (WD) et de réhydratation éventuelle (RW) correspond à la période courant de D25 à

D28. À l'exception de *M. sativa* à partir de D26, les paramètres ambiants étaient similaires entre les espèces et tout au long des expérimentations avec une température moyenne de 21°C le jour et de 16°C la nuit et un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) moyen le jour de 405 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'humidité de l'air fluctuait entre 63% le jour et 69% la nuit et la concentration en CO_2 entre 434 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ et 462 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

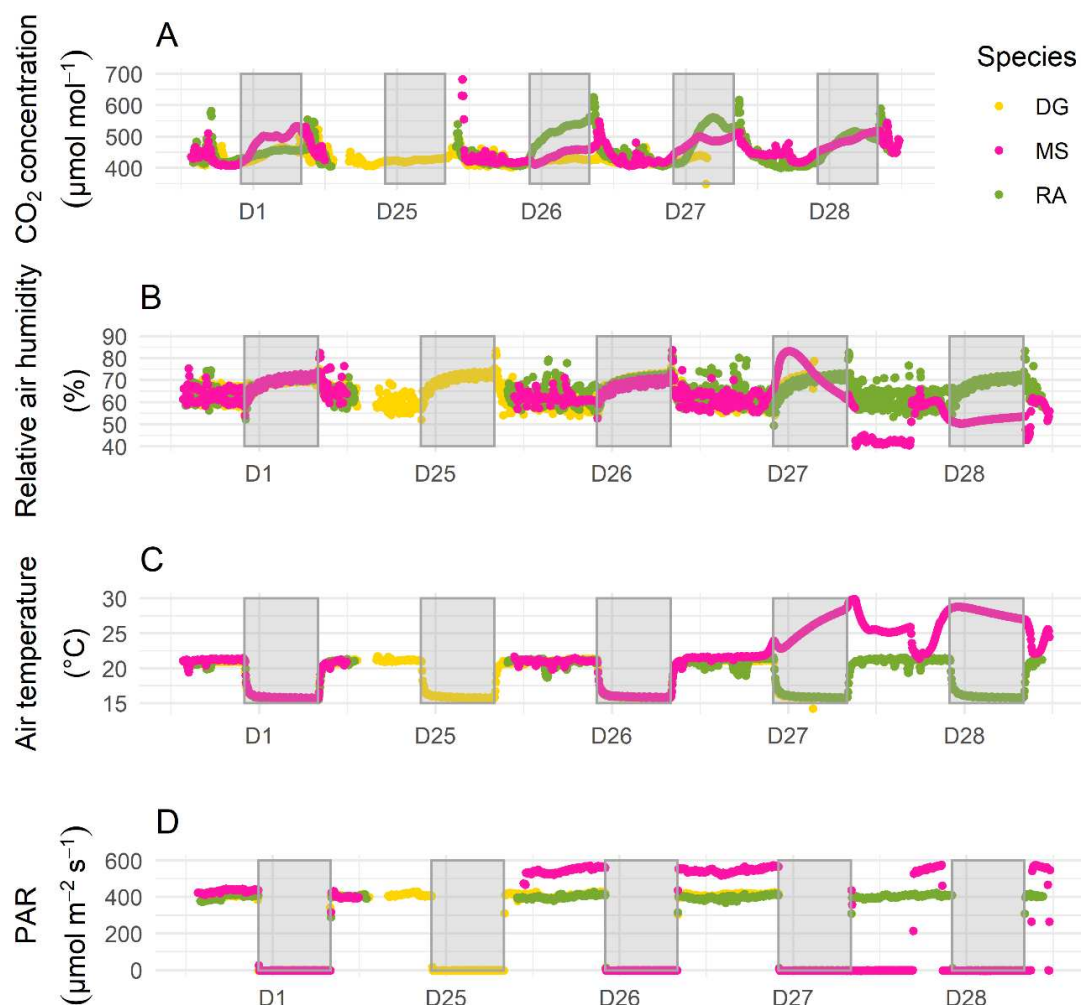


Figure 35. Évolution temporelle de la concentration en CO_2 (A), de l'humidité relative de l'air (B), de la température de l'air (C) et du rayonnement photosynthétiquement actif (D) dans la chambre climatique durant les expérimentations sur *D. glomerata* en jaune, *M. sativa* en rose et *R. acetosa* en vert. L'alternance des rectangles blancs et gris représente le cycle jour/nuit dont la photopériode est de 14 heures.

V.3.2. Traits foliaires et racinaires

La **Table 1** recense les traits foliaires et racinaires. La surface foliaire totale (LA) variait entre 0.09 m^2 pour *M. sativa* et 0.38 m^2 pour *R. acetosa*. La surface spécifique foliaire (SLA) était similaire entre les trois espèces, un facteur de seulement 1.14 séparant la plus faible valeur (251 $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ pour *R. acetosa*) de la plus élevée (287 $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ pour *M. sativa*). La densité stomatique présentait des variations plus importantes, un facteur de 4.5 séparant la plus faible

valeur (37.5 stomates mm^{-2} pour *R. acetosa*) de la plus élevée (169.8 stomates mm^{-2} pour *M. sativa*). Dans des conditions hydriques non limitantes, la conductance stomatique variait d'un facteur 2.49, entre 114.19 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour *D. glomerata* et 284.04 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour *M. sativa*. *R. acetosa* présentait une valeur intermédiaire avec une conductance stomatique de 189.70 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La **Table 1** contient également les valeurs de volume racinaire (RootV), de masse racinaire (RootM), de diamètre moyen (RootD), de longueur spécifique de racines (SRL), de densité de tissus racinaires (RTD) et de teneur en eau (RWC) des racines présentes dans la fenêtre de mesure RMN. Les espèces étudiées présentaient des traits racinaires contrastés, un facteur de 5.6, 7.3 et 4.8 séparant les plus faibles valeurs des plus hautes de volume, masse et diamètre moyen des racines respectivement. *M. sativa* se distinguait par des valeurs élevées de volume (4.22 cm^3), masse (1.38 g), diamètre moyen (0.67 mm) et densité de tissus (0.328 g cm^{-3}) racinaires, et par des valeurs faibles de teneur en eau des racines (0.65 g g^{-1}) et de SRL (5.1 m g^{-1}). A contrario, *D. glomerata* se distinguait par les valeurs les plus faibles de RTD (0.189 g cm^{-3}), de volume (0.98 cm^3), de masse (0.19 g) et de diamètre moyen (0.14 mm) des racines, et par une valeur élevée de SRL (227 m g^{-1}). Enfin, *R. acetosa* se caractérisait par des valeurs élevées de masse et de volume racinaires (1.02 g et 5.5 cm^3 respectivement), par la plus haute teneur en eau racinaire (0.85 g g^{-1}) et par une valeur intermédiaire de SRL (72.9 m g^{-1}).

Table 1. Traits racinaires (volume (RootV), masse (RootM), diamètre moyen (RootD), longueur spécifique (SRL), densité de tissus (RTD) et teneur en eau (RWC) des racines mesurées dans la fenêtre de mesure RMN) et traits foliaires (surfaces totale (LA) et spécifique (SLA), densité stomatique et conductance stomatique (Gs) en conditions hydriques non limitantes).

	LA (m^2)	SLA ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	Densité stomatique (mm^{-2})	Gs ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	RootV (cm^3)	RootM (g)	RootD (mm)	SRL (m g^{-1})	RTD (g cm^{-3})	RWC (g g^{-1})
DG	0.163	262.4	112.5	114.19	0.98	0.19	0.14	227.0	0.189	0.70
MS	0.091	287.0	169.8	284.04	4.22	1.38	0.67	5.1	0.328	0.65
RA	0.376	251.0	37.5	189.70	5.50	1.02	0.26	72.9	0.186	0.85

La proportion cumulée de volume racinaire par classe de diamètre des racines est représentée sur la **Figure 36**. Alors que *D. glomerata* et *R. acetosa* présentaient une distribution équivalente des volumes racinaires selon les classes de diamètre racinaire, les racines présentes dans le carré de *M. sativa* étaient largement dominées par la présence des grosses racines (89% du volume racinaire était dû à des racines de diamètre supérieur à 1 mm). Près de la moitié du volume racinaire total de *D. glomerata* (47%) était due à de très fines racines (≤ 0.4 mm).

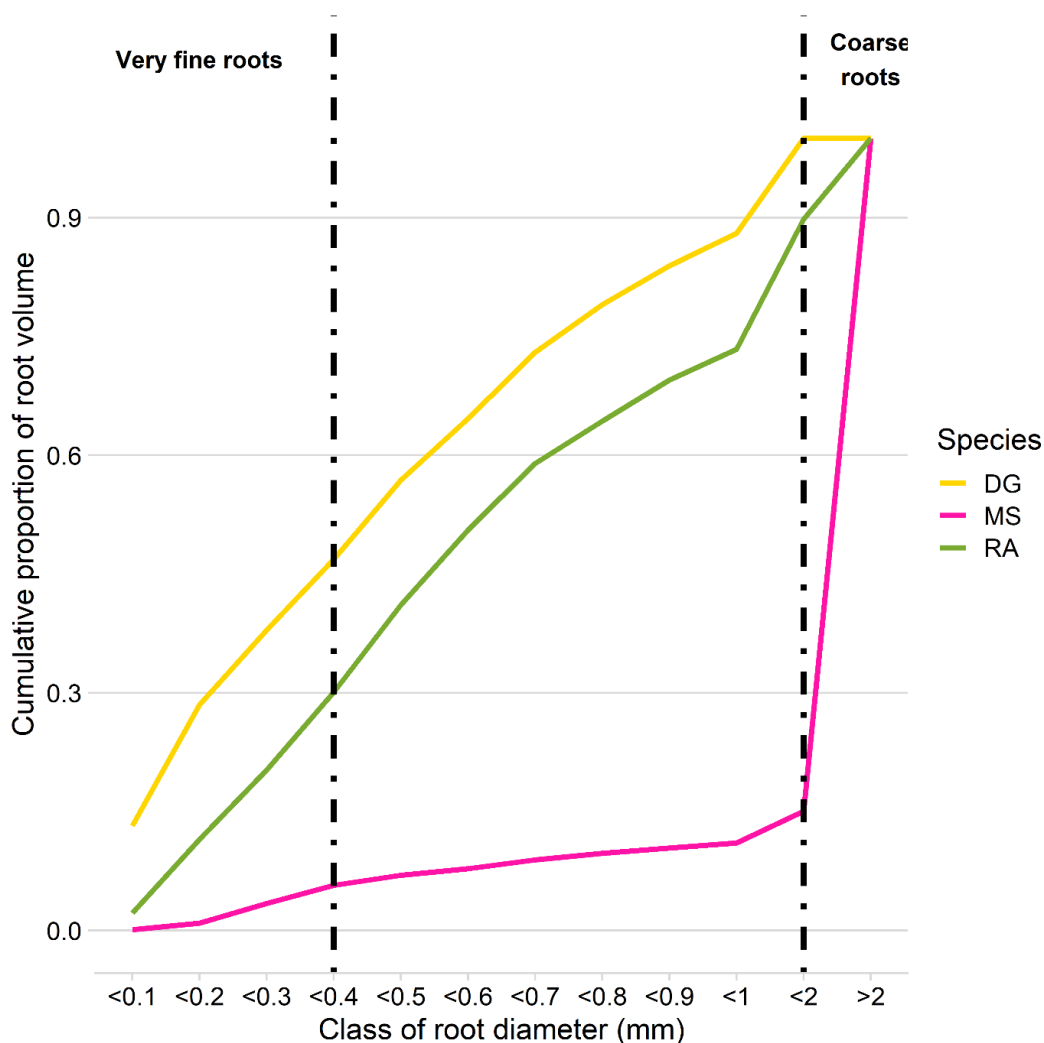


Figure 36. Proportion cumulée de volume racinaire par classe de diamètre des racines (mm) présentes dans la fenêtre de mesure RMN de *D. glomerata* (jaune), *R. acetosa* (vert) et *M. sativa* (rose)

V.3.3. Profils RMN

La **Figure 37** présente des profils acquis en période hydratée (WW en vert, LWP entre -0.04 et -0.32 MPa) et en période de stress hydrique (WD en jaune, LWP entre -3.53 et -5.07 MPa), trois semaines après le dernier arrosage. Un profil acquis pendant la période de réhydratation est également présent pour *R. acetosa* (RW en bleu, LWP autour de -3.86 MPa). Les trois compartiments composant le modèle ont été retrouvés quelles que soient l'espèce ou les conditions hydriques. En effet, la zone dont les indices de profondeur sont négatifs et le signal RMN est nul correspond à la plaque transparente. La zone incurvée correspond aux racines tandis que la zone plus plate correspond au sol.

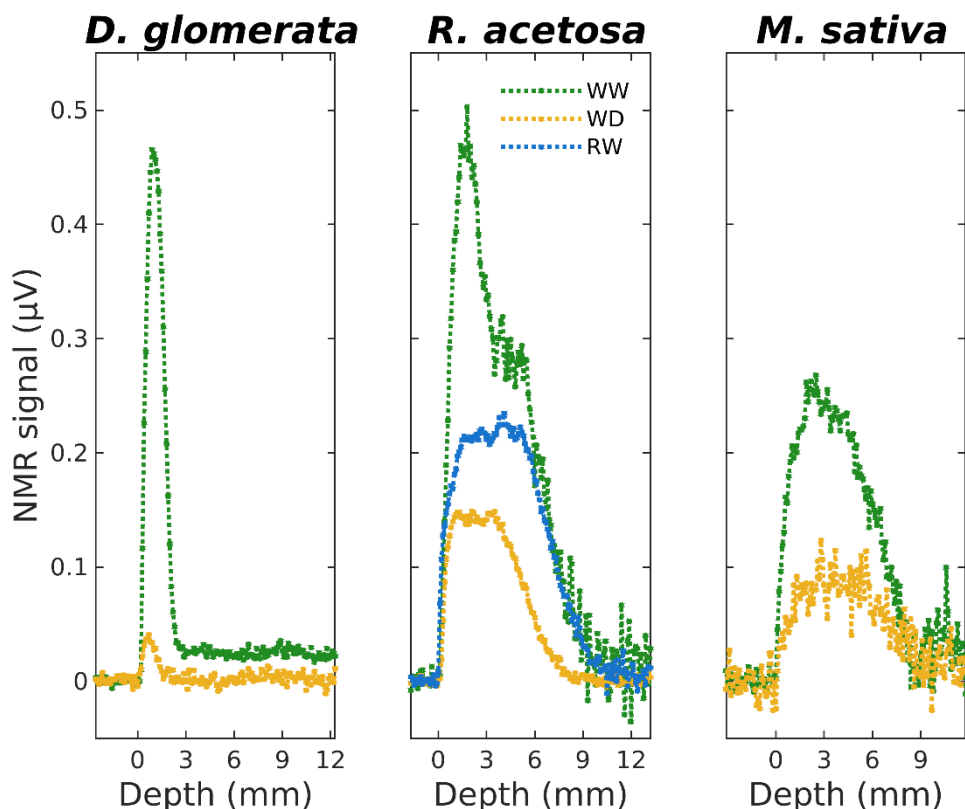


Figure 37. Profils acquis sur *D. glomerata*, *R. acetosa* et *M. sativa* en période d'hydratation (WW en vert), après trois semaines sans arrosage (période de stress hydrique, WD en jaune) et à la fin de la période de réhydratation (RW en bleu). Les plantes présentaient un LWP entre -0.04 et -0.32 MPa en période d'hydratation. Les profils présentés en période de stress hydrique et de réhydratation sont des profils acquis au milieu de la nuit aux alentours de 03:00.

Quelle que soit l'espèce un important contraste était visible entre les conditions d'hydratation (WW) et de stress hydrique (WD). En effet, le signal était systématiquement plus élevé en période hydratée qu'en période de stress (rapport WW/WD sur le pic présentant le maximum de signal de 2.45 pour *M. sativa*, 3.33 pour *R. acetosa* et 11.75 pour *D. glomerata*). Alors que pour *M. sativa* la profondeur occupée était la même entre les deux conditions (8.1 mm), pour les deux autres espèces la profondeur occupée diminuait de 2.4 mm à 1.6 mm pour *D. glomerata* et de 8.8 mm à 8.1 mm pour *R. acetosa*. Ces diminutions d'intensité du signal et/ou de la profondeur se traduisaient par une diminution de l'intégrale de la zone des racines de 59% pour *M. sativa* (de 2133 μV à 884 μV), de 63% pour *R. acetosa* (de 3163 μV à 1181 μV) et de 93% pour *D. glomerata* (de 887 μV à 64 μV). Concernant *R. acetosa*, à la suite des trois jours de réhydratation, l'intensité du signal et la profondeur occupée avaient augmenté par rapport à la période de stress hydrique (d'environ 0.14 μV à 0.21 μV et de 8.1 à 8.8 mm) entraînant une augmentation de l'intégrale de la zone des racines de 78% (de 1181 μV à 2112 μV). Par ailleurs, alors qu'en période hydratée, deux pics étaient présents pour *R. acetosa*, ces derniers étaient absents en période de stress et à la suite de la période de réhydratation.

La **Table 2** contient les paramètres mesurés autour des profils présentés sur la **Figure 37**. Le potentiel hydrique foliaire de fin de nuit avait ainsi diminué de 3.6 MPa pour *D. glomerata*, de 5.1 MPa pour *M. sativa* et de 4.2 MPa pour *R. acetosa* traduisant un stress intense ressenti alors par les plantes.

Table 2. Intégrales de la zone racine et paramètres écophysologiques (SWC, la teneur en eau du sol ; Gs, la conductance stomatique ; LWP_{finN} , le potentiel hydrique de fin de nuit et ΔLWP , la différence de potentiel hydrique entre le potentiel hydrique de fin de nuit et le potentiel hydrique le plus faible du jour) mesurés en période hydratée (WW) et de stress hydrique (WD) pour *D. glomerata*, *M. sativa* et *R. acetosa*. Pour cette dernière espèce figurent également les valeurs en période de réhydratation. Les valeurs recensées de Gs ont été calculées sur toutes les mesures prises sur les périodes d'hydratation, de stress hydrique et de réhydratation tandis que celles de $LWP_{moyen, profil}$, LWP_{finN} et SWC ont été prises autour de la mesure des profils observés sur la **Figure 37**. Le potentiel hydrique foliaire indiqué pour *R. acetosa* en période de stress correspond à celui mesuré le jour précédent les mesures RMN.

	<i>D. glomerata</i>		<i>M. sativa</i>		<i>R. acetosa</i>		
	WW	WD	WW	WD	WW	WD	RW
Intégrale_{racine} (μV)	887	64	2133	884	3163	1181	2112
$LWP_{moyen, profil}$ (MPa)	-0.04	-3.53	-0.32	-5.07	-0.16		-3.86
$SWC_{moyen, profil}$ (%)	22.48	9.12	37.49	17.95	24.74	11.82	23.47
LWP_{finN} (MPa)	0	-3.57	-0.34	-5.47	-0.13	-4.36	-3.85
Gs ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	114.19	23.19	284.04	33.02	189.70	11.37	46.88

V.3.4. Évolution temporelle des signaux RMN et écophysologiques

Afin de pouvoir suivre l'évolution des signaux RMN au cours du temps, l'intégrale de la zone des racines et la moyenne de la zone de sol ont été calculées à partir des profils acquis. Les mesures écophysologiques de potentiel hydrique foliaire (LWP), de conductance stomatique (Gs en orange) et d'humidité du sol (SWC) ont été mesurées en parallèle et tracées sur la **Figure 38**.

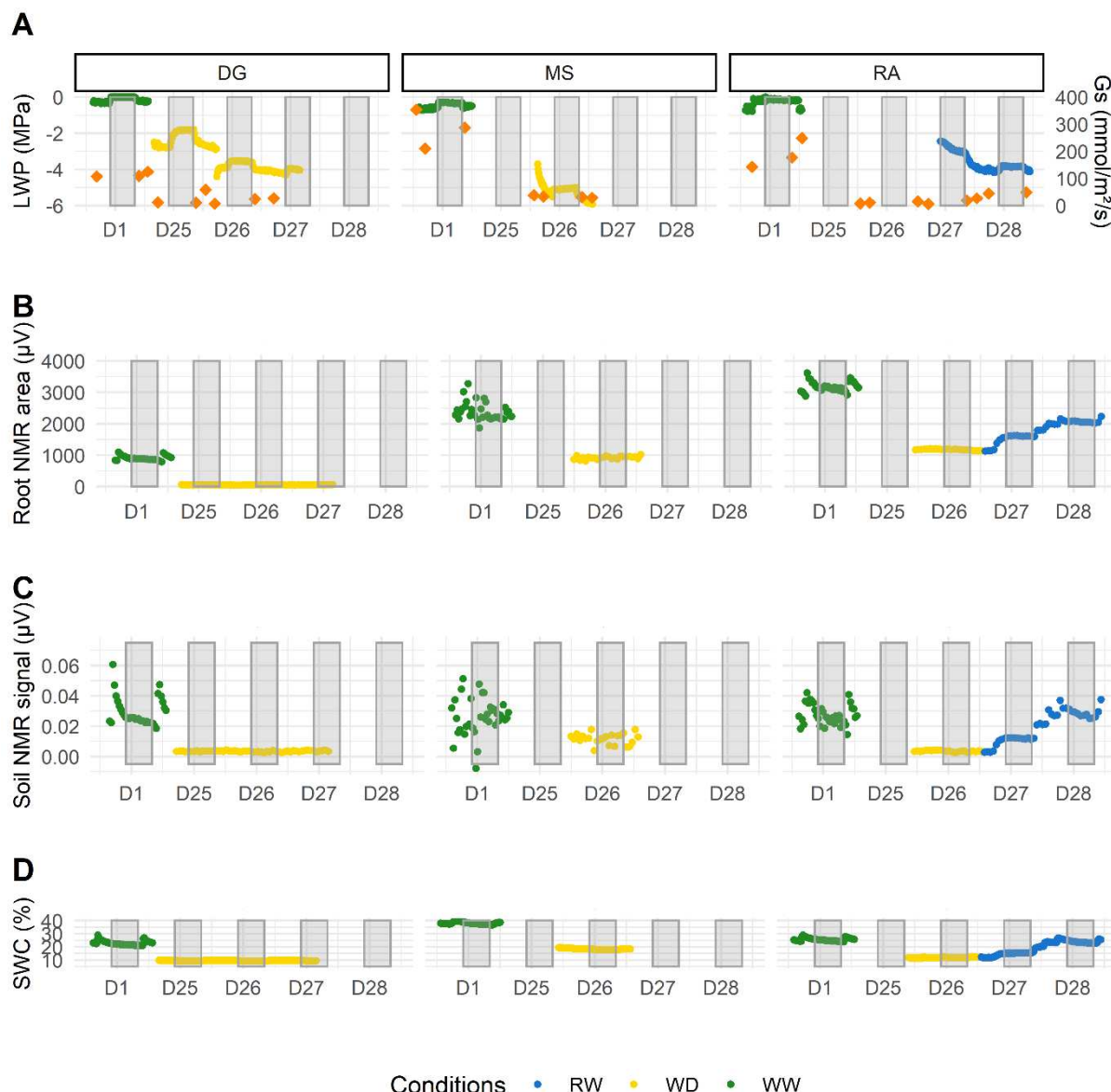


Figure 38. Évolution du potentiel hydrique foliaire et de la conductance stomatique (A), de l'intégrale de la zone racine et du signal RMN moyen du sol (B et C respectivement) et de l'humidité du sol (D) pour *D. glomerata*, *M. sativa* et *R. acetosa* selon le cycle hydratation (vert), déshydratation (jaune) et réhydratation (bleu). La conductance stomatique est représentée par les losanges orange.

Quelle que soit l'espèce, les paramètres RMN et écophysiologiques présentaient des valeurs plus élevées en période hydratée qu'en période de stress hydrique. D'après la **Figure 38** et la **Table 2**, la conductance stomatique avait diminué de 80% pour *D. glomerata*, de 88% pour *M. sativa* et de 94% pour *R. acetosa*. La teneur en eau du sol avait, quant à elle, diminué de 58% pour *D. glomerata* et de 52% pour *M. sativa* et *R. acetosa* en période de stress hydrique par rapport à la période hydratée. À la suite de cette période de stress, *R. acetosa* avait été réhydraté. Le premier arrosage, qui avait eu lieu à l'intersection entre la courbe jaune (WD) et la courbe bleue (RW), n'avait eu aucun effet sur les mesures, y compris l'humidité du sol. Les arrosages suivants se traduisaient par une augmentation progressive des signaux RMN et

d'humidité du sol (de 11.8% à 23.5%), ainsi que par une hausse de la conductance stomatique (de 11 mmol m⁻² s⁻¹ à 47 mmol m⁻² s⁻¹).

V.3.5. Évolution de l'amplitude et des T_2 selon les conditions hydriques

La **Figure 39** montre la moyenne et l'écart type de l'amplitude (A), du T_2 et du produit AT_2 selon les conditions hydriques et les espèces. Il apparaît que, quelle que soit l'espèce, l'amplitude et le AT_2 en période d'hydratation étaient supérieurs à l'amplitude et au AT_2 en période de stress hydrique (amplitude moyenne entre 0.05 μ V et 0.22 μ V en période de stress hydrique et entre 0.41 μ V et 0.66 μ V en période hydratée ; AT_2 moyen entre 1.80 et 6.81 en période de stress hydrique et entre 12.08 et 26.21 en période hydratée). Par ailleurs, il apparaît clairement pour *R. acetosa* que le T_2 en période de stress hydrique (30.4 ± 0.9 ms) était plus court que le T_2 en période hydratée (40.5 ± 2.0 ms). Cette tendance semblait être également présente pour les deux autres espèces (34.0 ± 5.1 ms vs 38.3 ± 1.0 ms pour *D. glomerata* ; 26.9 ± 4.6 ms vs 30.1 ± 5.0 ms pour *M. sativa*). Globalement, l'amplitude avait diminué de 65.1% pour *M. sativa*, 65.4% pour *R. acetosa* et de 91.9% pour *D. glomerata* ; le T_2 avait diminué de 10.8% pour *M. sativa*, 11.2% pour *D. glomerata* et de 24.9% pour *R. acetosa* et le AT_2 avait diminué de 68.5% pour *M. sativa*, 74.0% pour *R. acetosa* et de 92.9% pour *D. glomerata*. À la suite de la réhydratation, l'amplitude, le T_2 et AT_2 avaient augmenté de 28.1%, 16.4% et 49.4% respectivement.

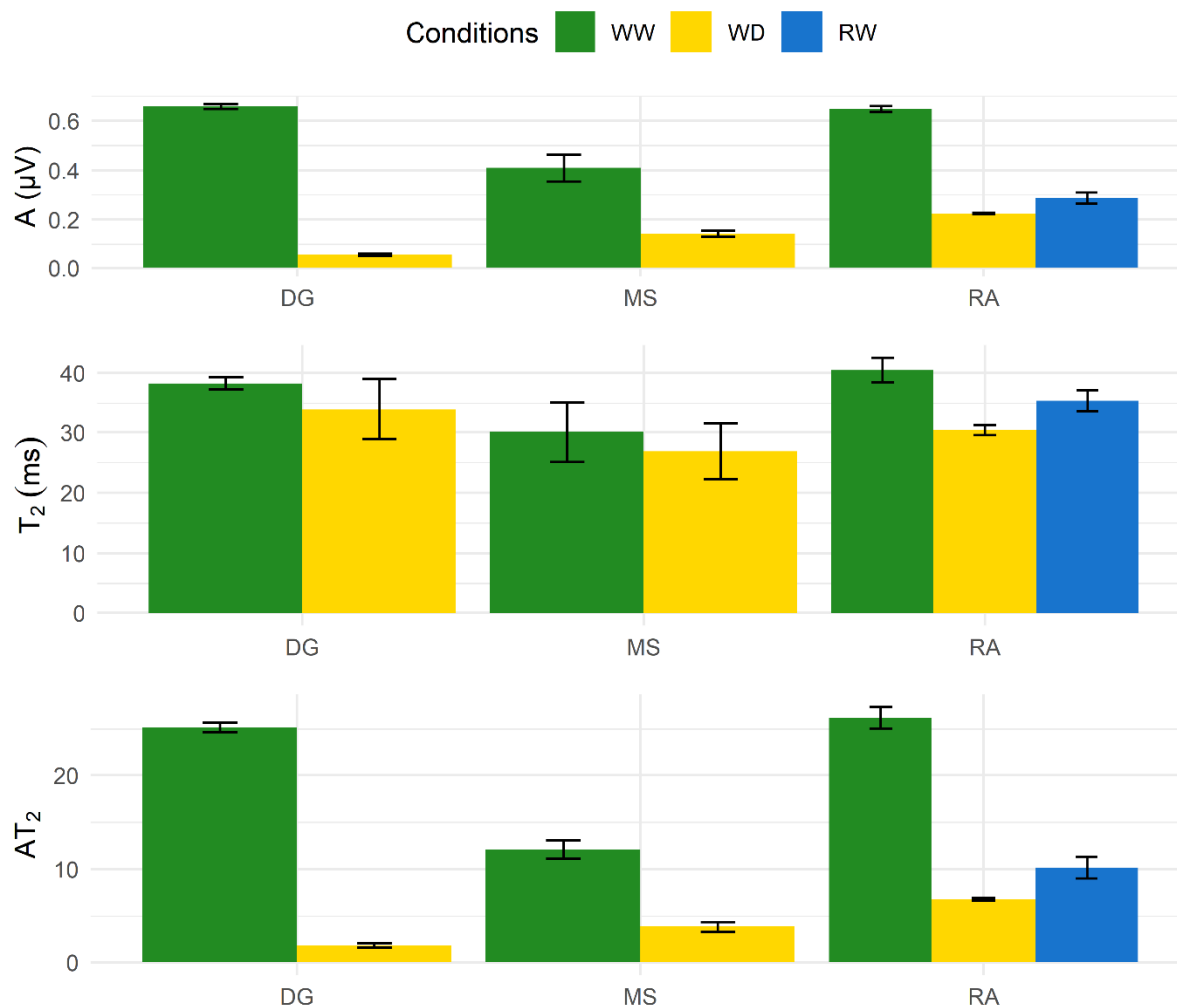


Figure 39. Moyenne et écart-type de l'amplitude (A), du T_2 et du produit des deux paramètres précédents (AT_2) mesurés la nuit selon les conditions hydriques et les espèces.

V.4. Discussion

V.4.1. Impact d'un stress hydrique sévère sur la répartition de l'eau dans les racines

Les profils ont été obtenus après avoir fait la moyenne des 256 échos, les pondérant à la fois en densité de protons et en T_2 . Comme cela a été observé dans nos précédentes études (Nuix et al., 2021; Chapitre 4), les compartiments composant le modèle de rhizotron étaient identifiables grâce à la différence nette d'intensité du signal entre le sol et les racines imputable à la fois à la différence de teneur en eau, plus élevée dans les racines que dans le sol, et de T_2 , plus court dans le sol que dans les racines en raison de la texture, de la porosité ou encore de la présence de particules paramagnétiques dans le sol (Gruwel, 2014; Pflugfelder et al., 2017; Bagnall et al., 2020). Contrairement aux deux autres espèces, les profils de *M. sativa* étaient plus bruités. Cela pouvait provenir (i) d'un volume sensible partiellement occupé par des racines et/ou (ii) au diamètre et à la densité des racines. En effet, comme nous pouvons le

constater sur la figure supplémentaire S4 (Annexe 3), la zone de mesure était centrée sur une racine pivot au diamètre élevé mais n'atteignant pas la totalité de la fenêtre de mesure, l'air occupant le volume restant. Par ailleurs, en plus d'avoir un diamètre élevé, les racines de *M. sativa* étaient également denses avec un RTD supérieur à 0.3 g cm^{-3} (**Table 1**). En raison de cette densité élevée, l'eau dans les tissus était plus liée que dans des tissus moins denses. Le T_2 était alors plus court entraînant une perte plus rapide du signal RMN. Les profils ayant été obtenus après avoir fait la moyenne de la totalité des échos, une quantité plus importante de bruit était présente dans la moyenne pour *M. sativa* par rapport aux deux autres espèces. Malgré cela, les observations faites sur *D. glomerata* et *R. acetosa* se retrouvaient également sur *M. sativa*.

Ainsi, il est apparu qu'en dépit du stress hydrique les compartiments (plaque transparente, racines et sol) étaient toujours identifiables (**Figure 37**). Le compartiment racinaire présentait cependant une diminution à la fois de l'intensité du signal mais aussi de la profondeur occupée (**Figure 37**). Cette profondeur diminuait notamment de la toile vers la plaque transparente, que ce soit pour *D. glomerata* ou *R. acetosa*. Par ailleurs, alors que deux pics étaient présents pour cette espèce durant la période d'hydratation, un unique plateau était observé à la suite du stress hydrique. Tout cela infirmerait l'hypothèse que nous avons faite dans notre précédente étude (Chapitre 4) qui supposait que le point d'inflexion dans le profil pouvait être dû à la présence du gradient d'eau dans les racines entre la toile (concentration en eau élevée) et la plaque transparente (concentration en eau plus faible). Ainsi, ces variations entre les deux conditions pourraient être dues à la distribution des racines dans le volume de mesure selon notamment leur diamètre. Pour explorer cette hypothèse, il faudrait s'orienter vers des méthodes permettant l'imagerie en trois dimensions telles que l'IRM (Gruwel, 2014; van Dusschoten et al., 2016; Pflugfelder et al., 2017) ou la tomographie à rayons X (Mooney et al., 2012). Ces diminutions de l'intensité du signal et/ou de la profondeur occupée entraînaient une diminution de l'intégrale de la zone des racines entre 59 et 63% pour *M. sativa* et *R. acetosa* contre 93% pour *D. glomerata*. Dans notre précédente étude, nous avons montré que l'intégrale de la zone des racines est liée à la quantité d'eau présente dans les racines (Chapitre 4). Ainsi, la diminution de l'intégrale de la zone racinaire traduisait une perte du volume d'eau dans les racines. Cette diminution était inversement proportionnelle au diamètre racinaire moyen (**Table 1**). *D. glomerata* était constitué essentiellement de fines racines puisque 88% du volume racinaire était dû à des racines de diamètre inférieur à 1 mm dont près de la moitié correspondait à de très fines racines ($\leq 0.4 \text{ mm}$), **Figure 36**). Dans le cas de *M. sativa*, le système racinaire était largement dominé par les grosses racines (88.9% du volume racinaire était dû à des racines

de diamètre supérieur à 1 mm, **Figure 36**). De même, *D. glomerata* et *R. acetosa* présentaient des valeurs de RTD faibles (0.189 et 0.186 g cm⁻³ respectivement) alors que *M. sativa* présentait une valeur élevée (0.328 g cm⁻³). Or, la densité des tissus est liée positivement à la fraction de stèle dans les racines (Hummel et al., 2007; Guerrero-Ramírez et al., 2021). Ainsi, des racines fines et peu denses comme celles de *D. glomerata* se déshydrataient plus vite que des grosses et denses racines telles que celles de *M. sativa*. Cela était cohérent avec la littérature. En effet, il a été observé *in vivo* par microtomographie à rayons X sur de la vigne que les fines racines sont plus rapidement affectées par le stress hydrique avec la formation de lacunes dans les cellules corticales (Cuneo et al., 2016). Ces lacunes correspondent à des zones remplies d'air le long de l'axe racinaire et se forment dans les couches centrales du cortex entraînant une diminution de la conductivité hydraulique racinaire. Cette formation de lacunes dans le cortex, bien que limitant l'entrée de l'eau dans les racines, serait un moyen de faire face au stress en prévenant la sortie de l'eau des racines vers le sol lorsque le potentiel hydrique du sol est plus faible que celui des racines (Cuneo et al., 2016). En présence d'un stress intense ou prolongé, comme cela était le cas ici avec un potentiel hydrique foliaire de fin de nuit proche de 50% d'embolie des vaisseaux (autour de -3.5 MPa pour *D. glomerata* (Lens et al., 2016; Volaire et al., 2018) et entre -1.3 et -3.3 MPa pour des dicotylédones (Lens et al., 2016)) et des signes de flétrissement des feuilles, une perte de turgescence des cellules corticales (Huang and Fry, 1998) et un effondrement de ces lacunes (Cuneo et al., 2016) peuvent survenir entraînant une rétraction des racines (Bingham, 2007; Carminati et al., 2009). Un rétrécissement racinaire pourrait expliquer la diminution de la profondeur occupée par les racines. Cette perte de turgescence des cellules, visible par les diminutions de potentiel hydrique foliaire de fin de nuit, qui permet d'estimer en raison du continuum sol-plante-atmosphère le potentiel hydrique dans l'interface sol-racines (**Table 2**), pourrait également expliquer les variations de l'amplitude du signal RMN. La turgescence est en effet assurée par la vacuole et la perte de turgescence se caractérise par une diminution du volume vacuolaire (Barrieu et al., 1999). Or, la vacuole est caractérisée par des temps de relaxation T_2 longs par rapport aux autres composants cellulaires (Van As, 2007). Une diminution de la fraction de T_2 long entraînerait donc une réduction du T_2 moyen dans les racines. Les profils étant pondérés à la fois en teneur en eau et en T_2 , la diminution du volume vacuolaire se répercuterait sur ces deux paramètres.

V.4.2. Impact d'un stress hydrique sévère sur la fonction des racines

L'IRM bas champ portable renseigne également sur la physiologie des plantes (Nuix et al 2021, Chapitre 4). Le cycle diurne observé dans nos précédentes études était présent en période hydratée pour *R. acetosa* et *D. glomerata*. En effet, une diminution de l'intégrale de la zone racine le jour et un maintien de celle-ci la nuit étaient visibles, les brusques augmentations du signal le jour correspondant aux arrosages (**Figure 38**). Cette évolution était en accord avec les mesures écophysologiques et traduisait la transpiration des plantes durant la journée.

Au bout de trois semaines de stress hydrique, ce cycle diurne n'était plus visible. Cette absence de variation était cohérente avec la littérature (Yoder et al., 2014; Malone et al., 2016) et les mesures écophysologiques. De fait, quelle que soit l'espèce, la conductance stomatique avait diminué de 80 à 94% et l'humidité du sol de 52 à 59%. Ainsi, durant cette période de stress hydrique prononcé, les plantes ne transpiraient plus ou alors très faiblement. Cette diminution de la fonction des racines pouvait également s'observer sur les mesures de T_2 . Celui-ci renseigne sur la mobilité des molécules d'eau. En effet, des valeurs de T_2 élevées sont associées à de l'eau mobile tandis que des valeurs de T_2 faibles traduisent la présence de molécules d'eau ayant une mobilité réduite et/ou liées à d'autres macromolécules (Van As, 2007). Dans les chapitres précédents (Chapitres 3 et 4), l'hypothèse de travail était que dans les racines, deux fractions d'eau sont principalement retrouvées, une fraction d'eau liée caractérisée par un T_2 court et une fraction d'eau mobilisable, plus libre caractérisée par un T_2 long. Cependant, une analyse NNLS ou encore un modèle bi-exponentiel n'ayant pas pu être effectués dans les conditions de stress hydrique (présence de résultats aberrants, faible nombre d'échos) un ajustement mono-exponentiel avait été utilisé. Ainsi le T_2 obtenu était, d'après notre hypothèse, un T_2 pondéré selon les deux fractions d'eau présentes dans les racines, la fraction liée et la fraction libre. Afin d'améliorer le contraste entre les différentes conditions hydriques les T_2 avaient été pondérés par l'amplitude du signal (AT_2 , Meixner et al., 2020). Les diminutions observées des différents paramètres (A , T_2 et AT_2) pouvaient s'expliquer par la diminution de la fraction d'eau dans la stèle qui circule lorsque la plante transpire. En raison de l'absence d'arrosage, cette diminution conduisait à la déshydratation des tissus qui pouvait se traduire par la senescence du cortex, et donc par une diminution des compartiments vacuolaires. Sous l'effet du stress, ces fractions d'eau libre (vacuole et stèle), caractérisées par des T_2 long, diminuaient contribuant à la diminution de ce T_2 pondéré. Cependant notre méthode ne nous donne qu'une information moyenne et ne nous permet pas de distinguer les différents tissus racinaires.

V.4.3. Effet de la réhydratation sur *R. acetosa*

À la suite de la période de stress hydrique sévère, *R. acetosa* avait été réhydraté pendant trois jours consécutifs. Le premier arrosage n'avait pas eu d'effet sur les paramètres RMN et écophysologiques, y compris l'humidité du sol (**Figure 38**). Cela pourrait être dû au fait que la quantité d'eau apportée était insuffisante pour observer un changement dans les valeurs de ces paramètres qui étaient mesurés à 16 cm sous la surface du rhizotron, l'eau réhydratant dans un premier temps les couches superficielles du sol. Les arrosages suivants étaient quant à eux observables à la fois sur les mesures RMN et sur l'humidité du sol. Alors que le SWC augmentait, la réhydratation de la plante était visible par une augmentation progressive du potentiel hydrique foliaire de fin de nuit (de -4.4 MPa à -3.9 MPa, **Table 2**) et de l'intégrale RMN de la zone racine (de 1181 μV à 2112 μV). Celle-ci était due à une augmentation de l'amplitude et de la profondeur occupée par l'eau dans les racines qui découlait d'une augmentation du diamètre racinaire (Huck et al., 1970; Carminati et al., 2009). La réhydratation des tissus s'accompagnait d'une reprise de la transpiration comme en témoignait l'augmentation de la conductance stomatique (de 11.37 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 46.88 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, **Table 2**). Ainsi en raison de la transpiration, de l'eau était prélevée du sol par les racines et transférée dans la stèle afin d'hydrater les tissus mais aussi répondre à la demande transpiratoire. Ce faisant, cela entraînait une augmentation de la fraction d'eau mobilisable et/ou libre impliquée dans le transport de l'eau (stèle et voie symplasmique par le biais des cellules corticales), expliquant l'augmentation de l'amplitude du T_2 (28.1%), de sa valeur (16.4%) et du produit de ces deux composantes AT_2 (49.4%).

La vitesse de récupération dépend de la durée et de l'intensité du stress hydrique subi par les espèces mais aussi de leur capacité à remobiliser les réserves accumulées dans les méristèmes pour produire de nouvelles feuilles (Zwicke et al., 2015; Volaire et al., 2020). Il s'est avéré ici qu'une réhydratation pendant trois jours consécutifs était insuffisante pour retrouver les paramètres écophysologiques et le niveau de signal RMN que la plante présentait en période hydratée. En effet, bien que l'intégrale de la zone racinaire augmentât de 78% et que la profondeur occupée retrouvât la valeur de la période d'hydratation initiale, celle-ci restait inférieure de 31% à l'intégrale en période d'hydratation. Il a été observé dans la littérature que, à la suite d'un stress hydrique induisant une forte déshydratation, le mucilage devient visqueux et hydrophobe pouvant alors entraîner une diminution de la conductance hydraulique du sol (Carminati et al., 2016). Dans l'étude de Carminati *et al.* (2016), il a notamment été observé qu'après réhydratation consécutive à un stress hydrique, la teneur en eau dans le sol était, dans un premier temps, supérieure à la teneur en eau dans la rhizosphère avant que cette tendance ne

s'inverse. À supposer que les racines sécrétaient ici du mucilage afin de favoriser le contact avec la toile et donc le transfert de l'eau, la déshydratation du mucilage pourrait impacter la réhydratation des racines. De même, l'absence de contact direct avec le sol, par la présence de la toile, pourrait retarder la réhydratation des racines. Par ailleurs, il a également été observé dans la littérature que durant le stress hydrique, en plus de la senescence du cortex et l'hydrophobicité du mucilage, une subérisation de l'endoderme, couche la plus interne du cortex (Enstone et al., 2002; Henry et al., 2012) et une lignification de la stèle (Hazman and Brown, 2018) pouvaient se mettre en place. L'hydrophobicité du mucilage après déshydratation ainsi que la lignification/subérisation des tissus permettent de limiter la perte d'eau et d'ions durant la période de stress hydrique (Enstone et al., 2002; Hazman and Brown, 2018). Elles permettent également de restreindre l'entrée de l'eau lorsque celle-ci est amenée en grande quantité, limitant ainsi la possibilité d'un choc osmotique (Carminati et al., 2010). Cependant, ces processus impactent l'absorption racinaire et le transfert radial de l'eau limitant ainsi temporairement la réhydratation des racines et donc de la plante (Enstone et al., 2002; Zarebanadkouki et al., 2018). Ces mécanismes pourraient également expliquer la vitesse de la réhydratation des racines.

V.5. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que l'IRM portable est un outil prometteur pour la caractérisation de la déshydratation des racines liée à un arrêt des arrosages. En effet, la capacité de l'IRM portable à suivre l'état hydrique des racines selon un cycle hydratation-déshydratation-réhydratation a été mise en évidence. Il a notamment été révélé que pour des conditions de stress intense (LWP de fin de nuit entre -3.6 et -5.5 MPa), les racines fines se déshydratent de manière plus importante que les grosses racines. Par ailleurs, des résultats observés dans la littérature sur des tiges ont été retrouvés sur les racines. En effet, il a été mis en évidence une perte du cycle diurne en présence d'un stress hydrique intense liée à l'arrêt de la transpiration (diminution de la conductance stomatique jusqu'à des valeurs comprises entre 11.4 et 33 mmol m⁻² s⁻¹). Il est apparu également que, dans nos conditions d'expérimentations, le stress hydrique affecte essentiellement la fraction d'eau libre qui diminue entraînant une diminution de l'amplitude et une réduction du T_2 en période de stress. L'intensité du signal et le T_2 réaugmentent lorsque la plante est réhydratée, montrant que ces paramètres RMN peuvent être utilisés pour réaliser un suivi du statut hydrique des racines.

Pour aller plus loin, il faudrait dans un premier temps valider la méthode par l'utilisation d'une méthode indépendante telle que la spectroscopie proche infrarouge (NIRS) qui permet également de mesurer la quantité d'eau au cours du temps de manière non-invasive. Dans un deuxième temps, il faudrait mesurer ce statut hydrique lorsque les racines sont dans le sol, le comportement obtenu pouvant alors être modifié (eau plus accessible ?). De même, il serait intéressant de suivre par RMN toute la cinétique entre la période d'hydratation et la période de stress hydrique. Cela permettrait d'observer à partir de quel moment le cycle diurne cesse et quelle est la valeur des paramètres écophysiological lorsque cela se produit. De même, en présence d'un stress modéré la fermeture des stomates n'est pas constante au cours de la journée et varie selon le déficit en vapeur d'eau de l'air, ceux-ci s'ouvrant en matinée afin de favoriser la fixation de CO₂ et se fermant l'après-midi (Brodribb and Holbrook, 2004; Amitrano et al., 2019). Il serait intéressant de voir si ce pattern peut être observé avec les mesures RMN. Il serait également intéressant de réhydrater la plante sur une période plus longue et d'espacer les arrosages pour voir si (i) le cycle diurne revient et si (ii) les valeurs de la période hydratée sont à nouveau atteintes.

Chapitre VI. Discussion générale et perspectives

Les racines sont des organes difficiles d'accès pour une étude *in situ*. Les méthodes non destructives et non invasives évoquées dans l'état de l'art (**Tableau 1**), bien qu'elles permettent de mesurer la teneur en eau et/ou l'absorption racinaire et/ou les flux d'eau, et éventuellement de visualiser l'architecture racinaire, sont pour la plupart limitées à une utilisation en laboratoire. La spectroscopie infrarouge peut être utilisée dans l'environnement naturel des plantes. Cependant, elle permet uniquement l'étude de la teneur en composés et ne permet donc pas d'étudier la mobilité de l'eau. L'IRM portable, généralement à bas champ magnétique, est un outil de plus en plus utilisé dans le domaine du végétal (**I.3.4.1 Application de l'IRM portable pour l'étude des végétaux**). Des études employant cette méthode ont été menées à l'extérieur du laboratoire pour étudier la physiologie des plantes en se focalisant sur un organe (fruit, feuille, branche, racine). Cependant, les organes étudiés sont essentiellement des branches ou des troncs d'arbres et il existe actuellement dans la littérature peu d'études réalisées avec l'IRM portable ayant pour objet d'application les racines. Une des rares études dédiées aux racines a été réalisée par Bagnall *et al.* en 2020. Dans celle-ci, ils ont imagé à 0.047 T, en se basant sur la différence de T_2 entre le sol (< 4 ms) et les racines (~ 100 ms), des racines de sorgho dans des sols argileux et limoneux intacts afin de visualiser l'architecture et la morphologie des racines *in situ*.

Bien que nous n'ayons pas acquis d'images au sens traditionnel du terme, avec visualisation en deux dimensions des racines comme cela est le cas dans l'étude mentionnée précédemment, les travaux réalisés durant ce projet de thèse ont permis d'élargir aux racines des observations réalisées sur d'autres organes à bas champ magnétique. Nos travaux constituent donc une première dans l'étude de la physiologie des racines par IRM portable. Nous avons ainsi montré sur des plantes prairiales que l'IRM portable permet :

- D'estimer la quantité d'eau présente dans les racines (Chapitre 4) ;
- De révéler au niveau des racines un rythme nycthéméral en lien avec la **transpiration**, aussi bien sur l'intensité du signal (quantité d'eau) que sur les paramètres de relaxation (mobilité de l'eau) (Chapitres 3 et 4) ;
- De mettre en évidence des stratégies d'utilisation de l'eau par les relations structure-fonction des racines (Chapitre 4) ;
- De mettre en évidence les effets d'un stress hydrique intense tant sur la teneur en eau (diminution) que sur sa mobilité (absence de rythme nycthéméral) (Chapitre 5).

Par ailleurs, au cours des expérimentations des chapitres 4 et 5, nous avons étudié des individus qui appartenaient aux mêmes espèces (*D. glomerata*, *M. sativa* et *R. acetosa*) dans des conditions hydriques similaires (conditions WW pour le Chapitre 5). Bien qu'entre les deux expérimentations les valeurs écophysologiques absolues différaient, le rang des espèces était conservé. Ainsi, quelle que soit l'expérimentation, *D. glomerata* présentait les plus faibles valeurs de volume racinaire, de diamètre moyen des racines et de conductance stomatique, des valeurs de densité stomatique et de densité des tissus racinaires intermédiaires et des valeurs de SRL élevées. A contrario, *M. sativa* présentait les valeurs les plus faibles de SRL et les valeurs les plus élevées de densité stomatique et de densité des tissus racinaires. Ces résultats sont cohérents avec leurs stratégies d'utilisation de l'eau (Chapitre 4). La relation observée entre le volume racinaire et l'intégrale de la zone racine des profils était également toujours présente (**Figure 40**). De même, hormis pour *D. glomerata*, les valeurs moyennes de T_2 (T_2 mono-exponentiels du Chapitre 4 et calculés à partir des données du Chapitre 5) étaient proches entre les deux expérimentations (47.5 ± 6.6 ms vs 38.3 ± 1.0 ms pour *D. glomerata* ; 32.5 ± 2.3 ms vs 30.1 ± 5.0 ms pour *M. sativa* ; 35.9 ± 2.6 ms vs 40.5 ± 2.0 ms pour *R. acetosa* ; **Figure 41**). Ainsi, nous pouvons voir que notre IRM portable fournit des résultats reproductibles.

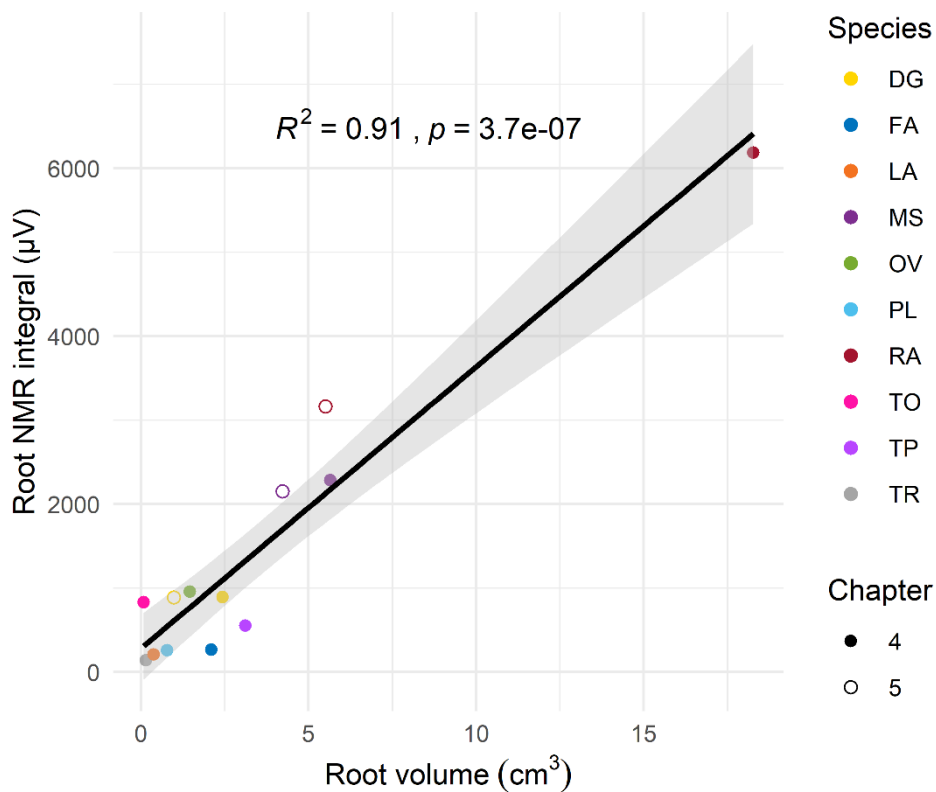


Figure 40. Relation entre l'intégrale de la zone racine des profils et le volume racinaire pour l'ensemble des espèces étudiées dans les chapitres 4 (cercle plein) et 5 (cercle vide).

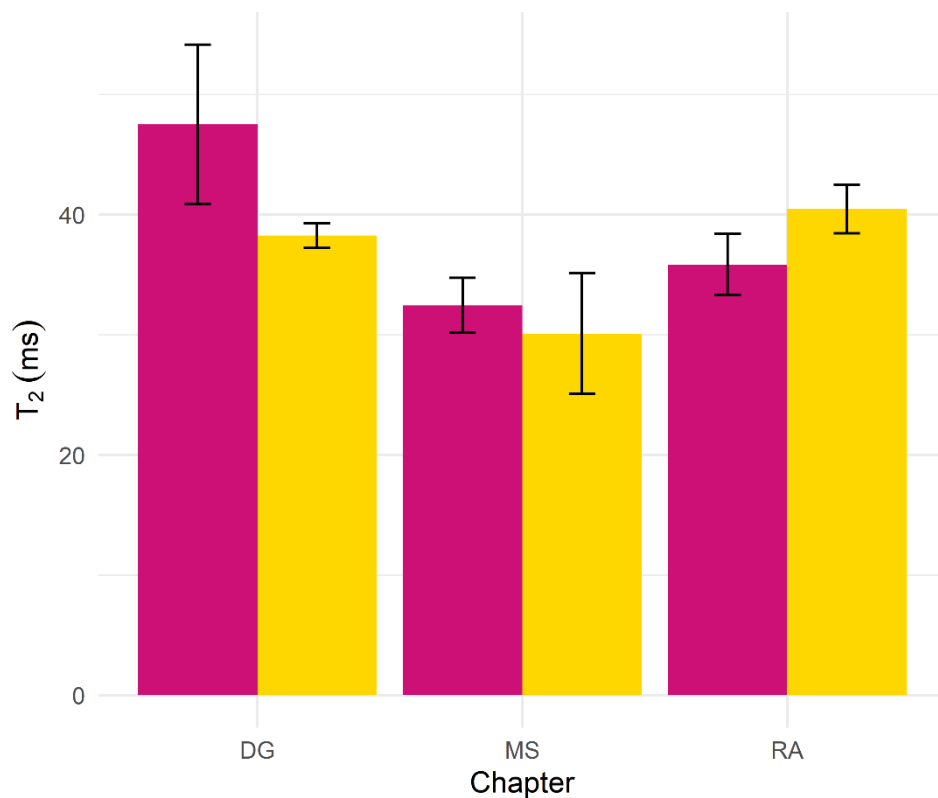


Figure 41. Comparaison des T_2 moyens mesurés chez les espèces étudiées à la fois dans le chapitre 4 (rose) et dans le chapitre 5 (jaune) dans des conditions hydriques similaires.

Ces preuves de concept ont été menées sur des modèles de rhizotron avec toile qui présentent les avantages de nous permettre de visualiser l'architecture racinaire dans son ensemble et de s'assurer du bon développement du système racinaire des plantes. Cette thèse s'intégrant dans un projet ANR intitulé OutlabMRI qui a pour objectif de sortir l'IRM du laboratoire pour quantifier les teneurs en eau et les flux d'eau dans les agroécosystèmes prairiaux et forestiers (<https://anr.fr/Projet-ANR-19-CE04-0006>), une prochaine étape serait de complexifier le modèle tout en maintenant une certaine maîtrise des paramètres. Ainsi, nous devons aller vers :

- Un modèle de rhizotron sans toile, avec les racines et le sol mélangés. En effet, de manière générale, les T_2 des racines sont supérieurs entre un à deux ordres de grandeurs à ceux du sol (Gruwel, 2014; van Dusschoten et al., 2016; Pflugfelder et al., 2017; Bagnall et al., 2020). En raison de cette différence de T_2 , un contraste suffisant est espéré pour pouvoir étudier les racines directement dans le sol. Ce contraste dépend cependant de la teneur en eau et du type de sol. Pflugfelder *et al.* (2017) ont imagé à 4.7 T des racines d'orge cultivées dans différents types de sol (six sols naturels et deux sols artificiels destinés à l'imagerie RMN) avec différentes teneurs en eau (entre 50% et 80%

de la capacité de rétention d'eau maximale). Dans cette étude, il n'a pas été observé d'effet de la teneur en eau du sol sur la qualité de la visualisation des racines dans les sols naturels. En revanche, dans le cas des sols artificiels et lorsque leur teneur en eau était supérieure à 70% de leur capacité de rétention d'eau maximale, l'eau du sol devenait visible affectant la qualité de la visualisation des racines. Ces augmentations de signal de l'eau du sol en lien avec sa teneur en eau ont également été observées par Bagnall *et al.* (2020) et elles étaient liées à une augmentation de la valeur du T_2 due à une fraction d'eau libre plus importante (augmentation du T_2 de 0,47 ms à 0,88 ms pour les sols argileux-limoneux et de 1,37 ms à 3,7 ms pour les sols limoneux pour une teneur en eau du sol passant de 10% à 25%). Des variations des temps de relaxation entre les types de sol sont également liées à la présence de particules paramagnétiques (Fe^{III} , Mn^{II} ..), la porosité et la teneur en sable, en argile, en limon et en matière organique (Bayer *et al.*, 2010). Ainsi, Grønras *et al.* (1996) ont observé qu'une augmentation de la vitesse de relaxation dans le sol était liée à une augmentation de la quantité d'argile kaolinite dans l'échantillon (T_1 entre 2,0 et 3,5 s sans kaolinite et entre 0,25 et 0,73 s avec 3% de kaolinite). Aussi, pour la poursuite de nos études, il apparaît comme indispensable de caractériser d'un point de vue RMN les différents types de sol pouvant être utilisés. Des rhizotrons sans toile contenant des plantes déjà étudiées telles que *D. glomerata* ou *R. acetosa* pourraient ensuite être envisagés, une fois que la caractérisation des sols seuls aura été effectuée. Par ailleurs, avec le système de toile, l'eau arrive du sol vers les racines à la fois verticalement et horizontalement. L'arrivée horizontale de l'eau conduit à la présence d'un gradient d'eau dans le système racinaire susceptible d'affecter la forme des profils, celui-ci pouvant être à l'origine des points d'inflexion observés. Afin de supprimer l'arrivée horizontale de l'eau et donc la présence du gradient, nous pourrions envisager de positionner une plaque entre le système racinaire et la toile et mettre un réservoir d'eau en profondeur. Ainsi, celle-ci n'arriverait plus que verticalement sur toute la largeur du rhizotron.

- Une maîtrise des variations de la température de l'aimant dues à la fluctuation de la température extérieure. Le NMR-MOUSE présente un gradient de champ magnétique $\mathbf{B}_0$ naturel qui permet de sélectionner la tranche dans laquelle les mesures sont effectuées. Or, ce dispositif est équipé d'un aimant permanent. Son champ magnétique, et donc sa position de mesure, varie en fonction de la température ($50 \mu\text{m } ^\circ\text{C}^{-1}$). Pour remédier à cela, une méthode de correction en temps réel est en cours de développement (Benmoussa *et al.*, 2021). Il s'agit d'une carte électronique programmable qui d'une part

mesure la température de l'aimant à l'aide de capteurs miniatures collés sur les blocs de l'aimant et qui d'autre part peut agir sur l'ascenseur. Ainsi, lorsqu'un écart de température entraînant une variation de 10 μm est atteint (pas minimum de l'aimant), la carte électronique prend le contrôle de l'ascenseur et ajuste la position de l'aimant avant de poursuivre les acquisitions RMN.

Toutefois, avant de complexifier le modèle, des approfondissements de nos études et des développements méthodologiques doivent être entrepris. En raison de la présence du gradient naturel $\mathbf{B}_0$, la diffusion entraîne des effets délétères sur la relaxation transversale qui est accélérée (diminution du T_2). Pour limiter son impact, nous avons réalisé les acquisitions avec la séquence CPMG avec un temps d'écho minimum (cf. équation 13). Dans les tissus biologiques et selon l'échelle de mesure, les T_2 sont caractéristiques des tissus et/ou des compartiments cellulaires (Van As, 2007). Du fait de ce gradient naturel, les décroissances T_2 acquises avec notre capteur présentent un SNR plus faible que celles obtenues avec des relaxomètres (dispositifs permettant d'étudier la dynamique des molécules par le biais de la relaxation RMN) de paillasse. De ce fait, nous n'avons pas pu remonter aux différentes fractions d'eau telles que la vacuole, le cytoplasme ou encore la paroi cellulaire. Nous avons donc réattribué les T_2 selon les deux principales fractions d'eau rencontrées dans les tissus, à savoir un T_2 caractéristique de l'eau liée (T_2 court) et un T_2 caractéristique de l'eau libre (T_2 long). Grâce à cette attribution des T_2 , nous avons pu mettre en évidence une variation diurne du T_2 long. Ces variations pouvaient être dues à la présence de la diffusion et/ou d'un flux lié à la transpiration des plantes. Nous avons vérifié en laboratoire sur un fantôme sans flux avec une variation de température identique à celles des expériences que l'effet du changement de la diffusion à cause de la température se traduisait sur les décroissances CPMG par une variation de l'ordre de la milliseconde du T_2 apparent (augmentation de 2.1% par rapport au T_2 le plus faible, cf. Annexe 4). Dans le cas de certaines plantes, comme *D. glomerata* par exemple, les variations étaient de l'ordre de la dizaine de millisecondes (augmentation entre le jour et la nuit chez certaines espèces entre 7.3% et 34.7%, Chapitre 4). Nous avons donc retenu l'hypothèse que ces fluctuations de T_2 étaient dues au flux transpiratoire. Ces variations de T_2 dues à la présence de la transpiration le jour sont donc encourageantes pour la suite, notamment pour l'estimation du flux dans les racines. Par ailleurs, dans le chapitre 4, nous avons mis en évidence sur neuf espèces prairiales une relation négative entre la valeur de T_2 et la densité des tissus racinaires. La densité de tissus est corrélée positivement avec la proportion de stèle dans les racines et donc avec la conductance hydraulique racinaire. Ainsi, la valeur absolue du T_2 ainsi

que son évolution temporelle sont liées au transport de l'eau dans les racines. Par ailleurs, nous avons montré que notre dispositif permettait de mettre en évidence la déshydratation des tissus racinaires par une diminution du signal RMN. Grâce aux profils et aux variations de leur forme (perte possible en volume occupé, en intensité de signal), la localisation des racines qui se déshydrataient en premier lieu pouvait être observée. De même, en présence d'un stress hydrique intense une perte du cycle diurne était observée comme attendue par la diminution de la conductance stomatique reflétant l'arrêt de la transpiration et supportée par la littérature (Yoder et al., 2014; Malone et al., 2016). Pour aller plus loin, nous pourrions :

- Vérifier la relation T_2 – proportion de stèle en faisant des mesures (i) sur des racines avec et sans cortex (retrait du cortex avec un scalpel ou racines déjà sans cortex). Nous connaissons ainsi l'influence du T_2 du cortex sur le T_2 mesuré ; et/ou (ii) à champ magnétique homogène. Le champ magnétique $\mathbf{B}_0$ étant homogène, l'effet de la diffusion est atténué. Ces mesures RMN seraient ensuite confrontées à des observations histologiques qui permettraient de connaître l'anatomie des racines et de calculer les proportions des différents tissus.
- Mesurer les flux dans les racines. Nous avons d'ores et déjà envisagé la mesure des flux dans les racines avec notre capteur par le biais de deux méthodes : (i) la méthode PFG et (ii) la méthode de sortie de coupe présentées dans la partie **I.3.3.3. Mesure des déplacements moléculaires**. Cependant, en raison de la sensibilité des mesures et de l'organisation des racines dans la fenêtre de mesure (enchevêtrement racinaire impliquant que les flux ne sont pas nécessairement parallèles au gradient d'encodage), l'obtention de propagateurs reproductibles est difficile. Aussi, du fait des variations de T_2 long entre le jour et la nuit, l'approche telle que proposée par Hemminga *et al.* (1977) qui tient compte de l'effet de sortie de coupe et du shift de phase (pour les déplacements dans la direction de $\mathbf{B}_0$) sur les amplitudes des échos de la séquence CPMG pourrait être utilisée. Cette approche sans gradient d'encodage directionnel paraît être bien adaptée aux racines.
- Suivre toute la cinétique entre la période d'hydratation et la période de stress hydrique intense. Nous pourrions alors observer le comportement des paramètres RMN selon la durée et l'intensité du stress hydrique. Le seuil de détection du dispositif RMN pourrait ainsi être déterminé selon les niveaux de stress et comparé aux données écophysiologiques (détection précoce, simultanée ou tardive du stress hydrique).

En plus de ces développements, nous pouvons envisager d'autres perspectives. Comme nous l'avons vu, la sensibilité de l'appareil peut être limitante avec l'influence des inhomogénéités des champs magnétiques, de la diffusion, des flux, du sol... Cette sensibilité pourrait être améliorée par le changement de l'antenne RF. En effet, nous avons la possibilité d'utiliser une antenne plus sensible qui toutefois présente un volume sensible plus petit (2 cm x 2 cm x 100 μm , soit 0.04 cm^3) et permet une exploration moins en profondeur (maximum 10 mm).

Outre cette question de la sensibilité de la mesure RMN, des perspectives au niveau des plantes peuvent être envisagées. Lors de ces premiers travaux, nous nous sommes concentrés sur l'étude d'une zone dont la profondeur était déterminée par celle du capteur d'humidité (position à 16 cm de profondeur). De plus, nous avons souhaité étudier chaque espèce sur un temps assez long pour pouvoir en tirer des conclusions robustes. Pour de prochaines études, il serait donc intéressant de regarder comment réagissent les racines en fonction soit de leur profondeur soit de la position de mesure dans le système racinaire (par exemple cas des espèces ayant des racines pivots tels que *T. officinale*). Pour cela, il serait possible de, soit diminuer la résolution temporelle des mesures et déplacer/replacer l'aimant, soit d'avoir plusieurs instruments. Au vu du prix raisonnable d'un tel équipement, cette option peut être considérée.

Par ailleurs, même si nos expérimentations ont été réalisées sur des modèles de rhizotrons qui permettaient de séparer physiquement les racines du sol, ces derniers avaient un certain degré de complexité. En effet, les plantes utilisées étaient des espèces relativement sauvages qui nous permettaient d'être proches de la réalité mais leurs phénotypes et leurs génotypes étaient probablement variables. Aussi, pour s'affranchir de la variabilité génotypique/phénotypique, nous pourrions envisager de travailler avec des organismes génétiquement modifiés (OGM). Nous pourrions par exemple étudier un génotype contrôle et un génotype avec une absence de régulation des aquaporines ou avec une absence de sécrétion de l'acide abscissique (ABA) et comparer, avec l'IRM portable, leurs réponses en présence d'un stress hydrique. En effet, la régulation de l'expression des aquaporines dépend de facteurs internes tels que le rythme circadien (Takase et al., 2011) mais également externes tels que la disponibilité en eau dans le sol. Lorsque celle-ci est réduite, les racines sécrètent de l'ABA qui permet de signaler cette sécheresse et d'entraîner la fermeture partielle des stomates réduisant ainsi la transpiration (Draye et al., 2010). Cette fermeture est due à l'inhibition des aquaporines présentes dans les stomates par l'ABA (Maurel et al., 2016). De même, en présence d'un stress hydrique durable, l'activité des aquaporines est diminuée dans les racines afin d'éviter le reflux de l'eau des racines vers le sol (Singh et al., 2020). Selon la durée et l'intensité du stress, des

prélèvements pourraient être effectués au niveau des racines et des feuilles et la teneur en ABA ou l'expression des aquaporines mesurées et comparées entre les génotypes. De même, les mesures RMN (teneur en eau, flux) seraient comparées et confrontées à ces mesures biologiques.

Enfin, nous pourrions aller plus loin dans notre exploration et dans l'étude des prairies en faisant des expériences sur des mélanges d'espèces. En effet, contrairement aux cultures agricoles qui sont généralement des monocultures, les prairies naturelles sont constituées de communautés végétales diverses en espèces. Cette diversité d'espèces permet, grâce à une complémentarité dans l'utilisation des ressources aériennes et souterraines, de maintenir la stabilité de la productivité de l'écosystème prairial à la suite d'événements liés au changement climatique tels que la sécheresse (Isbell et al., 2015; Kreyling et al., 2017; Yang et al., 2019). Une diversité d'espèces importante permet également dans le contexte de changement climatique de diminuer les pertes en carbone et d'augmenter son stockage dans le sol (Steinbeiss et al., 2008; Yang et al., 2019; Grange et al., 2021). Par ailleurs, le mode de gestion des prairies impacte leur capacité de séquestration du carbone. En effet, le pâturage et la fauche entraînent des diminutions de l'indice foliaire, et donc de la quantité d'eau transpirée et de la quantité de carbone fixé (Haferkamp and MacNeil, 2004). De même, Li *et al.*, (2022b) ont montré que la fréquence de la fauche affecte le stockage du carbone dans les couches superficielles (0-20 cm) du sol, une fréquence élevée diminuant les stocks. Balasubramanian *et al.*, (2020) ont montré que la fauche entraîne un stockage de carbone plus faible que le pâturage. La présence d'herbivores ainsi que l'intensité du pâturage affectent également la capacité de stockage, celles-ci étant négativement reliées aux stocks de carbone (Balasubramanian et al., 2020). Ainsi, quels que soient le mode de gestion et la fréquence de cette gestion, les capacités de stockage du carbone des prairies gérées sont plus faibles que celles des prairies peu ou pas gérées (Balasubramanian et al., 2020; Li et al., 2022b). Nous pourrions donc envisager une étude de la teneur en eau et des flux d'eau dans les racines d'espèces positionnées dans des rhizotrons contrôles, sans coupe, et des rhizotrons où la végétation serait coupée plus ou moins fréquemment.

Ainsi, ces travaux de thèse ont permis de montrer que l'IRM portable est un outil prometteur pour le domaine du végétal. Bien que les racines soient des organes difficiles d'accès avec une épaisseur très fines par rapport à d'autres organes tels que les branches par exemple, nous avons pu montrer que notre instrument était suffisamment sensible pour

caractériser et suivre temporellement de manière reproductible des teneurs en eau selon diverses conditions hydriques et qu'il pouvait renseigner sur les stratégies d'utilisation de l'eau des plantes. Ces travaux constituent une première application du NMR-MOUSE sur les végétaux, permettant d'élargir les multiples domaines d'applications du NMR-MOUSE qui s'étendent de la médecine à l'héritage culturel en passant par l'étude des matériaux (Blümich et al., 2008). Au-delà de mon travail de thèse et au vu de la flexibilité du dispositif, le NMR-MOUSE peut être utilisé pour la caractérisation de produits agroalimentaires et de processus de transformation ou encore pour effectuer du contrôle qualité.

Personnellement, j'ai retrouvé cette pluridisciplinarité dans le cadre de ma thèse en étant à l'interface de personnes spécialistes de la RMN et de personnes spécialistes du fonctionnement écophysiologique des plantes. Par ailleurs, au-delà des compétences et des connaissances acquises tout au long de la thèse, ayant un parcours universitaire orienté vers le biomédical, l'adaptation à une nouvelle discipline telle que la biologie végétale, qui m'était alors quasiment inconnue, a été en soi une expérience très enrichissante.

Annexes

Annexe 1. Matériels supplémentaires Article « *Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by Portable NMR* »

Figure S1: CPMG decay curves of each species

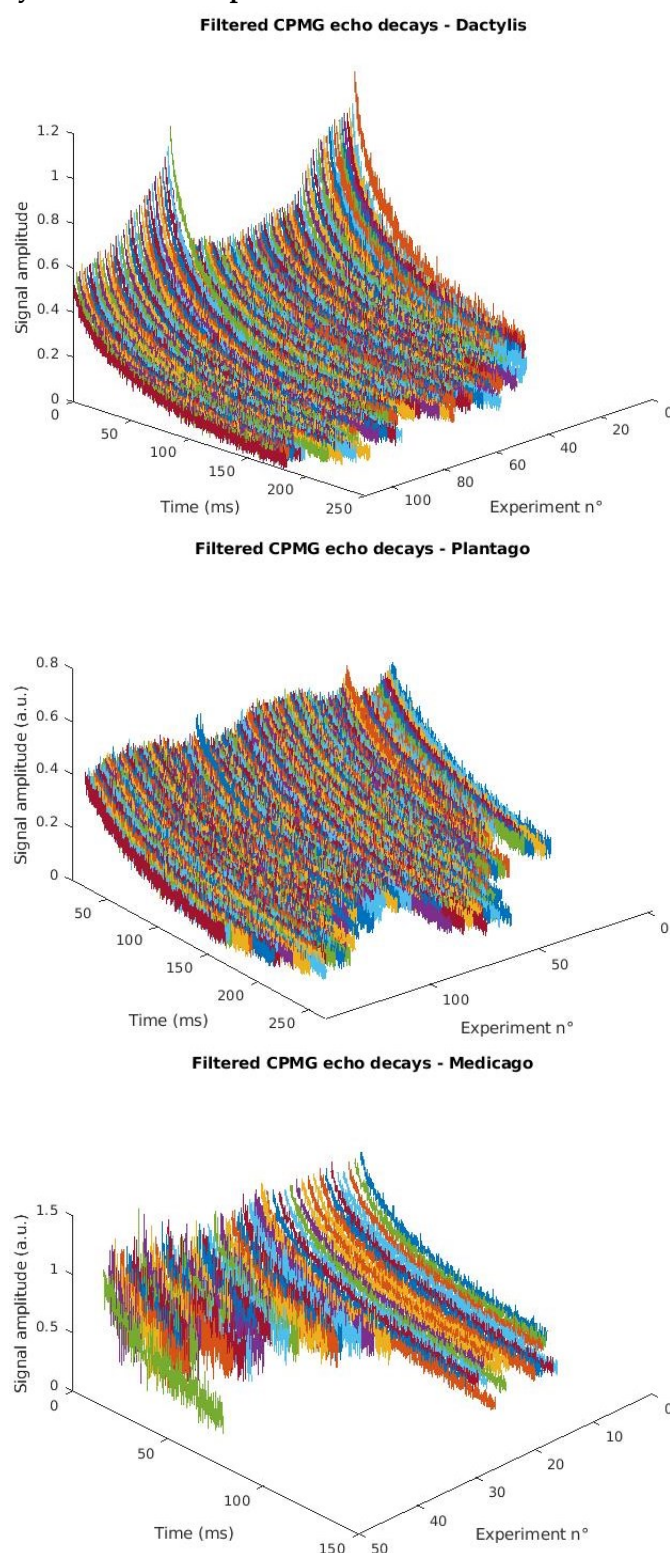


Figure S1. Filtered CPMG decay curves of *D. glomerata* (top), *P. lanceolata* (middle), and *M. sativa* (bottom)

Methods S1. Processing of the transverse relaxation decay curves

A representation of the transversal decay data obtained with the CPMG pulse sequence is presented in Fig S2A. Before any ILT analysis, data were first preprocessed by a) removing the first 10 points which were highly affected by both B_0 and B_1 inhomogeneities, i.e., high oscillations, and b) removing the last noisy points, i.e. all points after the first echo with an amplitude less than or equal to zero.

Assuming that the measured echo decays stands as a superposition of exponential decays, the signal can be expressed as:

$$S(t_i) = \sum_{j=1}^M A_j e^{-t_i/T_{2j}}, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad [1]$$

where t_i is the measurement time, M is the number of exponential components, N is the total number of data points, and A_j is the relative amplitude for each partitioned T_2 time, T_{2j} .

In the present study, the multiexponential analysis was performed using an in-house Matlab® implementation of the non-negative least squares (NNLS) algorithm [42]. To recover the M number of exponential components, their amplitudes A_j and their relaxation times T_{2j} , the NNLS algorithm was fed with a large M (i.e., 100) number of T_{2j} values logarithmically spaced from 1 ms to 1000 ms. To better reflect the continuous distribution of water commonly found in biological systems, an extra regularization constraint was added to smooth the estimated discrete distribution of A_j provided by NNLS. The regularized NNLS solution was then a set of amplitudes A_j that minimize the misfit:

$$\sum_{i=1}^N \left| \sum_{j=1}^M A_{ij} S_j - y_i \right|^2 + \mu \sum_{j=1}^M |S(T_{2j})|^2 \mu \geq 0 \quad [2]$$

where the Lagrangian term μ is automatically calculated using the cross-validation approach [43].

Figure S2. Flow of NNLS inversion of the transversal relaxation decay curves.

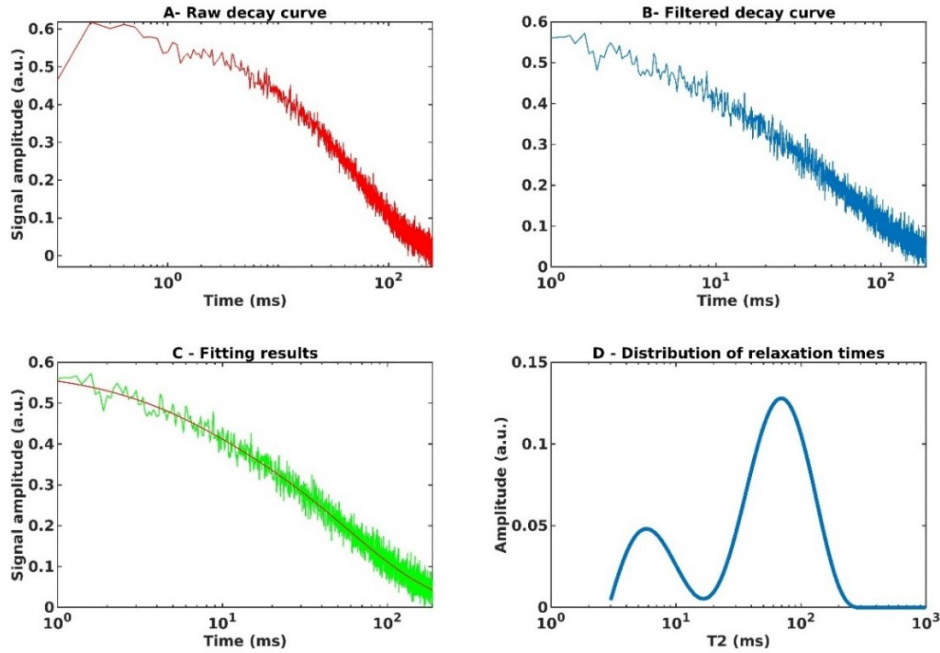


Figure S2. Flow of NNLS inversion of the transversal relaxation decay curves. A : Full transversal relaxation decay curve. B : Filtered decay after removal of the first 10 echo amplitude signals and the last and only noisy data points. C : Filtered decay (green) along with the fitted model (red) after NNLS analysis. D : The resulting distribution of T_2 relaxation provided by NNLS.

Annexe 2. Matériels supplémentaires Article « *Root structure-function relationships in water use for several herbaceous species revealed by portable NMR* »

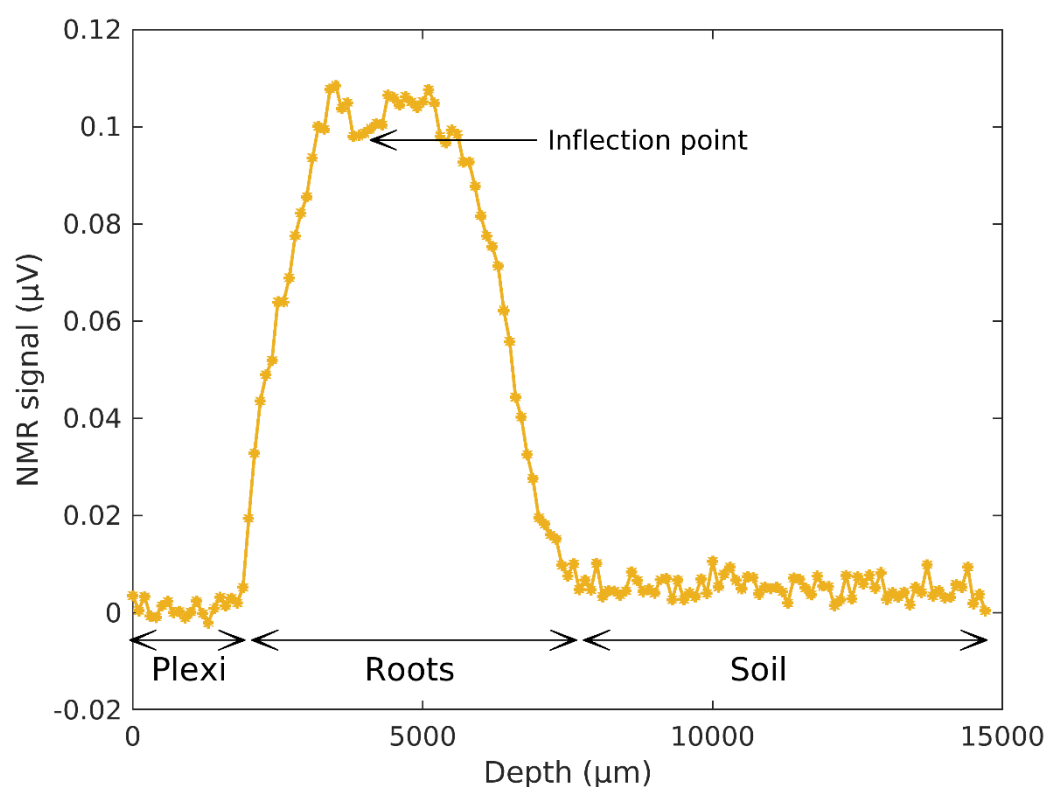


Figure S1. A profile of *T. pratense*. Visualization of the three zones composing the rhizotron. From the left to the right: the transparent wall in Plexiglass, the roots and the soil zones. Observation of an inflection point in the root zone.

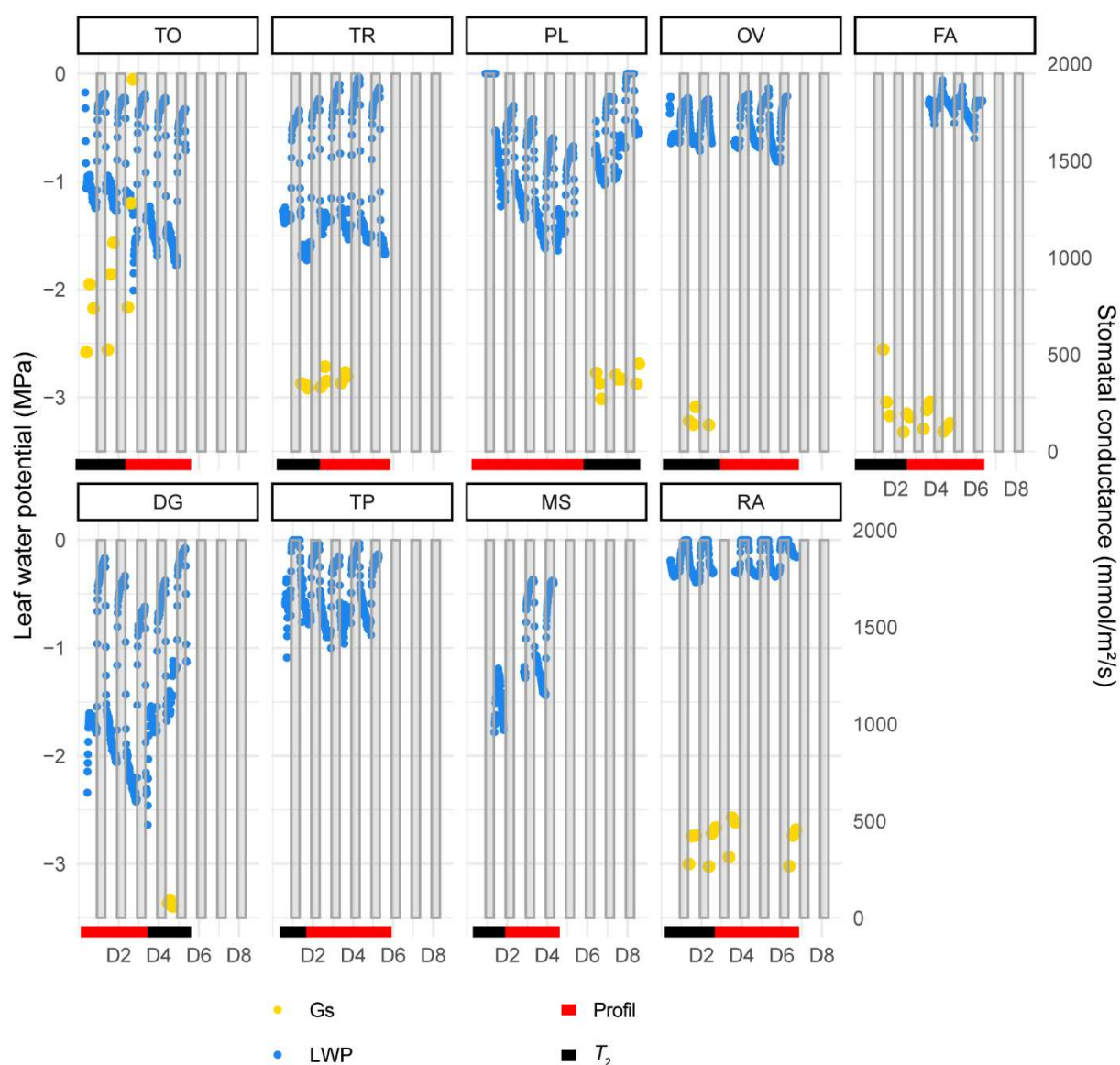


Figure S2. Temporal evolution of the mean leaf water potential (blue) and of stomatal conductance (yellow) measured during profile (red rectangle) and T_2 (black rectangle) measurements.

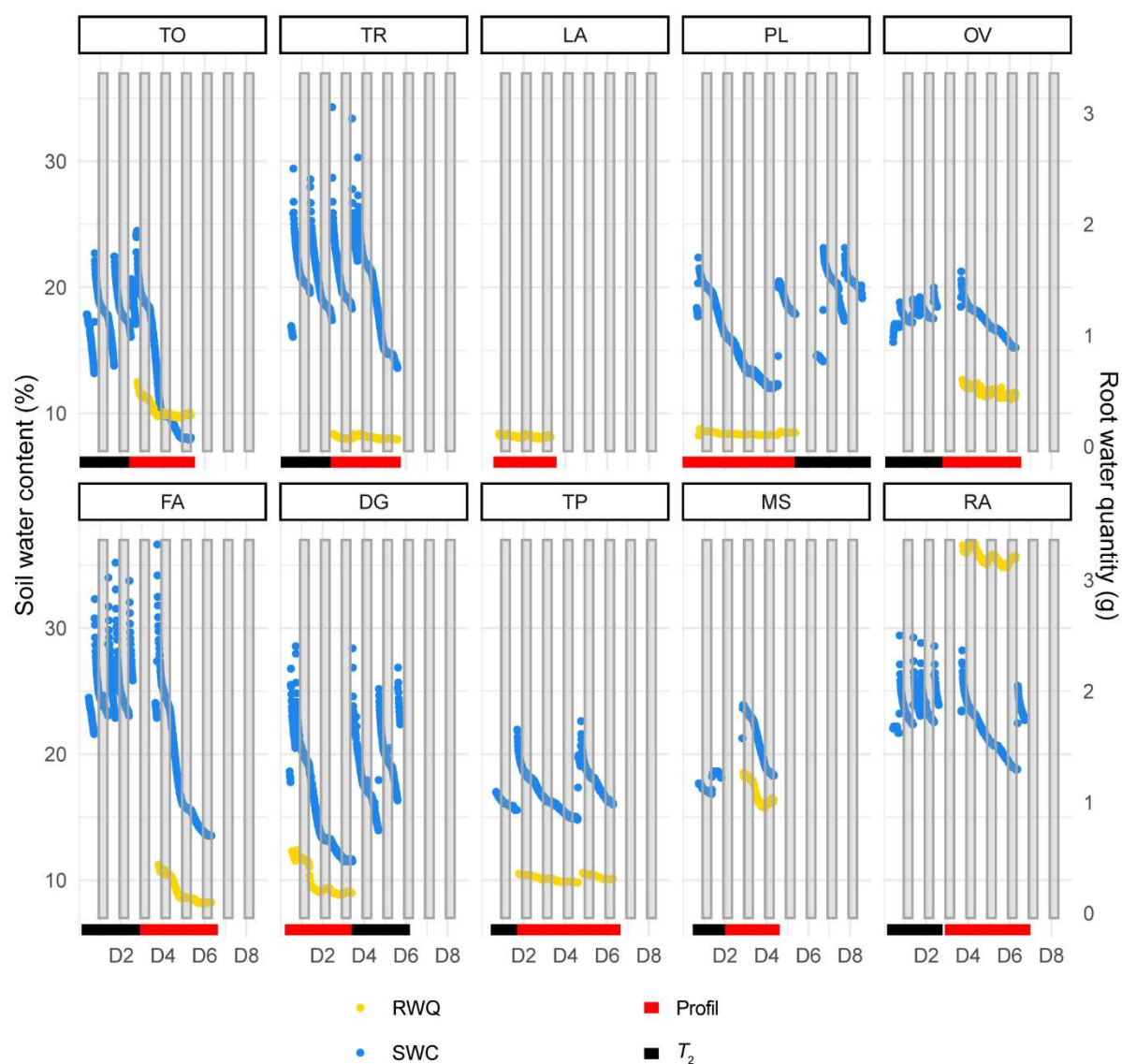


Figure S3. Temporal evolution of the soil water content (blue) measured during profile (red rectangle) and T_2 (black rectangle) measurements, and of root water quantity (yellow) obtained from the NMR profiles.

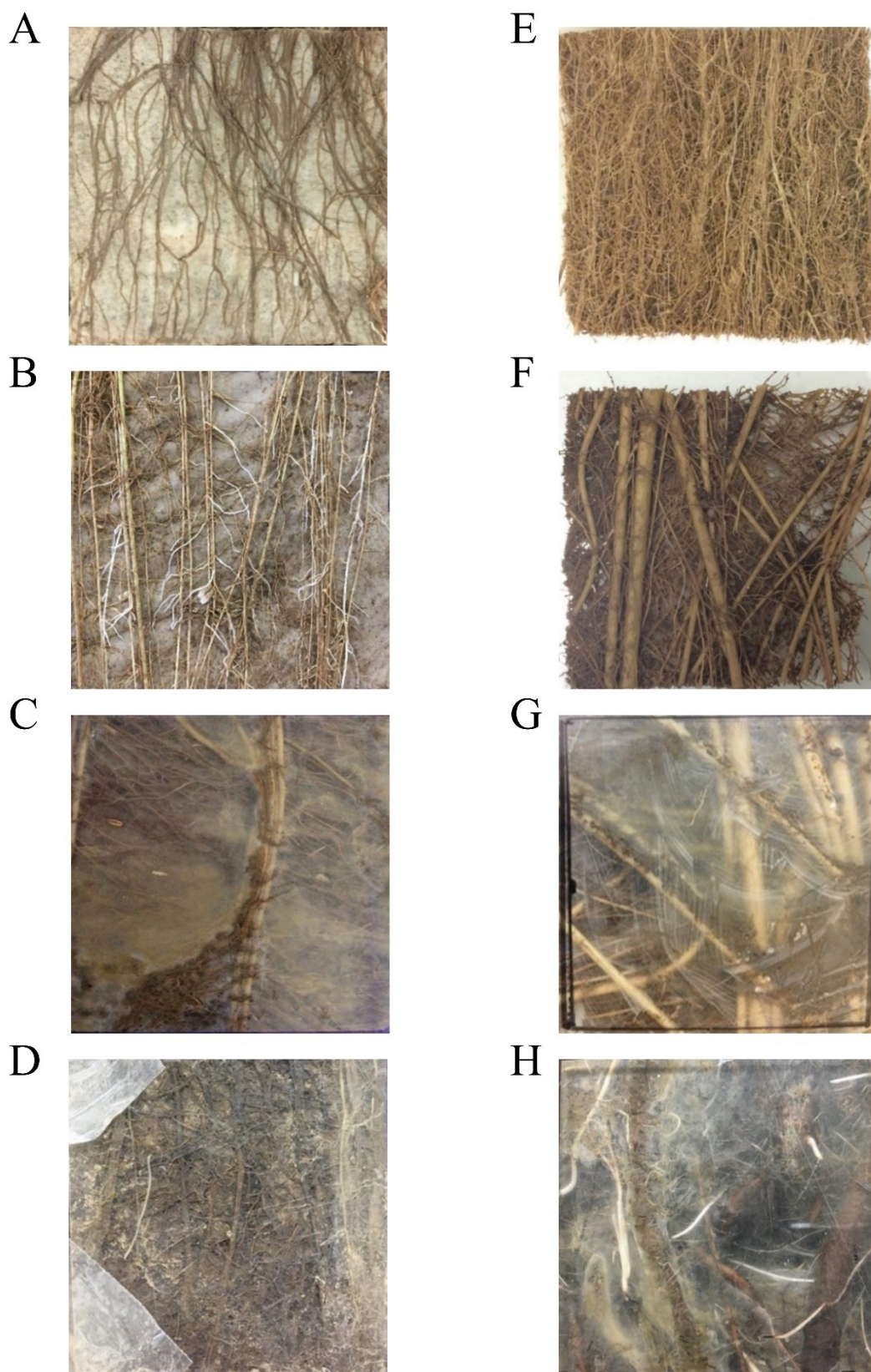


Figure S4. Photographs of the NMR measurement window of each species. A. *T. officinale*, B. *T. repens*, C. *P. lanceolata*, D. *F. arundinacea*, E. *D. glomerata*, F. *T. pratense*, G. *M. sativa*, H. *R. acetosa*

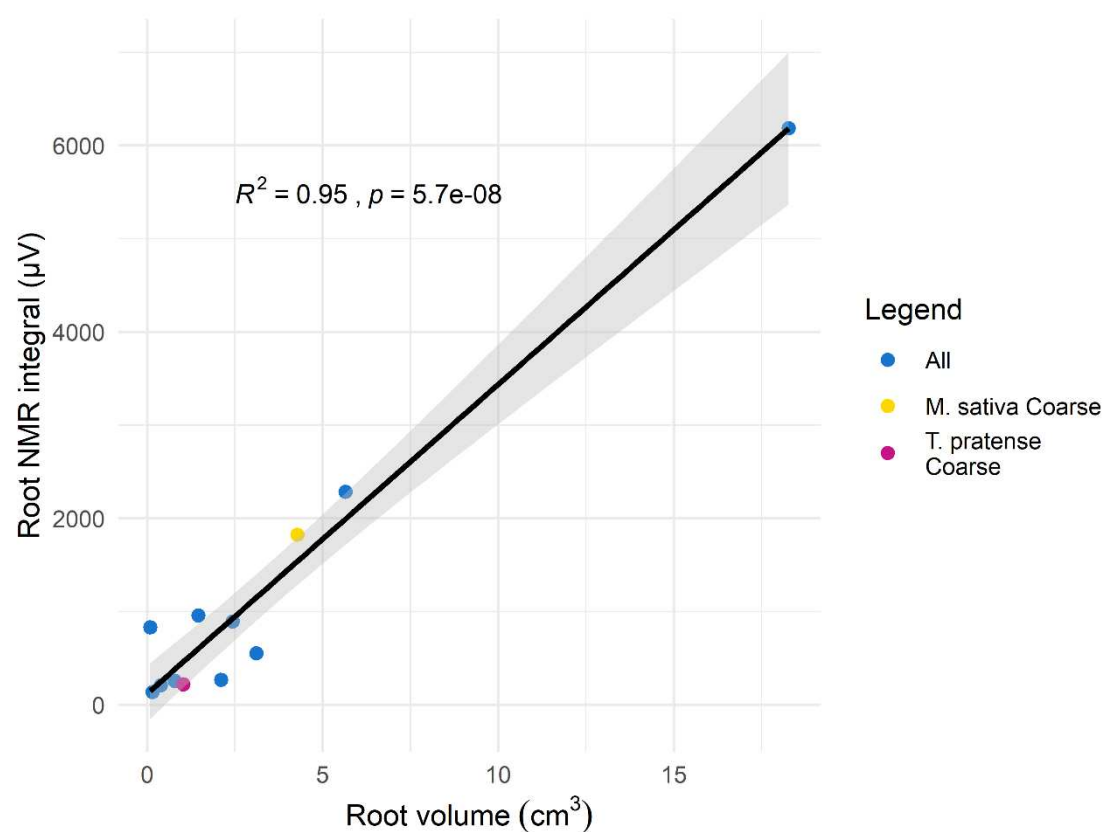


Figure S5. Relationship between the root NMR integral and the root volume (blue) and the first peak of the root NMR integral of *T. pratense* and *M. sativa* and the root volume of their coarsest roots (pink and yellow respectively).

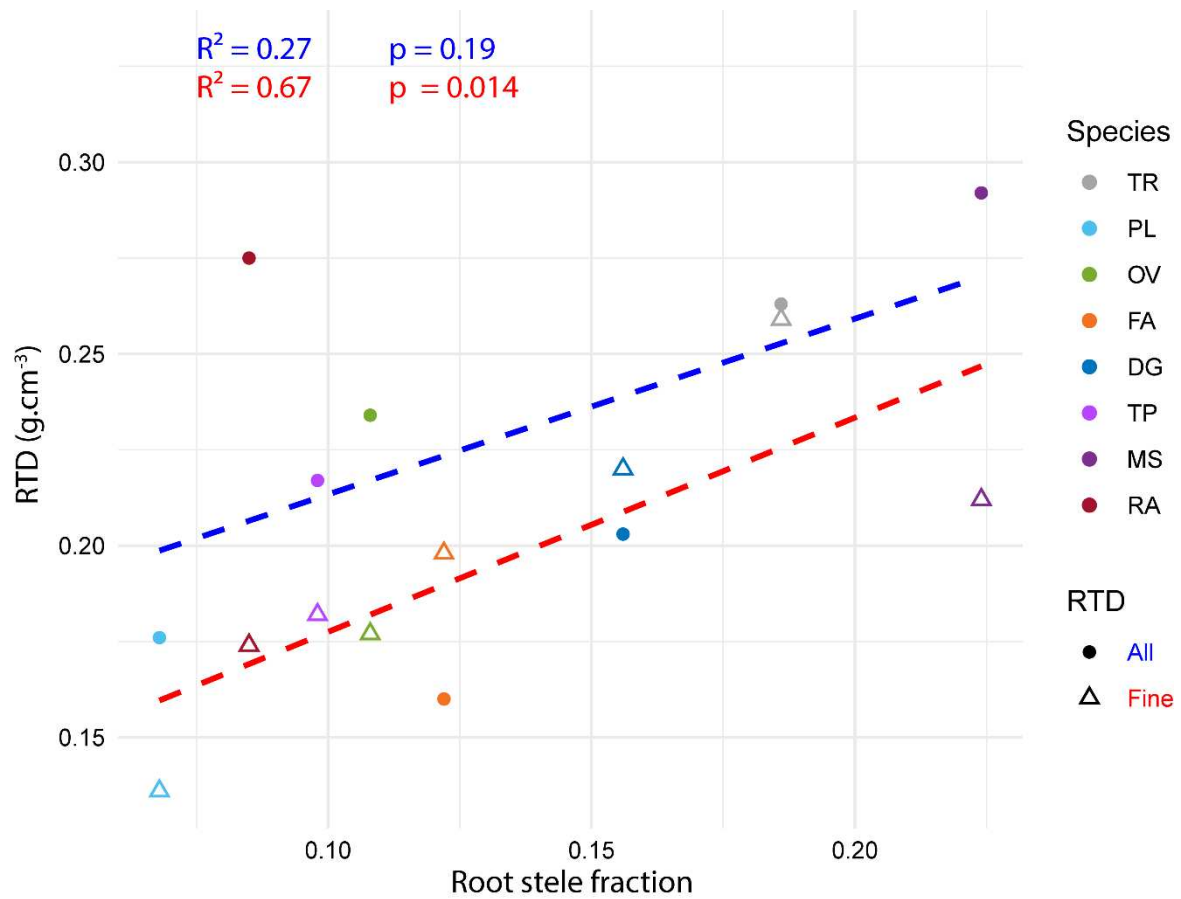


Figure S6. Our global RTD (circle, blue dashed line) and RTD of fine roots (triangle, red dashed line) in function of the root stele fraction from Guerrero-Ramírez *et al.* (2021).

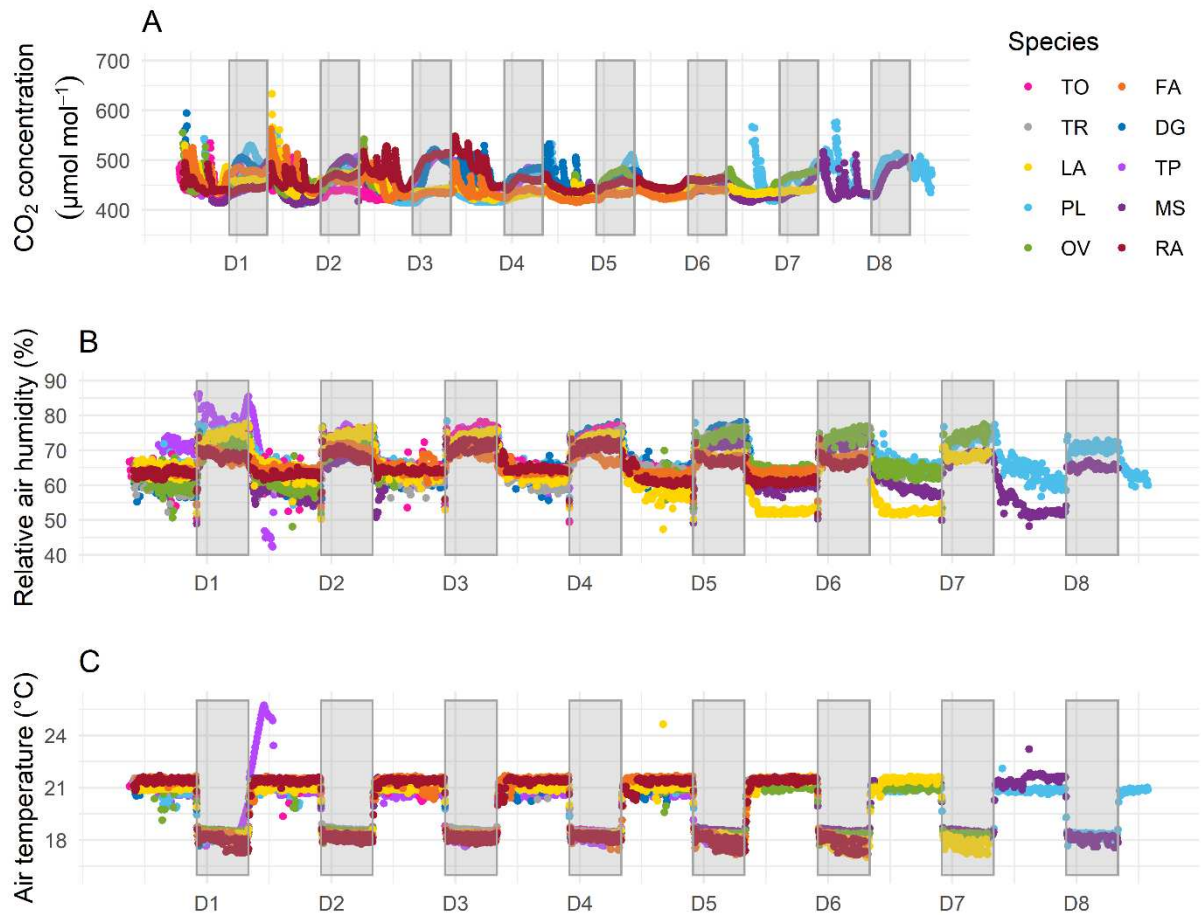


Figure S7. Evolution of the CO₂ concentration (A), the relative air humidity (B) and the air temperature (C) measured inside the climatic chamber for each experiment

Table S1. Values of short T_2 and long T_2 , and proportions of short T_2 at night and day for each species.

	Day			Night		
	Short T_2 (ms)	Long T_2 (ms)	Prop. Short T_2 (%)	Short T_2 (ms)	Long T_2 (ms)	Prop. Short T_2 (%)
TO	4.90	56.75	40.37	4.27	52.66	47.19
TR	3.95	35.31	59.45	3.73	47.55	65.37
PL	5.50	65.59	25.28	5.82	75.91	28.76
OV	6.26	65.96	25.17	5.97	70.78	24.77
FA	4.07	31.72	49.60	4.47	29.86	48.26
DG	5.06	62.53	34.96	5.03	69.62	34.11
TP	5.38	45.41	33.20	5.25	47.07	30.91
MS	5.15	40.29	35.74	5.34	45.09	31.79
RA	4.84	47.98	32.95	5.30	50.17	31.93

Table S2. Contribution of variables and species and quality of the representation of each species (cos2) to the main components of the PCA with the correlation coefficient of significant variables on the two first main axes.

		Component 1	Component 2	Component 3	Component 4	Component 5
Contribution of variables	DeltaLWP	8.78	8.89	5.72	36.62	15.16
	DeltaSWC	9.72	8.80	26.37	5.09	2.92
	FineProp	18.10	0.30	1.18	0.79	60.20
	FineRTD	0.02	45.06	3.06	5.01	1.63
	LongT2day	1.66	27.15	4.82	36.61	1.09
	RootIntegral	15.68	0.04	21.12	0.84	6.15
	RootV	17.41	0.00	13.56	0.03	6.76
	RootWC	15.81	9.66	1.58	1.34	0.13
	SRL	12.82	0.11	22.59	13.67	5.97
		Correlation	p-value			
Component 1	RootV	0.90	0.0010			
	RootIntegral	0.85	0.0035			
	DeltaSWC	0.67	0.0479			
	SRL	-0.77	0.0151			
	RootWC	-0.86	0.0033			
	FineProp	-0.92	0.0005			
Component 2	LongT2day	0.74	0.0222			
	FineRTD	-0.96	0.0001			
		Component 1	Component 2	Component 3	Component 4	Component 5
Contribution of species	TO	22.73	0.43	33.65	3.87	0.41
	TR	1.38	32.51	12.34	2.33	5.64
	PL	6.09	18.51	0.69	0.07	0.15
	OV	0.46	30.48	18.71	5.10	4.48
	FA	0.57	3.21	3.65	47.42	12.40
	DG	5.59	3.58	2.23	39.89	1.81
	TP	0.59	1.81	10.73	1.31	29.03
	MS	6.90	9.12	0.52	0.01	36.46
	RA	55.70	0.35	17.49	0.01	9.62
Cos2 of species	TO	0.70	0.01	0.26	0.02	0.00
	TR	0.07	0.73	0.16	0.02	0.01
	PL	0.41	0.54	0.01	0.00	0.00
	OV	0.02	0.67	0.24	0.05	0.01
	FA	0.05	0.12	0.08	0.71	0.05
	DG	0.37	0.10	0.04	0.48	0.01
	TP	0.09	0.12	0.43	0.04	0.22
	MS	0.52	0.30	0.01	0.00	0.13
	RA	0.92	0.00	0.07	0.00	0.01

Annexe 3. Matériels supplémentaires Chapitre 5

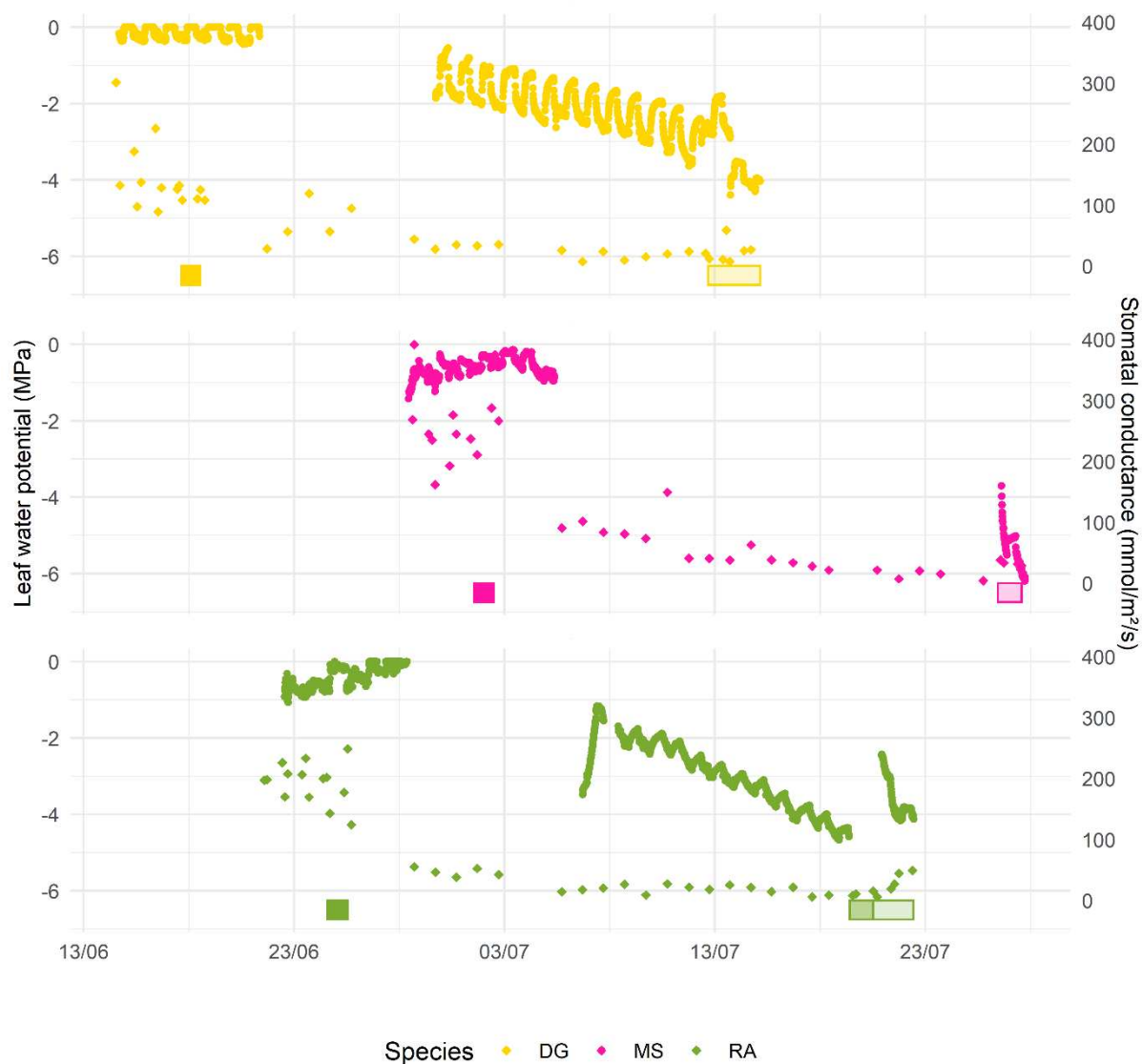


Figure S1. Évolution du potentiel hydrique foliaire (LWP) et de la conductance stomatique (losange) tout au long des expériences pour *D. glomerata* (jaune), *M. sativa* (rose) et *R. acetosa* (vert). Les rectangles colorés correspondent aux acquisitions des profils en conditions hydriques non limitantes (rectangles pleins) et en stress hydrique et réhydratation (rectangles transparents).

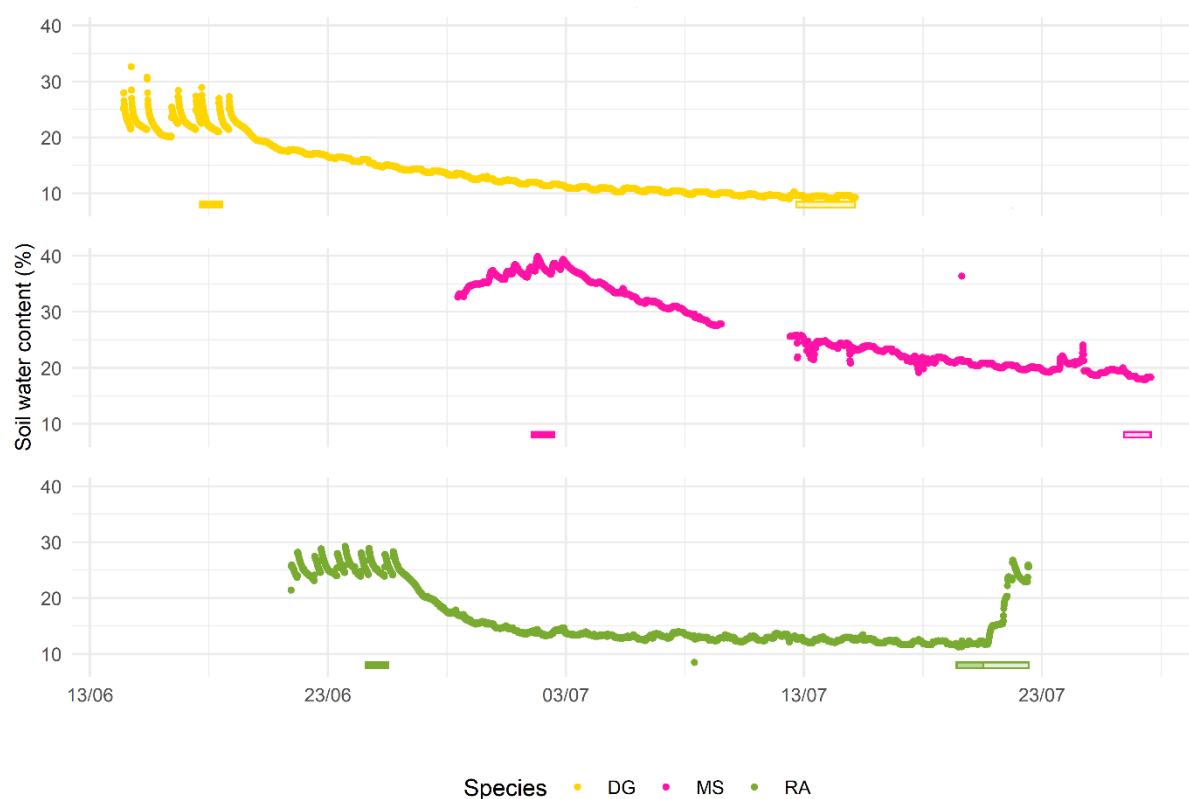


Figure S2. Évolution de la teneur en eau du sol (SWC) tout au long des expériences pour *D. glomerata* (jaune), *M. sativa* (rose) et *R. acetosa* (vert). Les rectangles colorés correspondent aux acquisitions des profils en conditions hydriques non limitantes (rectangles pleins) et en stress hydrique et réhydratation (rectangles transparents).

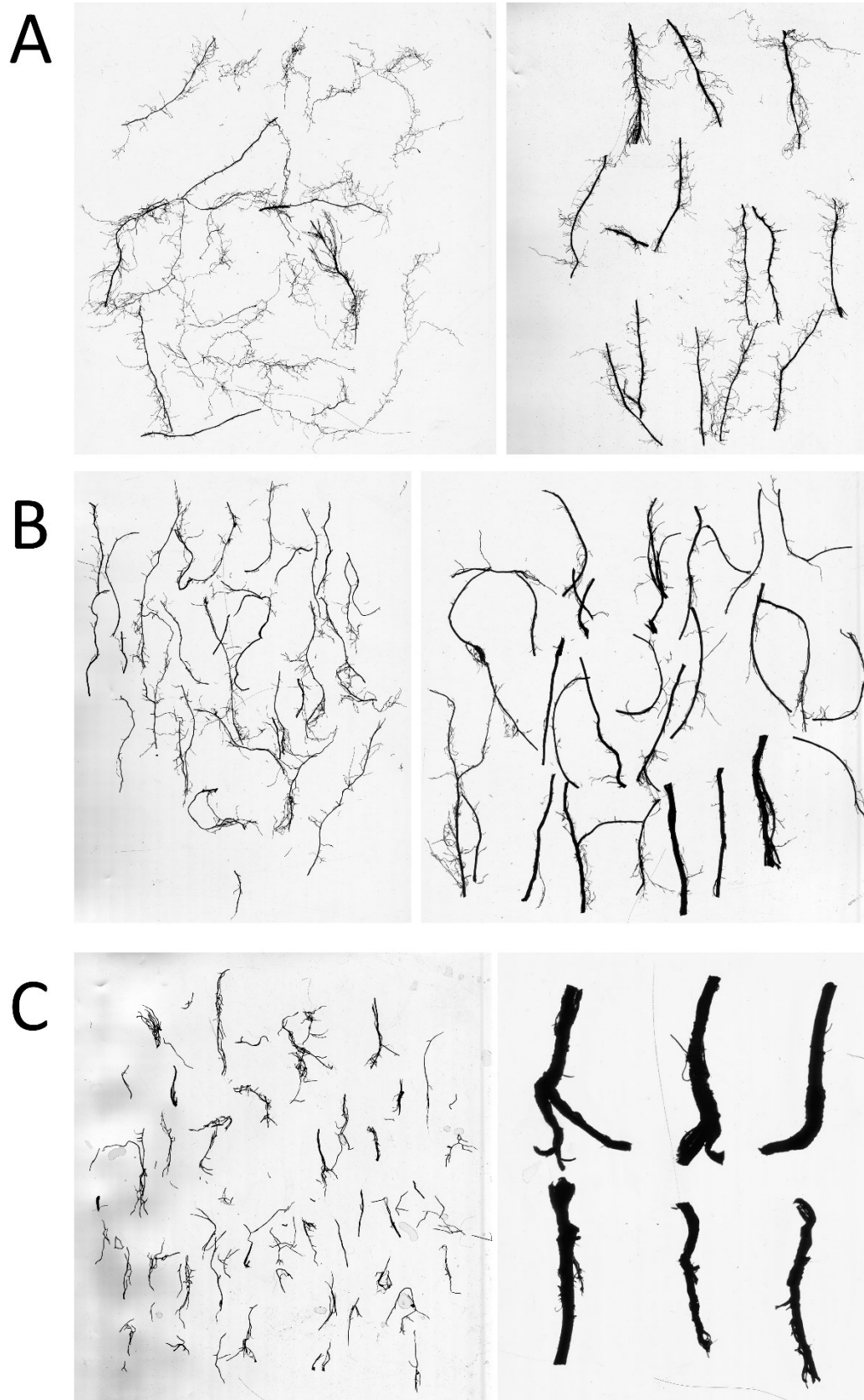


Figure S3. Exemples de scans de fines (à gauche) et de grosses (à droite) racines présentes dans la fenêtre de mesure RMN. A. *D. glomerata* ; B. *R. acetosa* et C. *M. sativa*.

A



B



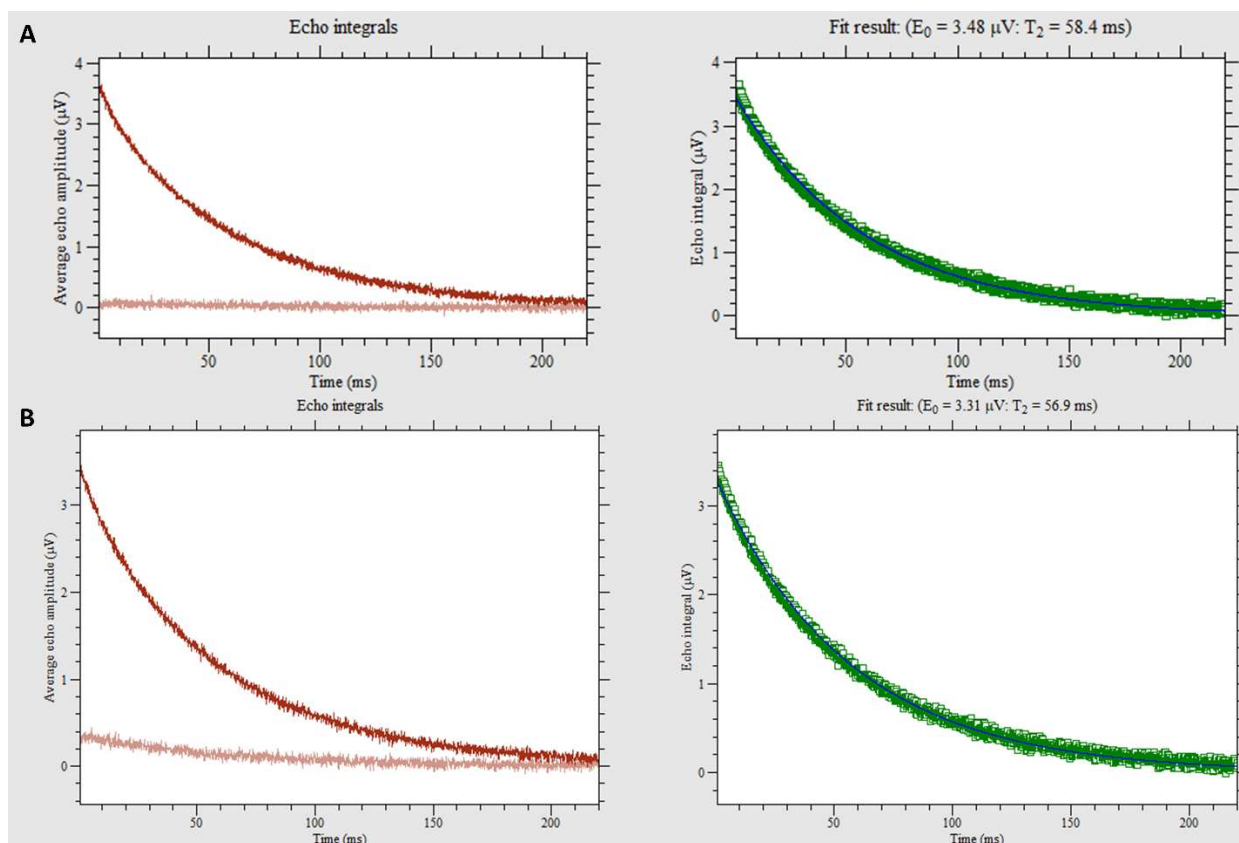
C



Figure S4. Photographies de la fenêtre de mesure RMN. A. *D. glomerata* ; B. *R. acetosa* et C. *M. sativa*.

Annexe 4. Vérification de l'effet de la température sur le T_2

Mesures de T_2 acquises sur un fantôme sans flux (boite de pétri avec de l'eau additionnée de CuSO_4) dans une chambre climatique (A) à 16.6°C et à (B) 20.4°C



3 mesures ont été effectuées pour chaque température :

(A) $E_0 = 3.45 \pm 0.03 \mu\text{V}$; $T_2 = 58.3 \pm 0.1 \text{ ms}$

(B) $E_0 = 3.34 \pm 0.04 \mu\text{V}$; $T_2 = 57.1 \pm 0.2 \text{ ms}$

Références bibliographiques

- Affek AN** (2018) Indicators of ecosystem potential for pollination and honey production. *Ecological Indicators* **94**: 33–45
- Ahmed MA, Kroener E, Holz M, Zarebanadkouki M, Carminati A** (2014) Mucilage exudation facilitates root water uptake in dry soils. *Functional Plant Biol* **41**: 1129
- Ahmed MA, Zarebanadkouki M, Kaestner A, Carminati A** (2016) Measurements of water uptake of maize roots: the key function of lateral roots. *Plant Soil* **398**: 59–77
- Ahmed MA, Zarebanadkouki M, Meunier F, Javaux M, Kaestner A, Carminati A** (2018) Root type matters: measurement of water uptake by seminal, crown, and lateral roots in maize. *Journal of Experimental Botany* **69**: 1199–1206
- Ainsworth EA, Rogers A** (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions: Photosynthesis and stomatal conductance responses to rising [CO₂]. *Plant, Cell & Environment* **30**: 258–270
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH (Ted), et al** (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259**: 660–684
- Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, McIvor J, Milne J, Morris C, Peeters A, et al** (2011) An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass and Forage Science* **66**: 2–28
- Amitrano C, Arena C, Rouphael Y, De Pascale S, De Micco V** (2019) Vapour pressure deficit: The hidden driver behind plant morphofunctional traits in controlled environments. *Ann Appl Biol* **175**: 313–325
- Arnault P** (2021) Evolution des flux d'eau dans des plantes herbacées prairiales lors de sécheresses. 31
- Arnone III JA, Verburg PSJ, Johnson DW, Larsen JD, Jasoni RL, Lucchesi AJ, Batts CM, von Nagy C, Coulombe WG, Schorran DE, et al** (2008) Prolonged suppression of ecosystem carbon dioxide uptake after an anomalously warm year. *Nature* **455**: 383–386
- Baek S, Lim J, Lee JG, McCarthy MJ, Kim SM** (2020) Investigation of the Maturity Changes of Cherry Tomato Using Magnetic Resonance Imaging. *Applied Sciences* **10**: 5188
- Bagnall GC, Altobelli SA, Conradi MS, Fabich HT, Fukushima E, Koonjoo N, Kuethe DO, Rooney WL, Stupic KF, Sveinsson B, et al** (2022) Design and demonstration of a low-field magnetic resonance imaging rhizotron for in-field imaging of energy sorghum roots. *The Plant Phenome Journal* **5**: e20038

- Bagnall GC, Koonjoo N, Altobelli SA, Conradi MS, Fukushima E, Kuethe DO, Mullet JE, Neely H, Rooney WL, Stupic KF, et al** (2020) Low-field magnetic resonance imaging of roots in intact clayey and silty soils. *Geoderma* **370**: 114356
- Bai Y, Cotrufo MF** (2022) Grassland soil carbon sequestration: Current understanding, challenges, and solutions. *Science* **377**: 603–608
- Balasubramanian D, Zhou W-J, Ji H-L, Grace J, Bai X-L, Song Q-H, Liu Y-T, Sha L-Q, Fei X-H, Zhang X, et al** (2020) Environmental and management controls of soil carbon storage in grasslands of southwestern China. *Journal of Environmental Management* **254**: 109810
- Bariac T, Gonzalez-Dunia J, Katerji N, Béthenod O, Bertolini JM, Mariotti A** (1994) Variabilité spatio-temporelle de la composition isotopique de l'eau (18O, 2H) dans le continuum sol-plante-atmosphère 2. Approche en conditions naturelles. *Chemical Geology* **115**: 317–333
- Bariac T, Rambal S, Jusserand C, Berger A** (1989) Evaluating water fluxes of field-grown alfalfa from diurnal observations of natural isotope concentrations, energy budget and ecophysiological parameters. *Agricultural and Forest Meteorology* **48**: 263–283
- Barrieu F, Marty-Mazars D, Thomas D, Chaumont F, Charbonnier M, Marty F** (1999) Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta* **209**: 77–86
- Bayer JV, Jaeger F, Schaumann GE** (2010) Proton nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometry in soil science applications. *The Open Magnetic Resonance Journal* **3**: 15–26
- Bayram H, Öztürk AB** (2014) Global Climate Change, Desertification, and Its Consequences in Turkey and the Middle East. *In* KE Pinkerton, WN Rom, eds, *Global Climate Change and Public Health*. Springer New York, New York, NY, pp 293–305
- Beer C, Reichstein M, Tomelleri E, Ciais P, Jung M, Carvalhais N, Rödenbeck C, Arain MA, Baldocchi D, Bonan GB, et al** (2010) Terrestrial Gross Carbon Dioxide Uptake: Global Distribution and Covariation with Climate. *Science* **329**: 834–838
- Beierkuhnlein C, Fischer J-C** (2021) Global biomes and ecozones – Conceptual and spatial communalities and discrepancies. *Erdkunde* **75**: 249–270
- Ben-Asher J, Garcia y Garcia A, Flitcroft I, Hoogenboom G** (2013) Effect of atmospheric water vapor on photosynthesis, transpiration and canopy conductance: A case study in corn Plant Soil Environ **59**: 549–555
- Bengtsson J, Bullock JM, Egoh B, Everson C, Everson T, O'Connor T, O'Farrell PJ, Smith HG, Lindborg R** (2019) Grasslands-more important for ecosystem services than you might think. *Ecosphere* **10**: e02582
- Benmoussa A, Nuix M, Jean-Marie B, Pagès G, Traoré A** (2021) Réaliser des mesures en extérieur avec un aimant unilatéral : Comment s'affranchir des biais de mesure RMN dus aux variations de température. *Journées RMN du Grand Sud*

- Berger-Landefeldt U** (1936) Der Wasserhaushalt der Alpenpflanzen.
- Bingham IJ** (2007) Quantifying the presence and absence of turgor for the spatial characterization of cortical senescence in roots of *Triticum aestivum* (Poaceae). *American Journal of Botany* **94**: 2054–2058
- Bjarnason TA, McCreary CR, Dunn JF, Mitchell JR** (2010) Quantitative T2 analysis: the effects of noise, regularization, and multivoxel approaches. *Magn Reson Med* **63**: 212–217
- Blair J, Nippert J, Briggs J** (2014) Grassland Ecology. In RK Monson, ed, *Ecology and the Environment*. Springer New York, New York, NY, pp 389–423
- Blaser SRGA, Schlüter S, Vetterlein D** (2018) How much is too much?—Influence of X-ray dose on root growth of faba bean (*Vicia faba*) and barley (*Hordeum vulgare*). *PLoS ONE* **13**: e0193669
- Bloch F** (1946) Nuclear Induction. *Phys Rev* **70**: 460–474
- Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV** (1948) Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys Rev* **73**: 679–712
- Blümich B, Blümli P, Eidmann G, Guthausen A, Haken R, Schmitz U, Saito K, Zimmer G** (1998) The NMR-mouse: construction, excitation, and applications. *Magnetic Resonance Imaging* **16**: 479–484
- Blümich B, Perlo J, Casanova F** (2008) Mobile single-sided NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **52**: 197–269
- Bogena HR, Huisman JA, Oberdörster C, Vereecken H** (2007) Evaluation of a low-cost soil water content sensor for wireless network applications. *Journal of Hydrology* **344**: 32–42
- Bottomley PA, Rogers HH, Foster TH** (1986) NMR imaging shows water distribution and transport in plant root systems in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**: 87–89
- Boval M, Dixon RM** (2012) The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. *Animal* **6**: 748–762
- Bretfeld M, Franklin SB, Hubbard RM** (2017) Initial evidence for simultaneous, bi-directional sap flow in roots of interconnected aspen ramets (*Populus tremuloides*). *Folia Geobot* **52**: 345–352
- Brodrribb TJ** (2009) Xylem hydraulic physiology: The functional backbone of terrestrial plant productivity. *Plant Science* **177**: 245–251
- Brodrribb TJ, Holbrook NM** (2004) Diurnal depression of leaf hydraulic conductance in a tropical tree species. *Plant Cell Environ* **27**: 820–827

- Brownstein KR, Tarr CE** (1979) Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Phys Rev A* **19**: 2446–2453
- Bubová T, Vrabec V, Kulma M, Nowicki P** (2015) Land management impacts on European butterflies of conservation concern: a review. *J Insect Conserv* **19**: 805–821
- Buisson E, Archibald S, Fidelis A, Suding KN** (2022) Ancient grasslands guide ambitious goals in grassland restoration. *Science* **377**: 594–598
- Bunyavanich S, Landrigan CP, McMichael AJ, Epstein PR** (2003) The impact of climate change on child health. *Ambulatory pediatrics* **3**: 44–52
- Burgess SSO, Adams MA, Bleby TM** (2000) Measurement of sap flow in roots of woody plants: a commentary. *Tree Physiology* **20**: 909–913
- Buy S, Le Floch S, Tang N, Sidiboulénouar R, Zanca M, Canadas P, Nativel E, Cardoso M, Alibert E, Dupont G, et al** (2018) Flip-flop method: A new T1-weighted flow-MRI for plants studies. *PLoS ONE* **13**: e0194845
- Cai G, Tötze C, Kaestner A, Ahmed MA** (2022) Quantification of root water uptake and redistribution using neutron imaging: a review and future directions. *The Plant Journal* **tpj.15839**
- Callaghan PT, Xia Y** (1991) Velocity and diffusion imaging in dynamic NMR microscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **91**: 326–352
- Capitani D, Brilli F, Mannina L, Proietti N, Loreto F** (2009) In Situ Investigation of Leaf Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol* **149**: 1638–1647
- Carminati A, Moradi AB, Vetterlein D, Vontobel P, Lehmann E, Weller U, Vogel H-J, Oswald SE** (2010) Dynamics of soil water content in the rhizosphere. *Plant Soil* **332**: 163–176
- Carminati A, Vetterlein D, Weller U, Vogel H-J, Oswald SE** (2009) When Roots Lose Contact. *Vadose Zone Journal* **8**: 805–809
- Carminati A, Zarebanadkouki M, Kroener E, Ahmed MA, Holz M** (2016) Biophysical rhizosphere processes affecting root water uptake. *Ann Bot* **118**: 561–571
- Carr HY, Purcell EM** (1954) Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys Rev* **94**: 630–638
- Casanova F, Perlo J, Blümich B** (2004) Velocity distributions remotely measured with a single-sided NMR sensor. *Journal of Magnetic Resonance* **171**: 124–130
- Casanova F, Perlo J, Blümich B, eds** (2011) *Single-Sided NMR*. doi: 10.1007/978-3-642-16307-4
- Clements J, White P, Buirchell B** (1993) The root morphology of *Lupinus angustifolius* in relation to other *Lupinus* species. *Aust J Agric Res* **44**: 1367

- Cochard H, Badel E, Herbette S, Delzon S, Choat B, Jansen S** (2013) Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: a critical review. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4779–4791
- Cochard H, Delzon S, Badel E** (2015) X-ray microtomography (micro-CT): a reference technology for high-resolution quantification of xylem embolism in trees. *Plant, Cell & Environment* **38**: 201–206
- Conti S, Meli P, Minelli G, Solimini R, Toccaceli V, Vichi M, Beltrano C, Perini L** (2005) Epidemiologic study of mortality during the Summer 2003 heat wave in Italy. *Environmental Research* **98**: 390–399
- Crisp D, Dolman H, Tanhua T, McKinley GA, Hauck J, Bastos A, Sitch S, Eggleston S, Aich V** (2022) How Well Do We Understand the Land-Ocean-Atmosphere Carbon Cycle? *Reviews of Geophysics* **60**: e2021RG000736
- Cuneo IF, Knipfer T, Brodersen CR, McElrone AJ** (2016) Mechanical Failure of Fine Root Cortical Cells Initiates Plant Hydraulic Decline during Drought. *Plant Physiol* **172**: 1669–1678
- Daly KR, Tracy SR, Crout NMJ, Mairhofer S, Pridmore TP, Mooney SJ, Roose T** (2018) Quantification of root water uptake in soil using X-ray computed tomography and image-based modelling. *Plant, Cell & Environment* **41**: 121–133
- De Roo L, Vergeynst L, De Baerdemaeker N, Steppe K** (2016) Acoustic Emissions to Measure Drought-Induced Cavitation in Plants. *Applied Sciences* **6**: 71
- De Schepper V, Bühler J, Thorpe M, Roeb G, Huber G, van Dusschoten D, Jahnke S, Steppe K** (2013) ¹¹C-PET imaging reveals transport dynamics and sectorial plasticity of oak phloem after girdling. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2013.00200
- Defraeye T, Derome D, Aregawi W, Cantré D, Hartmann S, Lehmann E, Carmeliet J, Voisard F, Verboven P, Nicolai B** (2014) Quantitative neutron imaging of water distribution, venation network and sap flow in leaves. *Planta* **240**: 423–436
- Dietzen CA, Larsen KS, Ambus PL, Michelsen A, Arndal MF, Beier C, Reinsch S, Schmidt IK** (2019) Accumulation of soil carbon under elevated CO₂ unaffected by warming and drought. *Glob Change Biol* **25**: 2970–2977
- Dixon AP, Faber-Langendoen D, Josse C, Morrison J, Loucks CJ** (2014) Distribution mapping of world grassland types. *J Biogeogr* **41**: 2003–2019
- Dixon HH, Joly J** (1895) On the Ascent of Sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **186**: 563–576
- Dixon M, Grace J** (1984) Effect of Wind on the Transpiration of Young Trees. *Annals of Botany* **53**: 811–819
- Dodd MB, Orr SJ** (1995) Seasonal growth, phosphate response, and drought tolerance of 11 perennial legume species grown in a hill-country soil. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **38**: 7–20

- Doussan C, Garrigues E** (2019) Measuring and Imaging the Soil-root-water System with a Light Transmission 2D Technique. *Bio-protocol* **9**: e3190
- Doussan C, Pierret A, Garrigues E** (2006) Water uptake by plant roots: II – Modelling of water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system – Comparison with experiments. *Plant and Soil* **283**: 99–117
- Draye X, Kim Y, Lobet G, Javaux M** (2010) Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2145–2155
- Dusenge ME, Duarte AG, Way DA** (2019) Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytol* **221**: 32–49
- van Dusschoten D, Metzner R, Kochs J, Postma JA, Pflugfelder D, Bühler J, Schurr U, Jahnke S** (2016) Quantitative 3D Analysis of Plant Roots Growing in Soil Using Magnetic Resonance Imaging1[OPEN]. *Plant Physiology* **170**: 1176–1188
- Edzes HT, van Dusschoten D, Van As H** (1998) Quantitative T2 Imaging of Plant Tissues By Means Of Multi-Echo MRI Microscopy. *Magnetic Resonance Imaging* **16**: 185–196
- Eidmann G, Savelsberg R, Blümner P, Blümich B** (1996) The NMR MOUSE, a Mobile Universal Surface Explorer. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **122**: 104–109
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F** (2002) Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *J Plant Growth Regul* **21**: 335–351
- Esser HG, Carminati A, Vontobel P, Lehmann EH, Oswald SE** (2010) Neutron radiography and tomography of water distribution in the root zone. *Z Pflanzenernähr Bodenk* **173**: 757–764
- Fang Y, Xiong L** (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Mol Life Sci* **72**: 673–689
- Fanourakis D, Giday H, Department of Food Science, Aarhus University, Årsløv, Denmark, Horticulture and Product Physiology Group, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, Hyldgaard B, Department of Food Science, Aarhus University, Årsløv, Denmark, Department of Bioscience, Aarhus University, Aarhus C, Denmark, Bouranis D, Plant Physiology and Morphology Laboratory, Crop Science Department, Agricultural University of Athens, Athens, Greece, Körner O, et al** (2019) Low air humidity during cultivation promotes stomatal closure ability in rose. *EuropJHorticSci* **84**: 245–252
- Farmer GT, Cook J** (2013) Carbon Dioxide, Other Greenhouse Gases, and the Carbon Cycle. *Climate Change Science: A Modern Synthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 199–215
- Feng X, Ackerly DD, Dawson TE, Manzoni S, McLaughlin B, Skelton RP, Vico G, Weitz AP, Thompson SE** (2019) Beyond isohydricity: The role of environmental variability in determining plant drought responses. *Plant Cell Environ* **42**: 1104–1111

- Fernández-Juricic E, Venier MP, Renison D, Blumstein DT (2005)** Sensitivity of wildlife to spatial patterns of recreationist behavior: A critical assessment of minimum approaching distances and buffer areas for grassland birds. *Biological Conservation* **125**: 225–235
- Fort F, Volaire F, Guillioni L, Barkaoui K, Navas M-L, Roumet C (2017)** Root traits are related to plant water-use among rangeland Mediterranean species. *Functional Ecology* **31**: 1700–1709
- Freschet GT, Pagès L, Iversen CM, Comas LH, Rewald B, Roumet C, Klimešová J, Zadworny M, Poorter H, Postma JA, et al (2021)** A starting guide to root ecology: strengthening ecological concepts and standardising root classification, sampling, processing and trait measurements. *New Phytologist* **232**: 973–1122
- Friedlingstein P, Jones MW, O’Sullivan M, Andrew RM, Bakker DCE, Hauck J, Le Quéré C, Peters GP, Peters W, Pongratz J, et al (2022)** Global Carbon Budget 2021. *Earth Syst Sci Data* **14**: 1917–2005
- Fukuda K, Kawaguchi D, Aihara T, Ogasa MY, Miki NH, Haishi T, Umebayashi T (2015)** Vulnerability to cavitation differs between current-year and older xylem: non-destructive observation with a compact magnetic resonance imaging system of two deciduous diffuse-porous species. *Plant, Cell & Environment* **38**: 2508–2518
- G. Viana W, Scharwies JD, Dinneny JR (2022)** Deconstructing the root system of grasses through an exploration of development, anatomy and function. *Plant Cell & Environment* **45**: 602–619
- Garnier E, Laurent G (1994)** Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytol* **128**: 725–736
- Garrigues E, Doussan C, Pierret A (2006)** Water Uptake by Plant Roots: I – Formation and Propagation of a Water Extraction Front in Mature Root Systems as Evidenced by 2D Light Transmission Imaging. *Plant Soil* **283**: 83–98
- Geya Y, Kimura T, Fujisaki H, Terada Y, Kose K, Haishi T, Gemma H, Sekozawa Y (2013)** Longitudinal NMR parameter measurements of Japanese pear fruit during the growing process using a mobile magnetic resonance imaging system. *Journal of Magnetic Resonance* **226**: 45–51
- Gleason SM, Butler DW, Ziemińska K, Waryszak P, Westoby M (2012)** Stem xylem conductivity is key to plant water balance across Australian angiosperm species: Plant stem hydraulic traits. *Functional Ecology* **26**: 343–352
- Grange G, Finn JA, Brophy C (2021)** Plant diversity enhanced yield and mitigated drought impacts in intensively managed grassland communities. *Journal of Applied Ecology* **58**: 1864–1875
- Green SR, Clothier BE (1988)** Water Use of Kiwifruit Vines and Apple Trees by the Heat-Pulse Technique. *J Exp Bot* **39**: 115–123

- Grime JP, Thompson K, Hunt R, Hodgson JG, Cornelissen JHC, Rorison IH, Hendry GAF, Ashenden TW, Askew AP, Band SR, et al** (1997) Integrated Screening Validates Primary Axes of Specialisation in Plants. *Oikos* **79**: 259
- Grønras T, Rueslåtten H, Roaldset E, Skjetne T** (1996) NMR responses to kaolinite in sand. *Magnetic Resonance Imaging* **14**: 961–962
- Grossiord C, Buckley TN, Cernusak LA, Novick KA, Poulter B, Siegwolf RTW, Sperry JS, McDowell NG** (2020) Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New Phytol* **226**: 1550–1566
- Gruwel MLH** (2014) In Situ Magnetic Resonance Imaging of Plant Roots. *Vadose Zone Journal* **13**: 1–8
- Guerrero-Ramírez NR, Mommer L, Freschet GT, Iversen CM, McCormack ML, Kattge J, Poorter H, Plas F, Bergmann J, Kuyper TW, et al** (2021) Global root traits (GRooT) database. *Global Ecol Biogeogr* **30**: 25–37
- Guo D, Xia M, Wei X, Chang W, Liu Y, Wang Z** (2008) Anatomical traits associated with absorption and mycorrhizal colonization are linked to root branch order in twenty-three Chinese temperate tree species. *New Phytologist* **180**: 673–683
- Gyssels G, Poesen J, Bochet E, Li Y** (2005) Impact of plant roots on the resistance of soils to erosion by water: a review. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment* **29**: 189–217
- Haber-Pohlmeier S, Tötze C, Lehmann E, Kardjilov N, Pohlmeier A, Oswald SE** (2019) Combination of Magnetic Resonance Imaging and Neutron Computed Tomography for Three-Dimensional Rhizosphere Imaging. *Vadose zone j* **18**: 1–11
- Haber-Pohlmeier S, Vanderborght J, Pohlmeier A** (2017) Quantitative mapping of solute accumulation in a soil-root system by magnetic resonance imaging. *Water Resources Research* **53**: 7469–7480
- Haferkamp MR, MacNeil MD** (2004) Grazing Effects on Carbon Dynamics in the Northern Mixed-Grass Prairie. *Environmental Management*. doi: 10.1007/s00267-003-9154-x
- Hafner BD, Tomasella M, Häberle K-H, Goebel M, Matyssek R, Grams TEE** (2017) Hydraulic redistribution under moderate drought among English oak, European beech and Norway spruce determined by deuterium isotope labeling in a split-root experiment. *Tree Physiology* **37**: 950–960
- Hahn EL** (1950) Spin Echoes. *Phys Rev* **80**: 580–594
- Harrison S, Spasojevic MJ, Li D** (2020) Climate and plant community diversity in space and time. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 4464–4470
- Haughey E, McElwain JC, Finn JA** (2020) Variability of water supply affected shoot biomass and root depth distribution of four temperate grassland species in monocultures and mixtures. *Journal of Plant Ecology* **13**: 554–562

- Hazman M, Brown KM** (2018) Progressive drought alters architectural and anatomical traits of rice roots. *Rice* **11**: 62
- Hemminga MA, de Jager PA, Sonneveld A** (1977) The study of flow by pulsed nuclear magnetic resonance. I. Measurement of flow rates in the presence of a stationary phase using a difference method. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) **27**: 359–370
- Henry A, Cal AJ, Batoto TC, Torres RO, Serraj R** (2012) Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4751–4763
- Heymans A, Couvreur V, LaRue T, Paez-Garcia A, Lobet G** (2020) GRANAR, a Computational Tool to Better Understand the Functional Importance of Monocotyledon Root Anatomy. *Plant Physiol* **182**: 707–720
- Heymans A, Couvreur V, Lobet G** (2021) Combining cross-section images and modeling tools to create high-resolution root system hydraulic atlases in *Zea mays*. *Plant Direct* **5**: e00290
- Hills BP, Duce SL** (1990) The influence of chemical and diffusive exchange on water proton transverse relaxation in plant tissues. *Magnetic Resonance Imaging* **8**: 321–331
- Hilton RG, West AJ** (2020) Mountains, erosion and the carbon cycle. *Nat Rev Earth Environ* **1**: 284–299
- Hochberg U, Rockwell FE, Holbrook NM, Cochard H** (2018) Iso/Anisohydry: A Plant–Environment Interaction Rather Than a Simple Hydraulic Trait. *Trends in Plant Science* **23**: 112–120
- Holloway-Phillips M-M, Brodribb TJ** (2011) Contrasting hydraulic regulation in closely related forage grasses: implications for plant water use. *Functional Plant Biol* **38**: 594
- Homan NM, Windt CW, Vergeldt FJ, Gerkema E, Van As H** (2007) 0.7 and 3 T MRI and Sap Flow in Intact Trees: Xylem and Phloem in Action. *Appl Magn Reson* **32**: 157–170
- Houssard C, Escarre J, Vartanian N** (1992) Water stress effects on successional populations of the dioecious herb, *Rumex acetosella* L. *New Phytol* **120**: 551–559
- Huang B, Fry JD** (1998) Root Anatomical, Physiological, and Morphological Responses to Drought Stress for Tall Fescue Cultivars. *Crop Sci* **38**: 1017–1022
- Huang Z, Liu Y, Tian F-P, Wu G-L** (2020) Soil water availability threshold indicator was determined by using plant physiological responses under drought conditions. *Ecological Indicators* **118**: 106740
- Hubeau M, Steppe K** (2015) Plant-PET Scans: In Vivo Mapping of Xylem and Phloem Functioning. *Trends in Plant Science* **20**: 676–685
- Huck MG, Klepper B, Taylor HM** (1970) Diurnal Variations in Root Diameter. *Plant Physiol* **45**: 529–530

- Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier É, Roumet C** (2007) Relating root structure and anatomy to whole-plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean species. *New Phytologist* **173**: 313–321
- Hunt Jr E, Rock B** (1989) Detection of changes in leaf water content using Near- and Middle-Infrared reflectances☆. *Remote Sensing of Environment* **30**: 43–54
- Isbell F, Craven D, Connolly J, Loreau M, Schmid B, Beierkuhnlein C, Bezemer TM, Bonin C, Bruelheide H, de Luca E, et al** (2015) Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. *Nature* **526**: 574–577
- Itakura K, Hosoi F** (2018) Automatic Leaf Segmentation for Estimating Leaf Area and Leaf Inclination Angle in 3D Plant Images. *Sensors* **18**: 3576
- Jiang P, Meinzer FC, Fu X, Kou L, Dai X, Wang H** (2021) Trade-offs between xylem water and carbohydrate storage among 24 coexisting subtropical understory shrub species spanning a spectrum of isohydry. *Tree Physiology* **41**: 403–415
- Jin X, Shi C, Yu CY, Yamada T, Sacks EJ** (2017) Determination of Leaf Water Content by Visible and Near-Infrared Spectrometry and Multivariate Calibration in *Miscanthus*. *Front Plant Sci* **8**: 721
- Johnson CS** (1999) Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **34**: 203–256
- Jones HG** (2007) Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**: 119–130
- Jones HG** (2014) *Plants and Microclimate : a quantitative approach to environmental plant physiology*, Third edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
- Jones M, Aptaker PS, Cox J, Gardiner BA, McDonald PJ** (2012) A transportable magnetic resonance imaging system for in situ measurements of living trees: The Tree Hugger. *Journal of Magnetic Resonance* **218**: 133–140
- Jung SY, Lee SJ, Park H** (2020) Investigation of water transport around the root for a plant using X-ray imaging technique. *Measurement* **151**: 107159
- Kang S, Hu X, Jerie P, Zhang J** (2003) The effects of partial rootzone drying on root, trunk sap flow and water balance in an irrigated pear (*Pyrus communis* L.) orchard. *Journal of Hydrology* **280**: 192–206
- Keeler J** (2007) *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons
- Khalil AM, Murchie EH, Mooney SJ** (2020) Quantifying the influence of water deficit on root and shoot growth in wheat using X-ray Computed Tomography. *AoB PLANTS* **12**: plaa036
- Kim HK, Park J, Hwang I** (2014) Investigating water transport through the xylem network in vascular plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1895–1904

- Kimura T, Geya Y, Terada Y, Kose K, Haishi T, Gemma H, Sekozawa Y** (2011) Development of a mobile magnetic resonance imaging system for outdoor tree measurements. *Review of Scientific Instruments* **82**: 053704
- Kizito F, Campbell CS, Campbell GS, Cobos DR, Teare BL, Carter B, Hopmans JW** (2008) Frequency, electrical conductivity and temperature analysis of a low-cost capacitance soil moisture sensor. *Journal of Hydrology* **352**: 367–378
- Klein T** (2014) The variability of stomatal sensitivity to leaf water potential across tree species indicates a continuum between isohydric and anisohydric behaviours. *Funct Ecol* **28**: 1313–1320
- Köckenberger W, Pope JM, Xia Y, Jeffrey KR, Komor E, Callaghan PT** (1997) A non-invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear magnetic resonance microimaging. *Planta* **201**: 53–63
- Kong D, Ma C, Zhang Q, Li L, Chen X, Zeng H, Guo D** (2014) Leading dimensions in absorptive root trait variation across 96 subtropical forest species. *New Phytol* **203**: 863–872
- Kreyling J, Dengler J, Walter J, Velev N, Ugurlu E, Sopotlieva D, Ransijn J, Picon-Cochard C, Nijs I, Hernandez P, et al** (2017) Species richness effects on grassland recovery from drought depend on community productivity in a multisite experiment. *Ecol Lett* **20**: 1405–1413
- Kuchenbrod E, Landeck M, Thürmer F, Haase A, Zimmermann U** (1996) Measurement of Water Flow in the Xylem Vessels of Intact Maize Plants using Flow-Sensitive NMR Imaging. *Botanica Acta* **109**: 184–186
- Kurepin LV, Stangl ZR, Ivanov AG, Bui V, Mema M, Hüner NPA, Öquist G, Way D, Hurry V** (2018) Contrasting acclimation abilities of two dominant boreal conifers to elevated CO₂ and temperature: CO₂ and warming effects on spruce and pine. *Plant Cell Environ* **41**: 1331–1345
- Leaver JD** (1985) Milk production from grazed temperate grassland. *Journal of Dairy Research* **52**: 313–344
- Lens F, Picon-Cochard C, Delmas CE, Signarbieux C, Buttler A, Cochard H, Jansen S, Chauvin T, Chacon Doria L, del Arco M, et al** (2016) Herbaceous angiosperms are not more vulnerable to drought-induced embolism than angiosperm trees. *Plant Physiol* pp.00829.2016
- Levitt MH** (2006) Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. John Wiley & Sons
- Li L, Dong Y, Zhang T, Wang H, Li H, Li A** (2022a) Environmental and social outcomes of ecotourism in the dry rangelands of China. *Journal of Ecotourism* 1–21
- Li L, Liu H, Baoyin T** (2022b) Mowing Increases Root-to-Shoot Ratio but Decreases Soil Organic Carbon Storage and Microbial Biomass C in a Semiarid Grassland of North China. *Agriculture* **12**: 1324

- Lindemann-Matthies P, Junge X, Matthies D** (2010) The influence of plant diversity on people's perception and aesthetic appreciation of grassland vegetation. *Biological Conservation* **143**: 195–202
- Liu S, Zhang Q, Liu J, Sun J, Wei Q** (2014) Effect of Partial Root-Zone Irrigating Deuterium Oxide on the Properties of Water Transportation and Distribution in Young Apple Trees. *Journal of Integrative Agriculture* **13**: 1268–1275
- Liu Z, Ma F, Hu T, Zhao K, Gao T, Zhao H, Ning T** (2020) Using stable isotopes to quantify water uptake from different soil layers and water use efficiency of wheat under long-term tillage and straw return practices. *Agricultural Water Management* **229**: 105933
- Lobet G, Couvreur V, Meunier F, Javaux M, Draye X** (2014) Plant Water Uptake in Drying Soils. *Plant Physiol* **164**: 1619–1627
- Lucero DW, Grieu P, Guckert A** (2000) Water deficit and plant competition effects on growth and water-use efficiency of white clover (*Trifolium repens*, L.) and ryegrass (*Lolium perenne*, L.). *Plant and Soil* **227**: 1–15
- Luo Y-Z, Li G, Yan G, Liu H, Turner NC** (2020) Morphological Features and Biomass Partitioning of Lucerne Plants (*Medicago sativa* L.) Subjected to Water Stress. *Agronomy* **10**: 322
- Ma Y, Zhang G-Z, Rita-Cindy SA-A** (2019) Quantification of Water, Protein and Soluble Sugar in Mulberry Leaves Using a Handheld Near-Infrared Spectrometer and Multivariate Analysis. *Molecules* **24**: 4439
- Malone MW, Yoder J, Hunter JF, Espy MA, Dickman LT, Nelson RO, Vogel SC, Sandin HJ, Sevanto S** (2016) In vivo Observation of Tree Drought Response with Low-Field NMR and Neutron Imaging. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00564
- Marques JP, Simonis FF, Webb AG** (2019) Low-field MRI: An MR physics perspective. *Journal of magnetic resonance imaging* **49**: 1528–1542
- Martínez-Vilalta J, Garcia-Forner N** (2017) Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept: Deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant, Cell & Environment* **40**: 962–976
- Martínez-Vilalta J, Poyatos R, Aguadé D, Retana J, Mencuccini M** (2014) A new look at water transport regulation in plants. *New Phytol* **204**: 105–115
- Masumoto T, Ito T, Akatsuki M, Makita N** (2022) Fine root hydraulic conductivity relates to root functional traits in four coniferous species. *Rhizosphere* **21**: 100489
- Matesanz S, Ramos-Muñoz M, Moncalvillo B, Rubio Teso ML, García de Dionisio SL, Romero J, Iriondo JM** (2020) Plasticity to drought and ecotypic differentiation in populations of a crop wild relative. *AoB PLANTS* **12**: plaa006
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V** (2008) Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 595–624

- Maurel C, Verdoucq L, Rodrigues O** (2016) Aquaporins and plant transpiration: Aquaporins and plant transpiration. *Plant, Cell & Environment* **39**: 2580–2587
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, Baker NR, Brendel O, Lawson T** (2016) Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytologist* **211**: 1209–1220
- McCormack ML, Dickie IA, Eissenstat DM, Fahey TJ, Fernandez CW, Guo D, Helmisaari H-S, Hobbie EA, Iversen CM, Jackson RB, et al** (2015) Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist* **207**: 505–518
- Meiboom S, Gill D** (1958) Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments* **29**: 688–691
- Meinzer FC, Woodruff DR, Marias DE, Smith DD, McCulloh KA, Howard AR, Magedman AL** (2016) Mapping ‘hydroscares’ along the iso- to anisohydric continuum of stomatal regulation of plant water status. *Ecol Lett* **19**: 1343–1352
- Meixner M, Kochs J, Foerst P, Windt CW** (2021) An integrated magnetic resonance plant imager for mobile use in greenhouse and field. *Journal of Magnetic Resonance* **323**: 106879
- Meixner M, Tomasella M, Foerst P, Windt CW** (2020) A small-scale MRI scanner and complementary imaging method to visualize and quantify xylem embolism formation. *New Phytol* **226**: 1517–1529
- Mencuccini M** (2003) WATER RELATIONS OF PLANTS | Xylem. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Elsevier, pp 1440–1449
- Metzner R, van Dusschoten D, Bühler J, Schurr U, Jahnke S** (2014) Belowground plant development measured with magnetic resonance imaging (MRI): exploiting the potential for non-invasive trait quantification using sugar beet as a proxy. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00469
- 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
- Mitchell J, Gladden LF, Chandrasekera TC, Fordham EJ** (2014) Low-field permanent magnets for industrial process and quality control. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **76**: 1–60
- Mohamed MF, Keutgen N, Tawfika AA, Noga G** (2002) Dehydration-avoidance responses of tepary bean lines differing in drought resistance. *Journal of Plant Physiology* **159**: 31–38
- Molina-Montenegro MA, del Pozo A, Gianoli E** (2018) Ecophysiological basis of the Jack-and-Master strategy: *Taraxacum officinale* (dandelion) as an example of a successful invader. *JPECOL* **11**: rtw121

- 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 Soil* **352**: 1–22
- Moradi AB, Carminati A, Vetterlein D, Vontobel P, Lehmann E, Weller U, Hopmans JW, Vogel H-J, Oswald SE** (2011) Three-dimensional visualization and quantification of water content in the rhizosphere. *New Phytologist* **192**: 653–663
- Moradi AB, Oswald SE, Menon M, Carminati A, Lehmann E, Hopmans JW** (2013) Applications of Neutron Imaging in Soil–Water–Root Systems. *Soil–Water–Root Processes: Advances in Tomography and Imaging*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 113–136
- Mora-Ortiz M, Smith LMJ** (2018) *Onobrychis viciifolia* ; a comprehensive literature review of its history, etymology, taxonomy, genetics, agronomy and botany. *Plant Genet Resour* **16**: 403–418
- Moreno-Gutiérrez C, Dawson TE, Nicolás E, Querejeta JI** (2012) Isotopes reveal contrasting water use strategies among coexisting plant species in a Mediterranean ecosystem. *New Phytologist* **196**: 489–496
- Mucina L** (2019) Biome: evolution of a crucial ecological and biogeographical concept. *New Phytol* **222**: 97–114
- Musse M, De Franceschi L, Cambert M, Sorin C, Le Caherec F, Burel A, Bouchereau A, Mariette F, Leport L** (2013) Structural Changes in Senescing Oilseed Rape Leaves at Tissue and Subcellular Levels Monitored by Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry through Water Status. *Plant Physiol* **163**: 392–406
- Musse M, Leport L, Cambert M, Debrandt W, Sorin C, Bouchereau A, Mariette F** (2017) A mobile NMR lab for leaf phenotyping in the field. *Plant Methods* **13**: 53
- Myers N** (2002) Environmental refugees: a growing phenomenon of the 21st century. *Phil Trans R Soc Lond B* **357**: 609–613
- Nabors M** (2008) *Biologie végétale. Structure, fonctionnement, écologie et biotechnologie*
- Nagata A, Kose K, Terada Y** (2016) Development of an outdoor MRI system for measuring flow in a living tree. *Journal of Magnetic Resonance* **265**: 129–138
- Nazari M** (2021) Plant mucilage components and their functions in the rhizosphere. *Rhizosphere* **18**: 100344
- Norton MR, Li GD, Xu B, Price A, Tyndall P, Hayes RC** (2021) Differences in dehydration tolerance affect survival of white clover (*Trifolium repens*) and lucerne (*Medicago sativa*) during a drying cycle. *Crop Pasture Sci* **72**: 723
- Nowak-Olejniki A, Mocior E, Hibner J, Tokarczyk N** (2020) Human perceptions of cultural ecosystem services of semi-natural grasslands: The influence of plant communities. *Ecosystem Services* **46**: 101208

- Nuix M, Traoré AS, Blystone S, Bonny J-M, Falcimagne R, Pagès G, Picon-Cochard C** (2021) Circadian Variation of Root Water Status in Three Herbaceous Species Assessed by Portable NMR. *Plants* **10**: 782
- Orford KA, Murray PJ, Vaughan IP, Memmott J** (2016) Modest enhancements to conventional grassland diversity improve the provision of pollination services. *J Appl Ecol* **53**: 906–915
- Osán TM, Ollé JM, Carpinella M, Cerioni LMC, Pusiol DJ, Appel M, Freeman J, Espejo I** (2011) Fast measurements of average flow velocity by Low-Field ^1H NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **209**: 116–122
- Pachauri RK, Mayer L, Intergovernmental Panel on Climate Change, eds** (2015) Climate change 2014: synthesis report. Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, Switzerland
- Pallardy SG** (2010) Physiology of woody plants. Academic Press
- Palmer LJ, Palmer LT, Pritchard J, Graham RD, Stangoulis JC** (2013) Improved techniques for measurement of nanolitre volumes of phloem exudate from aphid stylectomy. *Plant Methods* **9**: 18
- Palta JA, Turner NC, French RJ, Buirchell BJ** (2007) Physiological responses of lupin genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment. *Ann Applied Biology* **150**: 269–279
- Papy F, Riou C, Bonhomme R, Chassin P, Neveu A** (1997) L'eau dans l'espace rural: production végétale et qualité de l'eau. Quae
- Parmesan C, Yohe G** (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* **421**: 37–42
- Peeters A, Beaufoy G, Canals RM, De Vlieghe A, Huyghe C, Isselstein J, Jones J, Kessler W, Kirilovsky D, Van Den Pol-Van Dasselaar A** (2014) Grassland term definitions and classifications adapted to the diversity of European grassland-based systems. 25th EGF General Meeting on “EGF at 50: The Future of European Grasslands. pp 743–750
- Peri PL, Rosas YM, Rivera E, Pastur GM** (2021) Lamb and Wool Provisioning Ecosystem Services in Southern Patagonia. *Sustainability* **13**: 8544
- Perlo J, Casanova F, Blümich B** (2005) Profiles with microscopic resolution by single-sided NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **176**: 64–70
- Pfeifer J, Mielewczik M, Friedli M, Kirchgessner N, Walter A** (2018) Non-destructive measurement of soybean leaf thickness via X-ray computed tomography allows the study of diel leaf growth rhythms in the third dimension. *J Plant Res* **131**: 111–124
- Pflugfelder D, Metzner R, van Dusschoten D, Reichel R, Jahnke S, Koller R** (2017) Non-invasive imaging of plant roots in different soils using magnetic resonance imaging (MRI). *Plant Methods* **13**: 102

- Pickard WF** (1981) The ascent of sap in plants. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **37**: 181–229
- Picon-Cochard C, Nsourou-Obame A, Collet C, Guehl J-M, Ferhi A** (2001) Competition for water between walnut seedlings (*Juglans regia*) and rye grass (*Lolium perenne*) assessed by carbon isotope discrimination and $\delta^{18}\text{O}$ enrichment. 21:
- Picon-Cochard C, Pilon R, Tarroux E, Pagès L, Robertson J, Dawson L** (2012) Effect of species, root branching order and season on the root traits of 13 perennial grass species. *Plant Soil* **353**: 47–57
- Pierce S, Ceriani RM, DE Andreis R, Luzzaro A, Cerabolini B** (2007) The leaf economics spectrum of Poaceae reflects variation in survival strategies. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **141**: 337–343
- Pierret A, Kirby M, Moran C** (2003) Simultaneous X-ray imaging of plant root growth and water uptake in thin-slab systems. *Plant and Soil* **255**: 361–373
- Piseddu F, Bellocchi G, Picon-Cochard C** (2021) Mowing and warming effects on grassland species richness and harvested biomass: meta-analyses. *Agron Sustain Dev* **41**: 74
- Pohlmeier A, Oros-Peusquens A, Javaux M, Menzel MI, Vanderborght J, Kaffanke J, Romanzetti S, Lindenmair J, Vereecken H, Shah NJ** (2008) Changes in Soil Water Content Resulting from *Ricinus* Root Uptake Monitored by Magnetic Resonance Imaging. *Vadose Zone Journal* **7**: 1010–1017
- Pohlmeier A, Vergeldt F, Gerkema E** (2010) MRI in Soils: Determination of Water Content Changes Due to Root Water Uptake by Means of a Multi-Slice-Multi-Echo Sequence (MSME). *The Open Magnetic Resonance Journal* **3**: 69–74
- Pol M, Schmidtke K, Lewandowska S** (2021) *Plantago lanceolata* – An overview of its agronomically and healing valuable features. *Open Agriculture* **6**: 479–488
- Pope JM, Yao S** (1993) Quantitative NMR imaging of flow. *Concepts Magn Reson* **5**: 281–302
- Prieto I, Armas C, Pugnaire FI** (2012) Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytologist* **193**: 830–841
- Prieto I, Roumet C, Cardinael R, Dupraz C, Jourdan C, Kim JH, Maeght JL, Mao Z, Pierret A, Portillo N, et al** (2015) Root functional parameters along a land-use gradient: evidence of a community-level economics spectrum. *J Ecol* **103**: 361–373
- Purcell EM, Torrey HC, Pound RV** (1946) Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys Rev* **69**: 37–38
- Qaderi M, Martel A, Dixon S** (2019) Environmental Factors Influence Plant Vascular System and Water Regulation. *Plants* **8**: 65
- Rata DG, Casanova F, Perlo J, Demco DE, Blümich B** (2006) Self-diffusion measurements by a mobile single-sided NMR sensor with improved magnetic field gradient. *Journal of Magnetic Resonance* **180**: 229–235

- Read DB, Bengough AG, Gregory PJ, Crawford JW, Robinson D, Scrimgeour CM, Young IM, Zhang K, Zhang X** (2003) Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytologist* **157**: 315–326
- Reich PB** (2014) The world-wide ‘fast–slow’ plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology* **102**: 275–301
- Reich PB, Hobbie SE, Lee TD** (2014) Plant growth enhancement by elevated CO₂ eliminated by joint water and nitrogen limitation. *Nature Geosci* **7**: 920–924
- Resco de Dios V, Gessler A** (2018) Circadian regulation of photosynthesis and transpiration from genes to ecosystems. *Environmental and Experimental Botany* **152**: 37–48
- Richard SJ, Newling B** (2019) Measuring Flow Using a Permanent Magnet with a Large Constant Gradient. *Appl Magn Reson* **50**: 627–635
- Rieger M, Litvin P** (1999) Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy. *Journal of Experimental Botany* **50**: 201–209
- de la Riva EG, Prieto I, Villar R** (2019) The leaf economic spectrum drives leaf litter decomposition in Mediterranean forests. *Plant Soil* **435**: 353–366
- Robert E, Schmitz N, Copini P, Gerkema E, Vergeldt F, Windt C, Beeckman H, Koedam N, Van As H** (2014) Visualization of the stem water content of two genera with secondary phloem produced by successive cambia through Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Journal of Plant Hydraulics* e0006
- Roelfsema MRG, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate.’ *New Phytologist* **167**: 665–691
- Rogers HH, Bottomley PA** (1987) In Situ Nuclear Magnetic Resonance Imaging of Roots: Influence of Soil Type, Ferromagnetic Particle Content, and Soil Water¹. *Agronomy Journal* **79**: 957–965
- Rognli OA, Saha MC, Bhamidimarri S, Heijden S van der** (2010) Fescues. Fodder crops and amenity grasses. Springer, pp 261–292
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA** (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* **421**: 57–60
- Roumet C, Birouste M, Picon-Cochard C, Ghestem M, Osman N, Vrignon-Brenas S, Cao K, Stokes A** (2016) Root structure–function relationships in 74 species: evidence of a root economics spectrum related to carbon economy. *New Phytol* **210**: 815–826
- Roy J, Picon-Cochard C, Augusti A, Benot M-L, Thiery L, Darsonville O, Landais D, Piel C, Defosse M, Devidal S, et al** (2016) Elevated CO₂ maintains grassland net carbon uptake under a future heat and drought extreme. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 6224–6229
- Sala OE, Yahdjian L, Havstad K, Aguiar MR** (2017) Rangeland Ecosystem Services: Nature’s Supply and Humans’ Demand. In DD Briske, ed, *Rangeland Systems*. Springer International Publishing, Cham, pp 467–489

- Sanada Y, Gras M-C, Santen E van** (2010) Cocksfoot. Fodder crops and amenity grasses. Springer, pp 317–328
- Sandifer PA, Sutton-Grier AE, Ward BP** (2015) Exploring connections among nature, biodiversity, ecosystem services, and human health and well-being: Opportunities to enhance health and biodiversity conservation. *Ecosystem Services* **12**: 1–15
- Schulze E-D, Beck E, Buchmann N, Clemens S, Müller-Hohenstein K, Scherer-Lorenzen M** (2019) Water Deficiency (Drought). In E-D Schulze, E Beck, N Buchmann, S Clemens, K Müller-Hohenstein, M Scherer-Lorenzen, eds, *Plant Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 165–202
- Schymanski SJ, Or D** (2015) Wind effects on leaf transpiration challenge the concept of “potential evaporation.” *Proc IAHS* **371**: 99–107
- Schymanski SJ, Or D** (2016) Wind increases leaf water use efficiency. *Plant, Cell & Environment* **39**: 1448–1459
- Seeger S, Weiler M** (2021) Temporal dynamics of tree xylem water isotopes: in situ monitoring and modeling. *Biogeosciences* **18**: 4603–4627
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T** (2007) Light Regulation of Stomatal Movement. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 219–247
- Shukla PR, Skeg J, Calvo Buendia E, Masson-Delmotte V, Pörtner H-O, Roberts DC, Zhai P, Slade R, Connors S, van Diemen S, et al** (2019) Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)
- Sibgatullin TA, Vergeldt FJ, Gerkema E, Van As H** (2010) Quantitative permeability imaging of plant tissues. *Eur Biophys J* **39**: 699–710
- Sidi-Boulénouar R, Cardoso M, Coillot C, Rousset S, Nativel E, Charbit A, Baptiste C, Alibert E, Gatineau F, Verdeil J-L, et al** (2019) Multiscale NMR investigations of two anatomically contrasted genotypes of sorghum under watered conditions and during drought stress. *Magn Reson Chem* **57**: 749–756
- Signarbieux C, Feller U** (2012) Effects of an extended drought period on physiological properties of grassland species in the field. *J Plant Res* **125**: 251–261
- Simionov I-A, Petrea Ștefan-M, Mogodan A, Cristea D, Nica A, Neculita M** (2021) ASSESSMENT OF GLOBAL WARMING IMPACT ON AQUATIC ECOSYSTEMS: A STATE-OF-THE-ART PERSPECTIVE. *Scientific Papers Series E Land Reclamation, Earth Observation & Surveying, Environmental Engineering* **X**: 6
- Singh RK, Deshmukh R, Muthamilarasan M, Rani R, Prasad M** (2020) Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **149**: 178–189

- Solomon S, Manning M, Marquis M, Qin D** (2007) Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC. Cambridge university press
- Sorin C, Mariette F, Musse M, Leport L, Cruz F, Yvin J-C** (2018) Leaf Development Monitoring and Early Detection of Water Deficiency by Low Field Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in *Nicotiana tabacum* Plants. *Applied Sciences* **8**: 943
- Sorin C, Musse M, Mariette F, Bouchereau A, Leport L** (2015) Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. *Planta* **241**: 333–346
- Sperry JS** (2011) Hydraulics of Vascular Water Transport. In P Wojtaszek, ed, *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 303–327
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT** (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* **11**: 35–40
- Stampfli A, Zeiter M** (2010) L'appauvrissement botanique réduit la production fourragère. *Recherche agronomique suisse* **1**: 184–189
- Steinbeiss S, Bessler H, Engels C, Temperton VM, Buchmann N, Roscher C, Kreutziger Y, Baade J, Habekost M, Gleixner G** (2008) Plant diversity positively affects short-term soil carbon storage in experimental grasslands. *Global Change Biology* **14**: 2937–2949
- Steudle E** (2001) Water uptake by plant roots: an integration of views. In O Gašparíková, M Čiamporová, I Mistrik, F Baluška, eds, *Recent Advances of Plant Root Structure and Function*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 71–82
- Steudle E, Oren R, Schulze E-D** (1987) Water Transport in Maize Roots: Measurement of Hydraulic Conductivity, Solute Permeability, and of Reflection Coefficients of Excised Roots Using the Root Pressure Probe. *Plant Physiol* **84**: 1220–1232
- Stewart-Wade SM, Neumann S, Collins LL, Boland GJ** (2002) The biology of Canadian weeds. 117. *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wiggers. *Can J Plant Sci* **82**: 825–853
- Strömberg CAE, Staver AC** (2022) The history and challenge of grassy biomes. *Science* **377**: 592–593
- Suryan G** (1951) Nuclear resonance in flowing liquids. *Proc Indian Acad Sci (Math Sci)* **33**: 107
- Suzuki M, Umeda H, Matsuo S, Kawasaki Y, Ahn D, Hamamoto H, Iwasaki Y** (2015) Effects of relative humidity and nutrient supply on growth and nutrient uptake in greenhouse tomato production. *Scientia Horticulturae* **187**: 44–49
- Takase T, Ishikawa H, Murakami H, Kikuchi J, Sato-Nara K, Suzuki H** (2011) The Circadian Clock Modulates Water Dynamics and Aquaporin Expression in Arabidopsis Roots. *Plant and Cell Physiology* **52**: 373–383

- Tardieu F, Simonneau T** (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**: 419–432
- Terada Y, Horikawa Y, Nagata A, Kose K, Fukuda K** (2020) Dynamics of xylem and phloem sap flow in an outdoor zelkova tree visualized by magnetic resonance imaging. *Tree Physiology* **40**: 290–304
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, de Siqueira MF, Grainger A, Hannah L, et al** (2004) Extinction risk from climate change. *427*: 4
- Thuiller W, Lavorel S, Araújo MB, Sykes MT, Prentice IC** (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8245–8250
- Tidwell VC, Glass RJ** (1994) X ray and visible light transmission for laboratory measurement of two-dimensional saturation fields in thin-slab systems. *Water Resour Res* **30**: 2873–2882
- Torres I, Sánchez M-T, Benlloch-González M, Pérez-Marín D** (2019) Irrigation decision support based on leaf relative water content determination in olive grove using near infrared spectroscopy. *Biosystems Engineering* **180**: 50–58
- Tötze C, Kardjilov N, Manke I, Oswald SE** (2017) Capturing 3D Water Flow in Rooted Soil by Ultra-fast Neutron Tomography. *Sci Rep* **7**: 6192
- Tötze C, Miranda T, Konrad W, Gout J, Kardjilov N, Dawson M, Manke I, Roth-Nebelsick A** (2013) Visualization of embolism formation in the xylem of liana stems using neutron radiography. *Annals of Botany* **111**: 723–730
- Traoré A, Aliouissi R, Benmoussa A, Pagès G, Bonny J-M** (2019) Profiling the temperature dependent frequency of an open-magnet for outdoor applications.
- Tubiello FN, Soussana J-F, Howden SM** (2007) Crop and pasture response to climate change. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19686–19690
- Turner NC, Henson IE** (1989) Comparative water relations and gas exchange of wheat and lupins in the field.
- Utsumi Y, Sano Y, Fujikawa S, Funada R, Ohtani J** (1998) Visualization of Cavitated Vessels in Winter and Refilled Vessels in Spring in Diffuse-Porous Trees by Cryo-Scanning Electron Microscopy¹. *Plant Physiology* **117**: 1463–1471
- Van As H** (2007) Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *Journal of Experimental Botany* **58**: 743–756
- Van As H, Scheenen T, Vergeldt FJ** (2009) MRI of intact plants. *Photosynth Res* **102**: 213–222

- Van De Velde H, Bonte D, AbdElgawad H, Asard H, Nijs I** (2015) Combined elevated CO₂ and climate warming induces lagged effects of drought in *Lolium perenne* and *Plantago lanceolata*. *Plant Ecol* **216**: 1047–1059
- Van den Berge J, Naudts K, De Boeck HJ, Ceulemans R, Nijs I** (2014) Do interactions with neighbours modify the above-ground productivity response to drought? A test with two grassland species. *Environmental and Experimental Botany* **105**: 18–24
- Varney GT, Canny MJ** (1993) Rates of water uptake into the mature root system of maize plants. *New Phytologist* **123**: 775–786
- Vetterlein D, Doussan C** (2016) Root age distribution: how does it matter in plant processes? A focus on water uptake. *Plant Soil* **407**: 145–160
- Violle C, Navas M-L, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E** (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**: 882–892
- Volaire F** (2018) A unified framework of plant adaptive strategies to drought: Crossing scales and disciplines. *Glob Change Biol* **24**: 2929–2938
- Volaire F, Lens F, Cochard H, Xu H, Chacon-Doria L, Bristiel P, Balachowski J, Rowe N, Violle C, Picon-Cochard C** (2018) Embolism and mechanical resistances play a key role in dehydration tolerance of a perennial grass *Dactylis glomerata* L. *Annals of Botany* **122**: 325–336
- Volaire F, Morvan-Bertrand A, Prud'homme M-P, Benot M-L, Augusti A, Zwicke M, Roy J, Landais D, Picon-Cochard C** (2020) The resilience of perennial grasses under two climate scenarios is correlated with carbohydrate metabolism in meristems. *Journal of Experimental Botany* **71**: 370–385
- Wahl S, Ryser P** (2000) Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist* **148**: 459–471
- Wang Y, Dong X, Wang H, Wang Z, Gu J** (2016) Root tip morphology, anatomy, chemistry and potential hydraulic conductivity vary with soil depth in three temperate hardwood species. *Tree Physiol* **36**: 99–108
- Wang Y, Xiang J, Tang Y, Chen W, Xu Y** (2022) A review of the application of near-infrared spectroscopy (NIRS) in forestry. *Applied Spectroscopy Reviews* **57**: 300–317
- Washburn KE** (2014) Relaxation mechanisms and shales. *Concepts Magn Reson* **43A**: 57–78
- Watson RT, Noble IR, Bolin B, Ravindranath NH** (2000) Land use, land-use change and forestry. Summary for policymakers. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)
- Werling BP, Dickson TL, Isaacs R, Gaines H, Gratton C, Gross KL, Liere H, Malmstrom CM, Meehan TD, Ruan L, et al** (2014) Perennial grasslands enhance biodiversity and multiple ecosystem services in bioenergy landscapes. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 1652–1657

- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ** (2002) Plant Ecological Strategies: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annu Rev Ecol Syst* **33**: 125–159
- Whittall KP, MacKay AL** (1989) Quantitative interpretation of NMR relaxation data. *Journal of Magnetic Resonance* **84**: 134–152
- Windt CW, Blümmler P** (2015) A portable NMR sensor to measure dynamic changes in the amount of water in living stems or fruit and its potential to measure sap flow. *Tree Physiology* **35**: 366–375
- Windt CW, Soltner H, Dusschoten D van, Blümmler P** (2011) A portable Halbach magnet that can be opened and closed without force: The NMR-CUFF. *Journal of Magnetic Resonance* **208**: 27–33
- Windt CW, Vergeldt FJ, De Jager PA, Van As H** (2006) MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ* **29**: 1715–1729
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, et al** (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**: 821–827
- Wu H, Li J, Zhang C, He B, Zhang H, Wu X, Li X-Y** (2018) Determining root water uptake of two alpine crops in a rainfed cropland in the Qinghai Lake watershed: First assessment using stable isotopes analysis. *Field Crops Research* **215**: 113–121
- Yang Y, Reilly EC, Jungers JM, Chen J, Smith TM** (2019) Climate Benefits of Increasing Plant Diversity in Perennial Bioenergy Crops. *One Earth* **1**: 434–445
- Yoder J, Malone MW, Espy MA, Sevanto S** (2014) Low-field nuclear magnetic resonance for the *in vivo* study of water content in trees. *Review of Scientific Instruments* **85**: 095110
- Zappala S, Helliwell JR, Tracy SR, Mairhofer S, Sturrock CJ, Pridmore T, Bennett M, Mooney SJ** (2013) Effects of X-Ray Dose On Rhizosphere Studies Using X-Ray Computed Tomography. *PLoS ONE* **8**: e67250
- Zarebanadkouki M, Ahmed M, Hedwig C, Benard P, Kostka SJ, Kastner A, Carminati A** (2018) Rhizosphere hydrophobicity limits root water uptake after drying and subsequent rewetting. *Plant Soil* **428**: 265–277
- Zarebanadkouki M, Kim YX, Carminati A** (2013) Where do roots take up water? Neutron radiography of water flow into the roots of transpiring plants growing in soil. *New Phytol* **199**: 1034–1044
- Zarebanadkouki M, Trtik P, Hayat F, Carminati A, Kaestner A** (2019) Root water uptake and its pathways across the root: quantification at the cellular scale. *Sci Rep* **9**: 12979
- Zhang Q, Li Q, Zhang G** (2012) Rapid Determination of Leaf Water Content Using VIS/NIR Spectroscopy Analysis with Wavelength Selection. *Spectroscopy: An International Journal* **27**: 93–105

- Zhao Y, Liu Z, Wu J** (2020) Grassland ecosystem services: a systematic review of research advances and future directions. *Landscape Ecol* **35**: 793–814
- Zhou M, Bai W, Li Q, Guo Y, Zhang W-H** (2021) Root anatomical traits determined leaf-level physiology and responses to precipitation change of herbaceous species in a temperate steppe. *New Phytologist* **229**: 1481–1491
- Zhou M, Guo Y, Sheng J, Yuan Y, Zhang W, Bai W** (2022) Using anatomical traits to understand root functions across root orders of herbaceous species in a temperate steppe. *New Phytologist* **234**: 422–434
- Zhu GL, Steudle E** (1991) Water Transport across Maize Roots: Simultaneous Measurement of Flows at the Cell and Root Level by Double Pressure Probe Technique. *Plant Physiol* **95**: 305–315
- Ziegler H, Weber J, Lüttge UE** (2009) Thermal dissipation probe measurements of sap flow in the xylem of trees documenting dynamic relations to variable transpiration given by instantaneous weather changes and the activities of a mistletoe xylem parasite. *Trees* **23**: 441–450
- Žuna Pfeiffer T, Špoljarić Maronić D, Petrošaneć S, Štolfa Čamagajevac I, Stević F** (2018) Steppe-like grassland as a refuge of the wild edible and medicinal plant species in anthropogenic landscape in northeastern Croatia. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **152**: 1059–1066
- Zwicke M, Picon-Cochard C, Morvan-Bertrand A, Prud'homme M-P, Voltaire F** (2015) What functional strategies drive drought survival and recovery of perennial species from upland grassland? *Annals of Botany* **116**: 1001–1015