Normandie Université

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'**Université de Caen Normandie**

Analyses de deux stratégies d'acclimatation à un stress thermique intense reposant sur une thermo-sensibilisation ou une sensibilisation médiée par des bactéries PGPR chez le colza et la caméline

Présentée et soutenue par

JEREMY DELAMARE

Thèse soutenue le 12/12/2023

devant le jury composé de :

MME SEVERINE PIUTTI	Professeur des universités - Université de Lorraine	Rapporteur du jury
MME MARION PRUDENT	Chargé de recherche HDR - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Rapporteur du jury
MME EMMANUELLE PERSONENI	Maître de conférences - Université de Caen Normandie	Membre du jury Co-encadrante
MME CATHERINE PICON-COCHARD	Directrice de recherche - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Membre du jury
M. FREDERIC REES	Chargé de recherche - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Membre du jury
M. DENIS VILE	Directeur de recherche - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Membre du jury
MME MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités - Université de Caen Normandie	Président du jury
MME SOPHIE BRUNEL-MUGUET	Chargé de recherche HDR - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **SOPHIE BRUNEL-MUGUET** (Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen))

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Analyses de l'effet de deux stratégies d'acclimatation à un stress thermique intense reposant sur une thermo-sensibilisation ou une sensibilisation médiée par des bactéries PGPR chez *Brassica napus* (L.) et *Camelina sativa* ((L.) Crantz)

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier **Séverine Piutti** et **Marion Prudent** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi **Denis Vile**, **Catherine Picon-Cochard**, **Frédéric Rees** et **Marie-Pascale Prud-homme** d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Je tiens aussi à remercier la direction de l'UMR EVA **Marie-Pascale Prud-homme** et **Phillipe Lainé** puis **Phillipe Lainé** et **Phillipe Etienne** de m'avoir accueilli pendant ces trois années de thèse au sein de l'UMR et je remercie aussi toute l'équipe du labo pour son aide, mais aussi pour la bonne ambiance générale, toutes les discussions que j'ai pu avoir avec vous dans la salle café, dans les couloirs ou la salle récolte. Je pense que ces trois années font partie des années les plus mémorables que j'ai pu passer. Je voudrais aussi remercier les membres de **l'équipe EcoPeps** et surtout les animatrices de cette équipe **Annette** et **Servane** pour ces réunions d'équipe qui ont toujours été dans la bienveillance, la bonne humeur et d'où ressortaient des discussions toujours super intéressantes. Je remercie aussi toute l'aide technique que j'ai pu recevoir pendant cette thèse. En particulier, un énorme merci à **Josiane** pour ton aide aux récoltes, aux broyages et pour avoir stérilisé des litres et des litres d'eau ultrapure (c'était tout un programme !), mais aussi pour ta disponibilité et ta gentillesse. Un énorme merci à **Magali**, pour ton aide aux broyages et aux récoltes, mais aussi pour ta bonne humeur permanente pendant les récoltes qui se passaient très souvent avec de grands moments de rigolade, parfois/souvent à mes dépends, (n'est-ce pas Magali ?). Un très grand merci à **Bénédicte** pour les gros broyages, je sais que mes racines et tiges de colza t'ont donné du fil à retordre. Je remercie également **Frédéric Launay**, directeur de la station expérimentale du Pin pour avoir accepté qu'on prélève du sol pour nos cultures et un grand merci à **Olivier** et **Jean-François**, pour nous avoir aidé à pelleter tout ce sol. Je pense que les salles de cours où nous avons dû l'étaler pour le faire sécher s'en souviennent encore. Un grand merci à **Quentin**, pour l'aide apportée sur les analyses des sucres à l'HPLC (tu es un pro de l'analyse des sucres dans les exsudats maintenant !) et surtout pour toujours avoir été à l'heure pour l'appel du RU. Un grand merci à **Josette**, qui a réalisé une partie de mes micropésées à une vitesse impressionnante et un grand merci à **Fanny**, **Emmanuelle** et **Jehanne** de Platin' pour toutes les analyses réalisées. Merci à **Gwenaelle** pour toute l'aide apportée pendant les récoltes. Je voudrais aussi remercier **Sophie (la grande)**, pour l'aide apportée lors de la réservation des transports et hôtels à chacun de mes déplacements. Merci à **Jean-Bernard**, **Aurélia** et à **Annette** pour m'avoir expliqué le fonctionnement de l'HPLC (on a réussi à les analyser ces exsudats !). Enfin un très très grand merci à **Anne-Françoise**, pour toute l'aide que tu as pu m'apporter pour les cultures à la serre, pour les récoltes, mais aussi pour la lutte contre les pucerons et l'oïdium (ça a été dur mais on a réussi !). Un grand merci aussi pour tous ces moments de partage et de rigolade qu'on a pu avoir à la serre, dans la

salle récolte mais aussi dans le bureau des doctorants ! D'ailleurs en parlant du bureau des doctorants, comment ne pas remercier les anciens doctorants, **Galatea**, **Hanh**, **Momo**, **Aurélien** et **Charlotte** pour votre aide pendant la première année de ma thèse. Mais aussi un grand merci aux autres doctorants, **Lethicia**, **Raph**, **Antoine**, **Anouk, Juliette, Leonidas et Yann**. Merci beaucoup **Lethicia** pour ce petit séjour en Allemagne qu'on a pu faire ensemble et qui je pense reste mémorable avec toutes les aventures qu'il y a pu avoir (la paire de Ciseau à l'aéroport, par exemple). Merci à vous, **Raph** (c'est toi le prochain) et **Antoine** pour la bonne humeur permanente que vous faites régner dans le bureau. Je remercie également les autres personnes qui ont fait partie de l'aventure du bureau des doctorants ; **Lorane**, **Guillaume**, **Agathe, Aurore**, **Lucas et Liz.** Un grand merci pour votre aide, mais aussi pour votre bonne humeur et vos conversations. Merci **Agathe** d'avoir apporté tous ces tests de personnalité (ils sont encore notés sur le tableau du bureau !). Un immense merci à toi **Lorane**, pour les aides aux récoltes, à l'ensachage mais aussi pour toute l'aide avec les stats, tu m'as réconcilié avec Rstudio. Un grand merci aussi pour toutes les discussions que l'on pouvait avoir lorsqu'on finissait tard le soir pour s'entraider ! Et surtout un grand merci de m'avoir aidé à ruiner le tableau du bureau au lieu de le restaurer comme c'était prévu.

Je voudrais aussi remercier tous les stagiaires, ou mes armées de stagiaires comme certains les appelaient. Sans vous, tout ce travail n'aurait pas été possible. Alors un grand merci à l'armée numéro 1 : **Héloïse**, **Louise**, **Lucas**, **Zora**, **Léo**, **Margo** et **Basile** pour l'aide aux récoltes, l'ensachage, le tamisage du sol et le dépiautage des siliques, par contre je ne vous remercie pas pour la vaisselle ! J'ai dû me venger sur l'armée numéro 2 : **Patrick**, **Marie**, **Zazie**, **Manon**, **Maelle** et **Lise** que je remercie aussi pour l'aide aux récoltes, l'étiquetage, l'ensachage et le dépiautage des siliques, et la vaisselle ! Et bien sûr je remercie l'armée numéro 3 : **Elyne**, **Nina**, **Myriam** et **Madeleine** pour votre aide au dépiautage des siliques et aux nombreuses micropesées (vous en êtes arrivées à bout, bravo !). Merci à **Elena**, pour l'aide à l'analyse des exsudats de la manip méthodo. Enfin, un grand merci à **Lucien** sans qui, s'occuper des colzas en hydroponie aurait été beaucoup plus périlleux ! J'espère ne pas t'avoir trop traumatisé avec le scan racine.

Toutes les analyses de cette thèse n'auraient pas pu être réalisées sans l'aide de nombreuses personnes en dehors de l'UMR EVA et que je remercie énormément pour leur disponibilité, leur aide et leur bienveillance. Notamment, un grand merci à **Mélanie Bressan**, **Wassila Riah-Anglet**, **Lisa Castel** et **Anne Hanot-Cauchois** pour votre aide dans les analyses sur les communautés microbiennes. Ces petits allers-retours à Rouen ont été un véritable plaisir. Je voudrais aussi dire un grand merci à **Claire Prigent-Combaret** pour l'aide apportée pour la quantification de l'ACC déaminase (en effet, cette quantification n'est pas de tout repos), ainsi que pour ta disponibilité et ta bienveillance lors de mon séjour à Lyon et lors du congrès à Aussois. Un grand merci à **Stéphane Firmin** pour les analyses des

acides organiques dans les exsudats. Je remercie également **Tae-Hwan Kim** pour les analyses des phytohormones, **Marina Leguedard** pour les analyses des lipides dans les graines et **Nicolas Elie** pour le comptage des graines. Je voulais aussi remercier **Olivier Cantat** pour l'aide qu'il m'a apportée afin de trouver les meilleures températures à appliquer. Un grand merci aussi aux agriculteurs que j'ai pu contacter afin d'en apprendre plus sur la caméline et la façon de la cultiver. Je remercie également l'entreprise **SAATBAU** de m'avoir fourni les graines de caméline.

Je tenais aussi à remercier **Isabelle** et **Anne-Marie** pour m'avoir donné l'opportunité de donner des enseignements de biologie végétale. Enseigner a vraiment été un plaisir pour moi et je pense que c'est notamment grâce à vos conseils ainsi qu'à ceux de **Servane**, **Annette** et **Emmanuelle.** Je les remercie d'ailleurs toutes les trois de m'avoir permis de réaliser les sorties de terrains d'écologie avec elles dans la bonne humeur. Merci beaucoup **Sophie** de m'avoir donné certains de tes enseignements en M2 Ecocaen, ces cours ont été un véritable plaisir.

Je tenais à remercier les membres de mon CSI, **Isabelle Gattin**, **Amélie Cantarel**, **Gaëtan Louarn** et **Sybille Brochard** pour leur gentillesse, leur bienveillance, leur curiosité vis-à-vis de mes travaux et leurs précieux conseils pour améliorer le plus possible ma thèse. Je remercie également l'école doctorale (EDnBISE) pour la réponse à toutes mes questions et l'aide financière apportée pour mon déplacement à Lyon et le congrès à Aussois. Je remercie aussi **Anouk Lyver** et **Anna Marcout** de m'avoir donné l'opportunité de participer à leur CSI.

Enfin, comment ne pas remercier **Sophie** et **Emmanuelle** pour cette thèse et surtout pour tous les bons moments que j'ai pu passer pendant cette thèse avec vous. Tout d'abord, un grand merci à **Sophie**. Je me rappelle encore de cette thèse le jour où j'étais en M1 et que tu recherchais des candidats. Tu es venue me voir, tu me l'as proposée et puis après t'avoir dit que j'étais en M1, tu m'as répondu « à mince, désolée, j'aurais bien aimé mais ce n'est pas possible, comme tu es en M1 » et je t'ai répondu que c'était dommage parce que cette thèse avait l'air vraiment super. Au final, il a fallu un souci avec l'école doctorale, le désistement du précédent candidat, une pandémie mondiale et un autre désistement pour passer de liste complémentaire à liste principale et je suis arrivé ! Je me rappelle encore quand tu m'as appelé pour me dire que j'avais la thèse. Au final, je ne regrette absolument pas. Tu as été une directrice de thèse exceptionnelle, un gros merci pour tous ces moments de partage, ces discussions scientifiques et non scientifiques et surtout un grand merci pour la bonne humeur permanente et ces petits instants de folie qui permettent de décompresser. Un grand merci aussi pour toutes les remarques et interrogations toujours très constructives, que tu as pu faire sur chacun de mes rendus et qui m'ont permis de grandement m'améliorer. Je te remercie aussi énormément de m'avoir appris autant de choses, d'avoir développé ma curiosité sur plein de sujets et

aussi d'avoir toujours été ouverte d'esprit face à mes nombreuses propositions de nouvelles manips et de nouvelles idées. Et aussi un grand merci pour ces petites sessions crochet ! Enfin, **Emmanuelle**, je me rappelle encore du jour, en L3, où je suis venu te voir pour te parler de mon hésitation à continuer dans la recherche. Ensuite, je suis arrivé en M1 Ecocaen avec cette petite idée dans la tête, j'ai embêté tous les enseignants du master pour être sûr de mon choix, puis je t'en ai reparlé et tu m'as pris en stage de M1 sur l'un des sujets les plus intéressants au monde, l'exsudation et la morphologie racinaire. Je crois que ça a été la révélation pour moi. Puis, toi aussi, tu m'as parlé de cette thèse en M1 que je pensais totalement inaccessible. Enfin, un jour en M2 je reçois un mail de ta part me disant que cette thèse est de nouveau disponible. Je pense que j'ai mis 10 min pour réaliser et 2 secondes pour faire mon choix. Au final, je pense avoir fait un très bon choix, parce que cette thèse a été une super aventure du début jusqu'à la fin et c'est en grande partie grâce à ton écoute, ta disponibilité, tes conseils et tes idées. Donc un grand merci pour ces réunions dans notre « bureau annexe » à côté du scan racine mais aussi pour les nombreux fous-rires pendant les manips (la douche de boue que j'ai pu recevoir, la chauve-souris dans le sol…). Au final, je finirai par dire, comme tu m'avais dit au début de la thèse, « la pensée va à l'énergie ». Et bien je pense que cette thèse a toujours été dans une pensée positive grâce aux deux personnes qui l'encadraient, ce qui a conduit à beaucoup d'énergie positive, expliquant tous les beaux résultats qu'on a pu avoir !

Enfin je voudrais remercier ma famille et mes amies **Manon**, **Margot**, **Auriane**, **Morgane** qui m'ont beaucoup soutenues pendant ces 3 années de thèse et qui m'ont permis de décompresser et de me changer les idées à chaque fois que j'en avais besoin. Un énorme merci à **Corentin**, qui a toujours été là à chaque coup de mou et qui a toujours su comment me rebooster et m'aider à chaque fois.

Au final, en plus d'être une aventure scientifique extraordinaire, cette thèse a aussi été une aventure humaine hors du commun et je remercie chaque personne qui y a contribué.

Liste des abréviations

A

ABA : 2-cis, 4-trans-abscisic acid
ACC : 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate
ARYLS : Arylsulfatase

B

BAC_DNA : Bacterial abundance (ADN bactérien)
BG : β-glucosidase

C

C : Carbone
CS : Combined sequences
C32 : Inoculation avec *Pseudomonas sp*. C32
C32/HS : Inoculation avec C32 + HS

D

DES : Déshydrogénase
DOC : Dissolved Organic Carbon
DW : Dry Weight

E - F

FA : Fatty Acids
FL_C : C in fallen leaves
Fung_DNA : Fungal abundance (ADN fongique)
F113 : Inoculation avec *Pseudomonas ogarae* F113
F113/HS : Inoculation avec F113 + HS

G

GA3 : Gibberellic Acid
GI : Gradual Increase = PS (Pre-stress)
GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat = IPCC

H

HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HPAEC : High Performance Anion Exchange Chromatography
HSP : Heat Shocks Proteins
HS : Heat Stress = IHS (intense heat stress)

I

IAA : Indole-3-Acetic Acid
IHS : Intense Heat Stress = HS (heat stress)
IPCC : Intergovernmental Panel on Climate Change = GIEC
IRMS : Isotope-Ratio Mass Spectrometry

J-K-L

LA : Leaf Area
LDW : Leaf Dry Weight
Leaf_C : C in leaves
LNC : Leaf Nitrogen Content
L:R ratio : Leaf: Root ratio
L:repro ratio : Leaf : reproductive parts ratio

M

MBC : Microbial Biomass Carbon
MonoUFA : MonoUnsaturated FA

N

N : Nitrogen (=Azote)
NAG : N-Acetyl-glucosaminidase

O-P

PCA : Principal Component Analysis
PES : PolyEtherSulfone
PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobia
PolyUFA : polyunsaturated FAs
PS : Pre-Stress = GI (gradual increase)

Q-R

RDA : Redundancy Analysis
RDMC : Root Dry Matter Content
RDW : Root Dry Weight
Repro_C: C in reproductive parts
Repro_DW : DW of reproductive part
RMR : Root Mass Ratio
RNC : Root Nitrogen Content
Root_struct_C : C in root structure
ROS : Reactive Oxygen Species
RTD : Root Tissue Density
RWE : Root Water Extracts = RWEC

RWEC : Root Water-Extractable Compounds = RWE
R:S ratio : Root:Shoot Ratio

S

SFA : saturated FA
SLA : Specific Leaf Area
SOM : Soil Organic Matter
SOC : Soil Organic Content
SRL : Specific Root Length
Stem_C : C in stem

T

Total_DW : Total Dry Weight
TSW : Thousand Seed Weight = PMG

U-V-W-X-Y-Z

Veg_DW : DW of vegetative parts

Autres

ω3 : α-Linolenic acid
ω6 : Linoleic acid
ω9 : oleic acid

Table des matières

CONTEXTE DE LA THESE 13

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 17

1.1. LE CHANGEMENT CLIMATIQUE 19
1.1.1. CARACTERISTIQUES DU CHANGEMENT CLIMATIQUE 19
1.1.2. L'AUGMENTATION DES PHENOMENES DE VAGUES DE CHALEUR 20
1.2. IMPACT D'UN STRESS THERMIQUE SUR LES PLANTES DE GRANDES CULTURES 22
1.3. CAS D'ETUDE : ANALYSE DES EFFETS DU STRESS THERMIQUE SUR DEUX ESPECES OLEAGINEUSES CONTRASTEES : LE COLZA ET CAMELINE 24
1.3.1. EFFETS DU STRESS THERMIQUE CHEZ LE COLZA 29
1.3.2. EFFETS DU STRESS THERMIQUE CHEZ LA CAMELINE 31
1.4. QUELS SONT LES LEVIERS D'ADAPTATION AUX TEMPERATURES ELEVEES ? 32
1.4.1. ETAT DE L'ART DES LEVIERS EXISTANTS 32
1.4.2. LE THERMOPRIMING : DEFINITION 33
1.4.3. LA THERMO-RESISTANCE MEDIEE PAR DES BACTERIES PGPR 35
1.5. L'EXSUDATION RACINAIRE COMME MOYEN D'INTERACTION ENTRE LES PLANTES ET LES MICROORGANISMES DU SOL 39
1.5.1. CARACTERISTIQUES DE L'EXSUDATION RACINAIRE 39
1.5.2. INTERACTIONS PLANTE/COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL 42
1.5.3. RELATIONS ENTRE EXSUDATION ET TRAITS RACINAIRES 45
1.5.4. EFFET DU STRESS THERMIQUE SUR LE SYSTEME RACINAIRE, L'EXSUDATION ET LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL 49

CHAPITRE 2 : PLAN DE RECHERCHE 59

2.1. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS 61
2.1.1. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE 61
2.1.2. CHRONOLOGIE DES EXPERIMENTATIONS ET OBJECTIFS ASSOCIES 62
2.2. MATERIEL ET METHODES 64
2.2.1. CONDITIONS DE CULTURE ET DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX 64
2.2.2. MESURES EXPERIMENTALES 69

CHAPITRE 3 : EFFETS D'UN STRESS THERMIQUE ET D'UN THERMOPRIMING SUR LA MORPHOLOGIE ET L'EXSUDATION RACINAIRE DU COLZA ET DE LA CAMELINE 73

3.1. EFFET D'UN STRESS THERMIQUE ET D'UN THERMOPRIMING SUR LA MORPHOLOGIE ET L'EXSUDATION RACINAIRE CHEZ LE COLZA ET LA CAMELINE 75
3.1.1. PREAMBULE 75
3.1.2. INTRODUCTION 77
3.1.3. MATERIALS AND METHODS 80
3.1.4. RESULTS 85
3.1.5. DISCUSSION 94

3.2. ANNEXE METHODOLOGIQUE : COMPARAISON DE DIFFERENTES METHODES DE COLLECTE DES EXSUDATS RACINAIRES CHEZ LE COLZA ET LA CAMELINE 101
3.2.1. PREAMBULE 101
3.2.2. INTRODUCTION 102
3.2.3. MATERIEL ET METHODE 103
3.2.4. RESULTATS 105
3.2.5. DISCUSSION 108

CHAPITRE 4 : IMPACTS DE L'INOCULATION DE PGPR SUR LES TRAITS MORPHOLOGIQUES ET L'EXSUDATION RACINAIRE CHEZ LE COLZA ET LA CAMELINE : INTERACTIONS AVEC LE STRESS THERMIQUE 111

4.1. PREAMBULE 113
4.2. INTRODUCTION 115
4.3. MATERIALS AND METHODS 117
4.4. RESULTS 123
4.5. DISCUSSION 136

CHAPITRE 5 : EFFETS DU STRESS THERMIQUE ET/OU DE L'INOCULATION AVEC DES PGPR SUR L'ALLOCATION DE C DANS LE SYSTEME SOL-PLANTE, LES TRAITS RACINAIRES ET LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL CHEZ LE COLZA ET LA CAMELINE 143

5.1. PREAMBULE 145
5.2. INTRODUCTION 147
5.3. MATERIALS AND METHODS 149
5.4. RESULTS 154
5.5. DISCUSSION 164

CHAPITRE 6 : EFFETS DE DEUX STRATEGIES D'ACCLIMATATION POUR LIMITER L'IMPACT DU STRESS THERMIQUE SUR LE RENDEMENT ET LA QUALITE GRAINIERE DU COLZA ET LA CAMELINE 171

6.1. PREAMBULE 173
6.2. INTRODUCTION 175
6.3. MATERIALS AND METHODS 178
6.4. RESULTS 184
6.5. DISCUSSION 194

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 201

7.1. COMPARAISON DE DEUX STRATEGIES D'ACCLIMATATION POUR FAIRE FACE AU STRESS THERMIQUE : LE THERMOPRIMING ET L'UTILISATION DE PGPR, CHEZ LE COLZA ET LA CAMELINE 204
7.2. COMPARAISON DES EFFETS DU STRESS THERMIQUE SUR DEUX BRASSICACEES A STRATEGIES D'ESPECES CONTRASTEES 210
7.3. REFLEXION SUR L'ANALYSE DES EXSUDATS RACINAIRES 214
7.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 218

LISTE DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES.....221

ANNEXES.....227

RÉFÉRENCES.....243

Contexte de la thèse

Le changement climatique est un des enjeux majeurs de notre siècle par ses nombreux impacts sur nos modes de vie. L'agriculture représente l'un des secteurs les plus affectés par le changement climatique mettant en péril le principe de sécurité alimentaire. Parmi les stress causés par le changement climatique, le **stress thermique résultant de l'augmentation des températures annuelles et de la fréquence des vagues de chaleurs** constitue l'un des principaux facteurs frappant les grandes cultures, notamment au début des stades reproductifs, phases les plus critiques pour l'élaboration du rendement en grains et de leur qualité. Les oléagineux tels que **le colza et la caméline** sont des espèces particulièrement touchées par ce type de stress, engendrant de fortes pertes de rendement et une diminution de la qualité des graines. Ainsi, il est nécessaire de mettre en place des solutions pour faire face aux enjeux de sécurité alimentaire et ainsi maintenir une productivité durable de ces cultures.

La sélection variétale et l'amélioration des itinéraires techniques sont les deux principaux leviers actuels pour faire face au stress thermique. Cependant, ces leviers trouvent leur limite, notamment du fait d'une érosion de la diversité génétique (Esquinas-Alcázar 2005) ou d'une efficacité relativement fluctuante en fonction des conditions (Chen et al. 2005; Gao et al. 2021). C'est pourquoi il est nécessaire de **développer de nouvelles stratégies en rupture avec les techniques actuelles** comme des solutions reposant sur **l'acclimatation des plantes**. L'acclimatation au stress peut résulter d'une sensibilisation au stress permettant aux organismes de répondre de façon plus adaptée aux stress ultérieurs. Cet **effet « préparatoire » ou d' «amorçage» (priming)** repose sur l'exposition à un pré-stress qui peut être de même nature ou de nature différente au stress plus tardif. **Le thermopriming** consistant à appliquer un **stress thermique modéré avant un stress thermique intense** pourrait permettre d'acclimater les plantes via la mise en place de mécanismes leur permettant de faire face au stress (Serrano et al. 2019; Balazadeh 2022; Liu et al. 2022; Shekhawat et al. 2022). **L'inoculation des plantes avec des Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)** est aussi un levier d'acclimatation de plus en plus étudié permettant de limiter les impacts des stress abiotiques tels que le stress thermique (Meena et al. 2017; Lastochkina et al. 2019; Goswami and Deka 2020). Cependant, bien que ces deux types de leviers d'acclimatations soient principalement étudiés pour limiter l'impact des stress sur le développement des parties aériennes et sur le rendement, **peu d'études** se sont intéressées à leur **effet sur la morphologie et les fonctions racinaires** comme **l'exsudation racinaire**.

Ainsi, cette thèse a visé à **(i)** Etudier **l'effet** du stress thermique et du **thermopriming sur la morphologie et l'exsudation racinaire** et observer la mise en place de stratégies racinaires chez deux espèces d'intérêt agronomique – colza et caméline – pour faire face à ce stress **(ii)** Améliorer notre compréhension de **l'impacts** de l'inoculation de **PGPR sur les traits morphologiques et l'exsudation**

racinaire chez le colza et la caméline **en interaction avec le stress thermique** ainsi que **(iii)** les conséquences du **stress thermique et de cette inoculation** (en combinaison ou non) sur **l'allocation en carbone (C)** dans la plante, les **traits racinaires** et les **communautés microbiennes du sol**. Et *in fine*, **(iv)** comprendre si ces **deux types de stratégies** peuvent **limiter l'impact du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière du colza et de la caméline**.

Nos hypothèses en lien avec ces objectifs sont que le stress thermique présente un impact sur la morphologie et l'exsudation racinaire ainsi que le rendement et la qualité grainière et que ces deux stratégies d'acclimatation pourraient permettre de limiter les impacts chez ces deux espèces cultivées. De plus, l'utilisation du levier **d'acclimatation reposant sur des PGPR** suppose que le colza et la caméline soient capables **d'interagir avec ces bactéries via leurs exsudats racinaires** et ce plus particulièrement en condition de stress thermique. Aussi, les plantes pourraient être amenées à **modifier quantitativement et/ou qualitativement la composition de leurs exsudats** en condition de stress thermique afin d'améliorer le recrutement de ces PGPR. En retour, ces bactéries présentent de nombreuses activités bénéfiques pour la plante et pourraient *in fine* engendrer des **modifications de l'allocation du C au sein de la plante et jusqu'au sol et des changements de l'activité et/ou de la composition de la communauté microbienne du sol en interaction avec les stratégies de développement des plantes** afin d'améliorer la réponse au stress de ces dernières. La caméline pourrait aussi mettre en place de meilleures stratégies pour faire face au stress thermique en comparaison du colza de par sa meilleure résistance connue aux stress.

Pour conduire cette thèse, j'ai bénéficié d'un contrat doctoral cofinancé par le métaprogramme « Adaptation de l'Agriculture et de la Forêt au Changement Climatique » (ACCAF) de l'INRAE et par la COMUE Normandie université. De plus, les travaux réalisés pendant la thèse ont été financés par deux principaux projets de recherche régionaux. C'est pourquoi cette thèse vise à répondre à des enjeux régionaux (i.e. le développement des cultures de colza et de caméline face à l'évolution des caractéristiques climatiques régionales). Une partie des travaux a été réalisée dans le cadre d'un projet RIN (Réseau d'Intérêt Normand) Emergent financé par la région Normandie (projet « Acclimatation of *Linum usitatissimum* L. and *BrassicA napus* L. to global warming through ThermOpriming and Rhizobacteria inoculation », **ALBATOR, 2020-2022**) visant à déterminer les effets de deux stratégies d'acclimatation face au stress thermique. L'autre partie des travaux a été réalisée dans le cadre du projet RIN Tremplin financé par la région Normandie (projet « Bactéries, Exsudats Et Rhizodépôts », **BEER, 2019-2022**) visant à mieux comprendre les relations plantes bactéries via l'analyse de l'exsudation racinaire. Certaines analyses ont aussi été financées par un pari inter-unité financé par le département AgroEcoSystèmes (Projet « Plant Adaptation to Recurrent Stresses: combining Ecophysiological and Modeling Approaches », **PARSEMA, 2022-2024**).

Présentation du manuscrit de thèse

Chapitre 1 – Synthèse bibliographique : Introduction des principales thématiques du sujet de thèse. Contenu : les caractéristiques du changement climatique et du stress thermique, les impacts du stress thermique sur les plantes de grandes cultures, les leviers pour faire face au stress thermique et les caractéristiques de l'exsudation racinaire et son potentiel d'interaction avec les microorganismes.

Chapitre 2 – Plan de recherche : Présentation globale des objectifs de la thèse et des protocoles expérimentaux associés (ces protocoles sont davantage détaillés dans les chapitres présentant les résultats).

Chapitre 3 : Résultats présentant les effets d'un stress thermique et d'un thermopriming sur la morphologie et l'exsudation racinaire du colza et de la caméline

Chapitre 4 : Résultats présentant les effets d'un stress thermique et de l'inoculation de PGPR (en combinaison ou non) sur la morphologie et l'exsudation racinaire du colza et de la caméline

Chapitre 5 : Résultats présentant les effets d'un stress thermique et/ou de l'inoculation de PGPR sur l'allocation de C dans le système sol-plante, les traits racinaires et les communautés microbiennes du sol chez le colza et la caméline.

Chapitre 6 : Résultats présentant les effets de deux stratégies d'acclimatation pour limiter l'impact du stress thermique sur le rendement, ses composantes et la qualité grainière du colza et de la caméline.

Chapitre 7 – Discussion : Discussion générale, conclusion et perspectives

Liste des activités scientifiques : Liste des publications, des communications et autres activités scientifiques

Annexes

Références bibliographiques

Résumés en français et en anglais

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1. Le changement climatique

1.1.1. Caractéristiques du changement climatique

Le **changement climatique** est à l'heure actuelle considéré comme l'une des plus grandes menaces pour l'humanité. En effet, bien que une variabilité climatique liée aux cycles naturels de la Terre existe depuis toujours, la principale cause du changement climatique actuel reste l'émission de gaz à effet de serre dus aux activités anthropiques (IPCC 2021). Le principal effet de ce changement se traduit par une **augmentation des températures globales de la planète** (Fig.1). Ainsi, il a été démontré que la moyenne des températures terrestres entre la période de 2006 et 2015 était 1,53°C plus élevée que la période entre 1850 et 1900 (IPCC 2021). Ces modifications climatiques affectent les écosystèmes et les espèces dans leur globalité (Gonzalez et al. 2010; Pimm et al. 2014; Urban et al. 2016) et deux facteurs sont majoritairement en cause. En effet l'augmentation des températures et les changements de précipitation sont les deux causes majeures des modifications des communautés végétales et animales présentes dans les écosystèmes (Jackson and Overpeck 2000; Gonzalez et al. 2010).

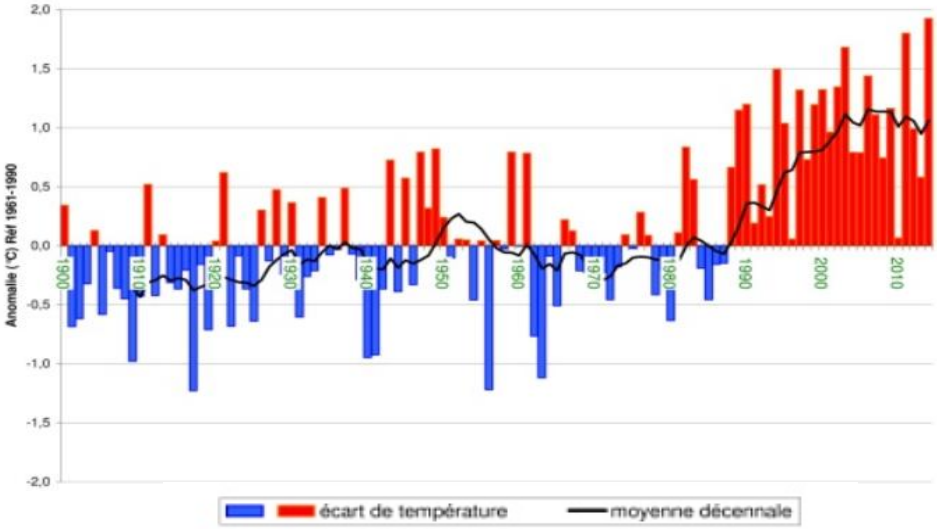


Figure 1 : Evolution des anomalies des températures moyennes annuelles de l'air en France, par rapport à la normale de référence (correspondant à la moyenne de l'indicateur sur la période 1961-1990 (soit 11,8 °C) d'après MétéoFrance.

Cependant, bien que le changement climatique soit ressenti de façon mondiale, des variations à l'échelle locale sont aussi observables. En effet, une **augmentation de la fréquence des épisodes de sécheresse et de vague de chaleur estivales** liée à une diminution des précipitations et d'un renforcement des contrastes saisonniers sont à prévoir dans le **contexte local normand** (Beauvais, 2016).

Outre les milieux naturels, les écosystèmes d'origine anthropique tels que les **agrosystèmes** comme les zones de cultures sont aussi menacés. Cette menace sur les agrosystèmes risque d'impacter directement la société humaine (Soussana et al. 2010). En effet, en plus de l'accroissement démographique engendrant une augmentation de la demande en ressources alimentaires, le **changement climatique** risque de **causer une diminution des rendements** de par son action directe sur les cultures (Soussana et al. 2010). Cela pourrait donc aboutir à une remise en cause du principe même de sécurité alimentaire.

1.1.2. L'augmentation des phénomènes de vagues de chaleur

En plus de l'augmentation moyenne des températures, un autre phénomène causé par le changement climatique est l'**augmentation d'évènements ponctuels extrêmes tels que les vagues de chaleur** (Lemonsu et al. 2014; Trnka et al. 2014; Bador et al. 2017). En effet, suite à l'analyse des différents scénarios du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) (Fig.2), une augmentation de la fréquence des vagues de chaleur a pu être remarquée, ainsi qu'une augmentation de leur intensité et de leur durée (Fischer and Schär 2010; Lemonsu et al. 2014; Bador et al. 2017) ; Fig.3).

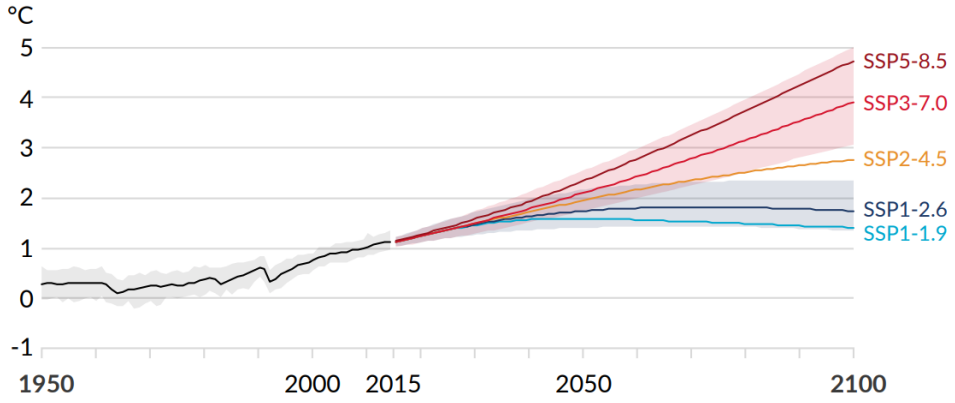


Figure 2 : Changement de la température de surface globale par rapport à 1850-1900 (IPCC 2021).

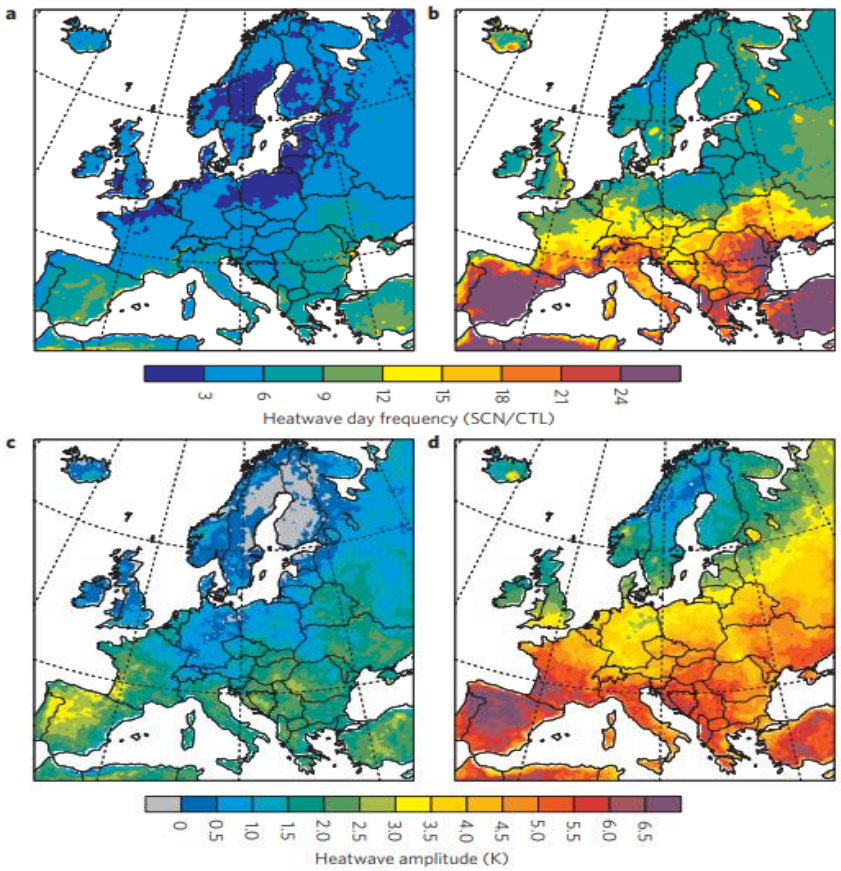


Figure 3 : Fréquence et amplitude des vagues de chaleurs. La fréquence des jours de canicule obtenue en faisant le ratio entre la moyenne des six différents scénarios de l'article et la période contrôle (1961-1990 ; a, b). L'amplitude des vagues de chaleur est exprimée en degré Celsius (c, d). Les changements sont indiqués pour 2021–2050 (a, c) et 2071–2100 (b, d) (Fischer and Schär 2010).

Une **vague de chaleur** se définit par une **hausse de température au-delà des normales de saisons en journée et dans la nuit pendant un certain nombre de jours au printemps et/ou en été**. Ce nombre de jours caractérisant la vague de chaleur diffère en fonction des auteurs. En effet, Kuglitsch et al. (2010) considère qu'une vague de chaleur présente une période de forte chaleur d'au **moins 3 jours consécutifs** (jour et nuit). Une journée chaude est définie comme un jour où le Tx quotidien (Tn) dépasse le 95e centile quotidien à long terme pour la saison juin-septembre (calculée sur 1969–1998 dans leur étude). Pour Fischer and Schär (2010), une vague de chaleur est définie comme une période d'au moins 6 jours consécutifs avec des températures maximales dépassant le 90e centile de la période historique (1961-1990). En France, depuis la canicule de 2003, les vagues de chaleurs sont particulièrement observées (Lemonsu et al. 2014). Les indicateurs de température minimale et maximale sont calculés comme une moyenne mobile des températures quotidiennes minimale (Tn) et maximale (Tx) sur 3 jours consécutifs afin de prendre en compte l'effet cumulatif du stress thermique dans le temps associé aux vagues de chaleur (Lemonsu et al. 2014). Cependant une nouvelle définition

des vagues de chaleurs est apparue en France, s'adaptant mieux aux projections climatiques. Une **vague de chaleur est détectée lorsqu'un ou plusieurs pics de chaleurs sont observés**. Ainsi les pics de chaleurs sont déterminés quand les valeurs quotidiennes de l'indicateur de **température** de la série temporelle historique de référence **excèdent le seuil de température appliqué par le Plan National Canicule** pour le département correspondant (Fig.4 ; Lemonsu et al. 2014). Actuellement, une vague de chaleur n'est plus seulement déterminée par sa durée, même si un minimum d'une durée de 3 jours est requis pour détecter l'événement d'une vague de chaleur (Lemonsu et al. 2014). Une vague de chaleur est ainsi caractérisée par l'ensemble des jours adjacents au pic de chaleur avec des valeurs de l'indicateur de température en dessous de 2°C du seuil de température du PNC (Plan National Canicule) pour toute la période prolongée (Fig.4).

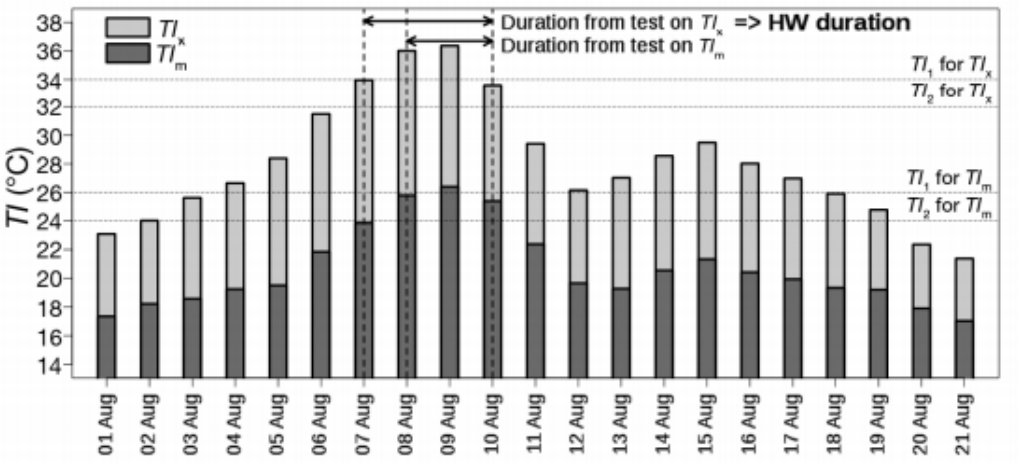


Figure 4 : Exemple de vague de chaleur. TI : Indicateur de température ; TIm : indicateur de température minimum ; TIx : indicateur de température maximum ; TI1 : seuil de température du PNC (Plan National Canicule) ; TI2 : seuil de température en dessous des deux degrés du PNC (Lemonsu et al. 2014).

1.2. Impact d'un stress thermique sur les plantes de grandes cultures

A l'heure actuelle, on estime que **30% des variations de rendements interannuelles** des principales grandes cultures **résultent des variations de températures et de précipitation dues au changement climatique** (Lobell and Field 2007; Ray et al. 2015).

La **sensibilité** des plantes aux **températures élevées varie avec le stade phénologique** de la plante, même si le stress thermique affecte dans une certaine mesure tous les stades végétatifs et

reproducteurs. Les effets observés **dépendent des espèces et du génotype**, avec de **grandes variations inter et intraspécifiques** (Barnabás et al. 2008). Les changements phénotypiques sous l'effet des stress thermiques sont généralement considérés comme similaires à ceux sous stress hydriques (Bañon et al. 2004). Cependant, diverses lésions physiologiques spécifiques ont pu être observées au niveau des parties aériennes à des températures élevées, telles que des brûlures au niveau des feuilles et des tiges, **l'abscission et la sénescence des feuilles** ainsi que des **décolorations des feuilles et des fruits** qui entraînent par conséquent une **diminution de la productivité des plantes** (Vollenweider and Günthardt-Goerg 2005). Dans de nombreux cas, **l'architecture des plantes change** et les hypocotyles et les pétioles s'allongent ressemblant aux réponses morphologiques liées à l'obscurité (Hua 2009; Tian et al. 2009). **Les températures élevées réduisent aussi le développement des plantes en affectant les taux d'assimilation du C** des parties aériennes et en accélérant leur cycle de développement, engendrant une diminution du poids sec total de la plante et impactant directement le rendement de nombreuses cultures (Wahid et al. 2007; Allakhverdiev et al. 2008; Kourani et al. 2022).

Les effets du stress thermique sont aussi retrouvés au niveau biochimique. En effet, il est notamment possible d'observer une diminution de la synthèse des protéines dans les parties végétatives et une accélération de la transcription et la traduction des Heat Shocks Proteins (HSP) (Sun et al. 2002; Al-Whaibi 2011), de la production de phytohormones (ABA) et d'antioxydants (Maestri et al. 2002). Des **changements dans l'organisation des structures cellulaires**, y compris les organites et le cytosquelette, et **les fonctions membranaires** sont aussi observés (Barnabás et al. 2008). En effet, il a été démontré une tendance générale à la réduction de la taille des cellules et à la fermeture des stomates permettant la réduction de la perte en eau, nécessaire pour le refroidissement des tissus (Bañon et al. 2004).

Les processus liés aux échanges gazeux tels que **la photosynthèse** sont eux aussi particulièrement **impactés par le stress thermique**. En effet, dans un premier temps, une augmentation des températures va engendrer une **fermeture des stomates** occasionnant une réduction de la fixation du C (Bañon et al. 2004; Allakhverdiev et al. 2008). Dans un second temps, les températures élevées peuvent entrainer une **diminution de l'acquisition de la lumière au cours du cycle de vie des plantes et une perturbation des processus associés à l'assimilation du C** (Allakhverdiev et al. 2008). En effet, l'exposition à des températures élevées va tout particulièrement impacter la photosynthèse, en causant une diminution de la biosynthèse de la chlorophylle (Dutta et al. 2009) ainsi que modifier l'organisation structurale des thylacoïdes (Karim et al. 1999). L'activité de la Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) va quant à elle être diminué par des températures supérieures à 35°C (Crafts-Brandner and Law 2000; Griffin et al. 2004).

Pendant la phase reproductive, une courte période de stress thermique peut provoquer une augmentation significative des avortements des bourgeons floraux et des fleurs ouvertes (Guilioni et al. 1997; Young et al. 2004). La détérioration du développement du pollen et des anthères par des températures élevées est aussi un facteur important qui contribue à la diminution de la nouaison (phase de formation des fruits) dans de nombreuses cultures (Peet et al. 1998; Young et al. 2004). Au niveau des graines, des températures élevées peuvent réduire le potentiel de germination et entrainer une mauvaise germination et par conséquent des défauts d'implantation (Fahad et al. 2017). Des effets à long terme du stress thermique sur les graines en développement peuvent aussi être observés, tels qu'une **modification du temps de germination** ou une perte de vigueur, conduisant finalement à de taux de levée réduits du fait de plantules peu vigoureuses (Wahid et al. 2007; Brunel-Muguet et al. 2015). Certains auteurs ont pu remarquer une baisse significative du poids de mille grains et du nombre total de grains chez le blé à des températures élevées (Ferris et al. 1998). Enfin, **la qualité nutritionnelle des grains des céréales et des oléagineux est également affectée négativement par le stress thermique**, parce qu'elle **réduit** considérablement en amidon mais aussi **les teneurs en huiles** chez les espèces oléagineuses (Wilhelm et al. 1999; Maestri et al. 2002; Wahid et al. 2007; Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021).

1.3. Cas d'étude : analyse des effets du stress thermique sur deux espèces oléagineuses contrastées : le colza et caméline

Les **oléagineux** sont des plantes cultivées principalement pour leurs **graines riches en matières grasses**. Ces huiles sont extraites par trituration et sont par la suite utilisées pour l'alimentation humaine, la fabrication de biocarburants ou à usage industriel (lubrifiants, peintures, linoleum…). A la suite de la trituration des graines, le tourteau, un coproduit riche en protéines peut être utilisé pour l'alimentation du bétail. Dans cette partie, les particularités du colza et de la caméline sont résumés dans deux encadrés respectifs et une synthèse de leurs différences est présenté dans le tableau 1.

Encadré 1 : Le colza (*Brassica napus*, L.)

L'espèce ***Brassica napus*** est une espèce de la famille des **Brassicacées** issue du **croisement naturel** entre la **navette** (*Brassica rapa L.*) et le **chou** (*Brassica oleracea L.*). Ce croisement a permis d'obtenir diverses variétés tels que les **colzas oléagineux de printemps et d'hiver**, les colzas fourragers et certains légumes tels que le chou kale ou le rutabaga. Cette plante est une **herbacée annuelle ou bisannuelle** mesurant entre 1 et 2 mètres et possédant un **système racinaire pivotant**, une tige rameuse et des feuilles glabres. Les inflorescences se développent en grappe et après fécondation, les siliques (fruit du colza) contiennent entre 15 et 30 graines.

Les **expérimentations conduites lors cette thèse** ont exclusivement été réalisées sur le **colza oléagineux d'hiver**, qui est beaucoup plus répandu en Europe que le colza de printemps. C'est pourquoi le cycle de culture développé par la suite, se concentre sur ce type de variétés.

Cycle de vie

Le **cycle de vie du colza d'hiver** est subdivisé en plusieurs stades (Fig.1 (Encad.1)). Ce dernier est semé entre août et octobre et la récolte des graines se fait à maturité entre les mois de juin et juillet. Son cycle débute par la phase de levée qui dure environ 100 degré-jour (dj) (Fig.1 (Encad.1)). Il se poursuit par la phase végétative de septembre à novembre/décembre (stade de 1 à 10 feuilles) permettant le développement du système racinaire et des feuilles jusqu'au stade de rosette, du repos végétatif en début d'hiver, où il va subir une période de **vernalisation**, période de mise au froid des plantes induisant la montaison et la phase reproductive de la plante (Fig.1 (Encad.1)) . En fin d'hiver, le colza entre en stade de montaison, période pendant laquelle les entrenœuds s'allongent et l'inflorescence commence à se dégager jusqu'à obtenir des boutons séparés. La plante étant particulièrement sensible aux carences à ce stade-là, il est préconisé de réaliser un apport en azote et en soufre au tout début de cette période afin d'augmenter la biomasse des plantes (Terres Inovia 2019). Début avril, le colza entre au stade floraison, début de la phase reproductrice, où la remobilisation des nutriments des feuilles vers les parties reproductives sera importante. Enfin, le stade de remplissage des siliques, débutant pendant le mois de mai correspond au stade où les premières graines commencent à se former au sein des siliques, puis se suivra le stade de maturation de graines à l'issue duquel les graines seront récoltées (Fig.1 (Encad.1)). Le colza est une espèce dite à croissance indéterminée, ainsi les stades de maturation, de remplissage et de floraison se chevauchent et se retrouve simultanément le long des ramifications de la plante (Diepenbrock 2000).

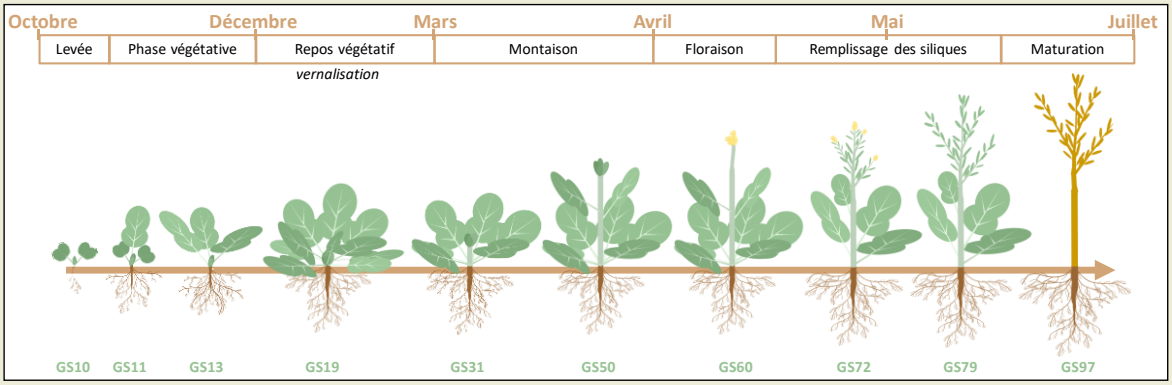


Figure 1 (Encadré 1) : Les différents stades de développement du colza d'hiver (Lancashire et al. 1991).

Qualité grainière

Les siliques du **colza** renferment des graines **riches en lipides** (jusqu'à 43% de la composition totale) et **en protéines** (environ 19% de la composition totale) (Fig.2A (Encad.1)). De plus l'huile de colza est réputée pour sa **forte teneur en acides gras polyinsaturés** tels que l'acide α-linolénique (C18:3 ; ω3) et l'acide linoléique (C18:2 ; ω6) (Fig.2B (Encad.1)). En effet, ces acides gras essentiels sont très bénéfiques pour la santé humaine. Ainsi, les **graines de colza** sont principalement **utilisées pour leurs huiles** servant pour des usages alimentaires après raffinage ou pour la production de biocarburants. A l'issue de cette extraction, un co-produit très riche en protéines sera transformé en **tourteau**, utilisé pour l'alimentation des animaux d'élevage (Fig.2C (Encad.1)).

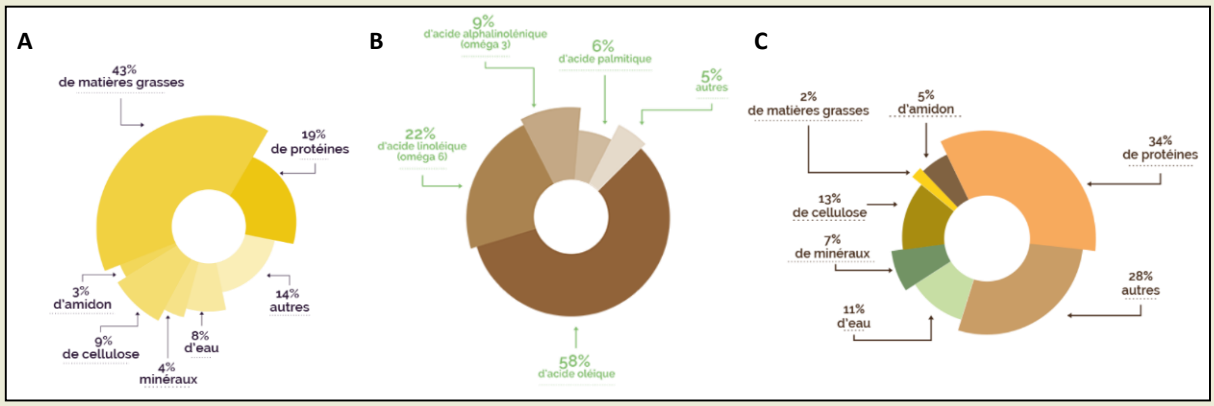


Figure 2 (Encadré 1) : Composition de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau (C) de colza (www.terresunivia.fr).

Surface de production

Actuellement le colza est le **3ème oléoprotéagineux cultivé** derrière le soja et le palmier à huile. En 2018 sur le marché mondial des oléagineux, 67 millions de tonnes (Mt) de graines de colza ont été produites dans le monde dont 21Mt produites par l'union européenne. La France était le 1er producteur de Colza en 2018 en Europe et le 4ème à l'échelle mondiale. **En France**, la production de colza se situe principalement dans la **moitié Nord du pays** et surtout dans les régions Centre-Val-de-Loire, Normandie, Hauts-de-France, Grand-Est et Bourgogne-Franche-Comté (Fig.3 (Encad.1)). A l'échelle régionale, le colza est la **2ème production normande** (*ca*. 132 000 ha) après le blé tendre et le **1er oléoprotéagineux** avec 537 500 tonnes pour la campagne 2016/17 (FranceAgriMer 2017).

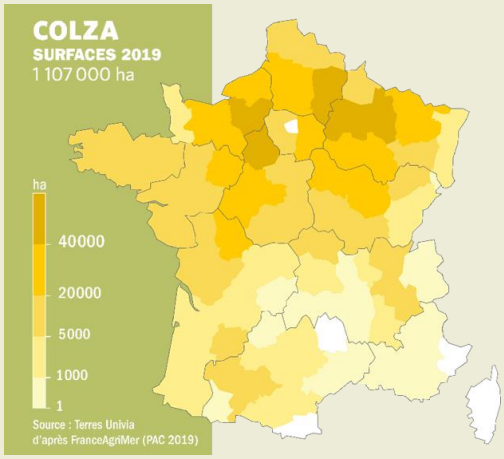


Figure 3 (Encadré 1) : Carte de la répartition des surfaces cultivées en colza par département. Le colza est surtout cultivé dans la moitié Nord de la France (www.terresunivia.fr).

Encadré 2 : La caméline (Camelina sativa (L.) Crantz)

La **caméline (*Camelina sativa* L. Crantz**) est une espèce de la famille des **Brassicacées** présentant des tiges dressées de 40 à 80 centimètres simples ou ramifiées, des feuilles oblongues, lancéolées et les inflorescences sont constituées de petites fleurs jaune pâle. Les fruits sont des silicules (siliques rondes) et les graines sont d'une dimension comprise entre 1 et 2 millimètres. Cette espèce présente globalement le **même type de développement que le colza** mais sur une **période plus courte** (Fig.1 (Encad.2)). Les variétés cultivées en France ne sont quasi-exclusivement que des **variétés de printemps**. Ainsi, cette espèce est généralement semée entre mi-avril et mi-juin pour une récolte entre Juillet et Septembre. Son cycle de culture relativement cours (3 à 4 mois), permet d'installer une nouvelle culture à la suite de cette espèce (Fig.1 (Encad.2)).

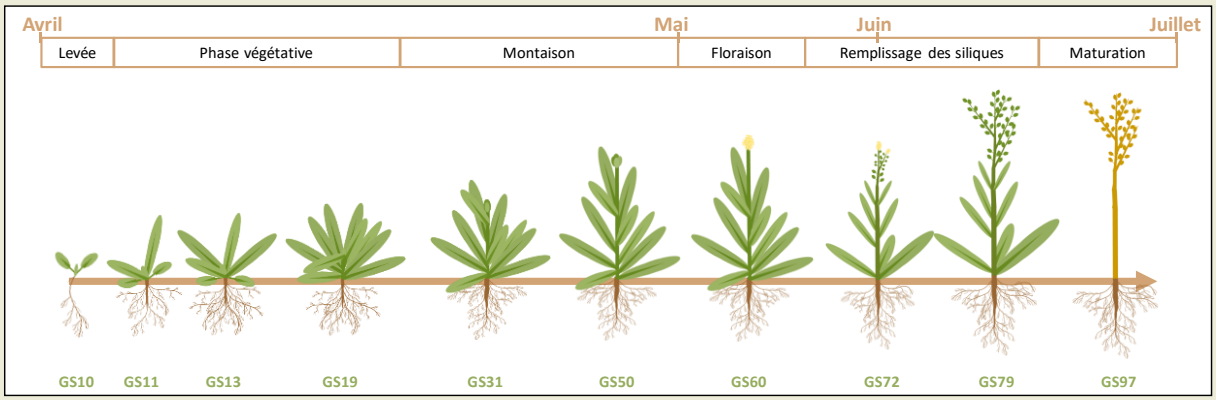


Figure 1 (Encadré 2) : Les stades de développement de la caméline de printemps (d'après Martinelli and Galasso 2011).

Historique

La caméline était initialement une des **premières oléagineuses cultivées** dans le monde (Zubr 1997; Zanetti et al. 2021). Cependant suite à la révolution verte (1960-1980), cette plante surtout cultivée dans les milieux tempérées européens fut **remplacée par le colza qui présente un rendement grainier plus important**. Ainsi, cette culture fût oubliée jusqu'à récemment, où la production de caméline tend à se développer de nouveau. C'est pourquoi cette espèce est qualifiée **d'espèce oléagineuse ré-émergente** (Julié-Galau et al. 2014; Zanetti et al. 2021). L'abandon de la culture de la caméline après la révolution verte, a soustrait cette espèce à une forte pression de sélection. Ainsi, cette espèce, **peu sélectionnée**, pourrait ainsi conserver de nombreux gènes de résistance qui ont été contre sélectionnés (et donc perdus) dans les programmes d'amélioration chez d'autres espèces (Brock et al. 2018; Luo et al. 2019). En effet, cette espèce est **réputée pour être particulièrement résistante** aux maladies et ravageurs. Elle peut également se développer sur des sols pauvres en nutriments et est donc peu demandeuse en intrants.

Utilisation

Initialement, cette espèce a été redéveloppée **comme engrais vert** en culture dérobée, puis par la suite elle fut cultivée en culture associée avec des légumineuses, **puis en monoculture pour ses graines, très riches en huile (43%)** et plus particulièrement en **acides gras polyinsaturées** dont **des ω3 qui constituent jusqu'à 40% de la quantité d'huile totale** (Fig.2 (Encad.2) ; Dharavath et al. 2016). Comme pour le colza, après trituration des

graines, les huiles peuvent être utilisées pour **l'alimentation humaine ou pour la réalisation de biocarburants**. De plus, les tourteaux, riches en protéines peuvent être utilisées pour l'alimentation des animaux d'élevage. Actuellement, les surfaces produites sont en forte progression et **en 2021** il a été estimé **qu'environ 10 000 hectares de caméline seraient cultivés en Europe** (Zanetti et al. 2021).

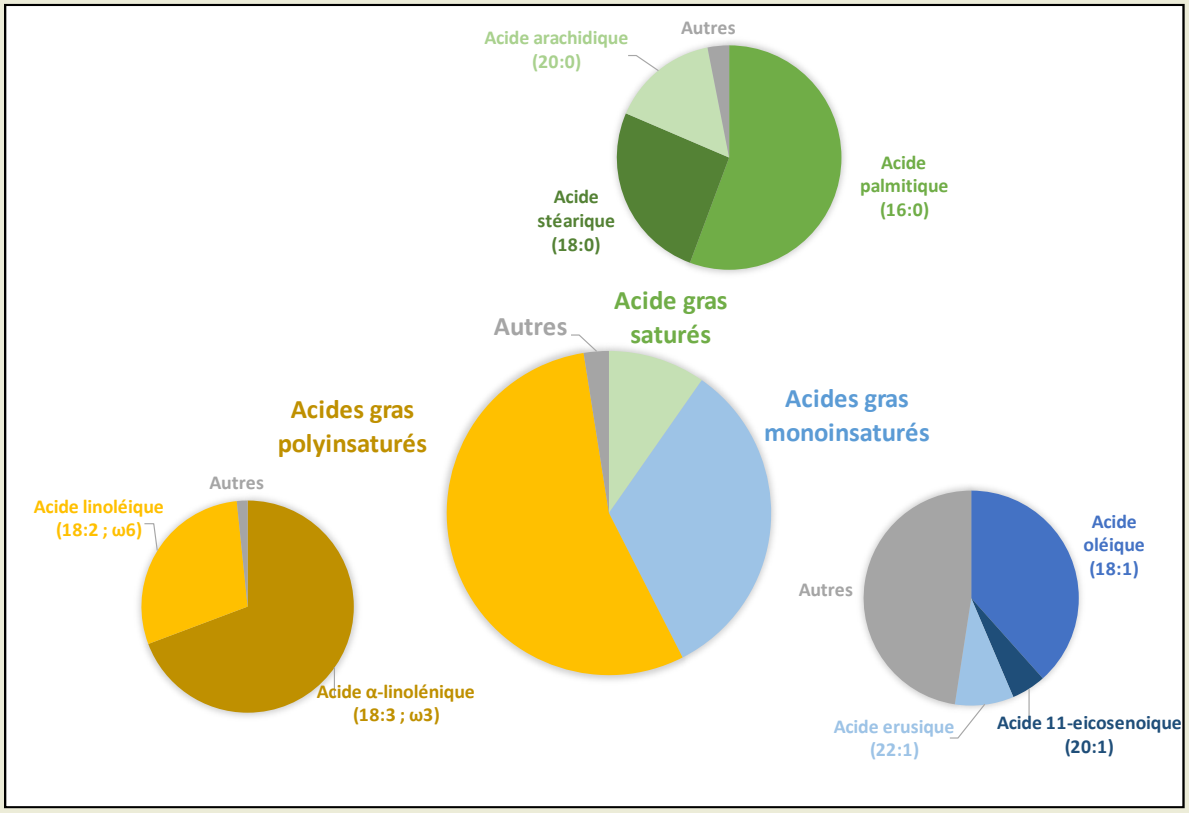


Figure 2 (Encadré 2) : Composition de l'huile de la caméline (d'après Dharavath et al. 2016)

Tableau 1 : Résumé comparatif des différentes caractéristiques de vie entre le colza et la caméline.

Caractéristiques	Colza	Caméline
Durée du cycle de vie	Long (9 mois)	Court (3 à 4 mois)
Besoin en nutriments	Importants besoins en N et S	Faibles besoins
Sensibilité générale (maladies, ravageurs, stress abiotiques)	Très sensible	Peu sensible
Performance agronomique	Haut rendement (35q/ha)	Bas rendement (15q/ha)
Qualité nutritionnelle	9% ω3	40% ω3
Pression de sélection	Très sélectionné	Peu sélectionnée

1.3.1. Effets du stress thermique chez le colza

Le colza est une culture particulièrement touchée par le stress thermique et ce, à tous les stades de la plante (Fig.5). Bien qu'il existe des variétés plus ou moins thermotolérantes, elles subissent toutes une baisse plus ou moins importante de leurs caractéristiques reproductrices et/ou nutritionnelles. Généralement la période du **stress thermique coïncide avec la période où les colzas sont en fleurs et/ou en période de remplissage des grains**. Par conséquent, ce sont surtout ces deux périodes de son cycle qui sont les plus impactées.

Concernant la floraison, de nombreuses études montrent que cette phase est fortement impactée par le stress thermique. En effet, ce dernier peut créer un déséquilibre hormonal, qui **affecte le développement des parties florales** (Kourani et al. 2022). De plus, le stress thermique durant la floraison peut causer une **réduction du poids de mille grains et une diminution du nombre de graines par silique** (Morrison and Stewart 2002). Un stress thermique pendant cette phase peut aussi conduire à une **augmentation du nombre de siliques avortées** (McGregor 1981; Brunel-Muguet et al. 2015). Lorsque les colzas sont cultivés sous des températures comprises entre 26 et 32°C, une augmentation des fleurs stériles est observée (Polowick and Sawhney 1988; Young et al. 2004; Kourani et al. 2022). A l'inverse, des températures plus élevées peuvent promouvoir la floraison. Cependant, la plante va produire plus de primordia florifères qu'elle n'est capable de supporter avec sa photosynthèse (Tayo and Morgan 1979; Angadi et al. 2000). Par conséquent, les premières fleurs se transformeront en siliques fertiles, tandis que les plus tardives ne pourront pas être en mesure de le faire.

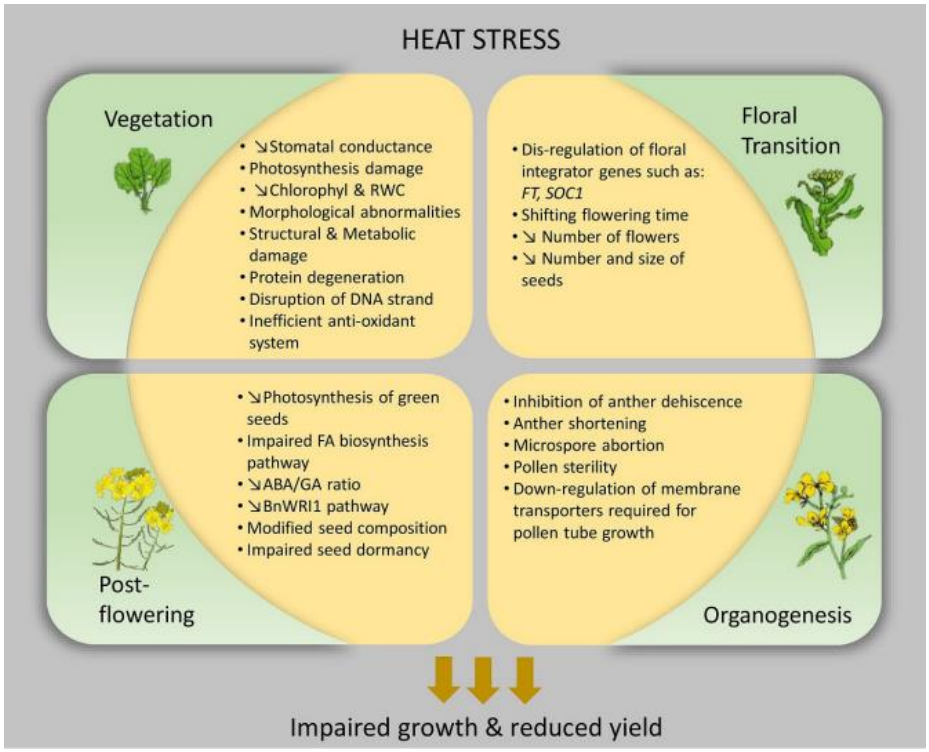


Figure 5 : Impacts physiologiques du stress thermique sur le colza (Kourani et al. 2022).

Le **rendement du colza** est **déterminé par le nombre de siliques**, le **nombre de graines par silique et le poids de mille grains**. Ainsi, certains auteurs ont montré qu'une température moyenne élevée pendant le développement végétatif était négativement corrélée avec le rendement en graines en raison d'une diminution du nombre de siliques (Morrison and Stewart 2002; Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). En outre pour Aksouh-Harradj et al. (2006), la baisse de rendement chez les variétés de colza les plus sensibles à un stress thermique court et intense n'est pas due à la baisse du nombre de siliques ou du nombre de grains par silique, mais surtout à une **diminution du poids des graines**. Cependant d'autres études ont permis de montrer que le nombre de grains, mais aussi le nombre de rameaux et de branches portant des siliques non avortées est significativement affectée par le stress thermique (Brunel-Muguet et al. 2015).

Il est aussi important de noter que **le stress thermique n'a pas le même impact en fonction de son intensité, de sa durée et de son occurrence au cours du cycle**. En effet une courte période d'extrême température à un stade sensible est plus critique pour le rendement de la culture et le développement de la plante qu'un stress thermique modéré sur une longue période (Angadi et al. 2000; Aksouh-Harradj et al. 2006). Ces observations soulignent l'importance des événements extrêmes - **de courte durée** - sur les cultures.

En plus d'avoir un impact sur le rendement et ses composantes, le stress thermique entraine aussi une **diminution de la qualité physiologique** (pouvoir germinatif, aptitude à la conservation, dormance) **et nutritionnelle** (teneur en acides gras, teneur en protéines) de la graine (Brunel-Muguet et al. 2015). Un des principaux effets du stress thermique sur la qualité physiologique du grain est relatif à l'aptitude à la conservation. En effet, une diminution du ratio (raffinose + stachyose)/ saccharose (due à des teneurs en saccharose plus élevées et en stachyose plus faibles) traduit une détérioration de la capacité de conservation des semences (Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021) du fait de la corrélation positive entre ce ratio et ce critère physiologique (Bailly et al. 2001). Des mesures de conductivité ont également montré qu'un stress thermique entraîne une augmentation des fuites d'électrolytes (Brunel-Muguet et al. 2015). Enfin, les **teneurs en acide abscissique (ABA) sont considérablement réduites** sous stress thermique (Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). Ainsi, les tendances observées sur ces trois critères (i.e. ratio des sucres solubles, conductivité et teneur en ABA) pourraient expliquer une **augmentation des germinations pré-récolte** (germination sur pieds) (Brunel-Muguet et al. 2015).

La **qualité nutritionnelle des graines** est, elle aussi, impactée par le stress thermique. En effet, cinq jours de fortes chaleurs **réduit la concentration en huile et augmente la concentration en protéines** des graines entrainant une diminution du ratio huile/protéines (Aksouh-Harradj et al. 2006; Brunel-

Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). En outre, en plus de baisser la quantité d'huile dans les graines, le stress thermique engendre aussi une **modification de la composition en huile de la graine** (Aksouh-Harradj et al. 2006; Baux et al. 2008, 2013; Schulte et al. 2013; Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021, 2022). En effet, les températures élevées pendant la maturation des graines **réduisent proportionnellement le pourcentage d'acides mono- et polyinsaturées tels que l'acide linoléique (ω6) et linolénique (ω3) et augmente celui des acides oléique (ω9)** en raison d'une réduction des activités désaturases (Rolletschek et al. 2007; Baux et al. 2008; Schulte et al. 2013). Ainsi, des températures plus élevées entraîneront des quantités plus faibles de lipides polyinsaturés et des quantités plus élevées de lipides monoinsaturés et saturés et par conséquent une **diminution de l'intérêt nutritionnel** de l'huile de colza. Les effets du stress thermiques sur les graines de colza sont regroupés dans le tableau 2.

1.3.2. Effets du stress thermique chez la caméline

Jusqu'à présent, beaucoup **moins d'études ont documenté les impacts du stress thermique chez la caméline**. Cependant, des preuves de sensibilité au stress thermique ont également été observées chez cette espèce et plus particulièrement sur les composantes du rendement où une **diminution du poids total des graines et du poids de mille grains** a été observée (Ahmad et al. 2021b, a; Waraich et al. 2021). Cependant, **concernant la qualité nutritionnelle**, les profils d'acides gras dans les graines de caméline et notamment la quantité d'acides oléique (ω9), linoléique (ω6) et linolénique (ω3) ne seraient que très légèrement modifiés en cas de stress thermique (Schulte et al. 2013). A l'inverse une autre étude observant l'implantation de la caméline sur des sites présentant des conditions météorologiques contrastés montre que le profil d'acides gras pourrait être altéré sur les sites présentant les températures les plus élevées (Obour et al. 2017). De plus, la variabilité qui peut être observée selon les différents études et les différentes localisations suggère que la **qualité grainière de la caméline pourrait être plus dépendante du milieu environnemental que du génotype** (Obour et al. 2017). Cependant, comme pour le colza ces effets contrastés pourraient dépendre des caractéristiques du stress thermique appliqué et notamment de l'intensité des températures appliquées, de la durée du stress et du stade lors de l'exposition au stress. En effet, le stade de floraison et de développement des fleurs seraient comme pour le colza, une stade particulièrement sensible pour le rendement et la qualité grainière de la caméline (Obour et al. 2017). Les effets du stress thermiques sur les graines de caméline sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résumé comparatif des effets du stress thermique sur les graines de colza et de caméline.

Effets du stress thermique	Colza	Caméline
Composantes du rendement	↘ rendement, nombre de graines, PMG	↘ rendement
Qualité physiologique	↘ de l'aptitude à la conservation des graines et de la dormance	*Non connu*
Qualité nutritionnelle	↘ quantité d'huile ↗quantité de protéines ↘ de la qualité du profil d'acides gras	Modification du profil d'acides gras

1.4. Quels sont les leviers d'adaptation aux températures élevées ?

1.4.1. Etat de l'art des leviers existants

Il existe à l'heure actuelle deux principaux leviers permettant de limiter l'impact du stress thermique chez les cultures. **Les leviers génétiques** font partie des solutions permettant de limiter l'impact du stress thermique chez les plantes cultivées (Kaur et al. 2009; Bergkamp et al. 2018; Kilasi et al. 2018). En effet, ces leviers de l'amélioration variétale, sont réalisés **soit par croisement entre espèces tolérantes au stress soit par identification de gènes permettant la résistance ou la tolérance des plantes aux fortes chaleurs**. Cependant, les leviers basés sur la génétique sont **considérablement critiqués en raison de l'érosion génétique** qu'ils occasionnent et qui a notamment réduit le pool de diversité génétique de certaines espèces où trouver des allèles de résistance au stress thermique (Esquinas-Alcázar 2005). De plus, la contre-sélection de caractères indésirables ou la perte simultanée de caractères de résistance à d'autres stress sont également des effets secondaires d'une sélection intensive (Bijlsma and Loeschcke 2012). **Les leviers agronomiques** sont aussi des leviers particulièrement sollicités pour limiter l'impact du stress thermique sur les plantes. Ces derniers correspondent à une **stratégie d'évitement de la période de stress par un décalage de la date des semis** et donc un évitement de la coïncidence entre le stress et les phases sensibles des cultures. Cependant, ce levier est souvent **dépendant du cycle de l'espèce cultivée** (Chen et al. 2005; Gao et al. 2021). En effet, par exemple, un semis précoce de colza d'hiver peut permettre d'éviter l'effet d'une vague de chaleur printanière sur la floraison ou sur les graines en cours de formation mais peut à l'inverse exposer le semis à des vagues de chaleurs tardives de fin d'été. La **création d'ombrage par**

l'implantation de haies autour de la parcelle ou la mise en place d'un système de type agroforesterie sont aussi des options de leviers agronomiques permettant de limiter l'impact du stress thermique. En effet, cet ombrage va permettre de **limiter l'évapotranspiration** tout en maintenant des températures plus fraîches en dessous de la canopée des arbres. Cependant, ces stratégies sont souvent **difficiles à mettre en place** (notamment pour des cultures sur de grandes surfaces) et très dépendantes des contextes pédoclimatiques. De plus, elles nécessitent des modifications parfois importantes des parcelles engendrant des coûts importants pour les agriculteurs sans pour autant avoir un effet positif garanti. Ainsi, au regard des limites de ces deux types de leviers, il est **nécessaire de trouver de nouvelles solutions innovantes pour faire face aux enjeux climatiques,** telles que des stratégies d'acclimatation comme le thermopriming ou des approches visant à améliorer la rhizosphère des espèces cultivées par le biais de l'utilisation de bactéries bénéfiques.

1.4.2. Le thermopriming : définition

Les stratégies d'acclimatation aux stress tels que la **sensibilisation préalable ou priming** (de prime, préparer) apparaissent comme une solution prometteuse pour maintenir le développement et les performances des plantes face aux changements climatiques (Liu et al. 2022; Villagómez-Aranda et al. 2022). **Le priming peut se définir comme un processus induisant un effet bénéfique grâce à un signal préalable permettant une réponse plus rapide, plus précoce, plus intense et/ou plus sensible à l'exposition d'un stress de même nature ou de nature différente du signal** (Fig.6).

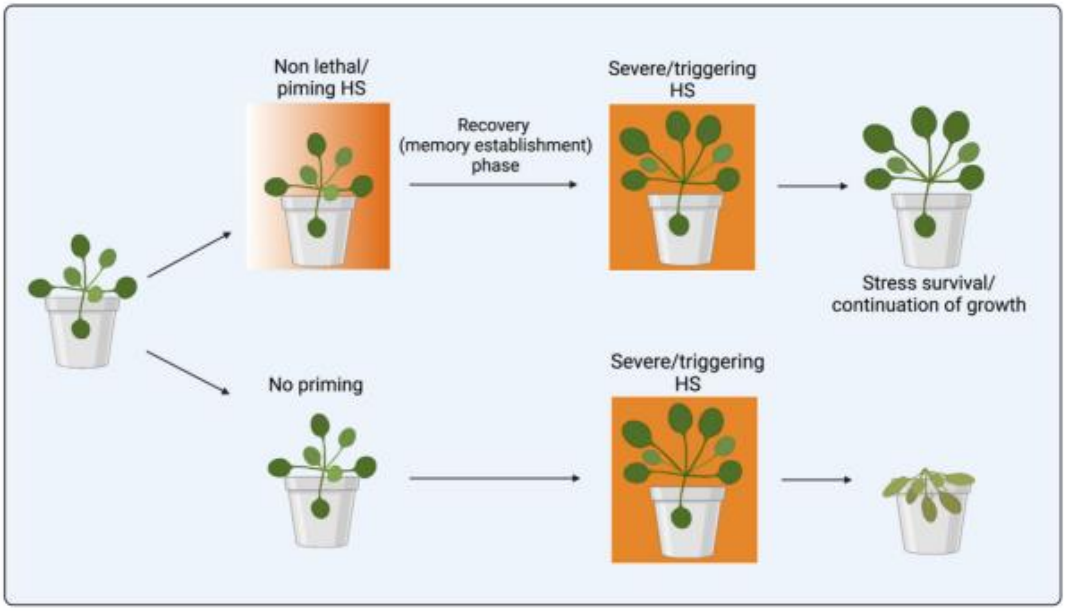


Figure 6 : Représentation d'un thermopriming induit par un signal préalable (priming). La pré-exposition des plantes à un stress thermique modéré ou transitoire augmente leur résilience à un autre stress thermique plus intense. D'après Balazadeh (2022).

Cette **sensibilisation présuppose une mémorisation des informations induites suite à la première exposition au stress**. La mémoire du stress se définit donc comme la capacité à stocker cette information et à la réutiliser lors des stress suivants, conduisant ainsi à des réponses différentes aux stress ultérieurs (Crisp et al. 2016; Hilker and Schmülling 2019; Serrano et al. 2019; Liu et al. 2022). Afin de générer la mémoire d'un stress, le stress sensibilisant (*priming stress*) et le stress suivant (*triggering stress*) sont séparés d'une phase de récupération (*recovery phase*) allant de quelques heures à quelques jours pendant laquelle se mettent en place les mécanismes de mémorisation Fig.7 ; Crisp et al. 2016; Serrano et al. 2019). **Il a aussi été démontré qu'un effet priming pouvait opérer sans phase de récupération avant le stress intense, par une augmentation graduelle de température** (Mareri and Cai 2022). Ainsi, dans ce cas il est difficile de parler de l'acquisition d'une mémoire du stress pendant une phase au cours de laquelle le signal stressant (modéré) perdure. Néanmoins, les premiers travaux illustrant ce phénomène de priming et de mémorisation du stress ont été décrits dans le cadre de stress biotiques tels que des attaques de ravageurs, des facteurs stressants répétés entre lesquels la plante n'a pas (toujours) eu le temps de récupérer (d'où une absence de phase de récupération *per se*) (Frost et al. 2008; Dowen et al. 2012; Pastor et al. 2013). Ce terme a ensuite été étendu dans le cadre de stress abiotiques - hydrique et thermique- récurrents (Bruce et al. 2007; Ding et al. 2012; Holeski et al. 2012; Bokszczanin and Fragkostefanakis 2013; Wang et al. 2017a; Serrano et al. 2019). Aussi, **les principaux critères pour définir un effet priming ne sont pas seulement liés à l'acquisition de la mémoire du stress** mais ils **sont aussi liés au déclenchement de mécanismes métaboliques favorisant l'accumulation des métabolites** impliqués dans l'homéostasie des plantes (par exemple le stachyose, le raffinose ou le thréonate) (Serrano et al. 2019) et permettant d'empêcher l'accumulation de protéines mal repliées ou d'espèces réactives de l'oxygène (Balazadeh 2022). Au niveau transcriptionnel, les preuves de la contribution des marques épigénétiques dans la régulation de l'expression des gènes sont aussi largement documentées dans un contexte de priming avec et sans mémoire de stress (Guerra et al. 2015; Han et al. 2022; Charng et al. 2023).

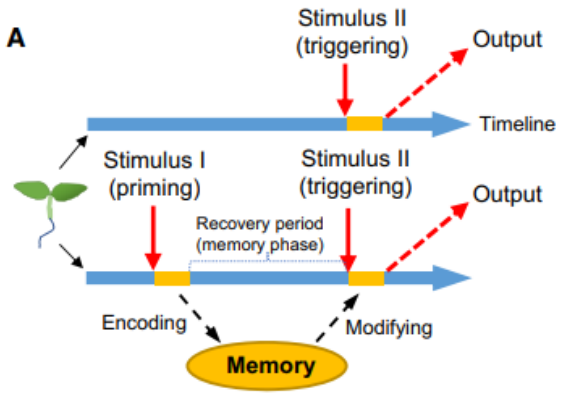


Figure 7 : Représentation d'un schéma d'acclimatation au stress abiotique via un priming présentant une phase de recouvrement pour présenter un effet mémoire. D'après Charng et al. (2023).

Le signal pouvant **induire une thermotolérance** (Liu et al. 2022; Shekhawat et al. 2022; Villagómez-Aranda et al. 2022) peut être obtenu par une **exposition préalable à un stress thermique modéré induisant un effet thermopriming**. Ainsi, des études ont montré que des stress thermiques répétés au cours du cycle des plantes chez certaines espèces, ont permis une **acclimatation** de ces plantes (Ding et al. 2012; Serrano et al. 2019), mais également une acclimatation des plantes des générations suivantes, soumises à des stress similaires. C'est ce qu'on appelle la mémoire inter- ou trans-générationnelle lorsque celle-ci s'observe au-delà de deux générations de plantes (Molinier et al. 2006; Groot et al. 2016; Wang et al. 2017a; Hatzig et al. 2018). En effet, cette mémoire trans-générationnelle est médiée en partie par des régulations épigénétiques dont la nature (méthylation de l'ADN…) détermine le degré de stabilité et d'héritabilité (Kumar and Wigge 2010; Iwasaki and Paszkowski 2014; Vriet et al. 2015; Lämke and Bäurle 2017).

Bien que le **signal sensibilisant** (priming) soit **souvent de même nature** que le stress ultérieur (trigerring stress) (Ding et al. 2012; Wang et al. 2017a; Serrano et al. 2019; Balazadeh 2022) certaines études ont montré que le signal **peut aussi être de nature différente** (Hirt 2012; Abd El-Daim et al. 2014; Savvides et al. 2016; Meena et al. 2017; Ahmad et al. 2021a) comme par exemple une inoculation avec des bactéries PGPR (Meena et al. 2017).

1.4.3. La thermo-résistance médiée par des bactéries PGPR

1.4.3.1. Généralités sur les PGPR

Une grande diversité de microorganismes sont présents dans le sol (Griffiths et al. 2001; Philippot et al. 2013). Parmi ces microorganismes du sol, certaines rhizobactéries libres telles que **les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) possèdent une large diversité d'activités biotiques et apportent des bénéfices pour les plantes** vivant dans les écosystèmes naturels et les agrosystèmes (Dini-Andreote and van Elsas 2013; Ahemad and Kibret 2014). Tout d'abord, ces bactéries vont agir indirectement, en entrant en compétition avec les microorganismes du sol dont certaines potentiellement pathogènes (Lugtenberg and Kamilova 2009; Ahemad and Kibret 2014). Ainsi, les PGPR vont ainsi prendre la place des pathogènes à proximité des racines et par conséquent limiter leur action négative sur les plantes. Cependant, la majeure partie de leurs actions bénéfiques est en lien direct avec la plante et à l'heure actuelle, **ces bactéries sont surtout utilisées pour améliorer la croissance des plantes en tant que biofertilisant** dans les grandes cultures (Vessey 2003; Ahemad and Kibret 2014; Kumar et al. 2022). En effet, l'augmentation de la disponibilité en nutriments présents dans le sol pour les plantes est un service réalisé par les PGPR particulièrement intéressant (Vessey 2003; Pérez-Montaño et al. 2014; Kumar et al. 2022). Par exemple, de nombreux nutriments tels que

le Phosphore (P) et le Fer (Fe) se trouvent sous des formes non-disponibles dans le sol (Richardson et al. 2009). Certaines bactéries PGPR, dites PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria), sont capables de solubiliser le phosphore et de le rendre disponible pour les plantes à l'aide de plusieurs mécanismes tels que la synthèse de molécules permettant de solubiliser ce dernier comme des enzymes (phytases, phosphatases) (Ahemad and Kibret 2014; Billah et al. 2019; Amy et al. 2022a, b). Certaines bactéries PGPR sont aussi connues pour augmenter la disponibilité en fer dans le sol par le biais de composés organiques tels que des chélateurs et des sidérophores permettant d'améliorer l'absorption de cet élément par les plantes (Kloepper et al. 1980; Nozoye et al. 2011). Ces bactéries sont aussi connues dans le cadre de la phytoremédiation et dépollution des sols en séquestrant les métaux lourds, permettant ainsi aux plantes de s'y développer (Santoyo et al. 2016). Enfin, d'autres activités réalisées par les PGPR existent et permettent une amélioration de la résistance des plantes face aux stress abiotiques (Meena et al. 2017; Goswami and Deka 2020).

1.4.3.2. Utilisation des PGPR face aux stress abiotiques

L'augmentation de la tolérance aux stress chez les plantes à l'aide de bactéries est de plus en plus étudiée et permettrait ainsi d'identifier de nouveaux moyens pour maintenir les productions agricoles (Hirt 2012). **Les bactéries PGPR sont à même de réaliser bon nombre de mécanismes bénéfiques, permettant la résistance des plantes face aux stress** et plus particulièrement face aux stress abiotiques (Grover et al. 2011; Ahemad and Kibret 2014; Meena et al. 2017; Lastochkina et al. 2019).

Parmi les mécanismes connus, ceux faisant intervenir la production de molécules permettant d'améliorer la résistance aux stress chez les plantes sont les plus décrits. Ainsi, divers mécanismes d'action ont été mis en évidence comme par exemple la modification des équilibres hormonaux de la plante, la dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la mise en œuvre de composés antioxydants, la réduction du taux d'éthylène par action de l' 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase, l'induction des HSP, la réalisation d'un ajustement osmotique, la modification du potentiel membranaire des cellules et la disponibilité des nutriments (Fig.8; Dimkpa et al. 2009; Grover et al. 2011; Meena et al. 2017; Goswami and Deka 2020).

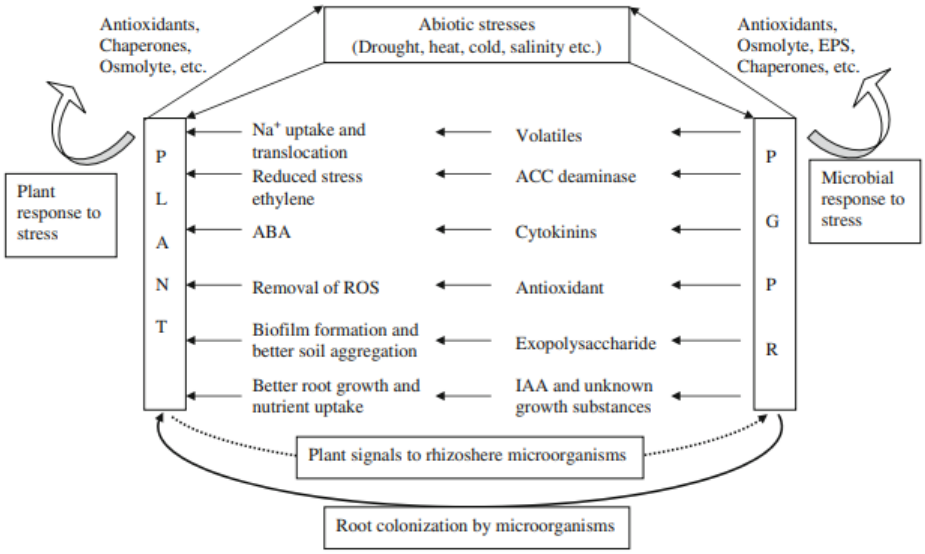


Figure 8 : Schéma représentant les interactions bénéfiques plantes-microorganismes en condition de stress abiotiques (Grover et al. 2011) .

La production de phytohormones fait partie de l'une des principales voies permettant de limiter l'impact des stress chez les plantes. En effet, de nombreuses hormones synthétisées par les PGPR peuvent être bénéfiques pour la plante. C'est notamment le cas **des auxines telles que l'acide indole 3-acétique (AIA), des gibbérellines (GAs) et des cytokinines**. Les bactéries synthétisant ces hormones sont souvent utilisées comme biofertilisant puisqu'elles permettent d'augmenter la croissance des plantes cultivées (Hayat et al. 2010; Grobelak et al. 2015; Kumar et al. 2022). En effet, ces phytohormones vont favoriser la division cellulaire, la germination, l'élongation et la croissance racinaire (Vessey 2003; Kumar et al. 2022). Cependant, en condition de stress, ces phytohormones comme l'AIA vont avoir un **effet direct sur la plante en améliorant sa croissance** et **notamment le développement racinaire**, qui peuvent être bénéfiques pour la résistance aux stress abiotiques. De plus, la production de l'AIA va permettre d'augmenter le développement des plantes et ainsi de décaler le stage phénologique de ces dernières engendrant un décalage de la période sensible aux stress (Dimkpa et al. 2009; Grover et al. 2011; Meena et al. 2017; Goswami and Deka 2020).

L'activité ACC déaminase est quant à elle l'une des activités les plus connues pour ces effets permettant de limiter l'impact du stress chez les plantes (Dimkpa et al. 2009; Lastochkina et al. 2019; Goswami and Deka 2020). En effet, **l'ACC est une molécule précurseur de l'éthylène**, produite par les plantes, qui va par son accumulation en cas de stress entrainer une forte production d'éthylène dans la plante, occasionnant en grande quantité des réponses négatives pour cette dernière. En effet, à faible dose, l'éthylène est une phytohormone impliquée dans divers mécanismes nécessaires au bon fonctionnement de la plante qui permet aussi d'initier une réponse bénéfique face aux stress (Fig.9 ; Glick 2014; Naing et al. 2021; Choi et al. 2022). Cependant, en cas de stress intense, les plantes vont

généralement fortement stimuler la production de cette phytohormone par le biais de la production d'ACC, engendrant un important pic d'éthylène, néfaste puisqu'occasionnant des dégâts importants tels que la sénescence de la plante, l'abscission des feuilles et des phénomènes de chlorose exacerbant l'effet négatif du stress en question (Glick 2014; Naing et al. 2021; Choi et al. 2022). Ainsi **l'ACC déaminase est une enzyme produite par les bactéries qui va jouer un effet puits pour l'ACC, dégrader cette molécule et permettre de diminuer la quantité d'éthylène produite par la plante** (Glick 2014; Lastochkina et al. 2019; Naing et al. 2021; Choi et al. 2022). Ainsi, la cascade d'évènements délétères est empêchée et son effet diminué grâce à une baisse de production d'éthylène.

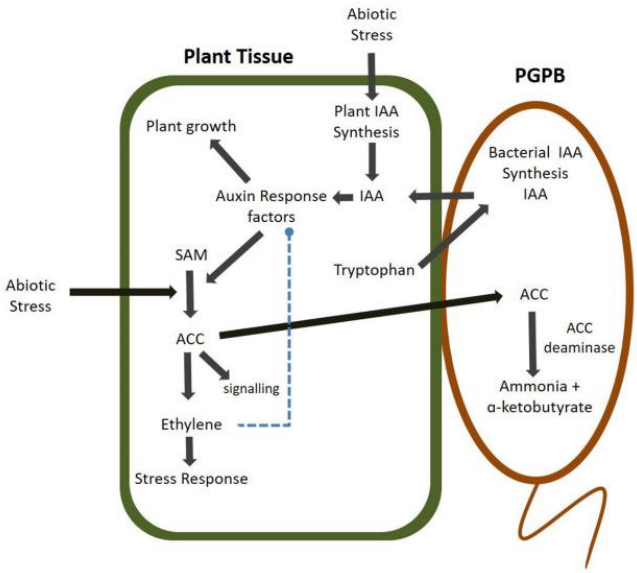


Figure 9 : Fonctionnement de l'activité ACC déaminase produite par les PGPR pour limiter la synthèse d'éthylène chez les plantes (d'après Naing et al. 2021)**.**

Enfin, **un dernier effet bénéfique de l'inoculation des PGPR est l'induction d'un effet sensibilisant**. En effet, des modifications transcriptionnelles se sont également révélées impliquées dans les réponses de thermotolérance des plantes avec le rôle spécifique des signaux bactériens dans le déclenchement des modifications épigénétiques sur le génome de la plante (Meena et al. 2017; Shekhawat et al. 2022). Cependant, **dans le cadre de notre étude les effets directs des bactéries via leurs activités et les effets indirects via cet aspect de sensibilisation permettant un priming ne peuvent pas être différenciés ainsi ils seront pris en compte conjointement.** Enfin, un autre effet indirect de l'action des PGPR pourrait être la modification de la communauté microbienne rhizosphérique en place par des phénomènes de compétition engendrant un changement de la communauté bénéfique pour la plante. En effet, les PGPR sont des bactéries particulièrement actives et peuvent stimuler la déposition de C dans le sol par les plantes permettant de stimuler leur développement et modifier la communauté microbienne au profit des bactéries hétérotrophes (Heulin et al. 1987; Oger et al. 2004; Blagodatskaya et al. 2010; Florio et al. 2017). Cependant, bien que

particulièrement prometteur, il est nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les processus d'interaction entre la plante et les bactéries tels que l'exsudation racinaire, un processus connu pour permettre le recrutement de microorganismes rhizosphériques bénéfiques par la plante.

1.5. L'exsudation racinaire comme moyen d'interaction entre les plantes et les microorganismes du sol

1.5.1. Caractéristiques de l'exsudation racinaire

Tous les végétaux supérieurs sont capables de libérer une grande variété de métabolites carbonés et azotés dans le sol et plus particulièrement dans la **rhizosphère, zone du sol sous l'influence des racines** (Nguyen 2003; Bais et al. 2006; Jones et al. 2009). L'ensemble de ces mécanismes regroupés sous le terme de rhizodéposition est généralement divisé en six principaux processus, tels que les desquamations des cellules bordantes et de la coiffe, la libération de mucilage insoluble, l'émission de composés volatiles, la mort et la lyse de la racine, la perte de C via les réseaux de champignons mycorhiziens et enfin **l'exsudation racinaire** (Fig.10 ; Nguyen 2003; Jones et al. 2009).

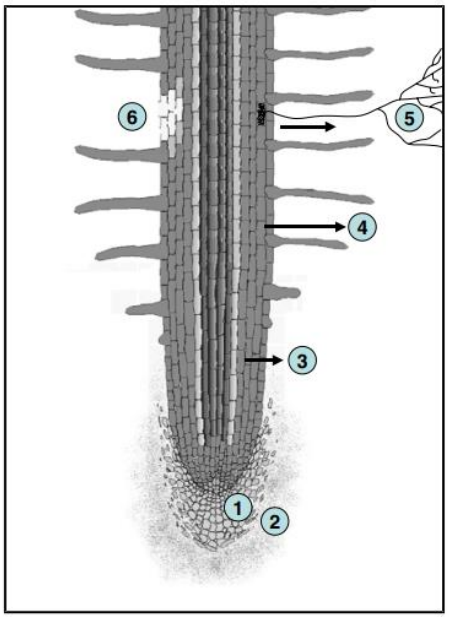


Figure 10 : Représentation schématique des six composantes majeures de la rhizodéposition : (1) les desquamations des cellules bordantes et de la coiffe, (2) la libération de mucilage insoluble, (3) l'exsudation racinaire de composés solubles, (4) l'émission de composés volatiles, (5) la perte de C via les réseaux de champignons mycorhiziens, (6) la mort et la lyse de la racine (Jones et al. 2009)

Définition de l'exsudation racinaire

L'exsudation racinaire se définit comme un mécanisme entrainant la libération active (par sécrétion) ou/et passive (par diffusion) de composés organiques solubles dans la rhizosphère (Nguyen 2003; Bais et al. 2006; Badri and Vivanco 2009; Huang et al. 2014). Les flux d'exsudation racinaire sont majoritairement modulés par l'activité photosynthétique des plantes. En effet, **entre 5 à 21% du C fixé par la photosynthèse peuvent être exsudés par les racines** (Nguyen 2003; Haichar et al. 2014). L'exsudation racinaire est donc rendue possible par la translocation et le transport des métabolites solubles des organes sources (tels que les feuilles) vers les organes puits (dont les racines) par le phloème (Dilkes et al. 2004). Le C fixé par la photosynthèse est ensuite en partie orienté vers les racines, vers trois compartiments : la respiration racinaire, la construction des racines (ou structure racinaire) **et l'exsudation racinaires** (Fig.11 ; Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). **L'exsudation racinaire nette est la résultante de deux flux opposés** de part et d'autre de la membrane racinaire. En effet, **un flux sortant (ou efflux)** correspond à la sortie des métabolites libérés par la racine selon un gradient de concentration du cytosol vers la rhizosphère mais aussi potentiellement **un flux entrant (ou influx)** a été également mis en évidence, qui correspond à la réabsorption active des métabolites par la racine (Jones and Darrah 1993a, b; Personeni et al. 2007). Dans la plupart des expérimentations, ces deux flux ne peuvent être distingués et c'est l'exsudation nette résultant de ces 2 flux qui est mesurée.

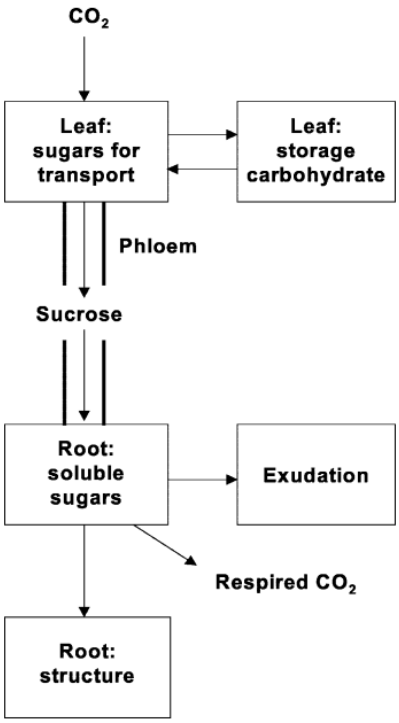


Figure 11 : Modèle simple de l'allocation du C provenant de la photosynthèse vers les racines. L'exsudation correspond à une perte de C soluble provenant du même pool (root soluble sugars) qui permet la croissance et la respiration racinaire (D'après Dilkes et al. 2004).

Les variations quantitatives et qualitatives de l'exsudation racinaires

Les exsudats racinaires présentent une grande diversité de composés et sont notamment **constitués de métabolites primaires** (sucres, acides aminés, acides organiques) ainsi que **de composés secondaires** (phytohormones, protéines) (Badri and Vivanco 2009; Huang et al. 2014; Escolà Casas and Matamoros 2021). Les exsudats sont quantitativement **majoritairement constitués de métabolites primaires** à faibles poids moléculaires **tels que des sucres** , **des acides aminés et des acides organiques** (Lohaus et al. 1994; Hütsch et al. 2002; Fischer et al. 2007; Oburger and Jones 2018). En effet, ces composés sont présents à des concentrations élevées dans le cytoplasme et la vacuole des cellules racinaires et sont facilement exsudés de manière passive par les plantes (Lohaus and Moellers 2000; Hütsch et al. 2002; Jones et al. 2009; Oburger and Jones 2018). Ainsi ce pool de métabolites libérés dans la rhizosphère par la plante va permettre de constituer une partie du C soluble circulant dans le sol (Dissolved Organic Carbon ; DOC), qui **constitue une source essentielle de C** disponible pour le métabolisme **des communautés microbiennes rhizosphérique** (Hütsch et al. 2002; Fischer et al. 2007, 2010). **L'exsudation racinaire peut varier quantitativement et qualitativement en fonction d'une grande diversité de facteurs** tels que l'espèce végétale (Dietz et al. 2019), le stade de développement de la plante (Tang et al. 2021a; Remus et al. 2022), l'architecture racinaire (Darwent et al. 2003; Proctor and He 2017), des facteurs environnementaux climatiques tels que la température (Pramanik et al. 2000; Yin et al. 2013a; Vives-Peris et al. 2017; Yaqoob et al. 2020) et la luminosité (Pomilio et al. 2000; Pramanik et al. 2000; Tharayil and Triebwasser 2010; Martin et al. 2018) et édaphiques tels que le pH (Meharg and Killham 1990) et la texture du sol (Boeuf-Trnemblay et al. 1995; Groleau-Renaud et al. 1998) mais aussi des facteurs biotiques comme la communauté microbienne du sol (Heulin et al. 1987; Huang et al. 2014). Chaparro et al. (2013) ont montré que la composition des exsudats varie au cours du cycle d'Arabidopsis, en parallèle des besoins métaboliques des micro-organismes de sa rhizosphère.

Principaux rôles de l'exsudation racinaire

La libération d'exsudats dans la rhizosphère peut entrainer des effets bénéfiques directs pour la plante. En effet, ce mécanisme peut notamment permettre de chélater des composés toxiques présents dans le sol pour éviter leurs effets négatifs sur le développement (Vives-Peris et al. 2020a). L'exsudation joue aussi un rôle dans les relations de compétition intra- et interspécifiques, notamment via l'émission de composés à caractère allélopathique impactant le développement des espèces environnantes (Bertin et al. 2003; Bais et al. 2006). Cependant, l'exsudation est surtout connue pour permettre aux plantes **d'améliorer l'acquisition des ressources** en augmentant la disponibilité des nutriments tels que le phosphore et le fer par le biais de certains composés tels que des acides organiques (malate, citrate) en acidifiant le milieu afin de décomplexer les formes insolubles (Hoffland

et al. 1992; Jones 1998). En plus de ces effets directs des exsudats, d'autres processus existent dans la rhizosphère via l'effet des exsudats sur les communautés microbiennes du sol, de manière indirecte.

1.5.2. Interactions plante/communautés microbiennes du sol

L'exsudation racinaire est à l'origine d'une multitude d'interactions allant de l'échelle de l'espèce à l'échelle de la communauté microbienne en passant par les interactions multitrophiques (Fig.12 ; Badri and Vivanco 2009; Huang et al. 2014). Ainsi l'exsudation **joue un rôle dans la sélection et l'activité des communautés microbiennes** ainsi que dans le **recrutement des microorganismes bénéfiques** pour la plante.

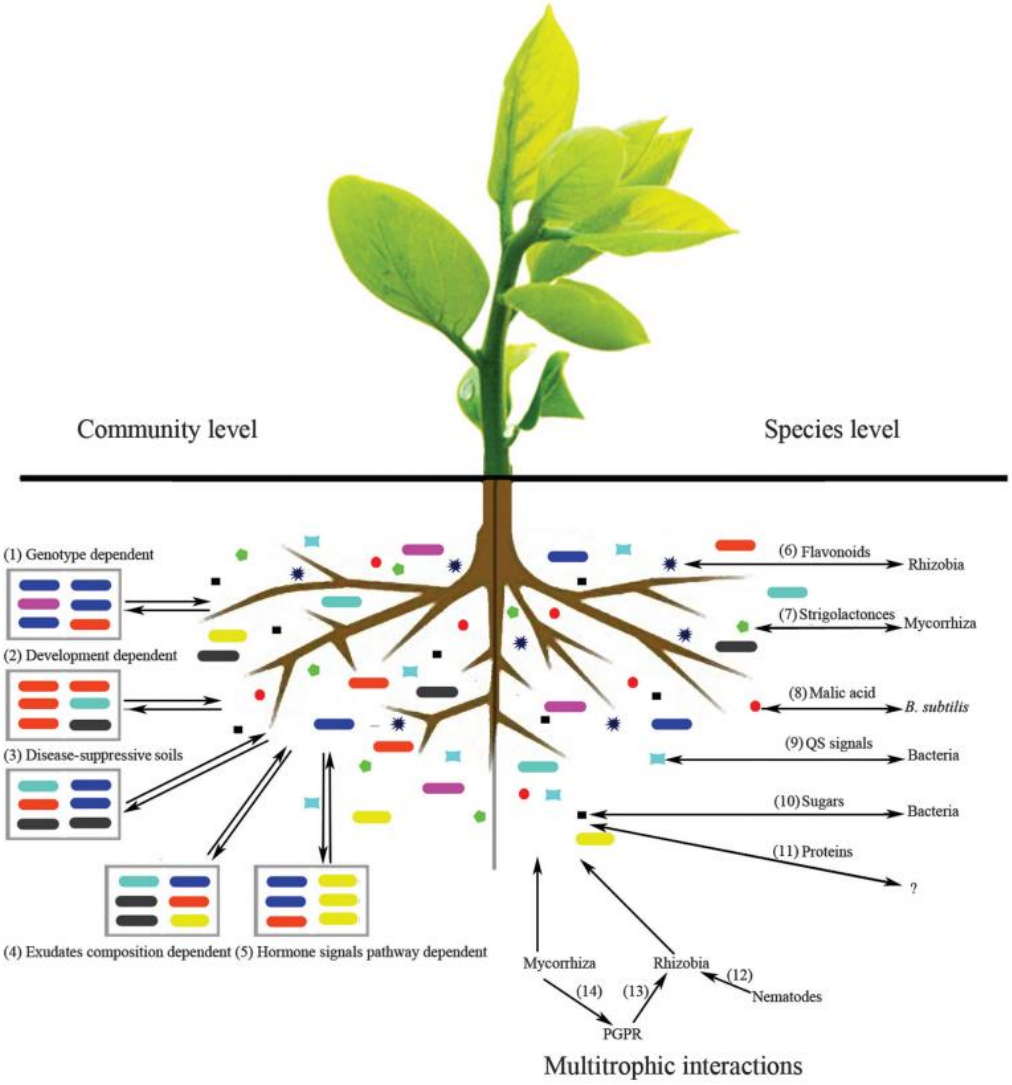


Figure 12 : Les exsudats racinaires sont à l'origine d'une multitude d'interactions rhizosphériques : à l'échelle de l'espèce (côté droit), des interactions multitrophiques (en bas) et à l'échelle de la communauté microbienne (côté gauche ; Huang et al. 2014).

Effet de l'exsudation racinaire sur les communautés microbiennes

A l'échelle de la communauté microbienne, il a été montré que **l'exsudation racinaire et la diversité des composés exsudés peuvent modifier la composition de la communauté microbienne** (Haichar et al. 2008; Steinauer et al. 2016; Eisenhauer et al. 2017; Guyonnet et al. 2018; Vescio et al. 2021). Par exemple, il a été démontré que la rhizosphère des brassicacées présente une plus faible abondance de champignons expliquée par une exsudation de composés soufrés antifongiques tels que les glucosinolates (spécifiques aux brassicacées) par la plante (Bressan et al. 2009; Sharma et al. 2023). Dans le cadre des interactions d'ordre trophique, l'exsudation racinaire permet de **favoriser les populations microbiennes hétérotrophes au détriment des autotrophes** par un apport en C facilement assimilable par ces organismes et nécessaire pour leur développement (Hartmann et al. 2009; Florio et al. 2017). L'exsudation racinaire peut ainsi intervenir dans la libération des minéraux en **stimulant l'activité des communautés microbiennes rhizosphériques**, conduisant à une accélération des cycles des éléments dans le sol (Nguyen 2003; Badri and Vivanco 2009; Jones et al. 2009; Haichar et al. 2014; Zhang et al. 2019). En effet, les sucres, les acides aminés et les acides organiques exsudés fournissent une source importante de C (et de N) aux microorganismes du sol (Fischer et al. 2007, 2010). Ces métabolites retrouvés dans la solution du sol (DOC) sont rapidement incorporés dans le métabolisme et la biomasse des communautés microbiennes principalement présents dans la rhizosphère (Hill et al. 2008; Fischer et al. 2010; Kuzyakov and Blagodatskaya 2015). Ainsi **ces composés vont stimuler la production d'enzymes microbiennes extracellulaires** et ainsi augmenter la décomposition de la matière organique du sol (Cheng and Coleman 1990; Asmar et al. 1994). En effet, par exemple, il a été mis en évidence que l'activité de **l'arylsulfatase**, une enzyme impliquée dans le cycle du soufre (S) (Vong et al. 2007) et la **N-acetyl-glucosaminidase** (NAG), impliquée dans le cycle du N (Meier et al. 2017) sont toutes deux stimulées par la déposition de C soluble dans le sol par la plante. De plus, il a été démontré qu'un gradient d'activité décroissant est observé depuis le rhizoplan vers la rhizosphère, avec une plus forte activité à proximité des racines, notamment de certaines enzymes impliquées dans le cycle du N (Leucine Aminopeptidase), du S (sulfatase) et du P (phosphatase) (Razavi et al. 2016; Ma et al. 2018; Zhang et al. 2019). **Certains composés dans les exsudats peuvent intervenir** sur la stimulation d'une activité enzymatique spécifique, tels que le glucose permettant de stimuler l'activité de deux enzymes microbiennes impliquées dans le cycle de P et du N (Leucine Aminopeptidase et phosphatase) et l'alanine stimulant les activités β-glucosidase, phosphatase et sulfatase (Zhang et al. 2019). Enfin, l'activité déshydrogénase traduisant l'activité générale des communautés microbiennes est aussi stimulée par les métabolites provenant des exsudats et plus particulièrement par la présence d'acides organiques tels que le malate, le lactate et l'acide quinique (Shi et al. 2011).

Effet de l'exsudation racinaire sur le recrutement de bactéries du sol

A l'échelle spécifique, les exsudats sont aussi des médiateurs de l'interaction avec les bactéries du sol. En effet, les plantes sont capables de **recruter des microorganismes pour déclencher des réponses microbiennes spécifiques ayant un impact positif** par rétroaction sur leur physiologie et leur développement. En effet, le recrutement des microorganismes du sol par les exsudats racinaires peut se faire par 2 principaux moyens (Bais et al. 2006; Huang et al. 2014). Le premier consistant à initier des relations trophiques où les bactéries utilisent les exsudats comme substrats permettant leur développement et le second permettant de développer des relations signalétiques où certaines molécules exsudées vont jouer un rôle dans l'attraction de certains microorganismes (Bais et al. 2006; Rudrappa et al. 2008; Huang et al. 2014). Ce dernier processus est surtout mis en évidence lors d'interactions spécifiques plantes-bactéries (Rudrappa et al. 2008; Ling et al. 2011; Vílchez et al. 2020; Vora et al. 2021). En effet, les **exsudats peuvent être considérés comme un signal permettant d'attirer certains microorganismes cibles** ayant des effets positifs pour la plante. Ce mécanisme appelée **chimiotactisme** consiste en des échanges d'informations permettant le recrutement des microorganismes de façon spécifique (Chagas et al. 2018). De nombreux **composés chimio-attractants** sont retrouvés dans les exsudats tels que **des acides organiques** (malate et citrate ; Rudrappa et al. 2008; Ling et al. 2011; Vora et al. 2021), **des sucres et sucres alcools** (glucose, fructose, *myo*-inositol ; (Somers et al. 2004; Vílchez et al. 2020) et **des composés secondaires** tels que des hormones (flavonoïdes, strigolactones ; Fig.12 ; Huang et al. 2014; Chagas et al. 2018). De plus, plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'importance de certains composés exsudés dans la mise en place et le contrôle du *quorum sensing* par les plantes. En effet, le *quorum sensing* est un stimulus, dépendant de la densité cellulaire bactérienne permettant une régulation et une synchronisation de processus bactériens (tels que leur métabolisme, leur propagation, leur virulence ; Chagas et al. 2018). Ainsi l'exsudation racinaire peut réguler ce mécanisme avec certains composés exsudés, mimant les signaux échangés entre les bactéries et permettant le développement de comportements bénéfiques pour la plante (Gao et al. 2003; Chagas et al. 2018). Par exemple, ces **signaux chimiques peuvent permettre de stimuler la production de biofilms** par les bactéries autour des racines, bénéfiques en conditions de stress hydrique ou face à certains pathogènes (Angus and Hirsch 2013; Zhang et al. 2014; Chagas et al. 2018).

Effet des bactéries sur l'exsudation racinaire

En retour, **les bactéries peuvent modifier l'exsudation racinaire des plantes**. En effet, cette rétroaction peut être directe par la consommation des composés exsudés qui vont déséquilibrer les flux d'exsudation et engendrer des modifications des relations sources/puits au niveau de la plante (Leyval and Berthelin 1993; Farrar et al. 2003; Matilla et al. 2010; Huang et al. 2014). La rétroaction

peut aussi être indirecte par le biais de communications hormonales avec la plante qui, en réponse, module son exsudation (Huang et al. 2014; Asari et al. 2017; Jalmi and Sinha 2022). Ainsi, **les relations exsudation-bactéries observées sont souvent une résultante de l'effet des plantes sur les bactéries et par rétroaction de l'effet des bactéries sur la plante.** D'un point de vue morphologique, il est connu que les bactéries présentent une plus forte activité sur certaines zones de la racine tels que les apex, connus pour présenter une exsudation plus importante (Darwent et al. 2003; Razavi et al. 2016). Ces résultats ont pu être confirmé grâce à des approches de microfluidique qui montrent que les bactéries vont préférentiellement se placer au niveau de la zone d'élongation des racines (Massalha et al. 2017). C'est pourquoi, il est intéressant de mettre en lien la morphologie racinaire avec l'exsudation notamment dans un contexte d'amélioration de notre compréhension des stratégies d'exsudation reliés aux autres traits de la plante.

1.5.3. Relations entre exsudation et traits racinaires

Effet de la morphologie racinaire sur l'exsudation racinaire

Le développement des racines, la respiration racinaire, le C retrouvé dans les exsudats constituent les trois principaux puits de C au niveau racinaire (Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). Certains auteurs ont pu montrer que l'exsudation racinaire était modulée par la morphologie racinaire. En effet, il a par exemple été démontré que **l'exsudation racinaire se situait surtout au niveau des zones de ramifications latérales et des apex et plus particulièrement au niveau de la zone d'élongation** (Darwent et al. 2003; Farrar et al. 2003; Yan et al. 2004). En effet, au niveau racinaire, le C nouvellement assimilé est préférentiellement transloqué aux apex (Pausch and Kuzyakov 2011). L'exsudation racinaire tend à augmenter en même temps que la longueur totale de racines et le taux de ramification des racines (Groleau-Renaud et al. 1998; Darwent et al. 2003; Yin et al. 2013b). De plus, il a été montré que les racines plus jeunes ou les racines fines et présentant des poils absorbants possèdent une exsudation plus importante que les racines plus âgée ou plus épaisses (Proctor and He 2017).

Relations entre traits racinaires et exsudation racinaire

Plus récemment, certains auteurs ont essayé d'expliquer l'exsudation racinaire par certains traits racinaires mesurés en conditions *in situ*. Cependant ces derniers ont observé que la variabilité des exsudats est majoritairement expliquée par des effets espèces et sites plus que par les traits et ont conclu que **l'exsudation ne pouvait être prédite par un trait en particulier** (Herz et al. 2018). Pourtant, certains auteurs ont observé que l'exsudation était plus importante chez les espèces présentant une stratégie d'utilisation des ressources de type acquisitive (Kaštovská et al. 2015). En effet, ces derniers ont pu observer que l'exsudation était négativement corrélée avec le contenu en matière sèche de

racine (Root Dry Matter Content ; RDMC), un trait qui lorsque sa valeur est élevé, est représentatif des espèces conservatives (Guyonnet et al. 2018). D'autres ont fait les mêmes observations, notamment chez des ligneux où l'exsudation était positivement corrélée avec le Root Nitrogen Content (RNC) et la respiration racinaire, deux traits aux valeurs particulièrement élevés chez les espèces exploitatives et inversement corrélée avec le Root Tissue Density (RTD), un trait à valeur plus élevée chez les espèces conservatives (Sun et al. 2021; Williams et al. 2022). Cependant, bien qu'une exsudation racinaire importante soit reliée aux espèces exploitatives, il a été souligné que **l'exsudation serait plutôt une stratégie d'acquisition des ressources complémentaire au développement de la prospection racinaire** (Sun et al. 2021). En effet, une coordination multidimensionnelle des traits racinaires dans laquelle l'exsudation représente un des axes perpendiculaires à celui représentant la morphologie racinaire a été proposé afin de conforter cette hypothèse de complémentarité de ces deux moyens d'acquisition des nutriments (Fig.13 ; Sun et al. 2021). Tout comme le taux d'exsudation, la **composition des exsudats est difficilement prédictible par les traits morphologiques racinaires** du fait des nombreux facteurs l'influençant. Cette composition est plus majoritairement caractérisée par l'écologie et la phylogénie des espèces que par leur morphologie racinaire (Williams et al. 2022; Rathore et al. 2023).

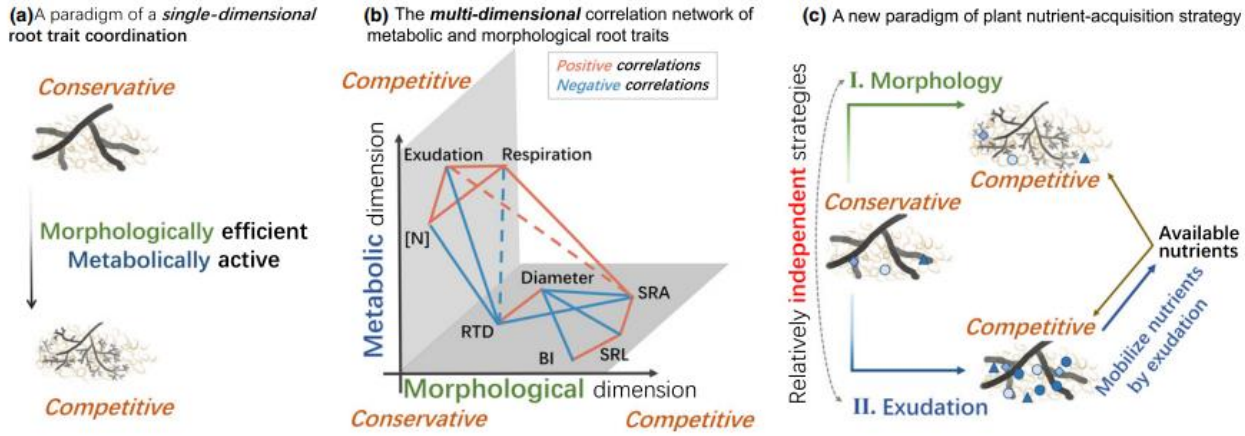


Figure 13 : (a) Gradient unidimensionnel des traits racinaires initialement supposé comme décrivant les corrélations entre l'exsudation racinaire et d'autres traits racinaires (b) Coordination multidimensionnelle des traits racinaires observée dans l'étude de Sun et al. (2021). Les deux axes perpendiculaires représentent une dimension métabolique et une dimension morphologique. Les lignes indiquent des corrélations significatives entre les traits reliés entre eux. (c) Nouveau schéma de la stratégie d'acquisition des éléments nutritifs des plantes. Selon les réseaux de corrélation en (b), l'augmentation de la disponibilité des nutriments par les exsudats racinaires est susceptible d'être une stratégie indépendante de la stratégie de recherche de nutriments du sol avec des traits morphologiques compétitifs (Sun et al. 2021).

L'exsudation racinaire est une des composantes des stratégies d'acquisition des ressources

Au final, **il est difficile de prédire l'exsudation uniquement par le biais des traits fonctionnels racinaires** étant donné la grande variabilité de facteurs impactant cette dernière. Les traits fonctionnels sont des variables indicatrices des stratégies d'investissement de l'énergie dans la plante et au niveau racinaire, et renseignent sur les compromis entre construction, développement du système racinaire et les autres fonctions racinaires. Ainsi, il semble plus intéressant de considérer l'exsudation comme un trait racinaire (Guyonnet et al. 2018; Sun et al. 2021), au même titre que les traits morphologiques et d'interpréter les compromis réalisés par la plante selon sa stratégie entre le développement du système racinaire et l'exsudation racinaire. Il faut également prendre en compte le C alloué aux symbioses telles que les associations avec les champignons mycorhiziens qui constitue un autre puits de C pour les plantes (Wen et al. 2019, 2022; Bergmann et al. 2020). Ces auteurs expliquent notamment les **différences d'allocation du C au niveau des racines par des compromis entre le C utilisé pour le développement du système racinaire, l'exsudation racinaire et les symbioses mycorhiziennes** (Fig.14). L'arbitrage entre ces trois compartiments met en évidence les stratégies d'acquisition des ressources propres à la plante (Wen et al. 2019, 2022). Il a longtemps été considéré que les traits racinaires traduisaient un gradient unidimensionnel (gradient de conservation) présentant les différentes stratégies de développement entre les espèces avec les espèces exploitatives ou acquisitives d'un côté (SRL et RNC élevé) et les espèces conservatives de l'autres (RTD, RDMC élevé). Cependant, il a été récemment proposé un nouveau gradient multidimensionnel prenant en compte le gradient de conservation en relation avec le gradient de collaboration avec des champignons mycorhiziens afin de mieux prendre en compte les différentes stratégies d'allocation du C au niveau des racines (Fig.14 ; Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). Ainsi, une SRL élevée serait inversement corrélée au pourcentage de mycorhization et pourrait traduire selon les auteurs une stratégie dite de « do it yourself » consistant à développer son système racinaire au lieu de réaliser des interactions avec des champignons mycorhiziens (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). Ce type de stratégie serait notamment celle des brassicacées tels que le colza et la caméline qui présentent un système racinaire très ramifié et constitué de racines fines. En effet, **les espèces de brassicacées** forment une famille particulière dans le règne végétal étant donné qu'elle **ne développement pas d'interactions avec les champignons mycorhiziens** (Cosme et al. 2018). Ainsi, le C alloué au niveau des racines pour l'acquisition des nutriments ne vise qu'à développer le système racinaire en développant notamment plus de racines fines et/ou en améliorant l'exsudation racinaire (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). **Ces espèces sont donc confrontées à la nécessité de réaliser un compromis entre C alloué au développement du système racinaire ou à l'exsudation**.

L'exsudation et la morphologie racinaire sont des paramètres clés susceptibles d'être fortement impactés par les facteurs abiotiques. C'est pourquoi regarder l'effet du stress thermique sur ces paramètres est nécessaire afin de mieux comprendre les stratégies mises en place par les plantes pour potentiellement faire face à ces stress. A l'inverse, il est aussi nécessaire d'appréhender des effets négatifs de ces stress, impactant l'exsudation et la morphologie racinaire et occasionnant des dommages plus importants pour la plante.

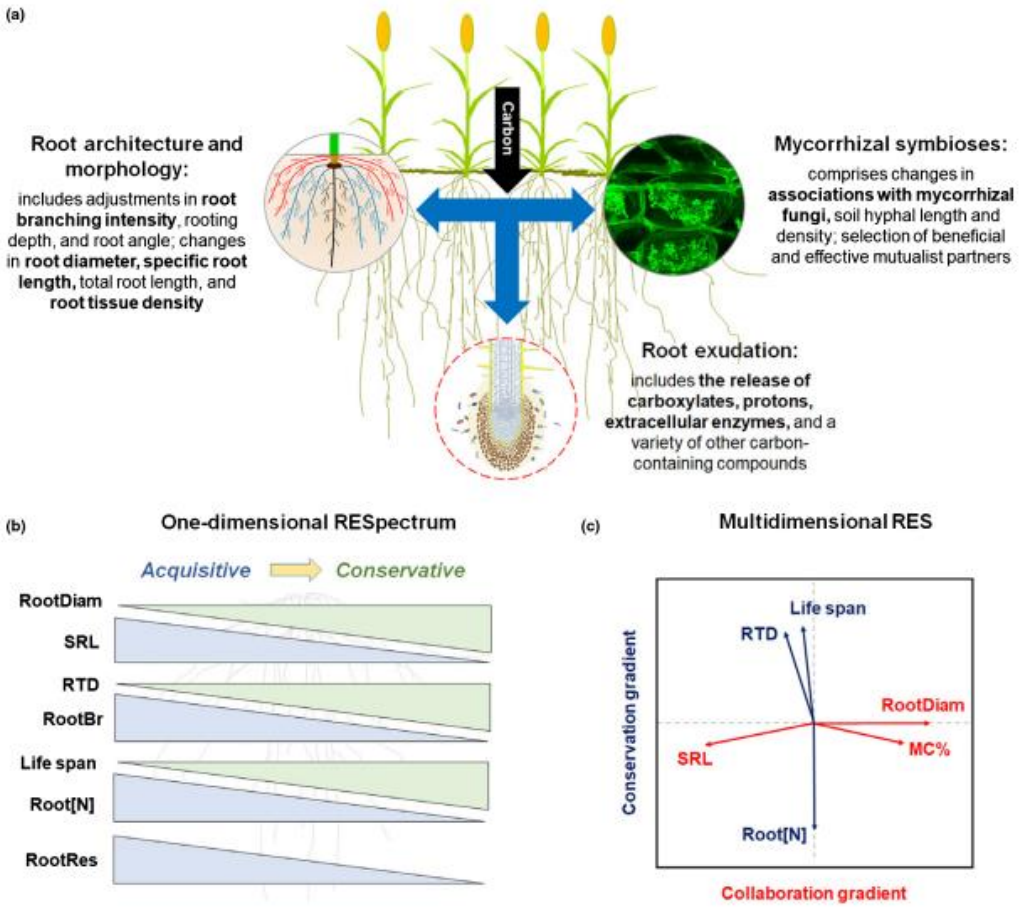


Figure 14 : L'exsudation racinaire en tant que chaînon manquant dans l'espace économique racinaire (Root Economic Space ; RES). (a) Regroupement des traits fonctionnels racinaires en trois grandes stratégies pour l'acquisition de ressources : l'architecture et la morphologie des racines, les symbioses mycorhiziennes et l'exsudation. (b) Root Economic Spectrum comme défini classiquement mettant en relation des covariations des traits racinaires pour des espèces allant des stratégies acquisitives aux stratégies conservatrices. (c) Les mêmes relations entre les traits, redessinées sur la base d'une analyse en composantes principales permettant d'observer un RES multidimensionnel avec un gradient de conservation et un gradient de collaboration (Wen et al., 2022).

1.5.4. Effet du stress thermique sur le système racinaire, l'exsudation et les communautés microbiennes du sol

1.5.4.1. Impacts du stress thermique sur le système racinaire

L'impact du stress thermique provenant d'une augmentation des températures de l'air est, dans la plupart des cas, étudié au niveau des parties aériennes et sur le rendement en particulier. Cependant **très peu d'études montrent l'impact du stress thermique sur la morphologie racinaire et encore moins sur l'exsudation racinaire**. En effet, les conséquences d'une augmentation de la température de l'air sur les racines sont élargies à la rhizosphère, rendant ainsi plus complexe la compréhension de leurs réponses à la chaleur. Ainsi, l'impact de la chaleur sur la morphologie racinaire, ainsi que leur fonctionnement (exsudation) et les interactions avec les communautés microbiennes du sol, ont reçu beaucoup moins d'attention jusqu'à présent (Vives-Peris et al. 2020b).

Les impacts du stress thermique sur les racines peuvent être **séparés en deux catégories** : (i) des **effets indirects résultant** de l'augmentation de la température de l'air qui va **affecter en premier lieu les parties aériennes de la plante** et qui entrainera des conséquences sur la structure et le fonctionnement du système racinaire et (ii) **des effets directs sur les racines liées à l'augmentation des températures du sol**. Parmi une large gamme d'espèces étudiées, les températures élevées (de l'air et/ou du sol) ont été démontrées comme impactant le développement racinaire (Heckathorn et al. 2013). Cependant, les modifications observées peuvent varier selon les espèces, la sensibilité aux températures de ces espèces, le stade de développement de la plante et de l'intensité du stress thermique (Kaspar and Bland 1992).

Effets indirects du stress thermique sur le système racinaire - via un effet du stress sur les parties aériennes

L'effet indirect d'un stress thermique sur les racines via une augmentation des températures de l'air est la conséquence de la **diminution des sources de photoassimilats** consécutive aux températures élevées sur les parties aériennes, qui constituent les organes photosynthétiquement actifs ou organes « sources » (Allakhverdiev et al. 2008). Ce stress indirect peut ainsi engendrer diverses modifications sur les organes « puits » tels que le système racinaire en termes de biomasses, de morphologie et de physiologie.

Des expérimentations au champ sur du blé (*Triticum aestivum* L) ont montré qu'une augmentation de la température de l'air engendre une diminution de la masse sèche de racines (Batts et al. 1998). Chez cette même espèce, en conditions contrôlées, des températures de l'air élevées ont engendré une **diminution de la biomasse racinaire**, **ainsi que du root/shoot ratio** (biomasse racinaire/ biomasse

des parties aériennes) et **une augmentation de la SRL** (Bakhshandeh et al. 2019). Chez les dicotylédones herbacées, les mêmes observations que chez les poacées peuvent être observées. En effet, chez la laitue (*Lactuca sativa*), des températures de l'air élevées engendrent une **diminution de la longueur et de la surface racinaire et une augmentation du diamètre racinaire moyen** (Qin et al. 2007). Ces résultats sont généralisables aux espèces de dicotylédones maraichères, telles que la tomate (*Solanum lycopersicum*), pour laquelle un stress thermique aérien a diminué la biomasse sèche racinaire (Giri et al. 2017). Chez *Brassica campestris*, il a été observé que de fortes températures de l'air occasionnaient une diminution de la biomasse, de la longueur, de la surface, du diamètre moyen et du volume racinaires, ainsi que du nombre d'apex (Yuan et al. 2016).

A l'inverse, malgré la baisse de fixation de C observée sous des températures de l'air élevées et la réduction de C disponible pour les organes sources, il a été observé une augmentation de la biomasse racinaire chez *Andropogon gerardii* dû à une **augmentation de l'allocation carbonée au détriment des parties aériennes** (Mainali 2007; Mainali et al. 2014)**.** En effet, à l'aide d'un marquage isotopique au $^{13}CO_2$, Mainali (2007) a observé une augmentation de l'allocation C et en ^{13}C dans les racines en condition de stress thermique. Ces résultats auraient pu s'expliquer par le fait qu'*Andropogon gerardii* est une poacée ayant une photosynthèse de type C4, donc plus adaptée aux températures élevées que les plantes de type C3 (Pompeiano et al. 2013). Cependant, ces résultats sont similaires à ceux de Giri et al. (2017) dans lesquels les auteurs observent une forte **augmentation de la proportion de C dans les racines de tomate**.

Effets directs du stress thermique sur le système racinaire : effet de l'augmentation de la température du sol

En addition aux effets du stress thermique sur les racines indirectement via les parties aériennes, des **effets directs sur les racines** ont été observés. Ces effets **résultent d'une augmentation de la température du sol** – milieu, pourtant en général plus tamponné que l'atmosphère.

D'anciennes études ont montré chez l'orge (Power et al., 1963), le maïs (Allmaras et al. 1964) et le blé (Kuroyanagi and Paulsen 1988), que les **racines sont plus sensibles à une augmentation des températures du sol que les parties aériennes** le sont à une augmentation des températures de l'air. Par exemple, les graminées de milieu tempéré maintiennent leur **taux de croissance maximum à des températures allant de 15 à 24°C pour les parties aériennes et de 10 à 18°C pour les racines** (Xu and Huang 2001). Les racines constituent donc un organe sensoriel très sensible à de faibles variations de températures. De plus, il a déjà été démontré chez le blé qu'une augmentation des températures du sol engendre une plus forte diminution du rendement en grains et une sénescence des parties aériennes plus rapide que lorsque les températures élevées sont appliquées seulement au niveau de

parties aériennes (Kuroyanagi and Paulsen 1988; Guedira and Paulsen 2002). Cependant, les effets du stress thermique dus à une augmentation des températures du sol sur la morphologie racinaire semble **en grande partie similaire au effet indirect** lors d'une augmentation des températures de l'air (Fig.15 ; Calleja-Cabrera et al. 2020)

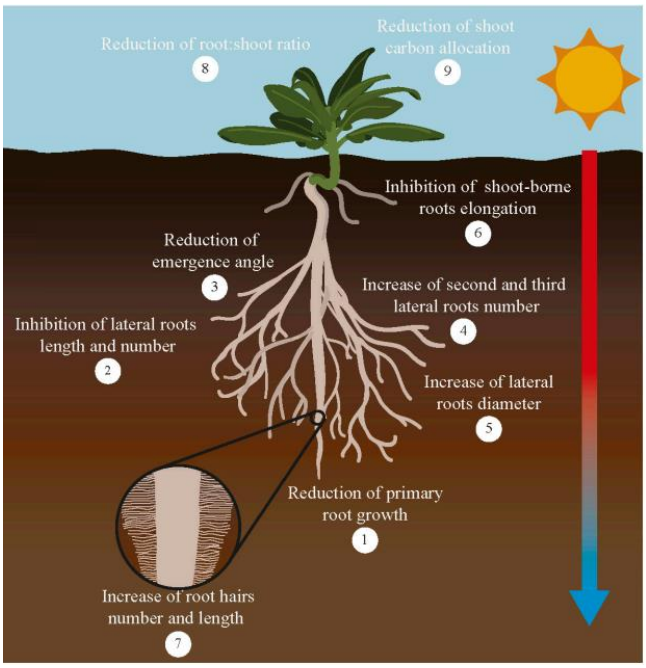


Figure 15 : Réponse des racines à l'augmentation des températures dans les cultures. (1) Réduction de la croissance des racines primaires. (2) Inhibition de la longueur et du nombre de racines latérales. (3) Réduction de l'angle d'émergence. (4) Augmentation du nombre de racines latérales secondaires et tertiaires et (5) du diamètre des racines latérales. (6) Inhibition de l'élongation des racines adventives. (7) Augmentation du nombre et de la longueur des poils absorbants. (8) Réduction du Root : shoot ratio et (9) de l'allocation de C dans les parties aériennes. (Calleja-Cabrera et al. 2020).

Effet du stress thermique sur les métabolites racinaires

La répartition du C dans les différents compartiments métaboliques peut être également impactée (Huang et al. 2012). Des variations de concentration en métabolites ont également été mises en évidence. En effet, chez le sétaire d'Italie (*Setaria italica* L.), **34 à 52% des métabolites primaires voient leurs concentrations modifiées** (Aidoo et al. 2016). Dans cette étude, les sucres, comme le galactose et le raffinose, semblent diminuer dans les racines sous stress thermique alors que le glucose et le maltose augmentent. Pour les acides organiques, le malate augmente chez les trois variétés de sétaire stressées alors que le succinate et l'itaconate diminuent et enfin, les acides aminés tels que la serine, la thréonine et la valine semblent augmenter alors que le glutamate diminue (Aidoo et al. 2016). A l'aide d'un marquage au ^{14}C, il a été observé par Du and Tachibana (1994) que lorsque le concombre (*Cucumis sativus* L.) est soumis à une élévation des températures, ce dernier va **préférentiellement allouer son C à la synthèse de sucres solubles** (fructose, glucose, saccharose, stachyose et raffinose),

au détriment des acides organiques (malate et fumarate) et des acides aminés. Des modifications métaboliques ont été observées chez deux espèces d'Agrostis (*A. stolonifera et A. scabra*) pour lesquelles le C alloué dans les protéines diminue significativement (Huang et al. 2012).

Au final, le stress thermique (direct ou indirect) peut altérer le système racinaire et intervenir au niveau morphologique mais aussi physiologique, de part une modification des concentrations de certains métabolites dans la racine, ce qui pourraient notamment impacter l'exsudation racinaire de la plante. De plus, l'intégrité membranaire ces cellules racinaires peut être endommagée par un stress thermique pouvant causer une fuite d'électrolytes et donc potentiellement impacter l'exsudation racinaire (Iglesias-Acosta et al. 2010).

1.5.4.2. Effets du stress thermique sur l'exsudation racinaire

Effet du stress thermique sur la quantité de C exsudé

L'exsudation racinaire est directement liée à la photosynthèse (Nguyen 2003). Or la photosynthèse est impactée par le stress thermique notamment à cause d'une diminution de la conductance stomatique et de l'acquisition de l'énergie lumineuse (Allakhverdiev et al. 2008). Cela aura pour conséquence d'entraîner une diminution du C fixé par la plante et ainsi modifier quantitativement et qualitativement l'exsudation. Cependant très peu d'étude présentent les effets d'un stress thermique sur l'exsudation racinaire (Tableau 3).

Chez les conifères, des travaux ont montré que **lorsque les températures sont plus élevées, la quantité de C exsudée exprimée par gramme de racines, ou par unité de longueur racinaire augmentait** (Yin et al. 2013a, b). Chez Andropogon gerardii, une herbacée prairiale d'Amérique du nord, des travaux ont mis en évidence à l'aide d'un marquage au ^{13}C une **augmentation du C déposé dans la rhizosphère** lorsque les températures sont plus élevées (Mainali et al. 2014). Enfin, plus récemment, une étude a observé une augmentation du C exsudé (plant-derived soil organic carbon) chez le blé sous stress thermique (Bakhshandeh et al. 2019).

Certaines études *in situ* prennent en compte le Dissolved Organic Carbon (DOC), une variable traduisant le C soluble circulant dans la rhizosphère et qui reflète la rhizodéposition des plantes. Ainsi le DOC pourrait être considéré comme un proxy de la quantité de C exsudée (Delarue et al. 2014; Bongiorno et al. 2019). Chez *Robinia pseudoacacia* un arbre de la famille des fabacées, la quantité de DOC est plus élevée à 30°C qu'à 26°C (Uselman et al. 2000). Ces observations sont similaires à celles de Toosi et al. (2014) qui observent une **corrélation positive entre l'augmentation des températures et du DOC dans les forêts de feuillus**. Des observation similaires ont été réalisées dans les prairies pour lesquelles une augmentation des températures engendre une augmentation significative du DOC des couches de sol entre 20 et 40 cm (Luo et al. 2009).

Tableau 3 : Synthèse des principaux travaux analysant les effets du stress thermique sur l'exsudation racinaire. En vert, sont représentés les travaux dans lesquels les exsudats ont été collectés à l'aide d'une solution piège. Les travaux expérimentaux ayant analysé les effets sur l'exsudation à l'aide d'un marquage ^{13}C et ceux ayant analysé l'effet du stress thermique sur le DOC comme proxy de l'exsudation sont représentés en jaune et en rouge respectivement.

Species	Plant stage	Heat features	Exudation and rhizodeposition methods	Impacts	References
Robinia pseudoacacia	Growth for 100 days	30/25°C day/night	Plants cultivated in sand. Exudates were collected for 24h in a nutritive solution without Fe and N.	↗ DOC (exuded carbon) with temperature	Uselman *et al.*, 2000
Picea asperata *Picea asperata* and *Abies faxoniana*	4 years old	Field exp. where air T°C and soil T°C are respectively 1.8°C and 3.6°C higher than their controls	Exudates collected with a modified culture-based cuvette system for root exudation collection in the field (Phillips et al., 2008)	↗ carbon amount exuded per root gram, root length and root area.	Yin *et al.*, 2013a Yin *et al.*, 2013b
2 citrus rootstocks (*Carrizo citrange* and *Citrus macrophylla)*	1 month	30°C or 40°C up to 10 days	Root exudates collected after 1, 3, or 10 days after heat stress, in deionized water	At 30°C: no significant effects and at 40°C: ↗ proline, t-cinnamic acid, jasmonic acid, salicylic acid and ↘ Abscisic acid	Vives-peris *et al.*, 2017
Sorghum bicolor	3 weeks	4h or 8h at 36°C or 40°C	Root are soaked 48h in ultrapure water	↗ phenolic and antioxidant exudation	Yaqoob *et al.*, 2020
Maize (*Zea Mays*)	3 weeks	32°C for 7 days	Soil-hydroponic hybrid approach. To collect root exudates, chamber was filled with 6 mL of the trap solution (0.5mM $CaCl_2$), and every 30 min the trap solution was collected for up to 4 h	Modifications of the composition of exudates	Tiziani *et al.*, 2022

Andropogon gerardii (C4 grass)	Lab study: 6 weeks Field study: vegetative growth stage	Lab study: **moderate** heating at 5°C upper than control (=35°C) and **severe** heating at 10°C upper than control (=40°C) for 5.5 days Field study: 10°C upper than control	Plants were labelled for 4hours with ^{13}C and soil with ^{15}N before heat stress	Lab study: ↗ percent of 13C in rhizospheric soil only with **severe** heat stress, no significant for moderate heat stress Field study: no difference with control	Mainali *et al.*, 2014
Wheat (*Triticum* aestivum)	Plant and soil samples collected at plant maturity	Heat stress: 30°C day/20°C night	Plants were continuously labelled all along the plant lifespan with naturally CO_2 depleted in ^{13}C for accurate separation of plant-derived C from original soil-derived C in soil organic carbon (SOC).	Heat stress cause an ↗ in the plant-derived C in SOC.	Bakhshandeh *et al.*, 2019
Experimental site is dominated by *Kobresia humilis, Festuca ovina, Elymus nutans, Poa pratensis, Carex scabrirostris, Scirpus distigmaticus, Gentiana straminea, Gentiana farreri, Leontopodium nanum, Blysmus sinocompressus, Potentilla nivea* and *Dasiphora fruticosa*	/	Temperatures differences between control and heated was 1.2°C at day and 1.7°C at night.	Soil solution samples were collected with a vacuum pump. Extracts were placed in amber bottles and stored at 4°C.	Between 20 and 40cm depth soil DOC ↗ with higher temperatures.	Luo *et al.*, 2009
Mixed oak-hickory	Forest not harvested for >50 years	Natural conditions: Soil temperature measured at different depth in field conditions	C concentration was extracted in soil solution (leachates) and analysed using a Shimadzu 5000 TOC analyzer (Kyoto, Japan)	Soil DOC and temperature are positively correlated (temperature ↗ = DOC ↗)	Toosi *et al.*, 2014

Effet du stress thermique sur la qualité des exsudats

En complément de la quantité de C déposée dans la rhizosphère, il a été démontré que la **qualité de l'exsudation racinaire est modifiée par un stress thermique**. En effet, Vives-Peris et al. (2017) ont observé chez des stades précoces de citronnier, une **augmentation de l'exsudation de proline** et de métabolites secondaires lors d'un stress thermique. Cependant, d'autres métabolites exsudés ont pu être modifiés chez cette espèce, comme **des phytohormones** tels que l'acide abscissique qui diminue avec des fortes températures alors que l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'acide cinnamique augmentent dans les exsudats de citronniers stressés (Vives-Peris, Gómez-Cadenas, and Pérez-Clemente, 2017). Des effets similaires ont été observés chez les herbacées, tels que le Sorgho (*Sorghum bicolor*), pour lequel une **augmentation de l'exsudation de composés phénoliques et d'antioxydants** tels que l'ascorbate, le glutathion, des carotènes et des tocophénols est observé (Yaqoob et al. 2020). Toutes ces molécules antioxydantes jouent un rôle important dans le contrôle et la régulation des ROS et sont nécessaires pour limiter le stress chez la plante (Yaqoob et al. 2020). A l'inverse, chez certaines espèces comme *Andropogon gerardii*, l'augmentation globale de C exsudé se traduit paradoxalement par une diminution de la quantité en protéines et en sucres exsudés donc potentiellement avec une exsudation augmentée d'autres métabolites tels que des métabolites secondaires (Mainali et al. 2014). Plus récemment, une étude sur le maïs a montré qu'un stress thermique cause une **modification du métabolome des exsudats racinaires** (Tiziani et al. 2022). En effet, 21 métabolites sont plus retrouvés dans les exsudats des plantes stressées alors que l'exsudation de 11 métabolites est quant à elle diminuée en condition de stress thermique (Tableau 4).

Tableau 4 : Variation des principaux métabolites retrouvés dans les exsudats de maïs en condition de stress thermique (d'après Tiziani et al. 2022).

	Heat and heat+combined stress
DOWN-EXUDED	**Ascorbic acid**
	Bisdemethoxycurcumin
	Apigenin 7-O-(6''-malonyl-apiosyl-glucoside)
	L-serine
	3-Methylcatechol
	3,5-Dihydroxybenzoic acid
	2-S-Glutathionyl caftaric acid
UP-EXUDED	**4-Vinylphenol**
	Luteolin 7-O-(2-apiosyl-6-malonyl)-glucoside
	malate
	2,4-Dihydroxybenzoic acid
	Benzoic acid
	6''-O-Malonylgenistin
	Pelargonidin 3-O-(6''-malonyl-glucoside)
	Quercetin 3-O-xylosyl-rutinoside
	Cyanidin 3-O-sambubiosyl 5-O-glucoside
	Petunidin 3-O-(6''-acetyl-galactoside)
	4-Ethylphenol
	3,4-Dihydroxyphenylglycol
	2,6-Dihydroxybenzoic acid

Au final, ces modifications (quantitative et qualitative) de l'exsudation causées par le stress thermique peuvent avoir un effet sur les interactions plantes/communautés microbiennes de la rhizosphère en place ainsi que sur certaines bactéries cibles.

1.5.4.3. Effets du stress thermique sur les communautés microbiennes du sol

Comme pour les racines, **des effets directs et indirects** du stress thermique sont observables chez les **communautés microbiennes rhizosphériques** (Classen et al. 2015).

Effets directs du stress thermique sur les communautés microbiennes

Très **peu d'études** se sont intéressées aux **effets directs du stress thermique** sur les microorganismes du sol. Ainsi, il a été démontré qu'une augmentation des températures à 50°C diminue significativement la plupart des activités microbiennes et l'abondance microbienne du sol (Riah-Anglet et al. 2015). Lorsque l'on se place dans des gammes de températures plus réalistes, il a été observé qu'un stress thermique court et intense a tendance à **augmenter le ratio bactéries/champignons** et le ratio bactéries Gram+/Gram- dans le sol (Yu et al. 2018). Cependant, la plupart des études sont souvent réalisées en présence de plantes, ne permettant pas de distinguer les effets directs, des effets indirects du stress thermique sur les microorganismes rhizosphériques. Ainsi, certains auteurs ont pu observer une **augmentation du C dans la biomasse microbienne (MBC)** dans la partie supérieure du sol (0-10cm) (Bardgett et al. 1998). Cette augmentation du développement des communautés microbiennes peut aussi se traduire par une **augmentation de la décomposition de la matière organique du sol (SOM)** résultant d'une augmentation de l'efflux de CO_2 traduisant un **accroissement de la respiration microbienne** (Kuzyakov et al. 2007). Ces observations pourraient liées à l'hypothèse d'une augmentation de la rhizodéposition des plantes stimulant ainsi le développement des communautés microbiennes.

Effets indirects du stress thermique sur les communautés microbiennes via la modulation de l'exsudation racinaire

La réponse de la plante face au stress thermique engendrant une modulation de son développement et de son exsudation va, par conséquent, modifier l'activité et la composition des communautés microbiennes du sol (Classen et al. 2015). En effet, il a été observé par Yin et al. (2013a) que **l'augmentation de l'exsudation de C** de certains conifères due à une augmentation des températures de l'air cause une **augmentation de la minéralisation, de la nitrification et de la dénitrification,** permettant ainsi de stimuler le cycle du N et la biodisponibilité des nutriments dans les sols faiblement fertiles (Yin et al. 2013a). Au final, cette augmentation de l'activité des microorganismes pourrait être un atout pour la plante, notamment en facilitant la biodisponibilité de certains nutriments essentiels au développement de cette dernière. Chez le blé, l'augmentation de

l'exsudation C avec l'augmentation des températures entraine une augmentation de l'acquisition du C dérivé des plantes par les microorganismes au détriment du C dérivé du sol (Bakhshandeh et al. 2019). Les **champignons du sol font partie des microorganismes** qui vont profiter de cette augmentation de C exsudée **et augmentent leur développement en condition de température élevée** (Heinemeyer et al. 2006; Hawkes et al. 2008).

Parallèlement, un changement de composition des exsudats en conditions stressantes pourrait **modifier l'attraction des microorganismes** potentiellement bénéfiques dans la rhizosphère (Vescio et al. 2021). En effet, des exsudats recueillis chez le citronnier subissant de fortes températures ont permis de **stimuler la croissance** de deux rhizobactéries en comparaison des exsudats recueillis chez des plantes non stressées (Vives-Peris et al. 2018). Ainsi, les proportions de certains composés primaires et secondaires exsudés par les plantes en condition de stress pourraient être modulées permettant d'**améliorer le recrutement de microorganismes potentiellement bénéfiques** (Vives-Peris et al. 2018). Vescio et al. (2021) confirme cette hypothèse en observant une augmentation de l'abondance de certains taxons correspondant à des bactéries bénéfiques dans la rhizosphère du maïs en condition de stress thermique.

Lien entre disponibilité en C soluble dans la rhizosphère et activités des communautés microbiennes sous stress thermique

Cette augmentation de l'activité des communautés microbiennes sous stress thermique peut permettre **d'augmenter la minéralisation de l'azote et la décomposition de la matière organique du sol** (Melillo et al. 2002). Or, dans plusieurs études, il a été observé que ces augmentations de l'activité sont généralement de courte durée et s'amenuisent au long terme (Melillo et al. 2002; Bradford et al. 2008). En effet, Walker et al. (2018) ont pu conclure que l'augmentation des températures cause une **augmentation de la biomasse microbienne et de la respiration des microorganismes**. Cependant la **quantité de C disponible constitue une limite pour leur développement**. En effet, si le C disponible dans la rhizosphère pour les bactéries est insuffisant, la MBC va par conséquent diminuer tout comme la respiration microbienne (Walker et al. 2018). Une autre étude montrant les relations entre C disponible et développement des communautés microbiennes sous températures élevée observe **une diminution du DOC et une augmentation de la MBC sous fortes températures** (Tang et al. 2021b). Le SOC (soil organic content) et le TN (Total Nitrogen) diminuent aussi dans ce cas. La diminution de ces deux paramètres découlent des modifications de DOC et MBC. En effet la diminution de la minéralisation azotée et de la décomposition du C avec l'augmentation des températures est due à une diminution du C labile (DOC) disponible pour les microorganismes étant donné qu'il est rapidement consommé par ces derniers (Tang et al. 2021b). Cependant, les résultats observés dans Hagedorn et al., (2010) s'opposent avec ceux de Tang et al., (2021b). En effet, Hagedorn et al., (2010)

voit une augmentation de la respiration du sol avec l'augmentation des températures, sans modifications du DOC. L'absence de variations significatives du DOC pourrait résulter d'un équilibre entre sa production et sa dégradation (Hagedorn et al. 2010). Ainsi, bien que les microorganismes aient une activité plus importante, ces derniers ne seraient pas limités par le C disponible, étant regénéré plus rapidement sous forte température. De plus, les expérimentations de Hagedorn et al., (2010) se situent sur sol forestier, des sols généralement riches en C contrairement au sol de Tang et al., (2021b) qui a étudié, des sols de grandes cultures après récolte donc davantage limités en C disponible pour les microorganismes.

1.5.4.4. Conclusion et perspectives des effets du stress thermique sur la rhizosphère

Les modifications morphologiques et physiologiques observées sur le système racinaire en situations de stress thermiques semblent être la conséquence d'une **modification de la fixation du C** par les parties aériennes ainsi que de modifications de l'allocation du C vers les parties racinaires (Heckathorn et al. 2013). Ces **changements de l'allocation du C** vont se répercuter sur le profil métabolique des racines conduisant à une modification quantitative et/ou qualitatives de l'exsudation racinaire. Ces impacts du stress thermique sur l'exsudation peuvent induire des changements dans la composition et l'activité des communautés microbiennes ainsi que des effets plus ciblés sur certains microorganismes.

Ainsi, il semble nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les effets du stress thermique sur la rhizosphère. En effet, le changement climatique pousse à requestionner les leviers d'acclimatation jusqu'alors centrés sur l'amélioration variétale et les techniques agronomiques alors que d'autres stratégies pourraient être mises en place, telles que l'acquisition d'une thermotolérance, mais aussi l'amélioration de la rhizosphère par le biais de PGPR ou par la stimulation des activités microbiennes du sol. C'est pourquoi, **il faut également considérer le système racinaire, son fonctionnement et les interactions possibles avec la rhizosphère, comme des stratégies innovantes dans le maintien du développement et de la productivité des plantes en contexte de stress thermique.** Une croissance racinaire plus rapide, mais aussi une exsudation plus forte et/ou plus ciblée pourrait permettre d'augmenter la biodisponibilité de certains nutriments et le recrutement des microorganismes bénéfiques, telles que des bactéries PGPR.

Chapitre 2 : Plan de recherche

2.1. Problématique et objectifs

2.1.1. Problématique et objectifs de la thèse

Le stress thermique issu du changement climatique cause différents impacts négatifs sur les plantes de grandes cultures, dont les oléagineux comme le colza et la caméline. En effet, ces impacts sur la plante - des parties reproductives aux racines - entrainent une altération de la plupart des mécanismes physiologiques (photosynthèse, exsudation…) résultant en une diminution du rendement et de la qualité grainière. C'est pourquoi il est nécessaire de proposer de **nouveaux leviers pour faire face au stress thermique se basant notamment sur des stratégies d'acclimatation**. Ainsi la problématique de la thèse se base sur l'analyse des effets de deux stratégies potentielles d'acclimatation, i.e. un **thermopriming** et l'**utilisation de PGPR**, afin de limiter les impacts de stress thermique intense sur le rendement et la qualité grainière chez le colza et la caméline. L'analyse de ces deux stratégies vise à **(i)** caractériser les effets du stress thermique et du thermopriming sur la **morphologie et l'exsudation racinaire** ainsi que sur la mise en place de stratégies racinaires par nos deux espèces d'intérêt pour y faire face, **(ii)** évaluer l'impact de l'inoculation de PGPR sur l'exsudation racinaire en interaction avec le stress thermique ainsi que **(iii)** les conséquences du stress thermique et de cette inoculation (en combinaison ou non) sur **l'allocation en C dans la plante**, les **traits racinaires** et l'activité et la composition des **communautés microbiennes du sol**, et in fine **(iv)** évaluer si ces deux types de stratégies peuvent limiter l'impact du stress thermique sur le **rendement et la qualité grainière** du colza et de la caméline (Fig.16).

Ainsi la problématique de cette thèse est : « Analyser l'effet de **deux stratégies d'acclimatation** à des **stress thermiques** reposant sur un **thermopriming** ou de l'utilisation de **PGPR** chez le **colza** et la **caméline** ». Pour répondre à la problématique, cette thèse sera déclinée en quatre objectifs :

- Etudier les effets d'un **stress thermique** et d'un **thermopriming** sur la **morphologie et l'exsudation racinaire** du **colza** et la **caméline** (Chapitre 3).
- Appréhender les effets de **l'inoculation de PGPR** sur les **traits morphologiques et l'exsudation racinaire** chez le **colza** et la **caméline** en interaction avec le **stress thermique** (Chapitre 4).
- Evaluer les effets du **stress thermique** et/ou de l'inoculation avec des **PGPR** sur **l'allocation de C dans le système sol-plante**, les **traits racinaires** et les **communautés microbiennes du sol** chez le colza et la caméline (Chapitre 5).
- Analyser et comparer l'effet de ces **deux stratégies d'acclimatation** pour limiter l'impact du **stress thermique** sur le **rendement et la qualité grainière** du **colza** et la **caméline** (Chapitre 6).

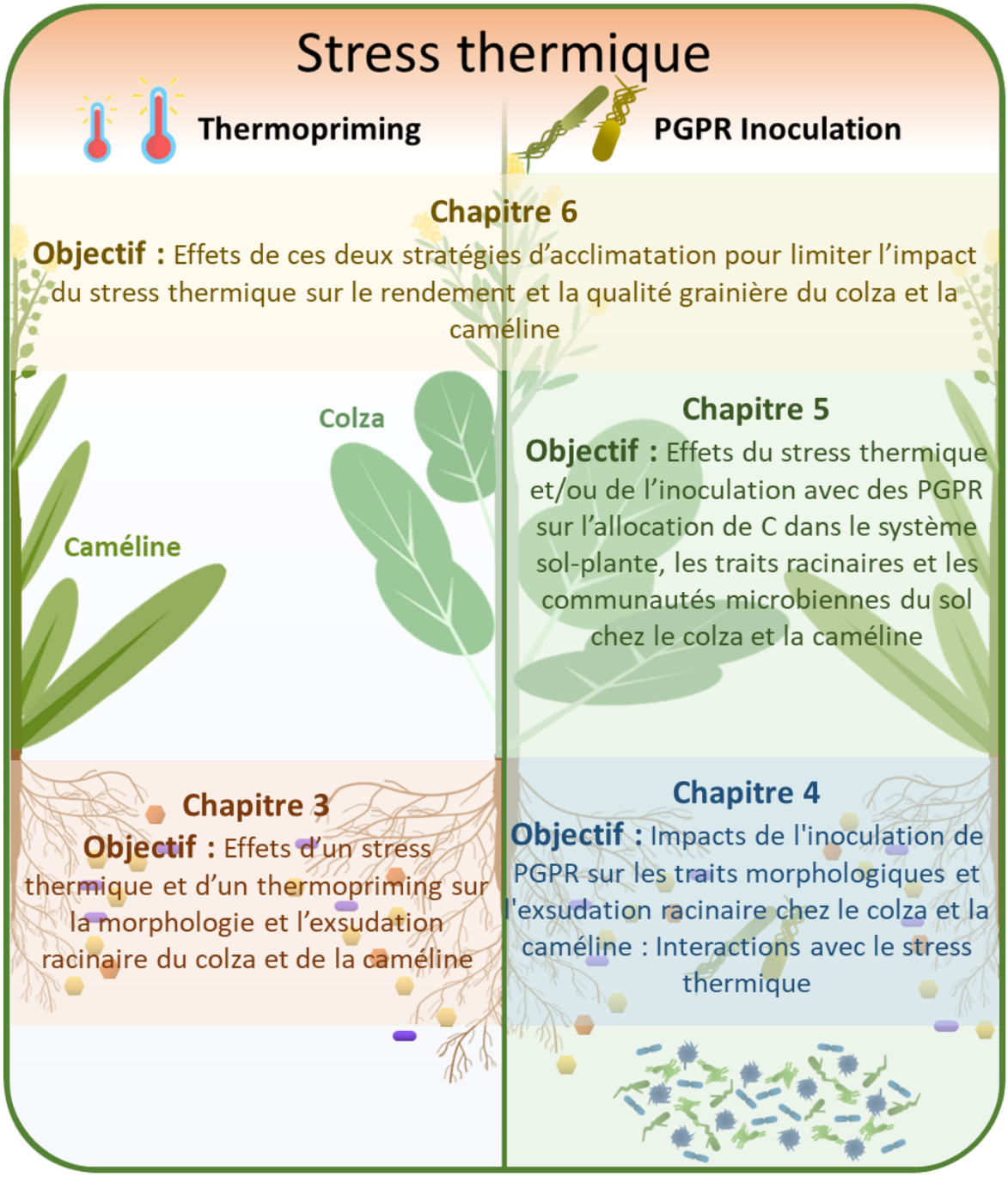


Figure 16 : Présentation des quatre principaux objectifs (présentés par chapitre) de la thèse (espèces et compartiments de la plante étudiés).

2.1.2. Chronologie des expérimentations et objectifs associés

L'expérimentation de **thermopriming** a été réalisée lors de la **première année** alors que l'expérimentation visant à observer l'effet des **PGPR** a été réalisé lors de la **deuxième année** de la thèse (Fig.17).

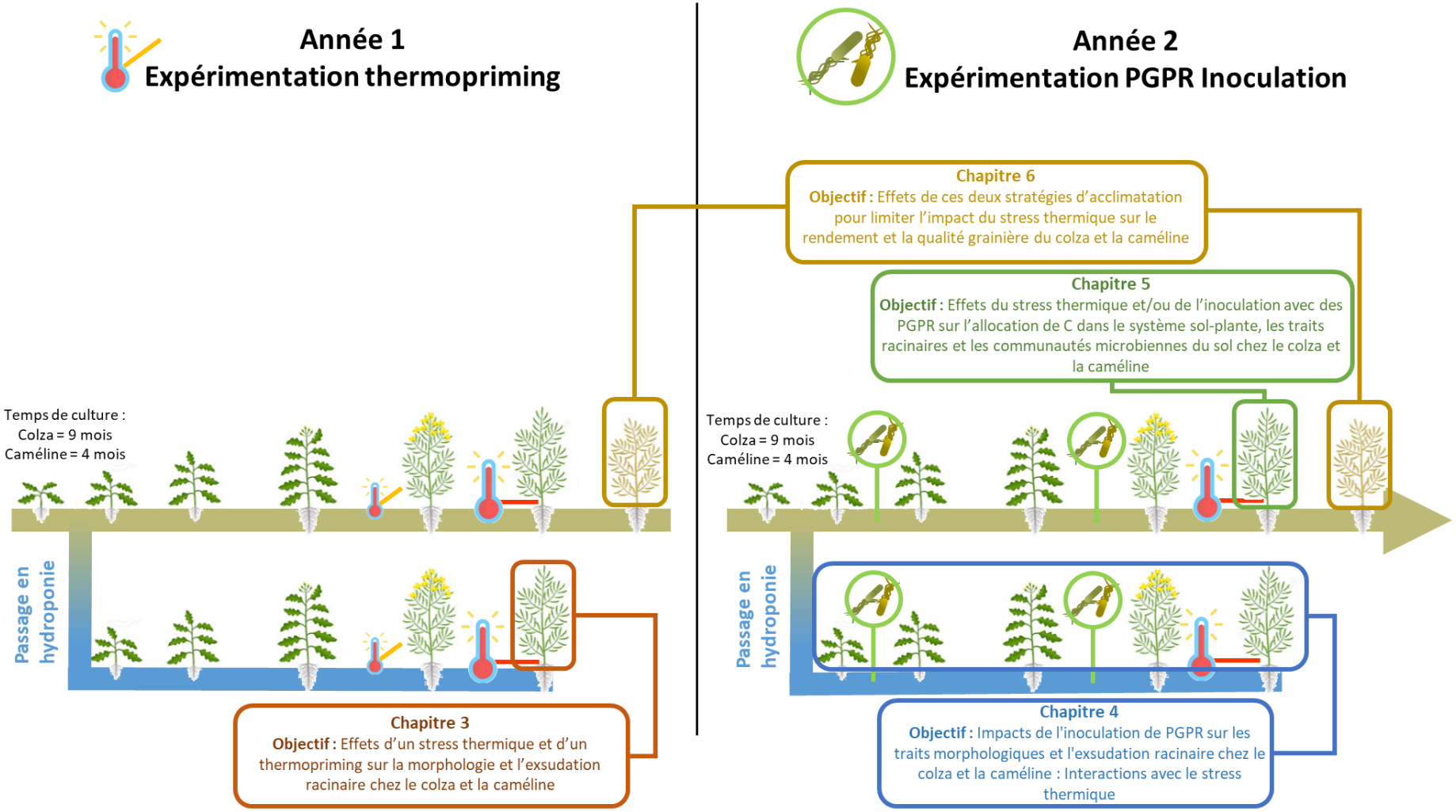


Figure 17 : Chronologie des expérimentations et des objectifs associés.

2.2. Matériel et Méthodes

2.2.1. Conditions de culture et dispositifs expérimentaux

2.2.1.1. Conditions de culture des expérimentations

Les conditions de cultures pour chacune des expérimentations sont détaillées dans les chapitres correspondants. Brièvement, pour les deux expérimentations, des graines de **colza (*cv*. Aviso)** ont été semées en octobre, sur vermiculite la première année et sur perlite, la seconde. Pour les colzas de l'expérimentation de thermopriming, au bout d'un mois environ les plantules ont été repiquées individuellement dans des pots de 2L contenant un mélange de perlite et de vermiculite (2:1) alors que les colzas de l'expérimentation avec l'inoculation de PGPR ont été repiqués environ 2 semaines après le semis dans des pots de 4L contenant un mélange de sol et de sable (1:1). Pour les deux expérimentations, les colzas ont été éclairés artificiellement (16h/8h ; jour/nuit) et alimentées avec une solution de Hoagland 1/4 (annexe 1) jusqu'à la vernalisation débutant au stade 10 feuilles (début décembre). A ce stade, les colzas sont transférés dans une chambre froide à 5°C sous une lumière artificielle avec une photopériode 10h/14h (jour/nuit) et sont alimentées par une solution Hoagland 1/4 sans N et S (annexe 1). Cette étape de vernalisation, nécessaire pour le passage au stade reproductif du colza, dure 12 semaines (jusqu'à début mars). En sortie de vernalisation les colzas sont transférés en serre avec une photopériode naturelle et leur alimentation est maintenue avec la solution Hoagland 1/4 sans N et S. A ce stade, un premier apport manuel de S (sous forme de MgSO4) et de N (sous forme de NH_4NO_3) est réalisé à des quantités équivalentes à 75 unités (U) pour le S et 100 U pour le N. Un second apport de N est réalisé au stade de bouton fermé à des quantités équivalentes à 50U.

Pour la **caméline (*cv*. Calena)**, les deux cultures (pour le thermopriming et les inoculations avec les PGPR) ont débuté entre fin mars et début avril dans un mélange sol sable (1:1). Deux semaines après le semis, les plantules ont été repiquées par quatre dans des pots de 2L contenant un mélange de sol et de sable (1:1) et ont été éclairées artificiellement (16h/8h ; jour/nuit). Elles ont été alimentées avec une solution Hoagland 1/4 jusqu'au début de l'élongation de la tige où les plantes passent à une photopériode naturelle et sont alimentées avec une solution de Hoagland 1/8 (annexe 1).

Pour les deux expérimentations et pour chaque espèce, **une partie des plantes sont dépotées**, en sortie de vernalisation pour le colza, et à partir du début de l'élongation de la tige pour la caméline, afin de collecter les exsudats racinaires. Pour cela, les racines sont soigneusement nettoyées à l'eau et **les plantes installées en hydroponie** dans des pots de 4L contenant une solution Hoagland 1/4 sans N ni S pour le colza et une solution Hoagland 1/8 pour la caméline et continuellement oxygénée à l'aide de bulleurs (Fig.18). Les mêmes apports en N et S que pour les colzas restés en pot sont aussi apportés

chez les colzas en hydroponie mais de manière fractionnée toutes les semaines à chaque changement de solution nutritive de sorte à minimiser les écarts de nutrition entre les plantes en pot et celles en hydroponie.

Figure 18 : Dépotage et passage en hydroponie des colzas (haut) et des camélines (bas).

2.2.1.2. Protocoles de stress thermique

Les protocoles d'application des stress thermiques pendant les deux expérimentations sont détaillés dans les chapitres suivants. Pour l'expérimentation de thermopriming, **le stress modéré est appliqué à partir du stade GS72** (correspondant au stade où 20% des siliques sont formés sur la plante ; Lancashire et al. 1991) pour les deux espèces. Les plantes ont été soumises à un **stress modéré correspondant à une augmentation graduelle des températures de 5 jours** (j) avant le stress intense, **soit environ 2.5j à 24°C/ 16°C (jour/nuit) puis 2.5j à 28°C/16°C (jour/nuit)**.

Pour les deux expérimentations, le **stress thermique intense a été appliqué 5 jours après l'application du stress modéré** (expérimentation de thermopriming) **ou de la première inoculation avec des PGPR** (expérimentation avec l'inoculation de PGPR) soit 5j après le stade GS72. Pour ce faire, les plantes ont été **soumises à une température de 28°C/16°C (jour/nuit) avec un pic par jour à 33°C pendant 5h (de 11h à 16h)**.

Détermination des caractéristiques de température du stress thermique intense

Dans cette étude, nous avons voulu appliquer des profils thermiques qui soient les plus proches des projections telles que définies par les modèles climatiques. Aussi, en collaboration avec Olivier Cantat (LETG, université de Caen-Normandie), nous nous sommes **basés sur les simulations climatiques Drias-2020**[1] **sous le scénario RCP 8.5** (celui pour lequel les émissions de gaz à effet de serre sont les plus importantes, dit « sans politique climatique ») du GIEC sur une localisation à proximité de Caen. De ces simulations, les **vagues de chaleurs printanières** comprises entre la mi-avril et le début du mois de juin des années 2090 à 2100 ont été isolées. Puis, la moyenne des températures maximales (Tmax) de toutes les vagues de chaleurs sur ces périodes et la moyenne des Tmax des pics de chaleurs ont été calculées, et fixées à environ 28°C pour Tmax et à environ 33°C pour les Tmax des pics. La moyenne des températures minimales (Tmin) pendant ces vagues de chaleurs a également été calculée, du fait que cette valeur pouvait être représentative des températures observées la nuit et ainsi servir à fixer la température nocturne appliquée en serre pour les plantes contrôles, soit 16°C.

2.2.1.3. Inoculation avec des PGPR

2.2.1.3.1. Caractéristiques des bactéries

Pour l'expérimentation avec inoculation de PGPR, deux PGPR ont été utilisées provenant chacune d'un laboratoire partenaire i.e. ***Pseudomonas ogarae* F113** et ***Pseudomonas sp*. C32**. La *Pseudomonas ogarae* F113 est une bactérie provenant du laboratoire d'écologie microbienne de l'Université Lyon 1 et a été fournie par Claire Prigent-Combaret. La *Pseudomonas sp*. C32 provient de l'unité AGHYLE d'Unilasalle Rouen et nous a été fournie par Mélanie Bressan. La *Pseudomonas* F113 est une PGPR avérée, connue pour son large spectre d'activités PGPR (Vacheron et al. 2016, 2018). La *Pseudomonas* C32 est une PGPR potentielle, extraite d'un sol normand et présentant certaines activités PGPR (Amy et al. 2022a). Par ailleurs, une culture test concluante a été réalisée avec cette bactérie pour tester son innocuité sur le développement du colza et de la caméline.

Pou**r chacune de ces bactéries, le profil métabolique (Biolog®) a été réalisé** en collaboration avec Mélanie Bressan (AGHYLE, Unilasalle Rouen), afin de connaitre les sources carbonées préférentiellement utilisés par ces bactéries. De plus, **deux activités PGPR majeures, à savoir l'activité ACC déaminase et la production d'auxine ont été quantifiées.** L'activité ACC déaminase a été quantifiée par mes soins et en collaboration avec Claire Prigent-Combaret (Laboratoire d'écologie microbienne, Université Lyon 1) dans le cadre d'un déplacement au laboratoire d'écologie microbienne à Lyon. La production d'auxine a été quantifié en collaboration avec Mélanie Bressan (AGHYLE

[1] https://www.drias-climat.fr/

Unilassalle Rouen). Les résultats du profil métabolique de ces deux activités sont présentés plus en détails dans le Chapitre 4 (Delamare *et al.*, 2023b).

Dans un second temps, étant donné que la ***Pseudomonas sp*. 32 est une nouvelle espèce** de *Pseudomonas*, le génome de cette bactérie a été séquencé et comparé avec le génome de la *Pseudomonas ogarae* F113 afin de déterminer leur écart phylogénétique. Ces études génomiques de la souche provenant de l'unité AGHYLE (Rouen) ont été réalisées par Amine M. Boukerb de l'UMR CBSA de Evreux. L'arbre phylogénétique présentant l'écart entre les deux souches est présenté dans le Chapitre 4 (Delamare *et al.*, 2023b), alors que la comparaison des génomes (réalisé à l'aide de l'outil de comparaison de génomes BRIG (Blast Ring Image Generator, Alikhan et al. 2011)) est présentée dans la figure 19. Cette figure nous permet ainsi de visualiser des différences de génomes importantes entre les deux bactéries.

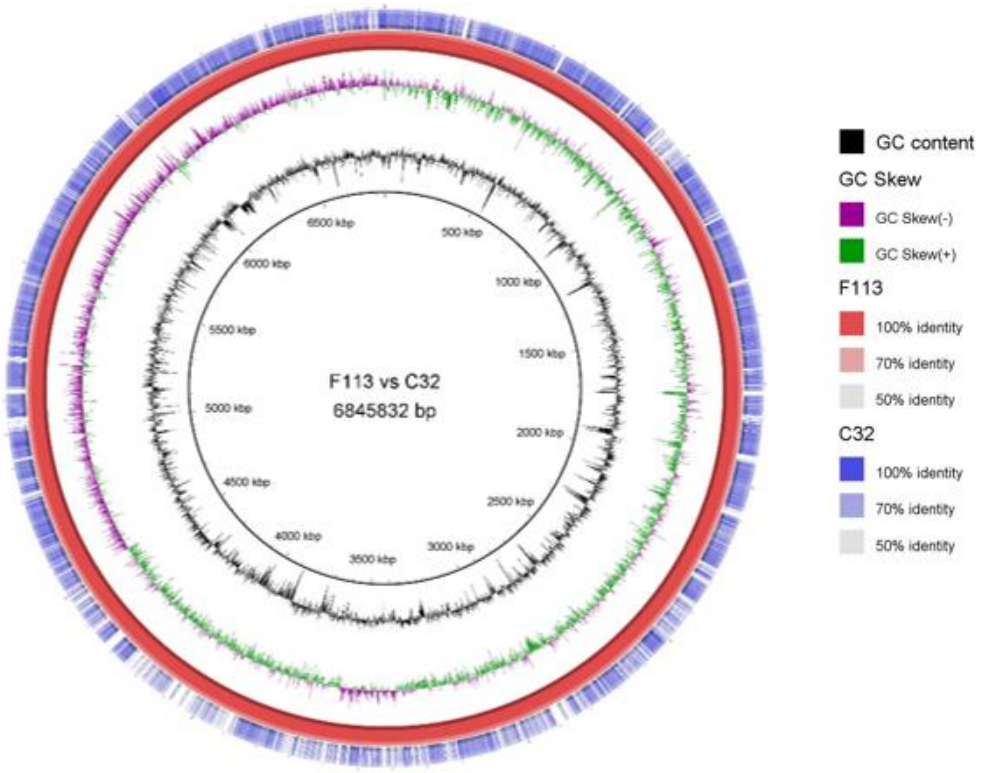


Figure 19 : Représentation circulaire de l'alignement des séquences du génome à au moins 50 % de similarité entre *Pseudomonas ogarae* F113^{T} (référence, en rouge) et *Pseudomonas sp*. C32 (en bleu). Anneaux de l'intérieur : 1–GC content, 2–GC skew, 3–F113, 4–C32. Figure réalisée par Amine Boukerb (UMR CBSA, Evreux).

2.2.1.3.2. Méthode d'inoculation

Avant de procéder aux inoculations, **une cinétique de croissance a été réalisée** afin de déterminer la quantité de cellules présentes dans le milieu de croissance pour une unité de Densité Optique (DO), nous permettant ainsi de connaitre la quantité de bactéries à appliquer. Ainsi, les bactéries sont mises en croissance sur milieu Luria-Bertani (LB) et toutes les 30 minutes (min) une lecture de DO est réalisée ainsi qu'un étalement sur boite de Pétri au début, au milieu et à la fin de la phase de croissance exponentielle. La cinétique est terminée à la fin de la phase de ralentissement (Fig.20). Le lendemain, les colonies présentes sur les boites de Pétri sont comptées. Ce nombre de cellules correspondant à une DO lue, nous permet ainsi de calculer l'équivalence du nombre de cellules pour une unité de DO.

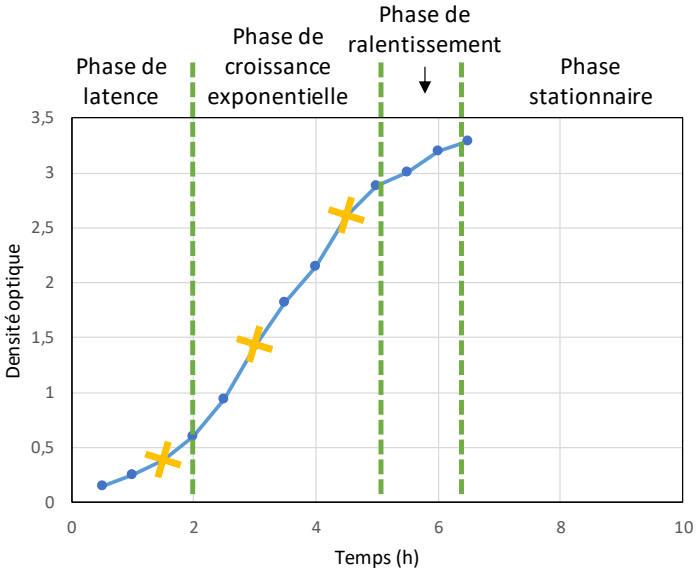


Figure 20 : Cinétique de croissance de la *Pseudomonas ogarae* F113. Les croix jaunes représentent les étalements sur boite de Pétri.

Afin de pouvoir inoculer ces bactéries, celles-ci ont été cultivées sur milieu LB à 30°C avec agitation (150 rpm) pendant 16h (environ une nuit). Après lecture de la DO lors de la phase de croissance exponentielle des bactéries, le milieu de culture est récupéré dans un tube Falcon. Ce dernier est centrifugé à 4000 rpm dans le but de culoter les bactéries et permettre de remplacer le milieu de culture par du $MgSO_4$ à 10mM afin d'obtenir l'inoculum. Cet **inoculum est dilué à une concentration de 10^6 bactéries par mL**. Puis, **10 mL de cet inoculum sont apportés par pot**, équivalent à une quantité de 10^7 bactéries déposées soit sur le sol pour les plantes en pots, soit directement dans la solution nutritive pour les plantes en hydroponie. **Les plantes sont inoculées deux fois** : la première fois au début de l'élongation de la tige et la seconde, 5 jours avant l'application du stress thermique.

2.2.2. Mesures expérimentales

2.2.2.1. Analyses des traits racinaires et analyses élémentaires (C et N) dans les différents organes

Pour chaque récolte des deux expérimentations, les différents organes de la plante sont séparés (racines, tiges, feuilles vertes et sénescentes, feuilles chutées, inflorescences, siliques, siliques avortées). Ensuite, les feuilles sont planimétrées afin d'obtenir la surface foliaire, puis tous les organes sont mis à sécher à 40°C pendant 1 semaine, puis pesés et broyés dans l'objectif de déterminer la quantité de C et N total pour chaque organe par IRMS (analyses réalisées par la plateforme PLATIN[2]). Pendant la récolte, les racines sont récupérées et nettoyées puis une partie des racines (environ 1 g) est pesée, placée dans un tube Falcon et directement congelée pour pouvoir par la suite **extraire les composés solubles de la racine (RWE)**. Le reste des racines est séparé en deux, pesé, puis une partie est séchée et broyée afin de déterminer la **quantité de C et N total** alors que l'autre partie est conservée dans de l'éthanol à 10% dans l'attente de **l'analyse de la morphologie racinaire**. Pour extraire les composés solubles des racines, 10 mL d'eau ultrapure sont ajoutés dans les tubes et les racines sont chauffées pendant 1h dans un bain marie à 65°C (Vong et al. 2007). Après 1h les racines sont retirées et les extraits sont filtrés à 0.2µm, puis le C et N total sont quantifiés par IRMS. Pour l'analyse de la morphologie racinaire, les racines conservées dans une solution à 10% d'éthanol sont étalées sur une plaque dans de l'eau osmosée et sont scannées puis analysées avec le logiciel WinRhizo® afin d'obtenir la longueur racinaire totale, la longueur de racines fines (inférieure à 0.2mm de diamètre), la surface racinaire, le volume des racines, le diamètre moyen. Tous les traits racinaires présents dans les chapitres suivants ont été calculés selon Freschet et al. (2021).

2.2.2.2. Recueil et analyses élémentaires et biochimiques des exsudats

Les exsudats racinaires sont récupérés chez les plantes placées en hydroponie pour les deux expérimentations. Pour cela, les racines sont rincées deux fois avec de l'eau ultrapure puis sont placées dans un bécher contenant un volume connu de 200 à 500 mL pour s'adapter au volume racinaire, d'**eau ultrapure stérile pendant 1h**. Les colzas sont mis à exsuder individuellement alors que les camélines sont mises à exsuder par 4 pour un bécher afin d'obtenir une quantité d'exsudats suffisante pour être quantifiée (Fig.21). Au bout d'une heure, les exsudats sont récupérés et directement filtrés à 0.2 µm afin de supprimer tous les débris cellulaires potentiels. Ces exsudats sont ensuite congelés et lyophilisés (concentrés 30 fois) dans l'attente des **analyses de la quantification de C et N par IRMS et de la composition en sucres et acides organiques par HPLC** (high performance liquid

[2] PLATeau d'Isotopie de Normandie, université de Caen-Normandie

chromatography). Le détail de la détermination de la composition en sucres et en acides organiques sont précisés dans le chapitre 3 (Delamare *et al.*, 2023a). L'analyse de la composition en acides organiques a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec Stéphane Firmin (Unité AGHYLE, Unilasalle Beauvais). J'ai réalisé la détermination des sucres à l'UMR EVA sous la direction d'Annette Bertrand.

Figure 21 : Exsudation des colzas (haut) et des camélines (bas).

2.2.2.3. Analyses du carbone organique dissous (Dissolved Organic Carbon =DOC) et des communautés microbiennes

Des **analyses de DOC** et des communautés microbiennes ont été réalisées chez les plantes en pot de l'expérimentation avec inoculation de PGPR. L'analyse du DOC a été réalisée en déposant 10g de sol dans des tubes Falcon avec 20 mL d'eau ultrapure qui ont été placés sous agitateur rotatif pendant 1h (Bongiorno et al. 2019). La solution est ensuite récupérée et centrifugée à 10 000 rpm, puis le surnageant est filtré à 0.2µm. La solution est ensuite congelée et lyophilisée, puis concentrée 10 fois afin de quantifier le C total par IRMS.

Sous la supervision de Mélanie Bressan (Unité AGHYLE, Unilasalle Rouen), j'ai réalisé différentes analyses d'activités des communautés microbiennes du sol. **Ces analyses se sont concentrées sur quatre activités enzymatiques** impliquées dans le cycle du C (la **β-glucosidase**), du N (la **N-acetylglucosaminidase**), du S (l'**arylsulfatase**) et de l'activité générale des microorganismes du sol (la **déshydrogénase**). De plus **l'abondance fongique et bactérienne a été déterminée par extraction de l'ADN microbien du sol** et par quantification par qPCR de l'ADNr bactérien (16S) et fongique (18S). Les protocoles détaillés de ces analyses sont présentés dans le Chapitre 5.

2.2.2.4. Analyses du rendement et de la qualité grainière

Le colza et la caméline sont des espèces dites à croissance indéterminée, c'est-à-dire qu'une même plante peut porter **simultanément des graines en cours de maturation, des graines en cours de remplissage et des inflorescences** (Diepenbrock and Geisler 1979). C'est pourquoi, afin de déterminer les effets du stress thermique et des traitements appliqués sur le rendement et la qualité grainière en fonction du stade auquel le stress est appliqué, des précautions d'étiquetage des siliques/fleurs ont été prises en amont de la collecte des graines. En effet, au stade GS72 (5 j avant le stress intense et la veille de l'application du stress modéré et de PGPR), **trois cohortes distinctes ont été étiquetées chez le colza : une cohorte regroupant des siliques présentant une longueur supérieure à 5 cm** (correspondant aux siliques où les graines sont en cours de maturation), **une cohorte regroupant des siliques présentant une longueur inférieure à 5 cm** (correspondant aux siliques où les graines sont en cours de remplissage) **et une cohorte regroupant les fleurs restantes** (les siliques et les graines issues de ces fleurs n'auront pas reçu le stress ; Fig.22). Ces cohortes ont été déterminées à partir de précédentes études visant à faire correspondre des mesures phénologiques avec le stade de développement des graines dans les siliques (Magno Massuia de Almeida et al. 2021). **Ces cohortes n'ont pas été réalisées chez la caméline** étant donnée sa rapidité de croissance, ne permettant pas de distinguer différentes cohortes pendant la période de stress.

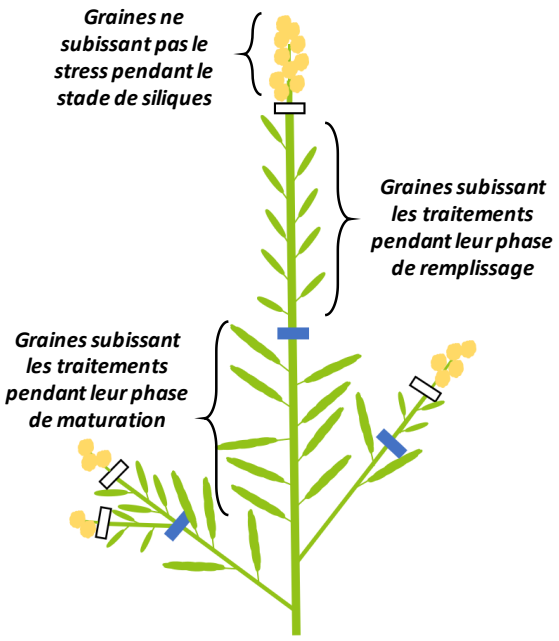
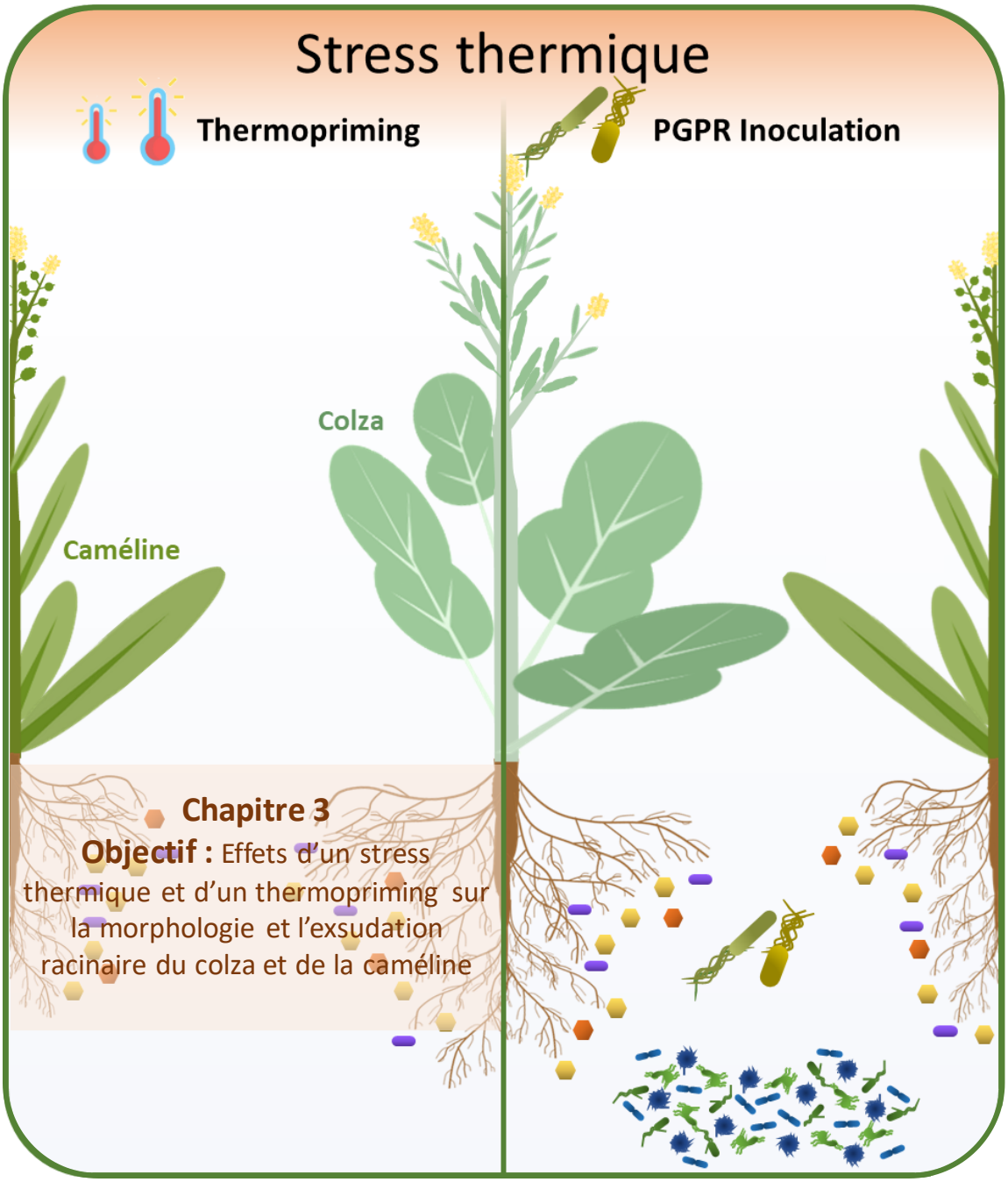


Figure 22 : Illustration schématique de l'étiquetage sur un plant ramifié de colza au stade GS72 visant à distinguer les trois différentes cohortes.

Une fois les différentes cohortes récoltées et séparées, les siliques sont ouvertes et les **graines sont séparées des enveloppes, puis pesées**. Afin d'obtenir le **nombre de graines totales** pour chaque cohorte, les graines sont étalées sur une feuille blanche et photographiées, puis les images sont analysées avec Image J, en collaboration avec Nicolas Elie (plateforme CMABio3, Université de Caen Normandie), afin de déterminer le nombre de graines. Le **nombre de graines germées sur pied** est déterminé par comptage manuel. Une partie représentative de chaque cohorte et ensuite récupérée puis broyée au mortier afin de réaliser les **analyses élémentaires** (PLATIN'), de **profil lipidique** (Marina Le Guédard de LEB Aquitaine Transfert) de **phytohormones** (Pr. Kim, Université de Chonnam, Corée du Sud).

Chapitre 3 : Effets d'un stress thermique et d'un thermopriming sur la morphologie et l'exsudation racinaire du colza et de la caméline



3.1. Effet d'un stress thermique et d'un thermopriming sur la morphologie et l'exsudation racinaire chez le colza et la caméline

3.1.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à la première expérimentation visant à tester l'effet potentiellement thermosensibilisant d'une augmentation graduelle de température (thermopriming) précédent un événement de stress thermique intense (Fig.17). Pour cela, une culture de colza d'hiver et de caméline de printemps a été réalisée en condition hybride sol/hydroponie. Au stade reproducteur, les plantes ont été soumises à un stress thermique précédé ou non d'un pré-stress correspondant à une augmentation graduelle de température. L'effet de ce pré-stress seul ainsi que du stress thermique intense ont aussi été caractérisés. Cette expérimentation a pour objectifs d'observer les effets d'un stress thermique sur la morphologie et l'exsudation racinaire des deux espèces ciblées et d'évaluer l'effet d'une augmentation graduelle de température précédant l'exposition au stress intense. La culture des plantes, l'analyse de la morphologie racinaire et les analyses quantitatives et qualitatives des exsudats ont été réalisées lors de la première année de thèse. L'analyse des résultats fait l'objet d'un article publié en 2023 dans Environmental and Experimental Botany (Delamare et al. 2023a). Les données supplémentaires de cet article sont présentées dans l'annexe 2.

Principaux résultats

- L'augmentation graduelle de température (pré-stress) précédant le stress thermique intense n'a pas permis d'atténuer les effets négatifs du stress intense sur les biomasses des parties aériennes. Cependant, un effet thermosensibilisant du pré-stress a été observé sur l'exsudation en C et N chez le colza mais pas chez la caméline pour laquelle les effets négatifs du pré-stress et du stress se sont cumulés.

- En réponse au stress thermique, une augmentation de la prospection racinaire et un ajustement de la composition de ses exsudats - *tout en maintenant l'exsudation carbonée* - ont été observés chez la caméline. A la différence, aucune modification de morphologie racinaire n'a été observée chez le colza, alors qu'une augmentation des quantités de C et de N exsudés - *sans modification qualitative* - a été analysée.

- Le colza et la caméline présentent deux stratégies racinaires et d'exsudation contrastées pour faire face au stress thermique.

Environmental and Experimental Botany 210 (2023) 105318

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental and Experimental Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envexpbot

Thermopriming effects on root morphological traits and root exudation during the reproductive phase in two species with contrasting strategies: *Brassica napus* (L.) and *Camelina sativa* (L.) Crantz

Jérémy Delamare [a], Sophie Brunel-Muguet [a], Annette Morvan-Bertrand [a], Olivier Cantat [b], Stéphane Firmin [c], Isabelle Trinsoutrot-Gattin [d], Lorane Le Franc [a], Emmanuelle Personeni [a,*]

[a] Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France
[b] LETG, Normandie Université, CNRS, UMR 6554 Littoral - Environnement - Télédétection – Géomatique, Caen, France
[c] UniLaSalle, SFR Condorcet FR CNRS 3417, AGHYLE Beauvais UP 2018.C101, 60000 Beauvais, France
[d] UniLaSalle, SFR NORVEGE FED 4277, AGHYLE Rouen UP 2018.C101, 76130 Mont Saint Aignan, France

Abstract

The impact of heat stress due to climate change is particularly well characterized on the plant aboveground and more specifically in the reproductive parts of crops. However, fewer studies aimed at characterizing the effects of heat stress on root morphology and root exudation. These two components of root functioning are of major importance for nutrient acquisition and set up beneficial interactions with microorganisms but they are also particularly sensitive to high temperatures. In our study, we aimed to analyse the effects of heat stress on root morphology and root exudation (quantitatively and qualitatively) in two *Brassicaceae* i.e. rapeseed (*Brassica napus*) and camelina (*Camelina sativa*) that differed from their development strategy which might interfere with their ability to face heat stress. We also designed several heat stress protocols so as to test whether a prior gradual temperature increase can have a priming effect over intense heat stress. Our results indicated that camelina and rapeseed exhibited two different behaviors upon heat stress. In rapeseed, heat stress led to an increase in exudation and no changes in root morphology. In contrast, camelina showed a more conservative strategy as revealed by increased root prospection and modifications of organic acid exudation. The prior gradual increase before the intense heat stress did not modify the trend observed upon the intense heat stress but tended to limit the impacts on root exudation in rapeseed. However, the combined sequence was more negative for camelina due to the longer cumulated duration of the stress. The contrasting behaviours of the two species can be explained by a difference in development strategy and also contrasting breeding histories, that enable the conservation of more traits involved in abiotic stress resistance in camelina in contrast to rapeseed. Eventually, our study highlights that although heat stress due to increased air temperature is mainly sensed by the aboveground plant parts, root functions are impacted and roots could act as a buffer organ to attempt

readjusting impaired allocation of carbohydrates to the seeds. Our work opens new perspectives for deciphering the interactions between the plant and soilborne microbe communities under heat stress.

Key words: Root morphology, Root exudation, Heat stress, Thermopriming, Camelina, Rapeseed

3.1.2. Introduction

Climate change has become a major issue that threatens ecosystem sustainability and food security worldwide due to increased frequency of extreme climatic events such as drought or heat waves (IPCC 2021). These extreme phenomena negatively impact agro-ecosystems by modifying their equilibrium and ecological functions (IPCC 2021). In addition to these ecological imbalances in ecosystems, abiotic stresses lead to yield penalties in many economically important crops as a consequence of intra and interannual variations of temperature and rainfalls (Lobell and Field 2007; Ray et al. 2015). Heat from increased air or soil temperatures is one of the main stresses that impact crop growth and development and eventually the quality of harvested products (Jha et al. 2014; Bakhshandeh et al. 2019; Calleja-Cabrera et al. 2020).

Nevertheless, most research studies on heat stress impacts are based on temperature stress protocols which are not realistic or not in accordance with the temperature profiles (in terms of duration, intensity and frequency) predicted by IPCC models. Moreover, although many studies highlighted the negative effects of high temperature events, they mainly focused on plant aboveground parts and seed yield while the effects on belowground parts and the feedbacks on source-sink flows to the roots are much less documented (Brunel-Muguet et al. 2015; Kourani et al. 2022; Mácová et al. 2022). However, roots are essential organs for the acquisition of nutrients and water and they are at the interface with soil microbiota.

The main belowground sinks for C are the living roots, the root exudates (a labile part of total rhizodeposited C) and the use of C for symbiosis (e.g. arbuscular mycorrhizas) (Wen et al. 2022). Moreover, the trade-off in C allocation between these three compartments highlights the resource-acquisition strategy specific to the plant (Wen et al. 2022). A heat stress can induce adjustments in C allocation to the different plant parts and consequently, it could modulate the root morphological traits and root exudation. Thus, it was observed that C allocation to the roots was increased by a heat stress of 42/37°C day/night of tomato plants (Giri et al. 2017). Moreover, this study indicated that source-sink balance for C between aboveground parts and roots was impacted by heat stress. Another study in a grassland species (*Andropogon gerardii*) highlighted similar results with an increase in C flux from shoot to root and in root C content at the expense of that of the shoots upon heat stress (Mainali and Kuman, 2007). This modification in source-sink balance for C in favour of the roots might lead to

alterations in the root traits. Indeed, a number of studies indicated that heat stressed plants displayed impaired root development and nutrient uptake capacity (Heckathorn et al. 2013; Yuan et al. 2016; Giri et al. 2017; Bakhshandeh et al. 2019; Calleja-Cabrera et al. 2020). It has been shown in heat stressed wheat plants that high temperatures (30/20°C day/night) increased specific root length as a consequence of a decrease of root dry biomass (Bakhshandeh et al. 2019). In *Brassica campestris*, a decrease in all parameters related to root morphology (Root dry weight, root length, root area) was observed under high temperatures (40/30°C day/night) (Yuan et al. 2016). These modifications in C allocation and root morphology could induce changes on the root exudation.

Root exudation is the main component of rhizodeposition which plays a key role in the recruitment of beneficial microorganisms and in nutrient acquisition (Jones 1998; Huang et al. 2014). Root exudates are mostly modulated by photosynthetic activity and 5 to 21% of C photosynthesized can be exuded by roots (Nguyen 2003; Haichar et al. 2014). Many studies highlighted the negative impact of high temperature on photosynthesis (Allakhverdiev et al. 2008). Then, the root exudation might be indirectly impacted by heat stress. However, the impact of heat stress on the rhizodeposition, and more specifically on root exudation, has been poorly investigated. So far, studies have mainly focused on woody species. Increases in exuded C per root mass unit and per root length unit in *Picea asperata* under heat stress were observed (Yin et al. 2013b, a). Among the studies on herbaceous species, Bakhshandeh et al. (2019) observed in wheat an increase in plant-derived soil organic C, under high temperature, that could reflect an increase in C rhizodeposition. The composition of the exudates is also particularly important. Indeed, some primary compounds like organic acids such as malate and citrate are particularly involved in increasing mining of nutrients such phosphorus (P) (Hoffland 1992; Jones 1998; Tiziani et al. 2020, 2021; Wen et al. 2022) and in recruiting beneficial microorganisms (Rudrappa et al. 2008; Huang et al. 2014; Vora et al. 2021). Exuded carbohydrates have been shown to increase the activities of microorganisms and thus the N availability to plants (Phillips et al. 2011; Yin et al. 2013a; Chai and Schachtman 2022; Wen et al. 2022). Moreover, plants can control beneficial microorganisms recruitment through organic acids and carbohydrates exudation (Chet et al. 1973; Bacilio-Jiménez et al. 2003; Somers et al. 2004; Huang et al. 2014). One could expect that heat stress, while switching C fluxes towards roots, would also modify the composition of primary metabolites in the exudates. Indeed, Aidoo et al. (2016) showed that the proportions of carbohydrates and organic acids in roots change in response to a heat stress. However, the exudate composition altered by heat stress have been under investigated so far. One study showed that in two heat stressed *Citrus* species, the amount of proline in root exudates increased (Vives-Peris et al. 2017). Other works in herbaceous cultivated species (*Sorghum bicolor* L.) also pointed out changes on exudate composition upon heat stress with an increased amount of exuded flavonoids and phenolic compounds (Yaqoob et al. 2020). Recently, Tiziani et al. (2022) showed evidence of upheaval in the profile of some exuded metabolites

under heat stress. These metabolic modifications, associated with C budget changes could have consequences on soil bacterial and fungal communities (Hawkes et al. 2008; Vescio et al. 2021; Tiziani et al. 2022). Brassicaceae species form an uncommon family in plant kingdom because they do not develop interactions with mycorrhizal fungi. These species allocate the C resources to collect nutrients by developing more fine roots and more broadly the root system and/or by improving root exudation (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). Thus, to acquire nutrients, Brassicaceae species are faced with the need for a trade-off between the C allocated in root growth and that allocated to root exudation (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). The C allocated in root exudation can drive the relationship with non-symbiotic bacteria in rhizosphere (Gkarmiri et al. 2017; Hilton et al. 2021).

Camelina and rapeseed are two Brassicaceae species that do not have the same needs for optimal growth. Camelina is more resistant to pests, diseases and drought (Moser 2010; Ibrahim and El Habbasha 2015; Soorni et al. 2021), in contrast to rapeseed that could be considered as a more sensitive crop. Moreover, the main difference deals with their respective nutrient needs and nutrient use efficiency. Indeed, camelina is a low fertilizer demanding species (Zubr 1997), unlike rapeseed which requires large N and S fertilization and is characterized by low nitrogen use efficiency (Dubousset et al. 2010; Bouchet et al. 2016). Therefore, from this perspective, camelina can be considered as a species with a more conservative strategy and rapeseed as a species with a more acquisitive strategy. The reproductive phase of oilseed plants is a period highly sensitive to heat stress over which flowering, pollination, seed filling and maturation are determining stages for yield and seed quality (Deng and Scarth 1998; Baux et al. 2013; Sage et al. 2015). By contrast with most oilseed plants, several studies in camelina, an ancient spring oilseed Brassicaceae (Zanetti et al. 2021), also called re-emergent oilseed crop (Julié-Galau et al. 2014), indicated that this species is more stress-tolerant (Ibrahim and El Habbasha 2015). For these two species, there is scarce information on the effect of heat stress on root morphological traits and root exudation although changes in these parameters can have major consequences.

The stress acclimation process emerge as a promising solution to maintain plant fitness and performances under climate changes (Liu et al. 2022; Villagómez-Aranda et al. 2022). It relies on stress memory which is the ability to memorize the information generated by a first stress and to retrieve it upon following stresses, thus leading to different responses to the subsequent stresses (Crisp et al. 2016; Hilker and Schmülling 2019; Serrano et al. 2019; Liu et al. 2022) whether they are of the same nature as the initial stress (Ding et al. 2012; Serrano et al. 2019) or of a different nature (Savvides et al. 2016; Ahmad et al. 2021a). This beneficial stress memory, also called “priming”, reflects the ability of the plants to be better prepared to the subsequent stresses. However, thermo-priming protocols have mainly been studied on aboveground plant parts so far (Wang et al. 2016; Fernández-Pascual et al. 2019; Serrano et al. 2019; Magno Massuia de Almeida et al. 2021) while they could also interfere

with the root growth and functioning such as exudation, thus leading to change C allocation and source-sink balance in plants.

In this context, our study aimed to (i) analyze the effect of heat stress on the root morphological traits and on root exudation, (ii) evaluate the potential of a gradual increase in temperature as a thermopriming event to alleviate the negative impacts of later heat peaks on root morphological traits and root exudation and (iii) highlight the difference between two contrasting Brassicaceae species regarding their respective resource acquisition strategy under high temperatures, i.e. *Brassica napus* L. an acquisitive species and *Camelina sativa* (L.) (Crantz)., a conservative specie .

3.1.3. Materials and Methods

3.1.3.1. Plants cultivation and high temperature modality application

Oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) *cv*. Aviso (a winter variety) and Camelina plants (*Camelina sativa* (L.) Crantz) *cv*. Calena (a spring variety) were grown in 2020/2021 and 2021 respectively in greenhouse located at the University Caen-Normandy (49◦11′ 09 N, 0◦21′ 32 W, Caen, France). Oilseed rape seeds obtained from the Center of Biological Resources BrACySol (Brassica-Allium-Cynara-Solanum, INRAE Center of Rennes, Brittany, France) were sown in October 2020 in vermiculite at natural thermoperiod of 19.6°C (±1.6°C; day-16h) and 16.5°C (±0.98°C; night-8h). After one month, the plants were transplanted into 2L pots containing a mix of perlite and vermiculite (1:2, v/v) and supplied with 25% Hoagland solution consisting of 1.25 mM $Ca(CO_3)_2$, $4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14µM H_3BO_3, 5µM $MnSO_4$, 3µM $ZnSO_4$, 0.7µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7µM $CuSO_4$, 0.1µM $CoCl_2$ up to the 12-leaves stage. Then, the oilseed rape plants were vernalized for 13 weeks in a cold chamber at 6.1°C (±1.3°C) (standard model, Froid & Mesures, Beaucouzé, France) with an artificial light for daytime (10 hrs day/14 hrs night) and supplied with a 25 % Hoagland solution deprived of sulphur (S) and nitrogen (N). After the vernalization period, oilseed rape plants were transferred into the greenhouse under natural photoperiod and under natural thermal conditions (on average from the end of the vernalization until the beginning of the temperature modalities 18.8°C (±1.7°C; day) and 16.2°C (±0.73°C; night)). Two weeks after the vernalization period, 16 oilseed rape plants (four per treatment) were placed in hydroponic conditions in 4L containing with 25% Hoagland without N and S oxygenated using an aerator. A fraction of N and S were providing every week so that the cumulated N and S supplies matched the conventional recommendations for field-grown oilseed rape plants as in Magno Massuia de Almeida et al. (2021). Prior to their transfer in hydroponic conditions, the substrate around the roots was carefully removed to limit mechanical root injuries

according to the method described in Oburger & Jones, (2018). The nutritive solution of the hydroponic plants was renewed every week.

Camelina seeds were sown at the end of March 2021 at natural thermoperiod of 18.5°C (±1.3°C; day-16h) and 16,1°C (±0.7°C; night-8h) end were grown into boxes containing a sandy soil. Camelina plants were supplied with 25% Hoagland solution until early flowering and then with a 12.5% Hoagland solution in order to limit nutrient excess in the soil. As described for the hydroponic conditions in oilseed rape, the substrate was carefully removed to limit mechanical root injuries. Each plant was placed in a 4L hydroponic device with 12.5% Hoagland solution oxygenated using an aerator. Four replicates per treatments are used and due to the small size of camelina, each replicate was composed of three individuals while only one individual per replicate was used for rapeseed.

For both species, several temperature modalities were designed to test whether a gradual increase in temperature could alleviate the negative effects of intense heat peaks during the reproductive phase. The temperature threshold features of each modality were chosen in order to be consistent with the temperature projections over the spring period (from mid-April to mid-May) on the horizon 2100 according to the SSP5-8.5 of the IPCC (IPCC 2021). The temperature modalities were applied at the same stage of growth for rapeseed and for camelina. Thus, the temperature treatments were applied at 316°Cd (base temperature 5°C, Morrison *et al.*, 1988) after flowering for oilseed rape (matching growth stage GS72, Lancashire et al., 1991) and 197°Cd (base temperature 0°C, Allen et al., 2014) after flowering for camelina (matching GS72, Martinelli & Galasso, 2011).

For oilseed rape, the first heat modality herein named “Pre-Stress” (PS) was a gradual increase in temperature over ca. 5 days i.e. 60 hours at 23.3°C ± 0.4/16.5°C ± 0.9 (day/night) and 60 hours at 26.2°C ± 0.4/17.4°C ± 0.1 (day/night). The second heat modality, herein named “Intense Heat Stress” (IHS) was composed of 5 days at 26.3°C ± 0.2/17.4°C ± 0.2 (day/night) with daily heat peak for 5 hrs (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.8°C ± 0.5. The third heat modality herein named “Combined Sequence” (CS) is the combination of the 2 previous modalities. This modality was designed to test whether the first event (gradual increase temperature) can alleviate the negative effects of the second event (intense heat stress). Finally, the temperatures for the control modality were at 19.3°C ± 0.9/16.4°C ± 0.2 (day/night) over the 10 day-treatment. Temperatures were controlled with temperatures probes (105 T Campbell, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK).

For camelina, the same modalities were applied. The first heat modality, “pre-stress” (PS) was a gradual increase in temperature over 5 days i.e. 2 days and a half at 22.8°C ± 0.2/17.4°C ± 0.1 (day/night) and 2 days and a half at 27,4°C ± 0.3/17.7°C ± 0.2 (day/night). The second heat modality, “intense heat stress” (IHS) was composed of 5 days at 26.8°C ± 0.2/18.6°C ± 0.70 (day/night) with daily heat peak for 5 hrs (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 32.2°C ± 0.4. The third heat modality, “combined sequence” (CS), was the combination of the 2 previous modalities. Eventually, the temperatures of the

control modality were 19.5°C ± 1.3/17.0°C ± 0.8 (day/night) over the 10 day-treatment (Fig.1 (Chap.3.1)).

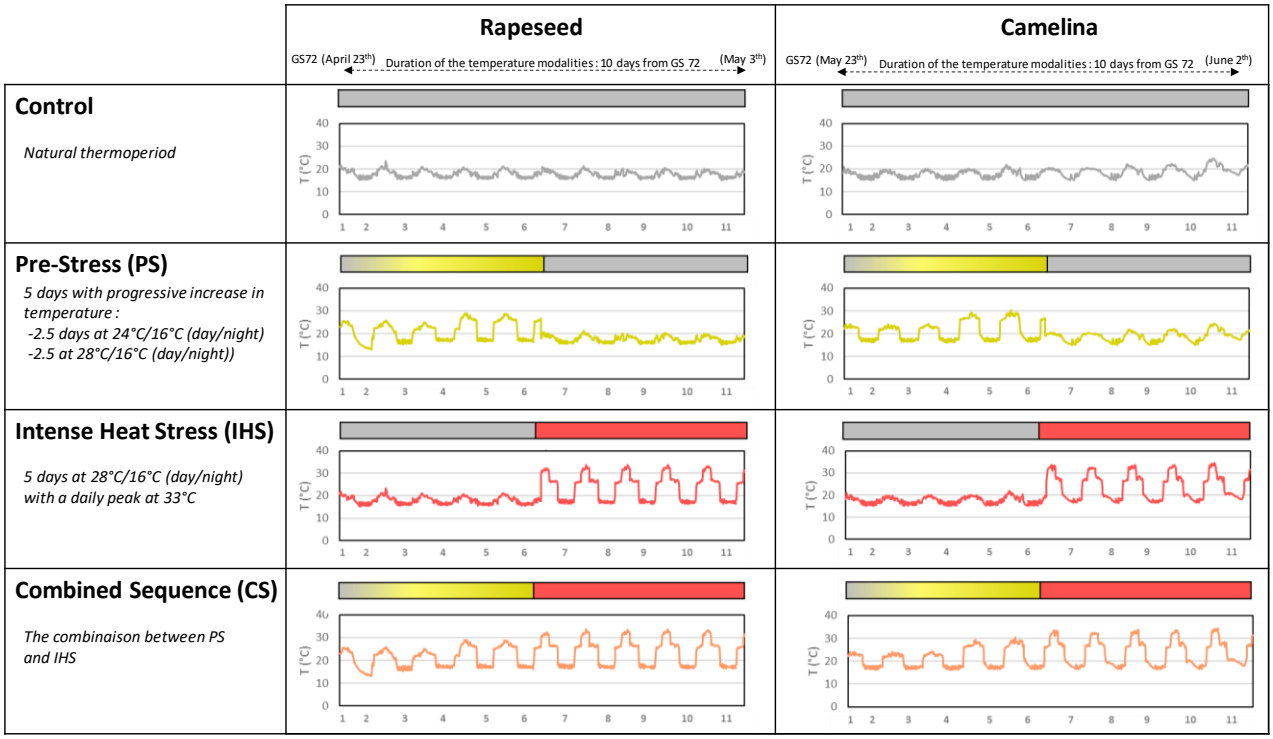


Figure 1 (Chap.3.1): Diagram of the experimental design describing the four modalities (one control and three heat modalities) and including graphs of the temperatures recorded in the greenhouse for rapeseed and for camelina at the GS72 stage.

3.1.3.2. Root exudates collection and plant harvest

The root exudates were collected 10 days after the beginning of the temperature modalities. Four hours after the sunrise, the roots of each plant were abundantly rinsed with sterilized ultrapure water and then soaked in sterilized ultrapure water (400ml for rapeseed and 200ml for camelina) according to Valentinuzzi et al., (2015). After one-hour soaking, the solutions that contained the root exudates were collected. Then, exudates were filtered at 0.2 µm with a polyethersulfone (PES) filter and stored at -20°C. As for root exudates, plants were harvested 10 days at the end of the heat stress sequences. The whole plant leaf area was measured using an area meter (LI-COR LI-3100, Lincoln, NE, USA). Then, the aerial plant compartment was separated in different parts (stems, leaves, reproductive parts gathering flowers and pods) which were freshly weighted. They were dried at 40°C during 48h, to measure the dry weight (DW). Meanwhile, approximatively 1 g of fresh root was also harvested, weighted, frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C for further extraction of root water-extractable compounds. The remaining roots were kept and soaked into a 10% ethanol solution until root morphological analyses.

3.1.3.3. Root morphology analyses

Root morphological analyses were performed with a flatbed scanner (Epson Expression 10000XL - WinRHIZO™ software- Regent Instruments Inc., Canada) in order to measure the total root length and the fine roots length corresponding to root length with a diameter lower than 0.2 mm. Then, the roots were dried at 40°C during for 48h and weighted to obtain the root dry weight.

3.1.3.4. Root water extraction

Frozen roots (ca. 1 g) were used to extract root water extracts. For this purpose, 10 mL of ultrapure water were added into the root-containing tubs which were placed in water bath at 65°C for 1h according to Vong et al., 2007. The soaking solution was then filtered at 0.2 µm with a PES filter. Finally, the root water extracts were stored at -20°C prior to the C and N analyses.

3.1.3.5. Carbon and nitrogen content in root exudates and root water extracts

Measurements of C and N amounts in root exudates and in root water extracts were performed with a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy) Exudates of both species were freeze-dried and concentrated 60 fold for rapeseed and 200 fold for camelina to reach sensing values.

3.1.3.6. Analyses of organic acids and soluble sugars in root exudates

Thirty milliliters of filtrated root exudates were lyophilized and resuspended with 1 mL of KH_2PO_4 25mM/methanol (99 :1 ; v:v) buffered at pH 2.40 for analysis of carboxylates by reversed phase chromatography. The separation and quantification of organic acids (malate, malonate, lactate, acetate, maleate, citrate, fumarate) were performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and conditions previously described by Yacoumas et al. (2020). To consider the variation of root biomass between plants, carboxylate release rates were determined by dividing concentrations data per the root DW. The total organic acid content was calculated as the sum of all mentioned carboxylates.

For soluble carbohydrate analyses, thirty milliliters of filtrated root exudates were lyophilized and resuspended with 1 mL and 0.9 mL are taken, lyophilized and resuspended with 90µl of ultrapure water. Soluble carbohydrates were analysed by high performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD; ICS-6000, Dionex, Thermo Fisher Scientific, CA, USA)

equipped with a CarboPac PA100 anion-exchange column (4 x 250 mm) and a CarboPac PA100 guard column with an elution at 30°C at 1 mL min^{-1} with an linearly increasing concentration of NaOH from 20 mM (0 min) to 200 mM (25 min) followed by an elution with 200 mM NaOH for 10 min. Firstly, *myo*-inositol, pinitol, sorbitol, adonitol, mannitol, trehalose, 3-methyl-glucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, fructose, melibiose, sucrose, melezitose, raffinose, stachyose, verbascose and 1-kestotriose were used as standards for the identification of carbohydrates in exudates by comparison of elution times. Since *myo*-inositol co-eluted with pinitol and sorbitol co-eluted with adonitol, we chose *myo*-inositol and sorbitol for calibration curves, as these three components are the most common among in root exudates among each pair (Dennis et al. 2010). Since elution times of galactose and mannose are very close to that of glucose (just before and after, respectively), and considering that glucose was the main carbohydrate found in rapeseed root exudates (Häggquist *et al.*, 1984) and in our exudates (additional analysis with the CarboPac SA-10 column, data not shown), only glucose standard was use for calibration curves among these three sugars. Finally, *myo*-inositol, sorbitol, mannitol, trehalose, 3-methyl-glucose, rhamnose, arabinose, glucose, xylose, fructose, melibiose, sucrose, melezitose, raffinose, stachyose, verbascose and 1-kestotriose were used for identification and quantification. Finally, the carbohydrate content was determined by dividing their quantities in exudate per the root DW.

3.1.3.7. Statistical analyses

For all variables measured, results were expressed as the mean ± sd of n replicates available per treatment. All statistical analyzes were performed with R software (version 4.0.3, R Core Team (2022)). To test the effects of the modality, an ANOVA coupled with a Tukey test was performed after verification of the normality with a Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variances with a Bartlett test. When one of these two conditions was not respected, variables were log or 1/n transformed to perform the ANOVA. Moreover, if despite the transformation, the normality or the homogeneity of the variances were not verified, then a Kruskal-Wallis test was used. A principal component analysis (PCA) was performed for each species, to explore the distribution of each heat stress modality relative to their plant functional traits. Plant traits were separated in four compartments : (i) aerial traits i.e. Vegetative Part DW (Veg_DW), Leaf DW (LDW), Leaf Area (LA), Specific Leaf Area (SLA), Reproductive Part DW (Repro_DW), Root/Shoot ratio (R:S) (ii) roots traits i.e. Root DW (RDW), Specific Root Length (SRL), Root Matter Content (RDMC), Root Tissue Density (RTD), (iii) C and N in root exudates and (iv) C and N in root water extracts (C_RWE, N_RWE). These PCAs were used to identify shifts in the plant strategy to acclimate to heat stress. The ellipses correspond to the 95% confidence intervals for each modality.

3.1.4. Results

3.1.4.1. Heat stress impacts on plant traits

Table 1 (Chap.3.1) displays morphological analyses in rapeseed (A) and camelina (B) at the end of the stress sequences. Significant effects of the temperature modalities were observed for both species on reproductive dry weight (Repro_DW) and the most penalising modality was the combined sequence (-26.5% and -31.6% compared to the control in rapeseed and camelina respectively). By contrast, the early mild stress sequence led to the lowest effect (-14.3% and -16.7% in rapeseed and camelina respectively). For the vegetative dry weight (Veg_DW), the leaf dry weight (LDW) and the leaf area (LA), the rankings were similar in both species but only significant for the later camelina. In addition, the temperature modalities did not impact any morphological root trait in both species.

Table 1 (Chap.3.1): The effect of the three heat modalities on the dry weight of the different plant parts and the root morphological traits. Mean (n=4) and standard deviation for rapeseed (A) and camelina (B). The effect of the temperature modality was tested with a one-way ANOVA (or Kruskal-Wallis test for Leaf area, Total root length and Fine root length for camelina). Pre-Stress (PS), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Dry weight (DW), Vegetative part dry weight (Veg_DW), Reproductive part dry weight (Repro_DW), Leaf Dry Weight (LDW), Leaf Area (LA), Specific Leaf Area (SLA), Root/Shoot Ratio (R:S), Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Tissue Density (RTD). Plants were harvested at the end of the heat modality application.

A

Treatment	Control	PS	IHS	CS	P-value
Veg_DW (g)	12.8 ±1.6	11.1 ±0.5	10.7 ±0.6	11.0 ±0.8	0.110
Repro_DW (g)	9.8 ±0.6 **b**	8.4 ±0.9 **ab**	8.1 ±0.3 **a**	7.2 ±0.6 **a**	**0.003** **
LDW (g)	1.1 ±0.2	0.7 ±0.2	0.7 ±0.1	0.8 ±0.3	0.064
LA (cm^2)	284.5 ±58.9	181.0 ±29.2	194.5 ±24.3	224.7 ±62.9	0.081
SLA (cm^2/g)	260.9 ±7.1	282.0 ±22.4	301.1 ±31.3	273.5 ±28.6	0.276
R:S	0.13 ±0.01	0.12 ±0.01	0.14 ±0.01	0.14 ±0.02	0.410
RDW (g)	3.3 ±0.4	2.6 ±0.2	2.9 ±0.3	2.9 ±0.6	0.221
Total root length (m)	249.7 ±22.3	278.4 ±36.4	286.4 ±62.7	279.7 ±51.7	0.771
Fine Root length (m)	181.3 ±16.3	209.1 ±31.1	216.7 ±51.1	207.5 ±45.5	0.701
SRL (m/g)	76.5 ±11.6	108.6 ±12.1	100.9 ±26.6	101.0 ±22.3	0.246
RDMC (g/g)	0.14 ±0.01	0.13 ±0.01	0.13 ±0.00	0.13 ±0.01	0.714
RTD (g/cm^3)	0.26 ±0.04	0.21 ±0.03	0.23 ±0.03	0.22 ±0.04	0.292

B

Treatment	Control	PS	IHS	CS	P-value
Veg_DW (g)	1.2 ±0.1 **b**	1.1 ±0.2 **ab**	0.9 ±0.1 **a**	0.9 ±0.1 **a**	**0.004 ****
Repro_DW (g)	0.6 ±0.1 **b**	0.5 ±0.1 **ab**	0.4 ±0.1 **a**	0.4 ±0.04 **a**	**0.019 ***
LDW (g)	0.13 ±0.02 **ab**	0.15 ±0.1 **b**	0.06 ±0.01 **ab**	0.05 ±0.00 **a**	**0.016 ***
LA (cm^2)	34.0 ±5.3 **ab**	41.5 ±19.3 **b**	17.5 ±4.7 **ab**	15.5 ±2.3 **a**	**0.013 ***
SLA (cm^2/g)	261.1 ±9.8	264.0 ±15.4	277.3 ±31.3	284.5 ±24.6	0.535
R:S	0.07 ±0.01	0.08 ±0.02	0.08 ±0.01	0.08 ±0.02	0.830
RDW (g)	0.17 ±0.03	0.16 ±0.05	0.14 ±0.02	0.13 ±0.03	0.542
Total root length (m)	29.8 ±2.4	22.2 ±1.6	28.4 ±2.5	29.8 ±11.5	0.077
Fine Root length (m)	22.9 ±2.0	16.8 ±0.9	22.5 ±2.2	22.7 ±0.9	0.093
SRL (m/g)	183.7 ±47.2	154.7 ±40.1	202.1 ±19.1	220.6 ±42.8	0.248
RDMC (g/g)	0.18 ±0.01	0.20 ±0.03	0.22 ±0.02	0.20 ±0.01	0.251
RTD (g/cm^3)	0.14 ±0.03	0.16 ±0.03	0.13 ±0.01	0.11 ±0.02	0.209

3.1.4.2. Heat stress impacts on C and N contents in root water extracts and on root exudation

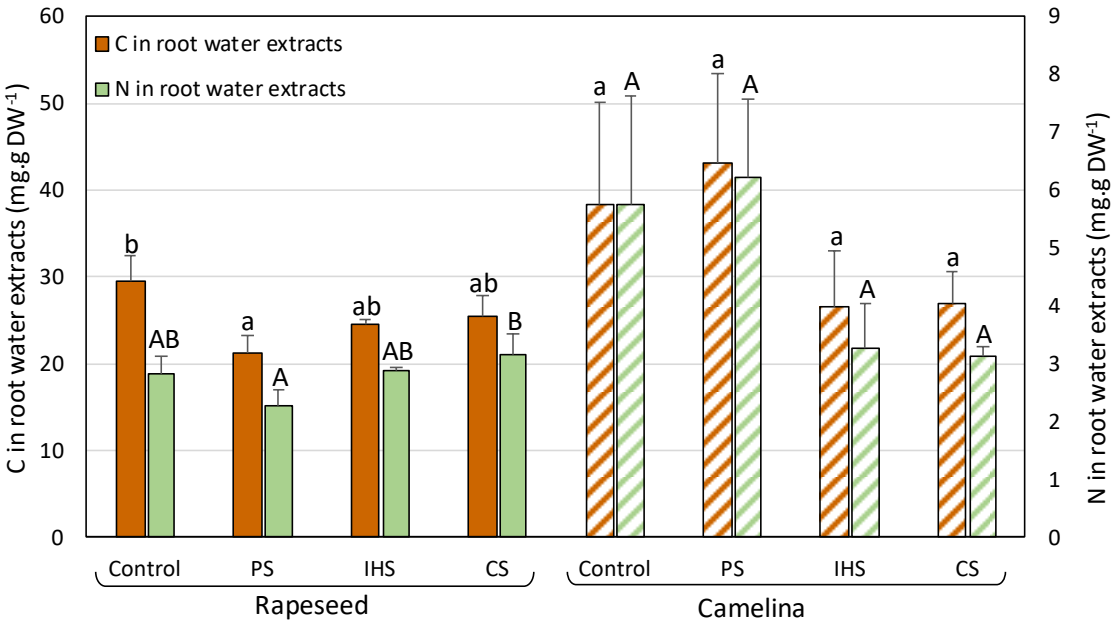
Figure 2 (Chap.3.1) displays the effects of the three heat modalities on the concentrations of C and N in root water extracts and in root exudates. For rapeseed only, the pre-stress (PS) significantly decreased the C concentration in root water extracts whereas the intense heat stress (IHS) and the combined sequence (CS) only tended to decrease it (Fig.2A (Chap.3.1)). For N concentration in root water extracts, PS tended to decrease the N concentration whereas CS led to a slight increase in N concentration compared to the Control and IHS modalities in rapeseed. In camelina, C concentration in root water extracts was not impacted by the heat stress modalities. However, N concentration in root water extracts was significantly impacted by the modalities (Fig.2A (Chap.3.1)).

For root exudation, we observed that the C concentrations in exudates were two-fold and five-fold higher in camelina than in rapeseed, respectively (Fig.2B (Chap.3.1)). In rapeseed, the modality that led to the highest concentration of C and N in exudates was IHS (85.1% and 83.8% increase for C and N, respectively) (Fig.2B (Chap.3.1)). The Combined Sequence (CS) also increased C and N exudation but to a lesser extent than the Intense Heat Stress (IHS). Pre-Stress (PS) increased C exudation only and did not affect N exudation. By contrast, in camelina, CS generate the highest concentration of C exudates (+60.3%) while PS and IHS did not led to a significant increase (Fig.2B (Chap.3.1)). Eventually, no heat modality had impacted N exudation in camelina (Fig.2B (Chap.3.1)).

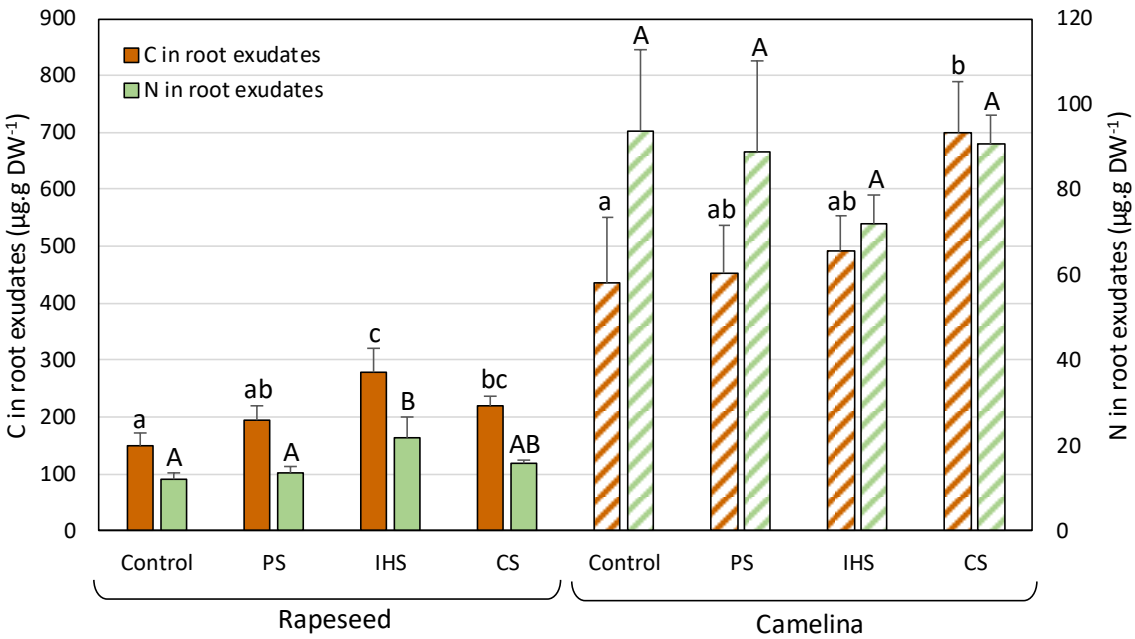
In rapeseed, the C/N ratio in root water extracts decreased with all heat modalities with a stronger effect for IHS and CS than PS (Fig.2C (Chap.3.1)). However, in this species, no effect of the heat

modalities was reported for the C/N ratio in root exudates (Fig.2C (Chap.3.1)). Conversely, for camelina, the C/N ratio in root water extracts was significantly impacted by heat modalities with an increase in C/N ratio with IHS and CS. The same observation was reported for the C/N ratio in camelina root exudates for whom IHS and CS increase the C/N ratio in comparison with PS and the control (Fig.2C (Chap.3.1)).

A



B



C

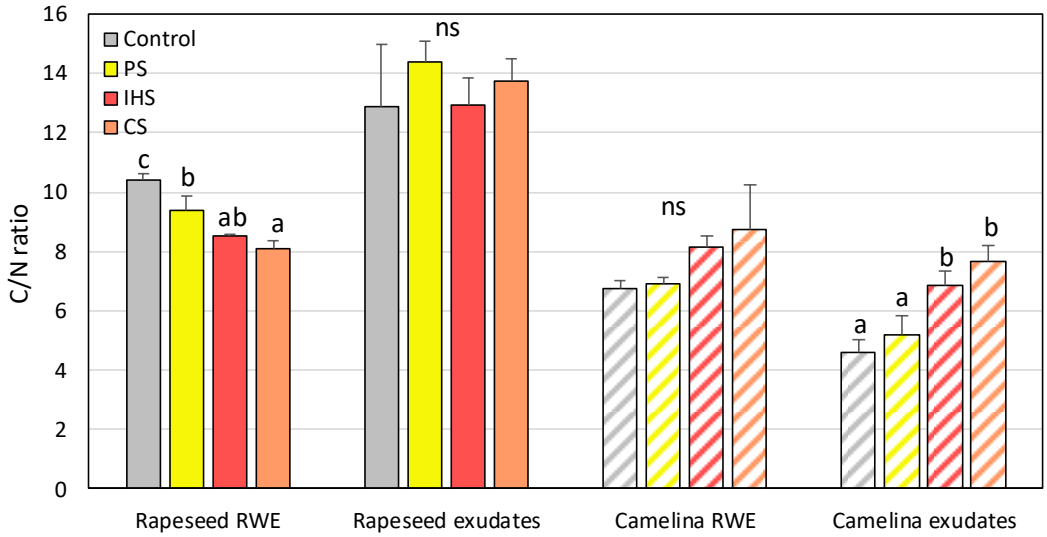


Figure 2 (Chap.3.1): The effect of 3 heat modalities on the C and N contents in root water extracts (RWE) (A), on the C and N content in root exudates (B) and on the C/N ratio of root water extracts and root exudates (C). Mean (n=4) and standard deviation for rapeseed and camelina. The effect of the temperature modality was tested with a one-way ANOVA. Pre-Stress (PS), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Root Water Extracts (RWE), Dry Weight (DW).

3.1.4.3. Modifications in plant resource acquisition strategy by heat stress

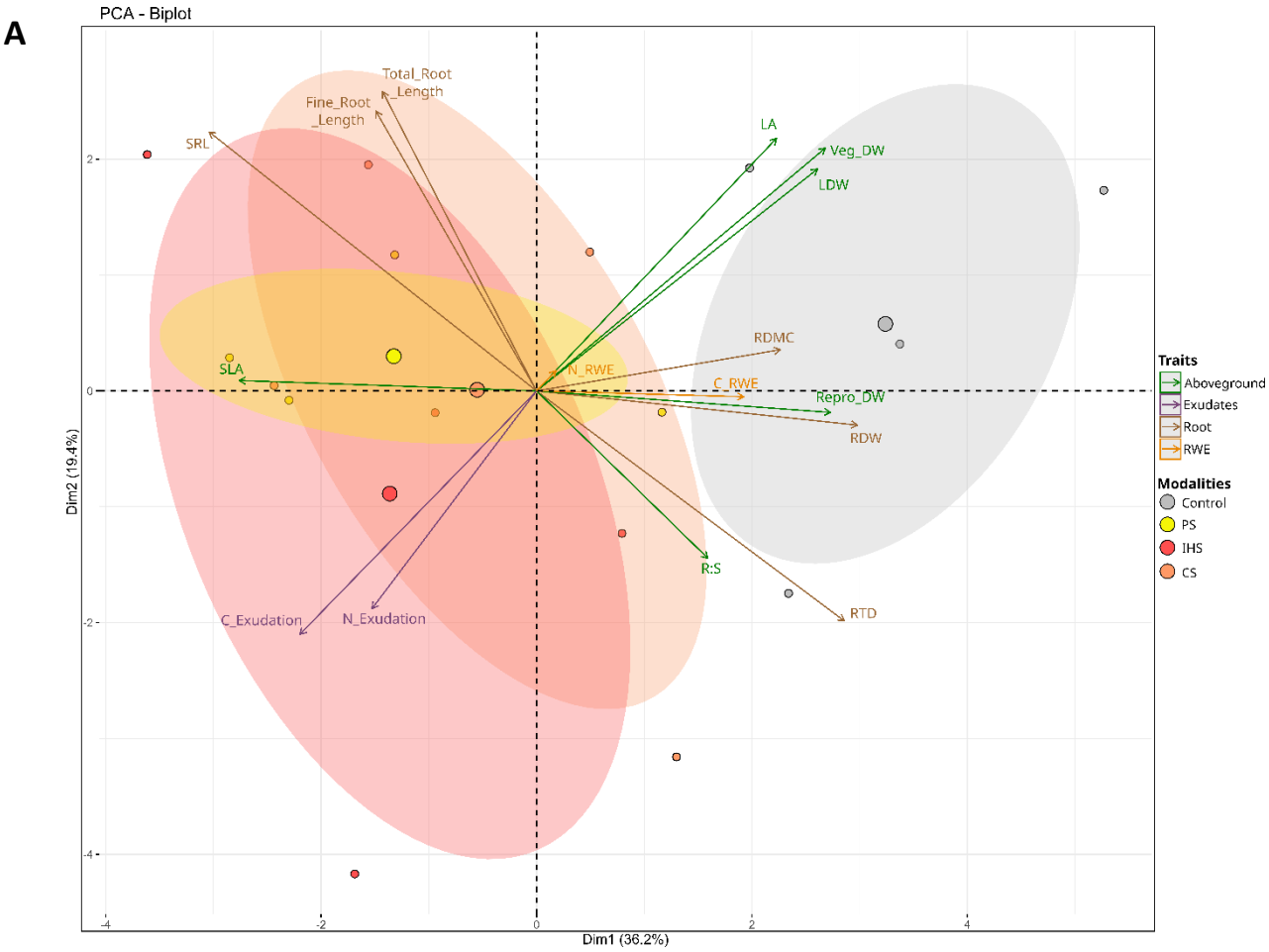
The PCAs were used to identify the relationships among the 16 measured variables that gather plants traits (aboveground and root morphological traits, C and N contents in exudates and root water extracts under the different heat modalities in rapeseed (Fig.3A (Chap.3.1)) and camelina (Fig.3B (Chap.3.1)). In rapeseed, the first four components explained 83.4% of the total variance. The first dimension (Dim 1) which contributed to 36.2% of the variance was mainly associated to aerial parts such as SLA (9.2%), Repro_DW (9%), Veg_DW (8.6%), LDW (8.2%) and LA (6%), root variables such as SRL (11.1%), RDW (10.7%), RTD (9.8%) and RDMC (6.2%) (Fig.3A (Chap.3.1)). The second dimension (Dim 2) which contributed to 19.4% of the total variance was mainly associated with root morphology such as Total root length (15%), Fine root length (13.1%), SRL (11.2%) and RTD (8.8%), vegetative part variables such as LA (10.7%), Veg_DW (9.9%) and LDW (8.2%) and also root exudation such as C exudation (9.9%) and N exudation (7.9%) (Fig.3A (Chap.3.1)). The third dimension (Dim 3, 15.2 % of the variance) was explained by different root parameters like RDW (13.5%), Total root length (14.5%), Fine

root length (15.9%), RDMC (14.5%) and R:S (23.9%) (Fig.S1A (Chap.3.1)). The fourth dimension (Dim 4) contributed to 12.5% of the total variance and was mainly explained by the root soluble compounds such as C_RWE (24.4%) and N_RWE (41.9%), the root exudation such as N exudation (8.5%) and C exudation (7%) and by the SLA (7.3%) (Fig.S1B (Chap.3.1)). The analysis showed that the first dimension clearly discriminated the different heat stress modalities from the control. Figure 3A (Chap.3.1) indicates that the control plants displayed a greater RDW, RDMC, RTD, LDW, LA, Repro_DW and Veg_DW than the plants from the three heat modalities which in turns displayed a greater SLA and SRL. However, this dimension did not discriminate the three heat modalities. The second dimension allowed Pre-Stress (PS) modality to be distinguished from the Intense Heat Stress (IHS) and the Combined Sequence (CS) (Fig.3A (Chap.3.1)), especially because of the narrower extent of individual variation of the variables that contributed to this dimension. Moreover, the second dimension discriminated the Control from the IHS and the CS modalities. Figure 3A (Chap.3.1) showed that the control plants had a greater Total root length, Fine root length, LA, LDW and Veg_DW than IHS and CS which in turns displayed a greater C and N exudation. Interestingly, Figure 3A (Chap.3.1) indicates that RTD was inversely correlated to SRL. The other root variables were also separated between the variables related to root prospection (total root length, fine root length, SRL) and the variables related to root structure (RDW, RDMC and RTD).

Figure 3B (Chap.3.1) displays the PCA performed with the values of variables in camelina. The first four components accounted for 86.7% of the total variance (Fig.3B (Chap.3.1)). The first dimension (Dim 1) which contributed to 35.7% of the total variance. As for rapeseed, it was mainly associated to the aerial parts variables such as LDW (13.8%), Veg_DW (12.6%), LA (12.5%), Repro_DW (8.9%) and also root morphological traits such as RTD (12.8%), SRL (12.3%) RDW (9.6%) and C exudation (8.7%) (Fig.3B (Chap.3.1)). The second dimension (Dim 2) explained 27.5% of the total variance. As in rapeseed, this dimension was built by several root variables such as the RDMC (8.7%), the RDW (8.1%), the Total root length (7.4%), the Fine root length (7.1%), the R:S (17.5%), the root soluble compounds such as the C_RWE (17.1%) and the N_RWE (17.1%) and also the N exudation (10.2%) (Fig.3B (Chap.3.1)). The third dimension (Dim 3, 15.2% of the total variance) was also explained by several root variables such as the Total root length (24%), the Fine root length (22.7%), the SRL (9.5%), the RDMC (9.3%), the RTD (7%), two aerial parts variables such as Repro_DW (7.7%) and Veg_DW (6.3%) (Fig.S2A (Chap.3.1)). Finally, the fourth dimension (Dim 4) contributed to 8.4% of the total variance and was mainly associated to the leaf variables like the SLA (42.1%), the LA (14.6%), the LDW (8%) and reproductive part such as Repro_DW (11.2%) (Fig.S2B (Chap.3.1)).

In contrast to rapeseed, dimension 1 discriminated both the control and the Pre-Stress (PS) modalities from CS and to a lesser extent IHS modalities. Thus, control and PS plants displayed a greater

RDW, RTD, LDW, LA, Repro_DW and Veg_DW than plants subjected to Intense Heat Stress (IHS) and the combined sequence (CS) modalities which in turn, displayed a greater SRL and C exudation (Fig.3B (Chap.3.1)). Moreover, CS plants are characterized by a greater SRL and C exudation than IHS plants (Fig.3B (Chap.3.1)). The positioning of the modalities within the dimensional space was also impacted by the variables that accounted for the second dimension (Fig.3B (Chap.3.1)). Indeed, IHS and CS plants displayed a greater RDW, RDMC and R:S and also a lower N_RWE and C_RWE than Control and PS (Fig.3B (Chap.3.1)). Finally, the third dimension was the most explanatory dimension of the repartition between root length related variables. Indeed, Control plants displayed a greater Total root length, Fine root length and SRL than plants from PS, IHS, CS which exhibited a greater RDMC and RTD. Like for rapeseed, RTD was also conversely correlated to SRL. The other root variables were also separated between the variables related to root prospection (total root length, fine root length, SRL) and the variables related to root structure (RDW, RDMC and RTD).



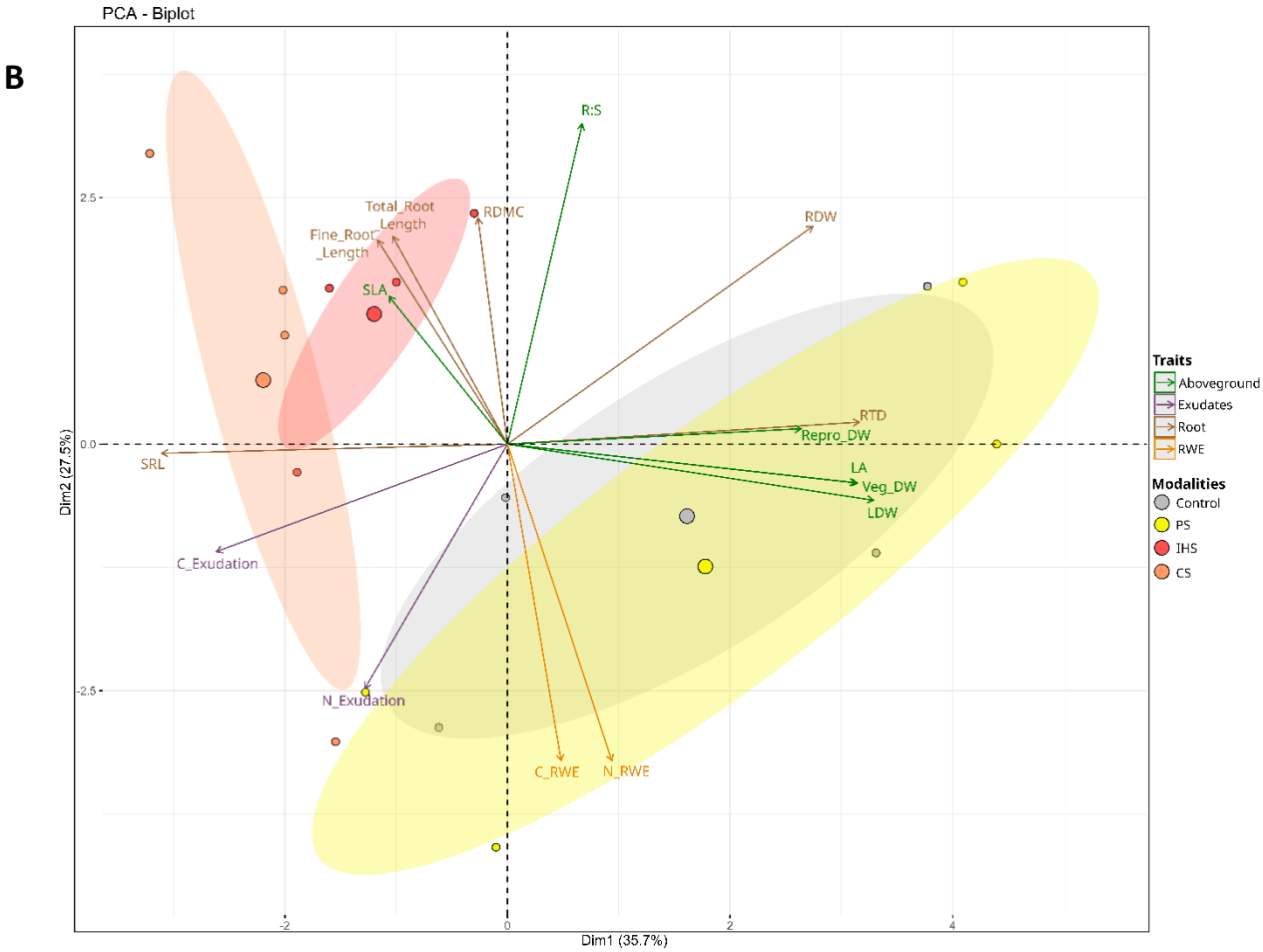


Figure 3 (Chap.3.1): Principal component analysis of the first two components for rapeseed (A) and camelina (B), i.e. Dim 1 (=36.2% for rapeseed and = 35.7% for camelina) and the Dim 2 (=19.4% for rapeseed and =27.5% for camelina). The variables acquired under the 3 heat stress modalities gather four different plant traits types (Aboveground traits, root morphological traits, exudates and RWE)**.** The small dots represent the individuals (plants) per modality while the larger dots represent the mean for each modality. Ellipses reflect the interval of confidence. These PCA are represented by the Dim 1 (=36.2% for rapeseed and = 35.7% for camelina) and the Dim 2 (=19.4% for rapeseed and =27.5% for camelina). Pre-Stress (PS), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Dry weight (DW), Vegetative part DW (Veg_DW), Reproductive part DW (Repro_DW), Leaf DW (LDW), Leaf area (LA), Specific Leaf Area (SLA), Root/Shoot ratio (R:S), Root DW (RDW), Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Tissue Density (RTD), Root Water Extracts (RWE).

3.1.4.4. Modifications of the root exudate biochemical composition

The effects of the heat stress sequences on the root exudate composition have been targeted on the modifications of carbohydrates and organic acids. Figure 4 (Chap.3.1) displays the variations in carbohydrate and organic acid contents in the root exudates of rapeseed and camelina according to the different modalities.

Under control conditions, the major carbohydrates in root exudates of both species were sucrose, glucose and fructose and the preponderant polyol was *myo*-inositol (Fig.4A and B (Chap.3.1)). Galactooligosaccharides were not detected in exudates. In rapeseed, neither the total amount nor the composition was modified under heat stress whatever the modalities (Fig.4A (Chap.3.1)). By contrast, in camelina, the total amount of carbohydrates increased significantly in exudates under CS and to a lesser extent under Pre-Stress (PS) and Intense Heat Stress (IHS) (not significant) and the carbohydrate composition was also modified (Fig.4B (Chap.3.1)). The PS modality had the least impact on the carbohydrate composition and led to a significant increase in sucrose and, to a lesser extent, in mannitol, xylose, glucose and fructose (not significant). Under IHS, the amounts of *myo*-inositol (p-value = 0.044), mannitol and xylose significantly increased while the increase in glucose and fructose was not significant. Finally, the Combined Sequence (CS) was the most impacting modality on carbohydrate composition with increases in most carbohydrate contents i.e. a significant increase for mannitol, glucose, fructose, xylose and an increasing trend for sucrose and myo-inositol (Fig.4B (Chap.3.1)). By contrast, no modification in sorbitol, trehalose, rhamnose and arabinose contents was observed whatever the heat modality (Fig.4B (Chap.3.1)).

Under control conditions, the major organic acid in root exudates of both species was lactate, follow by malonate and malate in rapeseed and acetate in camelina. In rapeseed, neither the amount of total organic acids per root DW nor the composition was modified under the three heat modalities (Fig.4C (Chap.3.1)). In camelina, the amount of total organic acids was not impacted by the heat stress modalities (Fig.4D (Chap.3.1)) but the composition was modified with an increase of the amount of citrate exuded under the three heat stress modalities with CS leading to the highest value (Fig.4D (Chap.3.1)). The amount of malate exuded also increased under the heat stress modalities with the highest increase observed under IHS (Fig.4D (Chap.3.1)). As for rapeseed, the amounts of fumarate, acetate, malonate and lactate were not modified by the heat stress modalities in camelina (Fig.4D (Chap.3.1)).

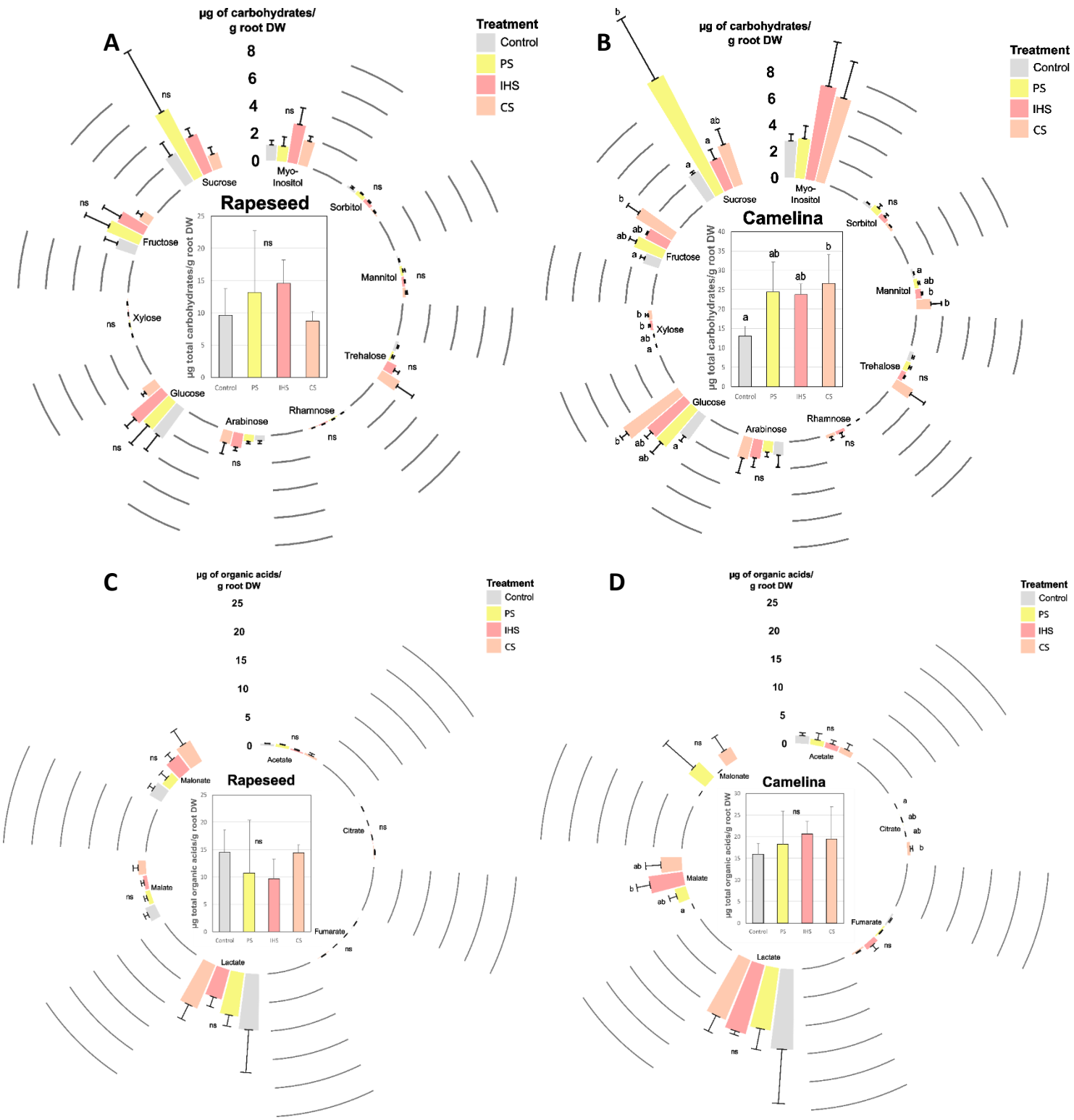


Figure 4 (Chap.3.1): The effect of the three heat stress modalities on the compositions of carbohydrates (A and B) and organic acids (C and D) in root exudates of rapeseed (A and C) and camelina (B and D). Mean (n=4) and standard deviation for rapeseed and camelina. The effect of the temperature modality was tested with a single ANOVA. The results are expressed in total organic acid or carbohydrate exuded per root DW (µg/g of root DW). Pre-Stress (PS), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Dry weight (DW).

3.1.5. Discussion

3.1.5.1. Plant traits and root exudation were modified upon heat stress scenario.

Aboveground biomasses were reduced by heat stress in both species unlike belowground biomasses which remained unchanged. For both species, the reproductive compartment was the more impacted, but in camelina, the vegetative compartment was also negatively modified. These results are consistent with several publications that have shown a decrease in aboveground DW and more specifically a decrease in reproductive part DW under heat stress conditions (Angadi et al. 2000; Brunel-Muguet et al. 2015; Kourani et al. 2022). This decrease in the aboveground biomass is probably the consequence of impaired photosynthesis activity caused by heat stress (Allakhverdiev et al. 2008). Therefore, less carbon is taken up by the plants and then assimilated into the aboveground biomass. Higher C allocation to the roots could explain the unchanged belowground biomass as observed in several studies which highlighted that heat stress triggered an increase in C allocation to the roots following labelled ^{13}C assimilation (Mainali 2007; Mainali et al. 2014; Giri et al. 2017). By contrast with our observations, other studies have shown impairments of root related parameters under heat stress (Heckathorn et al. 2013; Yuan et al. 2016; Bakhshandeh et al. 2019; Calleja-Cabrera et al. 2020). This is likely the consequence of different heat stress protocols that do not reflect realistic field conditions when an intense event occurs at both night and day. Moreover, the degree of response could be species-dependent.

The higher root sink strength for C could lead to an increase in C exudation under heat stress. Indeed, in rapeseed, while lower amounts of C were observed in root water extracts, C exudation increased significantly upon heat stress. However, it does not necessarily raise a contradiction because the C concentration in root water extracts was about 100-fold higher than the one measured in root exudates collected over 1h at the same period. Our results were consistent with the literature review in woody plants (Yin et al. 2013b, a) and in wheat (Bakhshandeh et al. 2019) which showed that higher C allocation to the roots upon heat stress led to higher C losses by exudation, and conversely lower soluble C within the roots (i.e. decrease in C concentration in root water extracts). Therefore, root extract C content is probably not correlated with C content in the exudates in stress conditions, which raises the issue of impairment in cell membrane stability (Iglesias-Acosta et al. 2010). Furthermore, the experimental conditions (soil-hydroponic-hybrid ; Oburger and Jones, 2018) could have an influence on the exudation contents considering the absence of mechanical impedance (Groleau-Renaud et al. 1998), but with no incidence for the comparison between the treatments.

In rapeseed, the increase in C exudation occurred along with an increase in N exudation. The increase in N exudation upon heat stress leads to a loss in nutrients for the plants, which may no longer be able to maintain high N level within their roots. However, we did not observe a decrease of the concentration in N in root water extracts upon heat stress. This could mean either that there might be some compensation of the N exudation losses, likely from a weaker N demand towards the shoot or that there was a higher N uptake, although this is more speculative as this was not observed in Giri et al. (2017). In addition, stable N concentration into the roots can be explained by a trade-off between the root and the shoot to reduce energy costs of N transfer from roots to shoot and especially the reproductive compartment, as we observed for C allocation. Therefore, lower amounts of N would be allocated to the shoot in favour of the roots in an attempt to limit N losses by exudation.

In camelina, the intense heat stress and the early moderate heat stress did not modify neither N nor C exudation. As for rapeseed, decrease in photosynthetic activity and changes in C sink priorities led to unchanged root biomass along with lower shoot biomass upon heat stresses. Moreover, camelina plants were more able to maintain C and N allocation within the roots as neither C and N exudations nor C and N in root water extracts were not modified. Therefore, in camelina, the C and N sink strength in roots may induce an increase of root biomass for prospection. However, there were no modifications in root tissue density (RTD), root dry matter content (RDMC) or root biomass which are used as proxies for root biomass requirements. There were also no modifications in either root length or SRL which were used as proxies for root prospection. These observations lead to the conclusion that, in this species, only a decrease in the photosynthetic activity, as expected from evidence of the literature, can explain a decrease in C uptake and assimilation and thus a decrease in aboveground biomass.

Among the broad variety of chemical compounds constituting the C content in root exudates, carbohydrates and organic acids affected by abiotic stresses presumably through photosynthesis modifications (Svenningsson et al. 1990; Allakhverdiev et al. 2008; Tiziani et al. 2022). In our study, the total organic acids exuded remained unchanged in both species under each of the heat modalities but higher concentrations of malate upon the intense heat stress and of citrate upon the combined sequence were observed in camelina. Similar outputs of increasing malate concentration in root exudates were observed for *Zea mays* under heat stress conditions (Tiziani et al. 2022). Similarly, to organic acids, no effect of heat stress on the total amount of carbohydrates nor on the carbohydrate composition in exudates were observed in rapeseed. Therefore, the increase in C exudation could likely reflect the increase in other C-compounds that were not analysed in this study and that remain largely unidentified yet. In camelina, the increase in C exudation that was observed under the combined heat sequence was consistent with the increase in carbohydrate exudation such as glucose, fructose, *myo*-inositol, the three most abundant carbohydrates in camelina exudates along with mannitol and xylose.

As for the organic acids, our results are in line with the literature that observed an increase in glucose, fructose, *myo*-inositol and sucrose in root exudates in rapeseed under water stress (Svenningsson et al. 1990).

Overall, while both species displayed reduction in shoot biomass, they differed from their ability to face the consequences of heat on the root system because unlike to rapeseed plants, camelina plants can partially maintain N and C concentrations within the roots by limiting the increase of exudation.

3.1.5.2. A gradual increase in temperature prior to a more intense heat stress partially alleviates the negative effects of the later in rapeseed but not in camelina

The gradual increase in temperature did not have a thermopriming effect on the aboveground growth in rapeseed and camelina as the aboveground biomass under the combined sequence was as low as under the late intense heat stress. Moreover, cumulated negative effects of the combined sequence were observed on the reproductive biomass in rapeseed, and on the leaf area and leaf dry weight in camelina, which highlighted that the longer the heat stress, the greater the impact on the aboveground biomass. The negative effect of the combined sequence in camelina was also observed on root exudation with cumulative effect in C exudation meaning that the gradual increase did not allow the plants to be primed and then face a more intense heat stress. These results were in line with prior studies attesting that successive heat stress events could lead to cumulative negative effects that eventually amplified the individual effect of each event (Magno Massuia de Almeida et al. 2021). The PCA performed on camelina illustrates these observations with a decrease in shoot biomass along with increased exudation in a higher extent under the combined sequence than under the intense heat stress alone. The slightly higher content in C in the water-extractable compounds in root under the lower heat stress indicates that camelina increased C concentration within the roots without significant increase in C exudation during the pre-stress. However, this could eventually result in higher C exudation following the later intense heat stress. This outcome between root water extracts and exudates may explain why the successive events were more damaging in camelina. Overall, these observations highlight that the effects of the combined sequence led to cumulative effects meaning that the gradual increase in temperature did not trigger the expected priming effect.

In rapeseed, the gradual increase in temperature did not induce a priming effect as observed for the reproductive biomass but, combined to the intense heat stress, it tended to decrease the amounts of C, N and organic acids exuded by comparison with the intense heat stress alone. Like for the intense heat stress, the amount and the composition of carbohydrates were not modified under the combined

sequence and this group of primary compounds could not explain the C increase with this heat stress modality. By contrast, for camelina, the increase in C exudation under the combined sequence, and to a lower extent under the intense heat stress, is related to an increase in the amount of major carbohydrates in root exudates.

The question addressed in our study was whether the pre-stress condition (i.e. the gradual increase), which was initially applied to trigger a thermopriming effect, could be systematically beneficial for plants. In the literature, the definition of a thermopriming event encompasses diverse features. Indeed, most studies defined a priming event as a first (mild) stress exposure followed by a recovery phase before the second (more intense) stress exposure (Crisp et al. 2016; Serrano et al. 2019; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). This recovery phase can allow a memory effect required to set up regulatory mechanisms such as epigenetics modification or accumulation of defence compounds, involved in plant thermotolerance (Crisp et al. 2016). However, this recovery phase does not occur systematically as observed in the case of biotic stresses (e.g. pathogen attacks) although a priming state can be defined (Conrath et al. 2006). Indeed, the first infection (i.e. the priming stimulus) might still be there or not yet overcome by the plants when the second one starts which means that there is no recovery phase. Thus, despite there was no recovery phase in this case, a priming effect is described (Heil and Kost 2006; Conrath et al. 2015). In the context of abiotic stresses, the required occurrence of recovery phase can also be questioned. Indeed, a recent article demonstrated that a priming sequence can be a gradual increase in temperature meaning that a recovery phase between two stressing events was not required (Mareri and Cai 2022).

Finally, our results highlight that the gradual increase in temperature attenuated the effect of the later intense heat stress in rapeseed as it tended to limit C and N losses in exudates, but it did not modify the allocation strategies towards the root compartment and led to biomass losses of the reproductive plant parts. By contrast, camelina plants were more negatively impacted by the combined sequence than by the intense heat stress alone which indicates that the gradual increase did not induce a priming effect. These observations can be interpreted in the light of the respective duration of the culture cycle of the two species. Indeed, while camelina cycle lasts 3.5 months, rapeseed cycle is about 3 times longer. Therefore, in camelina a longer proportion of the reproductive phase was exposed to the high temperatures. Overall, our results tended to indicate that while rapeseed could benefit from a gradual increase prior to more intense stress, camelina might be more resistant to an intense heat stress as C and N exudation remained stable but be more impacted by a longer stress.

3.1.5.3. Rapeseed and camelina have two contrasting roots strategies to withstand an intense heat stress.

As Brassicaceae species do not develop interactions with mycorrhiza, their strategy to acquire belowground resources rely mainly on the trade-offs between C allocation to root growth devoted to prospection and between root exudation devoted to resource-acquisition (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). However, heat stress modifies the C assimilation and then repartition of carbohydrates between the root and shoot compartments.

We investigated here the different strategies set up upon heat stress by these two contrasted *Brassicaceae* and we assessed their ability to maintain or adjust their resource-acquisition strategy during a heat stress period. Our results highlighted greater modifications of C allocation under heat stress in rapeseed than in camelina. Indeed, C allocation to the shoot compartment decreased along with temperature increase. However, this decrease in C allocation to the shoot was not beneficial to the root compartment as no changes in biomass, nor morphology were observed. This underlined unchanged resource-acquisition strategy based on prospection related root morphological traits. In regards to the exudation behavior, our observations highlighted higher amount of exuded C and N under heat stress which could be the result of an increase in root exudation or/and a decrease in reuptake of exuded compounds from the solution. Both hypotheses reflect rapeseed's inability to reuptake exuded compounds or to maintain cell membrane integrity under heat stress. Altogether, these observations indicate that rapeseed plants were impacted by heat stress because they did not develop an adaptive root strategy to maintain their resource-acquisition strategy upon heat stress.

In camelina, C allocation was also modified under heat stress but to a different extent than in rapeseed as vegetative biomass was also reduced and reproductive biomass was reduced by 32% (vs. 26% in rapeseed for the most impacting modality). The PCA analysis suggested that higher temperature intensity and duration were associated to decreased root biomass and root tissue density and increased specific root length which reflects an optimization of root prospection. Unlike rapeseed, camelina plants modified root morphology by allocating C resource to enhance prospection at the expense of thinner root to endure heat stress. These modifications support a shift in plant growth strategy upon stresses (Weemstra et al. 2016; Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). In addition, amounts of C and N in root soluble compounds and in root exudates were not modified under heat stress (or slightly higher for exuded C under the longest stress sequence) which contrasted with rapeseed's response. However, although total amount of exuded organic acids remained unchanged, the composition of the root exudates was modified with an increase in both malate and citrate exudation. An increase of exudation of malate and citrate is usually observed under several abiotic and biotic stresses and both organic acids were shown to help the plants in recruiting beneficial

microorganisms such as PGPR (Rudrappa et al. 2008; Huang et al. 2014) and to improve P and Fe uptake which are involved in stress responses (Hoffland et al. 1989; Hoffland 1992; Jones 1998). In the same way, the increase in some carbohydrates in root exudates like *myo*-inositol could allow the beneficial microorganism recruitment (Vílchez et al. 2020; Wilkinson and Ton 2020). Moreover, soluble carbohydrates constitute a very labile C pool for microorganism feeding in the rhizosphere. Thus, with the increase in carbohydrate exudation, camelina would benefit from a positive feedback by increasing soil microbial activity and then organic matter mineralisation (Haichar et al. 2014), in contrast to the rapeseed that does not modify the exudation of carbohydrates and organic acids.

Overall, our results indicate that camelina and rapeseed demonstrate two different behaviors upon heat stress. While unchanged root morphology along with increased exudation were observed under heat stress in rapeseed, camelina develops a more acquisitive strategy revealed by increased root prospection and modifications of organic acid exudation. Another layer of explanation regarding the contrasting behaviors between the two species relies on their respective breeding history. Intense breeding in rapeseed has fruitfully increased seed yield and quality (Wang et al. 2017 ; Snowdon and Iniguez Luy, 2012) while, camelina did not undergo the same selection pressure (Brock et al. 2018; Luo et al. 2019). Indeed, few varietal selection and domestication efforts have been undertaken in this species since it was largely replaced by rapeseed in the 1950s (Brock et al. 2018; Luo et al. 2019). As a result, traits of resistance to biotic and abiotic stresses were not counter selected in camelina by contrast with rapeseed which genetic pools have been drastically eroded (Esquinas-Alcázar 2005; Moser 2010; Ibrahim and El Habbasha 2015; Soorni et al. 2021). These different selection histories can account for by their different behaviors under heat stress and towards soil microbiota. Eventually, our study highlights that although heat stress from air temperature is sensed mainly by the aboveground plant parts, root functions are impacted too and could act as a buffer organ to attempt readjusting impaired allocation of carbohydrates to the seeds. Moreover, the plant economics spectrum at the reproductive stage in line with the plant development strategies is necessary for the plants to limit heat stress impact and maintain plant fitness. Our work opens perspectives to further studies to decipher the interactions of plants with soilborne microbe communities under heat stress.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Aknowledgments

This work was financially supported by Normandy region by the ALBATOR project and the metaprogram ACCAF “Adaptation to Climate Change in Agriculture and Forest” by INRAE. The authors would like to thank Anne-Françoise Ameline, Magali Bodereau, Josiane Pichon and Josette Bonnefoy for technical assistance. Thanks to Adeline Adam from Unilasalle Beauvais technical plaform for her help in carboxylate data analysis. We are also very grateful to PLATIN’ (PLAteau d’Isotopie de Normandie) for providing facilities and technical support. The authors thank the three anonymous reviewers for their helpful comments that greatly improve the manuscript.

3.2. Annexe méthodologique : Comparaison de différentes méthodes de collecte des exsudats racinaires chez le colza et la caméline

3.2.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors d'une expérimentation visant à comparer différentes techniques de collecte d'exsudats chez nos deux espèces étudiées. Pour cela, des plants de colzas d'hiver et de caméline de printemps ont été cultivés en hydroponie et ont été mis à exsuder à différentes durées dans l'eau ultrapure (30 min, 1h, 2h) et dans différents milieux pendant 1h (i.e. eau ultrapure avec et sans aération et une solution de $CaCl_2$ à 5 mM). Cette expérimentation a eu pour objectif de confirmer que la technique d'exsudation utilisée pour les deux principales expérimentations optimise la caractérisation qualitative et quantitative de l'exsudation racinaire chez les deux espèces. Ainsi, les quantités de C, de N et de sucres solubles ont été analysées dans les exsudats afin d'observer les effets des plusieurs techniques de recueil sur les exsudats.

Principaux résultats

- Une durée d'exsudation de 30 min ne permet pas d'obtenir suffisamment d'exsudats pour avoir une quantification précise du C, du N et des sucres solubles totaux.
- L'ajout d'une oxygénation par la mise en place d'un bulleur diminue la quantité d'exsudats retrouvée.
- Le $CaCl_2$ empêche l'analyse qualitative des exsudats racinaires.
- L'exsudation dans l'eau ultrapure pendant 1h s'avère être la technique présentant les meilleurs compromis (faisabilité technique et précision des analyses) pour nos expérimentations.

3.2.2. Introduction

L'exsudation racinaire est une composante de la rhizodéposition, qui consiste en la libération active par **sécrétion** ou passive par **diffusion** de métabolites permettant divers bénéfices pour la plante (Nguyen 2003; Bais et al. 2006; Badri and Vivanco 2009; Jones et al. 2009). L'exsudation racinaire représente un puits de carbone particulièrement important pour la plante. En effet, entre 5 et 21% du carbone fixé par la photosynthèse est exsudé par les plantes (Nguyen 2003; Haichar et al. 2014). Il a été démontré que des métabolites libérés dans la rhizosphère sont essentiels pour rendre certains éléments disponibles pour la plante par une acidification du milieu via l'exsudation d'acides organiques par exemple ou par l'exsudation d'agent chélateurs (Hoffland et al. 1989, 1992; Jones 1998). L'exsudation permet aussi de recruter certains microorganismes bénéfiques tels que des champignons mycorhiziens chez les espèces mycorhizées ainsi que des bactéries libres permettant d'améliorer le développement et la résistance au stress de ces espèces (Rudrappa et al. 2008; Huang et al. 2014; Vílchez et al. 2020). Cependant, **les approches** visant à **recueillir**, **quantifier** et **déterminer la composition** des exsudats restent très largement discutées dans la littérature (Valentinuzzi et al. 2015; Oburger and Jones 2018; Vives-Peris et al. 2020a; Escolà Casas and Matamoros 2021). En effet, Oburger and Jones (2018) recensent les principales techniques utilisées pour recueillir les exsudats avec leurs avantages et leurs limites. Par exemple, la culture **en hydroponie** des plantes, est une méthode de culture permettant d'obtenir assez facilement une quantité satisfaisante d'exsudats nécessaire pour une analyse quantitative et qualitative de ces derniers. Cependant cette méthode a été décriée car **l'absence de contraintes mécaniques sur le système racinaire** modifie son architecture et son développement, alors considérés comme peu réalistes par comparaison avec ceux d'un système racinaire cultivé dans du sol (Groleau-Renaud et al. 1998). Pour pallier cet inconvénient et néanmoins conserver la simplicité d'une culture hors sol, certains auteurs ont utilisé des colonnes remplies d'un **substrat inerte** (sable, billes de verre) qui permet la croissance (« mécaniquement contrainte ») des racines dans ce substrat et de recueillir le percolat ou le lessivat contenant les exsudats (recueil unique ou en dynamique) (Uselman et al. 2000; Lesuffleur et al. 2007). Dans certains cas, cette méthode reste peu fiable quantitativement car certains métabolites peuvent rester adsorbés sur le substrat et par ailleurs elle permet d'obtenir une plus faible quantité d'exsudats (Oburger and Jones 2018). En plus du choix du systèmes de culture (hydroponie, substrat), **la solution dans laquelle les exsudats sont recueillis** n'est pour le moment pas généralisée (Personeni et al. 2007; Valentinuzzi et al. 2015). Ainsi l'utilisation d'eau ultrapure, préconisée pour les analyses métabolomiques, a longtemps été délaissée car longtemps estimée comme pouvant causer des dommages physiologiques au niveau des cellules racinaires dus à un choc osmotique (Vranova et al. 2013; Oburger and Jones 2018). Ainsi, l'alternative souvent conseillée a consisté à utiliser des **solutions d'exsudation composés de sels minéraux** tels que

le $CaCl_2$ afin de maintenir une certaine tension osmotique (Jones et al. 1995; Shahbaz et al. 2006; Personeni et al. 2007; Valentinuzzi et al. 2015). Cependant, ces sels engendrent souvent des complications lors des analyses qualitatives et ce d'autant plus, lorsqu'il est nécessaire de concentrer les exsudats afin d'atteindre un seuil minimum pour la quantification. De plus, bien qu'il soit possible de réaliser un dessalage, certains composés polarisés sont souvent retenus en même temps, altérant ainsi la composition des exsudats. **L'absence d'un aérateur** dans la solution d'exsudation est aussi souvent critiquée par certains auteurs qui mettent en avant la possibilité d'atteindre des conditions potentiellement hypoxiques ou anoxiques pour la racine. Pour garder les racines en parfaite condition physiologique, certains auteurs préconisent d'ajouter un bulleur dans la solution d'exsudation pour une durée d'exsudation de plus de 3 h (Valentinuzzi et al. 2015). Enfin, **le temps d'exsudation** est un paramètre très variable selon les études allant parfois de quelques minutes jusqu'à une journée entière. L'existence d'un pallier de la concentration en C dans les exsudats a été mis en évidence sur des racines de maïs. Une augmentation rapide de la concentration en C dans la solution d'exsudation a lieu dans les minutes qui suivent la mise en solution jusqu'à une heure puis la concentration atteint un plateau qui a été attribué à un équilibre entre l'efflux d'exsudats et le flux de réabsorption (influx) (Personeni et al. 2007). La généralisation de ce plateau reste à démontrer mais il est vraisemblable que le temps d'atteinte de ce seuil dépend de la plante (espèce, stade, morphologie du système racinaire) et des conditions de recueil (éclairement, rapport volume de solution/ volume de racines). A partir de ces éléments de la bibliographie, il a été jugé nécessaire de tester différentes approches de collecte des exsudats pour obtenir le meilleur compromis entre faisabilité technique et précision d'analyses des exsudats en termes qualitatif et quantitatif. Ainsi dans cette expérimentation annexe, nous avons (i) caractérisé la quantité d'exsudats retrouvée après trois temps d'exsudation différents (30min, 1h et 2h), (ii) comparé les méthodes avec et sans aération de la solution à 1h d'exsudation et (iii) comparé la solution de recueil des exsudats (eau ultrapure et solution saline de CaCl2 à 5mM) à 1h d'exsudation.

3.2.3. Matériel et méthode

3.2.3.1. Culture des plantes

Pour cette expérimentation des graines de colza d'hiver (cv. Aviso) et de caméline de printemps (cv. Calena) ont été semées en serre sur perlite. Après leur levée, les plantules sont disposées dans des pots de 4L en hydroponie, sous une thermo-période contrôlée (20°C/16°C, 16h jour/ 8h nuit) et sous lumière artificielle. Elles sont alimentées avec une solution Hoagland 1/4 pour le colza et une solution Hoagland 1/8 pour la caméline. 5 réplicats pour chaque méthode de collecte d'exsudats (soit 25 pots pour chaque espèce) sont utilisés pour cette expérimentation et un réplicat est constitué d'une

plantule pour le colza et de quatre plantules pour la caméline. Enfin, le système hydroponique est continuellement oxygéné à l'aide d'un bulleur. Au bout de six semaines de culture, les exsudats sont collectés et les plantes récoltées.

3.2.3.2. La collecte des exsudats et récolte des plantes

Les exsudats sont collectés selon cinq méthodes différentes, soit à 30 min, 1h ou 2h dans de l'eau ultrapure, soit 1h dans de l'eau ultrapure avec oxygénation, soit dans une solution de $CaCl_2$ à 5 mM. De plus, l'exsudation étant fortement dépendante de la photosynthèse, tous les réplicats seront mis à exsuder sous lampe et dans la même plage horaire, soit entre 9h30 à 11h30. Les systèmes racinaires sont tout d'abord rincés dans deux bains successifs de 500 mL d'eau ultrapure afin d'enlever un maximum de minéraux provenant de la solution nutritive. Les plantes destinées à une exsudation dans du $CaCl_2$ 5mM sont rincées dans deux bains successifs de $CaCl_2$ 5 mM. Une fois les rinçages réalisés, les plantes sont immédiatement mises à exsuder dans 500 mL pendant 30min, 1h ou 2h dans de l'eau ultrapure stérile (sans oxygénation), soit 1h dans de l'eau ultrapure avec oxygénation, soit 1h dans du $CaCl_2$ à 5 mM sans oxygénation. Après leur recueil, les exsudats sont directement filtrés à 0.2 µm, puis le volume collecté est fractionné dans plusieurs tubes Falcon (contenant chacun 30 mL d'exsudats) pour les différentes analyses. Les sous échantillons sont congelés et lyophilisés.

Les plantes sont récoltées et séparées en trois compartiments (racines, tiges, feuilles). La matière fraiche de chaque compartiment est pesée, les feuilles sont planimétrées, mises à l'étuve à 50°C puis pesées pour obtenir la masse sèche. Les racines sont stockées dans une solution à 10% d'éthanol pour réaliser les analyses morphologiques du système racinaire.

3.2.3.3. Analyse des exsudats racinaires

Les quantités de C et de N et des différents sucres solubles ont été analysées dans les exsudats. Les mêmes méthodes que celle décrites dans la partie 1 du chapitre 3 (Delamare *et al.,* 2023a) ont été utilisées. Brièvement, pour analyser les quantités de C et N exsudées, un aliquote de 30 mL est lyophilisé pour le concentrer 30 fois, puis 400 µL de solution d'exsudats concentrée sont déposés dans des capsules en étain contenant un substrat absorbant inerte (Chromosorb) pour permettre le dosage du C et du N par IRMS (Isoprime, Elementar, Lyon, France). En parallèle, un second aliquote de chaque réplicat, concentré 300 fois est utilisée pour obtenir par HPLC la quantité totale de sucres solubles (correspondant à la somme de chacun des sucres détectés) et le nombre de sucres identifiés pour chacune des techniques.

3.2.3.4. Analyse de la morphologie racinaire

La morphologie racinaire a été analysée comme expliquée dans la partie 1 du chapitre 3 (Delamare *et al.,* 2023a). Brièvement, les racines ont été étalées sur une plaque remplie d'eau osmosée et la longueur racinaire totale a été analysée à l'aide d'un scanner (Epson Expression 10000XL) couplé au logiciel Winrhizo – (WINRHIZO™ software- Regent Instruments Inc., Canada). Ensuite les racines ont été séchées à 50°C pendant 48h afin d'obtenir la masse sèche de racines.

3.2.4. Résultats

3.2.4.1. Comparaison de la morphologie des plantes selon les différentes techniques de collecte des exsudats

Il n'y a pas de différences de biomasse totale, de surface foliaire, ni de longueur de racines totale selon les différentes techniques d'exsudation pour le colza ni la caméline (Fig.1 (Chap.3.2)). Ainsi, la comparaison des techniques d'exsudat peut se faire sans influence de la morphologie ou de la biomasse.

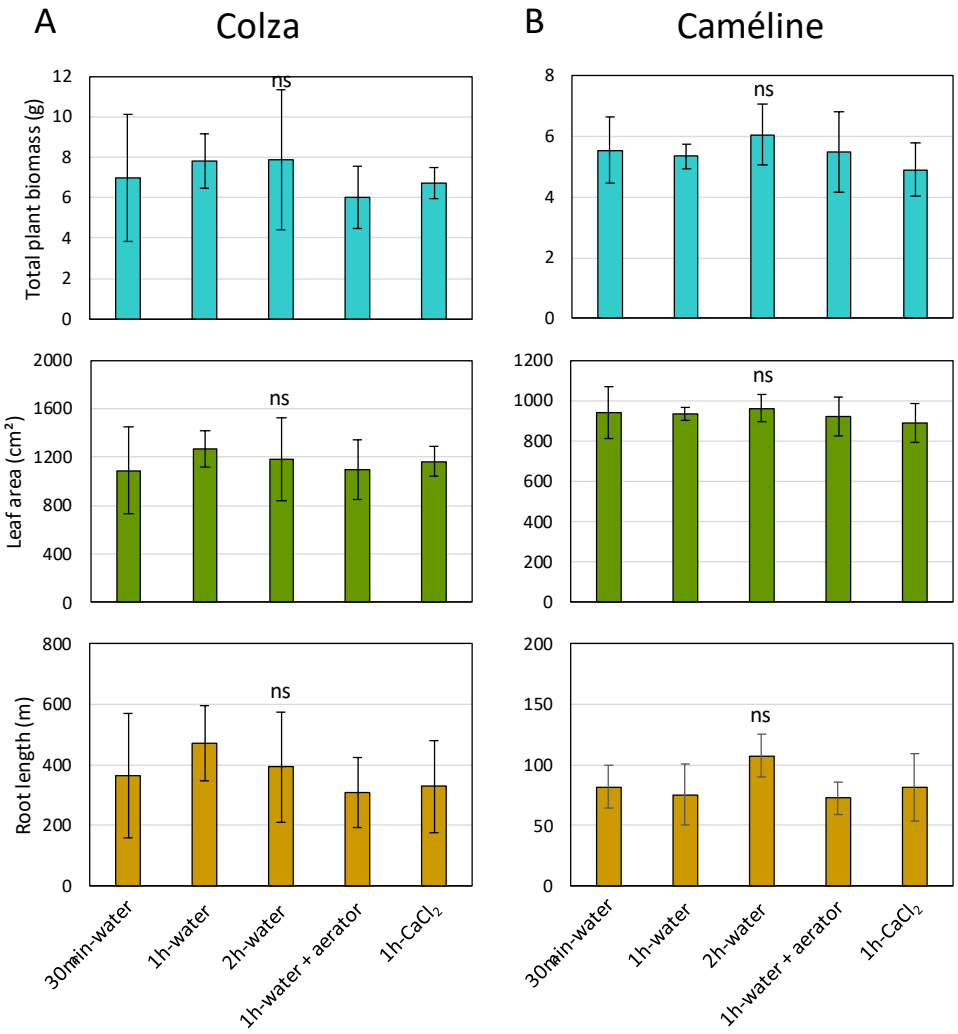


Figure 1 (Chap.3.2) : Moyennes (n=5) de la biomasse totale, de la surface foliaire et de la longueur racinaire totale des colzas (A) et camélines (B) utilisées pour les différentes techniques d'exsudation. Les valeurs individuelles correspondent à la somme de quatre individus pour la caméline. Les barres verticales correspondent aux écart-types. Non significatif (ns).

3.2.4.2. Effet des différentes techniques de collecte des exsudats sur la quantité de C, de N et de sucres exsudés

Pour le colza, les quantités de C et de N tendent à augmenter entre 30min et 1h et entre 1h et 2h (Fig.2A (Chap.3.2)). De plus, des conditions d'aération dans l'eau ultrapure pendant 1h réduisent les quantités de C et de N par rapport à des conditions sans aération. A l'inverse, l'exsudation pendant 1h dans du $CaCl_2$ tend à augmenter la quantité de C et N retrouvés dans les exsudats en comparaison à 1h dans l'eau ultrapure (Fig.2A (Chap.3.2)). Pour la caméline, les quantités de C et de N augmentent significativement entre 30min et 1h et tendent à augmenter entre 1h et 2h (Fig.2B (Chap.3.2)). Comme pour le colza, l'exsudation pendant 1h dans l'eau ultrapure avec aérateur réduit significativement les quantités de C et N par rapport à des conditions sans aérateur. A l'inverse, les quantités de C et N retrouvés dans les exsudats sont significativement plus élevés lorsque les plantes ont exsudé dans le $CaCl_2$ pendant 1h en comparaison d'une exsudation pendant 1h dans l'eau ultrapure (Fig.2B (Chap.3.2)). Enfin, les différentes techniques de recueil du C et N dans les exsudats sont classés de la même façon pour le colza et la caméline (Fig.2 (Chap.3.2)).

La quantité de sucres retrouvée dans les exsudats de colza et de caméline est significativement plus importante à 2h en comparaison des autres traitements (Fig. 3A et B (Chap.3.2)). Pour les deux espèces, la quantité de sucres augmente avec le temps d'exsudation. De plus, l'exsudation à 1h avec oxygénation et à 1h dans du $CaCl_2$ sont les deux traitements présentant le moins de sucres dans leurs exsudats (Fig. 3A et B (Chap.3.2)).

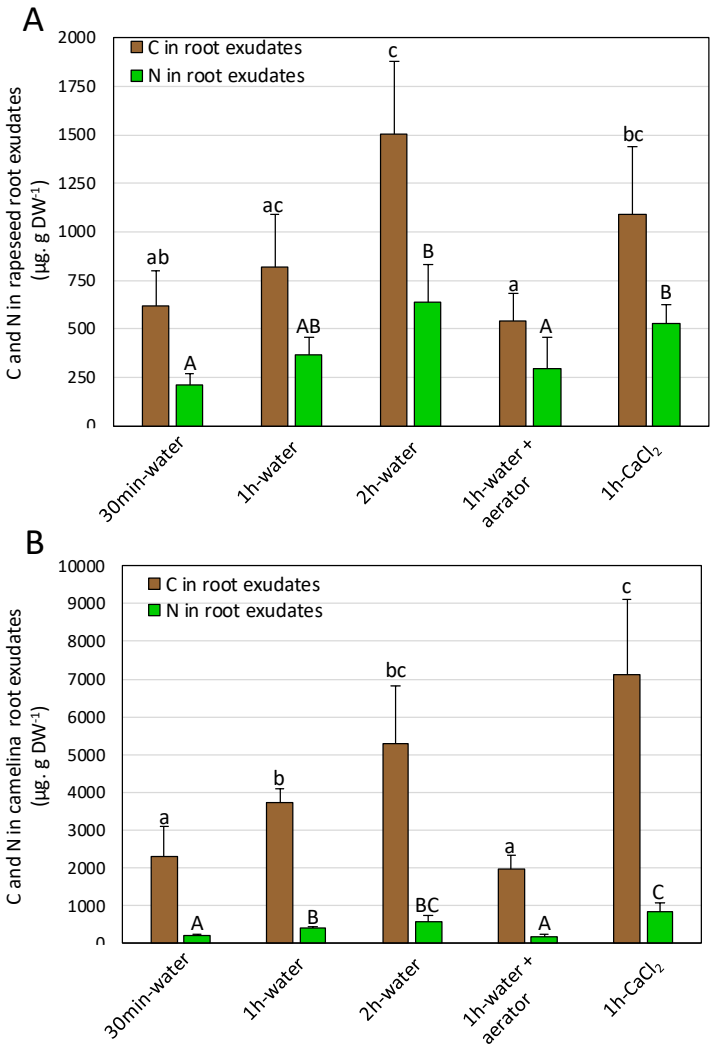


Figure 2 (Chap.3.2) : Moyennes (n=5) des quantités de C et de N retrouvés dans les exsudats de colza (A) et de caméline (B) pour les différentes techniques d'exsudation. Les lettres minuscules représentent les différences significatives entre les traitements pour le C alors que les lettres majuscules représentent les différences significatives entre les traitements pour le N. Les valeurs individuelles correspondent à la somme de quatre individus pour la caméline.

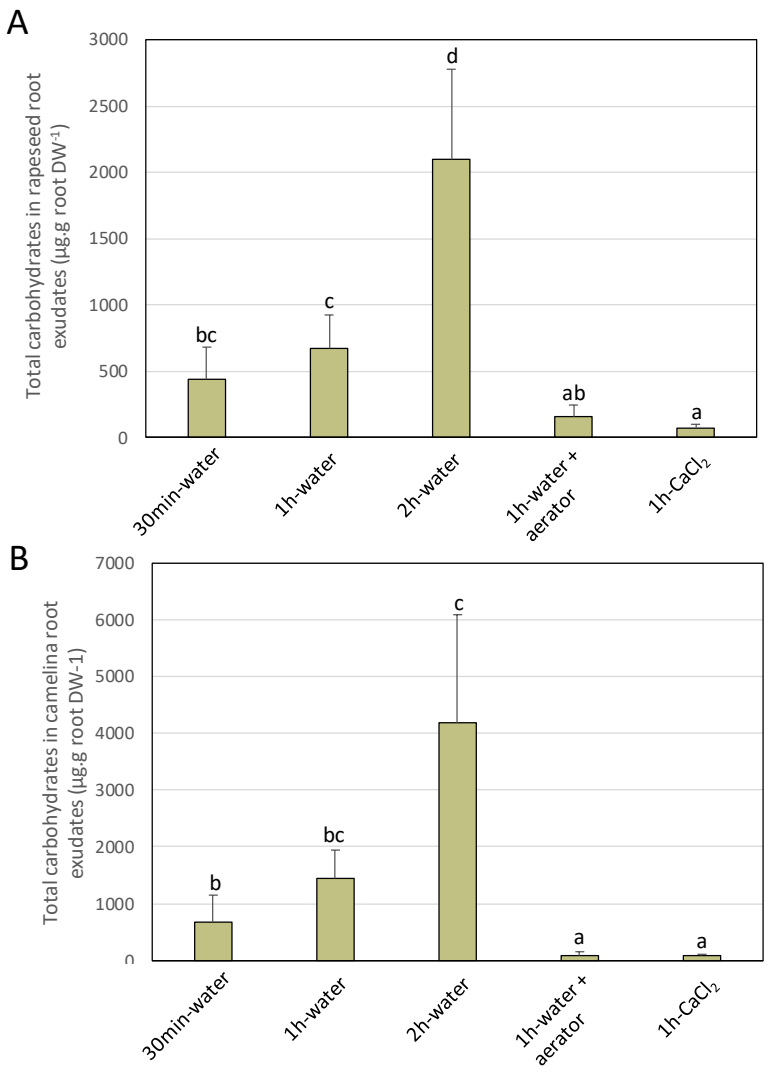


Figure 3 (Chap.3.2) : Moyennes (n=5) des quantités en sucres solubles totaux retrouvés dans les exsudats de colza (A) et de caméline (B) pour les différentes techniques d'exsudation. Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements. Les valeurs individuelles correspondent à la somme de quatre individus pour la caméline.

3.2.5. Discussion

L'exsudation racinaire varie en fonction du **temps d'exsudation**. En effet, la quantité de C retrouvée dans les exsudats de colza et de caméline double entre 30min et 2h et celle de N est triplée dans l'eau ultrapure. La quantité totale en sucres est multipliée par cinq pour le colza et 6 pour la caméline entre 30min et 2h dans l'eau ultrapure. Enfin l'exsudation à 1h dans l'eau ultrapure est intermédiaire aux deux autres durées d'exsudation. Ces résultats sont en accord avec d'autres publications qui montrent que **le temps d'exsudation à une influence sur la quantité de C et des métabolites** retrouvés dans la solution de collecte des exsudats (Personeni et al. 2007; Valentinuzzi et al. 2015). Dans Personeni et

al. (2007), les auteurs observent, chez le maïs, qu'à partir de 1h d'exsudation, la quantité de C exsudé arrive à un plateau et n'augmente plus, en raison d'un équilibre entre l'exsudation et la réabsorption réalisées par la plante. Contrairement à cette étude, nos résultats montrent que la quantité de C retrouvée dans les exsudats continue d'augmenter entre 1h et 2h d'exsudation. Toutefois, cela suggère que l'existence de ce plateau peut être dépendant de l'espèce et des conditions de recueil des exsudats, en supplément des autres facteurs influençant l'exsudation (cf. Chapitre 1). Cependant, si l'expérimentation sur colza et cameline devait être prolongée au-delà de deux heures pour atteindre un plateau, un défaut d'oxygénation des racines serait probable et compromettrait également la fiabilité des résultats.

Dans cette expérimentation lorsque l'on compare l'exsudation pendant 1h dans de l'eau ultrapure avec et sans oxygénation, nous pouvons observer une moindre quantité de C, de N (entre 1.5 et 2 fois moins avec oxygénation) et de sucres (4 fois moins pour le colza et 16 fois moins pour la caméline avec oxygénation) dans les exsudats. Une des hypothèses à ces observations pourrait être que l'oxygénation, qui induit la formation de très nombreuses bulles dans la solution et à la surface des racines, pourrait diminuer les surfaces d'échanges avec la solution d'exsudation et par conséquent limiter la diffusion dans la solution, des exsudats qui sont majoritairement constitués de composés solubles. L'hypothèse d'un effet de l'anoxie sur les racines à 1h sans oxygénation pourrait être écarté pour nos deux espèces étant donné que les apex n'étaient pas abimés, lors de l'observation visuelle. Ces espèces cultivées semblent donc peu sensibles à 1h sans oxygénation. D'autant plus que l'on peut facilement imaginer que lors d'événements pluvieux intenses, ces espèces sont fréquemment confrontées au champ à de l'eau stagnante dans les premiers horizons, pendant quelques heures, notamment sur sols argileux. De plus, il a été démontré chez le lupin, une légumineuse particulièrement sensible à l'anoxie, qu'il n'était pas nécessaire d'apporter une oxygénation de la solution d'exsudation en dessous de 3h d'exsudation (Valentinuzzi et al. 2015). Néanmoins, pour des espèces particulièrement sensibles à l'anoxie racinaire, des systèmes d'aspersion projetant des gouttelettes d'eau au contact des racines (aéroponie) peuvent être envisagés.

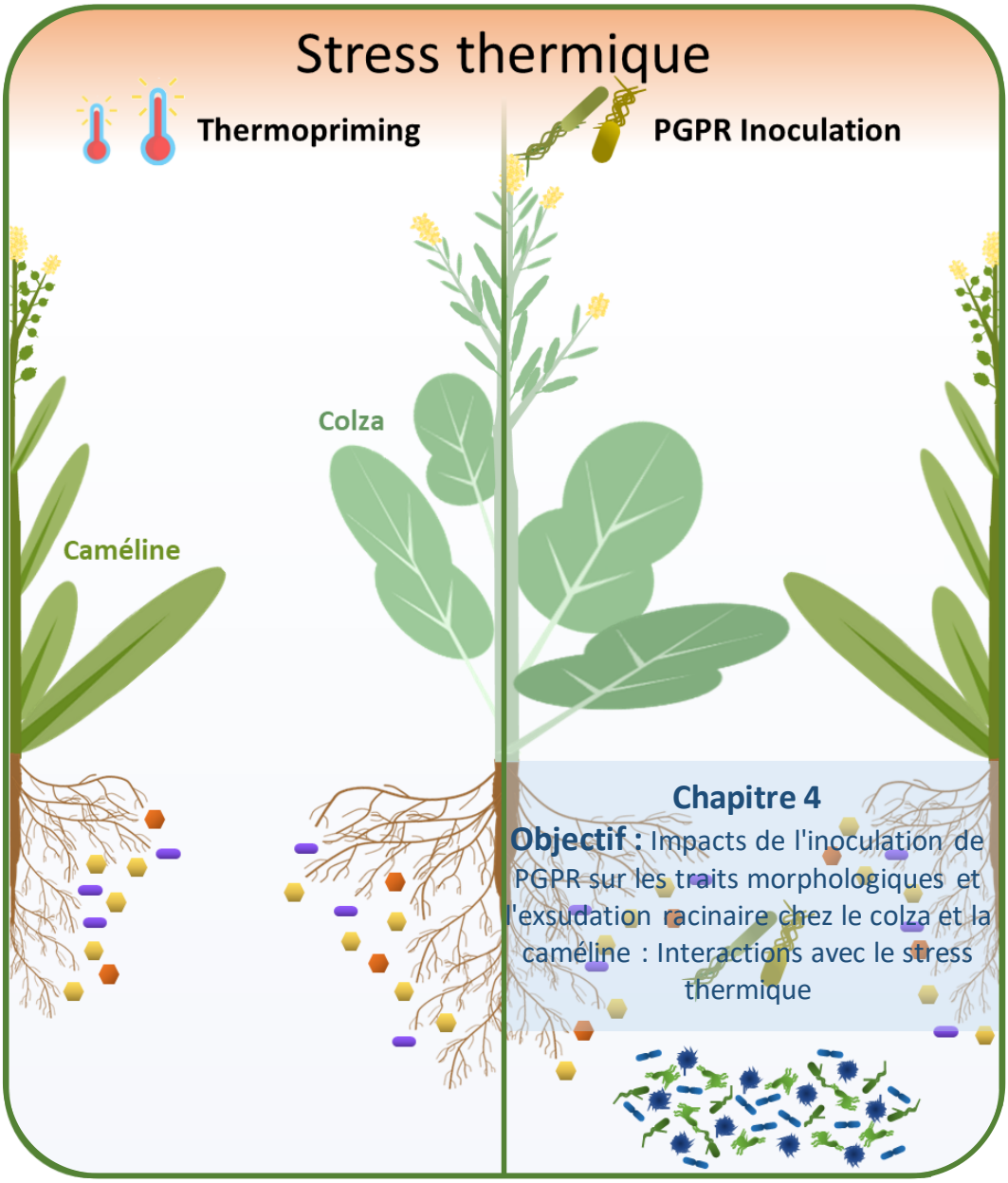
Ces résultats montrent que la solution d'exsudation a un impact sur l'exsudation racinaire. En effet, lorsque l'on compare l'exsudation pendant 1h dans l'eau ultrapure avec l'exsudation pendant 1h dans du $CaCl_2$ à 5mM, nous avons pu observer de plus importantes quantités de C et N retrouvées dans les exsudats récupérés dans du $CaCl_2$ (tendance pour le colza, significatif pour la caméline). Ces résultats vont dans le sens d'autres études qui ont montré que la composition de la solution d'exsudation peut modifier la quantité et la composition des exsudats racinaires (Oburger et al. 2013; Valentinuzzi et al. 2015). De plus, dans cette expérimentation, le $CaCl_2$ semble augmenter l'exsudation en comparaison de l'eau ultrapure. Ces résultats ne vont donc pas dans le sens de possibles désorganisation ou lésions

des membranes des cellules racinaires suite à un choc osmotique. En effet, un éclatement des cellules aurait engendré une augmentation de la quantité de C retrouvée dans les exsudats en comparaison du $CaCl_2$ qui est utilisé pour maintenir une tension osmotique autour des racines pour les protéger. Enfin, la très faible quantité de sucres retrouvée dans les exsudats obtenus avec le $CaCl_2$ s'explique par une difficulté de l'analyse qualitative de ces exsudats. En effet, afin d'analyser la qualité des exsudats et quantifier la composition en sucres par HPLC, il n'est nécessaire de concentrer les exsudats par lyophilisation. Cependant, lorsque les exsudats sont concentrés, le $CaCl_2$ provenant de la solution d'exsudation est lui aussi très fortement concentré. Ainsi, cette importante quantité de sel va perturber l'analyse par HPLC et totalement modifier le chromatogramme, le rendant très difficilement analysable. Cet effet des sels sur les analyses qualitatives est particulièrement connu et reste l'une des principales raisons de leur faible utilisation lors de l'analyse des exsudats (Oburger et al. 2013; Valentinuzzi et al. 2015). De plus, bien qu'un dessalage soit possible, cette technique a tendance à retirer la majeure partie des composés polaires tels que les acides organiques ce qui va donc impacter le profil et la quantification de certains métabolites particulièrement importants dans les exsudats (Oburger et al. 2013).

En conclusion, cette expérimentation confirme que la méthode de collecte des exsudats consistant à tremper les racines pendant 1h dans de l'eau ultrapure et sans bullage parait être un compromis acceptable dans notre cas et pour nos espèces d'intérêt. En effet, l'exsudation pendant un temps d'1h nous permet (i) d'obtenir une quantification en C, N et des composés étudiés satisfaisante en comparaison à une durée d'exsudation de 30 min (très proche de la limite de détection des appareils) et (ii) de se prévenir suffisamment d'un potentiel effet anoxique de la solution d'exsudation en comparaison à une durée de 2h. Etant donné, la faible probabilité d'un effet anoxique à 1h, la suppression de l'oxygénation par bullage, nous permet aussi d'obtenir des quantités suffisantes d'exsudats. Enfin, de par la difficulté d'analyses des exsudats, l'utilisation de l'eau ultrapure au détriment du $CaCl_2$ paraît être le meilleur compromis, d'autant plus qu'aucun effet négatif de l'eau ultrapure n'a été détecté pendant cette expérimentation. Pour confirmer ces résultats, il pourrait être intéressant de réaliser des observations microscopiques des racines afin de détecter la présence d'éventuelles lésions.

Il serait nécessaire de tester ces différentes méthodes de collecte sur un plus grand nombre d'espèces, de stades de développement et de conditions abiotiques afin de déterminer si un protocole généralisable est possible, ce qui simplifierait les comparaisons entre expérimentations, ou s'il est nécessaire de définir au préalable la meilleure méthode pour chaque espèce.

Chapitre 4 : Impacts de l'inoculation de PGPR sur les traits morphologiques et l'exsudation racinaire chez le colza et la caméline : Interactions avec le stress thermique



Impacts de l'inoculation de PGPR sur les traits morphologiques et l'exsudation racinaire chez le colza et la caméline : Interactions avec le stress thermique

4.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à la seconde expérimentation visant à atténuer les effets d'un stress thermique par l'utilisation de deux bactéries PGPR (*Pseudomonas sp.* C32 et *Pseudomonas ogarae* F113) (Fig.17). Pour cela, une culture de colza d'hiver et de caméline de printemps a été réalisée en condition hybride sol/hydroponie. Au stade reproducteur, les plantes ont été soumises à un stress thermique précédé ou non de deux inoculations avec les bactéries PGPR. Les effets de ces bactéries en condition de stress thermique et en condition contrôle ont été observés à plusieurs temps au cours du stade reproducteur. L'objectif principal de cette expérimentation est d'analyser les effets de l'inoculation sur la morphologie et l'exsudation racinaire en combinaison ou non avec un stress thermique intense. La culture des plantes, l'analyse de la morphologie racinaire ainsi que les analyses quantitatives et qualitatives des exsudats ont été réalisées lors de la deuxième année de thèse. L'analyse des résultats fait l'objet d'un article accepté en 2023 dans la revue Physiologia Plantarum (Delamare et al. 2023b). Les données supplémentaires de cet article sont présentées dans l'annexe 3.

Principaux résultats

- Le colza semble maintenir son exsudation carbonée bien qu'une partie de ces exsudats soit consommée par les bactéries, entrainant un effet puits supplémentaire au détriment de la plante.
- La caméline n'ajuste pas la perte du C dans ses exsudats et priorise ainsi son développement. De plus, elle modifie la composition de ses exsudats en augmentant l'exsudation de composés connus pour permettre des interactions avec les PGPR (e.g. malate, citrate, myo-inositol).
- En condition de stress thermique, le processus d'exsudation du colza est subi et principalement piloté par les PGPR alors que chez la caméline, ce processus est contrôlé pour permettre davantage d'allocation de C au développement de la plante.

Impact of PGPR inoculation on root morphological traits and root exudation in rapeseed and camelina: interactions with heat stress

Jérémy Delamare[1], Sophie Brunel-Muguet[1], Amine M. Boukerb[2], Mélanie Bressan[3], Lucien Dumas[1], Stéphane Firmin[4], Fanny Leroy[5], Annette Morvan-Bertrand[1], Claire Prigent-Combaret[6], Emmanuelle Personeni[1]

[1]Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

[2]Univ Rouen Normandie, Unité de Recherche Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses, CBSA UR4312, 27000, Évreux, France

[3]UniLaSalle, SFR NORVEGE FED 4277, AGHYLE Rouen UP 2018.C101, 76130 Mont Saint Aignan, France

[4]UniLaSalle, AGHYLE Beauvais UP 2018.C101, 60000 Beauvais, France

[5]Normandie Université, UNICAEN, Unité de Services EMERODE, PLATeau d'Isotopie de Normandie (PLATIN'), Caen, France

[6]Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, INRAE, VetAgro Sup, UMR5557 Ecologie Microbienne, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

Root exudation is involved in the recruitment of beneficial microorganisms by trophic relationships and/or signalling pathways. Among beneficial microorganisms, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) are known to improve plant growth and stress resistance. These interactions are of particular importance for species that do not interact with mycorrhizal fungi such as rapeseed (*Brassica napus* L.) and camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz). However, heat stress is known to have a quantitative and qualitative impact on root exudation and could affect the interactions between plants and PGPR. We aimed to analyse the effects of PGPR inoculation on root morphology and exudation in rapeseed and camelina at the reproductive stage. The modulation of the effects of these interactions under heat stress was also investigated. The plants were inoculated twice at the reproductive stage with two different *Pseudomonas* species and were exposed to heat stress after the second inoculation. In non-stressing condition, after bacterial inoculation, rapeseed and camelina exhibited two contrasting behaviours in C root allocation. While rapeseed plants seemed to undergo the interactions with the bacteria, camelina plants appeared to control the relationship with the PGPR by modifying the composition of their root exudates. Under heat stress, the plant-PGPR interaction was unbalanced for rapeseed for which the C allocation strategy is mainly driven by the C cost from the bacteria. Alternatively, camelina plants prioritized C allocation for their own above ground development. This work opens up new perspectives for understanding plant-PGPR interactions, especially in abiotic stress context.

4.2. Introduction

The passive and controlled diffusion of root exudates resulting in the release of organic compounds into the rhizosphere is involved in diverse processes (Nguyen 2003; Badri and Vivanco 2009; Huang et al. 2014). These exuded compounds can help the plants to improve resources acquisition either directly by enhancing nutrients availability such as for phosphorus and iron which are mainly under insoluble forms (Hoffland et al. 1992; Jones 1998) or/and indirectly by providing resources or signalling cues to the soil biotic environment. These later mechanisms allow interactions with the microorganisms in the rhizosphere to be established by providing labile carbon sources for microorganisms development, thus stimulating the soil nutrient cycling (Nguyen 2003; Badri and Vivanco 2009; Jones et al. 2009; Haichar et al. 2014). Moreover, plants can select microorganisms to trigger specific and beneficial microbial responses that positively impact their physiology and development (Santoyo 2022). Indeed, several exuded compounds such as organic acids, e.g. malate and citrate (Rudrappa et al. 2008; Huang et al. 2014) and carbohydrates including polyalcohols, e.g. *myo*-inositol (Vílchez et al. 2020) play a part in recruitment processes and in the selection of soil microorganisms (Bais et al. 2006; Hartmann et al. 2009; Huang et al. 2014; Eisenhauer et al. 2017). Among the microorganisms that are likely to be recruited by plants, the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) have beneficial effects that are widely documented (Vessey 2003; Vacheron et al. 2013; Ahemad and Kibret 2014; Pérez-Montaño et al. 2014; Lastochkina et al. 2019). Due to their specific characteristics, PGPR enhance directly or indirectly plant growth. These bacteria could prevent plants from damages and growth reduction by competing with potentially pathogenic soil microorganisms (Lugtenberg and Kamilova 2009; Ahemad and Kibret 2014; Besset-Manzoni et al. 2019). However, most of the beneficial actions of PGPR directly target the plants. Indeed, PGPR are generally applied to increase plant growth as biofertilizer agents on field crops (Ahemad and Kibret 2014; Kumar et al. 2022). Additionally, the use of PGPR for abiotic stress plant resistance is also an increasingly intended alternative to the use of stress tolerant varieties which are not systematically available (Dimkpa, Weinand and Asch, 2009; Meena et al., 2017; Goswami and Deka, 2020). Several PGPR-triggered mechanisms that alleviate the deleterious effects of abiotic stresses on plants have been demonstrated (Meena et al. 2017; Lastochkina et al. 2019; Shekhawat et al. 2022). They include auxin synthesis which leads to modifications of the plant hormones or the production of ACC deaminase which decreases plant ethylene levels (Dimkpa et al. 2009; Grover et al. 2011; Abd El-Daim et al. 2014; Vacheron et al. 2016; Meena et al. 2017; Lastochkina et al. 2019; Shekhawat et al. 2022). Among bacteria with known PGPR activities, the *Pseudomonas* genus gathers a large number of these plant-beneficial rhizobacteria (Adesemoye and Ugoji 2009; Santoyo et al. 2012; Chandra et al. 2018). PGPR interactions are particularly important for plant families that have little or even no interaction with mycorrhizal fungi like Brassicaceae (Cosme et al. 2018). These species

have probably favoured a specific strategy promoting their relationships with non-symbiotic microorganisms in order to improve their nutrients uptake and stress resistance (Gkarmiri et al. 2017; Hilton et al. 2021), through the establishment of large root systems and enhanced root exudation (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022).

Among abiotic stresses, heat stress is one of the most deleterious disturbance leading to major impact on crop development and quality of harvested plant parts (Jha et al. 2014; Bakhshandeh et al. 2019). Indeed, the increase in temperature negatively impacts yield of aboveground plant parts and the leaf biomass in particular (Wahid et al. 2007; Allakhverdiev et al. 2008). In Brassicaceae, especially in winter rapeseed (*Brassica napus* L.), high temperature events at the reproductive stages impair pollination, seed development and filling, leading eventually to seed yield penalties and lower seed quality (Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021; Kourani et al. 2022). The vegetative parts of rapeseed plants are also impacted by heat stress as a consequence of impairment of the photosynthetic activity and leaf development (Dikšaitytė et al. 2019; Kourani et al. 2022). Heat stress impacts in camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) have been less documented so far. However, some evidence of sensitivity to heat stress has also been observed in this species, thus affecting yields (Ahmad et al. 2021b; Waraich et al. 2021). In most studies on Brassicaceae, heat stress effects were mainly highlighted on seeds, as being the valuable plant parts, although the belowground parts are also impacted by heat stress. Indeed, roots are particularly sensitive to heat and increases in temperature are known to reduce root biomass and lead to modifications of root morphology (Xu and Huang 2001; Yuan et al. 2016; Calleja-Cabrera et al. 2020). In camelina, decrease in the root dry weight and root length were observed under intense heat stress (Waraich et al. 2021). These modifications in root morphology are likely to decrease nutrients and water acquisition by the root system. On the contrary, other studies reported an increase in carbon (C) allocation to belowground parts (Mainali et al. 2014; Giri et al. 2017) which lets assume positive impacts on the root features. Indeed, the C allocated to the roots contribute to C-cost efficient root prospection as observed with a higher specific root length (SRL) under high temperatures (Bakhshandeh et al. 2019). Moreover, the increase in C allocation to the roots may also generate an increase of root exudation of organic compounds.

So far, very few studies have explored the impacts of heat stress on root exudation (Vives-Peris et al. 2018; Delamare et al. 2023a). In coniferous trees, the C exuded per root biomass has been shown to increase with a heat stress (Yin et al. 2013b, a). Using labelled ^{13}C experiments, two Poaceae species were shown to release more C in the rhizosphere under higher temperature, which suggests that more C was exuded by the plants under heat stress conditions (Mainali et al. 2014; Bakhshandeh et al. 2019). Besides these quantitative features, the quality of the root exudates is also altered. In Sorghum (*Sorghum bicolor*), the amount of phenolic and antioxidants compounds in exudates were increased by heat which demonstrates that this species tends to limit the negative effect of heat stress by

increasing the synthesis of defence compounds (Yaqoob et al. 2020). In two lemon tree species, it was also observed that the amounts of proline in exudates changed under heat stress (Vives-Peris et al. 2017). Moreover, the responses of heat stress are species-dependant and vary with the features of the stressing event (Vives-Peris et al. 2017). In a recent study in maize, results illustrated a similar trend showing that heat stress modified the composition of the root exudates, with modifications of the carboxylates and the amino acids profiles (Tiziani et al. 2022). Because interactions between plants and soils microorganisms mainly rely on plant root exudation, it is likely that heat stress-induced modifications of the root exudates amount and composition will unbalance their relationships with rhizosphere microorganisms (Compant et al. 2010; Vescio et al. 2021). In return, modifications of root exudates in terms of amount and quality can be a strategy for the plants to improve PGPR recruitment and eventually to help them overcome the effects of heat stress. This raises the importance to better understand plant processes that determine positive or negative interactions with soil beneficial microorganisms upon heat stress, in particular, in Brassicaceae such as rapeseed and camelina.

In this context, our study aimed to (i) compare two PGPR in terms of phylogeny, PGPR activities and metabolisms and analyze whether (ii) inoculations with these PGPR at bolting and at the onset of the reproductive stage can modify root morphology and exudation in camelina and rapeseed, (iii) to what extent each species can adjust the composition of root exudates to fine tune the interactions with the PGPR.

4.3. Materials and Methods

4.3.1. Plant cultivation

Rapeseed (*Brassica napus* L.) *cv*. Aviso (winter variety) and Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) *cv*. Calena (spring variety) were grown from 2021 to 2022 in a greenhouse located at the University Caen-Normandy (49◦11′ 09 N, 0◦21′ 32 W, Caen, France). Rapeseed seeds were sown in October 2021 in perlite under semi-controlled thermo-photoperiod of 19.1°C (±1.3°C; day-16 h) and 16.6°C (±0.8°C; night-8 h). Camelina seeds were sown at the end of March 2022 under semi-controlled thermo-photoperiod of 19.7°C (±1.5°C; day-16 h) and 17.1°C (±1°C; night-8 h) into sandy soil. At the two-leaves stage, the plants were transplanted into 4 L pots for rapeseed and 2 L pots for camelina containing sandy soil. In each camelina pot, four individuals were transplanted to obtain sufficient plant material to harvest and in each rapeseed pot, only one individual was transplanted. The plants were supplied with 25% Hoagland solution consisting of 1.25 mM $Ca(CO_3)_2$, $4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14µM H_3BO_3, 5µM $MnSO_4$, 3µM $ZnSO_4$, 0.7µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7µM $CuSO_4$, 0.1µM $CoCl_2$ up to the 12-leaves stage for rapeseed and until early flowering for camelina. At the 12-leaves stage, rapeseed plants were vernalized for 13 weeks in a cold chamber at

5.5°C (±1.4°C) (standard model, Froid & Mesures, Beaucouzé, France) with an artificial light for daytime (10 h day/14 h night) and supplied with a 25% Hoagland solution deprived of sulphur and nitrogen. At the onset of flowering, camelina were supplied with a 12.5% Hoagland solution in order to limit nutrient excess in soil. At the end of the vernalization period, rapeseed plants were transferred into the greenhouse under natural photoperiod and under semi-controlled thermal conditions without addition of light (on average from the end of the vernalization until the beginning of the heat modality 18.6°C (±1.6°C; day) and 17.3°C (±1°C; night). Two weeks after the vernalization period for rapeseed and at the beginning of the stem elongation stage for camelina, 48 pots of each species were placed in hydroponic system in 4 L pots containing 25% Hoagland without N and S for rapeseed and 12.5% Hoagland for camelina. The system was oxygenated using an aerator. Thus, each hydroponic pot contained one individual for rapeseed and four individuals for camelina, as with soil pots. For rapeseed, fractions of N and S were weekly provided so as to cover the full requirements of N and S fertilizers that matched the conventional recommendations for field-grown rapeseed plants, as calculated in Magno Massuia de Almeida et al. (2021) for pot experiments. Prior to their transfer, the substrate around the roots was carefully removed to limit mechanical root injuries according to the soil-hydroponic-hybrid method described in Oburger & Jones (2018). The nutritive solution of the hydroponic plants was renewed every week.

4.3.2. Comparative analysis of PGPR characteristics and inoculation

PGPR strains

Two bacterial strains were used in this study i.e. *Pseudomonas ogarae* F113 which was isolated from sugar beet rhizosphere in Ireland and known for its PGPR effects (Shanahan et al. 1992; Vacheron et al. 2016, 2018; Blanco-Romero et al. 2022) and *Pseudomonas sp* C32 which was isolated from rapeseed rhizosphere in France (Amy et al. 2022) with promising PGPR characteristics detected in vitro.

Whole genome characterization of Pseudomonas sp. C32

In order to decipher the taxonomic status of strain C32, its genome sequence was obtained following genomic DNA extraction, detection and qualification using agarose gel electrophoresis and Qubit 4.0 fluorometer (Thermo Scientific). Library preparation was achieved using the Nextera Flex kit (Illumina), and sequenced on an Illumina Miseq system using the 2×250 paired-end protocol. The draft genome sequence of strain C32 was deposited at Genbank under the Bioproject accession number PRJNA990826 (with BioSample accession number SAMN36276709, SRA accession number SRR25146787, and GenBank genome assembly accession number JAUHUK000000000). Default parameters were used for all bioinformatic tools unless otherwise noted. TrimGalore v.0.6.2 (Krueger

2015) was used for reads trimming, and read quality was checked with FastQC v.0.11.9 (Andrews 2010). Raw paired-end reads were *de novo* assembled with Unicycler v.0.5.0. (Wick et al. 2017) and bbmap v39.01 (Bushnell 2014) was used to estimate genome coverage. Structural gene prediction and functional annotation were carried out using the Bakta pipeline v.1.14.0. (Schwengers et al. 2021). Average nucleotide identity (ANI) between C32 and the genome sequences of 316 type-species of the *Pseudomonas* genus (downloaded from NCBI database as on 30th April 2023) was calculated using PYANI v.0.2.7 (Pritchard et al. 2016) with blast option in order to calculate their intergenomic similarity. Then, the fifteen closest species to C32 were selected of another ANI analysis coupled to the Genome-to-Genome Distance Calculator analysis (GGDC; Meier-Kolthoff et al. 2022). The latter being used to get values of the *in silico* DNA-DNA hybridization. As recommended for draft genomes, the *is*DDH model "formula2" was applied. In addition, alignment and phylogenetic tree (using maximum-likelihood method with bootstrap values based on 1000 replications) were obtained from the concatenated sequences of the 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* and *rpoD* genes of these fifteen closest *Pseudomonas* species using ClustalX (Larkin et al. 2007) and MegaX (Kumar et al. 2018), respectively. The phylogenetic analyses were carried out using *Cellvibrio japonicus* Ueda107^{T} as the outgroup.

Indole-3-Acetic Acid production quantification

As explained in Amy et al. (2022), IAA bacterial production was determined with the method described by Kumar et al. (2012). Briefly, the two strains were pre-cultivated in liquid LB medium for 24 h. 50 mL of liquid NB medium were supplemented with 1 µg.mL^{-1} D-L-tryptophan and inoculated with 500 µL of pre-culture and incubated at 30°C under orbital agitation (120 rpm) in the dark for 48 h. The quantities of IAA were estimated by colorimetric reaction. Cultures were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm and 4°C. Then, 1 mL of supernatant was added to 4 mL of Salkowski reagent, and the absorbance of the pink coloration was read at 535 nm, at the same time as a standard IAA calibration curve, in a UV/visible spectrophotometer Varian Cary® 50 Scan (Varian Medical Systems, USA, Palo Alto).

ACC deaminase activity quantification

As explained in Vacheron et al. (2018), the quantification of ACC deaminase activity of the two strains was performed following the method in Penrose and Glick (2003). This method is based on the deamination of ACC into α-ketobutyrate by the enzyme ACC deaminase and then on the quantification of the α-ketobutyrate by colorimetric reaction at 540 nm, by comparison with a α-ketobutyrate standard curve. To express the data in nanomoles of ketobutyrate per milligram of protein, total protein content in the assay was measured using BCA protein assay kit (Pierce). ACC deaminase activity was measured four times for each strain.

PGPR carbon sources use determination

To quantify the potential utilisation of carbon sources of the two bacteria, the Biolog GEN III system (BIOLOG, Inc, Hayward, CA, USA) was assessed by absorbance measurement using a Biolog Microstation® (Biolog, USA, Hayward), according to the Biolog GEN III procedure.

PGPR inoculation

The two bacteria were cultivated in LB medium with shaking (150 rpm), at 30°C for 16 h. At the exponential growth phase, the media was removed and replaced by $MgSO_4$ at 10mM and the inoculum was diluted at the concentration of $1x10^6$ cells/ml. Then, 10 mL of each of these inocula were directly added to the nutritive solution in order to provide $1x10^7$ CFU per pot. The same amount of $MgSO_4$ was also provided for the control and heat stressed plants to ensure similar nutritional condition to the plants grown with the bacteria (with or without heat stress exposure). The PGPR were inoculated at the same growth stage for rapeseed and for camelina. The first PGPR inoculation was applied at the end of the vegetative stage in both species, i.e. 10 and 2 days after the transfer to the hydroponic system, for rapeseed and camelina respectively i.e. matching GS30 and GS31 for rapeseed and camelina, respectively (Lancashire et al. 1991; Martinelli and Galasso, 2011). The second PGPR inoculation was applied 5 days before the heat stress i.e. 319°Cd after flowering for rapeseed i.e. GS72 (base temperature 5°C, Morrison et al. 1989) and 166°Cd after flowering for camelina i.e. GS72 (base temperature 0°C, Allen et al., 2014).

4.3.3. Heat stress modality application

The temperature value of the intense heat stress event was chosen in order to be consistent with the temperature projections over the spring period (from mid-April to mid-May) by 2100 according to the most pessimistic scenario (SSP5-8.5; IPCC 2021). The heat stress modality was applied at the same growth stage for rapeseed and for camelina (i.e. GS72). Therefore, the heat modality was applied at 389°Cd (degree-days, °Cd) after flowering for rapeseed and 255°Cd after flowering for camelina. For rapeseed, the heat modality, herein named “Heat Stress” (HS) consisted of 5 days at 26.63°C ± 1.21/16.25°C ± 0.77 (day/night) with daily heat peak for 5 h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.27°C ± 0.79. The temperatures for the control modality were 21.16°C ± 1.66/16.53°C ± 0.80 (day/night) over the 5 day-heat treatment. Temperatures were controlled with temperatures probes (105 T Campbell, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK). For camelina, the HS modality consisted of 5 days at 26.93°C ± 1.34/17.26°C ± 0.97 (day/night) with daily heat peak for 5 h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at

31.74°C ± 0.98. The temperatures of the control modality were 20.10°C ± 1.48/16.64°C ± 0.72 (day/night) over the 5 day-treatment.

4.3.4. Root exudates collection and plant harvest

Plants and their root exudates were collected 3 times i.e. 5 days after each of PGPR inoculation (named hereafter, T0 after the first inoculation and T1 after the second inoculation) and at the end of the heat stress (named hereafter, T2). Exudates collection and plant harvests were realized as explained in Delamare et al. (2023a). Briefly, the roots were rinsed and then soaked in sterilized ultrapure water for one hour. Due to the small size of camelina, each replicate was composed of four individuals while only one individual per replicate for rapeseed was used. Then, exudates were filtered at 0.2 µm and stored at -20°C. The aerial plant parts were harvested, separated into vegetative and reproductive parts and dried at 50°C during 48 h to obtain the dry weight (DW). Approximatively 1g of fresh root was collected and used for the extraction of the root water extract (RWE). The remaining roots were kept to analyse the root morphological traits.

4.3.5. Root morphology analyses

As explained in Delamare et al. (2023a), root morphological analyses were performed with a flatbed scanner (Epson Expression 10000XL - WINRHIZO software- Regent Instruments Inc., Canada) in order to evaluate the root morphological traits such as Specific Root Length (SRL) and Root Tissue Density (RTD). Then, the roots were weighted to obtain the fresh mass, dried at 50°C for 48 h and weighted to obtain the root dry mass.

4.3.6. Root water extraction

The root water extracts (RWE) were extracted as explained in Delamare et al. (2023a). Briefly, roots were placed in 10 mL of ultrapure water in water bath at 65°C for 1h. The soaking solution was then filtered at 0.2 µm with a PES filter. Finally, prior to the C and N analyses, the root water extracts were stored at -20°C.

4.3.7. Carbon and nitrogen contents in root exudates and root water extracts

The C and N contained in the root exudates and roots water extracts were measured with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Isoprime, Elementar, Lyon, France) linked to a C/N analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). Exudates of both species were freeze-dried and concentrated 30 folds to reach detectable amounts.

4.3.8. Analyses of organic acids and soluble carbohydrates in root exudates

Organic acids and soluble carbohydrates (including polyalcohols) were analyzed as explained in Delamare et al. (2023a). Briefly, for analysis of organic acids, root exudates were lyophilized and resuspended with 1 mL of KH_2PO_4 25 mM buffered at pH 2.40. Separation of organic acids (malate, malonate, lactate, acetate, maleate, citrate, fumarate) was achieved using HPLC procedures as previously described by Yacoumas et al. (2020).

For soluble carbohydrates analyses, the root exudates were lyophilized and resuspended with ultrapure water and analyzed by high performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD ICS-6000, Dionex, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) equipped with a CarboPac PA100 anion-exchange column (4 x 250 mm) and a CarboPac PA100 guard column with an elution at 30°C at 1 mL min^{-1} with an linearly increasing concentration of NaOH from 20 mM (0 min) to 200 mM (25 min) followed by an elution with 200 mM NaOH for 10 min. The carbohydrate identification and quantification (*myo*-inositol, sorbitol, mannitol, trehalose, rhamnose, arabinose, glucose, xylose, fructose, sucrose) were performed with calibration standards as explained in Delamare et al. (2023a). The carbohydrate and organic acids contents were determined by dividing the content value by the root DW value.

4.3.9. Statistical analyses

The results were expressed as the mean ± sd of n replicates available per treatment for all assessed variables. The statistical analyzes were performed with R studio software (version 2023.06.0+421). After verification of the data normality and homogeneity of variances with the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test respectively, the effects of the modalities were performed with a one-way ANOVA for T0 et T1 and a two-way ANOVA for T2, coupled with a Tukey test for both. If the normality and/or the homogeneity of variances were not respected, variables were log, 1/n or square root transformed to perform the ANOVA. If the normality or the homogeneity of the variances were not verified despite the transformation, then the Kruskal-Wallis test was used to replace the single ANOVA with the package “Pgirmess” (Giraudoux 2015) for treatments comparison and the Scheirer–Ray–Hare test was performed to replace the two-way ANOVA with the package “Rcompanion” (Mangiafico 2023). To visualize the effect of the bacteria and the heat stress on the analyzed metabolite profiles in exudates (carbohydrates and carboxylates), cluster heatmaps were generated using the package “Pheatmap” (Kolde 2019) for each harvest time and for each species after standardizing the data per harvest time for each metabolite. A dendrogram was also applied to these heatmaps to illustrate the relative clustering between the metabolites.

4.4. Results

4.4.1. Comparative genomics of *Pseudomonas sp.* C32

Comparative genomic analysis was carried out in order to assess the taxonomic status of *Pseudomonas sp*. C32. Whole genome sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform resulting in 3,011,188 raw paired-reads. After all pre-processing steps and genome assembly, the genome size was 5,949,977 bp assembled into 54 contigs, with a GC content of 58.9%, a genome coverage of 120.3×, and an N_{50} score of 217,705 bp. The Bakta annotation identified 5,299 protein-coding genes, 62 tRNAs, and 4 rRNA genes. In order to decipher the taxonomic status of C32 isolate, a global ANI analysis was first achieved using the genome sequences of 316 type-species of the *Pseudomonas* genus. Then, based on the obtained results, ANI and *is*DDH analyses were done using the fifteen closest *Pseudomonas* species (Table S1 (Chap.4)). The highest ANI and *in silico* DDH values were 87.99% and 35.50% with *Pseudomonas jessenii* LMG21605^{T}, respectively. Both values were below the species cut-off threshold (95% for ANI; Hasegawa et al. (1983) and 70% for *is*DDH; Chun et al. (2018), respectively), indicating that *Pseudomonas* sp. C32 should be considered as a novel species.

Phylogenetic analysis based on the concatenated 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* and *rpoD* genes confirmed the ANI/*is*DDH tests. In fact, strain C32 represents a separate branch on the phylogenetic tree with 87% bootstrap support (Fig.1 (Chap.4)).

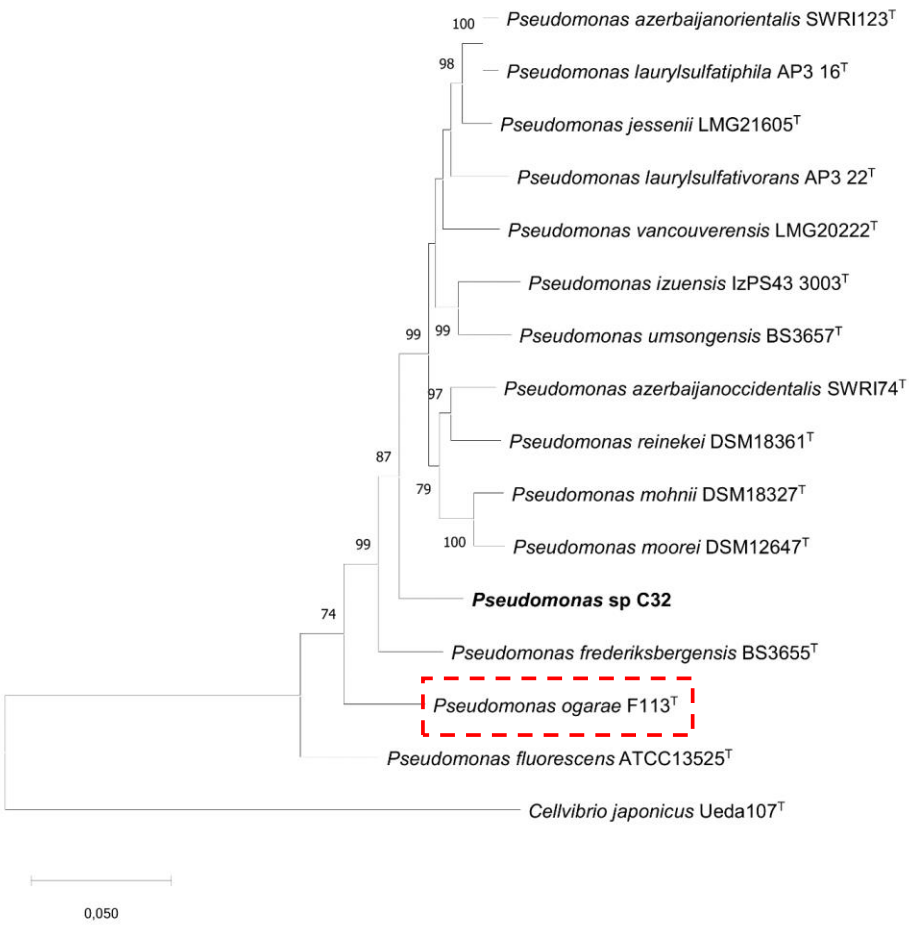


Figure 1 (Chap.4): Phylogenetic analysis of concatenated full sequences of 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* and *rpoD* genes (9,872 bp) of *Pseudomonas sp.* C32 and related species representing its distant position (in bold). Bootstrap values greater than 50% are represented at the branching points. The bar represents 0.05 substitutions per site. For easier reading, the position of *Pseudomonas ogarae* F113, the second PGPR analyzed in the study, is circled by red dots.

4.4.2. Comparison of the PGPR activities and metabolism between F113 and C32

To characterize the plant-beneficial properties of the two studied PGPR, two emblematic activities were quantified in both tested bacteria i.e. ACC deaminase activity and IAA production (Fig.2 (Chap.4)). F113 exhibits ACC deaminase activity unlike C32 is not able to deaminate ACC. On the contrary, C32 produces greater quantity of IAA than F113 (Fig.2 (Chap.4)).

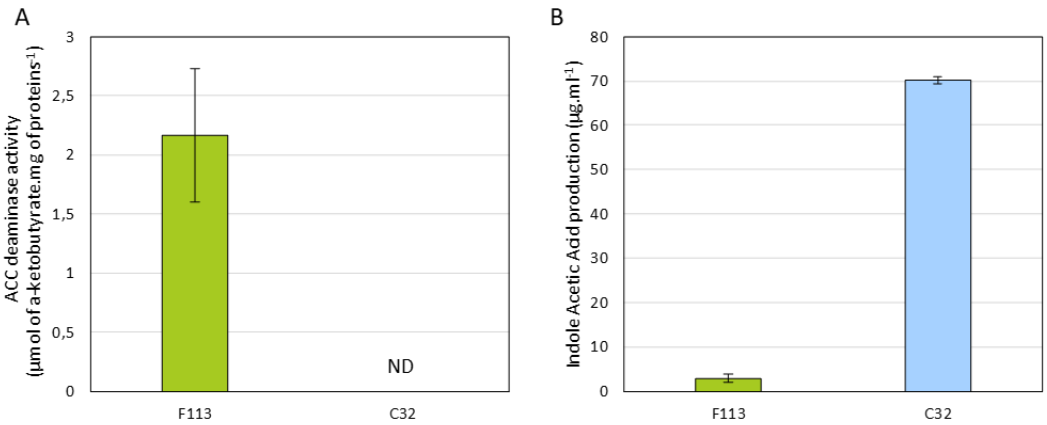


Figure 2 (Chap.4): ACC deaminase activity (A) and production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) (B) by *Pseudomonas ogarae* strain F113 (F113) and P*seudomonas sp.* strain C32 (C32). The ACC deaminase activity is expressed per µmol of ketobutyrate per mg of the total proteins. Values are means ± standard deviation (n= 4 for ACC deaminase activity and n=3 for IAA production). Non-detected (ND).

The differences in C metabolism between the two bacteria were analysed through a Biolog assay (Fig.S1 (Chap.4)). The focus was made on carbohydrates (glucose, mannitol, fructose, sorbitol, sucrose, trehalose, rhamnose, arabinose, xylose and the polyalcohol *myo*-inositol) and carboxylates (acetate, citrate, lactate, malate, fumarate, malonate, maleate) that were previously found and quantified in rapeseed and camelina root exudates. The two bacteria can catabolize at different levels, 8 out of the 10 carbohydrates analysed in the root exudates (unfortunately testing of arabinose and xylose was not available in Biolog GenIII) (Fig.S1 (Chap.4)). F113 grown more intensively with 7 out of the 8 carbohydrates (glucose, mannitol, fructose, sorbitol, *myo*-inositol, sucrose and trehalose) (Fig.S1A (Chap.4)). By contrast, C32 was able to grow more intensively on 2 out of the 8 carbohydrates (glucose and mannitol). Thus, F113 exhibited a lower selectivity for carbohydrates than C32 (Fig.S1A (Chap.4)). The two bacteria were able to grow with carboxylates (acetate, citrate, lactate or malate) as the sole sources of C with similar efficiencies (Fig.S1B (Chap.4)).

4.4.3. Effects of PGPR inoculation and heat stress on plant traits

The impacts of the PGPR inoculation and the heat stress exposure on the plant traits were measured at three successive times (T0, T1 and T2) in rapeseed (Fig.3A (Chap.4)) and camelina (Fig.3B (Chap.4)). In rapeseed, at T0 (i.e. 5 days after the first inoculation), the inoculation with the two PGPR significantly decreased the whole plant biomass (total_DW) and the aboveground vegetative biomass (veg_DW), but did not modify root biomass neither morphological traits (Root_DW, Specific Root length (SRL), Root Tissue Density (RTD) and Root Dry Matter Content (RDMC)) (Fig.3A (Chap.4)). At T1 (i.e. 5 days after the second inoculation), the previously observed modifications were lessened as root_DW,

veg_DW, repro_DW and total_DW were not modified after the second PGPR inoculation (Fig.3A (Chap.4)). Similarly, RTD remained unchanged. However, PGPR inoculation had an opposite effect on SRL (increase trend with F113 and decrease trend with C32) while both F113 and C32 significantly decreased RDMC compared to the control plants (Fig.3A (Chap.4)). At T2 (i.e. at the end of the heat stress), total_DW was significantly reduced under all the treatments except the modalities HS (heat stress without inoculation) and C32 (inoculation with C32 without heat stress). The most penalizing treatments were F113 and C32/HS (Fig.3A (Chap.4)). For the biomass of reproductive organs (repro_DW), as observed with F113 and C32/HS modalities, a significant reduction compared to the control was observed for F113/HS. Eventually, the veg_DW was less impacted because only C32/HS modality led to a significant decrease (Fig3A (Chap.4)). In line with the prior harvest times, rapeseed root traits did not show drastic differences between the different modalities, except the root biomass (Root_DW) that tended to decrease under HS and decreased significantly after F113 and C32 inoculations combined or not with HS compared to the control (Fig.3A (Chap.4)).

For camelina, the biomasses of the different plant parts (Root_DW, Veg_DW and Repro_DW) were not significantly modified by the treatments throughout the three harvest dates (Fig.3B (Chap.4)). However, total biomass (total_DW) tended to be reduced for all treatments compared to control plants, and the reduction was even significant for C32/HS modality (Fig.3B (Chap.4)). For this species, root traits, with the exception of root_DW, were significantly modified at T0. Both C32 and F113 inoculations significantly decreased RTD and increased (C32) or tended to increase (F113) SRL and RDMC compared to the control plants (Fig.3B (Chap.4)). At T1, SRL was only modified by PGPR inoculation, with opposite trends between F113 (trend to increase) and C32 (trend to decrease) compared to the control plants, while RTD and RDMC remained broadly unchanged (Fig.3B (Chap.4)). At T2, no significant change in root traits was observed regardless of the treatments (Fig.3B (Chap.4)).

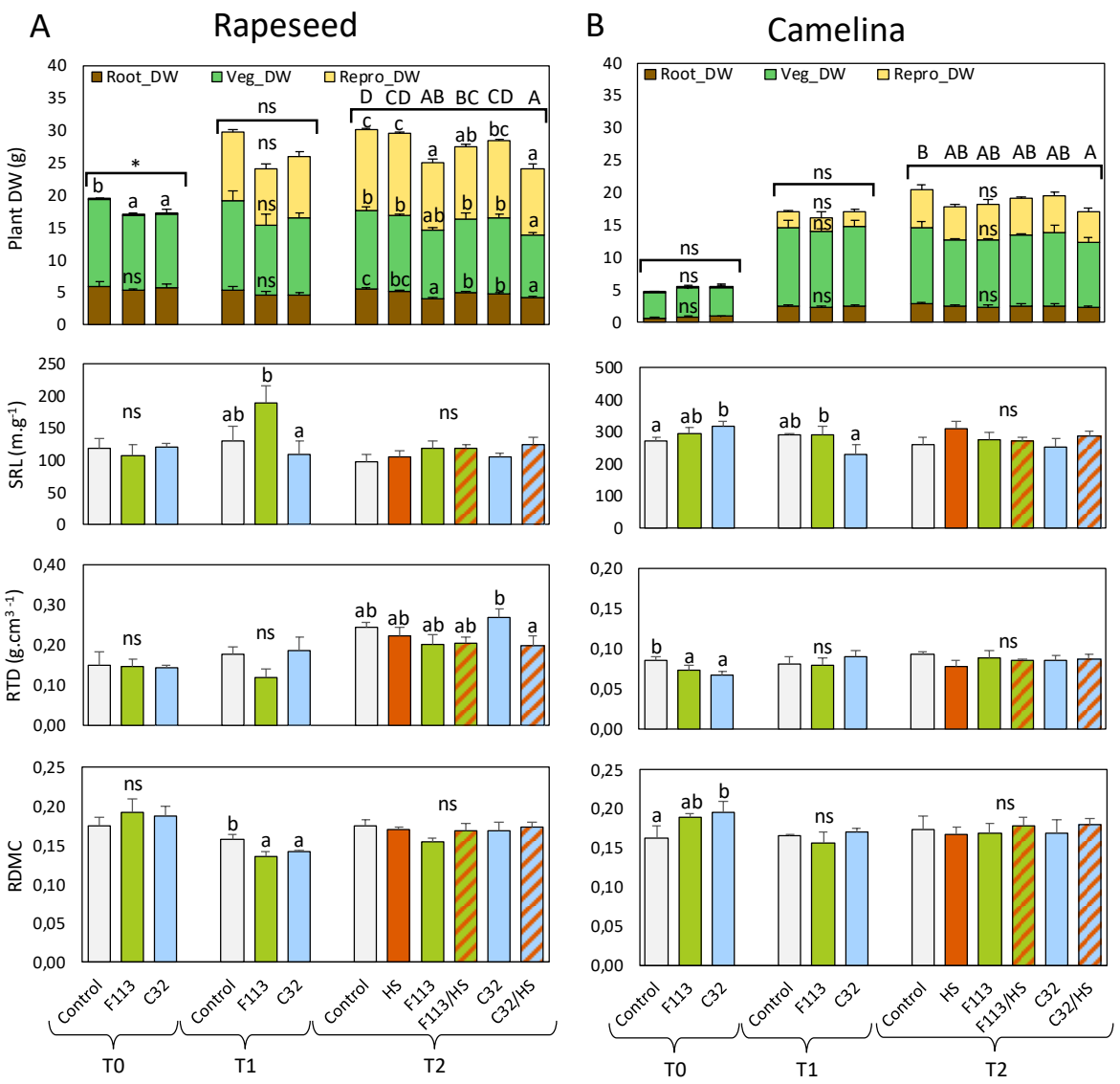


Figure 3 (Chap.4): Biomasses of plant parts and root morphological traits in rapeseed (A) and in camelina (B) at the three harvests (T0, T1 and T2) after PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain, F113, *Pseudomonas sp.* strain, C32) and/or heat stress exposure (HS, alone or combined with PGPR inoculations). Biomass **(**Dry weight; DW) of the whole plant (Total_DW) is divided into the reproductive (Repro_DW), the vegetative (Veg_DW) and the root (Root_DW) plant parts. Root morphological traits are Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Tissue Density (RTD) The effects of the bacteria and heat stress were tested with a one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis test at T0 and T1 and with a two-way ANOVA at T2. For root_DW, veg_DW and repro_DW, the lowercase letters indicate the different rankings amongst the treatments while the uppercase letters indicate the ranking amongst the treatments for the total plant DW (Total_DW), following a mean comparison test. For Total_DW at T0 in rapeseed, the significance of the Kruskal-Wallis is represented by an asterisk since pairwise post-hoc comparison showed no significant difference. Values are means ± standard deviation (n=4). Non-significant (ns).

Then, the effects of PGPR inoculation and heat stress exposure (alone or in combination with the PGPR) on the C and N contents such as on the C/N ratio were analysed in rapeseed (Fig.4A and 4C (Chap.4)) and in camelina (Fig.4B and 4D (Chap.4)), from root water extracts (RWE) at the three harvests. For rapeseed, at T0, C and N contents in RWE decreased after PGPR inoculation while the C/N ratio remained unchanged (Fig.4A and C (Chap.4)). However, at T1 neither C and N content nor the C/N ratio were yet impacted by the inoculation with F113 or C32 (Fig.4A and C (Chap.4)). At the last harvest (T2), while HS and F113/HS treatments decreased significantly C content, C32 and C32/HS treatments tended to decrease C content compared to control and to a lower extent to F113 inoculated plants (Fig.4A (Chap.4)). While HS and C32 treatments led to a slight decrease in N content compared to control plants, F113, C32/HS and F113/HS treatments led to opposite effects. The C/N ratio was strongly modified due to opposite variations of C and N contents in RWE. Under HS, F113/HS and C32/HS treatments, the C/N ratio was significantly decreased (Fig.4C (Chap.4)) which was also observed with F113 and C32 treatments but to a lesser extent (Fig.4C (Chap.4)).

For camelina, at T0, the inoculation with each of the two PGPR significantly decreased N content in RWE while the observed decrease in C content in RWE was not significant (Fig.4B (Chap.4)). At T1, F113 and C32 treatments significantly decreased the C and N contents in RWE (Fig.4B (Chap.4)). At the final harvest (T2), a significant effect of the treatments was observed on the C content in RWE ($p< 0.05$) with a decreasing trend of HS and F113 (with and without HS) and no effect of C32 (with and without HS; Fig.4B (Chap.4)). Without heat stress exposure, inoculation with F113 tended to decrease N content in RWE by contrast with inoculation with C32 which tended to increase N content. The combination of PGPR inoculation with heat stress decreased the trends of the bacterium alone as there was no difference from the control (F113/HS vs. control and C32/HS vs. control) (Fig.4B (Chap.4)). The C/N ratio was modified by the treatments only at T1 with higher value with PGPR inoculation (only significant with F113; Fig.4D (Chap.4)).

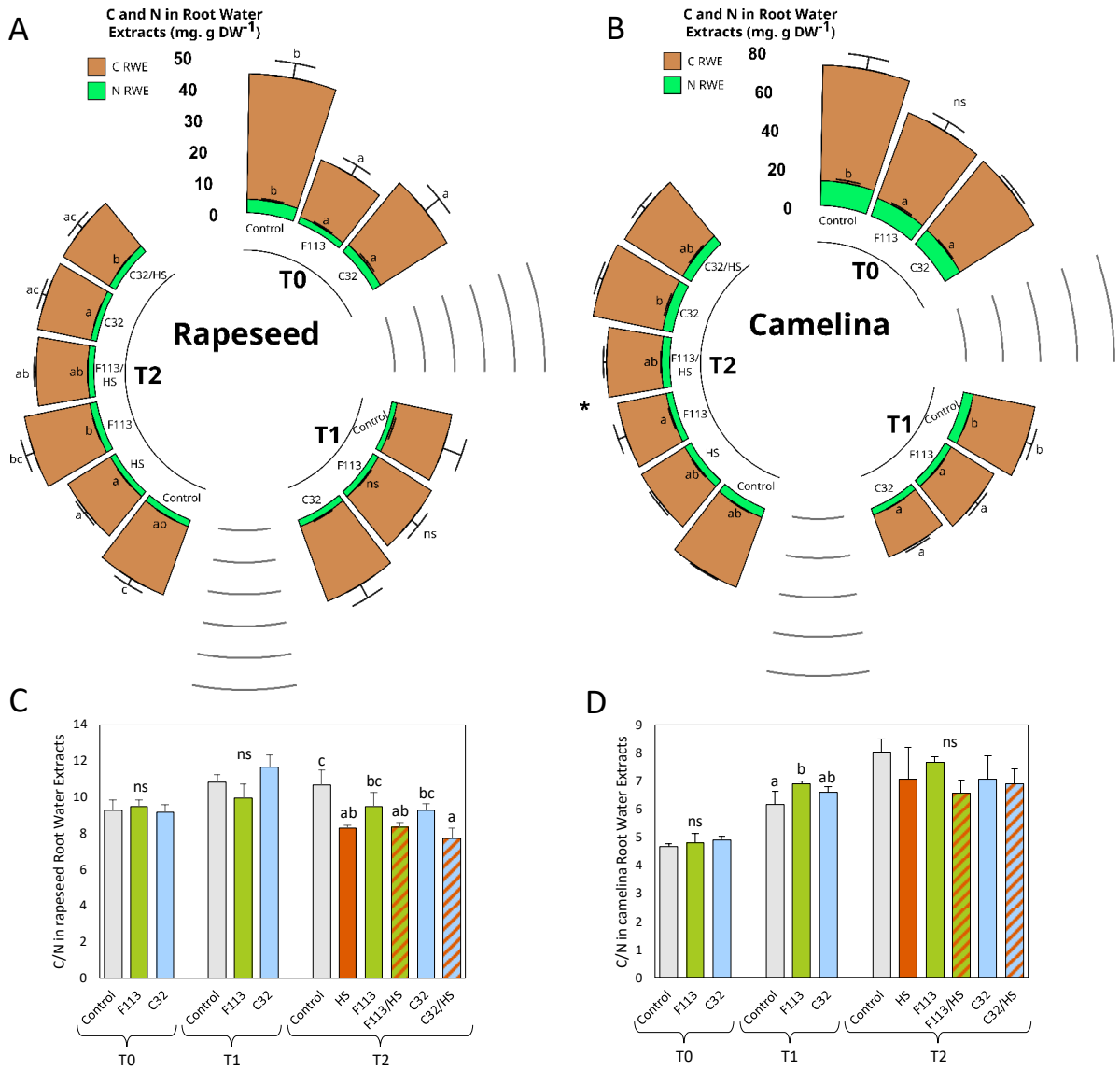


Figure 4 (Chap.4): C and N contents (A and B) and C/N ratio in Root water extracts (RWE) (C and D) in rapeseed (A and C) and in camelina (B and D) under PGPR inoculation and heat stress (HS) exposure (alone or combined with the PGPR inoculations). The effect of PGPR (*Pseudomonas ogarae* strain F113, *Pseudomonas sp.* strain C32) and temperature modality was tested with a one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis for T0 et T1 and a two-way ANOVA for T2. For C in RWE at T2 in camelina, the significance of the Kruskal-Wallis is represented by an asterisk since pairwise post-hoc comparison showed no significant difference. Values are means ± standard deviation. Non-significant (ns).

4.4.4. Effects of PGPR inoculation and heat stress on root exudation

The effects of the PGPR inoculation and/or the heat stress exposure were then analysed on C and N contents (Fig.5A and 5B (Chap.4)), and on the C/N ratio (Fig.5C and 5D (Chap.4)), in root exudates from rapeseed and from camelina. In rapeseed, the contents of C and N in exudates were not modified at T0 and T1. However, at T2, content of C in exudates increased with all treatments (only significant with F113 and C32/HS treatments) (Fig.5A (Chap.4)). Similar results were observed for the N content in exudates which increased under C32/HS (significant) and F113 treatments (trend) (Fig.5A (Chap.4)). As a consequence, the three treatments with heat stress (HS, F113/HS and C32/HS) decreased the C/N ratio in exudates (trend for HS and significantly for F113/HS and C32/HS) (Fig.5C (Chap.4)).

In camelina, at T0, neither N nor C contents were impacted by PGPR inoculation. Conversely, at T1, contents of C and N in exudates were significantly decreased by C32 and F113 inoculations (Fig.5B (Chap.4)). At the last harvest, C content tended to be increased by C32 inoculation (alone or in combination with heat stress), while it tended to decrease under HS and with F113 inoculation without HS (Fig.5B (Chap.4)). N content in exudates was not impacted by HS and F113 inoculation but tended to increase when the two treatments were combined (F113/HS). By contrast, C32 inoculation alone significantly increased N content in exudates but this effect was reduced when combined with heat stress (C32/HS) (Fig.5B (Chap.4)). Finally, the C/N ratio in root exudates was not impacted by either PGPR inoculation or heat stress treatment whatever the harvest time (Fig.5D (Chap.4)).

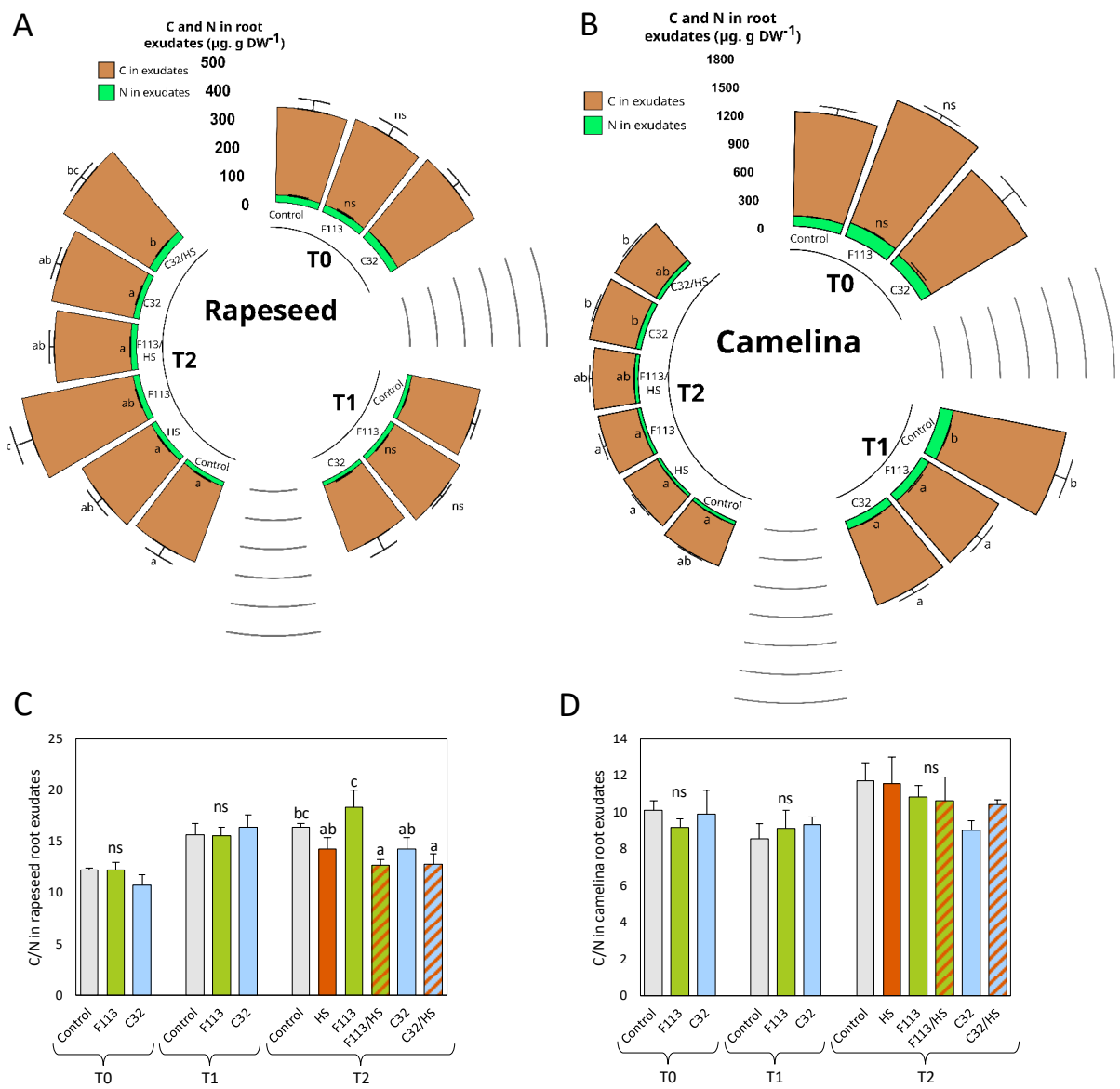


Figure 5 (Chap.4): C and N contents (A and B) and C/N ratio (C and D) in root exudates of rapeseed (A and C) and camelina (B and D) under PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain F113, *Pseudomonas sp.* strain C32) and heat stress (HS) exposure (alone or combined with the PGPR inoculations). The effect of the bacteria and the temperature modality was tested with a one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis for T0 et T1 and a two-way ANOVA for T2. Values are means ± standard deviation. Non-significant (ns).

The biochemical composition of root exudates was specifically investigated through the quantification of the major carbohydrates and carboxylates in root exudates. Figures 6 and 7 (Chap.4) show corresponding heatmaps, at each harvest time, for rapeseed (Fig. 6A, B, C (Chap.4)) and camelina (Fig. 7A, B, C (Chap.4)). In rapeseed, the heatmap at T0 highlighted the differential effects of the bacteria inoculation on metabolites contents, represented in 4 clusters, and pointed in particular a

stronger effect of C32 compared to F113 (Fig.6A (Chap.4)). The bacteria presented a contrasting effect in cluster 1 (acetate) with F113 induced an increase while C32 induced a decrease of the compound compared to the control. Clusters 2 and 3 distinguished from the other clusters as the metabolites of these two clusters had either higher or lower contents compared to the control according to the bacteria (F113 or C32, respectively). Notably, in cluster 2 which gathered major carbohydrates (glucose, sucrose, sorbitol, trehalose), the C32-induced decrease was slightly higher than F113. On the opposite, contents of metabolites grouped in cluster 3 (malate, xylose, rhamnose, malonate, mannitol) increased with bacteria inoculation and in particular with C32. The contents of metabolites of cluster 4 – mainly represented by carbohydrates (myo-inositol, arabinose and fructose) – were either increased with C32 or decreased with F113 (Fig.6A (Chap.4)). The contrasting effects between the two bacteria was even more pronounced at T1 (Fig.6B (Chap.4)) with higher contents compared to the control for metabolites of clusters 2 and 3 with C32 and lower contents with F113. Only cluster 2 distinguished from the other clusters with mirrors effects of the bacteria. Lower contents of the metabolites gathered in cluster 4 were observed for both PGPR. Finally, cluster 1 gathered only metabolite (mannitol) which increase compared to the control was even more pronounced with F113 (Fig.6B (Chap.4)).

At T2, the main clusters gathered different metabolites from the ones at T1 as observed between the respective clusters of T1 and T0 (Fig.6C (Chap.4)). As previously observed, inoculation of C32 or F113 (without heat stress) had opposite effects on the contents of the metabolites of all clusters (Fig.6C (Chap.4)). Exposure to HS led to drastic changes in the bacteria effects compared with the effect of the bacteria alone. Indeed, the combination F113/HS led to lower contents of compounds in cluster 2 (arabinose, glucose, sorbitol, xylose, acetate, mannitol), cluster 3 (maleate, malonate, citrate) and cluster 4 (*myo*-inositol, sucrose, trehalose, fumarate, fructose, except rhamnose) compared to F113 alone. The combination of C32/HS led to opposite effects compared to C32 alone, mainly with higher contents of the metabolites of the cluster 2. Interestingly, F113 showed closed content to the control for the compounds of cluster 4 (carbohydrates only). No difference was observed for this cluster between HS and F113/HS. Eventually, C32/HS led to the highest amplitudes of responses (i.e. higher content) for several carbohydrates (arabinose, glucose, sorbitol, xylose and mannitol) and acetate (Fig.6C (Chap.4), cluster 2).

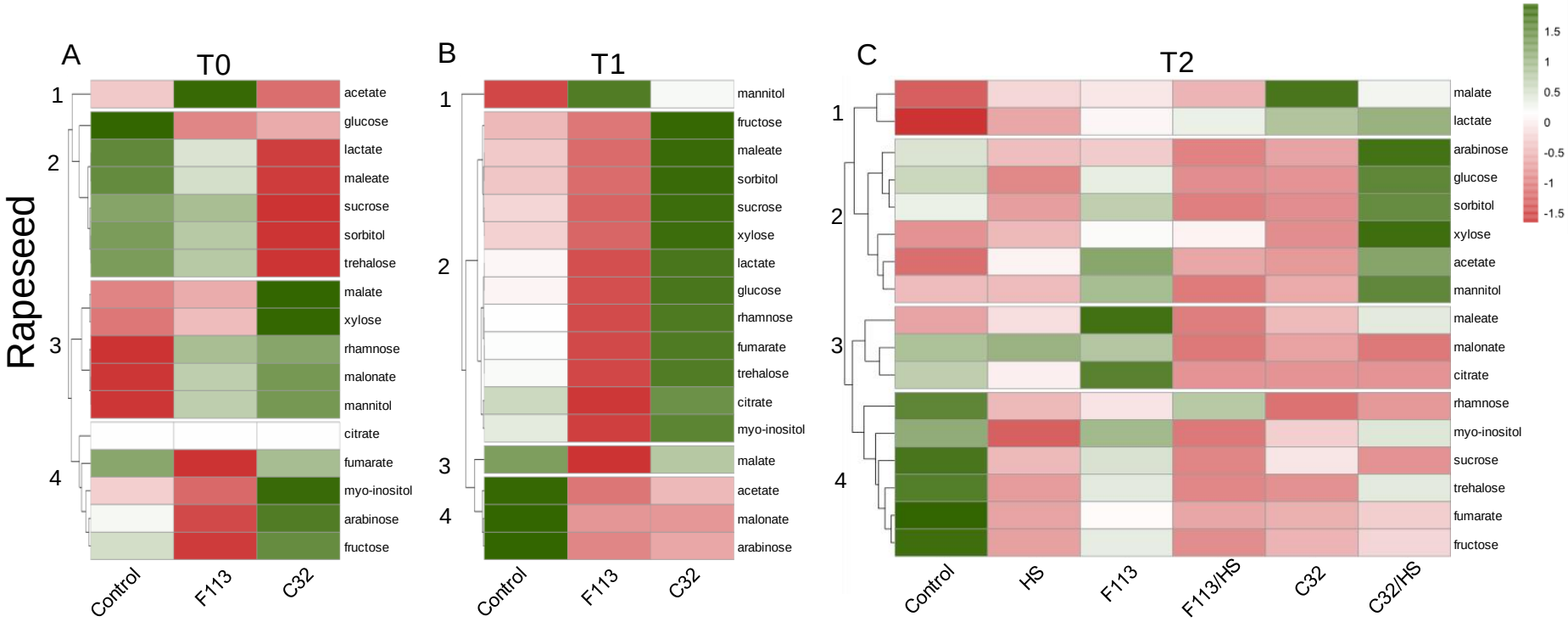


Figure 6 (Chap.4): Heatmaps and cluster trees of the composition of carbohydrates and carboxylates in rapeseed exudates at the three harvests: T0 i.e. 5 days after the first inoculation (A), T1 i.e. 5 days after the second inoculation (B) and T2 i.e. at the end of the heat stress (C), for control plants and under PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain F113, *Pseudomonas sp.* strain C32) and heat stress (HS) exposure (alone or combined with the PGPR inoculations). The intensity of colour of each box represents an average of the metabolite content (n=4). Green or red indicate metabolites with high or low abundance, respectively. Rows on the heatmap are re-ordered according to hierarchical clustering as represented in the dendrogram.

As observed for rapeseed, the heatmap of camelina exudates at T0 showed that C32 and F113 inoculation had different effects on exudates composition. By contrast with rapeseed, the two bacteria had similar effects in cluster 1 (malate, acetate, xylose), cluster 2 (citrate, fumarate, trehalose, malonate, lactate, *myo*-inositol i.e. main carboxylates) and cluster 3 (mannitol). This effect was more pronounced with C32 in cluster 2 and F113 cluster 3. Opposite effects of the bacteria were observed for cluster 4 (arabinose, sorbitol, glucose, fructose, rhamnose, sucrose i.e. mainly carbohydrates) (Fig.7A (Chap.4)). The contents of the metabolites of cluster 1 were higher with the two bacteria compared to the control while the ones of clusters 2 and 3 were lower (Fig.7A (Chap.4)). As for rapeseed, F113 inoculation decreased most of the metabolite contents in contrast with C32 inoculation after which metabolite levels were either increased or decreased (Fig.6A (Chap.4); Fig.7A (Chap.4)).

By contrast with rapeseed, at T1, the differences (increase or decrease) after F113 and C32 inoculation varied according to the metabolites (Fig.7B (Chap.4)). The content of the metabolites of cluster 1 (citrate, malate, fumarate i.e. carboxylate, and trehalose and *myo*-inositol) increased with F113 inoculation while they were either slightly increased or decreased after C32 inoculation. C32 mainly decreased the metabolites of cluster 2 (lactate, arabinose, xylose, malonate, sucrose) and on the opposite, the metabolites of cluster 3 (fructose, acetate, sorbitol) decreased mainly with F113 in comparison with the control (Fig.7B (Chap.4)). Eventually, both PGPR induced lower contents of metabolites of cluster 4 (maleate, glucose, mannitol, rhamnose) compared to the control. At T2, the amplitudes of the differences between the treatments for all the metabolites were lower than at T0 and T1, except for HS that induced a more pronounced effect (decrease) on the metabolites in comparison with the control. As previously observed, the two bacteria (i.e. without heat stress) had opposite effects on the contents of the metabolites of clusters 2, 3 and 4 mainly (Fig.7C (Chap.4)). The combination with HS modified their respective effects. Indeed, the combination F113/HS led to lower contents of compounds in cluster 1 (sorbitol, fructose, sucrose) and cluster 4 (malonate, glucose, trehalose, *myo*-inositol, arabinose, malate, citrate) compared to F113 alone, and the combination of C32/HS led to opposite effects compared to C32 alone for cluster 1 (increase in fructose and sucrose), cluster 3 (decrease in maleate and fumarate) and cluster 4. Interestingly, only the metabolites grouped in cluster 2 (xylose mannitol, lactate, acetate and rhamnose) exhibited more similar levels after C32 inoculation without (C32) or with heat stress (C32/HS).

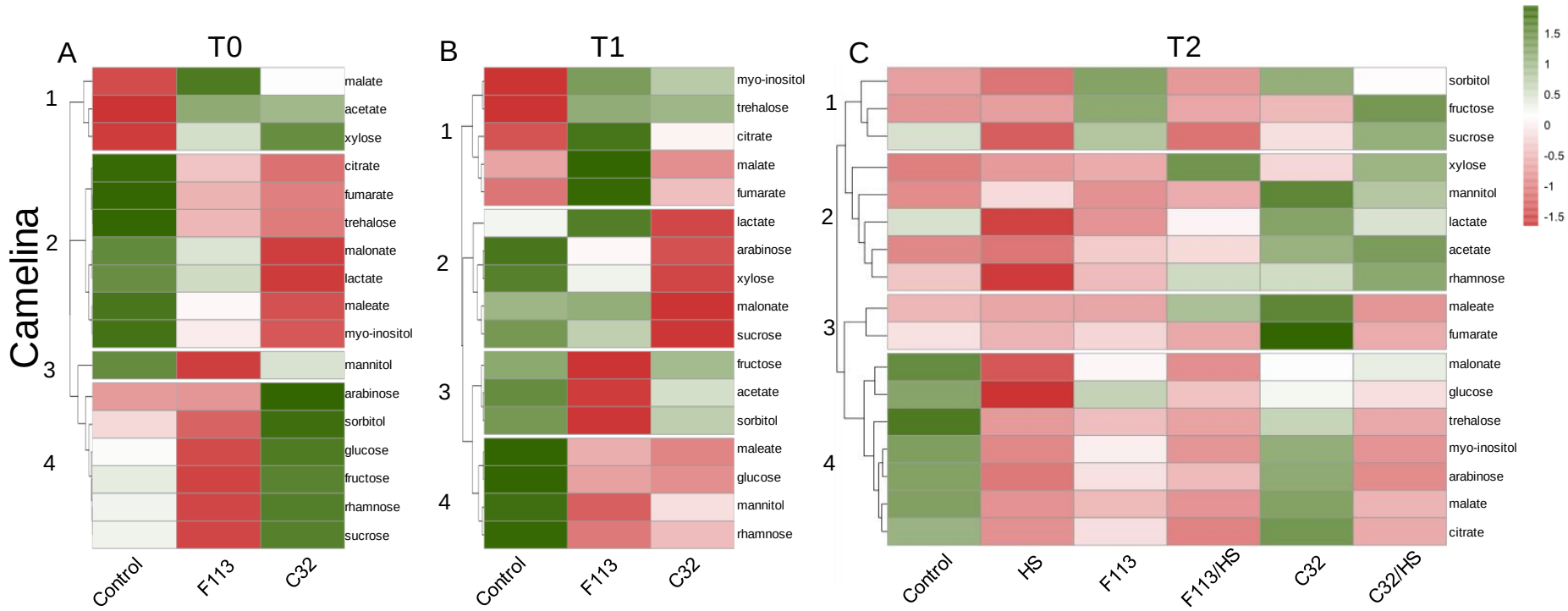


Figure 7 (Chap.4): Heatmaps and cluster trees of the composition of carbohydrates and carboxylates in camelina exudates at the three harvests: T0 i.e. 5 days after the first inoculation (A), T1 i.e. 5 days after the second inoculation (B) and T2 i.e. at the end of the heat stress (C), for control, PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain F113, *Pseudomonas sp.* strain C32) and heat stress (HS) exposure (alone or combined with the PGPR inoculations). The intensity of colour of each box represents an average of the metabolite content (n=4). Green or red indicate metabolites with high or low abundance, respectively. Rows on the heatmap are re-ordered according to hierarchical clustering as represented in the dendrogram.

4.5. Discussion

4.5.1. PGPR effect on plant traits under non-stressing conditions

We demonstrated that when the PGPR are inoculated at advanced development stage in non-stressed plants, two types of responses can be observed. One response is based on plant physiological adjustments through the modulation of exudation, not systematically associated with shifts on the phenotype (biomass repartition and root morphology). Indeed, PGPR inoculation triggered not only modifications of C and N contents but also adjustments of the quality of root exudates. The PGPR effects on root exudation can be direct through consumption of exuded compounds (that unbalances the exudation fluxes between internal root and growth media) (Leyval and Berthelin 1993; Farrar et al. 2003; Matilla et al. 2010; Huang et al. 2014) and/or indirect through hormonal interactions with the plant that would promote or decrease exudation (Huang et al. 2014; Asari et al. 2017; Jalmi and Sinha 2022). Coupled to shifts in exudation, changes in internal root composition (observed in the root water extract) consecutive to inoculation fits with the second assumption of indirect PGPR induced modifications of the whole plant metabolism (i.e. via hormonal regulation mediated by the PGPR).

In rapeseed, after the first inoculation, less C is allocated to aerial parts and less C is retrieved in root water extract suggesting that the bacteria could derive this C for their own metabolism, thus explaining that no modification of the exudation is observed (Fig.3A and 4A (Chap.4)). Overall, rapeseed plants do not seem to adjust exudation to interact with bacteria. Consequently, five days after the second inoculation, the same effects of the first inoculation were still going on which resulted in a decrease trend in total biomass, as the plants did not recover from the previous effects of the bacteria. At the belowground level, the decrease in RDMC can be explained by the decrease in the allocation of C to the roots which could be the consequence of bacteria development that acts as an additional sink for C. Indeed, RDMC is usually used to describe the investment of plants for the root tissues formation (Freschet et al. 2021). Considering that fewer amounts of carboxylates are found in the root exudates, very likely because of their consumption by the two studied bacteria (in consistence with their potential metabolic capacities determined through Biolog analysis) and given that C content in root water extracts and exudates remained stable (Fig.4A (Chap.4)), it can be assumed that the inoculated rapeseed plants compensate the carboxylate consumption by bacteria with other C-rich compounds in exudates. Nevertheless, this compensation could not be only achieved by carbohydrates. Indeed, the abundance of these metabolites increased with C32 but decreased with F113 (Fig.6B (Chap.4)). It can be assumed that the observed differences in carbohydrate metabolism between the two bacteria contribute to the contrasting composition of root exudates (Somers et al. 2004; Huang et al. 2014). Indeed, F113 might consume a larger spectrum of carbohydrates than C32

and might also be a faster metabolizer. Finally, rapeseed was not able to maintain its growth and development upon the newly C sink formed by the bacteria. However, the plants maintained the C allocation to roots (root water extracts) and exudates to compensate bacterial consumption. At the last harvest, 10 days after the second PGPR inoculation, a reduction in the biomass of reproductive parts is observed, particularly with F113, as well as a reduction in the biomass of the vegetative and root parts, which can be explained by a very strong exudation of C compounds including carbohydrates and carboxylates (Fig.3A, 5A and 6C (Chap.4)). C allocation is likely to be maintained to the roots, thus enabling stable C in root water extracts despite a large C sink effect which caused a C leakage after F113 inoculation. Indeed, the C in root water extracts has been shown to constitute a source of C for root exudates (Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). After C32 inoculation, despite a decrease in root biomass, a decrease in C content in root water extract as well as in carbohydrates in the exudates were observed, suggesting that the plants could have reduced C allocation to the roots in favour to the reproductive parts to match specific biomass development at this stage. Moreover, C32 could constitute a weak C sink that does not require a response from the plant.

In camelina, the effects observed are mostly different from those observed in rapeseed. Indeed, the first interaction between camelina and the two tested bacteria tends to reduce the amounts of C and N in root water extract. Moreover, in root exudates, the quantity of carboxylates decreases with the exception of acetate and malate which both increase (Fig.7A (Chap.4)). This observation could be explained by a slighter sink effect causing the C leakage. However, camelina plants are sufficiently capable to maintain C for their development as no modification in the plant biomass is observed (Fig.3B (Chap.4)). Despite the high capacity of consumption of the main carboxylates of the two tested bacteria, the observed increase in malate could be explained by an increase of its exudation. A similar stimulation of malate exudation has been reported in rice rhizosphere after PGPR supplies (Rekha et al. 2020). Promotion of malate exudation could improve plant-bacteria communication. Indeed, malate is one of the metabolites whose role in the recruitment of beneficial microorganisms by plants is well documented (Rudrappa et al. 2008; Huang et al. 2014; Vora et al. 2021). Therefore, from the first inoculation, camelina plants seem to initiate mechanisms of interaction with the two bacteria. Moreover, exudation monitored by camelina plants appears to be of mutual benefit. Indeed, camelina root morphology is modified by the bacteria in favour to root prospection (i.e. increased SRL) and at the detriment of root construction (i.e. decreased RTD) (Fig.3B (Chap.4)). This could improve nutrients and water uptake (Wen et al. 2022). Five days after the second inoculation, such as after the first inoculation, fewer amounts of C and N in root water extract were observed (Fig.4B (Chap.4)). In addition, the same observations are made for exuded C that decreases with bacterial inoculation, resulting from a decrease of several carbohydrates in root exudates (Fig.7B (Chap.4)). These results

are in line with the hypothesis that camelina plants do not compensate the observed leakage in C and N. Surprisingly, a group of compounds constituted by *myo*-inositol, malate (except for C32), citrate and trehalose were largely found in the exudates, despite their putative consumption by the two bacteria. Therefore, it can be assumed that the plants maintain their interactions with bacteria through an increased exudation of these compounds, known to improve bacteria recruitment (Huang et al. 2014; Vílchez et al. 2020; Vora et al. 2021).

At the last harvest (*i.e.* 10 days post second inoculation), plants growth and development did not appear to be stimulated by the bacteria. Indeed, the initial beneficial effect on root morphology seemed to be lost over time (Fig.3B (Chap.4)). This could be accounted for by the fact that plants have reached reproductive stage and then have lesser benefit in developing the root surface exchange (Keith et al. 1986; Remus et al. 2022). This assumption is also supported by the observed strong decrease in exuded C and N compared to the other times of harvests (Fig.5B (Chap.4); Chaparro et al. 2013; Tang et al. 2021). However, bacteria seemed to adjust the exudates' composition according to their respective C metabolism, with fewer amounts of most carbohydrates and carboxylates recovered after F113 inoculation and conversely higher amounts of these compounds after C32 inoculation.

Finally, in non-stressing heat conditions, plant species-specific interactions are rapidly established and lead to phenological modifications. Plant species exhibit contrasting strategies upon PGPR inoculation. Rapeseed seemed to endure the interaction conducting to a C allocation strategy directed to maintain the C level in roots and exudates at the expense of the aboveground biomass (Farrar et al. 2003). On the opposite, camelina seemed to prioritize C for their own development and do not adjust C level in roots nor in exudates. Moreover, composition of camelina root exudates appeared to be modified to promote the interactions with the bacteria whereas the composition of rapeseed exudates seemed to be mainly influenced by bacterial consumption.

4.5.2. PGPR effects on plant traits in heat-stressed conditions

In rapeseed, unlike results from the literature (Angadi et al. 2000; Brunel-Muguet et al. 2015; Kourani et al. 2022), only a few weak negative impacts of heat stress on aboveground parts was observed (Fig.3A (Chap.4) and Fig.8 (Chap.4)). However, heat stress tended to negatively impact root biomass but alternatively, tended to increase root exudation, as observed in Delamare et al. (2023a). Indeed, heat stress has been shown to increase the C allocation to roots leading to an increase in C root exudation (Yin et al. 2013b, a; Bakhshandeh et al. 2019; Tiziani et al. 2022). An increase in C content in exudates does not necessarily result from a modification of photosynthesis but can also

come from an increase in C allocation to the roots (Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). Indeed heat stress is known to rather decrease photosynthesis (Allakhverdiev et al. 2008).

Upon heat stress exposure, the effects of PGPR inoculations differed from their effects without heat stress. In rapeseed, the major C sink effect caused by F113 without heat stress, tends to be mitigated with exposure to heat stress. Indeed, the biomasses of the reproductive, vegetative and root parts increase with the heat stress (F113/HS), supporting a shift in allocation towards plant development (Fig.8 (Chap.4)). In addition, the C and N contents in root water extract slightly decreased as well as the amount of carbohydrates in exudates, suggesting that the sink effect of F113 is less marked under heat stress, allowing the plant to allocate more for its biomass. The metabolism and activities of F113 without heat stress are an additional cost with low positive feedback for the rapeseed. Under stressing conditions, rapeseed could probably benefit from the ACC deaminase activity of F113 that buffers heat stress impacts via a decrease of ethylene synthesis (Dimkpa et al. 2009; Lastochkina et al. 2019; Naing et al. 2021; Shekhawat et al. 2022). In comparison to F113, C32 inoculation led to a more moderated sink effect without heat stress and induced contrasting effects under heat stress. Indeed, C32 exacerbates the C sink effect under heat stress in comparison to the control. A strong decrease in the biomasses of the reproductive, vegetative and root parts along with an increase in C exudation including several carbohydrates and carboxylates were indeed observed in comparison with control (Fig.7C (Chap.4) and Fig.8 (Chap.4)). The metabolism and activities of C32 under heat stress represent an additional cost, leading to a negative feedback in rapeseed. Moreover, under heat stress, the high capacity of auxin production of C32 could send a counterproductive signal for the plant through an adverse increase of the C allocation for the root development. These results could raise the question of fluctuating effects of the PGPR depending on the temperature (Pillay and Nowak 1997; Egamberdiyeva and Höflich 2003; Compant et al. 2010).

In camelina, at 10 days post second inoculation and 5 days of heat stress exposure, heat stress is more impacting than bacteria inoculation in root exudates. Indeed, a decrease in carbohydrate and carboxylate contents in the exudates were observed only under heat stress (Fig.7C (Chap.4)). While F113 has no additional effects in camelina under heat stress, C32 (C32/HS) exacerbates the total biomass decrease together with the increase in C exudation (Fig.8 (Chap.4)). However, despite a major impact of heat stress on root exudation, few effects on the plant biomasses were demonstrated in camelina, probably consistent with its known greater resistance to abiotic stresses (Moser 2010; Ibrahim and El Habbasha 2015; Heydarian et al. 2018; Soorni et al. 2021).

Finally, the interactions between the plants and PGPR are challenged by heat stress, especially in rapeseed (Fig.8 (Chap.4)). Indeed, heat stress seems to reduce the load of F113 on the bacterium induced-C cost but on the opposite, it exacerbates C32 impact. Thus, the rapeseed strategy under heat stress is mainly driven by the bacteria profile and probably by their C metabolism functioning. In a

different way, under heat stress, camelina keep on prioritizing the C for its development by decreasing C level in exudates irrespectively to the bacteria profile.

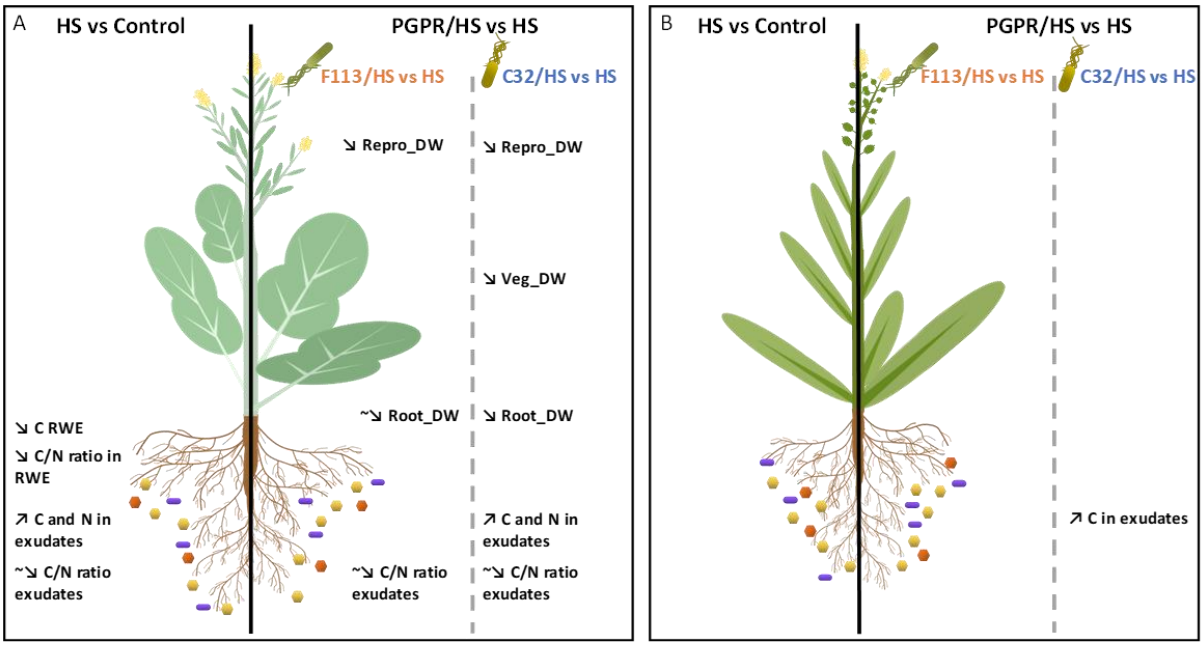


Figure 8 (Chap.4): Summary of the effects of heat stress alone or in combination with the inoculation of *Pseudomonas ogarae* F113 or *Pseudomonas sp.* C32 in rapeseed (A) and camelina (B). The effects are those observed at T2 (at the end of 5-day heat stress event) in comparison (i) with the control for the heat stress alone (HS) and (ii) with HS for F113/HS and C32/HS. The symbol (~) prior to the arrow indicates a non-significant trend.

Overall, our results indicate that the effects of the PGPR is heat stress- and species- dependent. Indeed, camelina and rapeseed exhibit two different behaviours in C root allocation after bacterial inoculation, with heat stress modulates plant-bacteria interaction. Rapeseed plants seem to undergo the plant-bacterial interactions while camelina plants appear to control the interactions with the bacteria. Nevertheless, because this study is only focused on the reproductive stage and cannot capture a holistic picture of the plant-bacteria interactions, these observations could not be generalized over the whole plant cycle (Chaparro et al. 2013; Huang et al. 2014; Tang et al. 2021a). Indeed, C fluxes and dynamics across plant development and depending on treatments are highly unpredictable between each sampling date. Further studies that consider a finer exudation dynamics are needed to describe plant development at the light of C fluxes (Tang et al. 2021a).

The quality of exudates in rapeseed seems to be as much impacted by bacteria as by heat stress, whereas in camelina, heat stress appears to be the most impacting factor of the exudates' quality. This study suggests the existence of close and rapid interactions involving trophic and signalling feedback

loops between *Pseudomonas* species and two Brassicaceae species. In our study, only few metabolites were analysed. A more exhaustive identification of the metabolites involved in the plant-bacteria interactions by metabolomic approach would allow a better understanding the role of exuded compounds in the modulation of the plant responses under heat stress (Escolà Casas and Matamoros 2021). Therefore, in addition to the quantity of each compound exuded, their diversity can also improve the relationship between plants and bacteria (Steinauer et al. 2016).

Overall, our study demonstrates the necessity to go deeper into the analysis of plant-PGPR interaction as it is likely to be a key driver for plant stress acclimation by modifying microbial communities in the rhizosphere (Vescio et al. 2021).

Author contribution

Jérémy Delamare: Investigation; Formal analysis; Visualization; Writing-Original Draft, Writing- Review & Editing

Sophie Brunel-Muguet: Funding acquisition; Project administration, Conceptualization; Writing- Review & Editing

Amine M. Boukerb: Investigation, Writing- Review & Editing

Mélanie Bressan: Investigation; Conceptualization, Writing- Review & Editing

Lucien Dumas: Investigation

Stéphane Firmin: Investigation

Fanny Leroy: Investigation

Annette Morvan-Bertrand: Investigation; Writing- Review & Editing

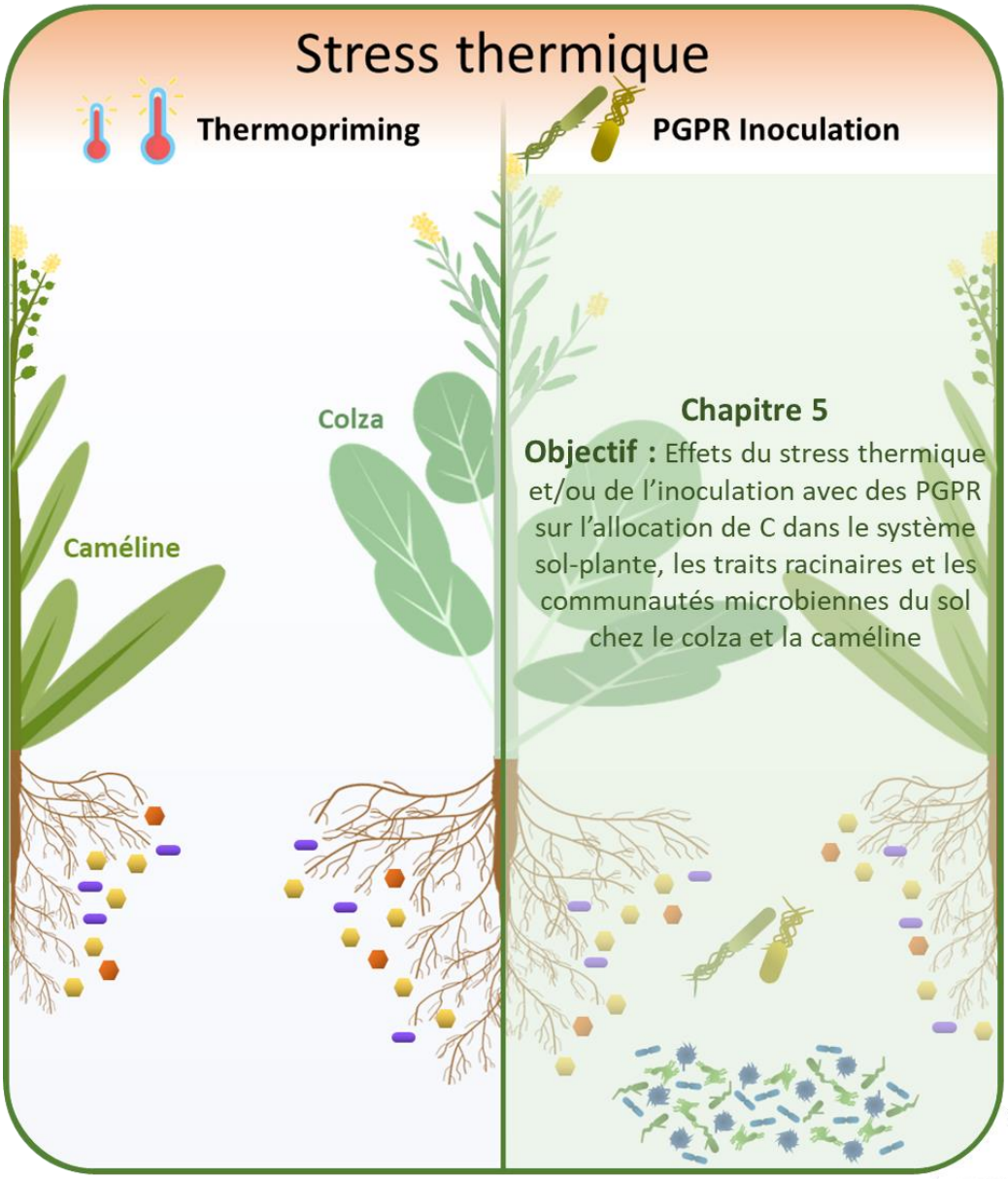
Claire Prigent-Combaret: Investigation, Conceptualization, Writing- Review & Editing

Emmanuelle Personeni: Project administration, Conceptualization, Writing- Review & Editing

Acknowledgements

This work was financially supported by Normandy region by the ALBATOR project and the metaprogram ACCAF “Adaptation to Climate Change in Agriculture and Forest” by INRAE. The authors would like to thank Anne-Françoise Ameline, Magali Bodereau, Josiane Pichon and Josette Bonnefoy for technical assistance. They also thanks to Adeline Adam from Unilasalle Beauvais technical plaform for her help in carboxylate data analysis and Anne Cauchois from UniLaSalle Rouen for microbiological analyses. We are also very grateful to PLATIN’ (PLAteau d’Isotopie de Normandie) for providing facilities and technical support. We thanks to the Center of Biological Resources BrACySol (Brassica-Allium-Cynara-Solanum, INRAE Center of Rennes, Brittany, France) for providing us the rapeseed seeds and SAATBAU for providing us the camelina seeds.

Chapitre 5 : Effets du stress thermique et/ou de l'inoculation avec des PGPR sur l'allocation de C dans le système sol-plante, les traits racinaires et les communautés microbiennes du sol chez le colza et la caméline



Effets du stress thermique et/ou de l'inoculation avec des PGPR sur l'allocation de C dans le système sol-plante, les traits racinaires et les communautés microbiennes du sol chez le colza et la caméline

5.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à la seconde expérimentation visant à atténuer les effets d'un stress thermique par l'utilisation de deux bactéries PGPR (*Pseudomonas sp.* C32 et *Pseudomonas ogarae* F113) (Fig.17). Pour cela, une culture de colza d'hiver et de caméline de printemps ont réalisées comme présenté dans le chapitre 4, à la seule différence que les plantes sont maintenues en sol au lieu d'être transférées en hydroponie. Au stade reproducteur, les plantes ont été soumises à un stress thermique précédé ou non de deux inoculations avec les bactéries PGPR. L'objectif principal de cette expérimentation est d'analyser les effets du stress thermique en combinaison ou non avec l'inoculation de PGPR sur les traits des plantes et le bilan carboné dans le système sol-plante des deux espèces ainsi que sur l'activité et la composition des communautés microbiennes. La culture des plantes, l'analyse des traits ainsi que les analyses des communautés microbiennes ont été réalisées lors de la deuxième année de thèse. L'analyse des résultats fait l'objet d'un article actuellement en cours de rédaction.

Principaux résultats

- En condition de stress thermique, le colza investit moins de biomasse dans les parties racinaires et semble maintenir son investissement dans les parties aériennes. De plus, l'activité microbienne diminue tandis que la composition des communautés microbiennes est peu modifiée.
- La caméline sous stress thermique investit plus de C dans les parties racinaires au détriment des feuilles. En parallèle, une augmentation du DOC est observée parallèlement à une modification de la composition microbienne du sol au profit des bactéries et une augmentation des activités enzymatiques telles que l'activité arylsulfatase.
- Les PGPR semblent agir comme un puits de C supplémentaire chez le colza alors qu'elles ont peu d'effets sur l'allocation carbonée de la caméline. De plus, les PGPR ont un impact sur la composition et l'activité des communautés microbiennes en place.

Functional ecological approach of the effects of PGPR inoculation on root traits, C allocation and soil microbial community in rapeseed (*Brassica napus* L.) and in camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) under heat stress condition

Jérémy Delamare[1], Sophie Brunel-Muguet[1], Mélanie Bressan[2], Wassila Riah-Anglet[2], Isabelle Trinsoutrot-Gattin[2], Claire Prigent-Combaret[3], Emmanuelle Personeni[1]

[1]Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

[2]UniLaSalle, SFR NORVEGE FED 4277, AGHYLE Rouen UP 2018.C101, 76130 Mont Saint Aignan, France

[3]Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, INRAE, VetAgro Sup, UMR5557 Ecologie Microbienne, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

Heat stress is known to modify C allocation in the plant-soil system and lead to modifications of plant traits and to impact the soil microbial communities. Inoculation of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) in soil is an increasingly acclimation strategy studied to help plants dealing with heat stress. However, these bacteria are also reported to modify the plant traits and the C allocation in plants.

The main objectives of this study were (i) to analyse the modifications induced by heat stress, and PGPR inoculation (in combination or separately) on plants (plant C balance and plant traits) and on the soil microbial state and (ii) to identify the contribution of C balance and plant traits in the variations of the abundance of soil microbial communities and enzyme activities. Finally, the comparison of the C allocation strategies between rapeseed and camelina was analysed.

Rapeseed and camelina presented two different strategies in heat stress condition. Indeed, camelina increased root investment and developed interactions with the soil microbial communities by increasing bacterial abundance and stimulating arylsulfatase activity. On the opposite, rapeseed underwent the heat stress. No major impacts of PGPR on plants were reported while PGPR mainly impact the microbial activity and the microbial composition either directly or through modifications of plant exudation. The plants traits explained 64.2% and 62.9% of the variations in the microbial activities and microbial composition for rapeseed and camelina respectively. The C balance in the plant/soil system allowed to explain 47% and 46.6% of the variations in the microbial activities and microbial composition for rapeseed and camelina respectively. Further studies are needed to understand the interactions between plants and the soil microbial communities under heat stress condition, at the light of the changes of the root exudates composition.

Key words: Plant traits, C allocation, Soil microbial community, Heat stress, PGPR, Rapeseed, Camelina

5.2. Introduction

The Carbon (C) allocation in plants can be described as a trade-off in resources partitioning between different functional sinks (Hartmann et al. 2020). The strategies of C allocation from the source organs (mainly leaves) towards the sink organs (roots, reproductive parts…) are linked to divergences in plant traits between species. From the sources organs, the newly assimilated C that is allocated to the roots is dedicated to ensure three main functions: i.e. root construction, root respiration and C released in the rhizosphere by root exudation (Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). Recently, another way to unravel the C functioning of allocation to the belowground part has emerged and is rather focused on the trade-offs between the C used for the development of the root system, for root exudation and for mycorrhizal symbioses, to explain the different sink strengths associated to these processes (Wen et al. 2019, 2022; Bergmann et al. 2020). Indeed, the different allocation rules between these three processes allow the strategies of acquisition of specific resources to the plant to be distinguished (Wen et al. 2019, 2022). The relation between these three pools can be explained by a multidimensional gradient considering the conservation gradient (acquisitive *vs*. conservative) and the collaboration gradient ("do it yourself" species *vs.* outsourcing species) in order to better characterize the different C allocation strategies at the root level (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). Thus, the authors explained that a high Specific Root Length (SRL) is inversely correlated to the percentage of mycorrhization and could reflect, a "do it yourself" strategy of the plant consisting in developing its root system instead of setting up interactions with mycorrhizal fungi (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022). This type of strategy is consistent with the Brassicaceae strategy such as rapeseed and camelina presenting a high SRL due to a highly branched root system with fine roots and that do not interact with mycorrhizal fungi (Gkarmiri et al. 2017; Cosme et al. 2018). These species are therefore faced to a trade-off to satisfy a twofold requirement i.e. allocated C to both the development and the metabolism - including root respiration - of the root system and the root exudation (Weigelt et al. 2021; Wen et al. 2022).

The C from exudates account for a key C input in soil. These soluble metabolites released in the rhizosphere have major impacts on soil microbial community's metabolism, abundance and taxonomic composition (Fischer et al. 2007, 2010; Haichar et al. 2008; Kuzyakov and Blagodatskaya 2015; Steinauer et al. 2016; Eisenhauer et al. 2017; Guyonnet et al. 2017, 2018; Vescio et al. 2021). Unfortunately, knowledge on the quantity and quality of the root exudates in field conditions is scarce as their collection stay challenging (Oburger and Jones 2018)., Several authors attempted to extract soluble C released in the rhizosphere to obtain the dissolved organic C (DOC). This variable is assumed to reflect the fraction of soluble C at the root/soil interface and is considered to be mainly composed of root exudates (Uselman et al. 2000; Delarue et al. 2014; Bongiorno et al. 2019).

Plants can select the microbial community in the rhizosphere through specific exudates (Bais et al. 2006; Philippot et al. 2013; Huang et al. 2014), such as the Brassicaceae species that can stimulate the bacteria development at the expense of the fungi species due to the exudation of glucosinolates (Bressan et al. 2009; Sharma et al. 2023). Moreover, through a trophic pathway, exudates can stimulate the soil microbial activity and therefore increase the production of microbial extracellular enzymes, that play a key role in nutrients cycling, increasing the rates of these elements (Cheng and Coleman 1990; Asmar et al. 1994). Extracellular enzymes activities including β-glucosidase, N-acetyl-glucosaminidase, arylsulfatase, involved in the dynamic of C, N, S and dehydrogenase as overall activity of microbial communities, are widely used as sensors for soil microbial status (Meier et al., 2017; Shi et al., 2011; Vong et al., 2007; Zhang et al., 2019).

The heat stress caused by the increase in temperature of heat waves represent one of the main factors affecting agrosystems (IPCC 2021). Heat waves occur mainly at the reproductive stages, the most sensitive stages for seed set and seed filling which are determining for seed yield in crops, such as rapeseed and camelina. Yield penalties can be partly due to an impairment of C assimilation from the above-ground plant parts, then resulting in a decrease in the whole plant biomass (Wahid et al. 2007; Allakhverdiev et al. 2008; Kourani et al. 2022). Indeed, processes related to gas exchange such as photosynthesis and respiration are particularly affected by heat stress due to a reduction of C fixation and light acquisition (Bañon et al. 2004; Allakhverdiev et al. 2008). These C modifications could impact the C balance and the C allocation in plants. However, despite the decrease in C fixation in heat stress conditions, some authors observed an increase in C content in the root and even assume that the C is preferentially allocated to the roots in heat stress conditions (Mainali 2007; Mainali et al. 2014; Giri et al. 2017). These modifications in C allocation could be accounted by contrasting modifications in root traits according to the plant species and abiotic conditions. For example, Bakhshandeh et al., (2019) demonstrated that the SRL of wheat increased in heat stress condition but alternatively, other studies showed a decrease in several root morphological traits, such as root length, root surface and average root diameter (Xu and Huang 2001; Yuan et al. 2016; Calleja-Cabrera et al. 2020). Considering that exudation is rapidly and dynamically linked to the photosynthesis and the C allocation rules to the roots (Farrar et al. 2003; Nguyen 2003; Dilkes et al. 2004), impairment in these processes due to heat stress can modify the root exudation. Several studies showed that an increase in C allocation to roots in heat stress conditions could result to a greater C exudation rate (Uselman et al. 2000; Yin et al. 2013a, b) and subsequently greater C inputs in the soil (Bakhshandeh et al. 2019). These findings are consistent with the previously observed increase in the DOC in heat stress condition (Uselman et al. 2000; Luo et al. 2009; Toosi et al. 2014) supporting the idea that DOC could be a reliable proxy of the exudation in soil. Under heat stress, plant growth is likely to be reduced to a higher magnitude than

photosynthesis, thus resulting in an overflow of soluble C in plant allocated to root exudation (Prescott et al. 2020; Prescott 2022). Finally, the modulation of C deposition in soil due to heat stress can modify the microbial communities composition (Classen et al. 2015; Vescio et al. 2021) and stimulate some microbial enzymatic activities (Kuzyakov et al. 2007; Yin et al. 2013a).

Inoculation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in soil is of growing interest to limit abiotic stress impacts. Indeed, these bacteria can reduce the impact of heat stress through a wide range of activities such as Indole-3-Acetic Acid (IAA) production that can directly affect the plant and improve root elongation and stimulate root development (Vacheron et al. 2013; Kumar et al. 2022). These PGPR can also modulate root exudation (i) directly by the consumption of the exuded compounds that could unbalance root exudates fluxes and the source/sinks relationships at the plant level (Leyval and Berthelin 1993; Farrar et al. 2003; Matilla et al. 2010; Huang et al. 2014) and (ii) indirectly via the hormonal communication between the PGPR and the plant (Huang et al. 2014; Asari et al. 2017; Jalmi and Sinha 2022). Finally, these PGPR could be able to change plant morphology and the C allocation within the plant due to an additional sink effect and/or by hormonal process (Jalmi and Sinha 2022). Moreover, soil inoculation with PGPR can modify the soil borne microbial communities (Renoud et al. 2022; Vuolo et al. 2022). PGPR are particularly competitive and can take the benefit of competition with the soil born microorganisms which could not only unbalance the activities of the microbial communities involved in nutrients cycle but also reduce soil microbial diversity (Blagodatskaya et al. 2010; Florio et al. 2017; Renoud et al. 2022; Vuolo et al. 2022).

The aim of the present work was to study (i) the potential modifications induced on plants (plant C balance, plant traits) and soil microbiological state under heat stress, combined or not with PGPR inoculation. (ii) the role of C balance and plant traits in the variations of the abundance of soil microbial communities and enzyme activities. This work will enable the comparison of carbon allocation strategies between two Brassicaceae species that differ in their plant growth strategies (acquisitive vs. conservative).

5.3. Materials and Methods

5.3.1. Plant cultivation and experimental treatments

The experiment was performed from October 2021 to July 2022 for rapeseed and from March to July 2022 for camelina in greenhouse conditions (49◦11’ 09 N, 0◦21’ 32 W, Caen, France) as explained in Delamare et al. (2023b). One rapeseed plant (*Brassica napus* L. cv. Aviso; a winter variety) and four camelina plants (*Camelina sativa* (L.) Crantz cv. Calena; a spring variety) were grown in each pot following the description of plant cultivation explained in Delamare et al. (2023b). Unlikely to the protocol detailed in Delamare et al. (2023b), the plants were kept in soil throughout the whole

cultivation period until the plant harvest. The plants have received the same treatments that are reported in Delamare et al. (2023b), consisting of inoculate plants with one PGPR (*Pseudomonas ogarae* F113 or *Pseudomonas sp.* C32) in combination or not with and heat stress exposure. Two PGPR were tested, *Pseudomonas ogarae* F113, known for its PGPR effects (Vacheron et al. 2016, 2018; Blanco-Romero et al. 2022) and *Pseudomonas sp.* C32 which presents several PGPR characteristics as described in Delamare et al. (2023b). The PGPR strains were cultivated and applied following the same procedure at the same concentration as explained in Delamare et al. (2023b). Briefly 10 mL of each inoculum (at the concentration of $1x10^6$ cells/mL) were provided into the soil. The first PGPR inoculation was applied at the end of the vernalization for rapeseed and at the beginning of the elongation stage for camelina and the second PGPR inoculation was applied five days before the heat stress application. The heat stress (HS) treatment was applied at the reproductive stage as described in Delamare et al. (2023b). Briefly, the heat stress modality consists of five days at 26.63°C ± 1.21/16.25°C ± 0.77 (day/night) with one daily heat peak for 5h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.27°C ± 0.79 for rapeseed and 26.93°C ± 1.34/17.26°C ± 0.97 (day/night) with one daily heat peak for 5h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.74°C ± 0.98 for camelina.

5.3.2. Plant traits and soil dissolved organic carbon analysis

Aerial plant traits analysis

The aerial plant parts were harvested and separated into 4 compartments: i.e. fallen leaves (i.e. the pool of leaves that fell over the whole cycle), green leaves (i.e. the green leaves that remained attached to the plant), stems and reproductive parts (corresponding at the sum of the inflorescences in each pot). The leaf area was measured using an area meter (LI-COR LI-3100, Lincoln, NE, USA) and each compartment was dried at 50°C during 48 h to obtain the dry weight (DW).

Root traits analysis

Roots system were gently extracted from soil, washed with distilled water and separated in 3 aliquots. Approximately 1g of root was collected to analyse the root water extracts and the remaining root system was separated in two similar parts. The first part was weighted to obtain the fresh mass, then dried at 50°C for 48 h to obtain the dry mass and eventually ground to analyse the total amount of C and N in the roots. The second part was used to obtain the root morphology, as explained in Delamare et al. (2023a). Briefly, root morphology was analysed with a flatbed scanner (Epson Expression 10000XL) coupled to the WINRHIZO software (Regent Instruments Inc., Canada). Then, these aliquots of roots were weighted to obtain the fresh mass, dried at 50°C for 48 h and weighted to obtain the root dry mass.

Root water extracts analysis

As described in Delamare et al. (2023a), the Root water extract (RWE) was collected using 1g of fresh roots that was placed in 10 mL of ultrapure water and incubated in a water bath at 65°C for 1h. The soaking solution was then filtered at 0.2 µm with a PES filter. Finally, prior to the C and N analyses, the root water extracts were stored at -20°C.

Dissolved organic carbon (DOC) extraction

The extraction of Dissolved Organic Carbon (DOC) was performed as explained in Bongiorno et al., (2019). Briefly, 10g of fresh soil were soaked with 20 mL of ultrapure water for 1h. After 1h, the supernatant was collected, centrifuged 20 min à 3750 rpm and 10 min à 10000 rpm and then filtered at 0.2µm. DOC extracts were stored at -20°C prior to the C analysis.

C and N analyses

The C and N content for each organ, in the DOC and in the roots water extracts (RWE) were measured with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Isoprime, Elementar, Lyon, France) linked to a C/N analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The DOC of both species was concentrated 10-fold to reach detectable amounts.

5.3.3. Soil microbiological analyses

Enzymatic activities

Soil enzymatic activities measured in this study were involved in C cycle, β-glucosidase activity (BG; EC: 3.2.1.21), N cycle, N-acetyl-glucosaminidase (NAG; EC: 3.2.1.52), and S cycle, arylsulfatase (ARYLS; EC: 3.1.6.1). The dehydrogenase activity (DES; EC: 1.1.1.1) was determined as an indicator of the whole soil microbial activity. The enzymes activities were analysed by colorimetric methods according to the procedure detailed in the ISO 20130:2018 for enzymes involved in C, N and S cycles and according to the procedure detailed in Stevenson (1959) for the dehydrogenase activity. Briefly, for enzymes involved in C (BG), N (NAG) and S (ARYLS) cycles, 4g of fresh soil were homogenized with 25 mL of sterile ultrapure water for 10min at 250 rpm. Soil solutions were subsequently incubated at 37°C with 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside at 0.05 M for BG, with para-nitrophenyl N-acétyl β-D glucopyranoside at 0.05 M for NAG and with Potassium 4-nitrophenyl sulfate at 0.025 M for ARYLS. Then, 1h after the incubation for BG and NAG and 4h after the incubation for ARYLS, the reaction was stopped with 0.5 M $CaCl_2$ and 0.1 M Tris at pH 12. The plate was centrifugated 5 min at 1500×g and the absorbance was measured on a Varioskan Flash-Thermo microplate reader at λ = 405 nm. The amounts of p-nitrophenol were obtained by comparison with calibration curves. For the

dehydrogenase activities, 1g of fresh soil was homogenized with 1.5 mL of 1 M Tris at pH 7. The soil solution was subsequently incubated for 24h at 20°C with 2-(p-Iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride at 5 mg/mL. The reaction was stopped with N,N-dimethylformamide/ethanol (1:1) and the tubes were centrifugated at 9000 rpm. Following centrifugation, 4 ml aliquots of clear supernatant were collected and light absorbance was measured using a spectrophotometer at λ = 464 nm (50 Scan UV-Visible, Varian, Australia). The amounts of iodonitrotetrazolium chloride were obtained by comparison with calibration curves. The soil enzymes activities were expressed in mU g^{-1} dry soil, corresponding to nmoles of hydrolyzed or oxidized substrate per minute per gram of dry soil.

Bacterial and fungal biomasses quantification

Total soil DNA was extracted from 0.5 g of all biological replicates using the FastDNA SPIN Kit for soil (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) according to the manufacturers' procedure. Concentrations of DNA samples were evaluated by fluorimetry using the Fluorescent DNA Quantitation Kit Hoechst 33258 (Biorad, Hercules, CA, USA) at 360/ 460 nm excitation/emission wavelengths, on a Varioskan Flash-Thermo microplate reader. DNA samples were then stored at – 20 °C for further analyses. Abundance of total bacterial and fungal communities were assessed using real-time PCR as described by Gangneux et al. (2011). Bacterial abundance was determined by targeting 16S rRNA gene using the primers 63f (5´-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3´) (Marchesi et al. 1998) and BU16S4 5´-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3´) derived from 341F (Muyzer et al. 1993). Fungal abundance was measured by targeting 18S rRNA genes using the primers FU18S1 (5´-GGAAACTCACCAGGTCCAGA-3´) and Nu-SSU-1536 (5´-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-3´) (Borneman and Hartin 2000). Real-time PCR reaction mixes were prepared as following: 10 ng of soil DNA, 0.5 µM of each primer, 25 µl of absolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) and 0.25 mg ml-1 BSA (GeneOn). Amplification procedure was 95°C for 15 min and 40 cycles at 95°C for 40 sec, 64]C for 45 sec and 72°C for 30 sec. Melting curve profiles were then obtained by heating PCR products to 95°C, cooling to 60 °C and slowly heating to 97 °C (1.1 °C every 10 s with continuous measurement of fluorescence). All amplifications were performed on a LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland). Standard curves were obtained using serial dilutions of linearized plasmids containing either the cloned 16S rRNA genes from the Pseudomonas aeruginosa or 18S rRNA gene of Fusarium graminearum. PCR efficiency and DNA concentration were assessed using the Roche second derivative maximum method. Bacterial and fungal abundance are expressed respectively in number of 16S or 18S rRNA copy g-1 dry soil.

5.3.4. Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± sd of n replicates available per treatment for all measured variables. The statistical analyses were performed with R studio software (version 2023.06.0+421). The effects of the treatments were tested with a two-way ANOVA, coupled with a Tukey test, after verification of the normality with the Shapiro-Wilk test and the homoscedasticity with the Bartlett test. If the normality and/or the homogeneity of variances were not respected, variables were log-, 1/n- or square root- transformed to perform the ANOVA. If the normality or the homogeneity of the variances were not verified despite the transformation, then the Scheirer–Ray–Hare test was performed to replace the two-way ANOVA with the package "Rcompanion" (Mangiafico 2023) and the treatments comparison was then assessed with the package "Pgirmess" (Giraudoux 2015). Redundancy analyses (RDA) were performed for each species, in order to analyse the linkage (i) between microbial activities and microbial composition and plant traits and (ii) between microbial activities and microbial composition and plant and soil C balance (Fig.1 (Chap.5)). Thus, variables related to microbial activities and microbial composition were constrained by 15 plant traits and 9 variables related to plant and soil C balance via the redundancy analysis with the package "vegan". Selection of the main explanatory variables were assessed with an Akaike Information Criterion (AIC). The significance of these RDA was assessed using permutation tests (1000 permutations). Before assessing the RDA, the correlations between plant traits analyses and between plant and soil C balance were evaluated to keep only one trait among those highly correlated between them.

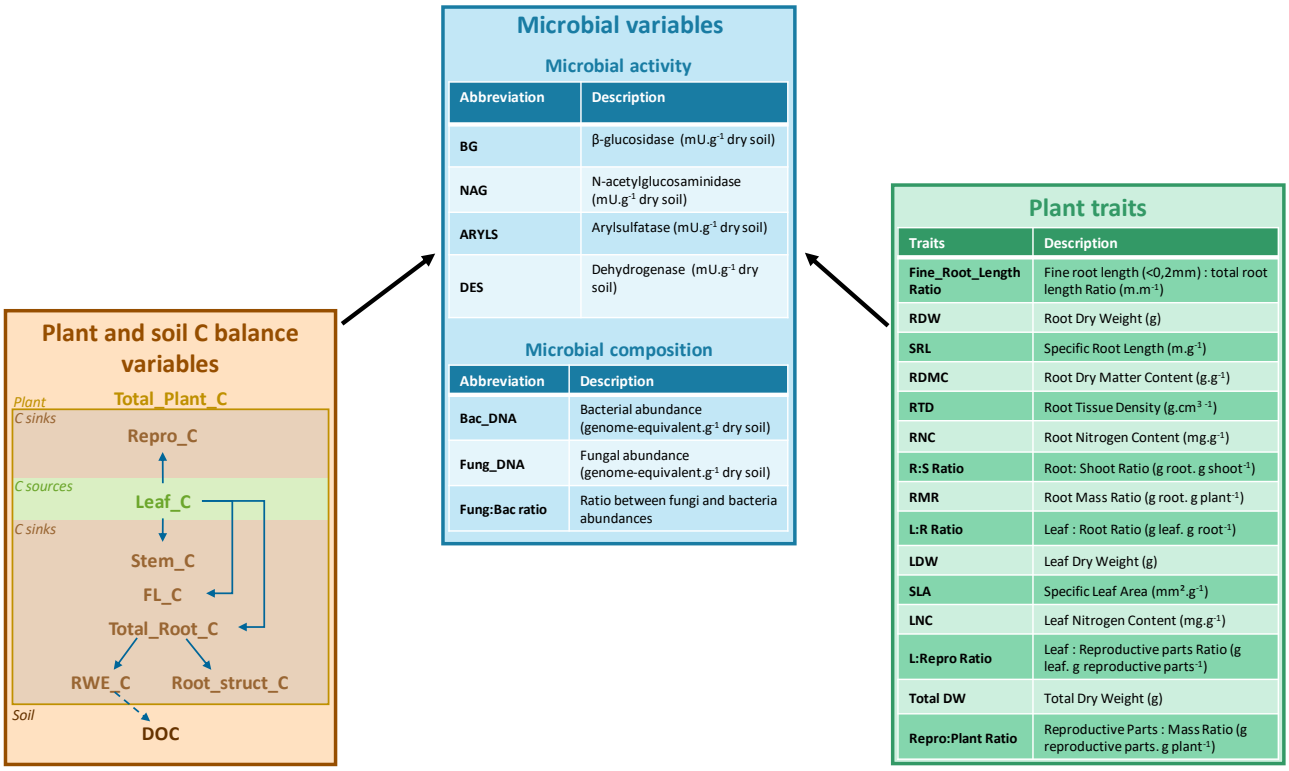


Figure 1 (Chap.5): Schematic diagram of the three sets of studied variables. The black arrows show links analysed in the RDA between **plant and soil C balance variables and plant traits towards microbial activity and microbial composition**. **Plant and soil C balance variables** are divided into Total_Plant_C: reproductive parts (Repro_C), leaves (Leaf_C), stem (Stem_C), fallen leaves (FL_C), and Total_Root_C: root structural C (Root_struct_C), root soluble C (RWE_C) and dissolved organic carbon (DOC). **The plant traits** are related to (i) root parts: i.e. Root Dry Weight (RDW), the ratio between the fine root length and the total root length (Fine_Root_length_Ratio), Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Nitrogen Content (RNC), (ii) belowground/aboveground investment, i.e. Root:Shoot Ratio (R:S ratio), Root Mass Ratio (RMR), Leaf: Root ratio (L:R ratio), (iii) total plant development, i.e. Total Dry Weight (Total_DW), (iv) leaf parts, i.e. Leaf Dry Weight (LDW), Specific Leaf Area (SLA), Leaf Nitrogen Content (LNC) and (v) reproductive parts plant investment, i.e. Leaf: reproductive parts ratio (L:repro ratio) and Reproductive parts Mass Ratio (Repro:plant ratio)

5.4. Results

5.4.1. Heat stress and PGPR inoculation effects on C balance, plant traits and soil microbial communities

Heat stress and PGPR inoculation effects on C balance

The impacts of the PGPR inoculation and the heat stress exposure on the plant C balance were measured in rapeseed (Fig.2A (Chap.5)) and camelina (Fig.2B (Chap.5)). In rapeseed, C32 alone only increased the amount of C in leaves (Leaf_C) in comparison with the Control and C32/HS (Fig.2A (Chap.5)). The principal treatment effect on roots were on Root C soluble (RWE_C) which decreased with F113 in combination with heat stress (F113/HS) in comparison with F113 without heat exposure. DOC was the compartment the most affected by treatments in rapeseed. HS without PGPR inoculation led to a greater DOC than when combined with F113 and C32 (F113/HS and C32/HS). Moreover, C32/HS induced a weaker amount of DOC than C32 without HS (C32) (Fig.2A (Chap.5)). In camelina, the C in aerial parts was not impacted by the treatments. The main effects were observed in root C soluble (RWE_C) and in DOC (Fig.2B (Chap.5)). Indeed, C32 without HS and HS without C32 inoculation led to lower amount of C soluble in roots than when combined (C32/HS). F113 in combination or not with HS (F113/HS or F113) did not impact the amount of C soluble in roots in camelina (Fig.2B (Chap.5)). Only HS without PGPR inoculation led to increase the amount of C in DOC in comparison with control plants (Fig.2B (Chap.5)).

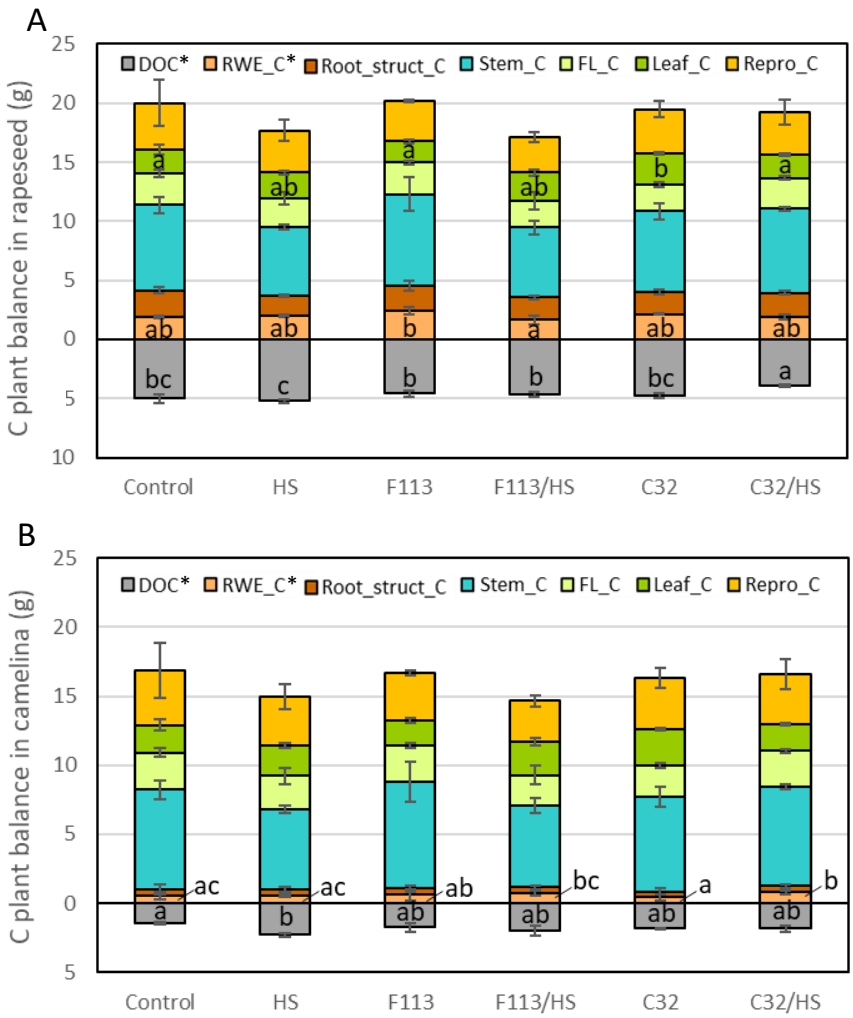


Figure 2 (Chap.5): C balance in rapeseed (A) and camelina (B) after PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain, F113, *Pseudomonas sp.* strain, C32) and/or heat stress exposure (HS, alone or combined with PGPR inoculations). C balance of the whole plant is divided into reproductive parts (Repro_C), leaves (Leaf_C), fallen leaves (FL_C), stem (Stem_C), root structural C (Root_struct_C) and root soluble C (RWE_C). The Dissolved Organic Carbon (DOC) is represented below the x axis. *** For better readability, the DOC and the RWE_C is inflated 10-fold for rapeseed and 100 and 10-fold for camelina, respectively**. The effects of the bacteria and heat stress were tested with a two-way ANOVA and letters indicate the ranking amongst the treatments following a mean comparison test. Values are means ± standard deviation (n=3).

Heat stress and PGPR inoculation effects on plant traits

The impacts of the PGPR inoculation and the heat stress exposure on plant traits were measured in rapeseed and camelina (Table.1A and B (Chap.5)). In rapeseed, RDW decreased with HS and F113/HS in comparison with Control and F113, respectively. The RDMC also decreased with HS and tended to decrease with F113/HS. On the opposite, L:R ratio tended to increase with HS and increased

significantly with C32 in comparison with control and C32/HS (Table.1A (Chap.5)). Moreover, F113/HS decreased significantly the Total_DW in comparison with F113 alone and the LDW was negatively impacted by C32/HS in comparison with C32 alone in rapeseed (Table.1A (Chap.5)). In camelina, the Fine_root_length_ratio decreased significantly with C32/HS and the SRL decrease significantly with C32 without HS (C32) in comparison with the control. On the opposite, the SLA increased significantly with C32 in comparison with the control (Table.1B (Chap.5)). The LDW decreased significantly with F113/HS and C32/HS in comparison with F113 and C32 alone, respectively. The L:R ratio decreased significantly under the treatments with HS (trend only for HS and significant decrease for both F113/HS and C32/HS) in camelina. Such as for the L:R ratio, the L:Repro ratio decreased with the treatments with HS (trend for HS and F113/HS and significantly for C32/HS) (Table.1B (Chap.5)).

Table 1 (Chap.5): Plant traits in rapeseed (A) and camelina (B) after PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain, F113, *Pseudomonas* sp. strain, C32) and/or heat stress (HS) exposure (HS alone or combined with PGPR inoculations). The analysed traits are related to **(i)** root parts, i.e. Root Dry Weight (RDW), the ratio between the fine root length and the total root length (Fine_Root_length_Ratio), Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Nitrogen Content (RNC), **(ii)** belowground/aboveground investment, i.e. Root:Shoot Ratio (R:S ratio), Root Mass Ratio (RMR), Leaf: Root ratio (L:R ratio), **(iii)** total plant development, i.e. Total Dry Weight (Total_DW), **(iv)** leaf parts, i.e. Leaf Dry Weight (LDW), Specific Leaf Area (SLA), Leaf Nitrogen Content (LNC) and **(v)** reproductive parts plant investment, i.e. Leaf: reproductive parts ratio (L:repro ratio) and Reproductive parts Mass Ratio (Repro:plant ratio). The effects of the bacteria and heat stress were tested with a two-way ANOVA and letters indicate the ranking amongst the treatments following a mean comparison test. Values are means ± standard deviation (n=4).

A

Treatments	RDW	RDMC	RTD	RNC	SRL	Fine_Root_length_ Ratio	R:S ratio	RMR	L:R ratio	LDW	LNC	SLA	L:repro ratio	Repro:plant ratio	Total_DW
Rapeseed															
Control	6.18 ± 0.80**ac**	0.20 ± 0.01**a**	0.29 ± 0.04	11.50 ± 2.53	105.76 ± 12.46	0.81 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.91 ± 0.24**bc**	5.92 ± 0.49**ab**	19.76 ± 2.11	258.82 ± 11.49	0.62 ± 0.32	0.22 ± 0.07	48.66 ± 1.92**ab**
HS	4.84 ± 0.15**b**	0.17 ± 0.01**b**	0.24 ± 0.03	12.61 ± 1.06	122.40 ± 17.41	0.78 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.24 ± 0.15**ab**	5.99 ± 0.60**ab**	21.91 ± 0.20	288.78 ± 6.52	0.62 ± 0.19	0.21 ± 0.02	41.45 ± 2.99**b**
F113	6.34 ± 0.18**a**	0.21 ± 0.01**a**	0.25 ± 0.02	11.99 ± 0.52	113.69 ± 13.86	0.78 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.72 ± 0.04**c**	4.85 ± 0.55**b**	18.58 ± 2.09	261.29 ± 13.44	0.53 ± 0.14	0.20 ± 0.03	49.68 ± 1.48**a**
F113/HS	5.10 ± 0.42**bc**	0.19 ± 0.01**ab**	0.25 ± 0.02	13.80 ± 0.78	111.30 ± 20.52	0.79 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.10 ± 0.19**ac**	6.31 ± 1.22**ab**	20.19 ± 3.16	270.00 ± 11.28	0.82 ± 0.37	0.20 ± 0.04	42.26 ± 4.28**b**
C32	5.47 ± 0.44**ab**	0.20 ± 0.01**a**	0.26 ± 0.05	12.51 ± 0.59	110.13 ± 30.42	0.79 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.00	1.35 ± 0.11**a**	7.35 ± 0.64**a**	17.05 ± 2.13	262.08 ± 18.91	0.80 ± 0.17	0.20 ± 0.02	45.79 ± 2.90**ab**
C32/HS	5.48 ± 0.40**ab**	0.20 ± 0.01**a**	0.25 ± 0.05	12.36 ± 0.34	123.46 ± 22.19	0.80 ± 0.02	0.14 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.95 ± 0.16**bc**	5.18 ± 0.58**b**	18.29 ± 2.11	275.81 ± 19.65	0.58 ± 0.24	0.21 ± 0.05	45.84 ± 2.49**ab**
Bacteria effects	0.686149	0.0689441 .	0.7988	0.5044	0.9134	0.63038	0.39892	0.33422	0.0596463 .	0.2142401	0.05499 .	0.601981	0.8279	0.7976	0.87495
Heat stress effects	**0.001082 ****	**0.0001523 *****	0.2214	0.1323	0.2834	0.94607	0.07001 .	0.06565	0.369167	0.4578817	0.10234	**0.008746 ****	0.8064	0.9251	**0.00316 ****
Interaction	**0.025286 ***	0.0528220 .	0.4952	0.3932	0.6159	**0.04275 ***	0.27168	0.23862	**0.0006833 *****	**0.0006284 *****	0.8623	0.347064	0.1553	0.9493	**0.04282 ***

B

Treatments	RDW	RDMC	RTD	RNC	SRL	Fine_Root_length_ Ratio	R:S ratio	RMR	L:R ratio	LDW	LNC	SLA	L:repro ratio	Repro:plant ratio	Total_DW
Camelina															
Control	1.15 ± 0.10	0.29 ± 0.01	0.14 ± 0.02	11.06 ± 0.48	301.77 ± 30.35**b**	0.87 ± 0.01**b**	0.12 ± 0.01**ab**	0.11 ± 0.01**ab**	0.75 ± 0.11**a**	0.87 ± 0.11**b**	19.92 ± 0.94	313.46 ± 26.45**b**	0.37 ± 0.02**a**	0.24 ± 0.01	10.26 ± 0.20
HS	1.27 ± 0.20	0.31 ± 0.02	0.14 ± 0.02	13.05 ± 0.17	243.46 ± 37.88**ab**	0.83 ± 0.02**ab**	0.13 ± 0.02**ab**	0.11 ± 0.01**ab**	0.53 ± 0.08**ab**	0.67 ± 0.07**bc**	21.77 ± 2.74	331.39 ± 16.09**ab**	0.25 ± 0.04**ab**	0.24 ± 0.01	10.73 ± 0.08
F113	1.24 ± 0.22	0.29 ± 0.01	0.14 ± 0.01	10.51 ± 0.71	254.87 ± 40.23**ab**	0.84 ± 0.01**ab**	0.12 ± 0.01**ab**	0.11 ± 0.01**ab**	0.71 ± 0.11**a**	0.87 ± 0.08**b**	21.03 ± 2.41	334.40 ± 33.06**ab**	0.31 ± 0.04**a**	0.25 ± 0.02	11.14 ± 1.07
F113/HS	1.32 ± 0.15	0.30 ± 0.01	0.16 ± 0.01	11.97 ± 1.38	243.08 ± 28.56**ab**	0.84 ± 0.02**ab**	0.14 ± 0.02**b**	0.12 ± 0.01**b**	0.48 ± 0.03**b**	0.57 ± 0.06**ac**	21.41 ± 0.74	373.37 ± 40.62**ab**	0.24 ± 0.03**ab**	0.24 ± 0.01	10.83 ± 1.20
C32	0.97 ± 0.15	0.29 ± 0.01	0.16 ± 0.01	11.59 ± 0.62	201.66 ± 50.13**a**	0.83 ± 0.02**ab**	0.11 ± 0.01**a**	0.10 ± 0.01**a**	0.72 ± 0.06**a**	0.74 ± 0.05**ab**	24.32 ± 3.08	382.49 ± 14.36**a**	0.26 ± 0.02**a**	0.27 ± 0.01	10.16 ± 0.15
C32/HS	1.21 ± 0.09	0.30 ± 0.01	0.13 ± 0.01	11.35 ± 1.44	267.01 ± 34.01**ab**	0.82 ± 0.01**a**	0.13 ± 0.01**ab**	0.12 ± 0.01**ab**	0.38 ± 0.15**b**	0.46 ± 0.20**c**	20.10 ± 2.86	362.83 ± 20.96**ab**	0.16 ± 0.12**b**	0.27 ± 0.03	10.95 ± 0.40
Bacteria effects	0.08954 .	0.66507	0.475102	0.32281	0.24818	**0.04359 ***	0.283158	0.271242	0.1905	**0.02317 ***	0.5894	**0.00898 ****	**0.0039663 ****	**0.008525 ****	0.25535
Heat stress effects	**0.04057 ***	**0.03208 ***	0.907578	**0.03056 ***	0.93776	0.09106 .	**0.006634 ****	**0.006849 ****	**0.000009224 *****	**0.00004949 *****	0.5583	0.30153	**0.0003138 *****	0.860871	0.61172
Interaction	0.58899	0.65273	**0.009585 ****	0.13565	**0.01798 ***	0.05977 .	0.353649	0.342979	0.4269	0.68561	0.1013	0.12317	0.6009593	0.951228	0.15154

Heat stress and PGPR inoculation effects on microbial communities' abundance microbial communities and enzymatic activities

The effects of the PGPR inoculation and the heat stress exposure on enzymatic activities under rapeseed and camelina are presented in Figure 3A (Chap.5). **The levels of enzyme activities showed different patterns of variation depending on plant species, applied treatment and the considered enzyme.** In rapeseed, the DES was the sole activity impacted by the treatments. Indeed, HS, F113/HS, C32 and C32/HS decreased the DES in rapeseed while F113 alone did not modify this activity (Fig.3A (Chap.5)). In camelina, the four activities showed different response to the treatments. C32 significantly increased the β-glucosidase and the NAG activities in comparison to control (Fig.3A (Chap.5)). While HS significantly increased ARYLS activity. F113 without HS (F113) decreased the dehydrogenase in comparison to the control and C32 alone (Fig.3A (Chap.5)).

Concerning the response of bacterial and fungal abundance under rapeseed and camelina after PGPR inoculation and the heat stress exposure, results are presented in Figure 3B (Chap.5). In rapeseed, microbial abundances were impacted by the treatments. C32/HS treatment significantly increased the Fung:Bac ratio (Fig.3B (Chap.5)), which was in line with the significant increase of fungal abundance under this treatment C32/HS. The bacterial abundance increased with the PGPR inoculation in comparison with control (significantly for F113 and trend for C32) and tended to increase with HS in rapeseed (Fig.3B (Chap.5)). In camelina, the Fung:Bac ratio and the fungal abundance were not impacted by the treatments. However, the bacterial abundance increased significantly with HS and C32, and decreased significantly with F113/HS in comparison with HS and F113. The same observation was made with C32/HS that led to decrease the bacterial abundance in comparison with HS (non-significantly) and C32 (significantly) (Fig.3B (Chap.5)).

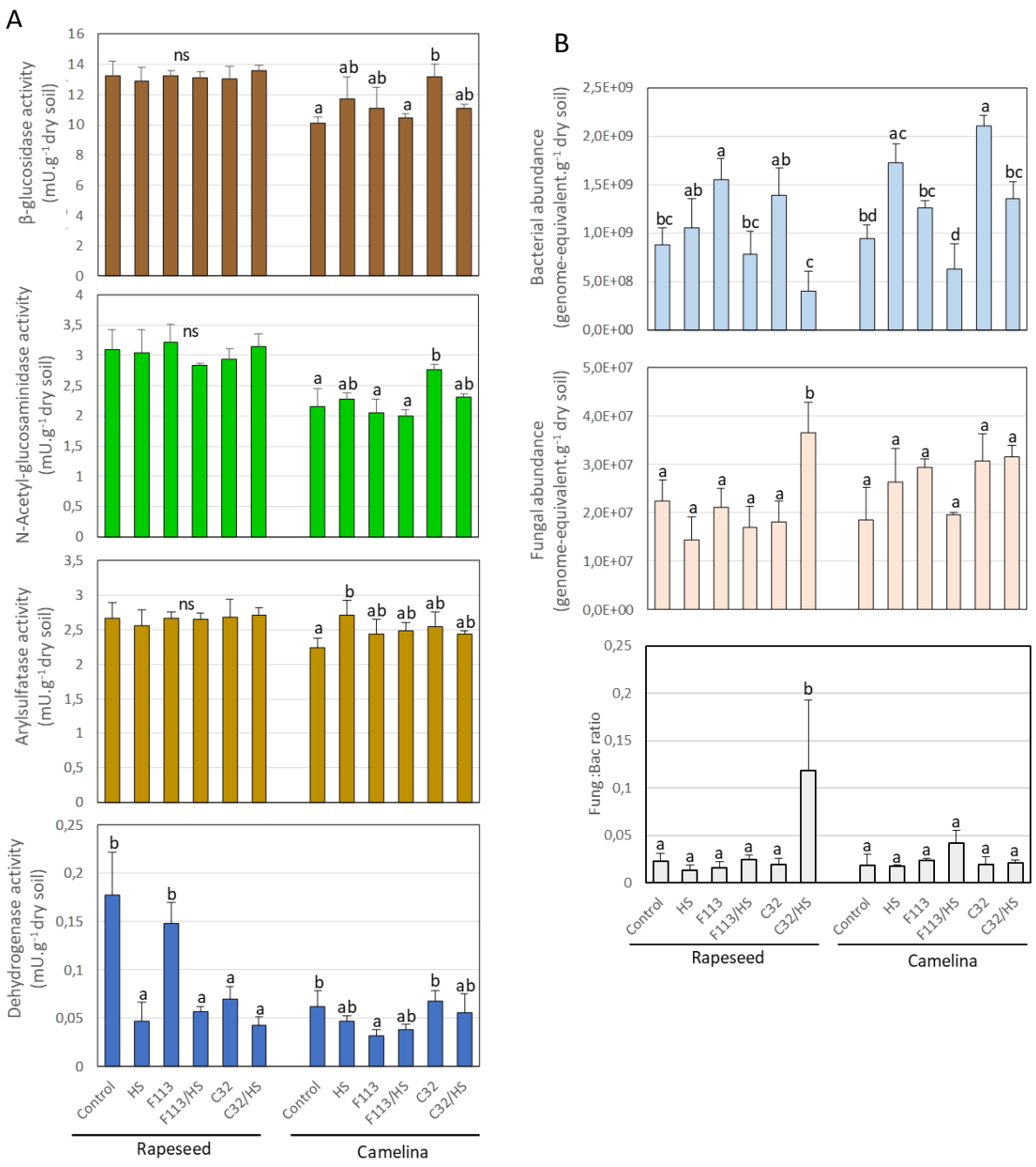


Figure 3 (Chap.5): Microbial activities (A) and abundance (B) in rapeseed and camelina after PGPR inoculation (*Pseudomonas ogarae* strain, F113, *Pseudomonas sp.* strain, C32) and/or heat stress exposure (HS, alone or combined with PGPR inoculations). The microbial activities were assessed by the quantification of four microbial extracellular enzymes, i.e. β-glucosidase (BG), N-acetylglucosaminisade (NAG), Arylsulfatase (ARYLS) and dehydrogenase activity (DES). The microbial composition (B) was analysed by the quantification of the bacterial and the fungal abundance. The ratio between these abundances (Fung:Bac Ratio) was calculated. The effects of the bacteria and heat stress were tested with a two-way ANOVA and letters indicate the ranking amongst the treatments following a mean comparison test. Values are means ± standard deviation (n=4).

5.4.2. Relationships between soil microbial communities, plant traits and plant C balance

According to the RDA, the plant traits explained 64.2% (p-value = 0.037*) of the activities and the composition of the microbial community in rapeseed (Fig.4A (Chap.5)). The LNC (p-value = 0.007**) and the RDW (p-value = 0.004**) were two variables that explained significantly variations in microbial activity and composition. The first and the second axes explained respectively 23.5% and 20.1% of the variation. The first axis was positively correlated to RDW, Fine root_length_Ratio, RTD, R:S ratio, Total_DW and negatively correlated to RNC, LDW, LNC, L:R_ratio. This first axis could be accounted for by aboveground versus belowground allocation. The second axis was positively correlated to RNC, SRL, SLA and negatively correlated to RDW, RTD, R:S ratio and Total_DW. The second axis could reflect the conservation gradient (conservative vs acquisitive) in rapeseed. The variables related to microbial activities (NAG, ARLYS, DES) were positively associated with the variables related to a greater root structure such as RDW, RTD and R:S ratio and they were inversely associated to the plant traits with a greater leaf investment via a greater L:R ratio, LNC and LDW. These enzyme activities were also inversely associated to the RNC (Fig.4A (Chap.5)). On the contrary, the fungal abundance (Fung_DNA) (inversely correlated with the bacterial abundance (Bac_DNA)) was positively associated with acquisitive related traits such as SRL, SLA and Fine_root_length_ratio. C32/HS treatment was separated from the other treatments (especially Control, HS and C32), and was -markedly positively linked to fungal abundance and acquisitive strategy traits (greater SRL, SLA and lower RTD and R:S_ratio) than C32 without stress and HS alone. C32 was associated to a greater bacterial abundance and was mainly linked to a higher investment in leaves (greater LDW, LNC and L:R_ratio). F113 and F113/HS were also discriminated by axis 2, explaining a greater acquisitive strategy of the plant under F113/HS condition but a greater bacterial abundance and microbial activity for F113 (Fig.4A (Chap.5)).

In camelina, according to the RDA, the plant traits explained 62.9% (p-value = 0.015*) of the activities and the composition of the microbial community (Fig.4B (Chap.5)). The Fine_root_length_ratio (p-value = 0.018*), the RTD (p-value = 0.047*) and the Repro:Plant_ratio (p-value=0.009*) were three variables that significantly explained the repartition of the microbial variables. The first axis explained mainly the RDA (34.5% of the variation) while axis 2 explained 11.2% of the variation. The first axis was positively correlated to SLA, LNC and repro:plant_ratio and negatively correlated to Fine_root_length_ratio, SRL, R:S ratio and Total_DW. Such as for rapeseed, this axis could be explained by aboveground vs belowground relations (Fig.4B (Chap.5)). The second axis was positively correlated to RDMC, RTD, R:S ratio, Total_DW, SLA, LNC and negatively correlated to Fine_root_length and SRL. Then, this second axis could be explained by root prospection vs root structure gradient in camelina. The variables related to microbial activities and composition (such BG,

NAG, ARLYS, DES, Bac_DNA and Fung_DNA) were positively associated with the variables related to an aboveground investment (axis 1) and a greater root structure (Fig.4B (Chap.5)). Treatments were mainly discriminated by the axis 1 (aboveground vs belowground relations). HS presented a higher aboveground investment and a higher microbial activity and microbial composition than control and F113/HS (Fig.4B (Chap.5)). On the opposite, F113/HS and C32/HS led to a higher root investment than F113 and C32 respectively.

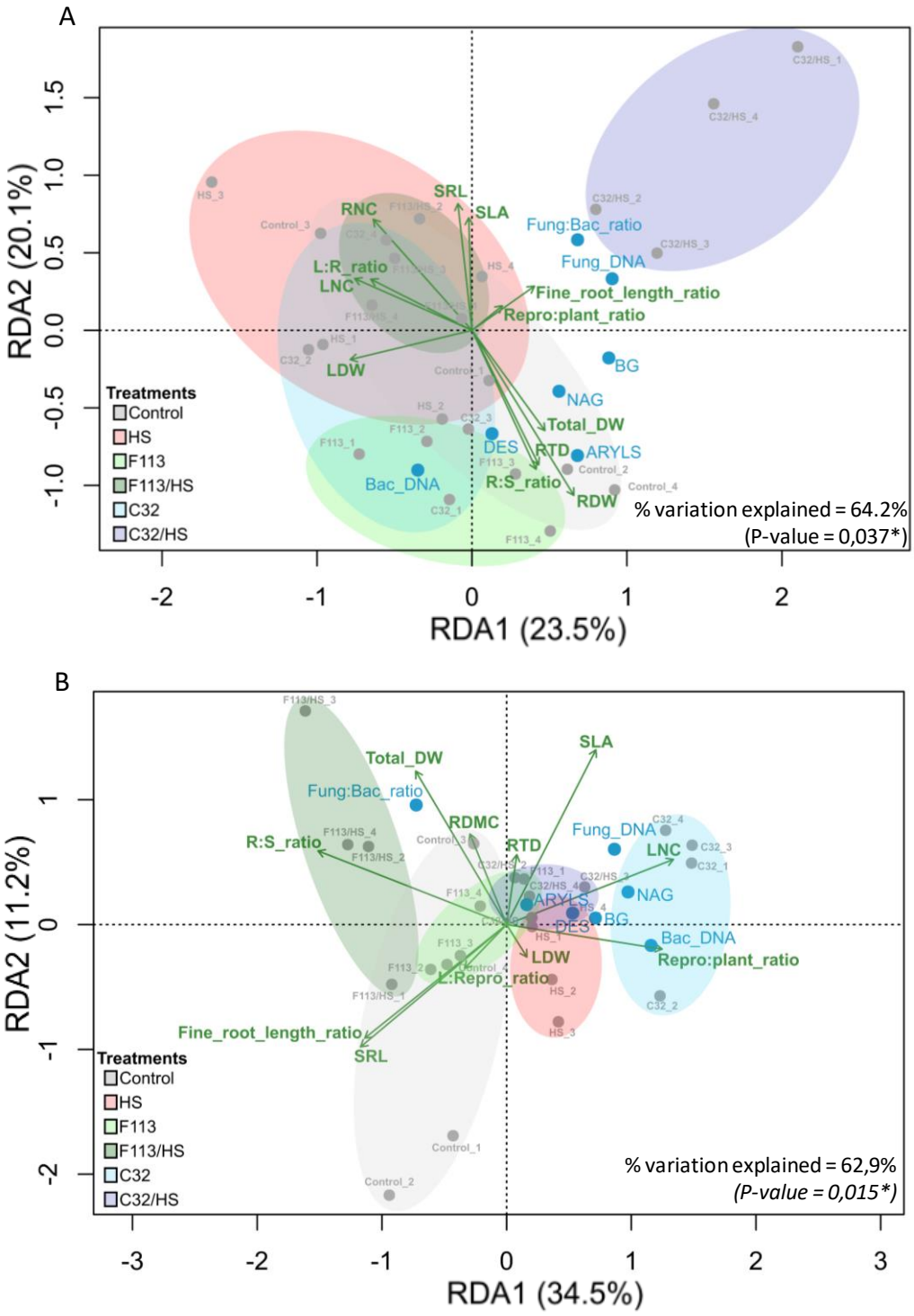


Figure 4 (Chap.5): Ordination of seven soil microbial properties representative of microbial activity and abundance (in blue: NAG, ARYLS, BG, DES, Fung:Bac ratio, Bac_DNA, Fung_DNA) constrained by plant traits (arrows) using a redundancy analysis (RDA) in rapeseed (A) and Camelina (B). The six treatments were HS, F113, C32, F113/HS, C32/HS and control. Replicates corresponding to each treatment (n=4) were gathered in the same colour area.

When variables related to the plant C balance were used to constrain the variables related to the microbial community, the RDA model accounted for 47.0% (p-value = 0.006**) of the variation in rapeseed (Fig.5A (Chap.5)). The DOC (p-value = 0.001***) and the Root_struct_C (p-value = 0.019*) were the two variables that explained significantly the distribution of the microbial variables. The first and the second axes explained 24.5% and 12.7% of the variation, respectively. The first axis was positively correlated to Root_structural_C, FL_C, Stem_C and negatively correlated to DOC, RWE_C and Leaf_C. The second axis was positively correlated to Leaf_C and negatively correlated to Root_struct_C, RWE_C, FL_C and Stem_C. This axis could be related to the source/sink relationships in plants while the first axis, mainly explained by the DOC, could be linked to soil/plant carbon fluxes in rapeseed (Fig.5A (Chap.5)). The variables related to microbial activities and composition (such NAG, ARLYS, DES, Fung_DNA) were positively associated with the variables related to plant C balances and C sinks organs (FL_C, Stem_C_ Root_struct_C) and negatively associated to the DOC and C sources organs (Leaf_C). Treatments were discriminated by the axes (Fig.5A (Chap.5)). The HS treatments (HS, F113/HS and C32/HS) were mainly discriminated from others by axis 2 (C sources/sinks relation in rapeseed). While, they presented a positive correlation with C sources organs (Leaf_C), their correlation was lower with C sinks organs and microbial activities variables (DES, ARYLS, NAG, BG) and microbial composition variables (except C32/HS that presented a greater Fung:Bac ratio).

In camelina, according to the RDA, the plant C balance explained 46.6% (p-value = 0.041*) of the activity and the composition of the microbial community in rapeseed (Fig.5B (Chap.5)). The RWE_C (p-value = 0.027*) was the only variable that explained significantly the distribution of the microbial variables in camelina. The RDA was explained mainly by the first axis (26.7% of the variation) while axis 2 explained 7.5% of the variation. The first axis is positively correlated to DOC, FL_C, Repro_C and Total_C and negatively correlated to Root_struct_C and RWE_C. The second axis is positively correlated to Total_C and negatively correlated to DOC, Leaf_C and Stem_C. The first axis could be related to the aboveground vs belowground relationships in plants while the second axis, mainly explained by the DOC, could explained the soil/plant carbon fluxes (Fig.5B (Chap.5)). The variables related to microbial activities and composition (such NAG, ARLYS, DES, Fung_DNA and Bac_DNA) were positively associated with the variables related to a greater aboveground C investment (FL_C, Stem_C_ Repro_C, Total_C) and negatively associated to the belowground C investment (RWE_C and

Root_struct_C). In camelina, the control discriminated from the other treatments due to a lower DOC. The other treatments (HS, F113, F113/HS, C32 and C32/HS) were mainly discriminated by the first axis (belowground vs aboveground relations). F113/HS presented a greater root C investment than F113 and HS. On the opposite, C32 presented a greater aboveground C investment than C32/HS. HS that have a greater DOC and aboveground C investment had greater correlation with microbial variables (Fig.5B (Chap.5)).

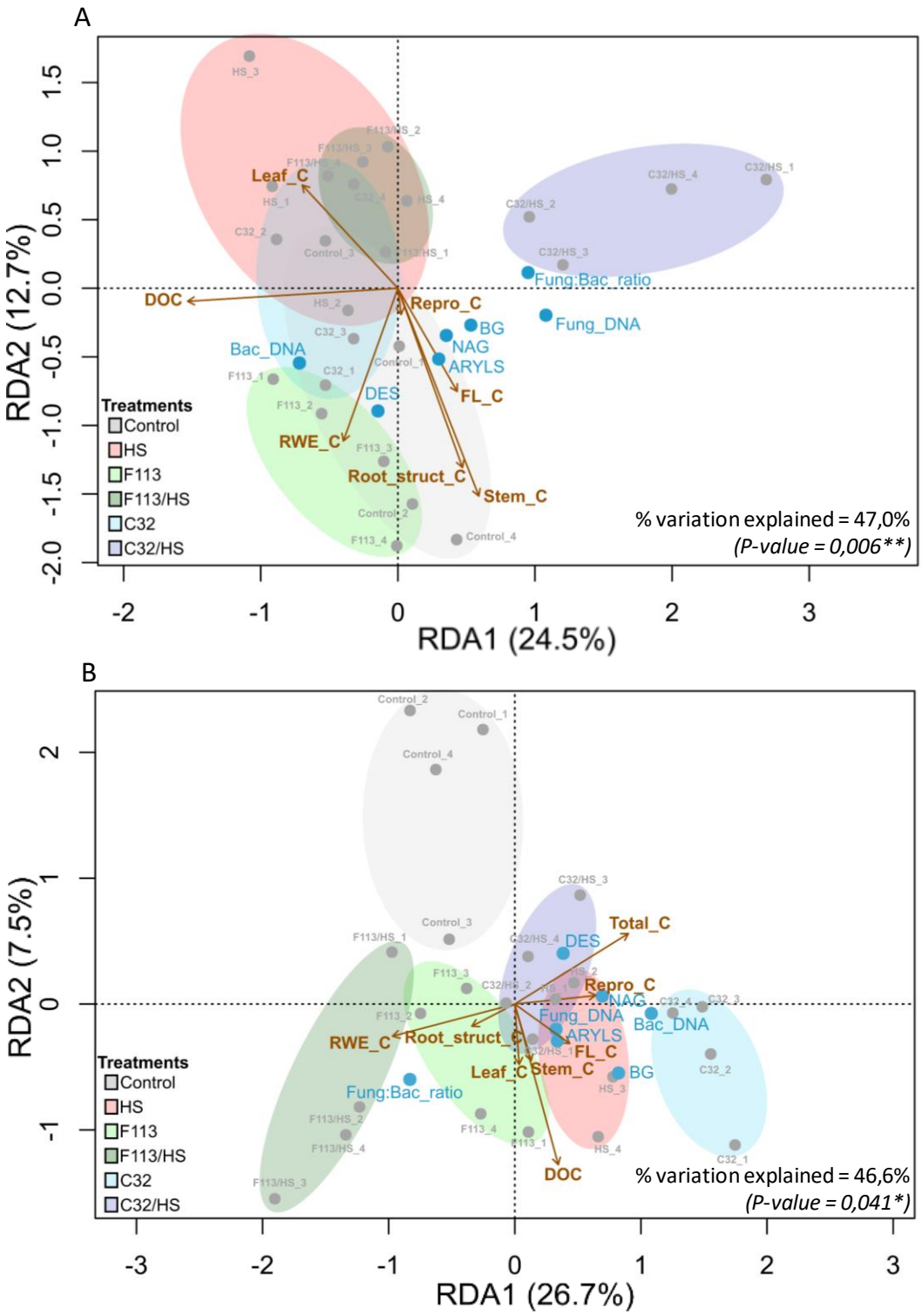


Figure 5 (Chap.5): Ordination of seven soil microbial properties representative of microbial activity and abundance (in blue: NAG, ARYLS, BG, DES, Fung:Bac ratio, Bac-DNA, Fung_DNA) constrained by plant C balance variables (arrows) using a redundancy analysis (RDA) in rapeseed (A) and Camelina (B). The six treatments were HS, F113, C32, F113/HS, C32/HS and control. Replicates corresponding to each treatment (N=4) were gathered in the same colour area.

5.5. Discussion

5.5.1. PGPR inoculation and heat stress impact plant development and soil microbial community

PGPR inoculation and heat stress impacts on the plant C balance and the plant traits

In this study, we demonstrate that the PGPR inoculation and the heat stress have an impact on plant traits and C allocation in plants and soil. Indeed, under heat stress condition, rapeseed plants decrease their root investment (RDW and RMDC decrease and L:R ratio increases). However, leaf biomass does not increase and C allocated to stem also decreases (significant heat stress effect on Stem_C). These observations reflect a whole plant development reduction as observed in other studies (Kourani et al., 2022; Morrison & Stewart, 2002; Young et al., 2004). PGPR inoculation under control temperature leads to lower effects than heat stress in rapeseed. Indeed, while F113 induces lower effect on plant development, C32 has even a positive impact on rapeseed leaves. Indeed, C32 inoculation increases the leaf biomass which is likely due to an increase of the C allocation in leaves. This beneficial effect of C32 could be explained by an important production of IAA, (Delamare et al. 2023b) known to improve the plant development (Goswami & Deka, 2020; Grobelak et al., 2015; Kumar et al., 2022). However, the beneficial effects of C32 on leaves observed under control temperature are not observed under heat stress condition. Moreover, the DOC decreases under heat stress. With F113, the tendential decrease in leaf biomass and increase in C soluble in roots could be explained by a greater sink strength previously ascribed to rhizobacteria from other species (Dilkes et al., 2004; Farrar et al., 2003; Heulin et al., 1987).

The effects of heat stress in camelina are different than those observed in rapeseed. Indeed, in camelina, heat stress decreases leaf investment in favour of root investment (significant heat stress effect on root traits such as RDW, RDMC, RNC, R :S ratio and RMR). An increase in root investment under heat stress is also reported by other authors (Mainali, 2007; Mainali et al., 2014). Some authors also observed an increase in C allocation in roots (Giri et al., 2017; Mainali et al., 2014), in contrast with our findings. The increase in DOC observed in heat stress condition could result from an increase in root exudation from camelina plants, as observed in other studies (Bakhshandeh et al., 2019; Luo et

al., 2009; Toosi et al., 2014; Uselman et al., 2000). Heat stress remains the major treatment to affect camelina development while PGPR inoculation have no (F113) or little (C32) effects. The main differences observed concerned the C soluble in roots (RWE_C) which increased C32/HS compared to HS. These effects could potentially be due to a combination of both the heat stress-induced increase in root investment and the sink effect caused by C32.

PGPR inoculation and heat stress impacts on soil microbial community

Soil microbial community associated with rapeseed is also impacted by heat stress. Indeed, the dehydrogenase reduction could reflect a decrease of the global activity of the soil microorganisms in heat stress condition (Kaur & Kaur, 2021; Stevenson, 1959). Inoculation with F113 and C32 lead to increase bacterial abundance in soil. This bacterial stimulation could be explained either by a modification of the native soil microbial composition and/or by an efficiency (colonization and growth) of these PGPR bacteria in the overall soil bacterial biomass. Indeed, PGPR are known to be very competitive bacteria toward the other heterotrophic bacteria, thus causing changes in microbial communities (Florio et al., 2017). However, C32 solely decreases the dehydrogenase, confirming changes in soil microbial composition. When the PGPR inoculation occurs in combination with heat stress in rapeseed, the effects are globally the same as those of heat stress. Only bacterial abundance showed a decrease with PGPR/HS compared to HS. The expected large contribution of the inoculated PGPR in total bacterial abundance could explain the decrease of total bacterial abundance with heat stress since PGPR, as all the bacteria, could be impacted by heat stress. The inoculation of C32 followed by the heat stress massively impacts soil microbial community. Indeed, bacterial abundance decreases while fungal abundance increases drastically. These effects could result from a competition between C32 and the native bacteria, especially the heterotrophic bacteria, which indirectly favours fungi development. Moreover, fungi are known to be positively stimulated by an increase in temperature (Hawkes et al., 2008; Heinemeyer et al., 2006).

In camelina, under heat stress condition, an increase in both bacterial abundance and arylsulfatase activity were pointed out. These two observations could be related because arylsulfatase is an extracellular enzyme associated to bacteria (Vong et al., 2008). The stimulation of arylsulfatase can increase sulphur availability from the soil for nutrition in camelina, which can be beneficial for the plant's development. Indeed, this nutrient is known to improve plant resistance to abiotic stresses (Ihsan et al., 2019; Sehar et al., 2022). The inoculation of both PGPR, without any stress, led to substantial and targeted modifications of the abundance and the activity of the associated soil microbial community. Indeed, when camelina plants were inoculated with F113, a decrease in dehydrogenase activity in soil was observed, reflecting a possible global impact on soil microbial

activity. With C32, bacterial abundance was increased, possibly because of its own contribution. In heat stress condition, as observed for rapeseed, C32 and F113 decrease soil bacterial abundance. As mentioned before, in both species, these results could be due to a modification of the native bacterial community or a decrease of the amount of bacteria induced by a strong competition exerted by the PGPR (Florio et al., 2017) that undergo heat stress in turn. The fact that the bacterial abundance increases in camelina under heat stress condition without PGPR could be explained by the modification of the community by the latter which makes possible the improvement of the diversity/composition or the quantity of bacteria potentially beneficial to the plant, as observed in Vescio et al. (2021). However, according to our findings, PGPR inoculation in camelina could impede this shift toward a microbial community composition potentially beneficial.

5.5.2. Effects of plant traits and plant C balance on the soil microbial community

The plant traits and the plant C balance account both for the variation of soil microbial community in rapeseed (Fig.4 and 5 (Chap.5)). Indeed, microbial activity is positively correlated to a large root development (especially greater root biomass) in rapeseed, resulting in an increased microbial activity. These results are consistent with other studies which shown that a greater root investment increases the microbial activity (Cantarel et al., 2015; Spitzer et al., 2020; Vong et al., 2007). Microbial activity appeared to increase with root investment and surprisingly, to be conversely correlated to acquisitive strategy. As observed in the literature, Brassicaceae species face a trade-off between C allocation for root exudation and root development (Wen et al. 2019, 2022). Thus, in rapeseed, an increase in root prospection, rather linked to an acquisitive strategy, seemed to be conversely correlated with the microbial activity. This reduced activity could be due to a lower stimulation of microbial communities explained by less C released by the roots or/and by a lower C use efficiency of the microbial community. However, as the treatments could impair these traits, plant-microorganism interactions could be disrupted. Indeed, heat stress and PGPR inoculation are well known to modify plant traits (Vacheron et al. 2013; Calleja-Cabrera et al. 2020) and C balance, which has a domino effect on the microbial activities. In our study, the treatments with heat stress (HS, F113/HS and C32/HS) trigger an acquisitive strategy in rapeseed. In addition, under stress conditions and/or inoculated with F113, rapeseed seemed to favour the aerial parts development, including a larger LNC (Leaf Nitrogen Content). The carbon balance shows the same trend, with a higher C allocation to leaves rather than to the root parts, possibly at the expense of interactions with microbial communities, with a lower microbial activity. C32/HS is the only treatment leading to a lower investment in the leaves likely due to a PGPR sink effect which affects the allocation strategy in rapeseed (Farrar et al., 2003; Heulin et al., 1987;

Delamare et al., 2023b). As observed with C32/HS, F113 tends to cause a higher C allocation to the roots, probably through a sink effect due to exudates consumption or hormonal communication (Jalmi and Sinha, 2022; Rekha et al., 2020; Delamare et al., 2023b). Under C32/HS, the limitation in DOC could cause the observed reduction of bacteria abundance, mainly induced by the reduction of their main C sources (Walker et al. 2018; Tang et al. 2021b). This bacterial decrease could contribute to fungal development. Moreover, fungi are positively stimulated by an increase in temperature (Heinemeyer et al. 2006; Hawkes et al. 2008). The observed decrease in DOC could be due to a greater C consumption by fungi (Kuzyakov et al. 2007).

In camelina, similarly, greater root prospection seems to be linked to reduced microbial activity (Fig.4B (Chap.5)). This observation can also be explained by the plant trade-off between exudation and root development (Wen et al. 2019, 2022). Thus, the variables associated to the microbial communities are positively linked to the root structure, but also the development of aerial parts. These results are contrasting with the previous interpretations claiming that camelina plants increase root investment in heat stress condition. These observations could be explained by a greater acquisition of C by the aerial parts that can thereafter increase the translocation of C into the roots and eventually to the soil which will stimulate the activities of microorganisms (Prescott et al. 2020; Prescott 2022). Indeed, for example, the higher DOC observed in heat stress condition could sustain bacteria development and enzymatic activities such as arylsulfatase, particularly influenced by the availability of labile C in soil (Dedourge et al., 2004; Vong et al., 2007, 2008). This is confirmed here (Fig.5B (Chap.5)) where microbial variables appeared to be linked to a higher DOC (Fischer et al. 2007; Kuzyakov et al. 2007) and to a higher quantity of C in the plant tissues (Prescott et al. 2020; Prescott 2022) but conversely linked to a small quantity of RWE C in the root (Vong et al., 2007). Indeed, greater C released by the plants in the rhizosphere led to lower content of RWE C. For camelina, heat stress is associated with global higher microbial abundance and activities. This can mean that camelina, unlike rapeseed, seems to preferentially interact with soil communities in heat stress condition, through an increase in DOC that can be beneficial for the development and the activity of heterotrophic bacteria (Kuzyakov et al. 2007; Toosi et al. 2014; Tang et al. 2021b). In addition, PGPR treatments showed a higher DOC which could promote interactions with microorganisms, as observed with C32, due to a stronger output of plant C, linked to a decrease of SRL and content of RWE C in root. The greater availability of C labile could then sustain microbial development and led to the greater observed β-glucosidase and N-acetyl-glucosaminidase activities under this treatment. Indeed, these activities are known to increase with addition of labile C in soil (Kuzyakov et al. 2007).

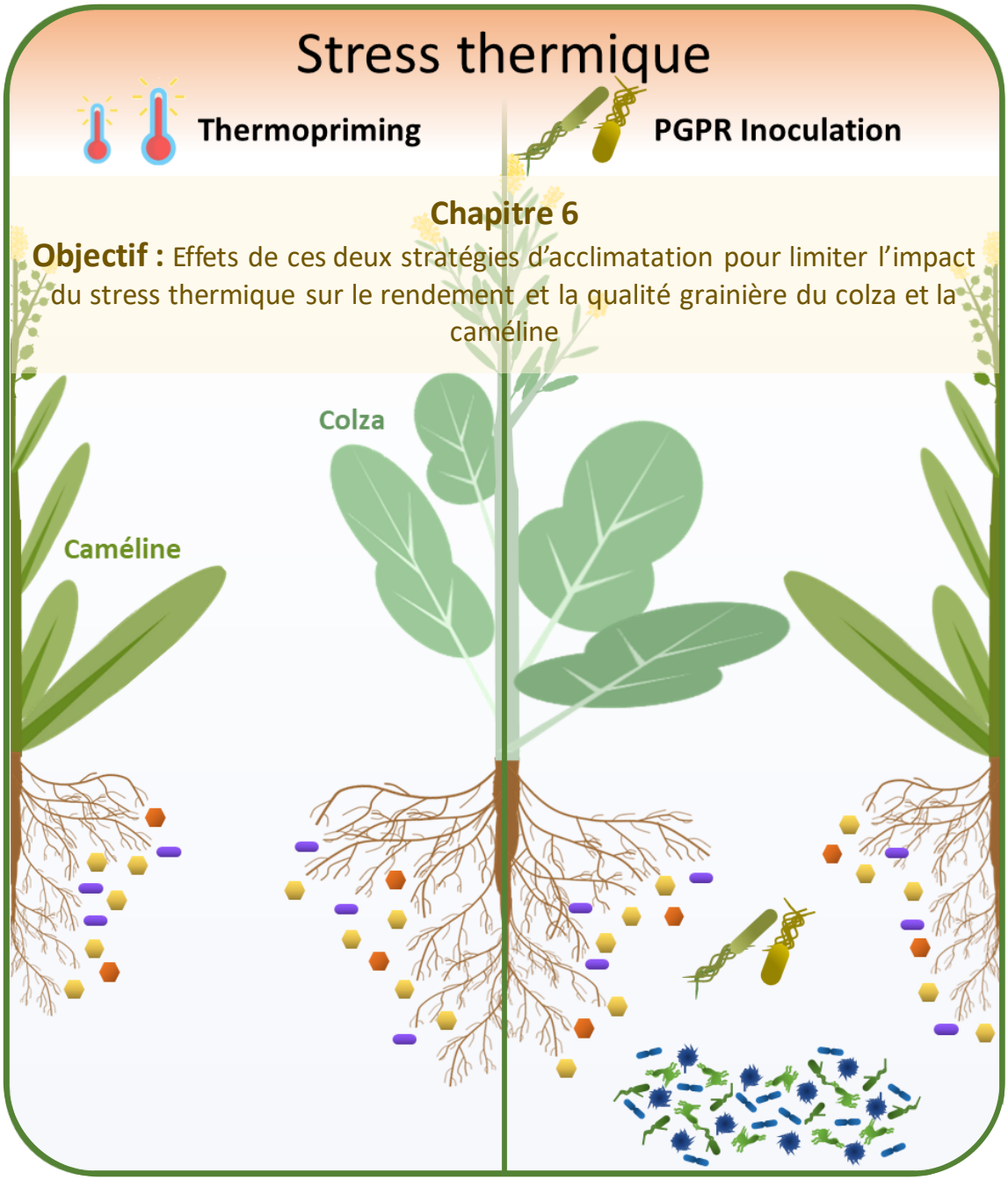
5.5.3. Rapeseed and camelina show two contrasting strategies in response to PGPR and heat stress exposure

Finally, rapeseed and camelina are two Brassicaceae species that display two contrasting development and C allocation strategies thus resulting in divergent relationships with soil microbial communities depending on environmental conditions (such as an increase in temperature). Indeed, rapeseed seems to be more impacted by heat stress which thus leads to increase biomass allocation to aerial parts while camelina is less impacted by heat stress and increases biomass investment to the root parts. Moreover, rapeseed is mainly impacted by the PGPR inoculation that causes a sink effect compared to camelina which is not impacted by the PGPR inoculation. These distinct responses to the treatments regarding plant traits and plant C allocation lead to different feedback effects on the soil microbial community. Indeed, according to the treatments, rapeseed seems to less interact with soil microbial community and does not modulate microbial activity while camelina stimulates the microbial activities such as the arylsulfatase, potentially beneficial to improve heat stress resistance (Ihsan et al. 2019; Sehar et al. 2022). These modifications could also be due to a shift in the microbial community in camelina toward a more beneficial community in heat stress condition, as observed in maize (Vescio et al., 2021). These differences in plant strategies to cope with heat stress could be partly explained by the difference in selection pressure between these two species. Indeed, camelina is a less selected species in comparison to rapeseed. Selection has been shown to increase the sensibility of plants to stress due to a loss of genetic diversity (Esquinas-Alcázar, 2005). Moreover, recent studies showed that domestication and selection can modify the exudation plasticity and could deteriorate the relationships between plant and soil microbial community as well as the diversity of the associated microbiota (Gruet et al., 2022; Martínez-Romero et al., 2020; Preece & Peñuelas, 2020). Thus, camelina could be more able to interact with soil microorganisms and to develop strategies to cope with heat stress compared to rapeseed.

In our study, DOC appears as a key variable that discriminates rapeseed and camelina and it is modulated by the treatments. Indeed, DOC is known to be partially composed of root exudates, but it is also composed of C from litter decomposition and microbial exudates (Bongiorno et al., 2019; Delarue et al., 2014). However, in our study, DOC was used as a proxy of the root exudates because, the plants were cultivated in pots where the whole volume of soil is considered as rhizospheric soil (soil under the root influence). As the analysed soil was sieved to remove the litter and mixed with sand, C from litter contribution is supposed to be secondary. The principal source of labile C in soil can only come mainly from roots and then from microbial exudates. However, in our study, we considered that the C used by the bacteria come mainly from the plant. In order to confirm this information, it could be relevant to couple this experimentation with an isotopic labelling with $^{13}CO_2$ to better

understand C allocation strategy in plants under heat stress and PGPR inoculation. The aim would be to better understand the partitioning of the plant C to the DOC and to microbial biomass. In this study, only the amount of DOC, used as an indicator of the amount of C exuded, had been investigated. However, the composition of the root exudates is particularly determining for the soil microbial composition and activity; and especially for the recruitment of beneficial bacteria (Huang et al., 2014; Steinauer et al., 2016). Therefore, further studies are needed to improve our knowledge of plant exudates composition on the soil bacterial communities and their feedbacks on plant responses to a wider range of environmental conditions.

Chapitre 6 : Effets de deux stratégies d'acclimatation pour limiter l'impact du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière du colza et la caméline



Effets de deux stratégies d'acclimatation pour limiter l'impact du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière du colza et la caméline

6.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors des deux expérimentations visant à atténuer les effets d'un stress thermique par un thermopriming ou par l'inoculation avec des bactéries PGPR (Fig.17). Pour cela, des plantes de colza d'hiver et de caméline de printemps ont été cultivées et soumises, au stade reproducteur, à un stress thermique précédé ou non d'un pré-stress correspondant à une augmentation graduelle de température ou à deux inoculations bactériennes (deux bactéries PGPR ont été testées séparément). Ces expérimentations ont visé à analyser les effets de ces deux stratégies de priming en amont d'un stress thermique intense sur le rendement et ses composantes, et des critères de qualités grainière i.e. nutritionnelle (teneur en acides gras, en azote des graines) et physiologique (dormance). La culture des plantes ainsi que les analyses de rendement et de qualité grainière ont été réalisées lors de la première et la deuxième année de thèse. L'analyse des résultats fait l'objet d'un article soumis en 2023 dans la revue European Journal of Agronomy. Les données supplémentaires de cet article sont présentées dans l'annexe 4.

Principaux résultats

- Comme attendu, le stress thermique intense a un impact négatif sur le rendement, la qualité grainière et l'aptitude à dormance des graines de colza. Cependant, le thermopriming a permis de limiter l'impact du stress thermique sur ces variables chez le colza à la différence de la caméline, pour laquelle le pré-stress (augmentation graduelle de température) a eu un effet plus négatif que le stress thermique intense plus tardif.
- En condition de stress thermique, l'inoculation préalable de PGPR permet de maintenir le rendement, la qualité grainière nutritionnelle et l'aptitude à la dormance des graines chez le colza, mais dans une moindre mesure que le thermopriming.
- L'inoculation préalable de PGPR n'a pas eu d'effets en condition de stress thermique.

Effects of thermopriming and bacteria mediated-heat stress acclimation strategies on seed yield and quality criteria in oilseed rape and camelina

Jérémy Delamare[1], Emmanuelle Personeni[1], Marina Le Guédard[2,3], Tae Hwan Kim[1,4], Nicolas Elie[5,6], Mélanie Bressan[7], Olivier Cantat[8], Quentin Dupas[1], Isabelle Trinsoutrot-Gattin[7], Claire Prigent-Combaret[9], Sophie Brunel-Muguet[1]

[1]Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

[2]Univ. Bordeaux, CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200, 71, avenue Edouard Bourlaux, 33883 Cedex Villenave d'Ornon, France

[3]LEB Aquitaine Transfert-ADERA, 71, avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon, France

[4]Division of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

[5]Normandie Université, UNICAEN, Federative Structure 4207 "Normandie Oncologie", Service Unit PLATON, Virtual'His platform, Caen, France

[6]Normandie Université, UNICAEN, Service Unit EMERODE, Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, CMABio3, Caen, France

[7]UniLaSalle, SFR NORVEGE FED 4277, AGHYLE Rouen UP 2018.C101, 76130 Mont Saint Aignan, France

[8]IDEES, Normandie Université, CNRS, UMR 6266, Identité et Différenciation de l'Espace, de l'Environnement et des Sociétés, Caen, France

[9]Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, INRAE, VetAgro Sup, UMR5557 Ecologie Microbienne, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

Among extreme weather events caused by climate change, heat waves are amongst the most threatening for food security. Besides their increased temperature, their higher frequency makes their effects on crop performances variable from one year to another, but mostly negative. Indeed, heat stress at the reproductive stage is particularly penalizing and is responsible for crop failures as a consequence of yield losses and lower quality of harvest plants parts. Protein-rich oil crops such as oilseed rape are known to be impacted by heat stress that decreases yield and negatively modifies fatty acids profiles and seed dormancy acquisition. In camelina - a re-emergent oilseed crop - albeit less documented, the effects of heat reveal are negative on yield but not on seed quality. In this context, our study aims to analyse two acclimation strategies that rely on the induction of signals prior to an intense heat stress event i.e. thermopriming (herein, a gradual increase in temperature) and bacteria inoculations (herein, two Plant Growth-Promoting Rhizobia (PGPR) were tested). In the two experiments, we assessed the expected beneficial effects of these two acclimation strategies on yield

components, seed quality criteria (nutritional and related to dormancy). While thermopriming improved heat stress tolerance in oilseed rape by maintaining yield, seed nutritional quality and seed dormancy, the effects of the gradual increase prior to the heat stress were even more negative than the later intense heat stress event in camelina which resulted in cumulated negative effects. The experimentation based on PGPR inoculation highlighted similar trends to thermopriming in oilseed rape but to a lesser extent. However, in camelina, very weak effects of PGPR inoculation upon heat were observed. Finally, these two acclimation strategies were shown to help alleviate the impacts of intense heat but in a species dependent manner. Additional studies on the plant-PGPR interactions in relation to plant growth strategies and strain-specific features are needed to provide applied solutions in the field.

Keywords: Thermopriming, PGPR inoculation, heat stress, oilseed rape, camelina, seed quality

6.2. Introduction

Tackling climate change and its impacts is one of the seventeen goals defined by the United Nation in the frame of the 2030 Agenda for Sustainable Development (Johnston 2016). Beside the rise in temperature, another feature of on-going changes is the increased frequency in extreme events such as heat waves (IPCC 2021). These temperature variations over the plant cycle and across crop seasons lead to unsteady yields and quality criteria of harvested plant parts which eventually results in insecure incomes for farmers (Lobell and Field 2007; Tian et al. 2009; Ray et al. 2015; IPCC 2021) Heat waves arise from early spring to late summer which spans the reproductive phase of a wide diversity of annual crops. This not only impacts plant growth but also key developmental stages such as flowering, seed set, filling and maturation, and thus yield and seed quality. For example, in wheat, increased temperatures induce morphological and physiological changes, such that the whole plant development is impaired and eventually cause yield losses and decreased seed starch concentration which is the main valuable seed criteria (Wahid et al. 2007; Dürr et al. 2018; Bakhshandeh et al. 2019). Grain protein concentration in (oleo)-proteaginous crops is also impacted by heat stress. In pea, a temperature regime of 30/25°C and 35/30°C (day/night) from the seed filling until seed desiccation was shown to reduce drastically seed dry weight and to alter N-containing seed storage compounds in N and several carbohydrates like sucrose and stachyose compared to 20/15°C (day/night) (Dürr et al. 2018). Among the crops the most subjected to heat stress, oleaginous species are particularly sensitive because of the duration of the reproductive phase that can last several months and that coincide with the expected heat stress window. In soybean, an increase in temperature at the seed formation stage impacts negatively the yield components (Kucharik and Serbin 2008).

In winter oilseed rape, several studies pointed out the adverse effects of high temperatures at the onset of pod formation on seed yield components, mainly seed number, and also on several

characteristics related to nutritional and physiological seed quality (Morrison and Stewart 2002; Young et al. 2004; Aksouh-Harradj et al. 2006; Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). Heat stress also reduces seed fatty acids (FAs) concentration and modifies the FAs composition (Brunel-Muguet et al., 2015; Magno Massuia de Almeida et al., 2021, 2022) at the expense of polyunsaturated FAs (i.e. linoleic (ω6) and linolenic (ω3) FAs) as a result of the impairment of the desaturases activity (Baux et al., 2013; Brunel-Muguet et al., 2015; Deng and Scarth, 1998; Magno Massuia de Almeida et al., 2021, 2022; Ren et al., 2009; Schulte et al., 2013). By contrast, seed nitrogen concentration was increased under heat stress, which was in line with the observed negative correlation between oil and proteins concentrations (Hammac et al. 2017; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). Seed physiological quality, such as dormancy, germination rates and desiccation tolerance were also impacted. Indeed, a higher Abscisic Acid to Gibberellin Acid ratio (ABA:GA) which reflects a lower seed dormancy (Brunel-Muguet et al. 2015) was observed on seeds from stressed mother plants. Seeds produced under heat stress germinated faster under both sub and supra-optimal temperatures than control seeds, which was in line with the observed lower seed dormancy level (Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). Although mostly negative, these effects of heat stress are tightly determined by the feature of the heat stress period in terms of intensity, duration, frequency and timing of occurrence (Angadi et al. 2000; Aksouh-Harradj et al. 2006; Magno Massuia de Almeida et al. 2021, 2022). For instance, a short period of extreme temperature at the pods formation stage was shown to be more critical for crop yield and plant development than a mild heat stress over a long period (Angadi et al. 2000; Aksouh-Harradj et al. 2006). Yield was more reduced under a mild stress that occurred at GS72 (i.e. when 20% of the pods have reached their final size, Lancashire et al. 1991) than at GS79 under a more intense stress, as a consequence of pollination default and abortion of young pods that are more abundant on the plant when the early stress occurred. Magno Massuia de Almeida et al (2021, 2022) demonstrated that effects of a multiple stressing events sequence cumulated while other studies on other crops subjected to repeated stress reflected alleviated effects of intense stress following an early mild stress exposure (tall fescue, Hu et al., 2015; peanut, Selvaraj et al., 2011; maize, Sinsawat et al., 2004; wheat, Wang et al., 2013, 2012, 2011; Zhang et al., 2016).

Few studies have focused on the effects of heat stress in camelina. Camelina is a re-emergent oilseed crop which tends to be more cultivated for its oil particularly rich in linolenic acids (ω3) (Dharavath et al. 2016; Zanetti et al. 2021). Recent studies showed that heat stress led to lower yield and lower Thousand Seed Weight (Ahmad et al. 2021b, a; Waraich et al. 2021). However Schulte et al. (2013), observed that the FAs profiles in camelina seeds and particularly the amount of oleic acid (ω9), linoleic (ω6) and linolenic (ω3) acids were not modified upon an increase in temperature, but the effects are likely to be very dependent on the temperature intensity, duration and timing exposure.

The main levers for heat stress acclimation in crops are based on genetic breeding and crop management strategies which are both re-questioned as they are few and limited. Genetic based-strategies were considerably slowed down as a result of genetic erosion which drastically shrunk the pool of genetic diversity where to find heat stress resistance alleles (Esquinas-Alcázar 2005). Counter selection of undesirable traits or concurrent loss of resistance traits to other stresses were also the side effects of intense breeding (Bijlsma and Loeschcke, 2012). Crop management-based strategies (e.g. modifications of sowing, harvest dates) are usually difficult to set up as their efficiency depends on the pedo-climatic context and on crop specific features (Chen et al. 2005; Gao et al. 2021). Another lever that breaks with the above more conventional approaches relies on priming induced-thermotolerance (Liu et al. 2022; Shekhawat et al. 2022; Villagómez-Aranda et al. 2022) which can be achieved by a prior exposure to heat, namely thermopriming, or by another priming agent of the same nature (Wang et al. 2017a; Serrano et al. 2019; Balazadeh 2022) or of different nature (Hirt 2012; Abd El-Daim et al. 2014; Meena et al. 2017). In the first case, thermopriming reflects the ability of the plants to store and recall prior stress induced-cues upon a second stress exposure, thus helping them adjust adaptive responses (Kinoshita and Seki 2014; Crisp et al. 2016). The priming stress can be either hours or days away from the subsequent stress (Serrano et al. 2019) or gradual without recovery phase prior to the next stress (Mareri and Cai 2022). Thermopriming triggers metabolic mechanisms that favour the accumulation of metabolites involved in plant homeostasis (e.g. stachyose, raffinose or threonate) (Serrano et al. 2019), and prevent from the accumulation of misfolded proteins or reactive oxygen species (Balazadeh 2022). At the transcriptional level, evidence for the contribution of epigenetic marks in the regulation of gene expression are widely documented (Guerra et al. 2015; Zioutopoulou et al. 2021; Han et al. 2022). In the second case, priming can be achieved upon exposure to biotic agents such as bacteria that act on the responses of the plants to heat. Plant inoculation with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) has been increasingly studied to decrypt the underlying mechanisms of their beneficial effects on plant development (Grobelak et al. 2015). In addition to their growth promoting actions which can accelerate the dynamics of plant phenology thus leading to avoid the coincidence of environmental stresses and sensitive phases, many studies report their beneficial effects on plants challenged with abiotic stresses such as drought, salinity and heat (Dimkpa et al. 2009; Grover et al. 2011; Meena et al. 2017; Lastochkina et al. 2019; Goswami and Deka 2020). These effects were shown to be supported by specific bacterial activities such as the 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) deaminase activity (Saleem et al. 2007; Vacheron et al. 2016; Naing et al. 2021), the auxin synthesis or antioxidant production (Dimkpa et al. 2009; Yang et al. 2009; Goswami and Deka 2020). For example, Abd El-Daim et al. (2014) showed that the wheat inoculation with PGPR at the seed stage can decrease the cell damages of the seedling. However, very few studies have worked on the limitation of the negative effect of heat stress on yield and seed quality through

the PGPR inoculation. For example, Zulfikar Ali et al. (2011) showed that PGPR inoculation can increase yield in heat stressed wheat plants. Epigenetic induced transcriptional modifications were also shown to be involved in the thermotolerance responses of the plants with the specific role of bacterial signals in triggering the epigenetic modifications on the plant genome (Meena et al. 2017; Shekhawat et al. 2022).

Our study aimed to analyse the effects on seed yield and on the main seed quality criteria of two heat stress acclimation strategies that are based either on the exposure to a gradual increase in temperature (i.e. thermopriming) or the inoculation of PGPR (i.e. bacteria-mediated priming) prior to intense heat. We also meant to compare the effects of two contrasting PGPR from the *Pseudomonas genus* that differ from their PGPR activities (i.e. ACC deaminase higher in *Pseudomonas ogarae* F113 and auxin synthesis, higher in *Pseudomonas* sp. C32; Delamare *et al.* 2023b) and the specific responses of two contrasting Brassicaceae species (i.e. *Camelina sativa* L. (Crantz) and *Brassica napus* L.).

6.3. Materials and Methods

6.3.1. Plant cultivation

For the thermopriming experiment, the two species were sown and grown as explained in Delamare et al. (2023a). Briefly, oilseed rape plants *cv*. Aviso (winter variety) and camelina plants *cv*. Calena (spring variety) were grown in 2020/2021 and 2021 respectively, under greenhouse conditions (49◦11' 09 N, 0◦21' 32 W, Caen, France). Oilseed rape seeds were sown in vermiculite in October 2020 under natural thermoperiod of 19.6°C±1.6 (16h, day) and 16.5°C±0.98 (8h, night) and camelina seeds were sown into boxes containing a sandy soil at the end of March 2021 under natural thermoperiod of 18.5°C±1.3 (16h, day) and 16.1°C ±0.7 (8h, night). Artificial light was provided from seedling emergence for both species until vernalization for oilseed rape or early elongation stage for camelina. After one month, oilseed rape plants were transplanted into 2L pots containing a mix of perlite and vermiculite (1:2, v/v) and supplied with 25% Hoagland solution consisting of 1.25 mM $Ca(CO_3)_2$, $4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14µM H_3BO_3, 5µM $MnSO_4$, 3µM $ZnSO_4$, 0.7µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7µM $CuSO_4$, 0.1µM $CoCl_2$ up to the 12-leaves stage. Then, oilseed rape plants were vernalized for 13 weeks in a cold chamber at 6.1°C (±1.3°C) (standard model, Froid & Mesures, Beaucouzé, France) with an artificial light for daytime (10h, day/14h, night) and supplied with a 25 % Hoagland solution deprived of sulphur (S) and nitrogen (N). After the vernalization period, oilseed rape plants were transferred into the greenhouse under natural photoperiod conditions without addition of light and in natural temperature (from the end of the vernalization until the beginning of the application of temperature modalities, 18.8°C±1.7 (day) and 16.2°C±0.73 (night) on average). As described in Magno Massuia de Almeida et al. (2021), after vernalization, oilseed rape plants were

provided with S (once at the end of the vernalisation) and N (twice, at the end of vernalization and at stem elongation) at rates that matched the conventional recommendations for field-grown oilseed rape plants. For camelina, one week after sowing, plants were transferred into 2L pots (4 seedlings per pot to yield enough biomass per replicate) and supplied with 25% Hoagland solution until early flowering and then with a 12.5% Hoagland solution in order to limit nutrient excess in the soil.

For the PGPR inoculation experiment, the same varieties of oilseed rape and camelina were grown in 2021/ 2022 and in 2022 respectively, at the same location (greenhouse in Caen, France). Seeds of oilseed rape were sown in October 2021 in perlite under natural thermo-photoperiod of 19.1°C±1.3 (16h, day) and 16.6°C (±0.8) (8h, night). As in the thermopriming experiment, camelina seeds were sown at the end of March 2022 under natural thermoperiod of 19.7°C ±1.5 (16h, day) and 17,1°C±1 (8h, night) into a sandy soil. As for the thermopriming experiment, artificial light was provided from seedling emergence for both species until vernalization for oilseed rape or early elongation for camelina. At the two-leaves stage, the oilseed rape and camelina were transplanted into 4L pots and 2L pots (4 plants per pot) respectively and containing a sandy soil. Then, similar conditions to the thermopriming experiment were applied. The temperature after the transfer into the greenhouse (post-vernalization) were 18.6°C±1.6 (day) and 17.3°C±1 (night) on average) before the heat stress application.

As explained in Magno Massuia de Almeida et al., (2021), for oilseed rape, mixed-age pods were present throughout the reproductive phase. Thus, on the day before the beginning of temperature modalities, each branch of the plants was labelled to identify three categories of pods when harvested at seed maturity : (i) the pods whose length was above 5 cm (podsL≥5cm), containing seeds that were maturing at the onset of the heat treatment (ii) the pods whose length was shorter than 5 cm (podsL<5cm) containing seeds that were filling and (iii) the pods ($pods_{flowers}$) from the flowers that formed during the stress and afterwards. Then, when the pods started desiccating, they were carefully wrapped per pod cohorts with plastic pouches to avoid seed dispersal and mixing seeds from the different pod cohorts. For camelina, the cohorts were not labelled given the fast pod establishment and development which were fully completed during the heat stress events.

6.3.2. Experimental treatments

Heat stress modalities

For the thermopriming experimentation, the heat modalities are detailed in Delamare et al. (2023a). Briefly, for both species, three temperature modalities were designed to test whether a gradual increase in temperature could alleviate the negative effects of intense heat peaks during the reproductive phase. The temperature threshold features of each modality were chosen in order to be consistent with the temperature projections over the spring period (from mid-April to mid-May) by 2100 according to the SSP5-8.5 of the IPCC (IPCC 2021). The temperature modalities were applied at the same stage of growth for oilseed rape and for camelina. Thus, the temperature treatments were applied at 316°Cd (base temperature 5°C, Morrison et al., 1988) after flowering for oilseed rape (matching GS72, Lancashire et al., 1991) and 197°Cd (base temperature 0°C, Allen et al., 2014) after flowering for camelina (matching GS72, Martinelli & Galasso, 2011).

For oilseed rape, the first heat modality herein named "Gradual Increase" (GI) was a gradual increase in temperature over ca. 5 days i.e. 60h at 23.32°C ± 0.38/16.46°C ± 0.87 (day/night) and 60h at 26.21°C ± 0.36/17.36°C ± 0.06 (day/night). The second heat modality, herein named "Intense Heat Stress" (IHS) was composed of 5 days at 26.25°C ± 0.16/17.38°C ± 0.24 (day/night) with daily heat peak for 5 h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.75°C ± 0.45. The third heat modality herein named "Combined Sequence" (CS) was the combination of the 2 previous modalities without recovery phase in between. This modality was designed to test whether the first event (gradual increase in temperature) can induce thermo-sensitization and alleviate the negative effects of the second event (intense heat stress). The mean daily temperatures for the control modality were at 19.31°C ± 0.87/16.43°C ± 0.17 (day/night) over the 10 day-treatment. Temperatures were controlled with temperatures probes (105 T Campbell, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK).

For camelina, the same stress design was applied. The first heat modality "Gradual Increase" (GI) was a gradual increase in temperature over 5 days i.e. 60h at 22.78°C ± 0.18/17.43°C ± 0.04 (day/night) and 60h at 27.36°C ± 0.27/17.66°C ± 0.21 (day/night). The second heat modality, "intense heat stress" (IHS) was composed of 5 days at 26.84°C ± 0.15/18.55°C ± 0.70 (day/night) with daily heat peak for 5 hrs (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 32.23°C ± 0.41. The third heat modality, "combined sequence" (CS), was the combination of the 2 previous modalities without recovery phase in between. The temperatures of the control modality were 19.50°C ± 1.32/16.96°C ± 0.84 (day/night) over the 10 day-treatment (Fig.1 (Chap.6)). For the purpose of the experiment, plants of modalities GI, IHS and CS, were transferred into another greenhouse unit during their respective heat exposure and then transferred back to greenhouse unit with the control plants until final harvest.

For the PGPR inoculation experiment, plants were exposed to intense heat stress (IHS) to test the expected beneficial effects of PGPR prior application. Thus, the IHS modality was applied on plants at the same stage as in thermopriming experiment in the control plants (389°Cd and 255°Cd after flowering for oilseed rape and camelina, respectively (base temperature 5°C for oilseed rape, (Morrison et al., (1989) and base temperature 0°C for camelina, Allen et al., (2014)). Thus, for oilseed rape, the measured temperatures provided during the 5 days were 26.63°C ± 1.21/16.25°C ± 0.77 (day/night) with daily heat peak for 5 h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.27°C ± 0.79 (Fig.1). In comparison, the temperatures for the control modality were 21.16°C ± 1.66/16.53°C ± 0.80 (day/night) over the 5 day-heat treatment. Temperatures were controlled with temperatures probes (105 T Campbell, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK). For camelina, the measured temperatures applied during the 5 days were 26.93°C ± 0.1.34/17.26°C ± 0.97 (day/night) with daily heat peak for 5h (from 11 a.m. to 4 p.m.) at 31.74°C ± 0.98. In comparison, the temperatures of the control modality were 20.10°C ± 1.48/16.64°C ± 0.72 (day/night) over the 5 day-heat treatment (Figure 1).

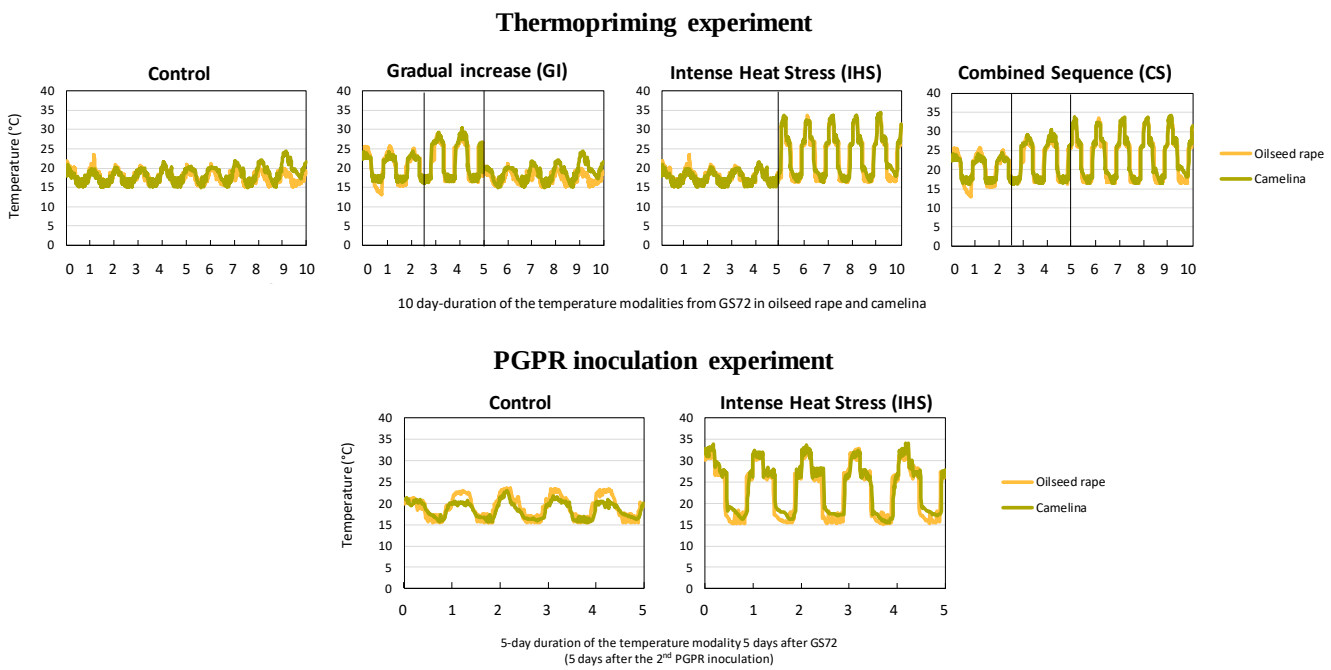


Figure 1 (Chap.6): Temperature recordings of the thermopriming (top panel) and the PGPR inoculation experiments (bottom panel). For thermopriming, the recordings of temperatures over the 10 day-treatment are displayed for the three heat modalities (GI, IHS and CS) along with the control. For the PGPR inoculation, the recordings of temperatures over the 5 day-treatment are displayed for the IHS modality and control.

PGPR inoculation

Pseudomonas ogarae F113 and *Pseudomonas sp*. C32 were the two bacterial strains used in this experiment. These bacteria are known to present several beneficial activities. Indeed, the strain F113 is known to have several PGPR effects (Shanahan et al. 1992; Vacheron et al. 2018; Blanco-Romero et al. 2022) while the strain C32 was shown to display several PGPR characteristics that were detected *in vitro* (Amy et al. 2022b).

The two bacteria were cultivated in LB medium for 16h at 30°C with shaking (150 rpm). At the exponential growth phase, the media was removed and replaced by $MgSO_4$ at 10mM and the inoculum was diluted at the concentration of $1x10^6$ cells/mL. Then 10mL of each of the inocula were directly provided onto the soil. The same amount of $MgSO_4$ was also provided on the plants from the control and intense heat modalities that were not inoculated with the bacteria, to ensure similar nutritional condition to the modalities with bacteria supplies. The first PGPR inoculation was applied at the vegetative stage in both species i.e. 10 days after the end of the vernalization for oilseed rape and at the beginning of the elongation for camelina (matching GS30 and GS31 for oilseed rape and camelina, respectively, Lancashire *et al.*, 1991; Martinelli and Galasso, 2011). The second PGPR inoculation was applied 5 days before the intense heat stress i.e. 319°Cd after flowering for oilseed rape (base temperature 5°C, Morrison *et al.*, 1988) i.e. GS72 (Lancashire et al., 1991) and 166°Cd after flowering for camelina (base temperature 0°C, Allen et al., 2014) (matching GS72, Martinelli & Galasso, 2011).

6.3.3. Seed yield components and seed quality analyses

At the end of the plant cycle, plants were harvested (n = 3) and seeds were retrieved from pods for each cohort of pods to analyse yield components and seed biochemical composition at the cohort and the whole plant levels.

Seed yield components

The yield components analysed were the number of seeds and the Thousand Seed Weight (TSW). Each cohort of seeds was weighted and pictured thus allowing to score the number of seeds per cohort following image analysis and then to calculate the TSW (ImageJ Software, Schindelin et al., 2012).

Seed nutritional quality

Seed fatty acids analyses

Oil content and fatty acids profiles (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1 and C22:1) were determined as described in Magno Massuia de Almeida et al. (2022). Approximately 10 mg of seeds powder from each plant were suspended in 1 mL of methanol/toluene/H2SO4 solution (100:20:2.5;

v/v) containing C17:0 as internal standard (25 µg.mL^{-1}), remaining 1h at 80°C for transmethylation. After cooling, 750 µL of hexane and 1.5 mL of water were added, and the hexane phase containing the resulting Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) was recovered for gas chromatography analysis combined with flame ionization detection (GC-FID). The FAMES (1 µL) were injected into an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a DB-WAX column (15m x 1µm x 0.53 mm, Agilent). FAMES were identified by comparing their retention times with those of commercial standards (Sigma, St. Louis, MO) and the amount of each fatty acid was calculated from the peak area quantified using ChemStation (Agilent). The saturated FAs (SFAs) were calculated by adding the data from C16:0, C18:0, C20:0 and C22:0, while the monounsaturated FAs (MonoUFAs) were calculated by adding the data from C16:1, C18:1, C20:1 and C22:1, and the polyunsaturated FAs (PolyUFAs) were calculated by adding the data from C18:2, C18:3, C20:2, C20:4.

Determination of the nitrogen in seeds

Seeds were dried for 48 h at 40°C and were ground manually for each cohort and for each plant for oilseed rape and for each plant only for camelina. The resulting powder was placed into tin capsules for analysis and the percentage of total nitrogen per mg DW of the seeds were determined with a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK).

Seed Dormancy

Seed dormancy-related phytohormones

As described in Magno Massuia de Almeida et al. (2021), 50 mg of ground seeds, previously freeze-dried, were mixed with 500 µL of extraction solvent [2-propanol/H_2O/ concentrated HCl (2:1:0.002, v/v/v)] to quantify 2-cis, 4-trans-abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA3), indole-3-acetic acid (IAA) and salicylic acid (SA) by HPLC-MS following the protocol in Pan et al. (2010). ABA and GA3 are two phytohormones involved in the balance between seed dormancy and germination. Thus, the ABA:GA3 ratio was used as a proxy of seed dormancy level (Debeaujon and Koornneef 2000; Finkelstein 2013). Due to little amount of ground seed from $pods_{flower}$ in oilseed rape, the quantification was performed only on the two other cohorts, podsL<5cm and pods≥5cm. For the PGPR priming experiment, the concentration of phytohormones could not be acquired for technical issues.

Pre-harvest sprouting rate scoring

Pre-harvest sprouted seeds reflect the ability of the seed to start germinating into the pods when still attached to the plants. For the purpose of the measurement, the whole plant seeds were disposed in a plate and the sprouted seeds were scored.

6.3.4. Statistical analyses

For a given experiment and a given species, results were expressed as the mean ± sd of 3 replicates available per treatment for all the analyzed variables. Statistical analyses were performed with R software (version 4.0.3, R Core Team (2022)). The normality of the value and the homogeneity of variances were assessed with a Shapiro-Wilk test and with a Bartlett test, respectively. If, these two parameters were verified, the effects of the modalities were assessed with a one-way ANOVA coupled with a Tukey test for the thermopriming experiment or a two-way ANOVA coupled with a Tukey test for the PGPR experiment in order to test the effects of both PGPR inoculation (PGPR effect), intense heat stress exposure (heat effect) and their interaction. If the normality and/or the homogeneity of variances were not respected, variables were log, 1/n or square root transformed to perform the ANOVA. Alternatively, a Kruskal-Wallis test was performed instead of the one-way ANOVA with the package "Pgirmess" to obtain the comparison between the treatment and a Scheirer–Ray–Hare test was performed instead of the two-way ANOVA with the package "Rcompanion".

6.4. Results

6.4.1. Thermopriming experiment

Effect on yield components

Figure 2 (Chap.6) displays seed yield, seed number and TSW at the whole plant scale for each species and according to the different temperature modalities. Significant effects of IHS on seed yield were observed in oilseed rape as a result of a decrease in TSW (*p=0.048*). The seed yield was also significantly affected under GI and CS as a result of a decrease in seed number in camelina. In oilseed rape, the most penalizing modality on seed yield and TSW was IHS (-10% and -7.1% relative to the control, Fig.8 (Chap.6)) while the prior gradual increase tended to alleviate the decrease (CS vs. IHS). By contrast in camelina, GI and CS modalities led to the highest seed yield and seed number losses (up to -19.5% and -24.8% relative to the control, Fig.2 (Chap.6) and Fig.8 (Chap.6)). At the cohort level, in oilseed rape no significant difference amongst the modalities on seed yield were observed for any of the three cohort (Supplemental data, Fig.S1 (Chap.6)). Nevertheless, slight temperature effects were observed in the intermediate cohort for both the TSW (*p=0.034*) and the seed number (*p=0.048*) with GI being the most penalizing modality on seed number only, which did not eventually impact on the whole seed biomass in this cohort (Supplemental data, Fig.S1 (Chap.6)).

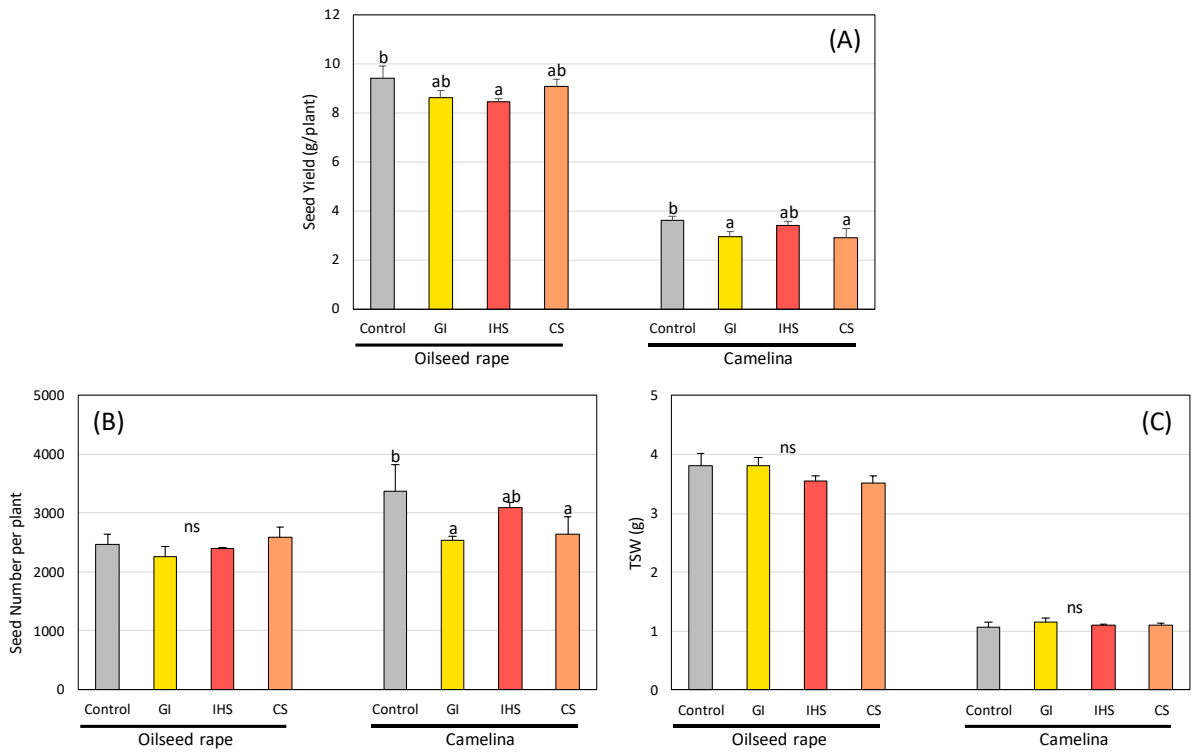


Figure 2 (Chap.6): Mean values (n = 3) of seed yield (A), seed number (B) and Thousand Seed Weight (TSW) (C) measured at the whole plant scale for each temperature modalities in the two species. The effect of the modalities was tested with a one-way ANOVA. Letters indicate the ranking amongst the temperature modalities. Bars denote standard deviation. ns: non-significant. Gradual Increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS).

Effects on seed nutritional quality

Fatty acids concentrations and profiles

In oilseed rape, total FAs concentration remained unchanged under heat stress (ranging from 31%DW to 33.9%DW) whereas increased concentrations were observed under higher temperature in camelina (ranging from 28.3%DW to 33.6%DW, Fig.3A (Chap.6)). The most impacting modality was GI (+18.9% compared to the control), followed by IHS (+13.6%) and CS (+11%) modalities (Fig.8 (Chap.6)). These effects in camelina were explained by the increased concentration of SFAs and especially by the increased concentration of UFAs more important under GI and IHS. Despite no difference in UFA and SFA concentrations in oilseed rape, the proportions of mono unsaturated FAs (MonoFAs) were modified under CS and IHS compared to the control (Fig.3B (Chap.6), left panel). Indeed, while the proportion of MonoFAs increased at the expense of the proportion of PolyFAs under CS, it decreased under IHS (*p>0.05*). In camelina, no difference in the respective proportion of mono vs. poly UFAs was observed while the proportions of SFAs vs. UFAs were modified (*p>0.001,* Fig.3B (Chap.6), right panel)

compared to the control under GI and IHS. Eventually, no difference in the ω6: ω3 ratio amongst the heat modalities were observed in both species (Fig.8 (Chap.6)).

At the cohort level in oilseed rape, the difference among the modalities were mainly observed in the oldest cohort ($pods_{L>5cm}$). Although non-significant, the decrease in total FAs and in UFAs concentrations under IHS were accounted for by significant decreases in this cohort (Supplemental Data, Fig.S2 (Chap.6)). Interestingly, the gradual increase prior to the IHS lowered the reduction in the concentrations of total FAs and UFAs in the seeds of this pod cohort. The proportion MonoUFAs was significantly modified under IHS but in the intermediate cohort ($pods_{L\leq5cm}$).

In oilseed rape, the seed N content remained unchanged under the 3 heat modalities (ranging from 3.5%DW to 3.7%DW) whereas increasing concentrations were observed under higher temperature in camelina (ranging from 3.3%DW to 3.6%DW, Fig.3C (Chap.6)). GI increased significantly the N content in seed (+6.1% compared to the control) and IHS (+8.2%) tended to increase this variable too (Fig.8 (Chap.6)). At the cohort level in oilseed rape, non-significant effect of the three heat modalities in the seed N content were observed (Supplemental Data, Fig.S2 (Chap.6)).

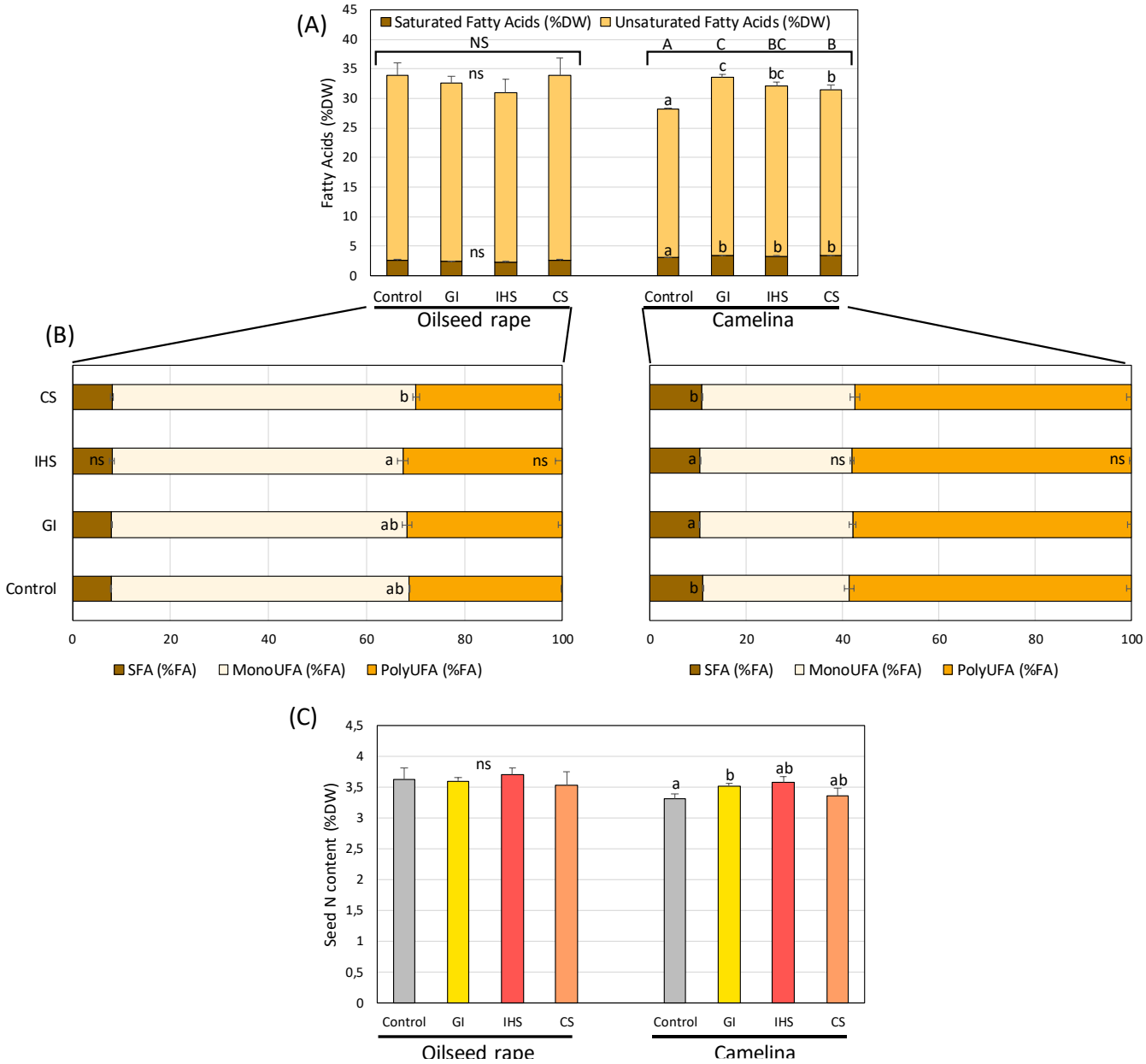


Figure 3 (Chap.6): Mean values (n=3) of FAs, SFAs, UFAs concentrations (A), proportions of SFAs, MonoUFAs, PolyUFAs (B) and the seed N content (C) at the whole plant scale, in oilseed rape (left) and camelina (right). The effects of the modalities were tested with a one-way ANOVA. Letters indicate the ranking amongst the temperature modalities following a mean comparison test. In panel A, uppercase letters indicate the ranking for the total FAs concentration and the lowercase letters indicate the ranking for either SFAs or UFAs concentrations. Bars denote standard deviation. ns: non-significant. Gradual Increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Fatty Acids (FAs), Saturated Fatty Acids (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MonoUFAs), Polyunsaturated Fatty Acids (PolyUFAs).

Effect on seed dormancy-related variables

Hormonal balances

Significant effects of the temperature modality on the ABA:GA ratio were observed in both species ($p<0.05$ and $p<0.001$, in oilseed rape and camelina respectively) although rankings amongst the modalities were species-specific (Fig.4A (Chap.6)). In oilseed rape, by contrast with the GI condition which increased the ratio, IHS significantly reduced the ratio which reflects a high temperature-induced reduction in seed dormancy. In camelina, the highest reduction was observed under GI while the highest increase was observed under the combined sequence but no effect of IHS was observed on the ABA:GA ratio. At the cohort level in oilseed rape, the ranking amongst the modalities for the ABA:GA were similar in the oldest ($pods_{L>5cm}$) and intermediate cohorts ($pods_{L\leq5cm}$) to the ranking at the whole plant scale, with IHS leading to the highest decrease in the ratio and GI or CS, to the highest increase for the intermediate or the oldest cohort respectively (Supplemental data, Fig.S3 (Chap.6)).

Pre-harvest sprouted rates

Pre-harvest sprouted seeds were only observed in oilseed rape with a significant increase under IHS (+95.7% with IHS compared to control; Fig.4B (Chap.6) and Fig.8 (Chap.6)). Interestingly, the gradual increase prior to the intense heat had an alleviating effect on the pre-harvest sprouted rates which remained similar to the rates observed under control and the GI modality (Fig.4B (Chap.6)). These observations reflected the significant trends observed in the intermediate cohort only (Supplemental data, Fig.S3 (Chap.6)).

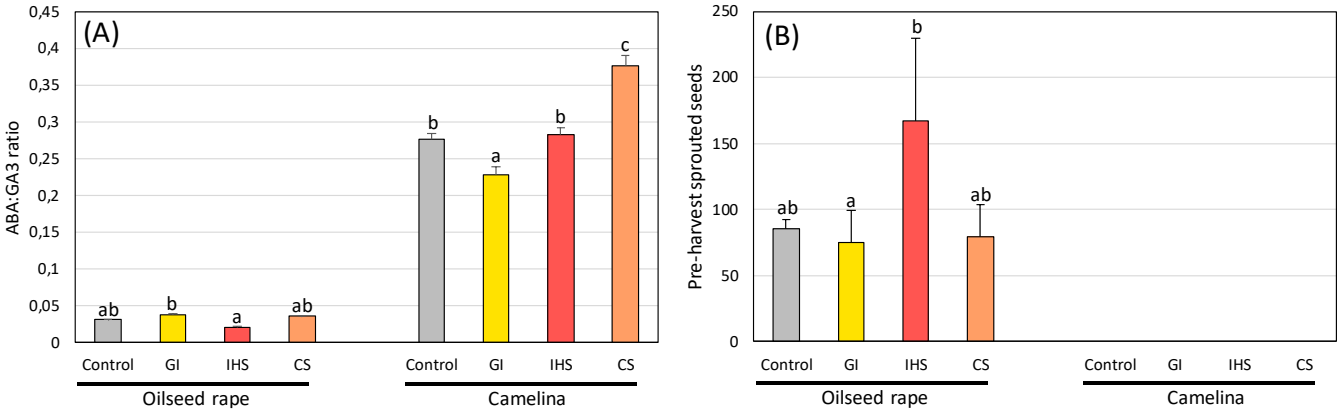


Figure 4 (Chap.6): Mean values (n=3) of the ABA:GA3 ratio (A) and the pre-harvest sprouted seeds (B) according to 3 heat modalities in the two species. The absence of bar in camelina (B) indicates that no pre-harvest sprouted seed was observed. Effects of the modalities was tested with a one-way ANOVA. Letters indicate the ranking amongst the modalities following a mean comparison test. Bars denote

standard deviation. ns: non-significant. Gradual Increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), 2-cis, 4-trans-abscisic (ABA), Gibberellic acid (GA3).

6.4.2. PGPR inoculation experiment

Effect on yield components

Figure 5 (Chap.6) shows the values of seed yield, seed number and TSW for each species according to the different treatments that include or not PGPR (F113 or C32) applications prior to the intense heat stress. As observed in the thermopriming experiment, heat stress alone led to seed yield losses in oilseed rape (significant heat effect, $p<0.001$), but not in camelina. No other significant effects were observed on seed number nor TSW in both species. Without temperature stress, the application of F113 or C32 did not significantly modify seed yield, nor the combination bacteria/IHS in both species. Moreover, a lower seed yield reduction was observed with the application of F113 or C32 in oilseed rape (-13.1% and -16.7% with F113 and C32 respectively compared to -21.2% under IHS without PGPR applications, Fig.8 (Chap.6)) and in camelina (-8% and -8.5% with F113 and C32 respectively compared to -10.7% under IHS without PGPR applications, Fig.8 (Chap.6)). At the cohort level in oilseed rape, the differences in seed yield tended to be explained by the youngest cohort of pods ($pods_{flowers}$) (Supplemental data, Fig.S4 (Chap.6)). Consistently with the observations at the whole plant scale, no differences amongst the modalities on TSW and the seed number were observed in any cohort.

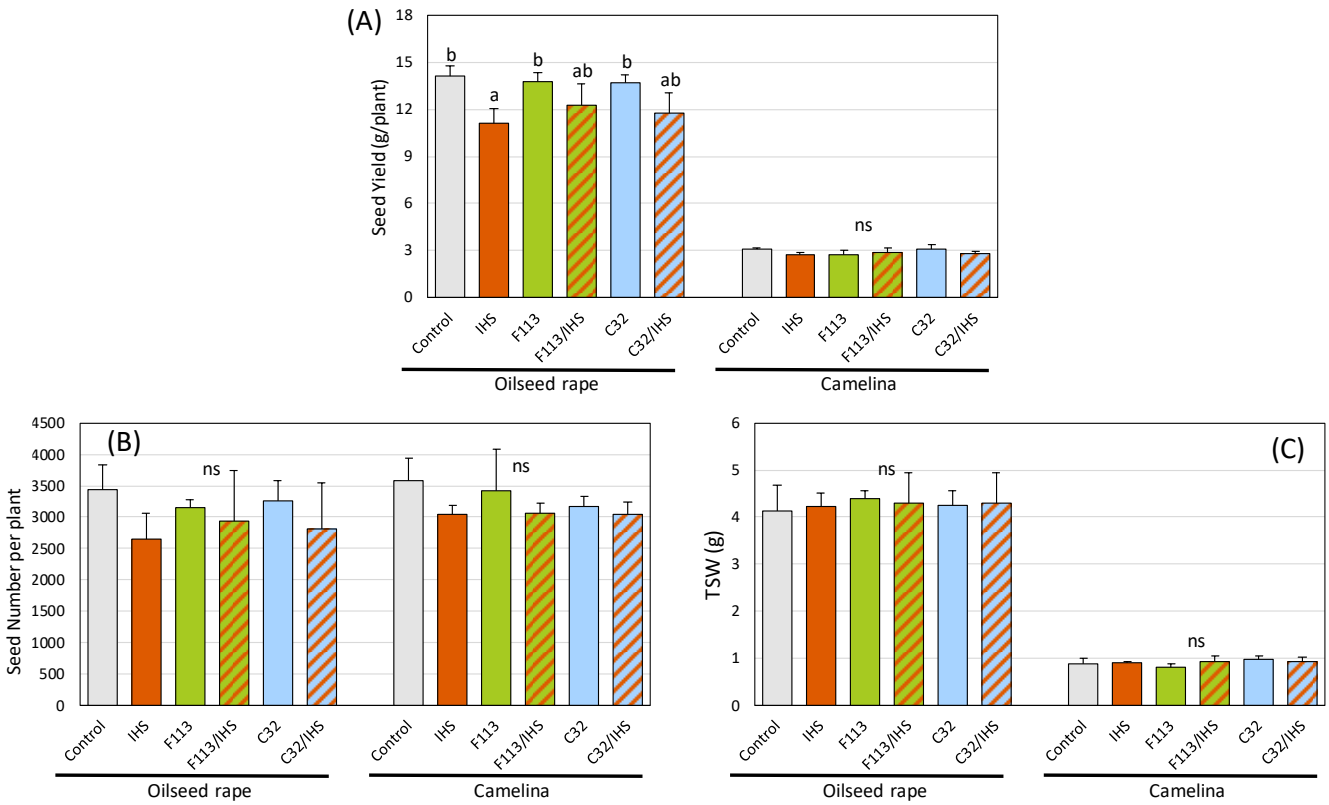


Figure 5 (Chap.6): Mean values (n = 3) of seed yield (A), seed number (B) and Thousand Seed Weight (TSW) (C) at the whole plant scale for each treatment in the two species. The effect of the treatment was tested with a two-way ANOVA (IHS, PGPR and IHS x PGPR effects). Letters indicate the ranking amongst the treatments following a mean comparison test. Bars denote standard deviation. ns: non-significant. Intense Heat Stress (IHS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32).

Effect on seed nutritional quality

Fatty acids concentrations and profiles

As observed in the thermopriming experiment, the only effects of the treatments on total FAs, SFAs and UFAs concentration were observed in camelina (ranging from 31.6%DW to 37.5%DW for oilseed rape and ranging from 31%DW to 36%DW for camelina; Fig.6A (Chap.6)). Only the modalities with the application of C32 led to significant differences (-3% with IHS and +12.4% without IHS, Fig.8 (Chap.6)). However, the trends were opposite with an increase of total FAs resulting from UFAs concentration with C32 alone and a decrease of the latter with C32 upon IHS (Fig.6A (Chap.6)). In oilseed rape, the proportions of SFAs vs. UFAs were modified with significant higher SFAs under IHS and lower SFAs with C32 alone, at the expense of Mono- and PolyUFAs (Fig.6B (Chap.6), left panel). By contrast, in camelina the higher proportion of SFAs was observed under the combination of C32 and IHS while the lowest proportion was induced by the application of C32 alone (Fig.6B (Chap.6), right panel). Eventually, the ω6:ω3 ratio was affected by the treatments in oilseed rape only (Fig.8 (Chap.6)). Indeed, while the application of F113 increased the ratio, the combination of F113 with a later exposure to intense heat led to decrease the ratio. But no effect of C32 alone or in combination with heat was observed (Fig.8A (Chap.6)).

At the cohort level in oilseed rape, unlike the thermopriming experiment, the differences in total FAs, SFAs, and UFAs concentrations amongst treatments were observed on the intermediate cohort and not on the oldest cohort (Supplemental Data, Fig.S5 (Chap.6)). However, these effects were diluted when gathering the three cohorts as no effect was observed at the whole plant scale (Fig.6 (Chap.6)). In the intermediate cohort, the most impacting modality in these three variables was the IHS (without bacteria inoculation). Eventually, the ranking for the ω6:ω3 ratio observed at the whole plant scale was accounted for by the values in the youngest cohort ($pods_{flowers}$) with the lowest decrease observed under the combination of F113 and IHS (Supplemental Data, Fig.S5 (Chap.6)).

In oilseed rape, such as for the thermopriming experiment, the seed N content remained unchanged with the modalities (ranging from 3.7%DW to 4.3%DW) whereas increasing concentrations were observed when the PGPR inoculation are coupled with the heat stress in camelina (ranging from 3.8%DW to 4.7%DW, Fig.6C (Chap.6)). F113/HS and C32/HS increased significantly the N content in

seed (+19% and +21% compared to the control, respectively). Such as the first experimentation, at the cohort level in oilseed rape, non-significant effect of the modalities in the seed N content were observed (Supplemental Data, Fig.S5 (Chap.6)).

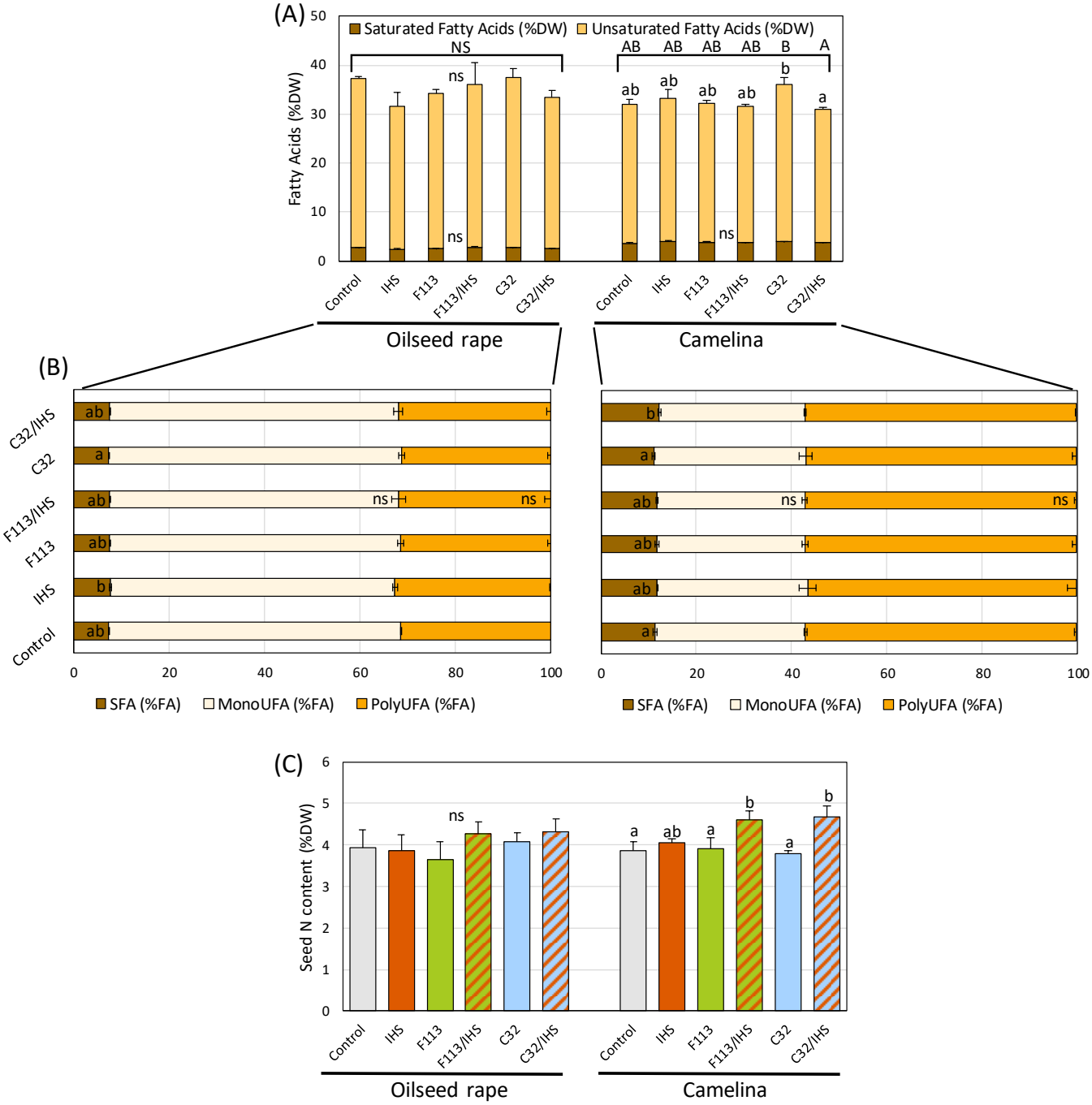


Figure 6 (Chap.6): Mean values (n=3) of FAs, SFAs, UFAs concentrations (A), proportions of SFAs, MonoUFAs, PolyUFAs (B) and the seed N content (C) for each treatment at the whole plant scale in oilseed rape (left) and camelina (right). The effects of the modalities were tested with a two-way ANOVA. Letters indicate the ranking amongst the treatments following a mean comparison test. In panel A, uppercase letters indicate the rankings for the total FAs concentration and the lowercase letters indicate the ranking for either SFAs or UFAs concentrations. Bars denote standard deviation.

ns: non-significant. Intense Heat Stress (IHS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32), Fatty Acids (FA), Saturated Fatty Acids (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MonoUFA), Polyunsaturated Fatty Acids (PolyUFA).

Effect on seed dormancy-related variables

Pre-harvest sprouted rates

While no preharvest sprouted seeds were scored in camelina, they ranged from 77.3 to 171.3 in oilseed rape but no significant effects of the modalities were highlighted, which was also confirmed at the cohort level (Fig.7 (Chap.6); Supplemental data, Fig.S6 (Chap.6)).

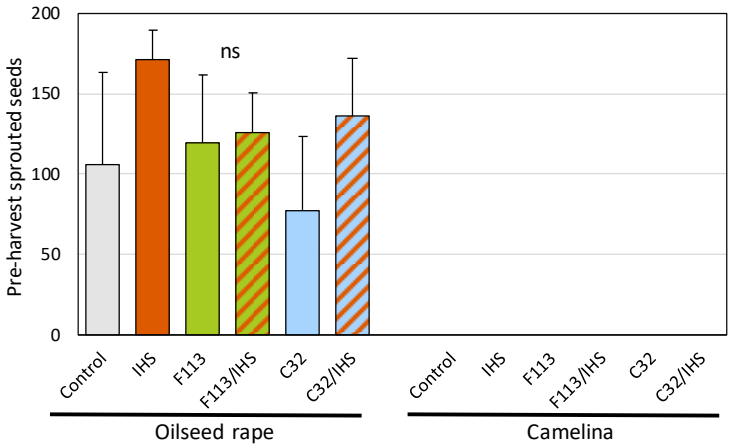


Figure 7 (Chap.6): Mean values (n=3) of the pre-harvest sprouted seeds in oilseed rape and camelina according to the treatments. The absence of bar in camelina (B) indicates that no pre-harvest sprouted seed was observed. The effects of heat stress and PGPR inoculation were tested with a two-way ANOVA. Letters indicate the rankings amongst the treatments (i.e. heat, PGPR and their combination) following a one-way ANOVA and a mean comparison test. Bars denote standard deviation. ns: non-significant. Intense Heat Stress (IHS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32).

6.4.3. Comparison of the responses to IHS in the two types of priming

In both species, the effects of IHS exposure were more important on the yield components for the PGPR experiment than for the thermopriming experiment (Fig.8 (Chap.6)) Same effects between the two priming experiments were observed regarding the seed FAs content for the oilseed rape but not for camelina as the FAs content was more reduced under the modality the combined the mild stress and the intense heat stress. Finally, the pre-harvest sprouted seeds in oilseed rape are impacted to the same extent with the two types of priming (Fig.8 (Chap.6)).

(A)

Oilseed rape		Thermopriming			PGPR inoculation				
		GI	IHS	CS	IHS	F113	F113/IHS	C32	C32/IHS
Yield components	Seed Yield (g/plant)	-8.5%	-10.0%	-3.6%	-21.2%	-2.3%	-13.1%	-2.6%	-16.7%
	Seed Number	-8.3%	-3.3%	4.9%	-22.8%	-8.5%	-14.8%	-5.3%	-18.1%
	TSW (mg)	-0.3%	-7.1%	-8.1%	1.8%	5.8%	3.9%	2.5%	3.6%
Nutritional quality	Total_FA (%DW)	-3.9%	-8.5%	0.2%	-15.2%	-8.2%	-2.9%	0.9%	-10.1%
	Saturated_FA (%DW)	-4.2%	-6.9%	2.1%	-11.7%	-6.4%	0.0%	1.0%	-7.1%
	Insaturated_FA (%DW)	-3.9%	-8.7%	0.1%	-15.5%	-8.4%	-3.1%	0.9%	-10.4%
	SFA (%FA)	-0.2%	2.3%	1.8%	4.3%	1.9%	2.9%	0.1%	3.4%
	MonoUFA (%FA)	-0.7%	-2.5%	2.0%	-2.5%	-0.4%	-1.2%	0.2%	-1.3%
	PolyUFA (%FA)	1.4%	4.3%	-4.3%	3.9%	0.2%	1.6%	-0.4%	1.8%
	ω6:ω3 ratio	-3.2%	1.0%	-0.4%	3.3%	5.7%	-4.4%	1.5%	-0.2%
	Seed N content (%DW)	-0.9%	2.0%	-2.6%	-1.6%	-7.0%	9.0%	4.1%	10.2%
Dormancy	ABA:GA3 ratio	21.0%	-35.1%	16.7%	NA	NA	NA	NA	NA
	Pre harvest sprouted seeds	-12.3%	95.7%	-7.2%	61.6%	12.9%	18.6%	-27.0%	28.6%

(B)

Camelina		Thermopriming			PGPR inoculation				
		GI	IHS	CS	IHS	F113	F113/IHS	C32	C32/IHS
Yield components	Seed Yield (g/plant)	-18.1%	-4.8%	-19.5%	-10.7%	-11.2%	-8.0%	0.1%	-8.5%
	Seed Number	-24.8%	-8.4%	-21.9%	-14.9%	-4.3%	-14.4%	-11.5%	-14.8%
	TSW (mg)	8.1%	3.3%	2.2%	4.1%	-7.1%	6.7%	11.9%	6.7%
Nutritional quality	Total_FA (%DW)	18.9%	13.6%	11.0%	3.6%	0.5%	-1.6%	12.4%	-3.0%
	Saturated_FA (%DW)	11.9%	8.0%	8.9%	8.7%	3.9%	2.2%	9.7%	5.3%
	Insaturated_FA (%DW)	19.7%	14.2%	11.2%	3.0%	0.0%	-2.0%	12.7%	-4.1%
	SFA (%FA)	-5.8%	-4.9%	-1.8%	4.9%	3.3%	3.7%	-2.4%	8.5%
	MonoUFA (%FA)	4.6%	4.0%	4.8%	-0.2%	-1.5%	-1.9%	0.9%	-3.2%
	PolyUFA (%FA)	-1.3%	-1.2%	-2.2%	-0.8%	0.1%	0.3%	-0.1%	0.1%
	ω6:ω3 ratio	3.5%	-2.4%	0.6%	1.5%	4.7%	-10.0%	-9.3%	-7.2%
	Seed N content (%DW)	6.1%	8.2%	1.5%	4.4%	0.7%	19.0%	-2.3%	21.0%
Dormancy	ABA:GA3 ratio	-17.6%	2.1%	35.6%	NA	NA	NA	NA	NA

Decrease (-) ← -20% -10% 0 +10% +20% → Increase (+)

Figure 8 (Chap.6): Summary of the effects of modalities/treatments from the thermopriming experimentation and the PGPR inoculation experimentation. The percentages are expressed relative to the respective control value, for the yield components and the seed quality criteria for Oilseed rape (A) and Camelina (B). Colors indicate the trends by level of increase or decrease. Gradual Increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32), Thousand Seed Weight (TSW), Fatty Acids (FA), Saturated Fatty Acids (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MonoUFA), Polyunsaturated Fatty Acids (PolyUFA), 2-cis, 4-trans-abscisic (ABA), Gibberellic acid (GA3).

6.5. Discussion

6.5.1. Thermopriming as a lever to alleviate intense heat stress effects

In the first experiment in oilseed rape, we highlighted that the intense heat stress (IHS) decreased yield but did not cause significant negative impacts on seed yield component i.e. seed number and the TSW. However, the combined sequence (CS) tended to increase yield up to the same level as control (-10% loss under IHS *vs.* -3.6% under CS; Fig.8 (Chap.6)). The effect of CS on the whole plant seed yield is likely to be explained by the $pod_{flowers}$ cohort for which seed yield was slightly weaker than the control (Fig.S1 (Chap.6)). This reduction results from higher rates of flower abortions and failures of pollination upon heat stress (Young et al. 2004). Conversely, as for seed number and TSW, the most impacted cohorts were $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$ although the effects of the temperature modalities were not significant. Interestingly for seeds from $pods_{L<5cm}$, while GI mostly impacted the seed number, the two other modalities (IHS and CS) which included both, intense heat, were more penalizing on TSW, thus reflecting the effects of the earliness of the stress on the seed set and of the intensity of the stress on seed filling.

Regarding the effects on seed quality criteria and more particularly fatty acids (FAs) seed contents, the total contents of FAs was not impacted, neither the content of saturated FAs nor unsaturated FAs (Fig.3 (Chap.6)). However, at the cohort level, when the seeds are in maturation phase ($pods_{L\geq5cm}$), the content of total FAs decreased upon intense heat as a result of a decrease of the UFAs (Fig.S2 (Chap.6)). These results are in line with prior studies that indicated that the maturation phase was the most sensitive for the synthesis of FAs and that an intense heat stress decreased the amount of FA (Aksouh-Harradj et al. 2006; Magno Massuia de Almeida et al. 2021, 2022). However, CS led to an even higher content of total FAs in this cohort ($pods_{L\geq5cm}$) which reflects an effective priming effect of the gradual increase over the intense heat, mainly due to the effects on the UFA contents. As for the proportion of monounsaturated and polyunsaturated FAs, in seeds from $pods_{L\geq5cm}$ the latter were not impacted by heat, although the ω6:ω3 ratio was increased under intense heat as observed in Magno Massuia de Almeida et al. (2022, 2021). The seeds in the filling phase (from $pods_{L<5cm}$) were also impacted in terms of quality. Indeed, a decrease in the proportion of monounsaturated FA was observed under intense heat in favour of the proportion of polyunsaturated FAs which increased (Fig.S2 (Chap.6)). This effect observed on this cohort was also observed at the whole plant scale which reflects the high proportion of seed from this cohort on the total seed bulk (ca. 50%, Fig.S2 (Chap.6)). Nevertheless, prior studies highlighted contrasting results (i.e. decrease in the proportion of polyunsaturated FAs in favour of monounsaturated FAs) that are explained by the expected heat stress-induced impairment of the desaturases (Rolletschek et al. 2007; Baux et al. 2008; Schulte et al. 2013). In line with the literature which demonstrated opposite correlation between oil and protein contents (Grami et al. 1977;

Hammac et al. 2017; Magno Massuia de Almeida et al. 2021), N contents which reflect the seed protein concentration tended to be increased (not significant). Finally, the physiological quality was also shown to be impacted as observed on the ABA:GA ratio and the rate of pre-harvest sprouted seeds. While the ratio decreased upon intense heat in the oldest cohorts of pods ($pods_{L<5cm}$, $pods_{L\geq5cm}$), thus causing a faster seed germination and consistently a higher rate of pre-harvest sprouted seeds as observed in Brunel-Muguet et al. (2015) especially in $pods_{L<5cm}$. The ABA:GA ratio increased upon the stressing modalities that included the gradual increase. This observation points out the priming effect of the gradual increase on seeds that were filling or maturating during the stress exposure which alleviated the effects of intense stress on seed dormancy.

In camelina, unlike oilseed rape, the gradual increase and the combined sequence led to more negative effects on yield and seed number than the intense stress alone (Fig.2 (Chap.6)). As regards the seed quality criteria, the contents in total FAs, saturated FAs and unsaturated FAs increased under the three temperature modalities. It is noteworthy that the longer and the more intense the stress sequence, the less important the increase in total and unsaturated FAs contents. Finally, the proportion of saturated FAs under the combined sequence was similar to the one observed under the control while GI and IHS reduced their proportion. In contrast with the observations in oilseed rape, FAs and N contents were not negatively correlated as both increased under heat (Fig.3 (Chap.6)). Regarding seed dormancy, the ABA:GA ratio was strikingly much higher in camelina than in oilseed rape, thus explaining that no pre-harvest sprouted seeds were found in camelina. The highest ratio was observed under the longest stress duration thus meaning that the induction of seed dormancy was associated to stress duration rather than stress intensity.

Overall, our observations indicate that the gradual increase allows the negative effects of later intense heat to be alleviated in oilseed rape but these effects were mainly observed at the cohort level and diluted at the whole plant scale. Eventually, this thermopriming effect leads to maintain seed yield and seed quality. Usually, a priming effect is evidenced in a sequence made of a first stimulus ("priming") followed by a recovery phase ("memory phase") and a second stimulus ("triggering") (Charng et al. 2023) where the first stimulus helps the organisms to be primed or sensitized to the second stimulus, thus resulting in stress acclimation which is known to have an epigenetic basis (Hilker et al. 2016; Serrano et al. 2019; Charng et al. 2023). However, in our experimental set up, the first stimulus was the gradual increase with no recovery prior to the intense heat by contrast with previous works that aimed to analyse thermopriming scenarios (Magno Massuia de Almeida et al. 2021, 2022). Other authors refer to thermopriming as a gradual increase in temperature which is not separated from the acute heat (Mareri and Cai 2022). The duration of the recovery was shown to be determining in the maintenance of the first stress-induced mechanisms that are likely to be reset or erased when too long (about 3 to 7 days, Lämke and Bäurle, 2017). In pioneering studies on biotic stresses (Heil and

Kost 2006; Conrath et al. 2015), the absence of recovery phase as plants had not recovered yet from the first pathogen attack demonstrates that priming is effective because the plants keep accumulate stress-induced compounds such as phytohormones. In line with these observations, one can assume that a short recovery phase or even a gradual stress might help sustaining priming effects when induced by a first stress exposure (Serrano et al. 2019).

On the opposite, in camelina, the combination of the gradual increase and the intense heat (CS) seems to be rather negative which indicates that stress duration outweighs any priming effect of the first stress exposure. As a consequence, the gradual increase could trigger a counterintuitive signal for camelina, thus causing modifications of C allocation priorities to the seeds at the expense of the other plant parts and then enhancing accumulation of seed storage compounds such as FAs, proteins, oligosaccharides and phytohormones under stressing conditions. In addition to its role in seed dormancy, ABA is known to have a protective effect against stresses (Chhabra et al. 2009; Ding et al. 2010; Essemine et al. 2010) which lets assume that its accumulation in seeds could make the progeny more tolerant to stresses and more vigorous owing to a greater storage of nutrients. This strategy reminds the one of wild species that delay seed germination (caused by ABA accumulation for instance) and development upon stresses while providing additional storage compounds (Volaire 2018).

6.5.2. PGPR inoculations is likely to reduce heat stress impacts

In the PGPR inoculation experiment, the two bacteria did not modify seed yield and yield components under control temperature condition in oilseed rape. Under heat stress condition, the bacteria tended to limit the decrease of yield induced by heat (from -21% with IHS to -13% with F113 and -17% with C32; Fig.8 (Chap.6)). These observations are in line with the study of Zulfikar Ali et al. (2011) that showed that PGPR inoculation before heat stress increased yield components compared to stress alone in wheat. As in the thermopriming experiment, the effects of the treatments on FAs contents were observed but at the cohort level only. The decrease in FAs was accounted for by a decrease in both saturated and unsaturated FAs. But unlikely to the thermopriming experiment, seeds from $pods_{L<5cm}$ (i.e. seeds being filled during the stress) were the most impacted (and not seeds from $pods_{L\ L\geq5cm}$). In addition, bacteria had no effect on FAs concentration under temperature control conditions as for yield. However upon heat, the concentration of FAs increased with both C32 and F113 compared to the IHS alone (change from -15% with IHS to -3% with F113 and -10% with C32; Fig.8 (Chap.6)), and especially in the filling cohort ($pods_{L<5cm}$) which emphasized on the timely positive effects of the bacteria i.e. because the synthesis of the seed storage compounds are temperature sensitive, the filling stage is likely to be the most responsive to the bacteria. However, the proportion of saturated, monounsaturated and polyunsaturated FAs are not modified in the seeds by contrast

with the thermopriming experiment and no effect of the bacteria inoculation upon heat was observed. As for the rate of pre-harvest sprouted seeds, although non-significant, an increase upon heat was observed like in the thermopriming experiment with a beneficial effect of bacteria and more particularly of F113 which tends to reduce the rate (from +62% with IHS to +19% with F113 and +29% with C32; Fig.8 (Chap.6)). Additional hormone analyses would confirm the bacteria-induced changes of the seed dormancy release upon heat. These beneficial effects might be accounted for by main strategies. Firstly, bacteria can have direct beneficial effects on the plants by their wide range of beneficial activities. For example, the ACC deaminase activity, mainly realized by the strain F113, is known to decrease the ethylene level in the plant while the auxin production, mainly produced by the strain C32, alleviates the heat stress effect owing to auxin-induced morphological and phenological modifications (Vacheron et al. 2018; Lastochkina et al. 2019; Shekhawat et al. 2022). Secondly, the bacteria can have indirect beneficial effects owing to bacterial signals that trigger epigenetic modifications on the plant genome (Meena et al. 2017; Shekhawat et al. 2022) as it is widely documented for thermopriming applications (Serrano et al. 2019; Charng et al. 2023). In our study, these two strategies might act simultaneously and/or altogether which results in thermotolerance.

In camelina, unlikely to the thermopriming experiment, no effect of bacteria or stress on yield components was observed. Concerning total FAs, only C32 increased the concentration but upon heat, the beneficial effects of C32 was cancelled. The bacterium C32 also reduced the proportion of saturated FAs but this effect was also cancelled upon heat. However, under heat stress conditions, this bacterium decreased the total amount of FA due to a decrease in unsaturated FA in the seed, resulting in a higher proportion of saturated FA. By contrast, F113 had no effect whether alone or in combination with heat. Interestingly, under heat stress conditions both bacteria increased N concentration in the seeds. One assumption to explain the little to null effect of the two PGPR in camelina could be that their inoculations took place at the reproductive stage throughout which the plants are less prone to interact with the soil microbial communities – consequently also reducing root exudation – in favour of the newly grown reproductive sinks (Tang et al. 2021a). This could also be due to the fact that the stress alone has only little effect on camelina yield and grain quality, as observed in the thermopriming experiment. Thus, the beneficial effects of these bacteria become much less visible than in those observed in oilseed rape plants, which are more severely impacted by heat stress.

6.5.3. Comparison between two types of priming

First of all, depending on the species, different effects of either the thermopriming or the PGPR inoculation could be observed, as a consequence of contrasting species-stress resistance. Indeed, oilseed rape is known to be highly sensitive to high temperatures (Aksouh-Harradj et al. 2006; Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021) unlike camelina which is known to be more resistant to abiotic stresses (Moser 2010; Schulte et al. 2013; Ibrahim and El Habbasha 2015; Heydarian et al. 2018; Soorni et al. 2021). Moreover, when we compared the species according to each of the two acclimation strategies, we observed that both led to effective alleviating effects of intense heat in oilseed rape, while thermopriming was not efficient -as the early stress induced a negative that cumulated to the later – and the inoculations of the PGPR had no effect in camelina. Therefore, our analyses highlight that the acclimation strategies are not only species-dependent but also specific of their respective strategies of development, resources allocation and stress resistance.

When comparing the two acclimation strategies for a given species, the thermopriming seems particularly beneficial in oilseed rape unlike the inoculation of bacteria which effects remain weaker (not significant). However, albeit particularly efficient, thermopriming cannot be applied in the fields compared to PGPR inoculation but this strategy as promising applications for epibreeding programs (Liu et al. 2022; Turcotte et al. 2022). If recurring heat stresses occur over one crop season, they might last longer and/or lead to cumulated negative effects (Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). Thus, applied solutions based on thermopriming- as in semi-controlled conditions for specific breeding purposes – will require the testing of several features of the repeated stress sequence such as the stress duration, the stress frequency and the duration in between the stress events (i.e. recovery phase) which are very likely to be determining to induced priming. Given these considerations, solutions based on the use of PGPR should be promoted in oilseed rape but it would be necessary to deepen the relationships between plants and bacteria in order to identify specific strains-species interactions in stressful conditions and then identify the most relevant strains to use according to the species and/or the cultivars. In addition, some beneficial bacteria under control conditions can have negative effects under stress conditions and *vice versa* through the formation of an additional sink effect. As concluded from our analyses, one acclimation strategy might be beneficial for one species but not for another.

Overall, developing new strategies to improve plant resistance to abiotic stresses requires a better understanding of the species-specific growth strategies to ensure timely beneficial interactions. These growth strategies must be analysed under stress conditions in order to capture the underlying modifications that plants develop to cope with stresses, especially in terms of root morphology and exudation features that potentially drive the plant-soil community interactions, as observed in

camelina (Delamare et al. 2023a). Eventually, in the perspective to provide long term heat acclimation strategies, studies on the inheritance of the beneficial effects of PGPR inoculation and thermopriming are further required to identify the major processes that support inter/transgenerational priming effects (e.g. epigenetic regulations and/or hormones accumulation; Tonosaki et al., 2022; Turcotte et al., 2022; Villagómez-Aranda et al., 2022). This perspective opens avenues to optimize the production of batches of seeds with acquired thermotolerance.

Author contribution

Jérémy Delamare: Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing-Original Draft, Writing- Review & Editing

Emmanuelle Personeni: Project administration, Conceptualization, Writing- Review & Editing, Investigation

Marina Le Guédard: Investigation

Tae Hwan Kim: Investigation

Nicolas Elie: Investigation

Mélanie Bressan: Investigation, Conceptualization, Writing- Review & Editing

Olivier Cantat: Conceptualization

Quentin Dupas: Investigation

Isabelle Trinsoutrot-Gattin: Conceptualization, Investigation

Claire Prigent-Combaret: Investigation, Conceptualization, Writing- Review & Editing

Sophie Brunel-Muguet: Funding acquisition, Project administration, Conceptualization, Writing- Review & Editing, Investigation

Acknowledgements

This work was financially supported by Normandy Region with the ALBATOR project and the Metaprogram ACCAF “Adaptation to Climate Change in Agriculture and Forest” of INRAE. We would like to thank Anne-Françoise Ameline, Magali Bodereau, Josiane Pichon and Josette Bonnefoy for technical assistance. We are also very grateful to PLATIN’ (PLAteau d’Isotopie de Normandie) for providing facilities and technical support. We thank the Center of Biological Resources BrACySol (Brassica-Allium-Cynara-Solanum, INRAE Center of Rennes, Brittany, France) for providing seeds of oilseed rape and SAATBAU for providing seeds of camelina.

Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

La problématique du sujet de thèse autour de l'analyse de l'effet de deux stratégies d'acclimatation à des stress thermiques reposant sur un thermopriming ou de l'utilisation de PGPR chez le colza et la caméline, s'est déclinée en quatre objectifs principaux : **(i)** étudier les effets du stress thermique et du thermopriming sur la **morphologie et l'exsudation racinaire** et sur la mise en place de stratégies racinaires -en termes de croissance et d'exsudation par deux espèces d'intérêt agronomique **(ii) mieux comprendre** l'impact de l'inoculation de PGPR sur l'exsudation racinaire en interaction avec le stress thermique ainsi que **(iii)** évaluer les conséquences du stress thermique et de l'inoculation de PGPR (combinés ou non) sur **l'allocation du C dans la plante**, les **traits racinaires** et les **communautés microbiennes du sol**, et *in fine* **(iv)** comprendre si ces deux types de stratégies d'acclimatation peuvent limiter l'impact du stress thermique sur le **rendement et la qualité grainière** du colza et de la caméline.

Les résultats issus des expérimentations nous ont permis d'acquérir une meilleure compréhension des deux stratégies d'acclimatation étudiées sur la globalité de la plante, allant des **relations plante/sol** (Chapitre 3.1, 4 et 5) en passant par **l'allocation carbonée dans la plante** (Chapitre 5), jusqu'au **rendement et à la qualité de la graine** (Chapitre 6). En effet, l'étude du thermopriming s'est surtout concentrée sur ses effets sur l'exsudation et la morphologie racinaire (Chapitre 3.1) et sur le rendement et la qualité grainière (Chapitre 6), alors que l'étude sur l'utilisation de PGPR s'est concentrée, non seulement sur l'exsudation et la morphologie racinaire (Chapitre 4), le rendement et la qualité grainière (Chapitre 6) – comme pour le thermopriming- mais également sur les traits et les relations d'allocation carbonée au sein de la plante et sur leurs effets sur l'activité et la composition des communautés microbiennes du sol (Chapitre 5). Peu d'études portent sur les effets des stress sur la morphologie racinaire et encore moins sur l'exsudation racinaire et les relations plantes/microorganismes du sol. C'est pourquoi, étudier les effets sur l'exsudation, du stress thermique et de deux stratégies d'acclimatation, peut être un challenge technique. Ainsi, il a été nécessaire de confirmer notre protocole d'exsudation en le confrontant à d'autres protocoles de recueil des exsudats retrouvés dans la bibliographie (Chapitre 3.2). De plus, ces travaux ont été réalisés sur **deux espèces de brassicacées, le colza et la caméline**, ayant, comme précisé dans la synthèse bibliographique, des cycles de vie et des besoins très différents (Chapitre 1). L'étude de ces deux espèces, contrastées sur plusieurs points (sélection, cycle de vie, résistance…), nous a notamment permis de mieux appréhender la possible généralisation de ces effets et si ces stratégies d'acclimatation fonctionnent indépendamment de l'écologie de l'espèce.

7.1. Comparaison de deux stratégies d'acclimatation pour faire face au stress thermique : le thermopriming et l'utilisation de PGPR, chez le colza et la caméline

Le principal objectif de **cette thèse a visé à comparer les effets des deux stratégies d'acclimatation** étudiées. Cette comparaison fait principalement l'objet du Chapitre 6 de la thèse. Cependant, tous les aspects ne sont pas présentés dans ce chapitre. En effet, les chapitres 3 et 4 présentent respectivement les résultats du thermopriming et de l'inoculation de PGPR sur l'exsudation, mais ces résultats ne sont jamais comparés dans une même synthèse. De plus, intégrer une comparaison de ces résultats obtenus dans ces chapitres pourrait nous permettre d'améliorer notre compréhension des effets observés dans le Chapitre 6. C'est pourquoi, avant de comparer ces deux stratégies d'acclimatation, il est important de relier les effets qui ont été observés tout au long des chapitres. Ainsi, cette première partie va tout d'abord relier les effets du thermopriming observés dans les différents chapitres chez le colza et la caméline. Puis, relier les effets de l'inoculation de PGPR observés dans les différents chapitres. Enfin une comparaison de ces deux stratégies d'acclimatation sera finalement réalisée ainsi qu'une recontextualisation dans leur possibles utilisations futures.

Le thermopriming, un levier d'acclimatation pour faire face au stress thermique

Lors de cette thèse, les effets du thermopriming, ont principalement été étudiés sur l'exsudation et la morphologie racinaire ainsi que sur le rendement et la qualité grainière.

Ainsi, **chez le colza**, il a été montré que **le thermopriming pouvait avoir un effet bénéfique sur le rendement et la qualité grainière** (Fig.23). Tout d'abord, le thermopriming tend à **augmenter le rendement** en comparaison du stress thermique. Cette observation est un premier indicateur particulièrement important quant à l'effet bénéfique de cette stratégie d'acclimatation pour faire face au stress thermique. En effet, il est connu que le stress thermique peut causer d'importantes diminutions du rendement, notamment chez le colza (Morrison and Stewart 2002; Aksouh-Harradj et al. 2006; Brunel-Muguet et al. 2015). Le thermopriming s'est également avéré **efficace sur la qualité nutritionnelle des graines**. En effet, en condition de stress thermique, il est généralement observé une diminution de la quantité totale d'huile et une modification du profil d'acides gras au profit des acides gras saturés, moins intéressants sur le plan nutritionnel (Aksouh-Harradj et al. 2006; Schulte et al. 2013; Brunel-Muguet et al. 2015; Magno Massuia de Almeida et al. 2021). Cependant, notre étude montre que le thermopriming, augmente la teneur en huile dans les graines, ainsi que le pourcentage d'acides gras monoinsaturés. Cet effet pourrait notamment s'expliquer par une diminution de l'effet négatif du stress thermique sur l'activité des désaturases généralement impactées par des températures élevées (Rolletschek et al. 2007; Baux et al. 2008). Enfin, **l'effet du thermopriming sur**

la qualité physiologique des graines a également été bénéfique chez le colza, puisqu'il a été observé une diminution du nombre de graines germées sur pied due à une modification du profil hormonal des graines avec augmentation du ratio ABA :GA3 au profit de l'ABA. L'ABA est une hormone connue pour augmenter le niveau de dormance des graines (Ding et al. 2010; Essemine et al. 2010). Aussi une augmentation de ce ratio induit une diminution du nombre de graines germées sur pied, qui est un phénomène généralement induit par une augmentation des températures sur le porte graine (Brunel-Muguet et al. 2015).

Concernant, les variables racinaires, de **faibles effets du thermopriming sur la morphologie racinaire du colza** ont pu être observés. Ainsi, l'hypothèse que cette stratégie d'acclimatation a permis de stimuler le développement racinaire permettant une meilleure prospection et une meilleure acquisition des ressources ne peut pas être validée. Cependant, **l'exsudation racinaire est modifiée par le thermopriming** (Fig.23). En effet, ces conditions thermiques tendent à diminuer l'exsudation en C et N du colza par rapport au stress thermique. Cette observation montre là aussi un effet bénéfique du thermopriming sur l'exsudation puisqu'il est connu que le stress thermique augmente l'exsudation racinaire (Yin et al. 2013b; Tiziani et al. 2022). De plus, il est admis que l'exsudation tend à diminuer au stade reproductif chez le colza (Chaparro et al. 2013; Tang et al. 2021a). Ainsi, une plus forte exsudation pourrait engendrer des pertes carbonées importantes au détriment du remplissage des graines et finalement résulter en un rendement final plus faible. Ainsi, cette diminution de l'exsudation causée par le thermopriming chez le colza pourrait expliquer un rendement meilleur et une quantité d'huile plus importante que dans des conditions de stress intense non précédées par une augmentation graduelle de température.

Cependant, à la différence du colza, **chez la caméline**, le **thermopriming tend à induire des effets plus négatifs que ceux résultant du stress intense seul**. En effet, un stress thermique intense tend à **diminuer le rendement et le nombre de graines** et à l'inverse, **à augmenter l'exsudation en C** (Fig.23). Cette augmentation du C exsudé cause notamment une augmentation de l'exsudation du glucose et du fructose, deux principaux sucres particulièrement importants dans le développement des plantes et la constitution du rendement des plantes. Seul l'effet du thermopriming sur le ratio ABA :GA3 est similaire à celle du colza. La principale hypothèse pourrait être que la caméline présente un cycle beaucoup plus court que le colza (9 mois pour colza contre 3.5 mois pour la caméline), ce qui l'expose à des températures élevées sur une plus grande durée relative de son cycle. Cette plus longue durée d'exposition est d'autant plus défavorable dans des conditions de thermopriming pour lesquelles le nombre de jour de stress modéré et chaud est plus élevé que dans des conditions de stress thermique intense uniquement.

Les PGPR, un levier d'acclimatation pour faire face au stress thermique

L'utilisation de PGPR est aussi un levier d'acclimatation permettant d'atténuer des effets négatifs du stress thermique auquel sont exposées les plantes (Meena et al. 2017). Cependant, ces effets sont non seulement dépendants de l'espèce végétale mais aussi de la bactérie inoculée. En effet, bien qu'il y ait certaines similitudes sur le mode d'action de ces bactéries, certains effets sont propres à la souche testée. Ainsi, **chez le colza**, il a été observé que **les deux bactéries testées agissent globalement de la même façon sur le rendement et la qualité grainière** et tendent notamment **à diminuer l'impact du stress thermique** sur le rendement mais aussi sur des variables reflétant la qualité physiologique des graines, comme le nombre de graines germées sur pied (Fig.23). En ce qui **concerne la qualité nutritionnelle**, la quantité de N dans les graines tend à augmenter avec les deux bactéries en condition de stress thermique. Cependant, seule la bactérie F113 tend à diminuer les effets du stress thermique sur la teneur en huile des graines. Si l'on essaie de faire le lien entre ces observations sur la récolte finale et les autres variables mesurées dans la thèse, il ressort que malgré une augmentation du rendement en grains à la fin du cycle du colza, la biomasse des parties reproductives est moins élevée à la fin du stress thermique avec ces deux bactéries par rapport au stress thermique seul. **A la fin de la période de stress thermique**, la **biomasse racinaire diminue** lorsque les plantes ont été inoculées au préalable avec les deux bactéries. L'une des raisons principales pourrait être que **les bactéries agissent comme un puits supplémentaire chez le colza** ce qui réduirait l'investissement dans les parties reproductives et dans les racines à ce stade. En effet, il y est connu que les bactéries sont capables de dériver le C de la plante pour elles-mêmes (Heulin et al. 1987; Farrar et al. 2003). De plus, les deux bactéries n'ont pas la même force de puits. En effet, C32 présenterait une force de puits beaucoup plus importante que F113 au stade reproductif étant donné la diminution de la biomasse des parties végétatives et de l'allocation du C dans les feuilles. De plus, la diminution du RDMC pourrait résulter d'une moindre allocation de C pour le développement des racines, se traduisant par une augmentation du C et N solubles dans les racines et de l'exsudation. Cependant, cette force de puits des bactéries semble s'atténuer au long terme puisque que le rendement en grain final n'est pas diminué par l'action des PGPR chez le colza. Au final, **ces modifications de l'allocation du C par les PGPR vont directement impacter la composition microbienne du sol** puisque qu'on peut observer une diminution de l'abondance bactérienne en condition de stress avec les deux bactéries et une augmentation de l'abondance fongique avec C32. En effet, le stress thermique est connu pour impacter les communautés microbiennes, notamment parce qu'il peut jouer un effet stimulant le développement des microorganismes du sol, qui en réponse vont augmenter leur utilisation de C labile (DOC dans notre cas). Cet impact du stress thermique sur les microorganismes va se traduire, sur le long terme, par une diminution du C disponible pour les microorganismes occasionnant par rétroaction, une diminution de leur abondance, comme observé dans nos analyses (Tang et al., 2021; Walker et al., 2018). De plus, il

est connu que les PGPR sont généralement des bactéries particulièrement actives et compétitives envers les autres bactéries hétérotrophes (Florio et al. 2017). Il est ainsi logique que cet effet soit plus marqué lors de l'apport des deux bactéries.

A nouveau, **les résultats sont différents chez la caméline**, **puisque peu d'effets sont observés sur les variables traduisant des modifications d'allocation** et d'investissement dans la plante (Fig.23). En effet, lors de la récolte des graines en fin de cycle, seule la quantité de N dans les graines tend à augmenter par rapport à la condition avec le stress thermique seul et le ratio ω6 :ω3 diminue dans ces conditions de stress avec les bactéries. De plus, aucun effet sur le rendement de la caméline n'est observé en condition de stress thermique. Ainsi les seuls effets observés chez cette espèce sont principalement une augmentation de l'exsudation en C avec C32 potentiellement dû à sa force de puits aussi observé chez le colza et une diminution de l'abondance bactérienne avec les deux PGPR, résultant certainement des mêmes processus invoqués pour le colza.

Comparaison de deux stratégies d'acclimatation pour faire face au stress thermique

Au final, **la comparaison des effets de ces deux stratégies d'acclimatation n'est pas généralisable aux deux espèces étudiées.** En effet, comme détaillé sur la figure 23, ces deux stratégies ne vont pas engendrer les mêmes effets sur le colza que sur la caméline. Ainsi, **cette comparaison ne vise pas à sélectionner l'une de ces deux stratégies, mais plutôt à comprendre leurs mécanismes associés**.

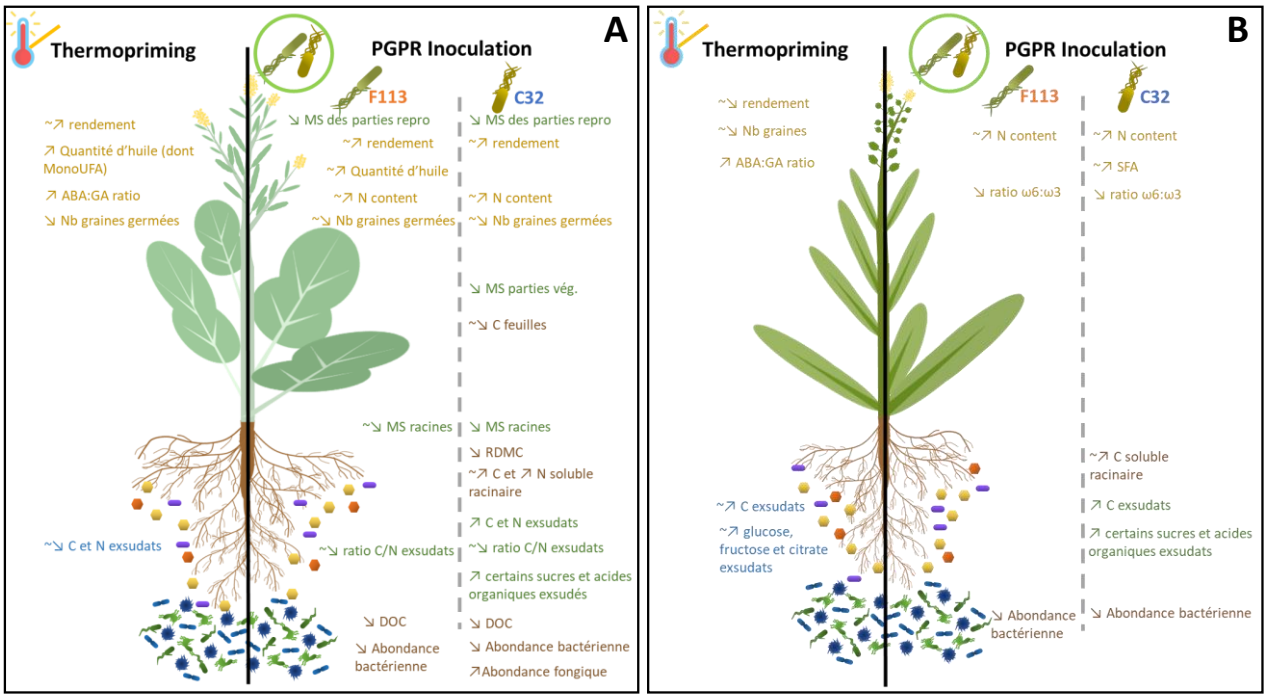


Figure 23 : Synthèse des effets du thermopriming et de l'inoculation de *Pseudomonas ogarae* F113 ou de *Pseudomonas sp*. C32 chez le colza (A) et la caméline (B). Les effets représentés sont ceux observés en comparaison du stress thermique intense. En bleu, sont répertoriés les effets observés dans le

Chapitre 3 ; en vert ceux dans le Chapitre 4 ; en marron, ceux dans le Chapitre 5 ; et en jaune, ceux répertoriés dans le Chapitre 6. Le symbole (~) indique des effets tendanciels et les flèches représentent le sens de l'effet sur la variable annotée.

Ainsi, chez le colza, nous avons pu voir que les deux stratégies d'acclimatation ont permis de limiter les effets négatifs du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière (Fig.23). De plus, **ces deux stratégies ont, toutes deux, joué sur des modifications d'allocation carbonée en relation avec les racines et l'exsudation**, bien que cela soit plus marqué avec la stratégie consistant en l'inoculation de PGPR. Cependant, l'une des principales différences se trouve sur la durée d'action de ces stratégies en amont du stress thermique. En effet, le **thermopriming ne pourra pas occasionner d'effets persistants avant le stress thermique**, du fait de leur continuité. A l'inverse, les PGPR appliquées bien en amont du stress thermique, vont exercer une force de puits additionnelle pouvant jouer sur l'allocation carbonée et les traits des plantes. De plus, bien que C32 présente une force de puits très prononcée en condition de stress, F113 présente ce même effet, mais en condition non stressante. Ainsi, **il pourrait être plus aléatoire de prédire l'effet des bactéries** pendant le cycle de la culture. Par ailleurs, ces stratégies sont très dépendantes de l'espèce végétale. Par exemple les PGPR n'ont eu que peu d'effet sur la caméline qui tend à être moins affectée par ce puits de C additionnel. Cependant, à l'inverse, les effets du stress thermique modéré et du stress thermique intense se sont cumulés chez la caméline et ont engendré un impact encore plus négatif que le stress thermique intense seul.

Perspectives d'utilisation de ces deux stratégies d'acclimatation au champ

Ces deux stratégies d'acclimatation présentent des modes d'actions différents. En effet, le thermopriming est une stratégie principalement basée sur la mise en place de régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles qui peuvent résulter en des variations biochimiques, des modifications d'équilibres hormonaux ou encore le dépôt de marques épigénétiques (Hilker and Schmülling 2019; Serrano et al. 2019; Liu et al. 2022; Shekhawat et al. 2022), alors que les PGPR, en plus de leurs actions sur les mêmes niveaux de régulations que le thermopriming (Meena et al. 2017; Shekhawat et al. 2022), vont aussi impacter directement la plante par leurs activités telles que l'ACC déaminase et la production d'auxine (Vacheron et al. 2016; Lastochkina et al. 2019; Goswami and Deka 2020). Au final, **ces deux stratégies d'acclimatation, sont des leviers potentiellement efficaces**. Cependant, notre étude reposant sur deux espèces de brassicacées nous montre que les effets bénéfiques de ces stratégies ne sont pas généralisables à toutes les espèces. Ainsi, pour le thermopriming, afin de viser une utilisation plus spécifique à l'espèce, il pourrait être intéressant d'analyser les effets de l'application de ce thermopriming selon le stade ou la durée d'application du stress graduel dans la perspective d'identifier la séquence qui aurait l'effet le plus sensibilisant. Enfin, dans notre étude il est difficile de dissocier les effets bénéfiques du thermopriming dus à des

modifications hormonales induites par l'augmentation graduelle de température, des effets provenant de l'acquisition de la mémoire du stress, c'est-à-dire exprimés après l'exposition au stress intense, lorsque l'on observe les performances finales. En effet, dans nos expérimentations, le pré-stress précède le stress thermique intense sans phase de récupération. Cependant, cette phase est nécessaire pour pouvoir identifier des modifications moléculaires qui perdurerait dans le temps, bien que selon la durée de cette phase de récupération, cet effet mémoire induit par le pré-stress peut être perdu (Lämke and Bäurle 2017). Ainsi, il pourrait être intéressant de réaliser d'autres expérimentations avec différentes durées de phases de récupérations, afin d'évaluer la contribution de régulations épigénétiques et l'implication de gènes mémoire (Ding et al. 2012) dans l'acquisition d'une tolérance au stress thermique. Néanmoins l'application de séquences sensibilisantes pour produire du matériel végétal tolérant est une stratégie d'acclimatation difficilement applicable en condition de plein champ et son réel intérêt réside surtout dans l'identification de signatures moléculaires, en particulier des marqueurs épigénétiques (c'est-à-dire qui soient transmissibles à la descendance) dans une perspective d'amélioration (ou d'acclimatation inter- voire trans-générationnelle).

L'utilisation de PGPR est une méthode plus facilement déployable au champ. Cependant, comme pour le thermopriming, certains ajustements seraient nécessaires pour développer son utilisation. En effet, nos expérimentations ont visé à étudier l'effet de PGPR à des doses fixes et à un stade de développement précis. Ainsi, pour obtenir une meilleure efficacité, il serait nécessaire de tester un panel de doses ainsi que l'application à d'autres stades de développement de la plante. Enfin, dans notre étude nous nous sommes focalisés sur deux PGPR. Cependant, il faudrait étudier l'effet d'un plus large éventail de PGPR afin de sélectionner les bactéries les plus efficaces en contexte de stress thermique. Pour cela, il pourrait être intéressant d'identifier des couples espèces ou variété végétale/souche bactérienne selon leur potentiel acclimatant. Enfin, les effets des PGPR peuvent aussi être variables en fonction de la communauté microbienne en place et donc potentiellement fluctuants en fonction des conditions pédoclimatiques. Ainsi, étudier ces couples en fonction des contextes pédoclimatiques précis pourrait aussi être un point à approfondir, notamment dans des contextes de déficiences en certains nutriments.

7.2. Comparaison des effets du stress thermique sur deux brassicacées à stratégies d'espèces contrastées

En plus de réponses contrastées aux deux stratégies d'acclimatation testées, **le colza et la caméline montrent initialement des différences de réponse au stress thermique seul**. En effet, bien que la biomasse des parties reproductives diminue chez les deux espèces à la fin du stress thermique (Fig.24), seul le colza présente une diminution du rendement final et une moindre qualité physiologique des graines, alors que chez la caméline, le rendement final n'est pas impacté. A l'inverse, la teneur en huile des graines de caméline augmente et pourrait refléter une priorisation d'allocation du C dans les graines favorable au développement des futures plantules. Ces différences entre colza et caméline sur le rendement laissent supposer que la caméline serait plus apte à atténuer les effets négatifs du stress au long terme par un **effet compensatoire**, plus prononcé que pour le colza. En effet, cet effet compensatoire connues chez les espèces à croissance indéterminée est souvent considéré comme l'une des raisons de la difficulté d'observer un impact du stress thermique survenant au cours du stade reproducteur sur le rendement final (Jullien et al. 2011; Labra et al. 2017; Magno Massuia de Almeida et al. 2023).

Comparaison des réponses mises en place au niveau rhizosphérique chez le colza et la caméline pour faire face au stress thermique

Les **effets observés au niveau racinaire** nous donnent aussi des pistes quant aux différences de réponse du colza et de la caméline face au stress thermique. En effet, ces deux espèces présentent des comportements très contrastés au niveau souterrain (Fig.24). **Chez le colza**, nous pouvons observer une diminution de la biomasse racinaire, de l'investissement de la plante pour développer cette biomasse (RDMC plus faible) et de la quantité de C soluble dans les racines. A l'inverse le C exsudé augmente, ce qui nous permet de conclure que chez le colza, en condition de stress thermique, le **C sera majoritairement exsudé entrainant une diminution de la quantité de C utilisé pour le développement du système racinaire**. Cette difficulté à retenir le C va causer *in fine* une diminution de la biomasse totale de la plante et pourrait être une des raisons de la perte de biomasse des parties reproductives et de la difficulté de la plante à maintenir son rendement final par des effets compensatoires. Cette augmentation de la déposition de C dans le sol pourrait être la raison de la tendance à l'augmentation de l'abondance bactérienne observée chez cette espèce.

A l'inverse chez la caméline, la biomasse des racines augmente suite à une augmentation de l'investissement de la plante vers son système racinaire (augmentation du RDMC et du RNC) (Fig.24). Comme pour le colza, cette augmentation de l'investissement aux parties racinaires aurait pu conduire à une plus forte perte de C par l'exsudation. Cependant, ce phénomène n'est pas observé chez la

caméline, qui, **sous l'effet du stress thermique, va avoir tendance à plus développer sa prospection racinaire et à modifier la composition de ces exsudats**. En effet, le ratio C/N de ces exsudats augmente, ce qui se traduit par une diminution de l'exsudation de N. De plus, la composition en métabolites des exsudats est modifiée, chez la caméline. Ainsi ces deux changements dans la composition pourraient entrainer une meilleure sélection des communautés microbiennes. En effet, un ratio C/N des exsudats plus important est connu pour être plus intéressant pour le développement et l'activité des communautés microbiennes (Steinauer et al. 2016). De plus, parmi la modification des composés exsudés une augmentation de certains composés connu pour leurs effets chimiotactiques tels que le malate, le *myo*-inositol et le mannitol (Rudrappa et al. 2008; Chagas et al. 2018; Vílchez et al. 2020) est observé. **Une exsudation préférentielle de ces composés pourrait permettre à la caméline de recruter des microorganismes bénéfiques lui permettant d'améliorer sa résistance aux stress.** En effet, il a été observé chez certaines espèces, qu'en condition de stress thermique, la communauté microbienne pouvait être modifiée et que l'abondance de bactéries bénéfiques augmentaient, en lien avec une modification de l'exsudation racinaire de la plante (Vescio et al. 2021). Ces observations pourraient expliquer **l'augmentation de l'abondance bactérienne observée chez la caméline et l'augmentation d'activités enzymatiques** comme l'activité arylsulfatase, connue pour être principalement réalisée par des bactéries (Vong et al. 2008) et l'activité β-glucosidase. En effet, l'augmentation de ces activités pourrait permettre, par rétroaction, d'améliorer la résistance de la caméline au stress de part une augmentation de la disponibilité de certains nutriments dont le soufre connu pour intervenir dans des mécanismes induisant une meilleure résistance au stress thermique (Ihsan et al. 2019; Sehar et al. 2022). Enfin, afin de mieux comprendre les modifications de la composition de la communauté microbienne, il aurait été intéressant de réaliser une analyse de type métabarcoding, pour identifier et quantifier les groupes de microorganismes préférentiellement favorisés en condition de stress thermique.

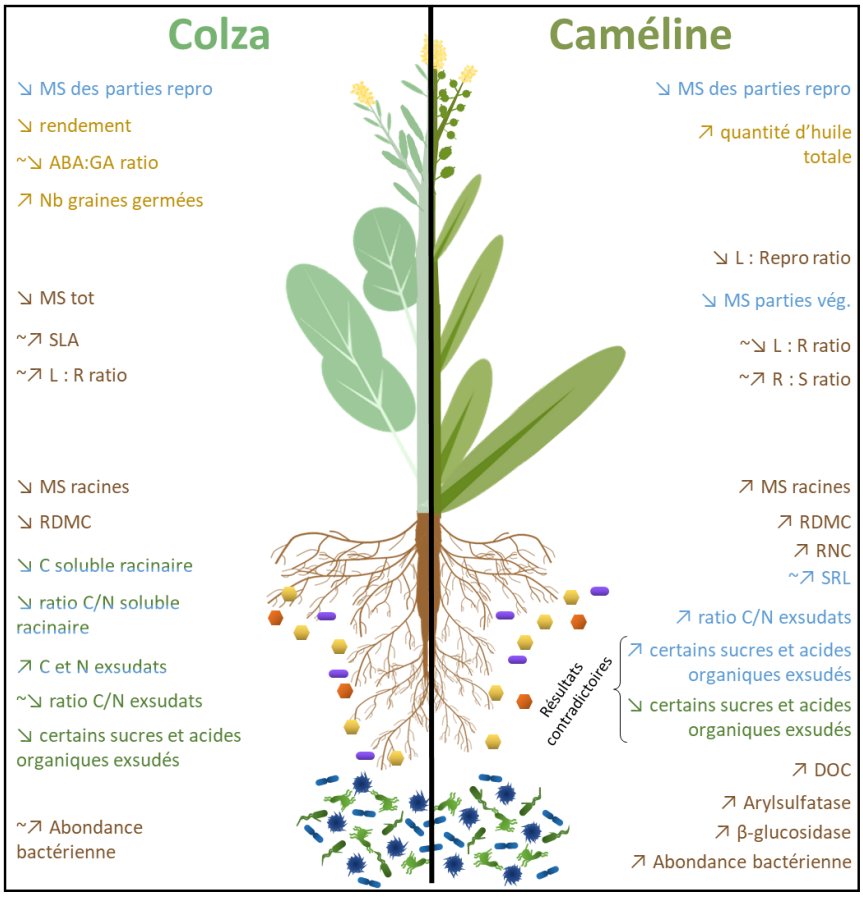


Figure 24 : Synthèse des effets du stress thermique chez le colza (gauche) et la caméline (droite). Les effets représentés sont ceux observés en fonction du contrôle. En bleu sont listés les effets observés dans le Chapitre 3 ; en vert ceux dans le Chapitre 4 ; en marron, ceux dans le Chapitre 5 ; et en jaune, ceux répertoriés dans le Chapitre 6. Le symbole (~) indique les effets tendanciels et les flèches représentent le sens de l'effet sur la variable annotée.

Quelles hypothèses pourraient expliquer ces différences de réponses entre les espèces ?

Les divergences de réponses observées entre le colza et la caméline peuvent s'expliquer par plusieurs raisons. En effet, en tant que Brassicacées, donc espèces non mycorhizées, ces deux plantes réalisent un compromis entre le développement de leur système racinaire et l'amélioration (quantitative et/ou qualitative) de leur exsudation (Wen et al. 2019, 2022). Cependant, bien qu'elles doivent faire face aux mêmes compromis, ces **deux espèces vont développer des stratégies d'espèce différentes**. La **caméline va davantage développer des réponses plus en lien avec son système racinaire et ajuster les relations avec les communautés microbiennes du sol**, alors que **le colza va difficilement moduler son système racinaire et va plutôt subir le stress thermique**, tout en compensant en partie son développement par la suite. Ces différences pourraient également être expliquer par les différences génétiques de ces espèces. En effet, l'exsudation racinaire peut être variable en fonction de la phylogénie des espèces (Rathore et al. 2023) et de la pression de sélection

(Preece and Peñuelas 2020). Le colza est une espèce qui a subi une sélection intensive particulièrement focalisée sur le rendement en grains (Snowdon and Iniguez Luy 2012; Wang et al. 2017b), alors que la caméline longtemps « oubliée » a évité cette sélection intensive (Julié-Galau et al. 2014; Brock et al. 2018; Zanetti et al. 2021). Cependant, la sélection variétale est une des causes d'érosion génétique qui a eu pour effet collatéral une augmentation de la sensibilité aux stress biotiques et abiotiques (Esquinas-Alcázar 2005). Ainsi, cette sélection aurait pu conduire à une plus grande sensibilité du colza au stress thermique contrairement à la caméline, plus résistante au stress biotiques et abiotiques (Moser 2010; Ibrahim and El Habbasha 2015; Soorni et al. 2021).

La sélection variétale principalement focalisée sur les parties aériennes a pu également entraîner une diminution de la plasticité de réponse de l'espèce au niveau racinaire (Cantarel et al. 2021). Ces effets de la domestication et de la sélection sur le microbiote et l'exsudation racinaires des plantes ont notamment été relevés dans de précédents travaux (Martínez-Romero et al. 2020; Preece and Peñuelas 2020). De plus, il a été récemment montré que le niveau de ploïdie pourrait aussi être une des raisons de la différence d'interaction avec des bactéries bénéfiques. En effet, une espèce hexaploïde comme la caméline, pourrait être plus apte à interagir avec des bactéries bénéfiques en raison d'une plus grande diversité de gènes qu'une espèce avec une ploïdie inférieure telle que le colza, espèce tétraploïde (Gruet et al. 2023).

Quels compromis entre développement des relations plante/microorganismes du sol et maintien de l'investissement vers les parties reproductives, le colza et la caméline réalisent-il ?

Cette thèse soulève aussi la question **des compromis** réalisés par les deux espèces **entre le développement des interactions avec les microorganismes du sol et le maintien d'un investissement vers les parties reproductives** pour assurer sa reproduction en condition de stress thermique.

En effet, en fonction du traitement, le colza et la caméline tendent à modifier le compromis entre investissement aux parties reproductives et développement des relations avec les communautés microbiennes du sol. En condition de stress thermique, la **caméline favorise non seulement l'investissement vers les racines mais aussi vers la rhizosphère** afin de modifier la communauté microbienne du sol en place mais aussi de stimuler l'activité des microorganismes. Néanmoins, ces changements auront lieu au détriment du développement de ses parties reproductives pendant la période du stress thermique seulement. En effet, **en fin de cycle, le rendement n'est quasiment pas affecté**. Ainsi, les modifications d'équilibre entre interactions avec les bactéries du sol et les parties reproductives réalisées pendant le stress thermique, ont pu à nouveau être perturbées en faveur des parties reproductive après le stress. A l'inverse, **chez le colza**, bien qu'on observe une augmentation de l'investissement vers les parties racinaires et du C exsudé en condition de stress, les communautés

microbiennes ne semblent pas être davantage stimulées et le **C exsudé semble davantage résulter d'une perte de C de la plante** causé par un surplus de C (Prescott et al. 2020; Prescott 2022). Cette perte occasionnera aussi une **diminution de l'investissement dans les parties reproductives**, qui comme pour la caméline, semble s'atténuer à la fin du cycle de vie de la plante mais de façon moindre, puisque le rendement est davantage pénalisé chez le cola que chez la caméline, reflétant ainsi des mécanismes compensatoires moins efficaces. Ainsi, le colza semble plutôt subir le stress qui causera une perte de C pour la plante et cherchera à compenser cette perte à la suite du stress, alors que la caméline tend plutôt à ajuster l'investissement en C entre le sol et les parties reproductives en faveur d'une meilleure résistance pendant le stress thermique.

Il serait intéressant, **d'intégrer cette notion de compromis entre parties reproductives et investissement aux parties racinaires et aux microorganismes du sol dans les approches de modélisation**. En effet, à notre connaissance, les approches généralement développées portent soit sur l'effet des stress sur le développement des parties aériennes et le rendement dans un cadre agronomique, soit sur la modélisation des flux entre la plante et le sol en conditions constantes dans un cadre physiologique. Cependant, le sujet de cette thèse montre qu'il est difficile de comprendre les effets du stress thermique sur le rendement final sans comprendre ses effets sur les flux au sein de la plante jusqu'au système racinaire mais aussi jusqu'à la rhizosphère, du C exsudé aux communautés microbiennes du sol. De plus, afin de comprendre les effets sur le compartiment microbien, il serait intéressant d'analyser les modifications d'utilisation du C provenant de la plante en situation de stress par les bactéries du sol. En effet, le C déposé dans la rhizosphère sera utilisé par les microorganismes, pour leur développement, leur respiration ou encore pour la réalisation de leurs activités telles que la production d'enzymes (Calabrese et al. 2022). Ainsi, les compromis réalisés entre ces trois processus chez les bactéries peuvent aussi être un point déterminant de leurs effets bénéfiques sur les plantes en condition de stress thermique.

7.3. Réflexion sur l'analyse des exsudats racinaires

La perspective d'explorer les flux de carbone provenant de la plante en situation de stress vers la rhizosphère et les communautés microbiennes, soulève la question de l'étude des exsudats racinaires. En effet, les exsudats racinaires sont particulièrement difficiles à analyser quantitativement et qualitativement (Oburger and Jones 2018). C'est pourquoi **il est souvent nécessaire de passer par des méthodes plus invasives pour la plante tels que le dépotage et la mise en exsudation en solution**. Néanmoins ces techniques peuvent engendrer un stress mécanique qui s'additionne aux effets des stress considérés dans l'expérience. De plus, la culture des plantes en hydroponie sur le cycle complet

peut modifier le système racinaire qui à son tour peut impacter l'exsudation racinaire (Groleau-Renaud et al. 1998). Cependant, **il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode parfaite pour récupérer les exsudats racinaires** et il est souvent nécessaire de réaliser un **arbitrage entre développement des racines en condition réaliste et risque d'infliger un stress (mécanique) supplémentaire**. Ainsi, dans un objectif d'analyse de la composition des exsudats, cet arbitrage parait nécessaire, alors que pour le suivi des flux carbonés dans la rhizosphère, il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres outils, tels que le marquage au ^{13}C, qui permettrait de mesurer quantitativement l'exsudation *in situ*. Cependant, cette dernière méthode nécessite une chambre de marquage, pouvant être contraignante pour des cultures d'espèces de plus grandes tailles ou ayant de nombreux réplicats. De plus, cette méthode est difficilement déployable dans des expérimentations testant plusieurs modalités de température, d'humidité ou de lumière. Ainsi, l'identification de proxies suffisamment sensibles pour quantifier l'exsudation ou à défaut ses variations, pourrait constituer une alternative. En effet, de récentes études ont notamment cherché à expliquer l'exsudation par la morphologie et les traits racinaires (Eisenhauer et al. 2017; Herz et al. 2018; Wen et al. 2019; Rathore et al. 2023). Cependant, le caractère plus fluctuant des exsudats que les traits morphologiques, pourrait justifier de **prendre en compte l'exsudation comme un trait en soi pour rendre compte des interactions entre les plantes et les communautés microbiennes du sol** dans une optique de définition de traits d'interactions. Ainsi, il pourrait être intéressant de dépasser la notion de traits expliquant les stratégies de conservation pour aller vers des traits racinaires traduisant les relations avec les communautés microbiennes. Cette idée est notamment proposée dans de récentes études avec l'apparition du gradient de collaboration (stratégie de do your self (forte SRL) *vs.* stratégie en lien avec les champignons mycorhiziens (faible SRL) (Wen et al. 2019, 2022; Bergmann et al. 2020; Weigelt et al. 2021). Cependant, afin de compléter cette idée, il serait nécessaire de prendre en compte les relations avec les bactéries du sol. En effet, des espèces non mycorhizées telles que les brassicacées mettent en place des relations avec les bactéries libres du sol via l'exsudation, comme observé dans notre étude.

Relations entre C exsudé et C soluble racinaire :

Dans cette thèse, chez les plantes en hydroponie nous avons analysé **conjointement au C dans les exsudats, la quantité de C soluble dans les racines,** nous permettant de tester les relations entre C dans la racine et C sortant, comme décrites par d'autres auteurs (Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). De plus, chez les plantes en sol, nous avons cherché à **corréler le C soluble dans les racines avec le DOC** afin de savoir si les variations de DOC pourraient être expliquées par celles du C soluble racinaire.

La figure 25 montre qu'**aucune corrélation entre le C dans les exsudats et le C soluble dans les racines des plantes contrôles** n'est observée ni pour le colza, ni pour la caméline. Ainsi, le C soluble dans les racines, ne semble pas constituer un proxy pertinent pour estimer le C dans les exsudats. En

effet, la fraction de C soluble racinaire se répartit dans trois processus : le développement de la racine, la respiration racinaire et l'exsudation (Farrar et al. 2003; Dilkes et al. 2004). Ainsi, le C exsudé résulte des équilibres s'effectuant avec les deux autres processus dans la racine, et c'est pourquoi, le C soluble racinaire à lui seul ne peut traduire l'exsudation C. De plus cet équilibre peut varier au cours du développement de la plante. Le C soluble racinaire devrait être directement relié au C du phloème (Dilkes et al. 2004) et il a été montré que les métabolites circulant dans le phloème sont reliés quantitativement et qualitativement aux métabolites exsudés (Canarini et al. 2016).

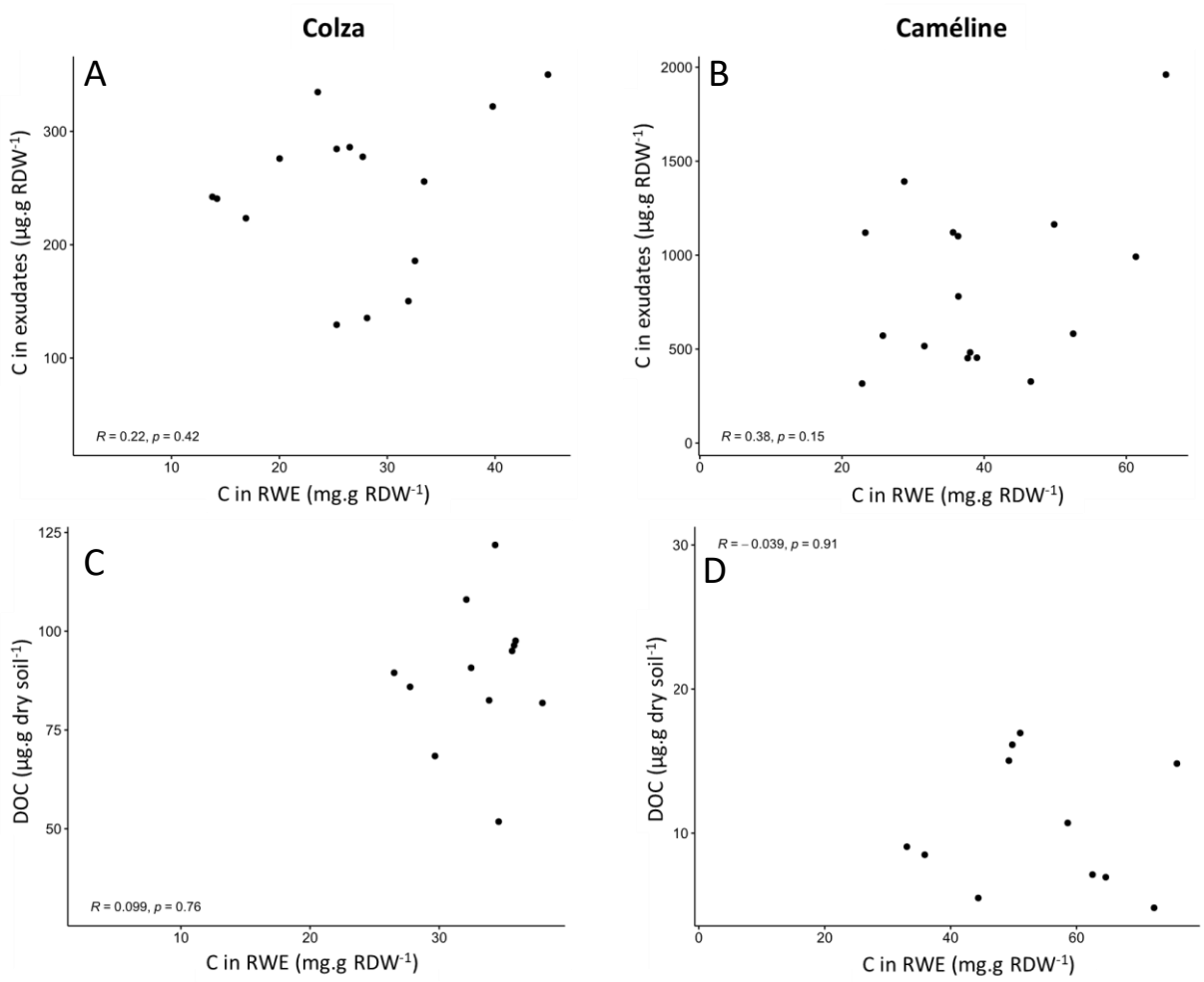


Figure 25 : Corrélations entre le C dans les exsudats et le C dans les extraits racinaires (RWE – Root Water Extracts) (A et B, plantes contrôles en hydroponie) et entre le Dissolved Organic Carbon (DOC) et le C dans les extraits racinaires (RWE – Root Water Extracts) (C et D, plantes contrôles en pots) chez le colza (A et C) et la caméline (B et D). Les données des graphiques A et B proviennent des plantes contrôles des chapitres 3 et 4. Les données des graphiques C et D proviennent des plantes contrôles du chapitre 5.

Relation entre DOC et exsudation :

Concernant le DOC, aucune corrélation n'est observée entre ce dernier et le C soluble racinaire (Fig.25). En effet, le DOC constitue la part de C organique labile dans le sol et bien qu'influencé par le système racinaire, il ne dépend pas seulement de la racine. Cela pourrait notamment être la raison qu'aucune corrélation n'est observé entre le DOC et le C soluble racinaire. Cependant, l'utilisation du DOC comme proxy de l'exsudation serait toujours une idée à développer. En effet, le DOC est en partie constitué d'exsudats racinaires (Delarue et al. 2014; Bongiorno et al. 2019) et pourrait ainsi traduire de potentielles variations dans l'exsudation des plantes dans certaines conditions. C'est pourquoi, il serait intéressant **d'approfondir cette relation dans le cadre d'expérimentations dédiées**. Dans notre étude, le DOC et l'exsudation ont été tout deux analysés. Cependant, il est difficile de mettre en relation ces deux variables étant donné que ces dernières n'ont pas été réalisées sur les mêmes plantes. De plus, ces variables ont été analysées sur des plantes ayant eu des conditions de cultures en partie différentes à la suite du dépotage. Ainsi, **comparer l'exsudation de C en hydroponie et le DOC en sol n'est pas statistiquement réalisable**. D'autant plus que les plantes en hydroponie et en sol n'ont pas tout à fait le même phénotype. En effet, les biomasses racinaires et des parties reproductives sont moins élevées en sol qu'en hydroponie et à l'inverse le C soluble racinaire est plus important chez les plantes en sol (Fig.26). Ces observations pourraient s'expliquer par l'absence de résistance mécanique sur les racines en hydroponie, favorisant ainsi le développement racinaire et expliquant la diminution des C solubles dans la racine. De plus, les plantes en hydroponie sont installées dans des bacs contenant de la solution nutritive. Ainsi, même si les plantes en sol sont alimentées en nutriments de façon optimale, le surplus de nutriments en hydroponie pourrait être une des explications de l'augmentation de la biomasse des parties reproductives et racinaires des plantes. De plus, la SRL en hydroponie et en sol pour le colza sont identiques, tandis que pour la caméline, la SRL en hydroponie est légèrement supérieure en sol. Chez le colza, le dépotage a eu lieu post-vernalisation. Ainsi les plantes qui ont été dépotées ont pu mettre en place la majeure partie de leur système racinaire pendant six mois lorsqu'elles étaient en sol, à la différence des plantes de caméline qui ont été dépotées un mois et demi après leur semis. Au final, pour éviter toutes ces différences observées dans de futures expérimentations, il pourrait être intéressant de réduire le délai entre le dépotage et la récolte des plantes et des exsudats afin d'obtenir des phénotypes moins différenciés entre plants en hydroponie et plantes restées en sol.

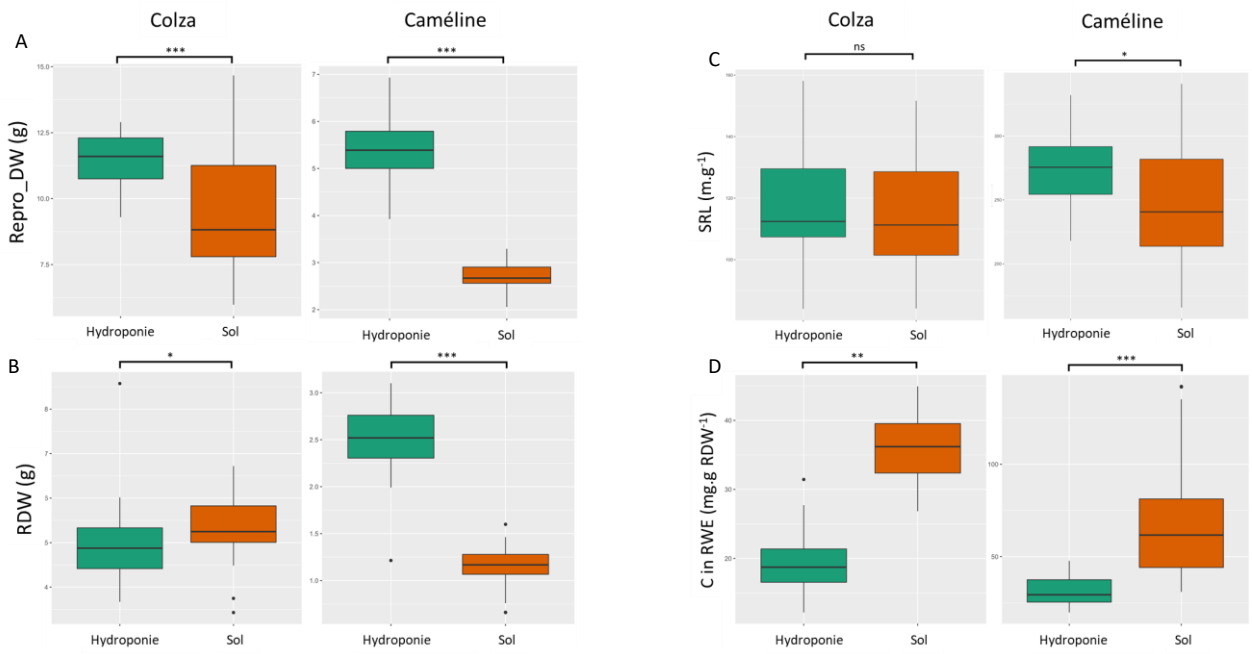


Figure 26 : Comparaison des biomasses des parties reproductives (Repro_DW – A), des biomasses racinaires (RDW – B), de la SRL (C) et du C soluble racinaire (C in RWE – D) en hydroponie et en sol chez le colza et la caméline. Les données des plantes en hydroponie proviennent du chapitre 4 alors que celles des plantes en sol proviennent du chapitre 5.

7.4. Conclusion et perspectives

De nouvelles stratégies d'acclimatation pour faire face au stress thermique existent et pourraient ainsi permettre élargir l'éventail des solutions existantes. Cependant, **nos travaux ont montré que selon l'espèce, les stratégies d'acclimatation testées** i.e. thermopriming et inoculation de PGPR **n'ont pas les mêmes effets et peuvent même s'avérer plus défavorable que bénéfiques**. C'est pourquoi, la compréhension des processus impliqués dans ces stratégies d'acclimatation nécessite d'être approfondie notamment pour obtenir une meilleure spécificité de leur utilisation. De plus il est nécessaire d'**améliorer notre compréhension des stratégies d'espèces que les plantes peuvent mettre en place pour faire face au stress thermique**. En effet, ces dernières ont-elles aussi développé des adaptations en lien avec leur parcours évolutif. C'est pourquoi il est aussi nécessaire de prêter attention lors de la sélection à conserver une gamme de variation des traits, autres que ceux impliqués dans le rendement, qui pourrait permettre d'améliorer la résistance aux stress des plantes.

En perspective de cette thèse, il pourrait être intéressant de **compléter nos travaux avec des expérimentations testant plusieurs génotypes contrastés** sur la phénologie, la morphologie aérienne versus racinaire. En effet, les effets observés dans cette thèse sont fondés sur un seul génotype pour chaque espèce. Ainsi, il est nécessaire d'explorer une gamme de diversité génétique afin de généraliser ces effets à l'espèce indépendamment du génotype.

De plus, les relations plantes/PGPR étudiées dans le cadre de la seconde stratégie d'acclimatation ont été appréhendés ici dans le sens des effets de la PGPR vers la plante. Il pourrait également être intéressant d'**étudier cette interaction d'un point de vue de la PGPR** notamment en réalisant des dynamiques de croissance de la bactérie en contact avec les exsudats racinaires de différentes espèces et des études sur le chimiotactisme, pour évaluer les étapes du recrutement et du maintien des PGPR dans la rhizosphère (Zhang et al. 2014; Vora et al. 2021).

L'allocation du C dans la plante a été étudiée au travers de bilan carboné réalisé pour chaque organe de la plante. Cependant, un accès aux flux de C dans la plante, de la fixation jusqu'au transfert vers les communautés microbiennes du sol via l'**utilisation d'un marquage ^{13}C pourrait être une perspective intéressante**. En effet, ce marquage pourrait notamment être couplé à une analyse de type DNA-SIP ou des PLFA (PhosphoLipid-derived Fatty Acids) afin de déterminer la diversité de la communauté microbienne active ayant consommé le C rhizodéposé par la plante.

Enfin, cette thèse s'est surtout concentrée sur les effets du stress thermique et des stratégies d'acclimatation étudiées pendant la période de stress thermique. Cependant, nous avons pu voir que les plantes réagissent différemment à ces stratégies. De plus, elles sont aussi capables de mettre en place des mécanismes pour maintenir leur développement *a posteriori* du stress thermique et à terme, **compenser les effets de ce stress pour maintenir leur rendement**. Ainsi, il pourrait être intéressant de **prendre en compte les processus de résilience (post-stress) et de résistance (pendant le stress)** de ces espèces notamment en lien avec les flux carbonés et les changements de communautés microbiennes tout au long du cycle de vie de la plante et surtout à la suite du stress thermique et ce, jusqu'à la récolte.

Liste des activités scientifiques

Liste des publications et communications

Articles dans des revues internationales

Delamare J., Brunel-Muguet S., Bressan M., Riah-Anglet W., Trinsoutrot-Gattin I., Prigent-Combaret C., Personeni E. (2023) Functional ecological approach of the effects of PGPR inoculation on root traits, C allocation and soil microbial community in rapeseed (Brassica napus L.) and in camelina (Camelina sativa L. Crantz) under heat stress condition. En cours de rédaction

Delamare J., Personeni E., Le Guédard M., Kim T.H., Elie N., Bressan M., Cantat O., Dupas Q., Trinsoutrot-Gattin I., Prigent-Combaret C., Brunel-Muguet S. (2023) Effects of thermopriming and bacteria mediated-heat stress acclimation strategies on seed yield and quality criteria in oilseed rape and camelina. Article soumis le 01 septembre 2023 dans European Journal of Agronomy.

Delamare J., Brunel-Muguet S., Bourkerb A.M., Bressan M., Dumas L., Firmin S., Leroy F., Morvan-Bertrand A., Prigent-Combaret C., Personeni E. (2023) Impact of PGPR inoculation on root morphological traits and root exudation in rapeseed and camelina: interactions with heat stress. Article accepté le 11 octobre 2023 dans Physiologia Plantarum.

Delamare J., Brunel-Muguet S., Morvan-Bertrand A., Cantat O., Firmin S., Trinsoutrot-Gattin I., Le Franc L., Personeni E. (2023) Thermopriming effects on root morphological traits and root exudation during the reproductive phase in two species with contrasting strategies: Brassica napus (L.) and Camelina sativa (L.) Crantz. Environmental and Experimental Botany, EEB, DOI: 10.1016/j.envexpbot.2023.105318

Communications dans des congrès internationaux

Delamare J. *et al.* (2022), oral. Comparison of two acclimatization strategies in rapeseed and in camelina to heat waves: thermo-priming vs microbial-priming. European Society for Agronomy Congress (ESA, 2022), Potsdam, Allemagne.

Delamare J. *et al.* (2022), poster (Annexe 5). Impacts of heat stress and thermo-priming on seed yield and quality and on root exudation. European Society for Agronomy Congress (ESA, 2022), Potsdam, Allemagne.

Communications dans des congrès nationaux

Delamare J. *et al.* (2023), oral. Heat stress effects on plant-PGPR interactions: focus on the root exudation modifications in two Brassicaceae species. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE 2023), Rouen, France.

Delamare J. *et al.* (2023), poster (Annexe 6). Heat stress on the plant-bacteria interactions: effects on root morphology and exudation in two Brassicaceae. Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Integrative, Santé, Environnement (JED nBISE 2023), Rouen, France.

Delamare J. *et al.* (2023), oral. Impact of heat stress on root morphology and root exudation in rapeseed and camelina: which consequences for plant/soil microbiota interactions? 16ème rencontre plantes bactéries (2023), Aussois, France.

Autres Communications

Delamare J. *et al.* (2023), oral. Relier l'exsudation racinaire aux « belowground economic traits » pour l'acquisition des ressources. Réunion d'équipe ECOPEPS (2023) à l'UMR EVA, Caen, France.

Delamare J. *et al.* (2023), oral. Impact of heat stress on root morphology and root exudation in rapeseed and camelina: which consequences for plant/soil microbiota interactions? Séminaire du Jeudi (2023) à l'UMR EVA, Caen, France.

Delamare J. *et al.* (2023), oral. Analyses de deux stratégies de sensibilisation pour l'acclimatation du colza et de la caméline à des stress thermiques printaniers : sensibilisation thermique et sensibilisation médiée par des bactéries PGPR. Communication dans le cadre d'un déplacement au laboratoire d'écologie microbienne (LEM), Lyon, France.

Delamare J. *et al.* (2022), oral. Effet d'un thermopriming sur les traits et l'exsudation racinaires durant la phase reproductive de deux espèces à stratégie contrastée : le colza (Brassica napus L.) et la caméline (Camelina sativa L. Crantz). Réunion d'équipe ECOPEPS (2023) à l'UMR EVA, Caen, France.

Delamare J. *et al.* (2022), oral. Comparaison de l'impact d'un apport de 3 bactéries PGPR sur le développement du colza : Première expérimentation test. Comité de Pilotage projet BEER en distanciel, France.

Liste des activités complémentaires

Activités scientifiques

2023 : Participation avec les autres doctorants de l'UMR EVA à la fête de la science (17 octobre 2023). Création d'un jeu de société sur le thème des espèces végétales de Normandie.

Activités au sein de l'EDnBISE

2021-2023 : Membre du CSI de Anouk Lyver, doctorante à l'unité AGHYLE (UniLasalle, Rouen)

2021-2023 : Membre du CSI de Anna Marcout, doctorante à l'UMR BOREA (Caen)

Missions d'enseignement

2022-2023 :

- 4h TD et 39h TP de Biologie végétale et mycologie au Licence 1 sciences de la vie
- 14h TP (sortie de terrain) de Population et Ecosystème (écologie végétale) au Licence 2 sciences de la vie
- 8h CM et 3h TD d'Agronomie au Master 2 Agrosciences, Environnement, Territoires, Paysage, Forêt, parcours gestion et valorisation agri-environnementales (AETPF – Ecocaen).

2021-2022 :

- 6h TD et 24h TP de Biologie végétale et mycologie au Licence 1 sciences de la vie
- 14h TP (sortie de terrain) de Population et Ecosystème (écologie végétale) au Licence 2 sciences de la vie

Encadrement de stagiaires

2022-2023 :

- Co-encadrement du stage de M1 de Elena Augusto (M1 AETPF, Caen) sur la « Comparaison méthodologique et spécifique de l'exsudation racinaire chez le colza et la féverole ».
- Encadrement de quatre stagiaires de L3, Elyne Faivre, Nina Marie, Madeleine wheeler et Myriam-Aurore Malassene-Lecarpentier (L3 sciences de la vie, parcours biologie Ecologie).

2021-2022 :

- Encadrement du stage de M1 de Lucien Dumas (M1 AETPF, Caen) sur l' « Effets de bactéries PGPR et d'une augmentation des températures sur les parties racinaires et certains traits aériens du colza (*Brassica napus*) »
- Encadrement de cinq stagiaires de L3, Maelle Bourhis, Lise Colineau, Manon Blouet, Zazie Benoit-Delaby, Marie Bugeat (L3 sciences de la vie, parcours biologie Ecologie).
- Encadrement du stage de BTS de Patrick Pichouron (BTS Anabiotech)

2020-2021 :

- Encadrement de six stagiaires de L3, Eloïse Lesage, Zora Lajeannière, Lucas Dubuisson, Louise Leroyer, Léo Bunel, Margo Rauld (L3 sciences de la vie, parcours biologie Ecologie).

Annexes

Annexe 1 : Composition des solution nutritives utilisées pour les cultures de colza et de caméline.

Annexe 2 : Supplemental data de l'article Delamare *et al.*, 2023 (Chapitre 3.1)

Annexe 3 : Supplemental data de l'article soumis Delamare *et al.*, 2023 (Chapitre 4)

Annexe 4 : Supplemental data de l'article soumis Delamare *et al.*, 2023 (Chapitre 6)

Annexe 5 : Poster présenté lors du European Society for Agronomy Congress (ESA)

Annexe 6 : Poster présenté lors des journées de l'école doctorale EDnBISE

Annexe 1 : Composition des solution nutritives utilisées pour les cultures de colza et de caméline.

Hoagland 1/4

Solution utilisée pour le colza jusqu'en début de vernalisation et pour la caméline jusqu'en début de montaison. Pour la caméline, à partir de la montaison, cette solution est diluée par deux afin d'obtenir une Hoalgand 1/8.

sels	masse molaire	[conc finale] mM	[conc mère] mol.L-1	[conc mère] g.L-1	vol. solut° mère en ml/ 20 L
Ca (NO3)2, 4 H2O	236,1	1,25	1,25	295,13	20
KNO3	101,1	1,25	0,5	50,55	50
KH2PO4	136,1	0,25	0,5	68,05	10
MgSO4	246,37	0,5	1	246,37	10
EDTA, NaFe, 3 H2O	421	0,2	0,08	33,68	50
Oligoéléments	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	10
détails oligo-éléments normaux	masse molaire	[conc finale] µM	[conc mère] mM	[conc mère] g.L-1	vol. en ml / 20L
H3BO3	61,83	14	28	1,731	cf.ci-desssus
MnSO4, H2O	169,01	5	10	1,69	
ZnSO4, 7 H2O	287,5	3	6	1,725	
CuSO4, 5 H2O	249,68	0,7	1,4	0,35	
(NH4)6 Mo7O24	1235,6	0,7	1,4	1,729	
CoCl2	237,93	0,1	0,2	0,0475	

Hoagland 1/4 sans N et S

Solution utilisée pour le colza à partir du début de vernalisation. L'apport en N et S est réalisé séparément selon les recommandations au champ.

sels	masse molaire	[conc finale] mM	[conc mère] mol.L-1	[conc mère] g.L-1	vol. solut° mère en ml/ 20 L
Ca (NO3)2, 4 H2O	236,1	0	1,25	295,13	0
KNO3	101,1	0	2	202,20	0
KH2PO4	136,1	0,25	0,5	68,05	10
MgSO4	246,37	0	1	246,37	0
CaCO3	100,8	1,25	0,36	36,29	69,4
KCl	74,54	1,25	1	74,54	25
MgCl2, 6H2O	203,31	0,5	1	203,31	10
EDTA, 2 NaFe, 3 H2O	421	0,2	0,08	33,68	50
NiCl2 6H2O	237,7	0,00004	7,29912E-05	0,01735	10,96022534
Oligoéléments	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	10

détails oligo-éléments normaux	masse molaire	[conc finale] µM	[conc mère] mM	[conc mère] g.L1	vol. en ml / 20L
H3BO3	61,83	14	28	1,731	cf.ci-dessus
MnSO4, H2O	169,01	5	10	1,69	
ZnSO4, 7 H2O	287,5	3	6	1,725	
CuSO4, 5 H2O	249,68	0,7	1,4	0,35	
(NH4)6 Mo7O24	1235,6	0,7	1,4	1,729	
CoCl2	237,93	0,1	0,2	0,0475	

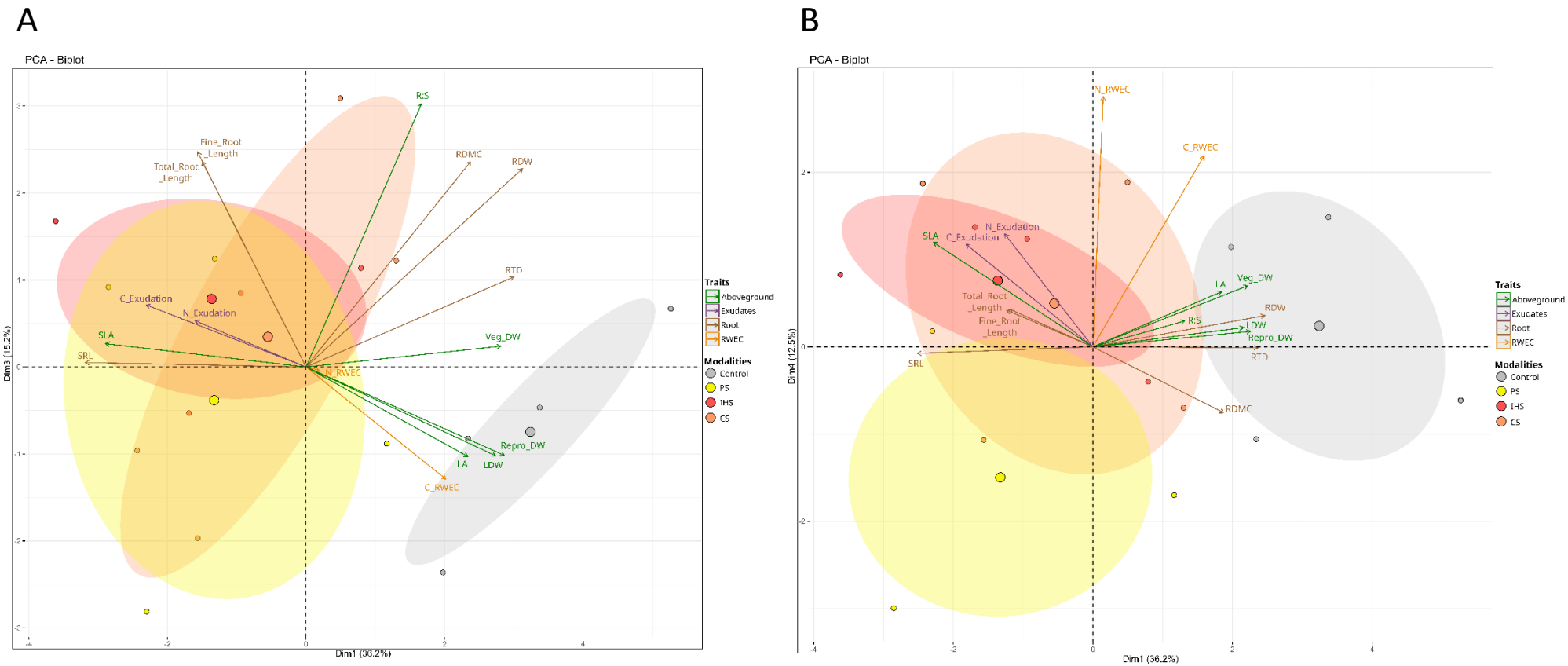


Figure S1 (Chap.3.1): Principal component analysis of the first two components for rapeseed, i.e. Dim 1 (=36.2%) and the Dim 3 (=15.2%) (**A**) and Dim 1 (=36.2%) and the Dim 4 (=12.5%) (**B**). The variables acquired under the 3 heat stress modalities gather four different plant traits types (Aboveground traits, root traits, exudates and RWEC)**.** The small dots represent the individuals (plants) per modality while the larger dots represent the mean for each modality. Ellipses reflect the interval of confidence. Pre-Stress (PS), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Dry weight (DW), Vegetative part DW (Veg DW), Reproductive part DW (Repro DW), Leaf DW (LDW), Leaf area (LA), Specific Leaf Area (SLA), Root/Shoot ratio (R:S), Root DW (RDW), Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Tissue Density (RTD), Root Water Extractable Compounds (RWEC).

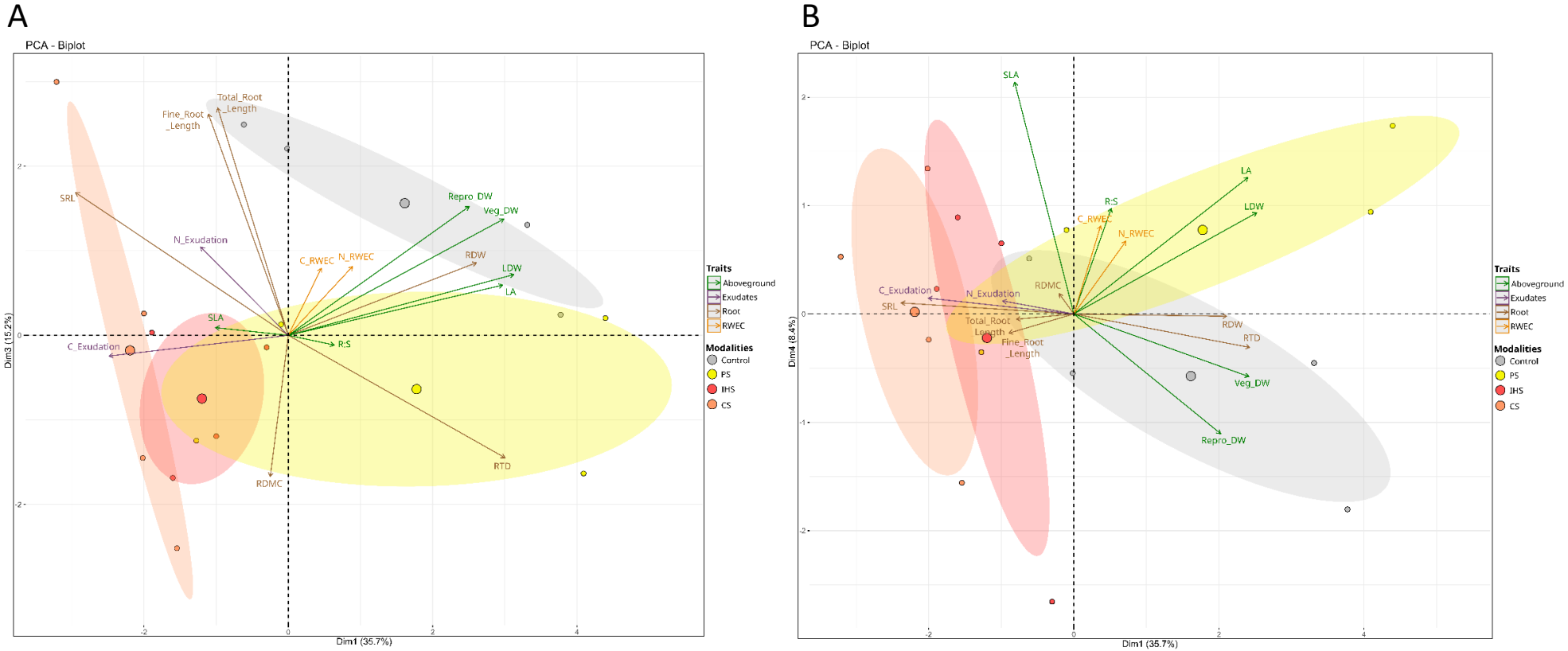


Figure S2 (Chap.3.1): Principal component analysis of the first two components for camelina, i.e. Dim 1 (=35.7%) and the Dim 3 (=15.2%) (**A**) and Dim 1 (=35.7%) and the Dim 4 (=8.4%) (**B**). The variables acquired under the 3 heat stress modalities gather four different plant traits types (Aboveground traits, root traits, exudates and RWEC)**.** The small dots represent the individuals (plants) per modality while the larger dots represent the mean for each modality. Ellipses reflect the interval of confidence. Pre-Stress (PS), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Dry weight (DW), Vegetative part DW (Veg DW), Reproductive part DW (Repro DW), Leaf DW (LDW), Leaf area (LA), Specific Leaf Area (SLA), Root/Shoot ratio (R:S), Root DW (RDW), Specific Root Length (SRL), Root Dry Matter Content (RDMC), Root Tissue Density (RTD), Root Water Extractable Compounds (RWEC).

Table S1 (Chap.4): Genome sequence similarity between *Pseudomonas* sp. C32 and genome sequences of the fifteen closely related type strain. The obtained values indicate significant distance of the C32 strain as a separate species.

Query	References	ANIb[a] (%)	*is*DDH - Formula 2[b] (%)	G+C difference (%)
Pseudomonas sp. C32	*Pseudomonas azerbaijanoccidentalis* SWRI74^T	86.64	33.20	0.40
	Pseudomonas azerbaijanorientalis SWRI123^T	87.75	34.70	1.21
	Pseudomonas fluorescens ATCC13525^T	81.40	24.80	1.09
	Pseudomonas frederiksbergensis BS3655^T	86.08	31.80	0.03
	Pseudomonas izuensis IzPS43 3003^T	86.10	32.10	0.71
	Pseudomonas jessenii LMG21605^T	87.99	35.50	0.76
	Pseudomonas laurylsulfatiphila AP3 16^T	87.58	34.60	1.25
	Pseudomonas laurylsulfativorans AP3 22^T	87.72	34.80	0.72
	Pseudomonas mohnii DSM18327^T	86.16	31.80	0.72
	Pseudomonas moorei DSM12647^T	86.36	32.00	0.76
	Pseudomonas nunensis In5^T	85.59	30.60	0.48
	Pseudomonas ogarae F113^T	82.93	26.90	1.89
	Pseudomonas reinekei DSM18361^T	86.64	32.70	0.23
	Pseudomonas umsongensis BS3657^T	86.09	31.80	0.79
	Pseudomonas vancouverensis LMG20222^T	86.06	31.50	1.21
	Cellvibrio japonicus Ueda107^T	71.00	24.40	6.91

[a] Average nucleotide identity based on BLAST.

[b] *in silico* DNA-DNA hybridization based on model "formula2".

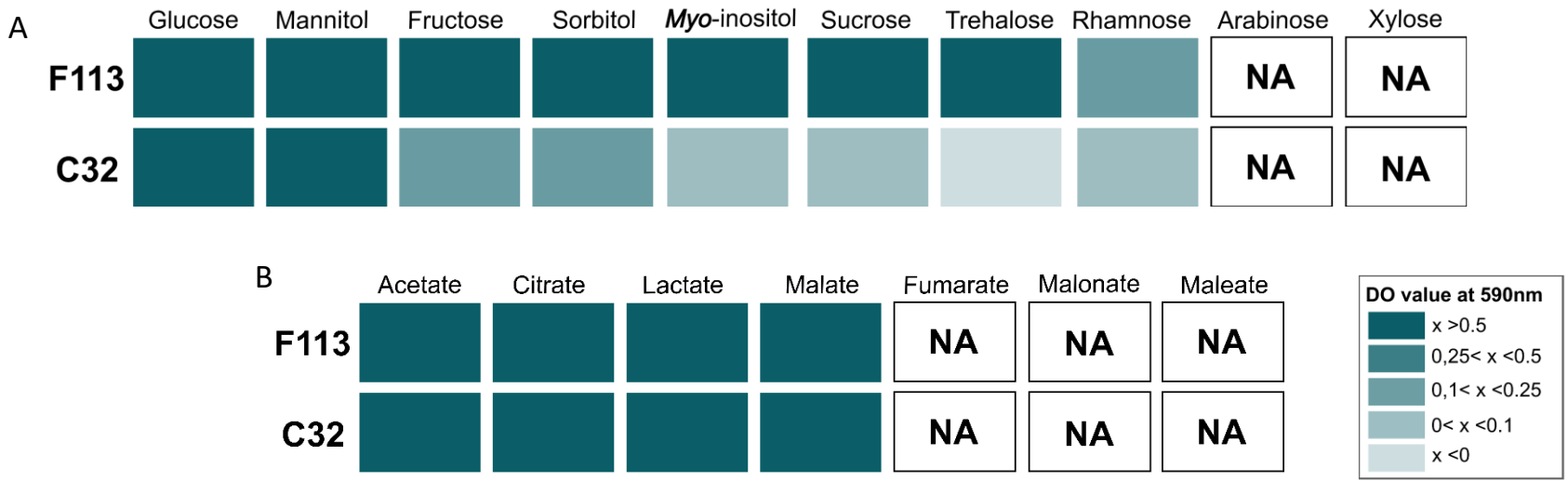


Figure S1 (Chap.4): Biochemical potential profile (Biolog GenIII) in the use of the carbohydrates (A) and carboxylates (B) by the 2 tested bacteria. The metabolites represented are those analysed in rapeseed and camelina root exudates (complete Biolog is in Fig. S2 (Chap.4)).

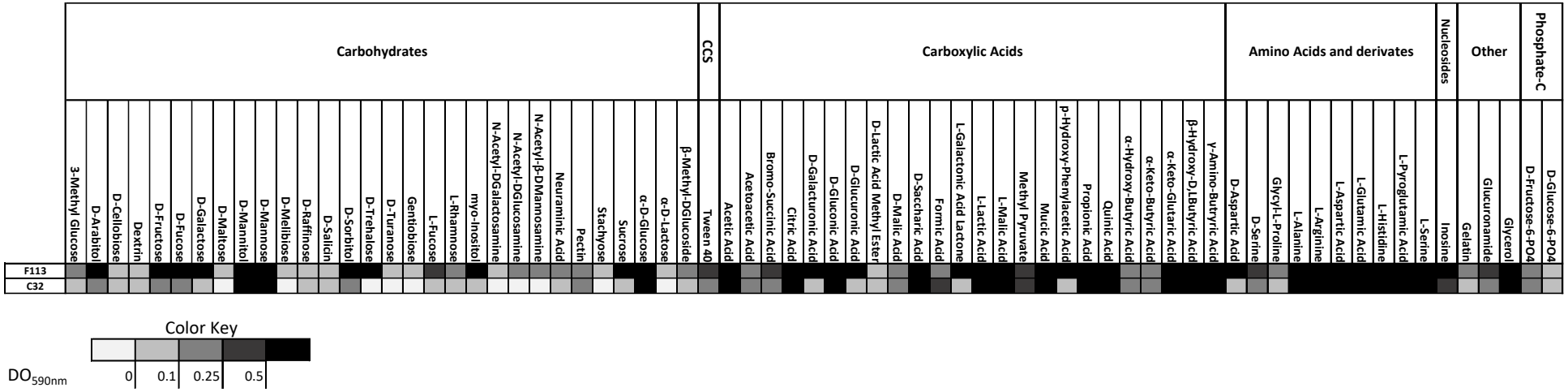


Figure S2 (Chap.4): Biochemical potential profile of the 2 tested bacteria regarding consumption of carbon substrates obtained by the Biolog GENIII system. Colour scale indicates the optical density at 590 nm, reflecting the bacterial biomass in each well of the plate, containing a sole carbon source.

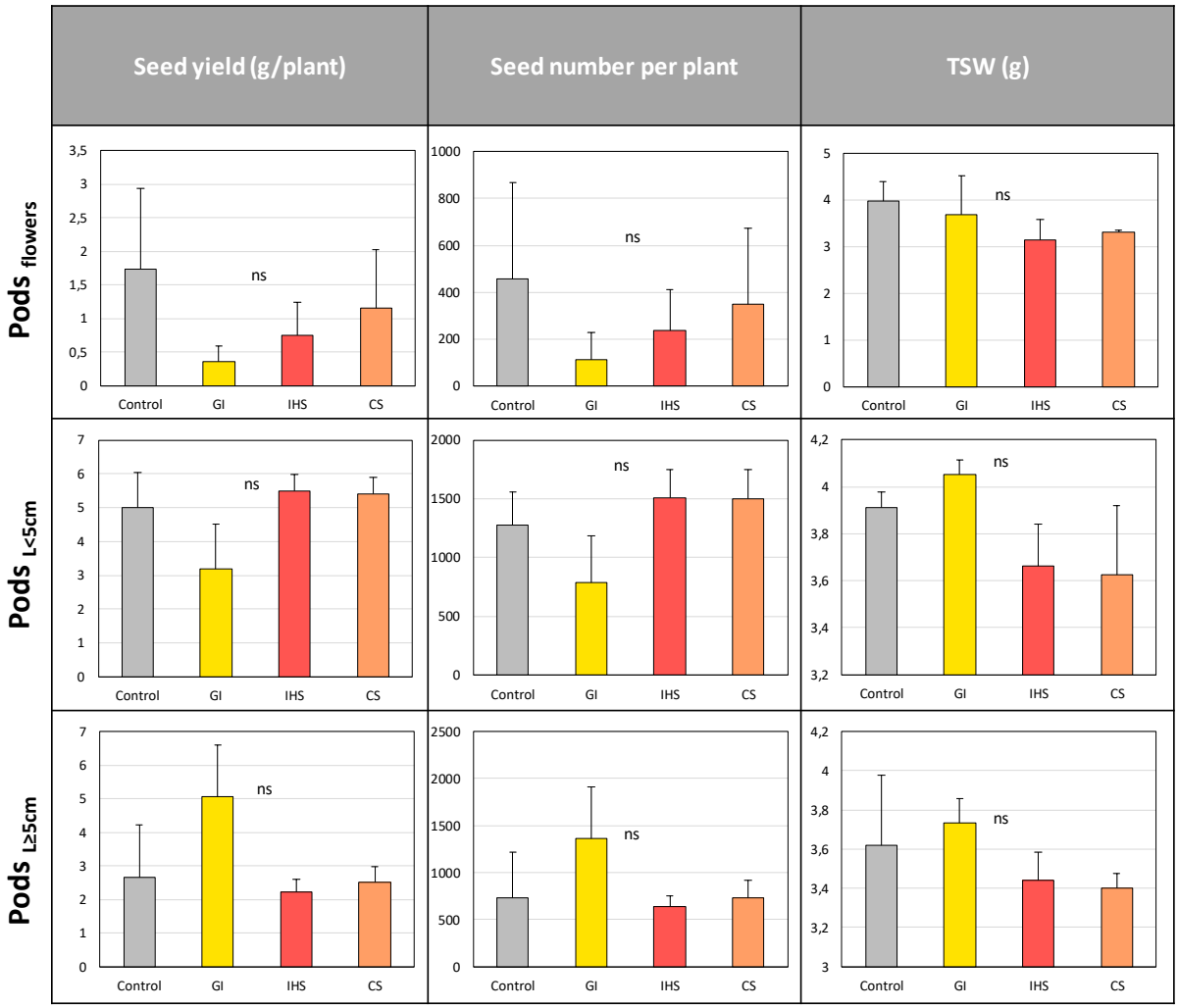


Figure S1 (Chap.6): Mean values (n=3) of the yield components variables in function of the heat modalities effect per pods cohorts in Oilseed rape. The effect of the modalities was tested with a one-way ANOVA and the letters represent the result of the Tukey test. Bars denote standard deviation. Gradual increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Thousand Seed Weight (TSW).

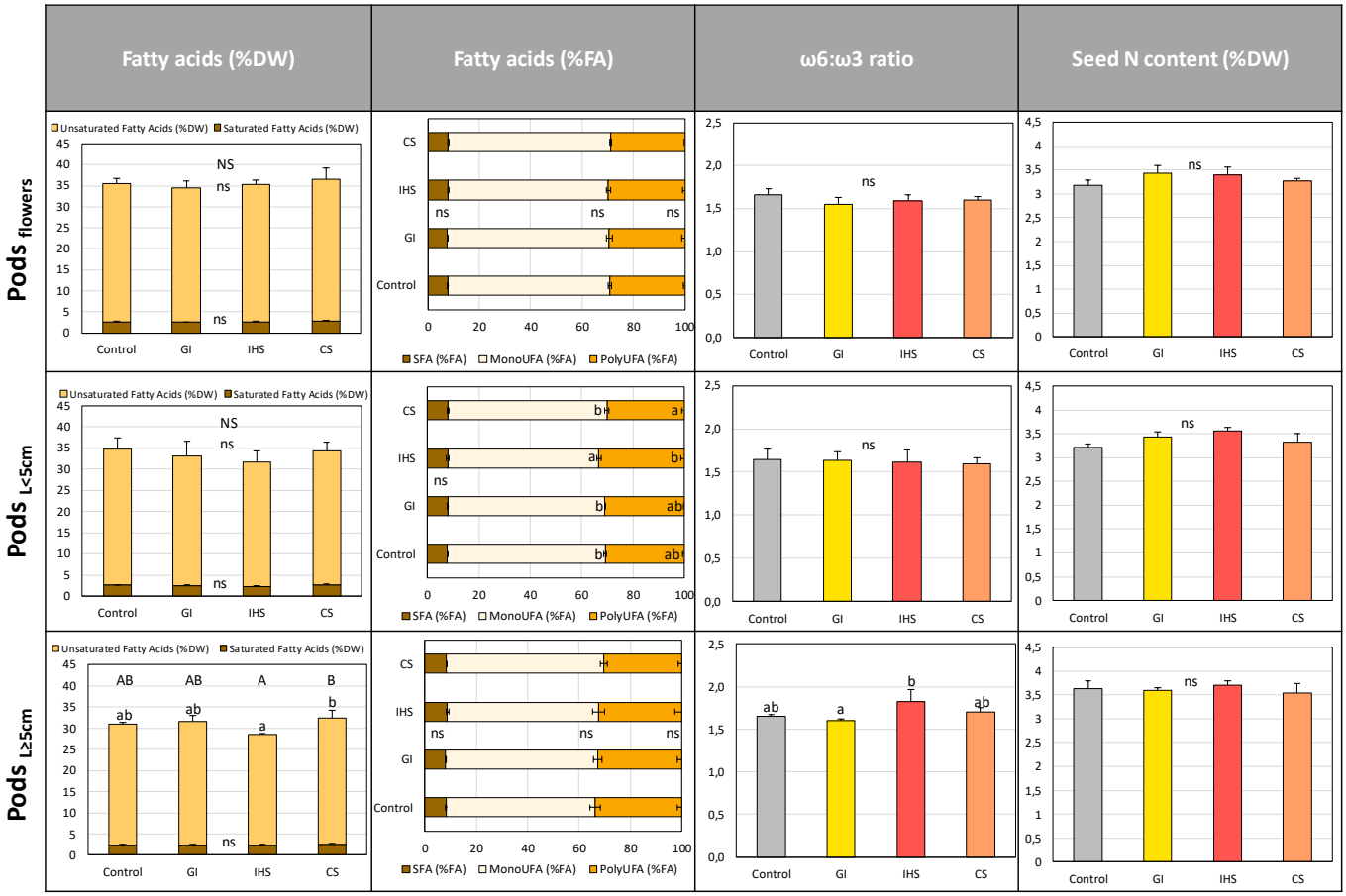


Figure S2 (Chap.6): Mean values (n=3) of the seed quality variables in function of the heat modalities effect per pods cohorts in Oilseed rape. The effect of the modalities was tested with a one-way ANOVA and the letters represent the result of the Tukey test. Bars denote standard deviation. Gradual increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), Dry Weight (DW), Fatty Acids (FA), Saturated Fatty Acids (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MonoUFA), Polyunsaturated Fatty Acids (PolyUFA).

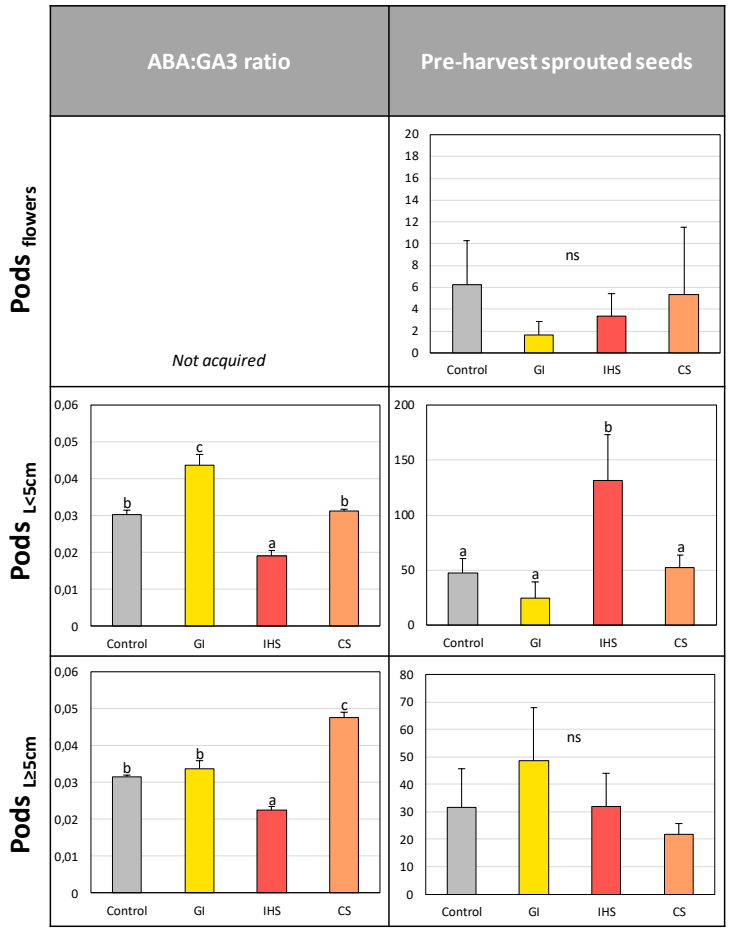


Figure S3 (Chap.6): Mean values (n=3) of the seed dormancy-related variables in function of the heat modalities effect per pods cohorts in Oilseed rape. The effect of the modalities was tested with a one-way ANOVA and the letters represent the result of the Tukey test. Bars denote standard deviation. ABA:GA3 ratio was not acquired for $pods_{flowers}$. Gradual increase (GI), Intense Heat Stress (IHS), Combined Sequence (CS), 2-cis, 4-trans-abscisic (ABA), Gibberellic acid (GA3).

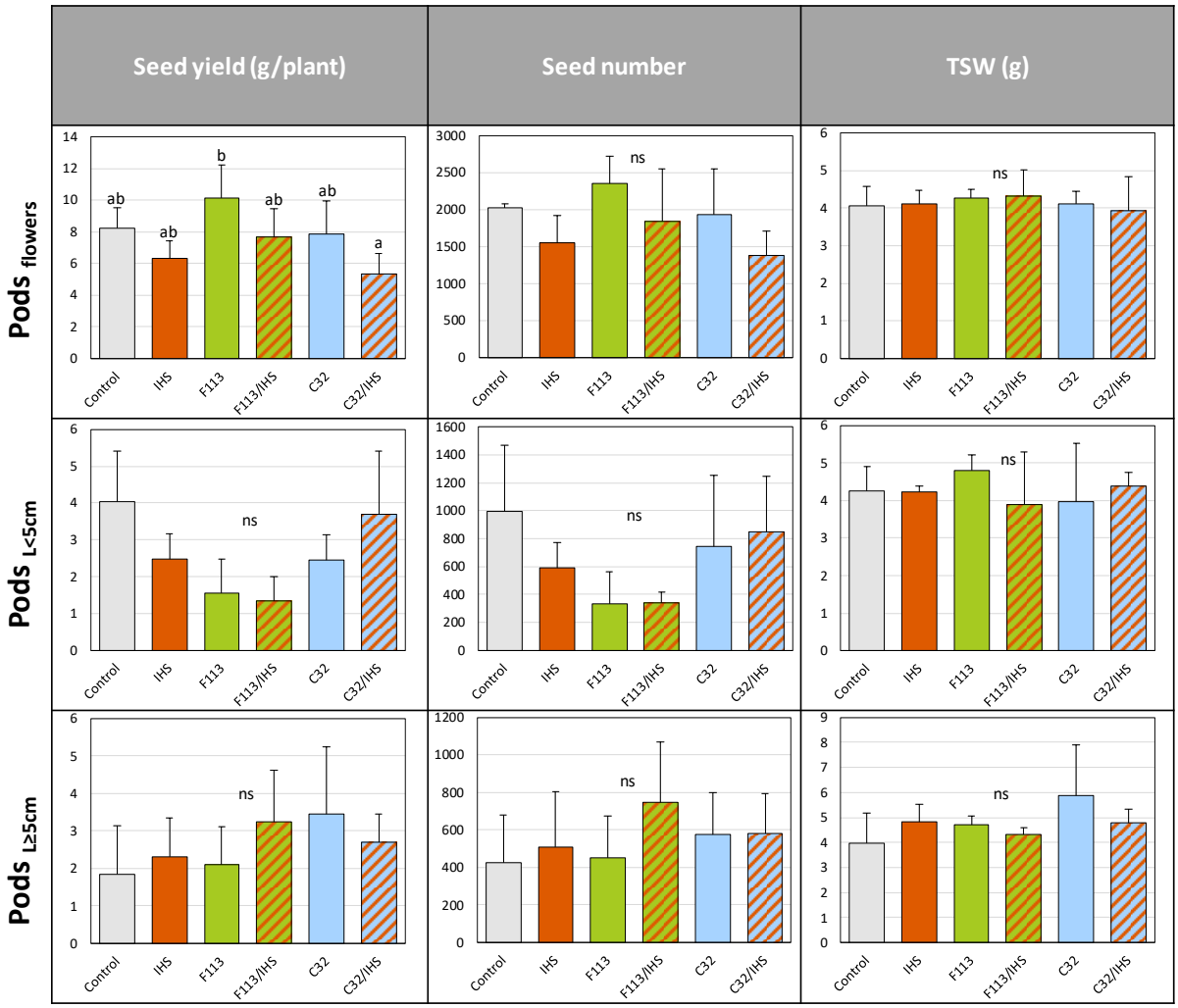


Figure S4 (Chap.6): Mean values (n=3) of the yield components variables in function of the treatment effect per pods cohorts in Oilseed rape. The effect of the modalities was tested with a two-way ANOVA and the letters represent the result of the Tukey test. Bars denote standard deviation. Intense Heat Stress (IHS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32), Thousand Seed Weight (TSW).

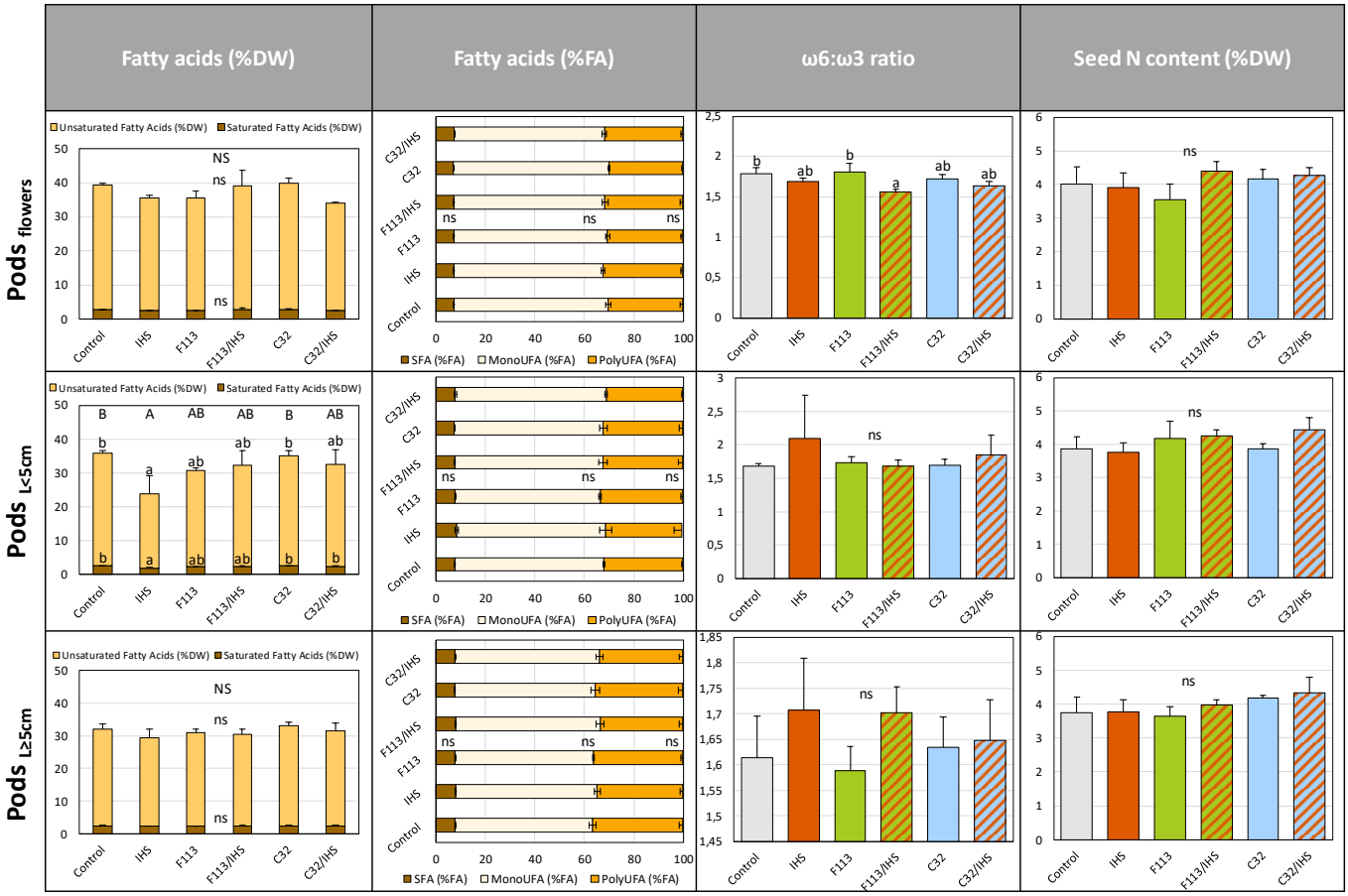


Figure S5 (Chap.6): Mean values (n=3) of the seed quality variables in function of the treatment effect per pods cohorts in Oilseed rape. The effect of the modalities was tested with a two-way ANOVA and the letters represent the result of the Tukey test. Bars denote standard deviation. Intense Heat Stress (IHS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32), Dry Weight (DW), Fatty Acids (FA), Saturated Fatty Acids (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MonoUFA), Polyunsaturated Fatty Acids (PolyUFA).

.

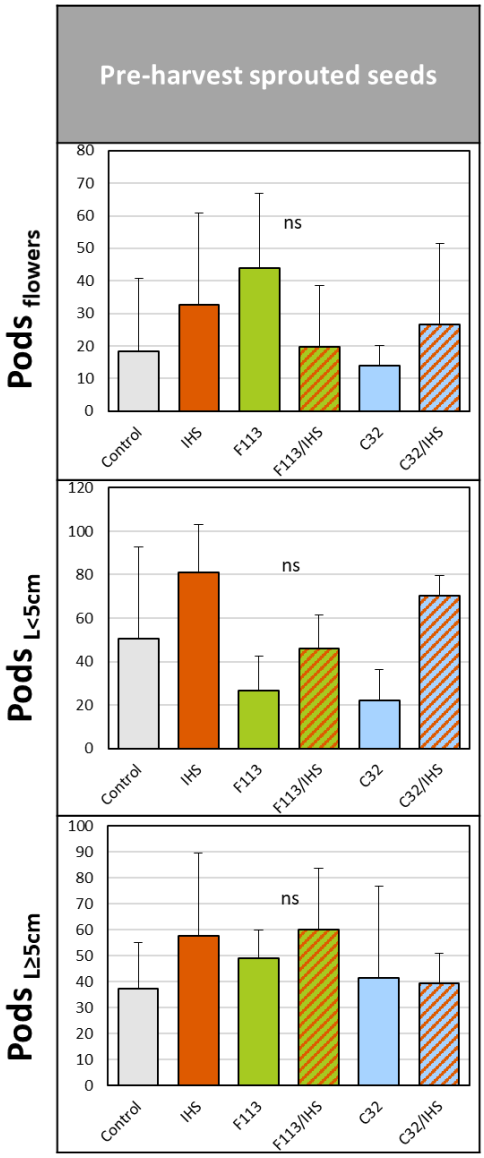


Figure S6 (Chap.6): Mean values (n=3) of the seed dormancy-related variables in function of the treatment effect per pods cohorts in Oilseed rape. The effect of the modalities was tested with a two-way ANOVA and the letters represent the result of the Tukey test. Bars denote standard deviation. Intense Heat Stress (IHS), Inoculation with *Pseudomonas* F113 (F113), Inoculation with *Pseudomonas* C32 (C32). For the PGPR priming experiment, the concentration of phytohormones could not be acquired for technical issues.

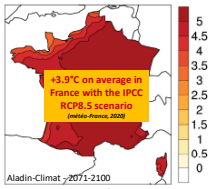
Annexe 5 : Poster présenté lors du European Society for Agronomy Congress (ESA)

Impacts of heat stress and thermo-priming on seed yield and quality and on root exudation

Jérémy Delamare[1], Sophie Brunel-Muguet[1], Stéphane Firmin[2], Olivier Cantat[3], Marina Le Guédard[4,5], Emmanuelle Personeni[1]

[1]EVA, University of Caen-Normandy, UMR INRAE–UNICAEN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N.C.S., Caen, France
[2]AGHYLE (SFR Condorcet FR CNRS 3417), UniLaSalle, Beauvais, France
[3]LETG, University of Caen-Normandy, CNRS, UMR 6554 Littoral - Environnement - Télédétection – Géomatique, Caen, France
[4]LEB Aquitaine Transfert – ADERA, Villenave d'Ornon, France
[5] LBM, University of Bordeaux, CNRS, UMR 5200 Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Villenave d'Ornon, France

Context & Objectives

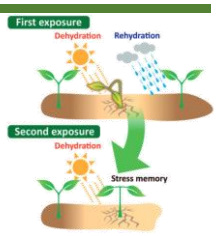


Rapports de la Direction générale de l'Énergie et du Climat. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie (Aout 2014)

High temperatures are one of the most deleterious abiotic stresses on yield and seed quality in oilseed crops such as rapeseed (Brunel-Muguet *et al.* 2015) and camelina (Carmo-Silva & Salvucci, 2012). High temperatures also lead to altered root development and exudation in **rapeseed** and **camelina** . In the perspective of providing strategies to help crops facing more frequent heat waves, the application of a gradual temperature increase prior to an intense heat stress event at the onset of seed filling was investigated as a thermo-priming protocol to maintain crop performances i.e. yield components and seed quality, and the root system functioning in terms of prospection (root growth and development) and exudation.

Obj 1 : Do **heat stress** affect yield and **seed quality** in **rapeseed** and **camelina?**
Does **thermo-priming** alleviate negative impacts on these variables?

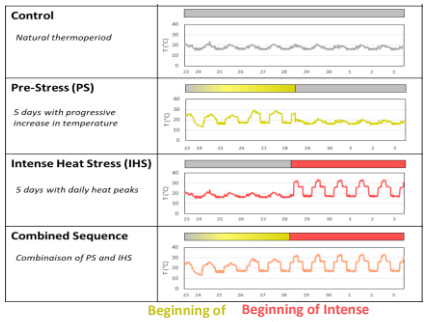
Obj 2 : Do **heat stress** affect **root morphology and root exudation**?
Does **thermo-priming** alleviate negative impacts on these variables?

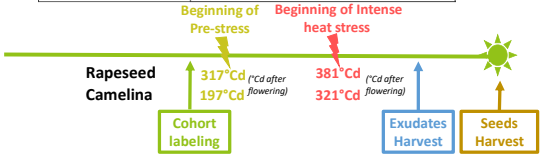


Kinoshita & Seki, 2014

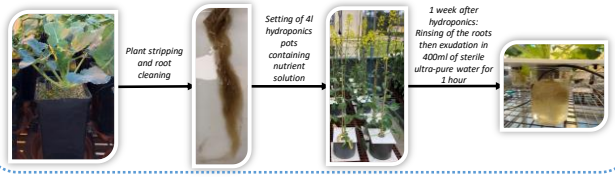
Methodology

Heat Stress Modalities

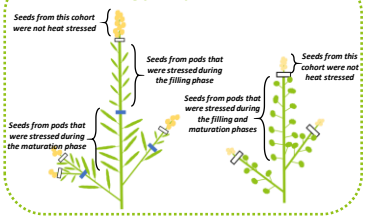




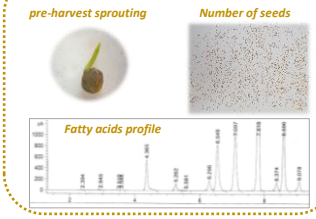
Quantification of exudates : C, N and organic acids



Cohort labeling for rapeseed and camelina

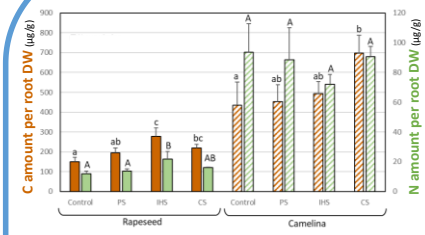


Seed Harvest : Analysis per seed cohort



Results

Impacts on root exudation

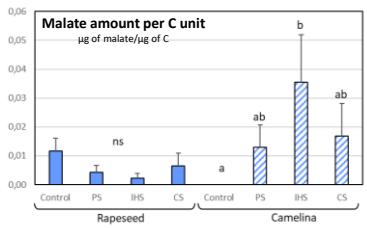


Rapeseed :
- IHS ↗ C and N exudation
- PS tended to limit the effects of IHS -> Priming effect

Camelina :
- CS ↗ C exsudation

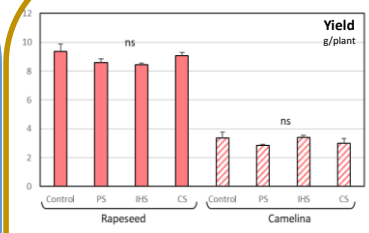
Rapeseed :
- IHS tended to ↘ malate exudation

Camelina :
- IHS ↗ significantly malate exudation



Letters indicate significantly different modalities

Impacts on yield and seed quality

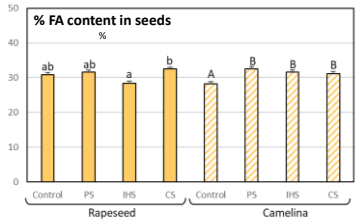


Rapeseed :
- No effect on yield

Camelina :
- No effect on yield

Rapeseed :
- IHS ↘ FA content
- CS ↗ FA content and limit IHS impact

Camelina :
- All heat modalities ↗ FA content



Letters indicate significantly different modalities

Seeds from pods that were stressed during the maturation phase

Seeds from pods that were stressed during the filling and maturation phases

Conclusion

➢ Rapeseed and camelina have **two different strategies** to respond to heat stress :

- **C and N exudation** are **increased upon stress in rapeseed** but **not in camelina**. In **rapeseed**, the **pre-stress tends to alleviate the negative impact of the intense heat stress** on both C and N exudation. However, in **camelina**, the **combined sequence** (ie. the longest duration of stress) leads to **increase the C exudation**.
- **Organic acids exudation** (like malate) **is not increased upon stress in rapeseed, whereas, it is in camelina.**

➢ **Malate** is a organic acid particularly **used by plants to recruit beneficial microorganisms** like **PGPR** (Huang *et al.*, 2014). Thus **camelina** might be **more efficient to recruit PGPR** upon **heat stress**.

➢ The effects of our **temperature modalities on seed quality are different between camelina and rapeseed**

➢ **In rapeseed**, heat modalities have no effect on yield. Moreover, **IHS** leads to **decrease FA content.** However, when a **Pre-Stress** is **applied before the IHS**, the **FA content increases**.

➢ **In camelina, all of heat modalities increase the FA content,** but **no effect on yield** was observed.

References

Brunel-Muguet S., D'Hooghe P., Bataillé M.-P., Larré C., Kim T.-H.,Trouverie J., … Dürr C. (2015). Heat stress during seed filling interferes with sulfur restriction on grain composition and seed germination in oilseed rape (Brassica napus L.). Front. Plant Sci. 6:213.
Huang X.F., Chaparro J.M., Reardon K.F., Zhang R., Shen Q., Vivanco J.M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. Botany 92: 267–275
Kinoshita T. & Seki M. (2014). Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in Plants. Plant Cell Physiol. 55(11): 1859–1863
Carmo-Silva A.E. & Salvucci M.E. (2012). The temperature response of CO2 assimilation, photochemical activities and Rubisco activation in Camelina sativa, a potential bioenergy crop with limited capacity for acclimation to heat stress. Planta 236:1433–1445

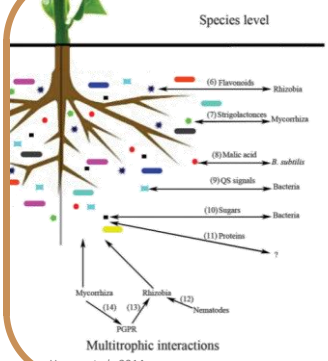
Annexe 6 : Poster présenté lors des journées de l'école doctorale EDnBISE

Heat stress on the plant-bacteria interactions: effects on root morphology and exudation in two Brassicaceae species

Jérémy Delamare[1], Sophie Brunel-Muguet[1], Mélanie Bressan[2], Stéphane Firmin[2], Fanny Leroy[3], Annette Morvan-Bertrand[1], Claire Prigent-Combaret[4], Emmanuelle Personeni[1]

[1]EVA, University of Caen-Normandy, UMR INRAE–UNICAEN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N.C.S., Caen, France
[2]AGHYLE, UniLaSalle, Mont Saint-Aignan, Beauvais, France
[3]Normandy University, UNICAEN, PLATIN', Esplanade de la Paix, Caen, France
[4]LEM, Centre National de la Recherche Scientifique, University Claude Bernard Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne Lyon, France

Context & Objectives



Huang *et al.*, 2014

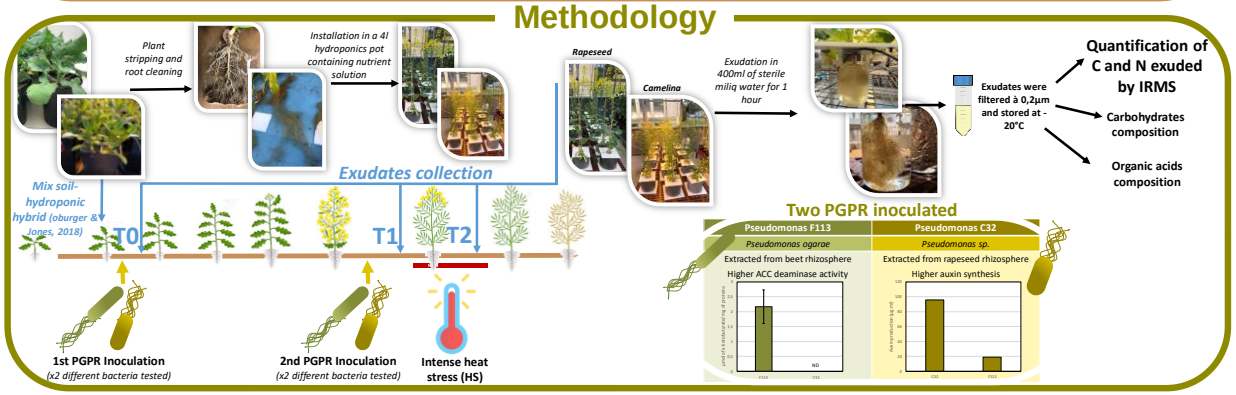
Root exudation (passive and controlled **diffusion of organic compounds into the rhizosphere**) can be used by the plants to **improve resources acquisition** (i) directly by the solubilization of some complexed forms in soil to improve nutrients uptake and (ii) indirectly by the **recruitment of microorganisms** such as **Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)** which might improve their development (Nguyen, 2003; Huang et al., 2014). This ability to interact with PGPR is particularly crucial in **Brassicaceae species**, such as **rapeseed and camelina**, as their interactions with non-symbiotic rhizobacteria are largely involved in their **root strategies for the resources acquisition** (Wen *et al.*, 2022).

PGPR inoculation can alleviate the negative effects of abiotic stresses on plants such as **heat stress** (Meena *et al.* 2017) via various microbial activities (ACC deaminase, Auxin synthesis, …). However, the **root exudation** are particularly **impacted by heat stress** and could cause an **alteration of plant-bacteria relationships** as a consequence of the stress-induced modifications of the amount and the composition of the root exudates.

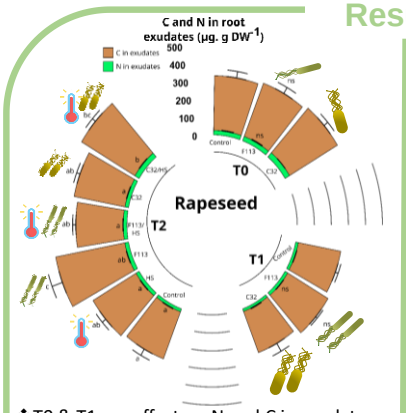
Obj 1 : Observation of the changes in plant-PGPR interaction upon heat stress via the root exudation

Obj 2 : Highlighting of the differences in exudation strategies between two contrasting Brassica species.

Methodology



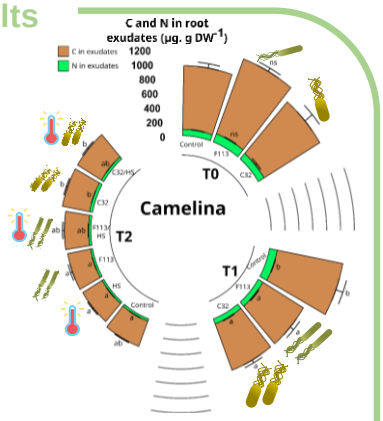
Results



❖T0 & T1: no effect on N and C in exudates.

❖T2:

- Significant ↗ exudation of C and N with C32 when exposed to HS but not with C32 alone.
- Significant ↗ exudation of C with F113 alone but not when exposed to HS (F113/HS) (trend for N).



❖T0: no effect on exuded N and C.

❖T1: ↘ C and N with F113 and C32 (not exposed to stress).

❖T2:

- C32 and C32/HS ↗ exuded N (trend for C).
- No effect with F113

Conclusion

Obj 1 :

In **rapeseed**, concentration of **C in** root **exudates increase** with the addition of **F113**, but **not with C32**. However, upon a **heat stress** exposure, we observed the **opposite trends** ie. with **F113 no modification** of C and N in root exudation and with **C32 increase** in. These results in rapeseed show that a **heat stress** can **modulate the plant-bacteria interactions**.

In **camelina**, the **C and N** in root **exudates decrease with** the second inoculation of both **C32** and **F113**. These results show that the **C and N exuded** by camelina can be **assimilated by these two PGPR** at this stage which suggests that the plants can **interact** with **these PGPR**. At **T2** an opposed effect of PGPR was observed because the **reproductive stage** has already started, thus making the plants **less reliant** on the **interactions with the PGPR**.

Obj 2 :

Rapeseed is likely to **endure the interaction** with **these PGPR.** They will act as an **additional sink** at the detriment of the aerial parts**.** Moreover, this **effect** are **heat stress dependent.**
On the contrary, **camelina** seems **to interact positively with these PGPR until the reproductive stage** till when they do not interact anymore with the PGPR.

Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M., (**2014**). Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities1. Botany 92, 267–275. doi: 10.1139/cjb-2013-0225
Meena KK, Sorty AM, Bitla UM, Choudhary K, Gupta P, Pareek A, Singh DP, Prabha R, Sahu PK, Gupta VK, Singh HB, Krishanani KK and Minhas PS (**2017**) Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies. Front. Plant Sci. 8:172. doi: 10.3389/fpls.2017.00172
Nguyen, C., (**2003**). rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23, 375–396. doi: 10.1051/agro
Oburger, E., **Jones**, D.L., (**2018**). Sampling root exudates – Mission impossible? Rhizosphere 6, 116–133. doi: 10.1016/j.rhisph.2018.06.004
Wen, Z., White, P.J., Shen, J., Lambers, H., (**2022**). Linking root exudation to belowground economic traits for resource acquisition. New Phytol. 233, 1620–1635. doi : 10.1111/nph.17854

Références

Références

Abd El-Daim IA, Bejai S, Meijer J (2014) Improved heat stress tolerance of wheat seedlings by bacterial seed treatment. Plant Soil 379:337–350. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2063-3

Adesemoye AO, Ugoji EO (2009) Evaluating Pseudomonas aeruginosa as plant growth-promoting rhizobacteria in West Africa. Arch Phytopathol Plant Prot 42:188–200. https://doi.org/10.1080/03235400601014791

Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. J King Saud Univ - Sci 26:1–20. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001

Ahmad M, Waraich EA, Hussain S, et al (2021a) Improving Heat Stress Tolerance in Camelina sativa and Brassica napus Through Thiourea Seed Priming. J Plant Growth Regul. https://doi.org/10.1007/s00344-021-10482-4

Ahmad M, Waraich EA, Zulfiqar U, et al (2021b) Thiourea application improves heat tolerance in camelina (Camelina sativa L. Crantz) by modulating gas exchange, antioxidant defense and osmoprotection. Ind Crops Prod 170:. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113826

Aidoo MK, Bdolach E, Fait A, et al (2016) Tolerance to high soil temperature in foxtail millet (Setaria italica L.) is related to shoot and root growth and metabolism. Plant Physiol Biochem 106:73–81. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.038

Aksouh-Harradj NM, Campbell LC, Mailer RJ (2006) Canola response to high and moderately high temperature stresses during seed maturation. Can J Plant Sci 86:967–980. https://doi.org/10.4141/P05-130

Al-Whaibi MH (2011) Plant heat-shock proteins: A mini review. J King Saud Univ - Sci 23:139–150. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022

Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. BMC Genomics 12:.

https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402

Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov V V., et al (2008) Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. Photosynth Res 98:541–550. https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0

Allen BL, Vigil MF, Jabro JD (2014) Camelina growing degree hour and base temperature requirements. Agron J 106:940–944. https://doi.org/10.2134/agronj13.0469

Allmaras RR, Burrows WC, Larson WE (1964) Early Growth of Corn as Affected by Soil Temperature. Soil Sci Soc Am J 28:271–275. https://doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800020041x

Amy C, Avice JC, Laval K, Bressan M (2022a) Are native phosphate solubilizing bacteria a relevant alternative to mineral fertilizations for crops? Part I. when rhizobacteria meet plant P requirements. Rhizosphere 21:. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100476

Amy C, Avice JC, Laval K, Bressan M (2022b) Are native phosphate-solubilizing bacteria a relevant alternative to mineral fertilizations for crops? Part II: PSB inoculation enables a halving of P input and improves the microbial community in the rapeseed rhizosphere. Rhizosphere 21:. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100480

Andrews S (2010) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Version 0.11.2. Available online http //www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

Angadi S V., Cutforth HW, Miller PR, et al (2000) Response of three brassica species to high temperature stress during reproductive growth. Can J Plant Sci 80:693–701. https://doi.org/10.4141/P99-152

Angus AA, Hirsch AM (2013) Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth. Mol Microb Ecol Rhizosph 2:701–712. https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch66

Asari S, Tarkowská D, Rolčík J, et al (2017) Analysis of plant growth-promoting properties of Bacillus amyloliquefaciens UCMB5113 using Arabidopsis thaliana as host plant. Planta

245:15–30. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9

Asmar F, Eiland F, Nielsen NE (1994) Effect of extracellular-enzyme activities on solubilization rate of soil organic nitrogen. Biol Fertil Soils 17:32–38. https://doi.org/10.1007/BF00418669

Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, et al (2003) Chemical characterization of root exudates from rice (Oryza sativa) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. Plant Soil 249:271–277. https://doi.org/10.1023/A:1022888900465

Bador M, Terray L, Boé J, et al (2017) Future summer mega-heatwave and record-breaking temperatures in a warmer France climate. Environ Res Lett 12:. https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa751c

Badri D V., Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. Plant, Cell Environ 32:666–681. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x

Bailly C, Audigier C, Ladonne F, et al (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. J Exp Bot 52:701–708. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701

Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol 57:233–266. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159

Bakhshandeh S, Corneo PE, Yin L, Dijkstra FA (2019) Drought and heat stress reduce yield and alter carbon rhizodeposition of different wheat genotypes. J Agron Crop Sci 205:157–167. https://doi.org/10.1111/jac.12314

Balazadeh S (2022) A ‘hot’ cocktail: The multiple layers of thermomemory in plants. Curr Opin Plant Biol 65:102147. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102147

Bañon S, Fernandez JA, Franco JA, et al (2004) Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of Lotus

creticus plants. Sci Hortic (Amsterdam) 101:333–342. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.007

Bardgett RD, Hobbs PJ, Jones TH, et al (1998) The response of soil microorganisms and roots to elevated CO2 and temperature in a terrestrial model ecosystem. Plant Soil 202:251–262

Barnabás B, Jäger K, Fehér A (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. Plant, Cell Environ 31:11–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x

Batts GR, Ellis RH, Morison JIL, et al (1998) Yield and partitioning in crops of contrasting cultivars of winter wheat in response to CO2 and temperature in field studies using temperature gradient tunnels. J Agric Sci 130:17–27. https://doi.org/10.1017/S0021859697005017

Baux A, Colbach N, Allirand JM, et al (2013) Insights into temperature effects on the fatty acid composition of oilseed rape varieties. Eur J Agron 49:12–19. https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.03.001

Baux A, Hebeisen T, Pellet D (2008) Effects of minimal temperatures on low-linolenic rapeseed oil fatty-acid composition. Eur J Agron 29:102–107. https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.04.005

Beauvais F (2016) Changement climatique et agriculture : Quelles vulnérabilités et représentations d ’ un élément de forçage des agrosystèmes ? L ’ exemple de la Plaine de Caen dans ses dimensions écologiques et anthropiques. 254

Bergkamp B, Impa SM, Asebedo AR, et al (2018) Prominent winter wheat varieties response to post-flowering heat stress under controlled chambers and field based heat tents. F Crop Res 222:143–152. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.03.009

Bergmann J, Weigelt A, Van Der Plas F, et al (2020) The fungal collaboration gradient dominates the root economics space in plants. Sci Adv 6:1–10. https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3756

Bertin C, Yang X, Weston LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil 256:67–83. https://doi.org/10.1023/A:1026290508166

Besset-Manzoni Y, Joly P, Brutel A, et al (2019) Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against Fusarium seedling blight by soil bacteria. PLoS One 14:1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225655

Bijlsma R, Loeschcke V (2012) Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. Evol Appl 5:117–129. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00214.x

Billah M, Khan M, Bano A, et al (2019) Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. Geomicrobiol J 36:904–916. https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043

Blagodatskaya E, Littschwager J, Lauerer M, Kuzyakov Y (2010) Growth rates of rhizosphere microorganisms depend on competitive abilities of plants and N supply. Plant Biosyst 144:408–413. https://doi.org/10.1080/11263501003718596

Blanco-Romero E, Durán D, Garrido-Sanz D, et al (2022) Transcriptomic analysis of Pseudomonas ogarae F113 reveals the antagonistic roles of AmrZ and FleQ during rhizosphere adaption. Microb Genomics 8:1–15. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000750

Boeuf-Trnemblay V, Plantureux S, Guckert A (1995) Influence of mechanical impedance on root exudation of maize seedlings at two development stages. Int J Mass Spectrom Ion Process 172:279–287

Bokszczanin KL, Fragkostefanakis S (2013) Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. Front Plant Sci 4:1–20. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00315

Bongiorno G, Bünemann EK, Oguejiofor CU, et al (2019) Sensitivity of labile carbon fractions to tillage and organic matter management and their potential as comprehensive soil quality indicators across pedoclimatic conditions in Europe. Ecol Indic 99:38–50.

https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.12.008

Borneman J, Hartin RJ (2000) PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl Environ Microbiol 66:4356–4360. https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4356-4360.2000

Bouchet AS, Laperche A, Bissuel-Belaygue C, et al (2016) Nitrogen use efficiency in rapeseed. A review. Agron Sustain Dev 36:. https://doi.org/10.1007/s13593-016-0371-0

Bradford MA, Davies CA, Frey SD, et al (2008) Thermal adaptation of soil microbial respiration to elevated temperature. Ecol Lett 11:1316–1327. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01251.x

Bressan M, Roncato MA, Bellvert F, et al (2009) Exogenous glucosinolate produced by Arabidopsis thaliana has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. ISME J 3:1243–1257. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68

Brock JR, Dönmez AA, Beilstein MA, Olsen KM (2018) Phylogenetics of Camelina Crantz. (Brassicaceae) and insights on the origin of gold-of-pleasure (Camelina sativa). Mol Phylogenet Evol 127:834–842. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.031

Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA (2007) Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. Plant Sci 173:603–608. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.09.002

Brunel-Muguet S, D’Hooghe P, Bataillé MP, et al (2015) Heat stress during seed filling interferes with sulfur restriction on grain composition and seed germination in oilseed rape (Brassica napus L.). Front Plant Sci 6:1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00213

Bushnell B (2014) BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner (Report No.: LBNL-7065E). In: 9th Annual Genomics of Energy & Environment Meeting, Walnut Creek, CA, March 17-20. Berkeley, CA (United States), pp 1–2

Calabrese S, Mohanty BP, Malik AA (2022) Soil microorganisms regulate extracellular enzyme production to maximize their growth rate. Biogeochemistry 158:303–312.

https://doi.org/10.1007/s10533-022-00899-8

Calleja-Cabrera J, Boter M, Oñate-Sánchez L, Pernas M (2020) Root Growth Adaptation to Climate Change in Crops. Front Plant Sci 11:. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00544

Canarini A, Merchant A, Dijkstra FA (2016) Drought effects on Helianthus annuus and Glycine max metabolites: from phloem to root exudates. Rhizosphere 2:85–97. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.06.003

Cantarel AAM, Allard V, Andrieu B, et al (2021) Plant functional trait variability and trait syndromes among wheat varieties: The footprint of artificial selection. J Exp Bot 72:1166–1180. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa491

Cantarel AAM, Pommier T, Desclos-Theveniau M, et al (2015) Using plant traits to explain plant-microbe relationships involved in nitrogen acquisition. Ecology 96:788–799. https://doi.org/10.1890/13-2107.1

Chagas FO, Pessotti RDC, Caraballo-Rodríguez AM, Pupo MT (2018) Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. Chem Soc Rev 47:1652–1704. https://doi.org/10.1039/c7cs00343a

Chai YN, Schachtman DP (2022) Root exudates impact plant performance under abiotic stress. Trends Plant Sci 27:80–91. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.003

Chandra D, Srivastava R, Glick BR, Sharma AK (2018) Drought-Tolerant Pseudomonas spp. Improve the Growth Performance of Finger Millet (Eleusine coracana (L.) Gaertn.) Under Non-Stressed and Drought-Stressed Conditions. Pedosphere 28:227–240. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60013-X

Chaparro JM, Badri D V., Bakker MG, et al (2013) Root Exudation of Phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. PLoS One 8:1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055731

Charng YY, Mitra S, Yu SJ (2023) Maintenance of abiotic stress memory in plants: Lessons learned from heat acclimation. Plant Cell 35:187–200.

https://doi.org/10.1093/plcell/koac313

Chen C, Jackson G, Neill K, et al (2005) Determining the feasibility of early seeding canola in the northern Great Plains. Agron J 97:1252–1262. https://doi.org/10.2134/agronj2005.0004

Cheng W, Coleman DC (1990) Effect of living roots on soil organic matter decomposition. Soil Biol Biochem 22:781–787. https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90157-U

Chet I, Zilberstein Y, Henis Y (1973) Chemotaxis of Pseudomonas lachrymans to plant extracts and to water droplets collected from the leaf surfaces of resistant and susceptible plants. Physiol Plant Pathol 3:473–479. https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90057-X

Chhabra ML, Dhawan A, Sangwan N, et al (2009) Phytohormones induced amelioration of high temperature stress in Brassica juncea. Proc 16th Aust Res Assem Brassicas 9–11

Choi J, Roy Choudhury A, Walitang DI, et al (2022) ACC deaminase-producing Brevibacterium linens RS16 enhances heat-stress tolerance of rice (Oryza sativa L.). Physiol Plant 174:1–10. https://doi.org/10.1111/ppl.13584

Chun J, Oren A, Ventosa A, et al (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 68:461–466. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516

Classen AT, Sundqvist MK, Henning JA, et al (2015) Direct and indirect effects of climate change on soil microbial and soil microbial-plant interactions: What lies ahead? Ecosphere 6:. https://doi.org/10.1890/ES15-00217.1

Compant S, Van Der Heijden MGA, Sessitsch A (2010) Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. FEMS Microbiol Ecol 73:197–214. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x

Conrath U, Beckers GJM, Flors V, et al (2006) Priming: Getting ready for battle. Mol Plant-Microbe Interact 19:1062–1071. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062

Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR (2015) Priming for Enhanced Defense. Annu Rev Phytopathol 53:97–119. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132

Cosme M, Fernández I, Van der Heijden MGA, Pieterse CMJ (2018) Non-Mycorrhizal Plants: The Exceptions that Prove the Rule. Trends Plant Sci 23:577–587. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.004

Crafts-Brandner SJ, Law RD (2000) Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. Planta 212:67–74. https://doi.org/10.1007/s004250000364

Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, et al (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Sci Adv 2:. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340

Darwent MJ, Paterson E, McDonald AJS, Tomos AD (2003) Biosensor reporting of root exudation from Hordeum vulgare in relation to shoot nitrate concentration. J Exp Bot 54:325–334. https://doi.org/10.1093/jxb/erg017

Debeaujon I, Koornneef M (2000) Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. Plant Physiol 122:415–424. https://doi.org/10.1104/pp.122.2.415

Dedourge O, Vong PC, Lasserre-Joulin F, et al (2004) Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-35S, microbial biomass-35S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. Eur J Soil Sci 55:649–656. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2004.00645.x

Delamare J, Brunel-Muguet S, Boukerb AM, et al (2023b) Impact of PGPR inoculation on root morphological traits and root exudation in rapeseed and camelina: interactions with heat stress. Physiol Plant (article accepté le 11 octobre 2023)

Delamare J, Brunel-Muguet S, Morvan-Bertrand A, et al (2023a) Thermopriming effects on root morphological traits and root exudation during the reproductive phase in two

species with contrasting strategies: Brassica napus (L.) and Camelina sativa (L.) Crantz. Environ Exp Bot 210:. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105318

Delarue F, Gogo S, Buttler A, et al (2014) Indirect effects of experimental warming on dissolved organic carbon content in subsurface peat. J Soils Sediments 14:1800–1805. https://doi.org/10.1007/s11368-014-0945-x

Deng X, Scarth R (1998) Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (Brassica napus L.). JAOCS, J Am Oil Chem Soc 75:759–766. https://doi.org/10.1007/s11746-998-0223-4

Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? FEMS Microbiol Ecol 72:313–327. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x

Dharavath RN, Singh S, Chaturvedi S, Luqman S (2016) Camelina sativa (L.) Crantz A mercantile crop with speckled pharmacological activities. Ann Phytomedicine An Int J 5:6–26. https://doi.org/10.21276/ap.2016.5.2.2

Diepenbrock W (2000) Yield analysis of winter oilseed rape (Brassica napus L.): A review. F Crop Res 67:35–49. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00082-4

Diepenbrock W, Geisler G (1979) Compositional Changes in Developing Pods and Seeds of Oilseed Rape (Brassica Napus L.) As Affected By Pod Position on the Plant. Can J Plant Sci 59:819–830. https://doi.org/10.4141/cjps79-124

Dietz S, Herz K, Döll S, et al (2019) Semi-polar root exudates in natural grassland communities. Ecol Evol 9:5526–5541. https://doi.org/10.1002/ece3.5043

Dikšaitytė A, Viršilė A, Žaltauskaitė J, et al (2019) Growth and photosynthetic responses in Brassica napus differ during stress and recovery periods when exposed to combined heat, drought and elevated CO2. Plant Physiol Biochem 142:59–72. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.026

Dilkes NB, Jones DL, Farrar J (2004) Temporal Dynamics of Carbon Partitioning and Rhizodeposition in Wheat. Plant Physiol 134:706–715.

https://doi.org/10.1104/pp.103.032045

Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell Environ 32:1682–1694. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x

Ding W, Song L, Wang X, Bi Y (2010) Effect of abscisic acid on heat stress tolerance in the calli from two ecotypes of Phragmites communis. Biol Plant 54:607–613. https://doi.org/10.1007/s10535-010-0110-3

Ding Y, Fromm M, Avramova Z (2012) Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. Nat Commun 3:. https://doi.org/10.1038/ncomms1732

Dini-Andreote F, van Elsas JD (2013) Back to the basics: The need for ecophysiological insights to enhance our understanding of microbial behaviour in the rhizosphere. Plant Soil 373:1–15. https://doi.org/10.1007/s11104-013-1687-z

Dowen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, et al (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. Proc Natl Acad Sci U S A 109:. https://doi.org/10.1073/pnas.1209329109

Du YC, Tachibana S (1994) Effect of supraoptimal root temperature on the growth, root respiration and sugar content of cucumber plants. Sci Hortic (Amsterdam) 58:289–301. https://doi.org/10.1016/0304-4238(94)90099-X

Dubousset L, Etienne P, Avice JC (2010) Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? J Exp Bot 61:4313–4324. https://doi.org/10.1093/jxb/erq233

Dürr C, Brunel-Muguet S, Girousse C, et al (2018) Changes in seed composition and germination of wheat (Triticum aestivum) and pea (Pisum sativum) when exposed to high temperatures during grain filling and maturation. Crop Pasture Sci 69:374–386. https://doi.org/10.1071/CP17397

Dutta S, Mohanty S, Tripathy BC (2009) Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in pea1[OA]. Plant Physiol 150:1050–1061.

https://doi.org/10.1104/pp.109.137265

Egamberdiyeva D, Höflich G (2003) Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. Soil Biol Biochem 35:973–978. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00158-5

Eisenhauer N, Lanoue A, Strecker T, et al (2017) Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. Sci Rep 7:1–8. https://doi.org/10.1038/srep44641

Escolà Casas M, Matamoros V (2021) Analytical challenges and solutions for performing metabolomic analysis of root exudates. Trends Environ Anal Chem 31:. https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00130

Esquinas-Alcázar J (2005) Protecting crop genetic diversity for food security: Political, ethical and technical challenges. Nat Rev Genet 6:946–953. https://doi.org/10.1038/nrg1729

Essemine J, Ammar S, Bouzid S (2010) Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: Physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defence. J Biol Sci 10:565–572. https://doi.org/10.3923/jbs.2010.565.572

Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, et al (2017) Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. Front Plant Sci 8:1–16. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147

Farrar J, Hawes M, Jones D, Lindow S (2003) How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. Ecology 84:827–837. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[0827:HRCTFO]2.0.CO;2

Fernández-Pascual E, Mattana E, Pritchard HW (2019) Seeds of future past: climate change and the thermal memory of plant reproductive traits. Biol Rev 94:439–456. https://doi.org/10.1111/brv.12461

Ferris R, Ellis RH, Wheeler TR, Hadley P (1998) E ffect of High Temperature Stress at Anthesis on Grain Yield and Biomass of Field-grown Crops of Wheat. Ann Bot 82:631–639

Finkelstein R (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. Arab B 11:e0166. https://doi.org/10.1199/tab.0166

Fischer EM, Schär C (2010) Consistent geographical patterns of changes in high-impact European heatwaves. Nat Geosci 3:398–403. https://doi.org/10.1038/ngeo866

Fischer H, Ingwersen J, Kuzyakov Y (2010) Microbial uptake of low-molecular-weight organic substances out-competes sorption in soil. Eur J Soil Sci 61:504–513. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01244.x

Fischer H, Meyer A, Fischer K, Kuzyakov Y (2007) Carbohydrate and amino acid composition of dissolved organic matter leached from soil. Soil Biol Biochem 39:2926–2935. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.014

Florio A, Pommier T, Gervaix J, et al (2017) Soil C and N statuses determine the effect of maize inoculation by plant growth-promoting rhizobacteria on nitrifying and denitrifying communities. Sci Rep 7:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08589-4

FranceAgriMer (2017) Chiffres-clés 2016/17 de FranceAgriMer / Prévisions 2017/18 en Normandie

Freschet GT, Pagès L, Iversen CM, et al (2021) A starting guide to root ecology: strengthening ecological concepts and standardising root classification, sampling, processing and trait measurements. New Phytol 232:973–1122. https://doi.org/10.1111/nph.17572

Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM (2008) Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle. Plant Physiol 146:818–824. https://doi.org/10.1104/pp.107.113027

Gangneux C, Akpa-Vinceslas M, Sauvage H, et al (2011) Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon. Soil Biol Biochem 43:431–437. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.012

Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD (2003) Production of substances by Medicago truncatula that affect bacterial quorum sensing. Mol Plant-Microbe Interact 16:827–

834. https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.9.827

Gao Z, Feng HY, Liang XG, et al (2021) Adjusting the sowing date of spring maize did not mitigate against heat stress in the North China Plain. Agric For Meteorol 298–299:108274. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108274

Giraudoux P (2015) Package “pgirmess”: Data Analysis in Ecology - R package version 1.6.2. 1–64

Giri A, Heckathorn S, Mishra S, Krause C (2017) Heat stress decreases levels of nutrient-uptake and -assimilation proteins in tomato roots. Plants 6:443–448. https://doi.org/10.3390/plants6010006

Gkarmiri K, Mahmood S, Ekblad A, et al (2017) Identifying the active microbiome associated with roots and rhizosphere soil of oilseed rape. Appl Environ Microbiol 83:1–14. https://doi.org/10.1128/AEM.01938-17

Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiol Res 169:30–39. https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009

Gonzalez P, Neilson RP, Lenihan JM, Drapek RJ (2010) Global patterns in the vulnerability of ecosystems to vegetation shifts due to climate change. Glob Ecol Biogeogr 19:755–768. https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00558.x

Goswami M, Deka S (2020) Plant growth-promoting rhizobacteria—alleviators of abiotic stresses in soil: A review. Pedosphere 30:40–61. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60839-8

Grami B, Stefansson BR, Baker RJ (1977) Genetics of Protein and Oil Content in Summer Rape: Heritability, Number of Effective Factors, and Correlations. Can J Plant Sci 57:937–943. https://doi.org/10.4141/cjps77-134

Griffin JJ, Ranney TG, Pharr DM (2004) Heat and drought influence photosynthesis, water relations, and soluble carbohydrates of two ecotypes of redbud (Cercis canadensis). J Am Soc Hortic Sci 129:497–502. https://doi.org/10.21273/jashs.129.4.0497

Griffiths BS, Bonkowski M, Roy J, Ritz K (2001) Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. Appl Soil Ecol 16:49–61. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00081-0

Grobelak A, Napora A, Kacprzak M (2015) Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. Ecol Eng 84:22–28. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.019

Groleau-Renaud V, Plantureux S, Guckert A (1998) Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. Plant Soil 201:231–239. https://doi.org/10.1023/A:1004316416034

Groot MP, Kooke R, Knoben N, et al (2016) Effects of Multi-Generational Stress Exposure and Offspring Environment on the Expression and Persistence of Transgenerational Effects in Arabidopsis thaliana full name: Netherlands Organization for International Cooperation in Higher Education, author: K. PLoS One 11:1–16. https://doi.org/10.5061/dryad.26031

Grover M, Ali SZ, Sandhya V, et al (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. World J Microbiol Biotechnol 27:1231–1240. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7

Gruet C, Alaoui M, Gerin F, et al (2023) Genomic content of wheat has a higher influence than plant domestication status on the ability to interact with Pseudomonas plant growth - promoting rhizobacteria. Plant Cell Environ 1–16. https://doi.org/10.1111/pce.14698

Guedira M, Paulsen GM (2002) Accumulation of starch in wheat grain under different shoot/root temperatures during maturation. Funct Plant Biol 29:495–503. https://doi.org/10.1071/PP01006

Guerra D, Crosatti C, Khoshro HH, et al (2015) Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: A spider's web of mechanisms. Front Plant Sci 6:1–14. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00057

Guilioni L, Wery J, Tardieu F (1997) Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: Is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs? Ann Bot 80:159–168. https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0425

Guyonnet JP, Cantarel AAM, Simon L, Haichar FZ (2018) Root exudation rate as functional trait involved in plant nutrient-use strategy classification. Int J Bus Innov Res 17:8573–8581. https://doi.org/10.1002/ece3.4383

Guyonnet JP, Vautrin F, Meiffren G, et al (2017) The effects of plant nutritional strategy on soil microbial denitrification activity through rhizosphere primary metabolites. FEMS Microbiol Ecol 93:1–11. https://doi.org/10.1093/femsec/fix022

Hagedorn F, Martin M, Rixen C, et al (2010) Short-term responses of ecosystem carbon fluxes to experimental soil warming at the Swiss alpine treeline. Biogeochemistry 97:7–19. https://doi.org/10.1007/s10533-009-9297-9

Häggquist M, Svenningsson H, Olsson S, et al (1984) Long-term culturing of plants with aseptic roots Determination of rape root exudates. Plant Cell Environ 7:549–552. https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11616234

Haichar F el Z, Santaella C, Heulin T, Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. Soil Biol Biochem 77:69–80. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017

Haichar FEZ, Marol C, Berge O, et al (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. ISME J 2:1221–1230. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80

Hammac WA, Maaz TM, Koenig RT, et al (2017) Water and Temperature Stresses Impact Canola (Brassica napus L.) Fatty Acid, Protein, and Yield over Nitrogen and Sulfur. J Agric Food Chem 65:10429–10438. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02778

Han D, Yu Z, Lai J, Yang C (2022) Post-translational modification: a strategic response to high temperature in plants. aBIOTECH 3:49–64. https://doi.org/10.1007/s42994-021-00067-w

Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. Plant Soil 321:235–257. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y

Hartmann H, Bahn M, Carbone M, Richardson AD (2020) Plant carbon allocation in a changing world – challenges and progress: introduction to a Virtual Issue on carbon allocation: Introduction to a virtual issue on carbon allocation. New Phytol 227:981–988. https://doi.org/10.1111/nph.16757

Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S (1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J Gen Appl Microbiol 29:319–322. https://doi.org/10.2323/jgam.29.319

Hatzig S V., Nuppenau JN, Snowdon RJ, Schießl S V. (2018) Drought stress has transgenerational effects on seeds and seedlings in winter oilseed rape (Brassica napus L.). BMC Plant Biol 18:1–13. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1531-y

Hawkes C V., Hartley IP, Ineson P, Fitter AH (2008) Soil temperature affects carbon allocation within arbuscular mycorrhizal networks and carbon transport from plant to fungus. Glob Chang Biol 14:1181–1190. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01535.x

Hayat R, Ali S, Amara U, et al (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. Ann Microbiol 60:579–598. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1

Heckathorn SA, Giri A, Mishra S, Bista D (2013) Heat Stress and Roots. In: Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance. pp 109–136

Heil M, Kost C (2006) Priming of indirect defences. Ecol Lett 9:813–817. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00932.x

Heinemeyer A, Ineson P, Ostle N, Fitter AH (2006) Respiration of the external mycelium in the arbuscular mycorrhizal symbiosis shows strong dependence on recent photosynthates and acclimation to temperature. New Phytol 171:159–170. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01730.x

Herz K, Dietz S, Gorzolka K, et al (2018) Linking root exudates to functional plant traits. PLoS One 13:1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204128

Heulin T, Guckert A, Balandreau J (1987) Stimulation of root exudation of rice seedlings by Azospirillum strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. Biol Fertil Soils 4:9–14. https://doi.org/10.1007/BF00280344

Heydarian Z, Yu M, Gruber M, et al (2018) Changes in gene expression in Camelina sativa roots and vegetative tissues in response to salinity stress. Sci Rep 8:1–22. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28204-4

Hilker M, Schmülling T (2019) Stress priming, memory, and signalling in plants. Plant Cell Environ 42:753–761. https://doi.org/10.1111/pce.13526

Hilker M, Schwachtje J, Baier M, et al (2016) Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. Biol Rev 91:1118–1133. https://doi.org/10.1111/brv.12215

Hill PW, Farrar JF, Jones DL (2008) Decoupling of microbial glucose uptake and mineralization in soil. Soil Biol Biochem 40:616–624. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.09.008

Hilton S, Picot E, Schreiter S, et al (2021) Identification of microbial signatures linked to oilseed rape yield decline at the landscape scale. Microbiome 9:1–15. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00972-0

Hirt H (2012) Rôle des micro-organismes bénéfiques pour aider les plantes à acquérir une tolérance aux stresses environnementaux. Biol Aujourdhui 206:285–290. https://doi.org/10.1051/jbio/2012028

Hoffland E (1992) Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. Plant Soil 140:279–289. https://doi.org/10.1007/BF00010605

Hoffland E, Findenegg GR, Nelemans JA (1989) Solubilization of rock phosphate by rape - II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. Plant Soil 113:161–165. https://doi.org/10.1007/BF02280176

Hoffland E, Van Den Boogard R, Nelemans J, Findenegg GR (1992) Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. New Phytol

122:675–680. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb00096.x

Holeski LM, Jander G, Agrawal AA (2012) Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. Trends Ecol Evol 27:618–626. https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.011

Hu T, Liu SQ, Amombo E, Fu JM (2015) Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photochemistry and metabolism of tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) in response to high-temperature stress. Front Plant Sci 6:1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00403

Hua J (2009) From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. Curr Opin Plant Biol 12:568–573. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.012

Huang B, Rachmilevitch S, Xu J (2012) Root carbon and protein metabolism associated with heat tolerance. J Exp Bot 63:3455–3465. https://doi.org/10.1093/jxb/ers003

Huang XF, Chaparro JM, Reardon KF, et al (2014) Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities1. Botany 92:267–275. https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225

Hütsch BW, Augustin J, Merbach W (2002) Plant rhizodeposition - An important source for carbon turnover in soils. J Plant Nutr Soil Sci 165:397–407. https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C

Ibrahim FM, El Habbasha SF (2015) Chemical composition, medicinal impacts and cultivation of camelina (Camelina sativa): Review. Int J PharmTech Res 8:114–122

Iglesias-Acosta M, Martínez-Ballesta MC, Teruel JA, Carvajal M (2010) The response of broccoli plants to high temperature and possible role of root aquaporins. Environ Exp Bot 68:83–90. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.10.007

Ihsan MZ, Daur I, Alghabari F, et al (2019) Heat stress and plant development: role of sulphur metabolites and management strategies. Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci 69:332–342. https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1569715

IPCC (2021) Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change

Iwasaki M, Paszkowski J (2014) Epigenetic memory in plants. EMBO J 33:1987–1998. https://doi.org/10.15252/embj.201488883

Jackson ST, Overpeck JT (2000) Responses of plant populations and communities to environmental changes of the late Quaternary. Paleobiology 26:194–220. https://doi.org/10.1017/s0094837300026932

Jalmi SK, Sinha AK (2022) Ambiguities of PGPR-Induced Plant Signaling and Stress Management. Front Microbiol 13:1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.899563

Jha UC, Bohra A, Singh NP (2014) Heat stress in crop plants: Its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. Plant Breed 133:679–701. https://doi.org/10.1111/pbr.12217

Johnston RB (2016) Arsenic and the 2030 Agenda for sustainable development. Arsen Res Glob Sustain - Proc 6th Int Congr Arsen Environ AS 2016 12–14. https://doi.org/10.1201/b20466-7

Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. Plant Soil 2058:25–44

Jones DL, Darrah PR (1993a) Re-sorption of organic compounds by roots of Zea mays L. and its consequences in the rhizosphere - II. Experimental and model evidence for simultaneous exudation and re-sorption of soluble C compounds. Plant Soil 153:47–59. https://doi.org/10.1007/BF00010543

Jones DL, Darrah PR (1993b) Influx and efflux of Amino acids from Zea mays L. roots and their implications for N nutrition and the rhizosphere. Plant Nutr — from Genet Eng to F Pract 91–94. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1880-4_11

Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. Plant Soil 321:5–33. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0

Jones DL, Shaff JE, Kochian L V. (1995) Role of calcium and other ions in directing root hair tip

growth in Limnobium stoloniferum - I. Inhibition of tip growth by aluminum. Planta 197:672–680. https://doi.org/10.1007/BF00191575

Julié-Galau S, Bellec Y, Faure JD, Tepfer M (2014) Evaluation of the potential for interspecific hybridization between Camelina sativa and related wild Brassicaceae in anticipation of field trials of GM camelina. Transgenic Res 23:67–74. https://doi.org/10.1007/s11248-013-9722-7

Jullien A, Mathieu A, Allirand JM, et al (2011) Characterization of the interactions between architecture and sourcesink relationships in winter oilseed rape (Brassica napus) using the GreenLab model. Ann Bot 107:765–779. https://doi.org/10.1093/aob/mcq205

Karim MA, Fracheboud Y, Stamp P (1999) Photosynthetic activity of developing leaves of Zea mays is less affected by heat stress than that of developed leaves. Physiol Plant 105:685–693. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105413.x

Kaspar TC, Bland WL (1992) Soil temperature and root growth. Soil Sci 154:290–299

Kaštovská E, Edwards K, Picek T, Šantrůčková H (2015) A larger investment into exudation by competitive versus conservative plants is connected to more coupled plant–microbe N cycling. Biogeochemistry 122:47–59. https://doi.org/10.1007/s10533-014-0028-5

Kaur P, Ghai N, Sangha MK (2009) Induction of thermotolerance through heat acclimation and salicylic acid in Brassica species. African J Biotechnol 8:619–625

Keith H, Oades JM, Martin JK (1986) Input of carbon to soil from wheat plants. Soil Biol Biochem 18:445–449. https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90051-9

Kilasi NL, Singh J, Vallejos CE, et al (2018) Heat stress tolerance in rice (oryza sativa L.): Identification of quantitative trait loci and candidate genes for seedling growth under heat stress. Front Plant Sci 871:1–11. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01578

Kinoshita T, Seki M (2014) Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. Plant Cell Physiol 55:1859–1863. https://doi.org/10.1093/pcp/pcu125

Kloepper JW, Leongt J, Teintzet M, et al (1980) Enhanced plant growth by siderophores

produced by plant growth-promoting rhizobacferia of activity metabolism and its possible relation to vertebrate origins. Nature 286:885–886

Kolde R (2019) Package “pheatmap”: Pretty heatmaps - R package version 1.0.12. 1–8

Kourani M, Mohareb F, Rezwan FI, et al (2022) Genetic and Physiological Responses to Heat Stress in Brassica napus. Front Plant Sci 13:1–20. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.832147

Krueger F (2015) Trim Galore: A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. Available online: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/

Kucharik CJ, Serbin SP (2008) Impacts of recent climate change on Wisconsin corn and soybean yield trends. Environ Res Lett 3:. https://doi.org/10.1088/1748-9326/3/3/034003

Kuglitsch FG, Toreti A, Xoplaki E, et al (2010) Heat wave changes in the eastern mediterranean since 1960. Geophys Res Lett 37:1–5. https://doi.org/10.1029/2009GL041841

Kumar A, Kumar A, Devi S, et al (2012) Isolation, screening and characterization of Azotobacter from rhizospheric soils for different Plant Growth Promotion (PGP): An in vitro study. Recent Res Sci Technol 4:01–05

Kumar S, Diksha, Sindhu SS, Kumar R (2022) Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. Curr Res Microb Sci 3:100094. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094

Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Kumar SV, Wigge PA (2010) H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. Cell 140:136–147. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.006

Kuroyanagi T, Paulsen GM (1988) Mediation of high-temperature injury by roots and shoots during reproductive growth of wheat. Plant Cell Environ 11:517–523. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1988.tb01790.x

Kuzyakov Y, Blagodatskaya E (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. Soil Biol Biochem 83:184–199. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025

Kuzyakov Y, Hill PW, Jones DL (2007) Root exudate components change litter decomposition in a simulated rhizosphere depending on temperature. Plant Soil 290:293–305. https://doi.org/10.1007/s11104-006-9162-8

Labra MH, Struik PC, Evers JB, Calderini DF (2017) Plasticity of seed weight compensates reductions in seed number of oilseed rape in response to shading at flowering. Eur J Agron 84:113–124. https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.12.011

Lämke J, Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. Genome Biol 18:1–11. https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6

Lancashire PD, Bleiholder H, Van Den Boom T, et al (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann Appl Biol 119:561–601. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1991.tb04895.x

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404

Lastochkina O, Aliniaeifard S, Seifikalhor M, et al (2019) Plant Growth-Promoting Bacteria: Biotic Strategy to Cope with Abiotic Stresses in Wheat

Lemonsu A, Beaulant AL, Somot S, Masson V (2014) Evolution of heat wave occurrence over the Paris basin (France) in the 21st century. Clim Res 61:75–91. https://doi.org/10.3354/cr01235

Lesuffleur F, Paynel F, Bataillé MP, et al (2007) Root amino acid exudation: Measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. Plant Soil 294:235–246. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9249-x

Leyval C, Berthelin J (1993) Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. Biol Fertil Soils 15:259–267. https://doi.org/10.1007/BF00337210

Ling N, Raza W, Ma J, et al (2011) Identification and role of organic acids in watermelon root exudates for recruiting Paenibacillus polymyxa SQR-21 in the rhizosphere. Eur J Soil Biol 47:374–379. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.08.009

Liu H, Able AJ, Able JA (2022) Priming crops for the future: rewiring stress memory. Trends Plant Sci 27:699–716. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.015

Lobell DB, Field CB (2007) Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. Environ Res Lett 2:. https://doi.org/10.1088/1748-9326/2/1/014002

Lohaus G, Burba M, Heldt HW (1994) Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (Beta vulgaris L.). J Exp Bot 45:1097–1101. https://doi.org/10.1093/jxb/45.8.1097

Lohaus G, Moellers C (2000) Phloem transport of amino acids in two Brassica napus L. genotypes and one B. carinata genotype in relation to their seed protein content. Planta 211:833–840. https://doi.org/10.1007/s004250000349

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol 63:541–556. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

Luo C, Xu G, Wang Y, et al (2009) Effects of grazing and experimental warming on DOC concentrations in the soil solution on the Qinghai-Tibet plateau. Soil Biol Biochem 41:2493–2500. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.006

Luo Z, Brock J, Dyer JM, et al (2019) Genetic diversity and population structure of a Camelina sativa spring panel. Front Plant Sci 10:1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00184

Ma X, Zarebanadkouki M, Kuzyakov Y, et al (2018) Spatial patterns of enzyme activities in the rhizosphere: Effects of root hairs and root radius. Soil Biol Biochem 118:69–78. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.12.009

Mácová K, Prabhullachandran U, Štefková M, et al (2022) Long-Term High-Temperature Stress Impacts on Embryo and Seed Development in Brassica napus. Front Plant Sci 13:. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.844292

Maestri E, Klueva N, Perrotta C, et al (2002) Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. Plant Mol Biol 48:667–681. https://doi.org/10.1023/A:1014826730024

Magno Massuia de Almeida L, Avice JC, Morvan-Bertrand A, et al (2021) High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (Brassica napus L.) in relation to sulphur nutrition. Environ Exp Bot 185:. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104400

Magno Massuia de Almeida L, Coquemont-Guyot M, Elie N, et al (2023) Repeated heat stress events during the reproductive phase impact the dynamic development of seeds in Brassica napus L. Plant Sci 327:. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111559

Magno Massuia de Almeida L, Coulon M, Avice JC, et al (2022) Effects of two-generational heat stress exposure at the onset of seed maturation on seed yield and quality in Brassica napus L. Environ Exp Bot 195:. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104788

Mainali KP (2007) Impact of heat waves on plant-soil links in tall-grass prairie

Mainali KP, Heckathorn SA, Wang D, et al (2014) Impact of a short-term heat event on C and N relations in shoots vs. roots of the stress-tolerant C4 grass, Andropogon gerardii. J Plant Physiol 171:977–985. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.006

Mangiafico S (2023) Package “rcompanion”: Functions to Support Extension Education Program Evaluation - R package version 2.4.30. 1–141

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, et al (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 64:795–799. https://doi.org/10.1128/aem.64.2.795-799.1998

Mareri L, Cai G (2022) Pollen priming for more efficient reproduction in a heating world:

what we know, what we need to know. Plant Stress 3:100060. https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100060

Martin BC, Gleeson D, Statton J, et al (2018) Low light availability alters root exudation and reduces putative beneficial microorganisms in seagrass roots. Front Microbiol 8:1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02667

Martinelli T, Galasso I (2011) Phenological growth stages of Camelina sativa according to the extended BBCH scale. Ann Appl Biol 158:87–94. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00444.x

Martínez-Romero E, Aguirre-Noyola JL, Taco-Taype N, et al (2020) Plant microbiota modified by plant domestication. Syst Appl Microbiol 43:. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126106

Massalha H, Korenblum E, Malitsky S, et al (2017) Live imaging of root-bacteria interactions in a microfluidics setup. Proc Natl Acad Sci U S A 114:4549–4554. https://doi.org/10.1073/pnas.1618584114

Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, et al (2010) Pseudomonas putida KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation. Environ Microbiol Rep 2:381–388. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x

McGregor DI (1981) Pattern of Flower and Pod Development in Rapeseed. Can J Plant Sci 61:275–282. https://doi.org/10.4141/cjps81-040

Meena KK, Sorty AM, Bitla UM, et al (2017) Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: The omics strategies. Front Plant Sci 8:1–25. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00172

Meharg AA, Killham K (1990) The effect of soil pH on rhizosphere carbon flow of Lolium perenne. Plant Soil 123:1–7. https://doi.org/10.1007/BF00009920

Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M (2022) TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. Nucleic Acids Res 50:D801–D807. https://doi.org/10.1093/nar/gkab902

Meier IC, Finzi AC, Phillips RP (2017) Root exudates increase N availability by stimulating microbial turnover of fast-cycling N pools. Soil Biol Biochem 106:119–128. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.004

Melillo JM, Steudler PA, Aber JD, et al (2002) Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. Science (80-) 298:2173–2176. https://doi.org/10.1126/science.1074153

Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B (2006) Transgeneration memory of stress in plants. Nature 442:1046–1049. https://doi.org/10.1038/nature05022

Morrison MJ, McVetty PB, Shaykewich CF (1989) The determination and verification of a baseline temperature for the growth of westar summer rape. Can J Plant Sci 69:455–464. https://doi.org/10.4141/cjps89-057

Morrison MJ, Stewart DW (2002) Heat stress during flowering in summer Brassica. Crop Sci 42:797–803. https://doi.org/10.2135/cropsci2002.7970

Moser BR (2010) Camelina (Camelina sativa L.) oil as a biofuels feedstock: Golden opportunity or false hope? Lipid Technol 22:270–273. https://doi.org/10.1002/lite.201000068

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700. https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993

Naing AH, Maung TT, Kim CK (2021) The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress. Physiol Plant 173:1992–2012. https://doi.org/10.1111/ppl.13545

Nguyen C (2003) rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23:375–396. https://doi.org/10.1051/agro

Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, et al (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. J Biol Chem 286:5446–5454.

https://doi.org/10.1074/jbc.M110.180026

Obour AK, Obeng E, Mohammed YA, et al (2017) Camelina seed yield and fatty acids as influenced by genotype and environment. Agron J 109:947–956. https://doi.org/10.2134/agronj2016.05.0256

Oburger E, Dell'mour M, Hann S, et al (2013) Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. Environ Exp Bot 87:235–247. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.11.007

Oburger E, Jones DL (2018) Sampling root exudates – Mission impossible? Rhizosphere 6:116–133. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004

Oger PM, Mansouri H, Nesme X, Dessaux Y (2004) Engineering root exudation of Lotus toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. Microb Ecol 47:96–103. https://doi.org/10.1007/s00248-003-2012-9

Pan X, Welti R, Wang X (2010) Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Nat Protoc 5:986–992. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37

Pastor V, Luna E, Mauch-Mani B, et al (2013) Primed plants do not forget. Environ Exp Bot 94:46–56. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.013

Pausch J, Kuzyakov Y (2011) Photoassimilate allocation and dynamics of hotspots in roots visualized by 14C phosphor imaging. J Plant Nutr Soil Sci 174:12–19. https://doi.org/10.1002/jpln.200900271

Peet MM, Sato S, Gardner RG (1998) Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. Plant, Cell Environ 21:225–231. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00281.x

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol Plant 118:10–15. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x

Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, et al (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. Microbiol Res 169:325–336. https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011

Personeni E, Nguyen C, Marchal P, Pagès L (2007) Experimental evaluation of an efflux-influx model of C exudation by individual apical root segments. J Exp Bot 58:2091–2099. https://doi.org/10.1093/jxb/erm065

Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van Der Putten WH (2013) Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. Nat Rev Microbiol 11:789–799. https://doi.org/10.1038/nrmicro3109

Phillips RP, Finzi AC, Bernhardt ES (2011) Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO2 fumigation. Ecol Lett 14:187–194. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01570.x

Pillay V, Nowak J (1997) lnoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (Lycopersicon esculentum L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. Can J Microbiol 43:354–361

Pimm SL, Jenkins CN, Abell R, et al (2014) The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. Science (80-) 344:. https://doi.org/10.1126/science.1246752

Polowick PL, Sawhney VK (1988) High temperature induced male and female sterility in canola (Brassica napus L.). Ann Bot 62:83–86. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087639

Pomilio AB, Leicach SR, Grass MY, et al (2000) Constituents of the root exudate of Avena fatua grown under far-infrared-enriched light. Phytochem Anal 11:304–308. https://doi.org/10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<304::AID-PCA531>3.0.CO;2-G

Pompeiano A, Volterrani M, Guglielminetti L (2013) Physiological responses of c4 grasses to prolonged heat stress. Adv Hortic Sci 27:127–132

Pramanik MHR, Nagai M, Asao T, Matsui Y (2000) Effects of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber (Cucumis sativus) in hydroponic culture. J Chem Ecol 26:1953–1967. https://doi.org/10.1023/A:1005509110317

Preece C, Peñuelas J (2020) A Return to the Wild: Root Exudates and Food Security. Trends Plant Sci 25:14–21. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.010

Prescott CE (2022) Sinks for plant surplus carbon explain several ecological phenomena. Plant Soil 476:689–698. https://doi.org/10.1007/s11104-022-05390-9

Prescott CE, Grayston SJ, Helmisaari HS, et al (2020) Surplus Carbon Drives Allocation and Plant–Soil Interactions. Trends Ecol Evol 35:1110–1118. https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.08.007

Pritchard L, Glover RH, Humphris S, et al (2016) Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. Anal Methods 8:12–24. https://doi.org/10.1039/c5ay02550h

Proctor C, He Y (2017) Quantifying root extracts and exudates of sedge and shrub in relation to root morphology. Soil Biol Biochem 114:168–180. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.07.006

Qin L, He J, Lee SK, Dodd IC (2007) An assessment of the role of ethylene in mediating lettuce (Lactuca sativa) root growth at high temperatures. J Exp Bot 58:3017–3024. https://doi.org/10.1093/jxb/erm156

Rathore N, Hanzelková V, Dostálek T, et al (2023) Species phylogeny, ecology, and root traits as predictors of root exudate composition. New Phytol. https://doi.org/10.1111/nph.19060

Ray DK, Gerber JS, Macdonald GK, West PC (2015) Climate variation explains a third of global crop yield variability. Nat Commun 6:1–9. https://doi.org/10.1038/ncomms6989

Razavi BS, Zarebanadkouki M, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2016) Rhizosphere shape of lentil and maize: Spatial distribution of enzyme activities. Environ Model Softw 79:229–237. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.020

Rekha K, Ramasamy M, Usha B (2020) Root exudation of organic acids as affected by plant growth-promoting rhizobacteria Bacillus subtilis RR4 in rice. J Crop Improv 34:571–586. https://doi.org/10.1080/15427528.2020.1746719

Remus R, Pandey D, Lüttschwager D (2022) What regulates the rhizodeposition of winter oilseed rape during growth? Plant Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-022-05441-1

Ren C, Bilyeu KD, Beuselinck PR (2009) Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. Crop Sci 49:1010–1022. https://doi.org/10.2135/cropsci2008.05.0247

Renoud S, Abrouk D, Prigent-Combaret C, et al (2022) Effect of Inoculation Level on the Impact of the PGPR Azospirillum lipoferum CRT1 on Selected Microbial Functional Groups in the Rhizosphere of Field Maize. Microorganisms 10:. https://doi.org/10.3390/microorganisms10020325

Riah-Anglet W, Trinsoutrot-Gattin I, Martin-Laurent F, et al (2015) Soil microbial community structure and function relationships: A heat stress experiment. Appl Soil Ecol 86:121–130. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.001

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil 321:305–339. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2

Rolletschek H, Borisjuk L, Sánchez-García A, et al (2007) Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. J Exp Bot 58:3171–3181. https://doi.org/10.1093/jxb/erm154

Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol 148:1547–1556. https://doi.org/10.1104/pp.108.127613

Sage TL, Bagha S, Lundsgaard-Nielsen V, et al (2015) The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. F Crop Res 182:30–42.

https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.06.011

Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J Ind Microbiol Biotechnol 34:635–648. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0240-6

Santoyo G (2022) How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. J Adv Res 40:45–58. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020

Santoyo G, Del Carmen Orozco-Mosqueda M, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of Bacillus and Pseudomonas: A review. Biocontrol Sci Technol 22:855–872. https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiol Res 183:92–99. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008

Savvides A, Ali S, Tester M, Fotopoulos V (2016) Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? Trends Plant Sci 21:329–340. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.003

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 9:676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Schulte LR, Ballard T, Samarakoon T, et al (2013) Increased growing temperature reduces content of polyunsaturated fatty acids in four oilseed crops. Ind Crops Prod 51:212–219. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.075

Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, et al (2021) Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microb Genomics 7:. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685

Sehar Z, Gautam H, Iqbal N, et al (2022) The Functional Interplay between Ethylene, Hydrogen Sulfide, and Sulfur in Plant Heat Stress Tolerance. Biomolecules 12:1–24.

https://doi.org/10.3390/biom12050678

Selvaraj MG, Burow G, Burke JJ, et al (2011) Heat stress screening of peanut (Arachis hypogaea L.) seedlings for acquired thermotolerance. Plant Growth Regul 65:83–91. https://doi.org/10.1007/s10725-011-9577-y

Serrano N, Ling Y, Bahieldin A, Mahfouz MM (2019) Thermopriming reprograms metabolic homeostasis to confer heat tolerance. Sci Rep 9:1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36484-z

Shahbaz AM, Oki Y, Adachi T, et al (2006) Phosphorus starvation induced root-mediated pH changes in solublization and acquisition of sparingly soluble P sources and organic acids exudation by Brassica cultivars. Soil Sci Plant Nutr 52:623–633. https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00082.x

Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, et al (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. Appl Environ Microbiol 58:353–358. https://doi.org/10.1128/aem.58.1.353-358.1992

Sharma A, Sinharoy S, Bisht NC (2023) The mysterious non-arbuscular mycorrhizal status of Brassicaceae species. Environ Microbiol 25:917–930. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16339

Shekhawat K, Almeida-Trapp M, García-Ramírez GX, Hirt H (2022) Beat the heat: plant- and microbe-mediated strategies for crop thermotolerance. Trends Plant Sci 27:802–813. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.02.008

Shi S, Richardson AE, O'Callaghan M, et al (2011) Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. FEMS Microbiol Ecol 77:600–610. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01150.x

Sinsawat V, Leipner J, Stamp P, Fracheboud Y (2004) Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (Zea mays L.) grown at control or high temperature. Environ Exp Bot 52:123–129. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.01.010

Snowdon RJ, Iniguez Luy FL (2012) Potential to improve oilseed rape and canola breeding in the genomics era. Plant Breed 131:351–360. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01976.x

Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. Crit Rev Microbiol 30:205–240. https://doi.org/10.1080/10408410490468786

Soorni J, Kazemitabar SK, Kahrizi D, et al (2021) Genetic analysis of freezing tolerance in camelina [Camelina sativa (L.) Crantz] by diallel cross of winter and spring biotypes. Planta 253:1–11. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03521-z

Soussana JF, Graux AI, Tubiello FN (2010) Improving the use of modelling for projections of climate change impacts on crops and pastures. J Exp Bot 61:2217–2228. https://doi.org/10.1093/jxb/erq100

Spitzer CM, Wardle DA, Sundqvist MK, Gundale MJ (2020) Root trait – microbial relationships across tundra plant species. New Phytol 229:1508–1520. https://doi.org/10.1111/nph.16982

Steinauer K, Chatzinotas A, Eisenhauer N (2016) Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? Ecol Evol 6:7387–7396. https://doi.org/10.1002/ece3.2454

Stevenson IL (1959) Dehydrogenase activity in soils. Can J Microbiol 5:229–235. https://doi.org/10.1139/m59-026

Sun L, Ataka M, Han M, et al (2021) Root exudation as a major competitive fine-root functional trait of 18 coexisting species in a subtropical forest. New Phytol 229:259–271. https://doi.org/10.1111/nph.16865

Sun W, Montagu M Van, Verbruggen N (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 1577:1–9

Svenningsson H, Sundin P, Liljenberg C (1990) Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. Plant Cell

Environ 13:155–162. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01287.x

Tang L, Zhan M, Shang C, et al (2021a) Dynamics of root exuded carbon and its relationships with root traits of rapeseed and wheat. Plant, Soil Environ 67:317–323. https://doi.org/10.17221/561/2020-PSE

Tang S, Cheng W, Hu R, et al (2021b) Five-year soil warming changes soil C and N dynamics in a single rice paddy field in Japan. Sci Total Environ 756:143845. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143845

Tayo TO, Morgan DG (1979) Factors influencing flower and pod development in oil-seed rape. J Agric Sci 92:363–373. https://doi.org/10.1017/S0021859600062894

Terres Inovia (2019) Guide de culture Colza 2019. Terres Inovia 1–50

Tharayil N, Triebwasser DJ (2010) Elucidation of a Diurnal Pattern of Catechin Exudation by Centaurea stoebe. J Chem Ecol 36:200–204. https://doi.org/10.1007/s10886-010-9749-7

Tian J, Belanger FC, Huang B (2009) Identification of heat stress-responsive genes in heat-adapted thermal Agrostis scabra by suppression subtractive hybridization. J Plant Physiol 166:588–601. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.09.003

Tiziani R, Mimmo T, Valentinuzzi F, et al (2020) Root Handling Affects Carboxylates Exudation and Phosphate Uptake of White Lupin Roots. Front Plant Sci 11:. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584568

Tiziani R, Miras-Moreno B, Malacrinò A, et al (2022) Drought, heat, and their combination impact the root exudation patterns and rhizosphere microbiome in maize roots. Environ Exp Bot 203:. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105071

Tiziani R, Puschenreiter M, Smolders E, et al (2021) Millimetre-resolution mapping of citrate exuded from soil-grown roots using a novel, low-invasive sampling technique. J Exp Bot 72:3513–3525. https://doi.org/10.1093/jxb/erab123

Tonosaki K, Fujimoto R, Dennis ES, et al (2022) Will epigenetics be a key player in crop

breeding? Front Plant Sci 13:1–23. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.958350

Toosi ER, Schmidt JP, Castellano MJ (2014) Soil temperature is an important regulatory control on dissolved organic carbon supply and uptake of soil solution nitrate. Eur J Soil Biol 61:68–71. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.01.003

Trnka M, Rötter RP, Ruiz-Ramos M, et al (2014) Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. Nat Clim Chang 4:637–643. https://doi.org/10.1038/nclimate2242

Turcotte H, Hooker J, Samanfar B, Parent JS (2022) Can Epigenetics Guide the Production of Better Adapted Cultivars? Agronomy 12:1–15. https://doi.org/10.3390/agronomy12040838

Urban MC, Bocedi G, Hendry AP, et al (2016) Improving the forecast for biodiversity under climate change. Science (80-) 353:. https://doi.org/10.1126/science.aad8466

Uselman SM, Qualls RG, Thomas RB (2000) Effects of increased atmospheric CO2, temperature, and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (Robinia pseudoacacia L.). Plant Soil 222:191–202. https://doi.org/10.1023/a:1004705416108

Vacheron J, Combes-Meynet E, Walker V, et al (2016) Expression on roots and contribution to maize phytostimulation of 1-aminocyclopropane-1-decarboxylate deaminase gene acdS in Pseudomonas fluorescens F113. Plant Soil 407:187–202. https://doi.org/10.1007/s11104-016-2907-0

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, et al (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front Plant Sci 4:1–19. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356

Vacheron J, Desbrosses G, Renoud S, et al (2018) Differential contribution of plant-beneficial functions from pseudomonas kionensis fl 13 to root system architecture alterations in arabidopsis thaliana and zea mays. Mol Plant-Microbe Interact 31:212–223. https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0185-R

Valentinuzzi F, Cesco S, Tomasi N, Mimmo T (2015) Influence of different trap solutions on the determination of root exudates in Lupinus albus L. Biol Fertil Soils 51:757–765. https://doi.org/10.1007/s00374-015-1015-2

Vescio R, Malacrinò A, Bennett AE, Sorgonà A (2021) Single and combined abiotic stressors affect maize rhizosphere bacterial microbiota. Rhizosphere 17:1–6. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100318

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571–586. https://doi.org/10.1023/A:1026037216893

Vílchez JI, Yang Y, He D, et al (2020) DNA demethylases are required for myo-inositol-mediated mutualism between plants and beneficial rhizobacteria. Nat Plants 6:983–995. https://doi.org/10.1038/s41477-020-0707-2

Villagómez-Aranda AL, Feregrino-Pérez AA, García-Ortega LF, et al (2022) Activating stress memory: eustressors as potential tools for plant breeding. Plant Cell Rep 41:1481–1498. https://doi.org/10.1007/s00299-022-02858-x

Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM (2020a) Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. Plant Cell Rep 39:3–17. https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5

Vives-Peris V, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM (2017) Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions. Plant Cell Rep 36:1971–1984. https://doi.org/10.1007/s00299-017-2214-0

Vives-Peris V, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2020b) Root involvement in plant responses to adverse environmental conditions. Agronomy 10:. https://doi.org/10.3390/agronomy10070942

Vives-Peris V, Molina L, Segura A, et al (2018) Root exudates from citrus plants subjected to abiotic stress conditions have a positive effect on rhizobacteria. J Plant Physiol 228:208–217. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.003

Volaire F (2018) A unified framework of plant adaptive strategies to drought: Crossing scales

and disciplines. Glob Chang Biol 24:2929–2938. https://doi.org/10.1111/gcb.14062

Vollenweider P, Günthardt-Goerg MS (2005) Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. Environ Pollut 137:455–465. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.01.032

Vong P-C, Piutti S, Slezack-Deschaumes S, et al (2008) Sulphur immobilization and arylsulphatase activity in two calcareous arable and fallow soils as affected by glucose additions. Geoderma 148:79–84. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.09.008

Vong PC, Piutti S, Benizri E, et al (2007) Water-soluble carbon in roots of rape and barley: Impacts on labile soil organic carbon, arylsulphatase activity and sulphur mineralization. Plant Soil 294:19–29. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9201-0

Vora SM, Joshi P, Belwalkar M, Archana G (2021) Root exudates influence chemotaxis and colonization of diverse plant growth promoting rhizobacteria in the pigeon pea – maize intercropping system. Rhizosphere 18:100331. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100331

Vranova V, Rejsek K, Skene KR, et al (2013) Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review. J Plant Nutr Soil Sci 176:175–199. https://doi.org/10.1002/jpln.201000360

Vriet C, Hennig L, Laloi C (2015) Stress-induced chromatin changes in plants: Of memories, metabolites and crop improvement. Cell Mol Life Sci 72:1261–1273. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1792-z

Vuolo F, Novello G, Bona E, et al (2022) Impact of Plant-Beneficial Bacterial Inocula on the Resident Bacteriome: Current Knowledge and Future Perspectives. Microorganisms 10:1–26. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122462

Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. Environ Exp Bot 61:199–223. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011

Walker TWN, Kaiser C, Strasser F, et al (2018) Microbial temperature sensitivity and biomass change explain soil carbon loss with warming. Nat Clim Chang 8:885–889.

https://doi.org/10.1038/s41558-018-0259-x

Wang C, Hai J, Yang J, et al (2016) Influence of leaf and silique photosynthesis on seeds yield and seeds oil quality of oilseed rape (Brassica napus L.). Eur J Agron 74:112–118. https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.12.008

Wang L, Feng Z, Schjoerring JK (2013) Effects of elevated atmospheric CO2 on physiology and yield of wheat (Triticum aestivum L.): A meta-analytic test of current hypotheses. Agric Ecosyst Environ 178:57–63. https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.06.013

Wang X, Cai J, Jiang D, et al (2011) Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat. J Plant Physiol 168:585–593. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.09.016

Wang X, Cai J, Liu F, et al (2012) Pre-anthesis high temperature acclimation alleviates the negative effects of post-anthesis heat stress on stem stored carbohydrates remobilization and grain starch accumulation in wheat. J Cereal Sci 55:331–336. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.01.004

Wang X, Liu F lai, Jiang D (2017a) Priming: A promising strategy for crop production in response to future climate. J Integr Agric 16:2709–2716. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61786-6

Wang X, Long Y, Wang N, et al (2017b) Breeding histories and selection criteria for oilseed rape in Europe and China identified by genome wide pedigree dissection. Sci Rep 7:1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02188-z

Waraich EA, Ahmad M, Soufan W, et al (2021) Seed priming with sulfhydral thiourea enhances the performance of camelina sativa l. Under heat stress conditions. Agronomy 11:. https://doi.org/10.3390/agronomy11091875

Weemstra M, Mommer L, Visser EJW, et al (2016) Towards a multidimensional root trait framework: a tree root review. New Phytol 211:1159–1169. https://doi.org/10.1111/nph.14003

Weigelt A, Mommer L, Andraczek K, et al (2021) An integrated framework of plant form and

function: the belowground perspective. New Phytol 232:42–59. https://doi.org/10.1111/nph.17590

Wen Z, Li H, Shen Q, et al (2019) Tradeoffs among root morphology, exudation and mycorrhizal symbioses for phosphorus-acquisition strategies of 16 crop species. New Phytol 223:882–895. https://doi.org/10.1111/nph.15833

Wen Z, White PJ, Shen J, Lambers H (2022) Linking root exudation to belowground economic traits for resource acquisition. New Phytol 233:1620–1635. https://doi.org/10.1111/nph.17854

Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE (2017) Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol 13:1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595

Wilhelm EP, Mullen RE, Keeling PL, Singletary GW (1999) Heat stress during grain filling in maize: Effects on kernel growth and metabolism. Crop Sci 39:1733–1741. https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3961733x

Wilkinson SW, Ton J (2020) Methylation moulds microbiomes. Nat Plants 6:910–911. https://doi.org/10.1038/s41477-020-0717-0

Williams A, Langridge H, Straathof AL, et al (2022) Root functional traits explain root exudation rate and composition across a range of grassland species. J Ecol 110:21–33. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13630

Xu Q, Huang B (2001) Lowering soil temperatures improves creeping bentgrass growth under heat stress. Crop Sci 41:1878–1883. https://doi.org/10.2135/cropsci2001.1878

Yacoumas A, Honvault N, Houben D, et al (2020) Contrasting Response of Nutrient Acquisition Traits in Wheat Grown on Bisphenol A-Contaminated Soils. Water Air Soil Pollut 231:. https://doi.org/10.1007/s11270-019-4383-7

Yan X, Liao H, Beebe SE, et al (2004) QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. Plant Soil 265:17–29. https://doi.org/10.1007/s11104-005-0693-1

Yang J, Kloepper JW, Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci 14:1–4. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004

Yaqoob S, Bhatti HN, Sultana B, Shahid M (2020) Prognosticating the potential of sorghum bicolor root exudates in response to abiotic stress. Pakistan J Agric Sci 57:1661–1668. https://doi.org/10.21162/PAKJAS/20.9633

Yin H, Li Y, Xiao J, et al (2013a) Enhanced root exudation stimulates soil nitrogen transformations in a subalpine coniferous forest under experimental warming. Glob Chang Biol 19:2158–2167. https://doi.org/10.1111/gcb.12161

Yin H, Xiao J, Li Y, et al (2013b) Warming effects on root morphological and physiological traits: The potential consequences on soil C dynamics as altered root exudation. Agric For Meteorol 180:287–296. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2013.06.016

Young LW, Wilen RW, Bonham-Smith PC (2004) High temperature stress of Brassica napus during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. J Exp Bot 55:485–495. https://doi.org/10.1093/jxb/erh038

Yu H, Ma Q, Liu X, et al (2018) Short- and long-term warming alters soil microbial community and relates to soil traits. Appl Soil Ecol 131:22–28. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.07.006

Yuan L, Liu S, Zhu S, et al (2016) Comparative response of two wucai (Brassica campestris L.) genotypes to heat stress on antioxidative system and cell ultrastructure in root. Acta Physiol Plant 38:1–8. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2246-z

Zanetti F, Alberghini B, Marjanović Jeromela A, et al (2021) Camelina, an ancient oilseed crop actively contributing to the rural renaissance in Europe. A review. Agron Sustain Dev 41:. https://doi.org/10.1007/s13593-020-00663-y

Zhang N, Wang D, Liu Y, et al (2014) Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. Plant Soil 374:689–700.

https://doi.org/10.1007/s11104-013-1915-6

Zhang X, Dippold MA, Kuzyakov Y, Razavi BS (2019) Spatial pattern of enzyme activities depends on root exudate composition. Soil Biol Biochem 133:83–93. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.010

Zhang X, Wang X, Zhong J, et al (2016) Drought priming induces thermo-tolerance to post-anthesis high-temperature in offspring of winter wheat. Environ Exp Bot 127:26–36. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.03.004

Zioutopoulou A, Patitaki E, Xu T, Kaiserli E (2021) The epigenetic mechanisms underlying thermomorphogenesis and heat stress responses in arabidopsis. Plants 10:. https://doi.org/10.3390/plants10112439

Zubr J (1997) Oil-seed crop: Camelina sativa. Ind Crops Prod 6:113–119. https://doi.org/10.1016/S0926-6690(96)00203-8

Zulfikar Ali S, Sandhya V, Grover M, et al (2011) Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting Pseudomonas putida strain AKMP7 on growth of wheat (Triticum spp.) under heat stress. J Plant Interact 6:239–246. https://doi.org/10.1080/17429145.2010.545147

Analyses de l'effet de deux stratégies d'acclimatation à un stress thermique intense reposant sur une thermo-sensibilisation ou une sensibilisation médiée par des bactéries PGPR chez le colza et la caméline

Résumé

Le changement climatique auquel nous sommes confrontés est caractérisé notamment par une modification des profils thermiques en termes d'intensité, de durée et de répétition des vagues de chaleur. Ces vagues de chaleur surviennent lors des stades reproducteurs des plantes qui sont également les plus critiques pour l'élaboration des composantes de rendement et des critères de qualité grainière des grandes cultures. Les oléagineux tels que le colza et la caméline sont des espèces particulièrement impactées par le stress thermique, causant de fortes pertes de rendement et une diminution de la qualité grainière. Ainsi, pour faire face à ce stress, il est nécessaire, d'identifier de nouveaux leviers d'acclimatation qui diffèrent des leviers génétiques et agronomiques, telles que des stratégies reposant sur l'acclimatation des plantes. Le thermopriming consistant à préparer les plantes à répondre de façon plus rapide, efficace, intense et/ou sensible à un stress thermique par une exposition préalable à un stress de même nature pourrait permettre d'acclimater les plantes qui mettraient donc en place des mécanismes de réponses adaptés. L'inoculation des plantes avec des bactéries de type Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) est également un levier d'acclimatation de plus en plus étudié, qui permet de limiter les impacts des stress abiotiques tels que le stress thermique. Cependant, bien que ces deux types de stratégies d'acclimatation soient principalement étudiés pour limiter l'impact des stress sur le développement des parties aériennes et sur le rendement, peu d'études se sont intéressées à leurs effets sur la morphologie et les fonctions racinaires comme l'exsudation racinaire. Dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé chez le colza et la caméline (i) d'une part les effets d'une augmentation graduelle de température précédant un stress thermique, sur le rendement et la qualité grainière et sur la morphologie et l'exsudation racinaire et (ii) d'autre part les effets de l'inoculation de deux *Pseudomonas* présentant des activités PGPR afin de limiter les impacts du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière. De plus, afin de connaitre l'impact du stress thermique et de l'inoculation de PGPR (combinés ou non) sur la plante et la rhizosphère associée, les effets de ces traitements ont été étudiés sur l'exsudation racinaire, l'allocation de carbone (C) dans le système sol-plante, les traits morphologiques racinaires et les communautés microbiennes du sol. Nos résultats ont montré que le colza et la caméline présentent des stratégies contrastées quant à leur réponse au stress thermique. En effet, la caméline semble réagir au stress en augmentant son investissement dans les parties racinaires, en améliorant qualitativement son exsudation et en stimulant l'activité des communautés microbiennes à l'inverse du colza qui semble plutôt endurer le stress. De plus, ces deux espèces ont réagi différemment aux deux stratégies d'acclimatation appliquées. En effet, chez le colza, le thermopriming a permis de diminuer l'exsudation en C et de maintenir son rendement et sa qualité grainière alors qu'il a eu un impact plus négatif sur l'exsudation et la morphologie racinaire chez la caméline. L'inoculation des PGPR est une stratégie d'acclimatation qui tend à limiter les effets du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière chez le colza. Cependant, les PGPR agissent comme un puits supplémentaire chez le colza impactant son développement, son exsudation ainsi que l'activité et la composition des communautés microbienne. A l'inverse, la caméline est peu impactée par l'apport de PGPR et semble par conséquent piloter les interactions plante/bactéries plutôt que les subir. En résumé, ces leviers d'acclimatation semblent démontrer des effets bénéfiques pour les plantes. De plus, il pourrait être intéressant d'intégrer les effets de la sélection variétale sur les stratégies de réponses des plantes face au stress et notamment la variabilité des fonctions racinaires et des interactions avec la rhizosphère, à la lumière de la sélection variétale différentiellement subie par le colza et la caméline.

Mots-clés : Stress thermique, Colza, Caméline, Thermopriming, PGPR, Traits et exsudation racinaires, Rendement et qualité grainière, Communautés microbiennes

Abstract

The on-going climate changes that we are facing are characterized in particular by modifications of temperature profiles in terms of intensity, duration and repetition of heat waves. These heat waves occur during the reproductive stages of the crops, which are also the most critical for seed yield elaboration and grain quality in crops. Oleaginous species such as rapeseed and camelina, are species particularly impacted by heat stress that cause yield penalties and a lower seed quality. Therefore, to cope with heat stress, it has become necessary to identify new acclimation levers that differ avec genetic and agronomic levers, such as strategies based on plants acclimation. Thermopriming which consist in priming the plants in a way to help them respond more rapidly, effectively, intensively and/or sensitively to heat by a prior exposure of a stress of the same nature could allow the plants to acclimate and develop appropriate response mechanisms. The plant inoculation with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)-type bacteria is also an acclimation lever increasingly studied, that limit the impacts of abiotic stress such as heat stress. However, although these two types of acclimation levers are mainly studied to limit stress impact on aboveground development and yield, few studies have observed their effects on root morphology and functions such as root exudation. In this thesis we analysed in rapeseed and camelina (i) the effects of a gradual increase in temperature prior a heat stress on yield and grain quality and on root morphology and exudation and (ii) the effects of inoculating two *Pseudomonas* with PGPR activities in order to limit the impact of heat stress on yield and grain quality. Moreover, in order to understand the impact of heat stress and PGPR inoculation (combined or not) on the plant and associated rhizosphere, the effects of these treatments were studied on root exudation, carbon (C) allocation in the soil-plant system, root morphological traits and soil microbial communities. Our results showed that rapeseed and camelina have contrasting strategies in terms of response to heat stress. Indeed, camelina seems to respond to the stress by increasing its investment to the roots thus improving the quality of exudation and stimulating the activity of microbial communities, unlike rapeseed, which seems to undergo heat stress. In addition, these two species respond differently to the two acclimation strategies applied. In rapeseed, thermopriming reduced C exudation and maintained yield and grain quality, whereas it had a more negative impact on exudation and root morphology in camelina. PGPR inoculation is an acclimation strategy that tends to limit the effects of heat stress on yield and grain quality in rapeseed. However, PGPRs act as an additional sink in rapeseed, impacting its development, exudation and the activity and composition of microbial communities in the rhizosphere. By contrast, camelina is slightly affected by the addition of PGPRs and seems to control the plant/bacteria interactions rather than be affected by them. In short, beneficial effects on plants of these acclimation levers have been evidenced. In addition, it could be interesting to integrate the effects of varietal selection on plant response strategies to stress, and in particular the variability of root functions and interactions with the rhizosphere, in the light of the varietal selection differentially undergone by rapeseed and camelina.

Keywords: Heat stress, Rapeseed, Camelina, Thermopriming, PGPR, Root traits and exudation, Seed yield and quality, Microbial community