



HAL
open science

Contribution des parties aériennes et souterraines des plantes à la matière organique des sols évaluée à partir de la dynamique des marqueurs des cutines et des subérines

Mercédès Gonzalez Mendez-Millan

► **To cite this version:**

Mercédès Gonzalez Mendez-Millan. Contribution des parties aériennes et souterraines des plantes à la matière organique des sols évaluée à partir de la dynamique des marqueurs des cutines et des subérines. Science des sols. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : 2007PA066476 . tel-00803208v1

HAL Id: tel-00803208

<https://theses.hal.science/tel-00803208v1>

Submitted on 27 Mar 2013 (v1), last revised 30 Mar 2016 (v2)

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Terre solide et Enveloppes Superficielles

Présentée par

Mme Gonzalez Mendez-Millan Mercédès

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Contribution des parties aériennes et souterraines des plantes
à la matière organique des sols
évaluée à partir de la dynamique des marqueurs
des cutines et des subérines**

Soutenue le 13 décembre 2007

Devant le jury composé de :

Mme DERENNE Sylvie
M. AMBLÈS André
M. BARRIUSO Enrique
M. MARIOTTI André
M. CHEFETZ Benny
Mlle. DIGNAC Marie-France

Directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Résumé

La matière organique des sols (MOS) représente un réservoir majeur de carbone. Certaines pratiques agricoles ont pour effet de minéraliser la MOS. Dans un système où les résidus de cultures sont retournés au sol, la biomasse racinaire contribue plus à la MOS que les parties aériennes, alors que la proportion de MO contenue dans les racines est plus faible. Afin de mieux comprendre les processus de dégradation et/ou de stabilisation de la MOS, nous avons choisi d'étudier dans une chronoséquence blé/maïs, la dynamique des marqueurs de deux biopolyesters, les cutines et les subérines, spécifiques des parties aériennes et souterraines des plantes. Le blé est une plante en C₃ ($\delta^{13}\text{C} \approx -28\text{‰}$) alors que le maïs est une plante en C₄ ($\delta^{13}\text{C} \approx -12\text{‰}$). Ce dispositif permet de suivre *in situ*, l'incorporation des marqueurs provenant du maïs à la MOS, par mesure de leur $\delta^{13}\text{C}$ dans le sol. Les marqueurs des cutines du maïs ne sont pas ou peu incorporés à la MOS, alors que ceux des subérines du maïs le sont, lors des six premières années de culture de maïs. Les marqueurs des cutines sont stabilisés dans le sol, soit parce qu'ils appartiennent à un compartiment chimiquement réfractaire, soit parce qu'ils sont protégés par la matrice du sol (protection physique, adsorption sur les minéraux). Les marqueurs des subérines, présentent deux compartiments cinétiques, un rapidement renouvelable, l'autre plus stable suivant les mécanismes de protections semblables à ceux des cutines. En profondeur, la concentration des marqueurs des subérines des racines de maïs augmente alors que celle des cutines diminue, indiquant que le changement de culture de blé à maïs influence la dynamique de la MOS.

Mots clés : Cutine; Subérine; Matière Organique; Sol; Monomère; Marqueur; Blé; Maïs ; Chronoséquence; Isotopie moléculaire; ^{13}C

Contribution of above and below ground plant biomass to soil organic matter assessed by the dynamics of markers of the cutin and the suberin

Abstract

Soil organic matter (SOM) represents an important pool of carbon. In cropland soils, root biomass organic matter (OM) is known to contribute in higher proportion to SOM than above ground biomass OM, when plant biomass is returned to soil. To improve the knowledge on degradation and / or stabilisation processes of SOM, we studied in a wheat/maize chronosequence the fate of markers derived from cutin and suberin, which are specific biopolyesters of above and below ground tissues.. The two cropping plants have different ^{13}C contents. The analysis of the natural ^{13}C labelling of biopolyester markers in the two plants and the soil allows following their incorporation into the SOM pool.

Incorporation rates of cutin and suberin markers display contrasted behaviour between the two biopolyesters. Cutin monomers derived from maize plant are poorly incorporated into SOM inferring that cutins added to the soil is promptly degraded and that monomers released from soils samples arise from old C_3 vegetation. The incorporation rates of the suberin monomers in soils underlined the higher contribution of maize root biomass when compared to wheat one. Stabilisation of suberin markers after 6 years of maize cropping suggested the presence in soils of two kinetic pools for these compounds. The vegetation change from wheat to maize influenced cutin and suberin concentrations in the deep soils. The higher maize root density when compared to that of wheat roots lead to high incorporation of suberin monomers deriving from maize root in all the soil profile. The lower concentration of cutin markers at depth in the soil under maize when compared to the soil under wheat suggested that cutins were degraded in deep soils, although we showed that they were stabilized in the surface horizon.

Keywords: Cutin; Suberin; Soil organic matter, Monomer; Marker; Wheat; Maize; Chronosequence, Molecular isotopes, ^{13}C

Cette thèse a été effectuée au sein du Laboratoire de Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux. Bât. EGER, Campus INA-PG, INRA, 78850 Thiverval-Grignon

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	9
CHAPITRE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1.1 Contexte général de l'étude	17
1.1.1. Rôle de la matière organique dans les sols.....	17
1.1.2. Mécanismes responsables de la stabilisation des matières organiques dans les sols	18
1.1.3. Origine des matières organiques dans les sols	19
1.1.4. Etudes de la composition chimique et de la dynamique des MOS	20
1.2 Les cutines et les subérines	23
1.2.1. Structure et composition.....	23
1.2.2. Méthodes d'analyses plantes/sols des cutines et des subérines.....	26
1.2.2.1. <i>Isolement/Purification</i>	26
1.2.2.2. <i>Caractérisation des polyesters</i>	27
1.2.3. Cutines et subérines dans les plantes blé et maïs	28
1.2.4. Devenir des cutines et des subérines dans les sols	31
1.2.4.1. <i>Contribution des cutines et des subérines à la MOS dans les sols</i>	31
1.2.4.2. <i>Etude de la dégradation de la cutine lors d'incubations</i>	34
1.2.4.3. <i>Réactivité des cutines vis-à-vis des polluants</i>	34
1.3 Objectifs de l'étude.....	35
CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES	37
2.1. Site expérimental de l'étude	39
2.2. Echantillonnages des plantes et des sols	39
2.2.1. Echantillonnage des plantes.	39
2.2.2. Echantillonnage des sols	40
2.2.2.1. <i>Echantillonnage des sols en surfaces</i>	40
2.2.2.2. <i>Caractéristiques des sols en surfaces étudiés</i>	41
2.2.2.3. <i>Echantillonnage des sols en profondeurs</i>	41
2.2.2.4. <i>Caractéristiques des sols étudiés en profondeur</i>	42
2.3. Protocoles d'analyse des biopolymères dans les plantes et les sols	42
2.3.1. Méthodes d'analyses testées sur les feuilles de maïs.	42
2.3.1.1. Extraction des lipides libres.....	43
2.3.1.2. <i>Oxydation à l'oxyde cuivrique (CuO)</i>	43
2.3.1.3. <i>Transesterification (BF₃ 10%/MeOH)</i>	43
2.3.1.4. <i>Saponification (KOH 6%/MeOH)</i>	44
2.3.1.5. <i>Dérivatisation des monomères</i>	44

2.3.1.6. <i>Identification des monomères</i>	44
2.3.1.7. <i>Quantification</i>	44
2.3.1.8. <i>Thermochemolyse/TMAH</i>	45
2.3.2. Méthodes d'analyses des biopolyesters dans les plantes et les sols.....	45
2.3.2.1. <i>Extraction des lipides libres par ASE</i>	45
2.3.2.2. <i>Saponification</i>	45
2.3.2.3. <i>Mesure de la signature isotopique des monomères</i>	46
CHAPITRE 3 COMPARAISON DE TROIS METHODES DE DEPOLYMERISATION SUR DES FEUILLES DE MAÏS APPLICATION DE LA METHODE SELECTIONNEE A UN SOL	47
3.1. Introduction	49
3.2. Material and methods	52
3.2.1. Plant samples and pretreatment.....	52
3.2.2. Soil sampling and pretreatment.....	52
3.2.3. Saponification.....	52
3.2.4. Transesterification.....	52
3.2.5. CuO oxidation.....	53
3.2.6. Derivatisation.....	53
3.2.7. Identification.....	53
3.2.8. Quantification.....	54
3.2.9. Thermochemolysis.....	54
3.3. results and discussion	55
3.3.1. Distribution of monomers from the three depolymerisation methods with maize leaves.	55
3.3.1.1. <i>Monomers specific for cutin</i>	55
3.3.1.2. <i>Other aliphatic monomers recovered from depolymerisations</i>	58
3.3.2. Comparison of methods.....	60
3.3.2.1. <i>CuO oxidation vs. Saponification</i>	60
3.3.2.2. <i>Saponification vs. transesterification</i>	61
3.3.2.3. <i>Derivatisation procedure</i>	63
3.3.2.4. <i>Thermochemolysis/TMAH</i>	64
3.3.3. Bound lipids released by saponification of a soil sample.	66
3.3.3.1. <i>Cutin-derived monomers</i>	68
3.3.3.2. <i>Other aliphatic compounds non specific for cutin</i>	69
3.4. Conclusion	71

CHAPITRE 4 COMPOSITION MONOMERIQUE ET SIGNATURE ISOTOPIQUE DES CUTINES ET DES SUBÉRINES DANS LES FEUILLES, TIGES ET RACINES

4.1. Introduction	75
4.2. Material and methods	78
4.2.1. Sampling and preparation of plant samples	78
4.2.2. Saponification	78
4.2.3. Derivatisation	78
4.2.4. Identification	78
4.2.5. Quantification	79
4.2.6. Isotopic measurements	79
4.3. Results and discussion	80
4.3.1. Monomeric composition of the biopolyesters in plants	80
4.3.1.1. <i>Carboxylic acids</i>	81
4.3.1.2. <i>n-alcohols</i>	82
4.3.1.3. <i>ω-hydroxy carboxylic acids</i>	82
4.3.1.4. <i>α-hydroxy carboxylic acids</i>	83
4.3.1.5. <i>diacids</i>	85
4.3.1.6. <i>Mid-chain hydroxy acids</i>	85
4.3.1.7. <i>Distribution of mid-chain hydroxy monomers in wheat leaves</i>	86
4.3.1.8. <i>Distribution of mid-chain hydroxy monomers in maize leaves</i>	87
4.3.1.9. <i>Mid-chain hydroxy monomers released from maize and wheat roots</i>	88
4.3.1.10. <i>Distribution of mid-chain hydroxy monomers in maize and wheat stems</i>	88
4.3.2. Specificity of the monomers and their possible use as biomarkers of below and aboveground tissues.	88
4.3.3. Isotopic composition	89
4.3.3.1. ^{13}C depletion of biopolyesters compared to bulk organs	90
4.3.3.2. $\delta^{13}\text{C}$ values of monomers released from plant organs	90
4.4. Conclusion	94

CHAPITRE 5 DYNAMIQUES DES MONOMÈRES SPECIFIQUES DES CUTINES ET DES SUBERINES DANS UN SOL AGRICOLE

5.1. Introduction	97
5.2. Material and methods	99
5.2.1. Experimental site, sampling and sample preparation	99
5.2.2. Saponification	99
5.2.3. Derivatisation	100
5.2.4. Identification	100
5.2.5. Quantification	100

5.2.6. Isotopic measurements.....	101
5.3. Results and discussion.....	102
5.3.1. Comparison between monomer inputs from plants with soil monomers distribution:	102
5.3.1.1 <i>Specific root/shoot origin of the monomers present in soils</i>	102
5.3.1.2. <i>Relative distributions of monomers and classes of monomers from plants to soils: selective preservation and/or degradation in soils.</i>	108
5.3.2. Maize-derived monomers in soils after 6 and 12 year of maize cropping.	109
5.3.2.1. <i>Isotopic signature of monomers released from plants and soils</i>	110
5.3.3.2. <i>Incorporation of monomers specifics for roots and shoots polymers</i>	112
5.4. Conclusion.....	115
CHAPITRE 6 DYNAMIQUES DES CUTINES ET DES SUBERINES EN PROFONDEUR LORS D’UN CHANGEMENT DE CULTURE BLE/MAÏS.....	117
6.1. Introduction	119
6.2. Résultats et discussions	121
6.2.1. Concentrations des monomères aliphatiques en profondeur dans les sols sous blé et sous maïs.	121
6.2.1.1. <i>Concentration des lipides liés totaux dans les sols sous blé et sous maïs</i>	121
6.2.1.2. <i>Contribution des monomères spécifiques des racines à la MOS en profondeur ..</i>	125
6.2.1.3. <i>Contribution des monomères spécifiques des cutine à la MOS en profondeur</i>	126
6.2.2. Mesures des signatures isotopiques des monomères spécifiques en profondeur.	129
6.2.2.1. $\delta^{13}C$ <i>des monomères spécifiques des subérines racinaires en profondeur.</i>	129
6.2.2.2. $\delta^{13}C$ <i>des monomères spécifiques des cutines des parties aériennes en profondeur.</i>	130
6.3. Conclusion.....	131
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	133
REFERENCES	137

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Cette thèse s'inscrit dans un ensemble de projets cherchant à identifier et à comprendre les mécanismes de stockage du carbone, sous forme de matières organiques, dans les sols cultivés. Les matières organiques du sol (MOS) sont étudiées, en raison de leur importance agronomique et environnementale. En agronomie, la matière organique (MO) est une source de nutriment pour les plantes et les microorganismes (Manlay et al., 2007). Elle permet aussi une meilleure cohésion de la structure physique des sols et augmente la rétention d'eau (Jiao et al., 2006). D'un point de vue environnemental, la MO contribue à la rétention de polluants, évitant ainsi leur lessivage vers nappes phréatiques et cours d'eau. Une meilleure gestion des stocks de carbone passe par une meilleure compréhension des processus de dégradation et de stabilisation. Ces derniers sont encore mal connus en raison de leur complexité. Dans les sols, les MOS proviennent essentiellement des résidus végétaux et des microorganismes présents et représentent un stock de carbone 2 à 3 fois plus important que le carbone contenu dans l'atmosphère et dans la biomasse végétale. Différents mécanismes permettent d'expliquer la préservation des MO dans les sols : protection physique, protection physico-chimique et récalcitrante chimique (Six et al., 2002). C'est l'action conjointe de ces mécanismes qui détermine le temps de résidence des MO dans les sols (Sollins et al., 1996) et peut conduire à leur préservation et au stockage de carbone sous forme organique à court, moyen et long terme.

En raison de la complexité de leur structure, les MOS sont mal caractérisées au niveau moléculaire (Gleixner, 2001; Kögel-Knabner, 2002). Cependant grâce à l'utilisation croissante de nouvelles méthodes d'analyses chimiques de pointe pour l'études des MOS (spectrométrie de masse, méthodes spectroscopiques...) la connaissance de la composition chimique des MOS s'améliore (Gleixner, 2001; Gonzalez Perez et al., 2004; Hempfling et al., 1988; Hempfling et al., 1986; Kögel-Knabner, 1997; Naafs et al., 2004; Nierop, 2001). Il reste toutefois beaucoup de travaux à mener pour comprendre l'influence de la composition chimique au niveau moléculaire sur les mécanismes de transformation qui conduisent les MO fraîches apportées au sol à contribuer aux différents pools cinétiques de carbone du sol.

En effet, les mécanismes de dégradation/stabilisation des MOS pourraient agir différemment en fonction de la nature des MO apportées aux sols. Ainsi les MO apportées par les racines contribueraient de manière plus importante aux MOS que les MO de parties aériennes, alors que cet apport en MO par les racines est plus faible que celui des feuilles et des tiges (Rasse et al., 2005). Comprendre l'influence de l'origine aérienne ou souterraine des MO et leur

dynamique dans les sols permettrait de mieux comprendre les mécanismes de dégradation/stabilisation qui agissent sur les résidus végétaux.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons de rechercher des marqueurs moléculaires permettant de différencier l'origine aérienne ou souterraine des MOS et d'étudier leurs dynamiques dans les sols. Nous rechercherons ces marqueurs au sein des cutines et subérines, polymères d'origine végétale car elles sont à priori spécifiques respectivement des parties aériennes et souterraines des plantes (Kolattukudy 1981). Nous suivrons la cinétique de renouvellement de ces marqueurs spécifiques dans les sols. Les cutines et les subérines sont des macromolécules insolubles et récalcitrantes chimiquement et biologiquement en raison de leur structure macromoléculaire (de Leeuw et Largeau, 1993). Une bibliographie importante existe sur l'étude de ces biopolymères dans les plantes, en raison de leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques exceptionnelles (Benitez et al., 2004a; Bernards, 2002; Cordeiro et al., 1997; Dean and Kolattukudy, 1976; Dean and Kolattukudy, 1977; Espelie et al., 1980; Holloway, 1983; Kolattukudy, 1984; Kolattukudy and Dean, 1974; Riederer and Schonherr, 1988; Schmidt and Schönherr, 1982; Zeier and Schreiber, 1998). Dans les sédiments, les monomères spécifiques de la cutine sont utilisés comme marqueur des plantes supérieures (Cardoso and Eglinton, 1975, 1983; Goñi and Hedges, 1990b, 1990c). Enfin, dans les sols, les cutines et les subérines sont très étudiées car elles contribuent de manière importante à la MOS (Kögel-Knabner, 2002; Kögel-Knabner et al., 1989; Nierop et al., 2003; Otto et al., 2005; Riederer et al., 1993; Rumpel et al., 2004). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la dynamique des cutines et des subérines dans les sols.

Les méthodes utilisant l'isotope stable du carbone, le ^{13}C , sont des outils de choix pour étudier la dynamique des MO dans les sols. Dans les sols, les processus de transformation des résidus végétaux n'introduisent qu'une très faible variation du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, ce qui signifie que les MOS possèdent un rapport isotopique proche de celui de la végétation qui y pousse (Mariotti, 1991). Les plantes en C_3 et C_4 possèdent des signatures isotopiques différentes (Smith and Epstein, 1971), et permettent de suivre la dynamique de MO dans les sols (Balesdent et Mariotti, 1996). Nous utiliserons un champ expérimental de l'INRA de Versailles utilisant une chronoséquence blé (C_3) / maïs (C_4) pour suivre in situ l'incorporation dans les sols des marqueurs spécifiques des deux biopolymères grâce à la mesure du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Les objectifs de la thèse étaient d'identifier les monomères spécifiques des tiges, feuilles et racines des plantes de maïs et de blé et de mesurer leur valeur isotopique dans les plantes et dans les sols de la chronoséquence C_3/C_4 afin d'estimer leur dynamique de renouvellement

dans les sols. Pour mieux évaluer l'impact des pratiques agricoles sur l'incorporation des résidus végétaux aux MOS, nous avons également étudié ces deux biopolymères à différentes profondeurs.

Nous avons divisé ce travail en six chapitres dont le premier est une revue bibliographique sur les matières organiques dans les sols, leur composition et fonctions. Cette partie regroupe les données bibliographiques sur la structure chimique des cutines et des subérines dans les plantes et leurs contributions aux MOS. Un deuxième chapitre regroupe les caractéristiques du site étudié, l'échantillonnage des sols et des plantes ainsi que les méthodes utilisées pour l'étude des cutines et des subérines. A partir de la revue bibliographique, il est apparu que plusieurs méthodes d'analyses étaient utilisées pour l'étude des biopolymères dans les plantes comme dans les sols. Le chapitre 3 teste trois méthodes de dépolymérisation les plus couramment utilisées pour l'étude des cutines et des subérines dans les plantes et dans les sols, afin de sélectionner la méthode la plus sélective vis-à-vis des monomères caractéristiques des biopolymères pour l'étude des polymères dans les plantes comme le maïs et le blé et dans un sol agricole, où la concentration en carbone organique est faible. La composition en monomères provenant de la dépolymérisation des trois parties (feuilles, tiges, racines) des deux plantes (blé et maïs) étudiées ainsi que la signature isotopique de ces monomères sont discutés dans le chapitre 4. L'objectif de ce chapitre est d'identifier les monomères caractéristiques des parties aériennes et racinaires des plantes, en comparant concentrations et distributions de monomères au sein de la plante et entre les plantes de blé et de maïs. Le chapitre 5 est consacré à l'étude de la dynamique d'incorporation des monomères provenant du maïs lors de la chronoséquence blé / maïs. Enfin, dans le dernier chapitre de cette étude, nous nous sommes intéressés à la dynamique des cutines et des subérines en profondeur dans deux sols de la chronoséquence.

Les résultats de ce travail sur les dynamiques des cutines et subérines dans les sols devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de dégradation/stabilisation des parties aériennes et souterraines des plantes et leur contribution au stockage de carbone. Ces structures étant réactives vis-à-vis des micropolluants organiques, mieux connaître leur dynamique dans les sols pourra aider aussi à mieux comprendre leur influence sur la dynamique des polluants.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Synthèse bibliographique

1.1 Contexte général de l'étude

1.1.1. Rôle de la matière organique dans les sols

La matière organique des sols (MOS) est un élément essentiel au bon fonctionnement d'un sol. En effet, quantité et composition chimique de la matière organique agissent sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol (Pare et al., 1999). Des études montrent que la cohésion structurale d'un sol est directement reliée à la quantité de MOS (Barral et al., 2007). La cohésion d'un sol offre un meilleur support physique aux cultures et évite les phénomènes d'érosions. La MOS influence les caractéristiques chimiques des sols (pH, nutriments minéraux) et agit sur le devenir des polluants dans les sols (rétention, dégradation) (Barriuso et al., 1996; Huang et al., 2003). De plus, la décomposition de la matière organique dans les sols libère les éléments nutritifs essentiels pour les organismes vivants et les plantes (Manlay et al., 2007). La MOS permet aussi une meilleure rétention de l'eau, rendant l'eau ainsi que les nutriments qui y sont présents plus disponibles pour les plantes et les microorganismes (Jiao et al., 2006).

De plus, la MOS est une forme de stockage de carbone dans les sols (Batjes, 1996) car la MOS contenue dans les sols constitue un réservoir important de carbone (2 fois le stock de CO₂ atmosphérique et 3 fois celui de la végétation), sensible aux changements climatiques et aux activités humaines. Dans le contexte actuel de réchauffement climatique, provoqué par une augmentation du CO₂ atmosphérique depuis plus d'un siècle due aux activités anthropiques (combustion fossile, déforestation, etc...) (Eswaran et al., 1993; Bruce et al., 1999; Amundson, 2001), mieux comprendre la dynamique de la MOS devient primordial (Houghton, 1995).

Les pratiques culturales entraînent une augmentation de la minéralisation de la matière organique dans les sols et donc une diminution des stocks de carbone (Lal, 2002). Afin de lutter contre cette diminution de MOS, des actions sont mises en œuvre comme l'apport de matière organique tel que le fumier ou le compost ainsi qu'une meilleure gestion des sols (Robert et Saugier, 2003). L'apport de compost augmente significativement le carbone organique présent dans le sol, stimule l'activité microbienne, et conduit à une amélioration des rendements des cultures et des propriétés physiques du sol (Annabi, 2005 ; Moldes et al, 2007 ; Odlare et al, 2007). La mise en œuvre de pratiques agricoles favorisant le stockage de

carbone dans les sols sous forme de MOS devient un facteur primordial (Jean-Baptiste et Ducroux, 2003). Pour cela, une meilleure compréhension de l'impact des MO provenant des plantes cultivées sur la MOS et des processus de stabilisation et de dégradation subies par ces MO fraîches dans les sols est nécessaire. En effet, c'est l'action conjointe des processus de stabilisation et de dégradation des MO fraîches corrélées à leur nature chimique qui conduit cette même MO à se stabiliser et à stocker du carbone sous forme organique dans les sols à court, moyen et long terme (Six et Jastrow, 2002). De plus, les études menées sur la dynamique des MOS dans les sols agricoles montrent des résultats très contrastés quant à l'effet d'un changement de pratiques agricoles (labour, non labour, restitution des résidus de cultures) sur l'accumulation ou la diminution des stocks de carbone. En effet, Campbell et al., (1991) rapportent que les stocks de carbone ne sont pas modifiés après 30 ans de restitution de résidus de blé. De même, 13 ans de restitution des parties aériennes de maïs diminue les stocks de carbone dans les sols lorsque ceux-ci sont comparés aux mêmes champs cultivés sans incorporation de la biomasse aérienne (Clapp et al. 2000). D'autres études montrent que la restitution ou la non-restitution de la biomasse aérienne de maïs sur 30 ans de culture n'a pas d'impact sur les stocks de carbone des les sols (Reicosky et al. 2002).

Les processus conduisant à une préservation et/ou dégradation des MO initiales incorporées dans le sol sont mal connus. Les modèles prédisant les dynamiques des MO dans les sols distinguent trois compartiments ayant des cinétiques de dégradation variables : un premier compartiment se dégradant rapidement (temps de résidence de l'ordre de l'année), un compartiment ayant un temps de résidence moyen dans le sol (plusieurs dizaines d'années), et un compartiment stable avec un temps de résidence de plusieurs centaines d'années. C'est ce dernier compartiment qui est responsable du stockage de carbone à long terme (Six et Jastrow, 2002). Par conséquent, une meilleure connaissance de ses processus conduisant à la dégradation et/ou stabilisation des MO dans les sols permettrait de mieux gérer les stocks de carbone dans les sols agricoles.

1.1.2. Mécanismes responsables de la stabilisation des matières organiques dans les sols

La stabilisation des MOS est complexe car elle fait appel à différents mécanismes (Six et al., 2002):

- Les processus physiques (protection des MO dans les agrégats des sols)
- Les processus physico-chimiques (adsorption des MO sur les matrices minérales)
- Les processus chimiques (récalcitrance de certaines molécules)

- Les processus biologiques (biodégradation par les microorganismes qui induisent des transformations des MO)

Ces différents mécanismes sont dépendants les uns des autres et c'est leur action conjointe qui conduit à la stabilisation des MOS (Sollins et al., 1996).

D'autres conditions interviennent dans la stabilisation des MOS comme les facteurs environnementaux (température, hydrologie...), la nature du sol ainsi que la nature de la matière organique apportée aux sols. Tous ces processus de dégradation et de stabilisation des MO changent les caractéristiques de la MO initiale par transformation, polycondensation et/ou par préservation sélective de certains composés (Baldock et al., 2006; Gleixner, 2001; Sollins et al., 1996). Les MOS forment par conséquent une matrice très complexe plus ou moins différente des MO initiales selon le degré de dégradation.

Ces mécanismes agissent différemment sur les différentes molécules des plantes, qui peuvent avoir des dynamiques contrastées (Gleixner, 2001; Six and Jastrow, 2002). Des études sur la dynamique et les temps de renouvellement des acides carboxyliques libres (Wiesenberg et al., 2004a), des lignines (Bahri et al., 2006), ou des sucres (Derrien et al., 2006) ont déjà été menées. Il en résulte que des molécules comme les sucres représentent jusqu'à 10% du carbone du sol, alors qu'elles sont facilement biodégradables, et que les lignines, macromolécules considérées comme récalcitrantes chimiquement et biologiquement, se dégradent relativement rapidement dans les sols. Au vu de toutes les études menées et des efforts faits pour prédire le comportement des MOS, il semble nécessaire d'approfondir la dynamique des MOS à l'échelle moléculaire. Comme les lignines, les cutines et les subérines sont des macromolécules qui contribuent de manière importante à la MOS (Kögel-Knabner et al., 1992a; Otto and Simpson, 2006; Riederer et al., 1993) mais n'ont pas fait l'objet, à notre connaissance, d'étude sur leurs dynamiques.

1.1.3. Origine des matières organiques dans les sols

La matière organique des sols (MOS) est définie comme étant de la matière morte provenant essentiellement des résidus végétaux et des microorganismes qui y sont présents. Les végétaux sont majoritairement composés de polysaccharides (cellulose, hémicellulose) et de lignine. On retrouve aussi des protéines, pigments, tannins, lipides, lignines, cutines et subérines. Les microorganismes sont pour leur part majoritairement composés de polysaccharides, de lipides et de protéines (Kögel-Knabner, 2002). Tous ces composés se retrouvent dans les MOS à différents stades de dégradation, constituant une importante

réserve de carbone dans une matrice très complexe. Mieux connaître la composition des MO initiales des végétaux et des microorganismes et leurs dynamiques dans les sols permettrait de comprendre les processus de dégradation et stabilisation des MOS (Gleixner, 2001).

C'est en profondeur que l'on retrouve les MO les plus stables comme le montrent les profils de datation au ^{14}C (O'Brein and Stout, 1978). Or, en profondeur, on constate une augmentation de la teneur relative en chaînes aliphatiques qui peuvent représenter jusqu'à 40% du carbone organique total (Kögel-Knabner et al., 1992b; Nierop, 1998; Rumpel et al., 2004). Ces structures aliphatiques ont deux origines possibles : soit elles proviennent des composés sélectivement préservés de la biodégradation comme les cutanes et subéranes (Nip et al., 1986; Tegelaar et al., 1989c; Augris et al., 1998) ou cutines et subérines (Kögel-Knabner, 1992b). La contribution des composés aliphatiques dérivés des microorganismes et des composés aliphatiques non-saponifiables tels que les cutanes et les subéranes aux MOS stables serait faible (Kögel-Knabner et al., 1992a). Ces structures aliphatiques stables pourraient aussi provenir de la polycondensation des composés aliphatiques dérivés des plantes (Kögel-Knabner et al., 1992a; Riederer et al., 1993; Gupta et al., 2007a,b).

Des études ont montré que la contribution des racines aux MOS serait 2.4 fois plus importante que celle des parties aériennes des plantes, bien que ces dernières représentent la majeure partie de la biomasse incorporée dans les sols (Balesdent et Balabane, 1996, Rasse et al., 2005). Barber et al. (1979) et Hooker et al. (1982) ont montré que la restitution au sol de la biomasse aérienne des résidus de culture contribuait à l'augmentation de carbone organique dans les sols. Toutefois, cette contribution est bien moindre que celle des parties racinaires.

La protection physique des racines par les agrégats ainsi qu'une récalcitrance à la biodégradation de ses constituants seraient les causes majeures de la préservation de la MO provenant de racines par rapport à celle provenant des parties aériennes des plantes (Rasse et al., 2005). De plus les processus physicochimiques d'adsorption dans les matrices du sol des exsudats racinaires ou de produits de dégradation des racines pourraient conduire à une préservation de la MO provenant des racines vis à vis des microorganismes (Christensen, 1996).

1.1.4. Etudes de la composition chimique et de la dynamique des MOS

Les avancées des techniques d'analyse des matrices organiques complexes pendant ces vingt dernières années ont permis de mieux comprendre le devenir des MO dans les sols ainsi que les processus de dégradation et de stabilisation. On distingue les méthodes spectroscopiques

des méthodes d'analyses au niveau moléculaire, soit des produits extractibles comme les lipides libres (Amblès et al., 1994; Quénéa et al., 2004), soit après dégradation chimique ou thermique des MOS (Amblès et al., 1991, Gobe et al., 2000, Quénéa et al., 2005). De plus l'analyse de l'isotope stable ^{13}C permet de suivre les cinétiques de renouvellement au niveaux global ou moléculaire (Balesdent et Mariotti, 1996; Boutton, 1996; Mariotti, 1991, Hayes et al., 1990).

Grâce à la RMN du ^{13}C (Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone) et à l'IRTF (Infrarouge à transformée de Fourier) par exemple, il est possible de caractériser les structures et fonctions majoritaires des MOS et de suivre leur évolution au cours du temps parfois sans étapes préalables d'extractions chimiques (Baldock et al., 2006; Gonzalez Perez et al., 2004; Hempfling et al., 1986; Kögel-Knabner, 1997).

D'un point de vue moléculaire, la pyrolyse et la thermochemolyse couplées à la chromatographie en phase gazeuse (CG) et à la spectrométrie de masse (MS) permettent d'avoir des indications sur la composition moléculaire de macromolécules et leur provenance (plantes ou microorganismes, produits de dégradation) (Capriel et al., 1990; Amblès et al., 1993; Almendros et al., 1997; Clifford et al., 1995; Augris et al., 1998; Clausen et al., 1998; Leinweber and Schulten, 1999; Nierop et al., 2001; Dorado et al., 2003) que ce soit sur les substances humiques (Saiz-Jimenez and De Leeuw, 1985, 1987; Saiz-Jimenez, 1994; Fabbri et al., 1996), ou la MO totale (Hempfling et Schulten, 1990; Leinweber et Schulten, 1995). La thermochemolyse est surtout utilisée lorsque les macromolécules que l'on veut étudier possèdent des unités polaires comme les lignines ou les subérines (Clifford et al., 1995; McKinney et al., 1995; Nierop et al., 2003; Klingberg et al., 2005; Ohra-aho et al., 2005). En effet, cette technique augmente la volatilité des composés polaires en méthylant les fonctions les fonctions alcools ou acides. Ces molécules sont ainsi analysables en chromatographie en phase gazeuse alors qu'elles n'auraient pas été détectées avec les techniques conventionnelles de pyrolyse/CG/SM.

L'extraction par différents solvants permettent l'étude des lipides (Stevenson, 1966; Morrison, 1969; Diné et Schnitzer, 1990; Amblès et al., 1994; Quénéa et al., 2004; Wiesenberg et al., 2004a,b). Les dégradations chimiques par oxydations ou hydrolyses utilisant des produits chimiques plus ou moins agressifs agissant spécifiquement sur certaines liaisons, et l'identification des produits de dégradation par CG-SM, ont aussi permis de mieux caractériser la structure des MOS (Amblès et al., 1991; Kögel-Knabner, 1992a,b; Quénéa et al., 2005).

Cependant, ces méthodes ne permettent pas de déterminer la contribution réelle aux MOS des

matières organiques fraîches apportées continuellement au sol.

L'analyse de l'abondance naturelle de l'isotope du carbone ^{13}C a été appliquée en science du sol pour répondre à cette question. L'élément carbone a deux isotopes stables, le ^{12}C (abondance naturelle de 98.9%) et le ^{13}C (abondance naturelle de 1.1%). Il existe chez les plantes deux types de chemin photosynthétique, le cycle photosynthétique où le premier produit formé après fixation du CO_2 est composé de 3 carbones (plantes en C_3) et celui où le premier produit formé après fixation du CO_2 est composé de 4 carbones (plantes en C_4). Cette différence de chemin de synthèse induit un fractionnement isotopique du CO_2 assimilé par la plante (Smith et Epstein, 1971). Ainsi les plantes en C_4 sont enrichies en ^{13}C par rapport aux plantes en C_3 . Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est exprimé en $\delta^{13}\text{C}$ par rapport à un standard international, le VPDB (Vienna Pee Dee Beleenite) (équation 1):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{éch}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} \right] \times 1000 \quad \text{équation 1}$$

Dans les sols, les processus de dégradation des résidus végétaux n'introduisent qu'une très faible variation du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, ce qui signifie que la MOS possède un rapport isotopique proche de celui de la végétation qui les recouvre. Lors de tout changement de végétation entre des plantes C_3 et C_4 , les MOS vont progressivement incorporer les MO des végétaux qui poussent sur ce sol. Il est possible alors, de suivre in situ la variation du rapport isotopique de la MOS et donc leur cinétique de renouvellement (Mariotti, 1991; Balesdent et Mariotti, 1996; Boutton, 1996). L'avancée la plus remarquable dans le domaine des isotopes stables du C a été l'analyse isotopique moléculaire (Hayes et al., 1999). Elle permet de déterminer la provenance des molécules (plantes C_3 ou C_4 , microorganismes...) dans les sols et les sédiments. Ainsi, la signature isotopique des biomarqueurs de plantes ou de microorganismes dans les sédiments permet de reconstruire les paléoclimats (Hayes et al., 1999; Chikaraishi et Naraoka, 2005; Dümig et al., 2007). Cet outil analytique est également utilisé dans les sols agricoles pour estimer la dynamique des lipides (Wiesenberg et al., 2004a; Quénéa, et al., 2006;), et pour modéliser les temps de résidence des lignines (Bahri et al., 2006) et des sucres (Derrien et al., 2006).

1.2 Les cutines et les subérines

1.2.1. Structure et composition

Une bibliographie scientifique conséquente s'est intéressée à la composition chimique, et la structure physique ainsi qu'à la synthèse des cutines et des subérines dans les plantes. On peut classer ces études en deux catégories : celles qui étudient ces biopolymères dans une optique botanique et physiologie végétale (structure, rôle dans la plante, synthèse, échanges...), et celles qui s'intéressent au devenir de ces macromolécules dans le milieu naturel (dégradation, contribution aux MOS, biomarqueurs des végétaux dans les sédiments). C'est pour la première catégorie que l'on trouve le plus d'études.

• La cutine

La cutine est un biopolymère amorphe qui, associé aux cires (mélange de différents lipides aliphatiques, esters, acides gras, etc.) forme la cuticule (Kolattukudy et Walton, 1973). Elle est constituée de monomères d'acides gras possédant une chaîne aliphatique de 16 ou 18 atomes de carbone. La chaîne aliphatique peut comporter une ou plusieurs fonctions alcools, des insaturations, ou une fonction époxyde (Hunneman et Eglinton, 1971; Holloway et al., 1981; Kolattukudy, 1981). Ces monomères sont reliés entre eux par des fonctions ester (figure 1) pour former une macromolécule permettant de réguler l'eau dans la plante, mais aussi de protéger la plante contre les agressions externes qu'elles soient physiques, chimiques ou biologiques (Heredia, 2003).

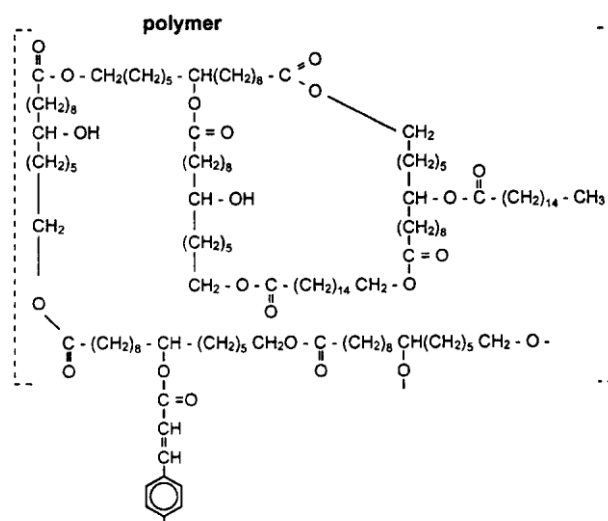
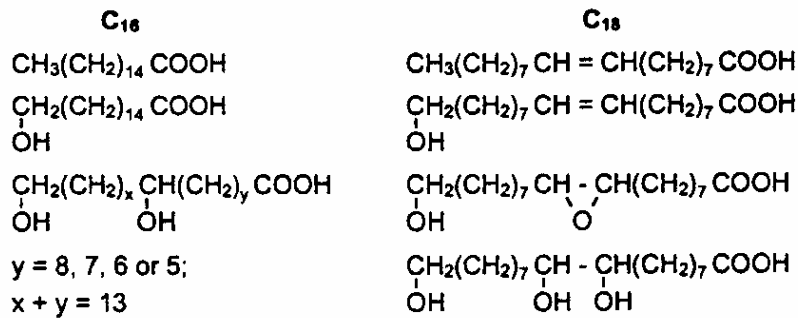


Figure 1 : Représentation schématique de la cutine, d'après Kolattukudy (1981).

Les isomères les plus fréquemment identifiés dans la littérature pour la cutine sont indiqués ci-dessous (d'après Kolattukudy 1981):



Outre ces acides gras hydroxylés, d'autres types de monomères peuvent être présents dans la cutine. Kögel-Knabner et al. (1994) retrouvent des monomères phénoliques comparables à ceux de la lignine dans la cuticule des aiguilles de sapins et estiment que ces monomères représentent jusqu'à 17% en poids de la cuticule (w/w). Graça et al. (2002) ont mis en évidence la présence de monomères de glycérol dans la cutine qui lui permettraient de se structurer de façon tridimensionnelle.

• **La subérine**

La subérine est un biopolymère structuré présent dans le périoderme superficiel des organes aériens et souterrains des plantes (les tiges et les racines). On retrouve aussi la subérine dans la paroi des cellules des tissus internes spécialisés comme dans l'hypoderme (Barnabas, 1996) et l'endoderme des racines et du xylem (Zeier et Schreiber, 1997) etc... Sa fonction principale est de protéger la plante contre les agents pathogènes (bactéries, champignons) (Bernards, 2002). La subérine est constituée d'un domaine aromatique, composé de monomères phénoliques, et d'un domaine aliphatique dit « lamellaire » (figure 2). Les monomères phénoliques présents dans la subérine sont les mêmes que ceux retrouvés dans la lignine. Ils sont constitués majoritairement des unités p-hydroxybenzaldéhyde, vanilline, acide vanillique, acide p-coumarique, acide férulique et acide cafféique (Borg-Olivier et Monties, 1993; Negrel et al., 1996; Bernards et Lewis, 1998; Bernards et Razem, 2001)

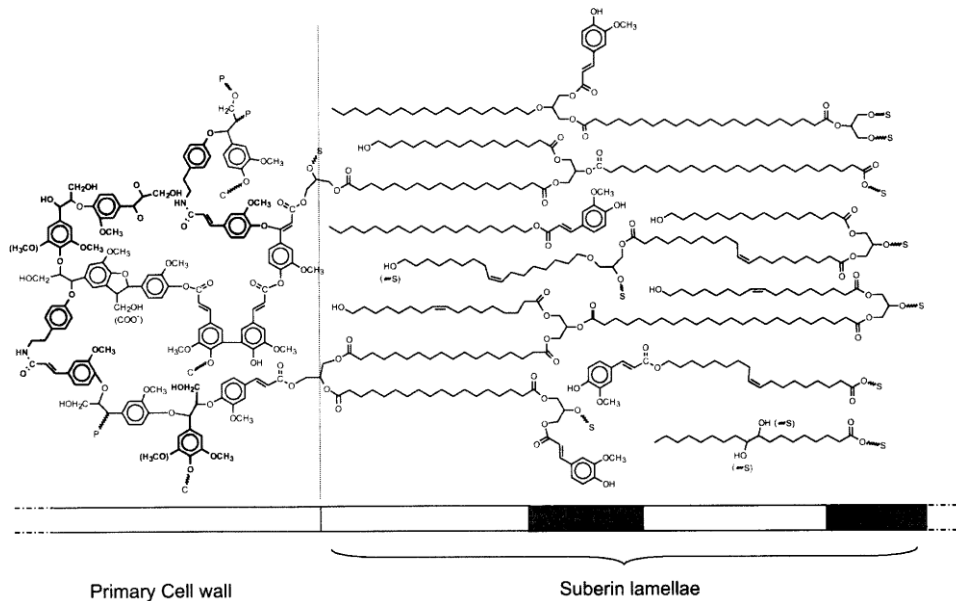
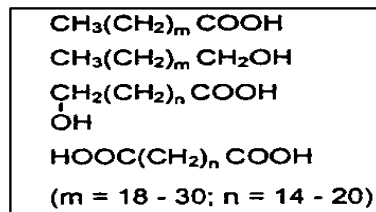


Figure 2 : Représentation schématique de la subérine, d'après Bernardis (2002).

La partie aliphatique est constituée essentiellement de monomères d'acides gras, d'acides gras ayant une fonction alcool en bout de chaîne, de diacides et d'alcools. Les longueurs des chaînes aliphatiques de ces monomères, vont de 16 à 32 atomes de carbone (Kolattukudy, 1981; Holloway, 1983; Matzke and Riederer, 1991; Santos Bento et al., 2001). Les monomères les plus fréquemment identifiés sont donnés ci-dessous (Kolattukudy, 1981) :



Plus récemment, des études ont montré la présence de « glycérols » comme monomères constitutifs de la subérine (Moire et al., 1999) comme dans la cutine. Les proportions sont faibles et varient d'une espèce à l'autre. Ces unités glycérol confèrent à la subérine sa structure tridimensionnelle.

La composition en monomères des biopolymères cutines et subérines varie selon les espèces et selon leur localisation au sein de la plante (Hunneman and Eglinton, 1971; Holloway, 1983; Matzke and Riederer, 1991). Les facteurs environnementaux (eau, température...) influencent aussi la composition monomérique des polymères (Zimmermann et al., 2000). Ces différences

ont conduit plusieurs chercheurs à essayer de différencier des grandes familles végétales en fonction de la composition en monomères de leur cutine (Caldicott et Eglinton, 1976; Goñi and Hedges, 1990b; Matzke et Riederer, 1991).

1.2.2. Méthodes d'analyses plantes/sols des cutines et subérines.

Les études des cutines et subérines dans les plantes et les sols utilisent indifféremment un grand nombre de méthodes d'analyse. Il apparaît qu'il n'y pas de méthode standard d'analyse des cutines et des subérines, que ce soit dans les plantes ou dans les sols. Cependant, il est nécessaire de passer par des étapes clefs qui sont communes aux différents protocoles analytiques utilisés dans la littérature.

1.2.2.1. Isolement/Purification

La première étape de préparation d'un échantillon de plante ou de sol est l'extraction des lipides libres par différents solvants (dichlorométhane, chloroforme, méthanol...). En effet, les cires, par exemple, contiennent des monomères communs avec ceux des cutines et des subérines tel que les acides carboxyliques ou les acides carboxyliques ω -hydroxylés (Kolattukudy et Walton, 1973). Il est nécessaire de les extraire afin d'éviter toute interférence avec les monomères que l'on veut étudier.

Dans le cas des plantes, les biopolyesters peuvent ensuite être isolés par voie chimique ou enzymatique. Par exemple l'élimination de la cellulose peut se faire par une hydrolyse acide en présence de Chlorure de zinc (Caldicott et Eglinton, 1976). Mais cette hydrolyse modifie les caractéristiques chimiques des biopolyesters et engendre une perte des monomères insaturés de la cutine. La voie enzymatique est utilisée pour des plantes entières ou broyées. Elle consiste à traiter le résidu végétal avec des enzymes, comme la cellulase, pectinase, hemicellulase (Rocha et al., 2001). Cette étape d'isolement permet d'obtenir des polyesters assez purs.

Dans le cas des sols, des hydrolyses acides successives permettent d'isoler les polyesters. Elles consistent à éliminer le plus de substances tels que les carbohydrates ou les lignines afin de simplifier les analyses et d'éviter les interférences avec d'autres composés. (Nip et al., 1986; Kögel-Knabner et al., 1992a; Nierop et al., 2003).

1.2.2.2. Caractérisation des polyesters

Plusieurs techniques existent pour analyser les cutines et les subérines dans les plantes ou dans les sols. On peut les regrouper en trois catégories : les méthodes spectroscopiques et microscopiques, les méthodes de dégradation thermiques, ou chimiques.

La première catégorie regroupe les techniques qui renseignent sur la structure générale du polyester (e.g. fonctions) dans la plante ou dans la MOS. Se sont des méthodes qualitatives et en général non destructives. La RMN ^{13}C ou l'IR sont les techniques les plus utilisées pour l'étude des polyesters dans les sols mais aussi dans les plantes (Fang et al., 2001; Kögel-Knabner et al., 1992a). Dans les plantes, d'autres techniques comme la spectrométrie de masse MALDI (Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation), les mesures de la pression osmotique, angles de contact etc..., sont utilisées pour caractériser la composition chimique et les propriétés physiques des polyesters (Cordeiro et al., 1997; Cordeiro et al., 1998; Matas et al., 2004). Certaines techniques spectroscopiques comme la RMN ^1H , RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et IRFT, après dépolymérisation partielle, permettent aussi d'identifier des fragments de polyester et de déterminer les enchaînements de monomères (Fang et al., 2001; Ray et al., 1998; Ray et al., 1998).

La thermochemolyse fait partie de la deuxième catégorie des techniques utilisées pour l'analyse des polyesters. Elle s'applique aussi bien à l'étude des polyesters dans les plantes qu'à leur contribution à la MOS (Nip et al., 1986; Tegelaar et al., 1989b,c; Kögel-Knabner et al., 1992a; Bento et al., 1998; del Rio et Hatcher, 1998; Hermosin et Saiz-Jimenez, 1999; Bento et al., 2001; Nierop, 2001; Gonzalez et al., 2003; Nierop et al., 2006;). Cette technique permet d'identifier les monomères présents dans les plantes et dans les sols, mais reste qualitative.

Enfin, la troisième catégorie des techniques utilisées pour l'étude des polyesters est la dépolymérisation chimique. Ces méthodes sont les plus utilisées dans les sols comme dans les plantes car elles permettent de séparer, identifier et quantifier les monomères constitutifs des polymères. Cependant, chaque méthode, selon le réactif utilisé, peut conduire à une sous estimation de certains monomères.

Il existe plusieurs techniques de dépolymérisation des polyesters communes aux plantes, aux sols et aux sédiments :

- la saponification avec NaOH ou KOH dans le méthanol (Cardoso et Eglinton, 1975; Nip et al., 1986; Kögel-Knabner et al., 1992b; Ray et al., 1995; Naafs et Van Bergen, 2002; Nierop et al., 2003;)
- la transesterification par BF_3 dans le méthanol (Riederer et Schonherr, 1988; Kögel-Knabner et al., 1989; Matzke et Riederer, 1990, 1991; Franke et al., 2005; Otto et Simpson, 2006; Riederer et al., 1993). La dépolymérisation par $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ a l'avantage de méthyler les fonctions carboxyliques au fur et à mesure que les monomères sont libérés.
- l'hydrogénolyse par AlLiH_4 (Kolattukudy et Walton, 1973; Espelie et Kolattukudy, 1979). L'hydrogénolyse pose des problèmes d'identification des monomères puisqu'elle réduit les fonctions acides en fonctions alcools. L'identification des monomères natifs nécessite de faire en parallèle une hydrogénolyse avec l'équivalent deutéré du réactif afin de reconnaître les fonctions initialement carboxylées.
- l'oxydation par l'oxyde cuivrique CuO (Dignac et Rumpel, 2006; Goñi et Hedges, 1990a,b,c; Rumpel et al., 2004).
- la dépolymérisation enzymatique est aussi parfois utilisée sur les végétaux. Les rendements de dépolymérisation sont de l'ordre de 10%, alors qu'avec les dépolymérisations chimiques on peut atteindre au moins 80% (Ray et al., 1998).

Si toutes ces méthodes d'analyses permettent d'estimer la contribution aux MOS des monomères provenant des cutines et des subérines, aucune ne peut suivre la dégradation de ces polymères végétaux in situ dans les sols.

1.2.3. Cutines et subérines dans les plantes blé et maïs

En utilisant certaines des méthodes décrites ci-dessous, la composition monomérique des cutines et des subérines dans différentes parties des plantes de blé et de maïs a déjà été étudiée. Seule la composition des cutines dans les feuilles de blé et de maïs et des subérines dans les racines de maïs ont été examinées. Les données de la bibliographie sont rassemblées dans le tableau 1. La composition en monomères de la cutine des feuilles de blé est très différente de celle identifiée dans les différents tissus de la feuille de maïs. La cutine des feuilles de blé est composée majoritairement des monomères 9,10-epoxy,18-OH C_{18} (36,7%) et α ,16-DiOH C_{16} (21,45%). Dans les feuilles de maïs, les composés majoritaires sont les acides ω -hydroxylés (32%) avec une forte contribution des monomères ω -OH C_{16} et ω -OH

C₁₈:1. Viennent ensuite les composés 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ (18.5%) et x,16-DiOH C₁₆ (13.7%). Dans le maïs, les monomères en C₁₆ et C₁₈ polyhydroxylés (9,10-epoxy,18-OH C₁₈, x,16-DiOH C₁₆ et 9,10,18-TriOH C₁₈) ne sont retrouvés que dans les feuilles, alors que la plupart des autres monomères ont été identifiés aussi bien dans les racines que dans les feuilles. A notre connaissance, il n'y a aucune autre donnée sur les polymères présents dans les tiges du blé ou du maïs ou dans les racines de blé.

Chaque étude, utilise une méthode de dépolymérisation chimique différente. Dans le cas de l'étude de Maktze et Riederer, (1990), et de Zeier et al., (1999) la transesterification a été utilisée pour la dépolymérisation des cutines et des subérines, alors que Espelie et Kolattukudy (1979) ont utilisé l'hydrogénolyse.

Il est intéressant de noter que des monomères avec des chaînes aliphatiques supérieures à 18 atomes de carbone sont présents dans la cutine du blé comme celle du maïs. Dans les feuilles de maïs, des tissus spécifiques contenant de la cutine existent en plus de la cutine présente dans la cuticule. La composition monomérique des deux types de cutines présentes dans les feuilles est différente (Espelie et Kolattukudy, 1979). Ce résultat suggère que la composition en monomères des différents biopolyesters dans la plante est directement reliée à leur fonction vis-à-vis du tissu auquel ils sont associés.

Dans les sols, les monomères communs aux différentes cutines ou subérines ne sont pas différenciables. Les monomères polyhydroxylés en C₁₆ ou C₁₈ tels que les x,16-DiOH C₁₆ et le 9,10,18-TriOH C₁₈ sont considérés comme étant spécifiques des parties aériennes des plantes alors que les diacides seraient spécifiques des racines. Cependant, une étude sur la composition monomérique de la subérine de racines de plusieurs espèces de plantes montre la présence de monomères attribués aux cutines tel que le 7,16-DiOH C₁₆ (Zeier et Schreiber 1998). D'autres composés comme les acides carboxyliques ou les alcools peuvent provenir des cires cuticulaires ou des microorganismes (Otto et al. 2005). Il est donc nécessaire de quantifier les monomères totaux provenant de l'ensemble des biopolyesters présents dans la plante afin d'estimer l'incorporation des monomères issus de tous les biopolymères de la plante dans les sols.

Tableau 1 : composition relative en monomères des cutines ou des subérines des différentes parties de plantes de blé et de maïs données en pourcentage de la concentration totale en monomères. Les monomères sont regroupés par familles de composés. Les abréviations correspondent à : ω OH acides = acides ω -hydroxylés, x,16-DiOH C16 = acides hexadécanoïques dihydroxylés en position 16 et (x=7, 8, 9 ou/et10), 9,10,18-TriOH C18 = acide 9,10,18-trihydroxyoctadécanoïque, 9,10-epoxy,18-OH C18 = acide 9,10-époxy, 18-hydroxyoctadécanoïque. C_x correspond au monomère identifié dans chaque famille avec x = nombre de carbone de la chaîne aliphatique.

(1) (Matzke and Riederer, 1990), (2) (Espelie and Kolattukudy, 1979), (3) (Zeier et al., 1999), la valeur donnée ici est une moyenne calculée à partir des données sur la composition monomérique de différents tissus des racines de maïs

	<i>Acides</i>	<i>Diacides</i>	<i>ωOH acides</i>	<i>αOH acides</i>	<i>x,16- DiOH C₁₆</i>	<i>9,10,18- TriOH C₁₈</i>	<i>9,10- epoxy,18- OH C₁₈</i>	<i>Alcan-1- ol</i>
Cuticule feuille de blé (1)	26.5 (C ₁₈ , C ₂₀ et C ₂₄)	-	2.2 (C ₁₆)	12 (C ₂₄)	21.45	-	36.7	-
Cuticule feuille de maïs (2)	1.7 (C ₁₆ , C ₂₀ et C ₂₂)	1 (C _{18:1})	32.4 (C ₁₆ et C _{18:1})	-	13.7	2.7	18.5	7.8 (C ₁₆ , C _{17a} C _{19a} C ₂₀ et C ₂₂)
gaines protectrices dans les feuilles de maïs (2)	3.8 (de C ₂₀ à C ₃₀)	7.2 (C ₁₆ , C _{18:1} , C ₂₂ et C ₂₄)	23.1 (C ₁₆ , C _{18:1} , C ₂₂ et C ₂₄)	-	19.6	6.0	4.6	22.7 (de C _{17a} à C ₃₀)
Racines de maïs (3)	21 (de C ₁₆ à C ₂₆)	23 (C ₁₆ , C _{18:1} , C ₁₈ , C ₂₂ et C ₂₄)	44 (de C ₁₆ à C ₂₈)	9 (de C ₁₆ à C ₂₆)	-	-	-	4 (C ₁₆ , C ₁₈ , C ₂₀ , C ₂₂ , C ₂₄)

1.2.4. Devenir des cutines et des subérines dans les sols

Les cutines et les subérines sont souvent étudiées dans les sols et les sédiments car leurs monomères leur sont spécifiques et sont considérés comme des biomarqueurs des plantes (Cardoso et Eglinton, 1975, 1983; Nip et al., 1986; Nierop et al., 2006;). En réalité, peu d'études ont été menées sur leur dégradation et/ou stabilisation dans les sols. Seules quatre

études ont quantifié la contribution de la cutine et de la subérine à la MOS. Riederer et al., (1993) et Kögel-Knabner et al., (1989) ont étudié la contribution des biopolymères dans les sols sous forêts. Otto et al., (2005) et Otto et Simpson (2006) ont réalisé le même type d'études dans des sols sous forêts et sous prairies. La spécificité des monomères permet de distinguer dans les sols les monomères provenant des cutines, et donc des parties aériennes de plantes, des subérines, plus spécifiques des parties racinaires, et d'estimer la proportion de ces deux biopolymères par rapport à la MOS (Kögel-Knabner et al., 1989; Otto and Simpson, 2006). Une étude préliminaire a aussi été menée dans les sols cultivés (Dignac et Rumpel, 2006).

On distingue les études réalisées sur des échantillons prélevés sur le terrain et celles réalisées après incubations.

1.2.4.1. Contribution des cutines et des subérines à la MOS

Dans les études de Riederer et al., (1993), Otto et al., (2005) et de Otto et Simpson (2006), six classes de monomères aliphatiques sont identifiées dans les sols après dépolymérisation: les acides carboxyliques, les ω -hydroxy acides, les alcan-1-ols, les acides α -hydroxylés, les diacides, et les composés en C₁₆ et C₁₈ polyhydroxylés comme les acides x,16-DiOH C₁₆. Parmi ces familles, seuls les acides ω -hydroxylés, les diacides, et les composés en C₁₆ et C₁₈ polyhydroxylés sont spécifiques des cutines et des subérines dans les sols. L'étude de Kögel-Knabner et al., (1989) ne porte que sur la concentration de quatre monomères, les acides x,16-DiOH C₁₆ (x=9 et 10), 9,10,18-TriOH C₁₈, 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ et l'acide 18-hydroxyoctadéc-9-énoïque. Ces monomères, identifiés dans la litière, appartiennent soit à la cutine des feuilles, soit à la subérine contenue dans les écorces des arbres soit au deux.

Trois études portent sur des sols sous forêt : Otto et Simpson (2006), étudient les sols de 0-10 cm et 10-25cm, Riederer et al., (1993) et Kögel-Knabner et al., (1989), étudient les sols par horizons pédologiques, particuliers à chaque type de sols. L'étude de Otto et al., (2005) a été réalisée dans un sol sous prairie.

Lorsque l'on considère les horizons minéraux (Ah), dans les études de sols sous forêt, l'étude de Riederer et al., (1993), estime que la contribution des cutines et des subérines par rapport à la quantité de carbone organique (C_{org}) est d'environ 5 à 70 mg g⁻¹C_{org} pour la cutine et de 12 à 120 mg g⁻¹C_{org} pour la subérine selon le type de sol. Lorsque l'on compare ces résultats à l'étude menée par Otto et Simpson (2006) dans d'autres sols sous forêt, la somme des monomères spécifiques des cutines est de 0.2 mg g⁻¹C_{org} et de 0.2 à 0.7 mg g⁻¹C_{org} pour les subérines, soit de 10 à 100 fois plus faibles que dans l'étude de Riederer et al., (1993). Kögel-

Knabner et al., (1989), ont évalué la contribution des cutines et des subérines dans quatre profils de sols sous forêt. La concentration totale des quatre monomères par rapport au carbone organique total varie de 0.8 à 13.5 mg g⁻¹C_{org} pour l'horizon minéral. Si on calcule pour l'horizon minéral la somme de ces quatre monomères pour les études de Riederer et al., (1993), et de Otto and Simpson (2006) on trouve des concentrations de l'ordre de 2.4 à 7 mg g⁻¹C_{org} et de 1.6 à 2.1 mg g⁻¹C_{org} respectivement.

Dans les sols sous prairies, les concentrations en monomères spécifiques des cutines et des subérines varient de 0.5 à 0.9 mg g⁻¹C_{org} pour les cutines et 4.5 à 0.6 mg g⁻¹C_{org} pour les subérines (Otto et al., 2005) selon le type de sol.

Les études les plus intéressantes sur le devenir des polyesters sont celles qui concernent les horizons profonds puisqu'elles montrent que la cutine et la subérine sont préservées dans ces horizons (Kögel-Knabner et al., 1989; Riederer et al., 1993). Si leur concentration décroît avec la profondeur, lorsque cette concentration est rapportée au carbone organique total, les profils de concentration (g kg⁻¹ C_{org}) indiquent qu'en profondeur, la contribution de ces polyesters aux MOS augmente ou si elle n'augmente pas, reste importante (figure 3). De plus, les profils de concentration des monomères de la cutine et de la subérine avec la profondeur sont différents ce qui indique que les vitesses de décomposition ne sont pas identiques pour les deux polymères

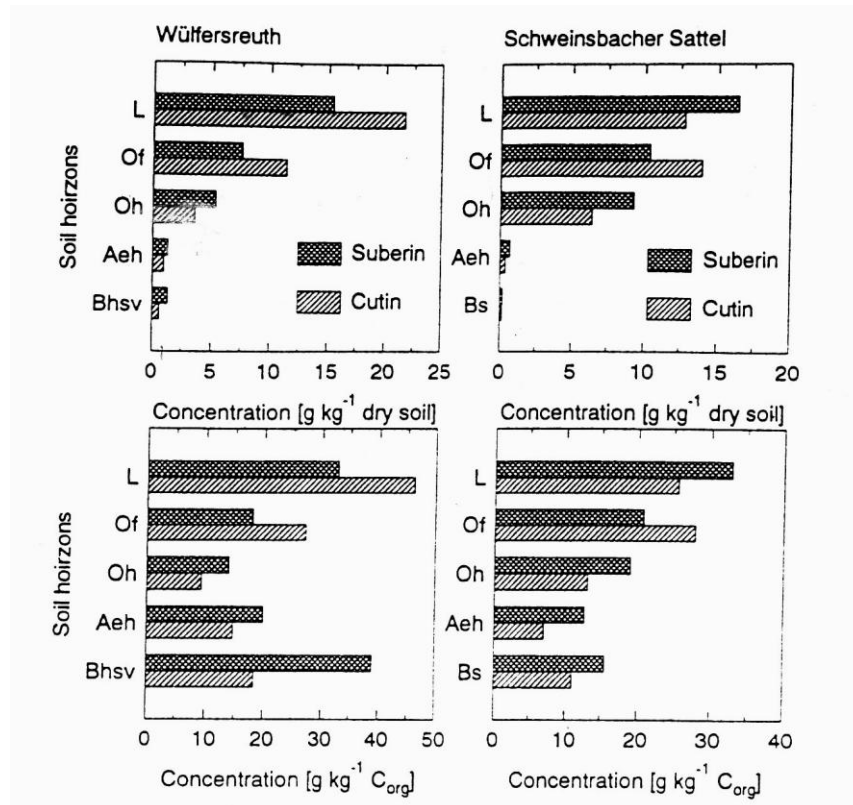


Figure 3 : Concentration des monomères des cutines et des subérines dans deux profils de sol sous forêt. D'après Riederer et al., 1993

Les monomères de la subérine et la cutine sont des marqueurs fiables de la contribution des parties aériennes et souterraines des plantes à la MOS et sont retrouvés en profondeur. Grâce à la RMN et à la pyrolyse, Kögel-Knabner et al., (1992a) a montré que les monomères des cutines et des subérines contribuent fortement au domaine aliphatique de la MOS. Avec la profondeur, la concentration en monomères spécifiques de la subérine contribuent plus à la MOS que ceux de la cutine, ce qui démontre que la contribution des racines à la MOS n'est pas négligeable en accord avec d'autres publications (Balesdent et Balabane, 1996; Nierop et Buurman, 1999; Nierop et al., 2003). Cette préservation peut être due à un apport continu de MO par les racines, ainsi qu'à une récalcitrance chimique et une protection physique de la subérine qui est contenue à l'intérieur des tissus, contrairement à la cutine. Cependant la présence des cutines et des subérines dans les horizons profonds et leur appartenance aux MOS stables ne serait pas due qu'à leur récalcitrance chimique ou à une protection physique. En effet dans les biopolymères il y aurait une augmentation des liaisons entre les chaînes aliphatiques lors des transformations dans le sol modifiant leur structure et augmentant leur résistance à la biodégradation (Tegelaar et al., 1990; Kögel-Knabner et al., 1992b).

1.2.4.2. Etude de la dégradation de la cutine lors d'incubations

Le suivi de la décomposition des cutines des feuilles *in vivo* et *in vitro*, a été réalisé et a permis de déterminer des tendances générales quant à la dégradation de la cutine.

Ces expériences ont porté sur la dégradation de la cutine *in vivo* lors d'incubations d'épines de sapin enfouies dans un sol sous forêt sur une période de 7 ans (Kögel-Knabner et al., 1992a) et sur la dégradation de feuilles de *Fagus sylvatica* incubées en laboratoire sur une période de 446 jours (Riederer et al., 1993).

Dans ces deux études, les auteurs estiment que la cutine et le C_{org} total ont des cinétiques de dégradation similaires. Au bout des périodes entières d'incubation, la cutine s'est dégradée à 70% dans l'étude de Riederer et al., (1993) et à 80% dans l'étude de Kögel-Knabner et al., (1992a). La quantité de monomères de cutines dégradés est plus élevée que la quantité de carbone organique total dégradé pour les deux études ce qui montre que la cutine n'est pas sélectivement préservée dans les sols.

1.2.4.3. Réactivité des cutines vis-à-vis des polluants

Des études ont montré l'importance des cutines vis-à-vis de l'adsorption des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), comme le phénanthrène, et d'hétérocycles comme la triazine (herbicide) (Barriuso et al., 1996). Lors d'expériences d'incubations la cutine favorise l'adsorption des polluants dans les sols et sa dégradation entraîne invariablement la diminution de quantité de polluants adsorbés (Chefetz, 2007; Stimler et al., 2006). L'adsorption des polluants est directement corrélée à l'accessibilité des polluants aux sites d'interactions (Chen et al., 2005), et à l'affinité des polluants sur les différentes fractions cuticulaires (Chefetz, 2003). Une étude, a clairement déterminé que le pyrène s'adsorbe lentement dans la cutine et migre vers l'intérieur du réseau cuticulaire, ce qui rend la désorption plus difficile (Sachleben et al., 2004).

1.3 Objectifs de l'étude

L'objectif général de cette étude est d'estimer la dynamique de renouvellement des cutines et des subérines, marqueurs spécifiques des parties aériennes et souterraines des plantes, dans les sols agricoles et d'évaluer la contribution des racines vs les parties aériennes à la MOS afin de mieux comprendre les processus conduisant à la stabilisation de la MOS. Pour mieux comprendre les processus conduisant à la dégradation et/ou la stabilisation des résidus végétaux dans les sols et de déterminer la contribution à la MOS des racines vs parties aériennes nous avons choisi d'étudier les cutines et les subérines. Ce sont des biomarqueurs spécifiques des parties aériennes et souterraines des plantes, présents dans tous les sols ainsi que dans les sédiments (Cardoso et Eglinton, 1975; Goñi et Hedges, 1990b,c; de Leeuw et Largeau, 1993; Riederer et al., 1993; Otto et Simpson, 2006). Le site expérimental utilisé pour l'étude de ces macromolécules est une chronoséquence blé (C_3) / maïs (C_4). Le dispositif mis en place nous permettra d'étudier la dynamique des cutines et des subérines dans le sol.

En raison de la diversité des méthodes d'analyse de ces biopolyesters dans les plantes et dans les sols, la première partie de ce travail a consisté à tester les trois méthodes de dépolymérisation les plus couramment utilisées pour l'étude des cutines et des subérines dans les plantes et leur contribution à la MOS : l'oxydation à l'oxyde cuivrique (CuO), la saponification (KOH 6%/MeOH) et la transesterification (BF₃ 10%/MeOH). La méthode sélectionnée devait être sélective vis-à-vis des monomères spécifiques des biopolymères. Les trois méthodes de dépolymérisation ont été testées sur des feuilles de maïs, d'une part, parce que la cutine des feuilles contient plus de monomères spécifiques que les autres parties de la plante, d'autre part, parce qu'elle a déjà été étudiée par Espelie et Kolattukudy, (1979). Cela nous a permis d'avoir une première composition monomérique de la cutine et de la comparer à nos propres résultats. En effet, la cutine présente une variété de monomères plus grande que la subérine des racines avec notamment la présence des monomères polyhydroxylés comme les acides dihydroxyhexadécanoïques et trihydroxyoctadécanoïques. Les critères de sélection de la méthode de dépolymérisation sont (1) le rendement de dépolymérisation, (2) le nombre de monomères identifiables et (3) la sélectivité de la séparation de chaque composé permettant quantification et mesure de la signature isotopique.

Une fois la méthode sélectionnée, nous avons identifié et quantifié les monomères libérés par dépolymérisation des racines, des tiges et des feuilles de blé et de maïs. Une connaissance précise des monomères constitutifs des biopolymères présents dans les différentes parties des

deux plantes étudiées (blé et maïs) avant incorporation au sol est nécessaire afin de déterminer quels marqueurs moléculaires seront viables pour l'étude de la dynamique des cutines et des subérines dans les sols. L'objectif de cette partie est de déterminer la spécificité de chaque monomère vis-à-vis des parties aériennes ou racinaires des plantes. Cette partie inclut les mesures des signatures isotopiques des monomères et compare l'analyse des différences de $\delta^{13}\text{C}$ mesurés entre les monomères des différents organes des deux plantes.

La troisième partie se focalise sur la provenance des monomères libérés par dépolymérisation des sols (horizons de surface) et les rendements d'incorporation des monomères déterminés comme étant spécifiques des cutines et des subérines grâce à la chronoséquence blé/maïs. Ces résultats nous permettront d'évaluer la contribution in situ des parties aériennes et racinaires aux MOS et la dynamique d'incorporation des monomères provenant du maïs aux MOS.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons évalué quelle était la contribution de ces monomères à la MOS en profondeur. En effet, c'est en profondeur que l'on retrouve les MO les plus stabilisées.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels et Méthodes

2.1 Site expérimental de l'étude

Le site expérimental « des Closeaux » a été mis au point à l'INRA de Versailles, près de Paris, par Jérôme Balesdent, en 1993. Le site comporte 32 placettes de 6.4 m par 15 m, cultivées sous blé ou ayant recouverte par une végétation en C₃ avant le début de l'expérience (figure 1). Depuis 1993, chaque année, trois parcelles cultivées initialement en blé sont cultivées en maïs. Quatre parcelles témoins continuent à être cultivées en blé.

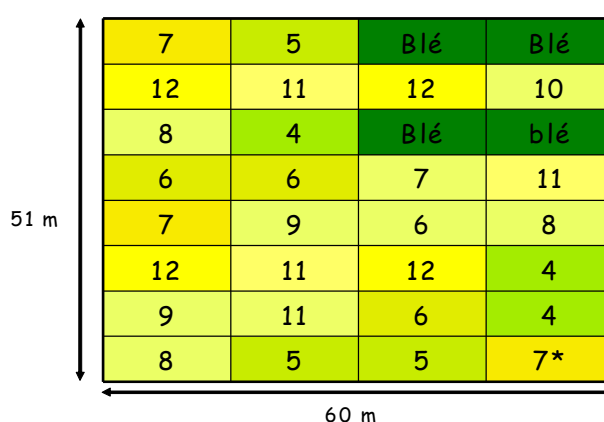


Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental du Site des Closeaux à l'INRA de Versailles. *= nombre d'années de culture de maïs

Deux campagnes de prélèvements en 2002 et 2005 nous ont permis d'avoir des sols de 0 à 12 ans de culture sous maïs.

2.2. Echantillonnages des plantes et des sols

2.2.1. Echantillonnage des plantes.

Les plantes de blé et de maïs ont été échantillonnées juste avant le retour au sol des résidus de culture après récolte des épis. Les différentes parties des plantes ont été séparées séchées à l'air et broyées à 100µm. La teneur en carbone ainsi que la signature isotopique des différents organes des plantes de blé et de maïs sont données dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Les résultats donnés pour les signatures isotopiques dans ce tableau sont proches de ceux déjà publiés dans Dignac et al. (2005). * écart type sur la moyenne calculée à partir de trois réplicats.

Organe	Teneur C	$\delta^{13}\text{C}$
	(mg/g d'organe)	(‰/VDPB)*
Feuilles de blé	176	-28.6±0.5
Tiges de blé	184	-27.6±0.5
Racines de blé	63.5	-28.7±0.5
Feuilles de maïs	170	-12.8±0.5
Tiges de maïs	130	-12.5±0.5
Racines de maïs	126	-11.9±0.5

Les calculs des apports du carbone organique total au sol des feuilles, tiges, et racines des plantes de blé et de maïs ont été calculés à partir de rapports allométriques trouvés dans la littérature. L'estimation des apports a déjà été publiée dans Bahri et al (2006) et sont données ci-dessous :

Tableau 2 : Apport du carbone organique total

	Blé	Maïs
	en g Corg-organe / 100g Corg-plante	
Feuilles	37*	41
Tiges	47	39
Racines	16	20

* Signifie que pour 100g de carbone organique apporté par la plante apporté au sol, 37g provient des feuilles.

2.2.2. Echantillonnage des sols

2.2.2.1. Echantillonnage des sols en surface

Lors de la campagne 2002, les sols de 0 à 9 ans de culture sous maïs ont été échantillonnés sur la profondeur 0-25 cm, sachant que la profondeur de labour se situe aux alentours de 30cm.

En 2005, les placettes correspondant à 10, 11 et 12 années sous culture de maïs ont été échantillonnées à nouveaux. Ces deux campagnes de prélèvements ont permis d'avoir des échantillons de sols de 0 à 12 années de cultures sous maïs. L'échantillonnage des sols, s'est

faite en trois points de la diagonale de la placette, en prenant garde de ne pas échantillonner trop près des bords des placettes comme indiqué sur la figure 2. Les trois échantillons de sols ont été ensuite mélangés afin d'avoir un échantillon composite représentatif de la parcelle.

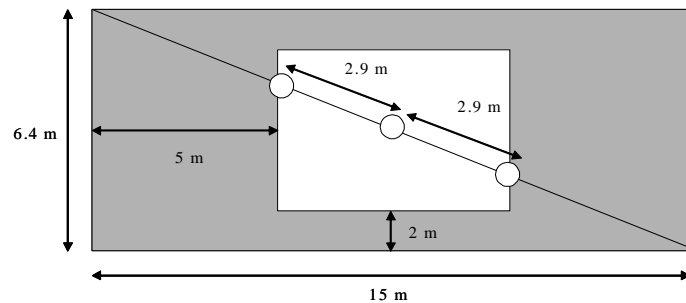


Figure 2 : Schéma d'échantillonnage des placettes.

Lors du deuxième échantillonnage en 2005, nous avons pris soins de ne pas rééchantillonné aux mêmes endroits que lors de la campagne précédente.

2.2.2.2. Caractéristiques des sols en surface étudiés

Pour cette étude nous avons choisit d'étudier trois sols : un sol cultivé sous blé (control), un sol après 6 années de culture sous maïs, et un sol après 12 années de cultures sous maïs.

Le sol du site expérimental est un luvisol, dont les caractéristiques ont déjà été publiées (Dignac et al. 2005) et sont présentées dans le tableau 3

Tableau 3 : Caractéristiques principales des sols étudiés

Profondeur (cm)	pH _(eau)	C		N	Argiles	Limons	Sable
		mg/g				(%)	
0-25	6.8	13.5	1.27		17	50	33

2.2.2.3. Echantillonnage des sols en profondeurs

L'échantillonnage des sols en profondeur a été réalisé lors de la campagne 2003. Les sols ont été échantillonnés grâce à un carottier hydraulique possédant une sonde de 2 cm de diamètre. Sur chaque parcelle, quatre carottes de sol ont été prélevées puis divisées tout les 15 cm de 0 à 105 cm, soit 7 profondeurs. Chaque profondeur provenant des quatre échantillonnages ont été mélangées, afin d'avoir un échantillon représentatif pour chaque profondeur et pour chaque parcelle (Rasse et al. 2006). Pour notre étude nous avons sélectionné deux sols : un sol sous

blé (le même que celui choisit pour les analyses des sols en surface) et un sol après 9 années de culture sous maïs.

2.2.2.4. Caractéristiques des sols en profondeur étudiés

Le tableau 4 regroupe les principales données sur les deux sols étudiés en profondeurs.

La teneur en carbonates (CaCO_3) est inférieure à 1 g kg^{-1} de sol sec, sur tout le profil étudié, ce qui signifie que les teneurs en carbone mesurés sont considérés comme étant du carbone organique. Sous les deux sols étudiés, le pH varie de 6.8 pour le premier horizon à 8.0 pour la profondeur 90-105 cm. Les caractéristiques physicochimiques des parcelles des Closeaux en profondeur ont déjà été publiées dans Rasse et al. (2006).

Tableau 4 : Caractéristiques des sols en profondeur sous blé et après 9 ans de maïs

Profondeur (cm)	Sol sous blé				Sol sous maïs			
	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	TENEUR C (mg/g)	TENEUR N (mg/g)	C/N	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$	TENEUR C (mg/g)	TENEUR N (mg/g)	C/N
0-15	-26,1	12,1	1,1	10,5	-24,8	12,0	1,3	9,5
15-30	-26,0	12,9	1,2	10,6	-24,6	12,5	1,3	9,9
30-45	-26,1	8,9	0,9	9,4	-24,7	10,8	1,1	9,9
45-60	-26,1	4,8	0,6	8,3	-25,4	5,6	0,7	8,3
60-75	-26,0	4,1	0,5	8,0	-25,4	4,6	0,6	8,0
75-90	-26,1	3,9	0,5	7,6	-25,4	3,3	0,5	7,2
90-105	-26,4	4,9	0,6	7,7	-24,6	2,0	0,3	6,2

2.3. Protocoles d'analyse des biopolyesters dans les plantes et les sols

2.3.1. Méthodes d'analyses testées sur les feuilles de maïs.

Nous présentons dans ce paragraphe les trois méthodes de dépolymérisations testées dans le chapitre 3 pour l'étude des monomères de la cutine présents dans les feuilles de maïs. En plus de ces trois méthodes, nous avons pour chaque méthode testée deux méthodes de dérivatisations.

2.3.1.1. *Extraction des lipides libres*

Préalablement aux méthodes de dépolymérisation, nous avons effectué une extraction des lipides libres par sonication dans un bain thermostaté (20 min) de feuilles de maïs au dichlorométhane (DCM) (3 x 50ml) pendant 20 min. Les trois méthodes de dépolymérisation ont été testées sur le même échantillon extrait.

2.3.1.2. *Oxydation à l'oxyde cuivrique (CuO)*

Dans un bécher en téflon nous avons pesé 50 mg de feuilles de maïs ainsi que 50 mg de $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4).6\text{H}_2\text{O}]$ (sulfate d'ammonium de fer 6 fois hydraté), 250 mg d'oxyde de cuivre et 50 mg de glucose. 15ml d'hydroxyde de sodium sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 30 sec sous flux d'azote et fermé afin d'éviter une teneur trop forte en O_2 dans le milieu. Les béchers sont ensuite insérés dans un « chauffeurr », que l'on programme à 270°C pendant 2h30. Une fois le mélange refroidi, il est filtré et rincé à l'eau distillée. Le filtrat est amené à un pH de deux grâce à de l'acide chlorhydrique 6N et transvasé dans une fiole jaugée de 100ml. Les échantillons sont laissés au repos toute une nuit puis centrifugés à 15000rpm pendant 20 min à une température de 4°C . La solution ainsi récupérée est purifiée sur des cartouches C18. (Les cartouches C18 sont préparées en faisant percoler successivement, sans jamais assécher, 2 ml d'acétate d'éthyle, 2 ml de méthanol. Elles sont ensuite remplies d'eau distillée que l'on fait un peu percoler avant de passer l'échantillon.). Les cartouches sont séchées sous azote pendant 1h15 puis les composés sont élués de la cartouche avec 6ml d'acétate d'éthyle. L'échantillon est séché sous azote, redissout dans du DCM et conservé au congélateur en attendant d'être analysé.

2.3.1.3. *Transesterification (BF_3 10%/MeOH)*

50 mg de feuilles de maïs extraites sont pesées dans un ballon dans lequel on ajoute 15 ml de trifluorure de bore à 10% dans le méthanol. Après 15 min de barbotage sous flux d'azote le ballon est fermé et mis à chauffer au bain marie à 70°C pendant 16h. Une fois la solution refroidie, elle est filtrée. Le filtre est rincé au méthanol. Après ajout de 150ml d'eau, le pH est ajusté à 2. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter et extrait 3 fois avec 50 ml de DCM. La phase organique DCM est transférée dans un ballon et évaporée à l'évaporateur rotatif et transférée dans un vial. En attendant d'être analysé

2.3.1.4. Saponification (KOH 6%/MeOH)

50 mg de feuilles de maïs extraites sont pesées dans un ballon dans lequel on ajoute 100ml d'une solution de d'hydroxyde de potassium (KOH) 6% dans le méthanol (MeOH) préparée le jour même. La solution est préparée en pesant 6g de KOH dissout dans 10ml d'eau désionisée auquel on rajoute 90ml de MeOH. La solution est mise à reflux pendant 18h. La suite du protocole est identique à celui de la transesterification.

2.3.1.5. Dérivatisations des monomères.

Nous avons testé deux méthodes de dérivatisations une silylation simple et une méthylation suivie d'une silylation. Les échantillons issus des trois méthodes de dépolymérisation sont sécher sous azote dans et redissout dans le DCM. L'échantillon est divisé en deux sécher à nouveau et redissout dans 0.4µl de pyridine auquel on ajoute 100 µl BSTFA (*N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide; Altech). La silylation se fait à 70°C pendant 1 h. Pour la méthylation-silylation, avant la procédure de silylation, l'échantillon redissout dans le DCM est transféré dans un ballon, dissout dans 15 ml de MeOH auquel on ajoute quelques gouttes de Chlorure d'acétyle. Le mélange est chauffé sous reflux pendant 1h. L'échantillon est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif, transféré dans un vial et séché sous azote La silylation transforme les fonctions hydroxylés et acides en fonctions éthers et esters triméthylsilylés. La méthylation-silylation transforme ces fonctions en fonctions éthers triméthylsilyls et méthylesters respectivement.

2.3.1.6. Identification des monomères

La séparation et l'identification ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse 6890 équipé d'une colonne a SGE BPX-5 (50 m x 0.25 mm x 0.32 µm) couplé à un quadrupole Agilent 5973 à impact électronique (70 eV). L'injecteur est à une température de 300°C. La programmation en température est de:100°C (2 min), suivie d'une rampe de température de 10°C min jusqu'à 150 °C, puis 5 °C min⁻¹ jusqu'à 200 °C. Enfin de 200°C à 350 °C à 2° C min⁻¹ terminé par un palier de 5 min à 350°C.

2.3.1.7. Quantification des monomères

La séparation des monomères à été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse HP GC 6890 équipé d'une colonne SGE BPX-5 (50 m x 0.25 mm x 0.32 µm) couplé à un détecteur FID pour la quatification. La programmation en température du chromatographe est identique à celle utilisée pour l'identification. Avant la dérivation, un standard interne, l'acide

nonadecanoïque à été ajouté aux l'échantillons. Une calibration externe a été réalisée avec l'acide 16-hydroxy hexadécanoïques et permet de calculer la concentration des monomères dans l'échantillon. Le facteur de réponse entre les deux acides est proche de 1 quelque soit la méthode de dérivatisations utilisée.

2.3.1.8. *Thermochemolyse*

La thermochemolyse a été réalisée sur un aliquote de résidu végétal (≈ 5 mg), auquel on a ajouté le réactif méthylant, l'hydroxyde de tetramethylammonium (TMAH) 25% dans l'eau (w/w), dans une proportion 1:1 (w/w). Après un temps de contact de cinq minutes, le mélange est lyophilisé et pyrolysé à 650°C pendant 15 s grâce à un pyrolyseur à point Curie (induction ferromagnétique). Le pyrolyseur (GSG Curie Point Pyrolyser 1040 PSC) est couplé à un chromatographe HP-5890 Hewlett Packard équipé d'une colonne CPSil5CB (30 m x 0.25 mm, x 0.5 μm) pour la séparation des composés et d'un spectromètre de masse quadrupolaire HP-5889A Hewlett Packard à impact électronique (70 eV) pour l'identification. La programmation en température du chromatographe est de $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 100°C à 320°C .

2.3.2. Méthodes d'analyses appliquées aux échantillons de plantes et de sols

2.3.2.1. *Extraction des lipides libres par ASE*

La méthode sélectionnée pour l'ensemble de l'étude est une extraction par solvant à haute température sous pression, publiée dans wiesenberg et al., (2004b). Environ 400 mg de plante et 15 g de sol sont extraits dans des cellules de 30ml, sur l'appareil Dionex ASE 200. Les échantillons sont successivement extraits à 75°C et 140°C par un mélange DCM/MeOH (3:1 v/v), puis à 140°C avec du DCM. Les paramètres d'extractions sont 5 min pour le temps de chauffe et 20 min pour le temps de contact à une pression de 5×10^6 Pa.

2.3.2.2. *Saponification*

Les échantillons extraits de plantes (100 mg) et de sols (1g) sont mis à reflux dans 100ml d'une solution de KOH 6%/MeOH pendant 18h. Pour les sols en profondeur la quantité de sol pesée est augmentée proportionnellement à la teneur en C organique des sols (3 g pour les sols échantillonnés à 90-105 cm). La solution est ensuite filtrée et le résidu lavé avec une solution eau/MeOH (1:9, V:V). 150ml d'eau distillée est ajoutée à la solution, dont le pH est ensuite ajusté à pH 2 grâce à une solution HCL 6N. La solution aqueuse acidifiée est extraite 3 fois avec 50 ml de DCM et la phase organique est évaporée à l'évaporateur rotatif.

L'échantillon est transféré dans un vial séché sous azote, redissout dans 400µl de pyridine contenant le standard interne, et conservé au congélateur.

2.3.2.3. Mesure de la signature isotopique des monomères

La signature isotopique moléculaire a été effectuée sur un spectromètre de masse à ratio isotopique Micromass-GVI Optima Isochrom III couplé à un chromatographe en phase gazeuse GC HP5890 équipé d'une colonne CPSil5CB (30 m x 0.25 mm, x 0.5 µm). Les échantillons sont injectés en mode splitless. La signature du dérivatisant a été déterminée par un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique Micromass NA 1500 NC, afin de corriger les valeurs isotopiques mesurées du nombre de carbones introduits lors de la silylation des monomères.

CHAPITRE 3

COMPARAISON DE TROIS MÉTHODES DE DÉPOLYMÉRISATION SUR DES FEUILLES DE MAÏS APPLICATION DE LA MÉTHODE SELECTIONNÉE A UN SOL

Comparaison de trois méthodes de dépolymérisation sur des feuilles de maïs

Application de la méthode sélectionnée à un sol

Depolymerisation of the aliphatic macromolecular polyesters
in maize leaves and soil: comparison of methods

Soumis à Organic Geochemistry

3.1. Introduction

Soil organic matter (SOM) provides essential physical and chemical properties for the efficient functioning of soil. In cropland soil, intensive agricultural activity leads to a decrease in SOM, weakening the entire ecosystem. Plant residues and microorganisms are the main OM sources in cropland soils (Kögel-Knabner, 2002). However, the degradation and stabilization processes, which turn fresh plant material into stabilised SOM remain unclear. Management of soil, which has become an important issue over the last decades, requires a better understanding of the composition and dynamics of SOM. Many studies attempted to characterize SOM composition and to explain how primary OM turns into stable OM, storing carbon for a long time (Kögel-Knabner, 2002). This stable OM pool often appears to be enriched in aliphatic moieties (up to 40%) of unknown origin (Sollins et al., 1996). Two main hypotheses can be put forward to explain the enrichment : (1) some plant components may be selectively preserved from biodegradation, such as cutan and suberan (Tegelaar et al., 1989; Augris et al., 1998) or cutin and suberin (Kögel-Knabner et al., 1992b), or (2) aliphatic moieties may be by-products of biodegradation and/or condensation products of biomolecules (Kögel-Knabner et al., 1992a; Riederer et al., 1993). Although cutin and suberin have been recognized as potential sources of aliphatic SOM, their dynamics in soils are poorly known. In order to elucidate the fate of the cutin and suberin biopolyesters in agricultural soil it is

necessary to quantitatively characterize them in plant and soil samples using the same method.

Cutin and suberin in plants were largely studied using a wide range of chemical (Molina et al., 2006), enzymatic (Rocha et al., 2001) and spectroscopic (Fang et al., 2001) methods. Several chemical methods were used to depolymerise them, such as acid hydrolysis (Holloway et al., 1981; Matas et al., 2004), base hydrolysis (Ray et al., 1995; Graça et al., 2002) and reduction (Velcheva et al., 1981). Enzymatic methods were also used to selectively depolymerise polyesters but these approaches released much lower amounts of monomers than chemical methods (Rocha et al., 2001) and cannot be applied to characterize the biopolyesters present in a complex medium such as soil. Studies with plants are difficult to compare because of the variation in structure and composition of biopolyesters among species, organs and plant growth stage (Kolattukudy and Walton, 1973; Riederer and Schönherr, 1988; Goñi and Hedges, 1990b). Furthermore, these studies were based on different depolymerisation methods.

Different chemical depolymerisation methods are also used to elucidate the fate of these biopolyesters in soil (Cardoso and Eglinton, 1975; Kögel-Knabner et al., 1989; Matzke and Riederer, 1991; Otto et al., 2005; Otto and Simpson, 2006). However, the identification and quantification of cutin and suberin monomers in agricultural soil remain difficult due to the low amounts.

The lack of a standard method for analyzing biopolyesters in plants and soil makes it difficult to compare studies concerning different plant species and different soil types. Three chemical depolymerisation procedures are frequently used to identify and quantify the monomers in plants and soils:

(1) Saponification with KOH/MeOH has been used for elucidating cutin monomeric composition of plants and infer cutin contribution to soil (Cardoso and Eglinton, 1975; Kögel-Knabner, 1992; Naafs and Van Bergen, 2002; Nierop et al., 2003) and sediments (Nip et al., 1986).

(2) Transesterification with BF_3/MeOH is a one step depolymerisation/methylation procedure. The technique has been applied to plants and soil (Matzke and Riederer, 1991; Riederer et al., 1993, Otto and Simpson, 2006) and is largely used for the identification and quantification of the monomers of suberin in roots (Franke et al., 2005).

(3) CuO oxidation is mainly used to release phenol monomers (Hedges and Ertel, 1982). The technique is generally applied to soil for lignin analysis (Kögel-Knabner, 1986) but has also been used successfully to characterize plant cutin (Goñi and Hedges, 1990a) and soil (Dignac

and Rumpel, 2006; Rumpel et al., 2004).

Because of the high polarity of the monomers released, derivatisation of hydroxyl groups is a prerequisite gas chromatography (GC) separation. Two methods are commonly used (Christie, 1993): direct silylation and methylation-silylation.

The objectives of this study were to (i) to compare the information derived from these three different methods combined with the two derivatisation procedures, and (ii) choose the most appropriate method for identifying and quantifying biopolyester monomers in crops and in agricultural soil. Bulk maize leaves, which contain a larger variety of monomers than other plant organs (unpublished data) were used. The monomers released using the depolymerisation methods are separated using GC, quantified with flame ionisation detection (FID) and identified using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The selected method was then applied to a maize cropped soil in order to evaluate whether the method could be applied to a complex matrix or not.

3.2. Material and methods

3.2.1. Plant samples and pretreatment

Samples of maize plants were collected just before harvest at the INRA experimental field of “Les Closeaux” in the “Parc du Château de Versailles”, France. Leaves were separated, air-dried and ground at 100 µm. Lipids were isolated using dichloromethane (DCM) extraction (3 × 50 ml) with a sonication bath (Fisherbrand) at 25°C for 20 min (Peres et al., 2006).

3.2.2. Soil sampling and pretreatment

The experimental field, sampling procedure and soil characteristics have been described (Dignac et al., 2005). Briefly, the field consists of a twelve year chronosequence of maize replacing the previous wheat cropping. The above ground maize biomass is returned to the soil after harvesting. For this study, the twelve year cropped soil was sampled at three points in the plot, from 0 to 25 cm. The three replicates were combined to yield a composite sample. The sample was sieved successively at 5 mm and 2 mm to remove coarse plant residue. It was air-dried and ground at 200 µm. In order to remove free lipids before depolymerisation, an aliquot (ca. 15 g) was extracted (x 3) using an accelerated solvent extractor (Dionex ASE 200) with a 30 ml stainless steel vessel (Wiesenberg et al., 2004b). The first extraction was at 75°C with DCM/MeOH (3:1 v/v). The extraction was repeated at 140°C. Finally, the sample was extracted with DCM at 140°C. For each extraction, the heating time was 5 min, and the static extraction lasted 20 min at 5×10^6 Pa.

3.2.3. Saponification

Lipid-free samples (ca. 50 mg for maize leaves and 1 g for soil) were refluxed for 18 h in KOH (6%) in MeOH. These conditions were reported to be optimal for cutin depolymerisation (Cardoso and Eglinton, 1975; Caldicott and Eglinton, 1976; Ray et al., 1995). The solution was filtered and the residue washed (x 3) with MeOH. Deionised water (150 ml) was added to the mixture and the solution was adjusted to pH 2 with 6N HCl in order to extract acidic lipids (Naafs and Van Bergen, 2002). The aqueous solution was finally extracted with DCM (50 ml x 3) and stirring at room temperature. The combined extracts were concentrated using a rotary evaporator and transferred to a vial until the sample was prepared for analysis.

3.2.4. Transesterification

Transesterification was carried out at 70°C in BF₃ (10%) in MeOH, under N₂ for 16 h using 50 mg of extracted leaves and 1 g of extracted soil (Kögel-Knabner et al., 1989; Ray et al., 1995; Riederer et al., 1993). Deionised water was added to the suspension before filtration. The residue was washed (x 3) with MeOH and the solution adjusted to pH 2 with 6N HCl. The hydrolysis mixture was stirred in DCM (50 ml x 3) at room temperature. After reduction of the volume of the recombined extracts, the final extract was transferred to a vial for derivatisation and analysis.

3.2.5. CuO oxidation

The sample (50 mg extracted leaves and 1g extracted soil) was oxidized at 172°C for 2 h with 250 mg CuO, 50 mg [Fe(NH₄)₂(SO₄)x(H₂O)₆] and 50 mg glucose in 2M NaOH under N₂ (Schnitzer, 1973; Hedges and Mann, 1979). The suspension was filtered and the solution adjusted to pH 2 with 6N HCl, completed to a constant volume (100 ml) and left overnight. After centrifugation, the solution was purified through a C₁₈ column according to the procedure described by Kögel-Knabner and Bochter (1985), compounds being eluted with ethyl acetate.

3.2.6. Derivatisation

Depolymerization extracts were dried under N₂ and dissolved in DCM. The solution was divided in two in order to compare the two derivatisation procedures. For the direct silylation, the sample was dried and dissolved in 0.4 ml pyridine and 100 µl BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; Altech) was added. Silylation was carried out at 70°C for 1 h. For methylation-silylation the sample was methylated prior to the silylation described above: the sample was dissolved in MeOH and a few drops of acetyl chloride were added. After refluxing for 1 h, the solvent was evaporated. Direct silylation transforms hydroxyl and carboxylic acid functions to the trimethylsilyl ether and ester derivatives (TMS ether / TMS ester) respectively, whereas the trimethylsilyl ether and methyl ester (TMS ether / methyl ester) derivatives are formed with the methylation-silylation procedure.

3.2.7. Identification

Extracts obtained using the three wet chemical methods of depolymerisation were analyzed using GC/MS after derivatisation. Separation and identification were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a SGE BPX-5 column (50 m x 0.25 mm x 0.32

μm) coupled to an Agilent 5973 electronic ionisation (EI, 70 eV) mass spectrometer. The GC oven temperature programme was: 100°C (2 min), to 150 °C at 10°C min⁻¹, to 200 °C at 5 °C min⁻¹, to 350 °C at 2° C (held 5 min). Compounds released by depolymerisation were assigned from their MS fragmentation patterns, supported by comparison with published spectra and a spectral library (Wiley).

3.2.8. Quantification

Separation and quantification were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a SGE BPX-5 column (50 m x 0.25 mm x 0.32 μm) and coupled to a FID. The GC oven temperature programme was as described above. Quantification was performed via addition of an internal standard, nonadecanoic acid, prior to derivatisation. External calibration with 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid was used to calculate compound concentrations. The response factor between nonadecanoic acid and 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid is close to 1, whatever the derivatisation method.

3.2.9. Thermochemolysis/TMAH

Extracted leaves or depolymerization residue (5 mg) were mixed with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) in 25% water (w/w) in a 1:1 (w/w) proportion. The sample was freeze-dried and loaded on to a ferromagnetic wire for pyrolysis. Thermochemolysis was performed by inductively heating the wire to its Curie temperature of 650°C in 0.15 s (10 s hold) in a pyrolysis unit (GSG Curie Point Pyrolyser 1040 PSC). The products were separated with a HP-5890 Hewlett Packard chromatograph equipped with a CPSil5CB column (30 m x 0.25 mm, x 0.5 μm) for separation coupled to a 70 eV EI HP-5889A Hewlett Packard Mass Spectrometer for compound identification. The GC oven was programmed from 100°C to 320°C at 3°C / min.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Distribution of monomers from the three depolymerisation methods with maize leaves

The depolymerisation methods afforded a large variety of aliphatic compounds listed in Table 1. Monomers in the first part of Table 1 are compounds with a chain length of 16 or 18 carbons bearing one to three hydroxyls, unsaturation and/or additional carboxylic group. Some, such as the (8,16-, 9,16- and/or 10,16-)-dihydroxyhexadecanoic acids, and 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid, have been described as specific for the cutin polymer in fruit and leaf cuticles (Kolattukudy, 1984; Kögel-Knabner et al., 1989). A wider carbon number range is observed for some of the series of products listed in the second part of Table 1. These classes of aliphatic compounds, such as carboxylic acids or ω -hydroxy carboxylic acids, are not specific for cutin, since they can also derive from cuticular waxes, which are tightly associated with cutin in leaves, or from suberized layers (Kolattukudy and Walton, 1973).

3.3.1.1. Monomers specific for cutin

The 16-hydroxyhexadecanoic acid, x,16-dihydroxyhexadecanoic acid isomeric compounds (x = 8, 9 or 10), 18-hydroxyoctadec-9-enoic acid and 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid were observed with all the methods (Table 1). These monomers are the most often cited in studies of plant and fruit cutin and are considered as the major cutin monomers (Hunneman and Eglinton, 1971; Ray et al., 1995). They are also used as indicators for the contribution of vascular plant cuticular layers to sediments (Cardoso and Eglinton, 1983) and SOM (Kögel-Knabner et al., 1989; Riederer et al., 1993; Hermosin and Saiz-Jimenez, 1999; Otto et al., 2005) . They compounds have already been identified in the cuticle of maize leaves and bundle sheaths by Espelie and Kolattukudy (1979).

Table 1: Concentration (mg g⁻¹ leaves) of monomers released by three depolymerisation methods (nd = not detected)

Monomer	CuO Methyl-silyl.	CuO Silyl.	KOH Methyl-silyl.	KOH Silyl.	BF ₃ Methyl-silyl.
Monomers specific for cutins					
16-hydroxyhexadecanoic acid	0.01	0.02	0.08	0.05	0.02
18-Hydroxyoctadec-9-enoic acid	0.10 ^a	0.09	0.76 ^a	0.24	0.23 ^a
(8,16-,9,16- and/or 10,16)-Dihydroxyhexadecanoic acids		0.06		0.72	
9,10,18-Trihydroxyoctadecanoic acid	nd	0.05	0.19	0.08	0.12
9-Hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid	0.01	nd	nd	0.04	nd
9,10-Dihydroxyoctadecanoic acid	nd	0.03	nd	0.06	nd
18-Hydroxyoctadecadienoic acid	nd	nd	0.13	nd	nd
18-Hydroxyoctadecadienoic acid	nd	nd	0.19	nd	nd
11,18-Hydroxyoctadecenoic acid	nd	0.10	nd	0.33	nd
(9,18- and 10,18-)-Hihydroxyoctadecenoic acids	nd	0.06	nd	0.22	nd
Sum (mg g⁻¹)	0.12	0.41	1.35	1.74	0.37
Other aliphatic monomers					
Carboxylic acids	0.53 (C ₁₆ , C ₁₈)	0.11 (C ₁₆ , C ₁₈)	4.46 (C ₁₆ to C ₃₂)	4.39 (C ₁₆ to C ₂₆)	3.81 (C ₁₆ to C ₂₆)
Unsaturated carboxylic acids (C18:1 + C18:2 + C18:3)	nd	nd	1.79	1.62	nd
Alcohols	0.08 (C ₁₈)	nd	0.18 (C ₁₈ , C ₂₂)	nd	0.25 (C ₁₈ , C ₂₂)
ω-OH carboxylic acids ^b	nd	nd	0.46 (C ₁₈ to C ₂₈)	0.82 (C ₁₈ to C ₂₈)	0.27 (C ₂₂ to C ₂₆)
α-OH carboxylic acids ^b	nd	nd	1.05 (C ₂₀ to C ₂₆)	0.48 (C ₂₀ to C ₂₆)	1.27 (C ₁₈ to C ₂₆)
α,β-dihydroxy C ₂₄ acid ^b	nd	nd	0.04	nd	nd
Sum aliphatic monomers (mg g⁻¹ of leaves)	0.61	0.11	7.98	7.59	5.60
<i>Sum (mg g⁻¹) all aliphatic compounds</i>	0.73	0.52	9.33	9.33	5.97

^a Sum of 18-hydroxyoctadec-9-enoic acid and (8,16-,9,16- and/or 10,16-)dihydroxyhexadecanoic acids.

^b Notation ω for hydroxyl in terminal position, α for hydroxyl in position 2 and β for hydroxyl in position 3.

The mixture of isomers comprising (8,16-, 9,16- and 10,16-) dihydroxyhexadecanoic acids coeluted with the 18-hydroxy octadec-9-enoic acid when methylation-silylation was used (Table 1) (Goñi and Hedges, 1990b). When the sample is only silylated, the x,16-hydroxy acids can be separated from the 18-hydroxy octadec-9-enoic acid and quantified separately. Using direct silylation, it was thus possible to estimate the proportion of each type of monomer released through the saponification and CuO oxidation depolymerisation methods. Three C₁₈ compounds, occurring with direct silylation procedure (Table 1), were tentatively assigned as x,18-dihydroxy octadecenoic acids from the mass spectrum (Fig.1).

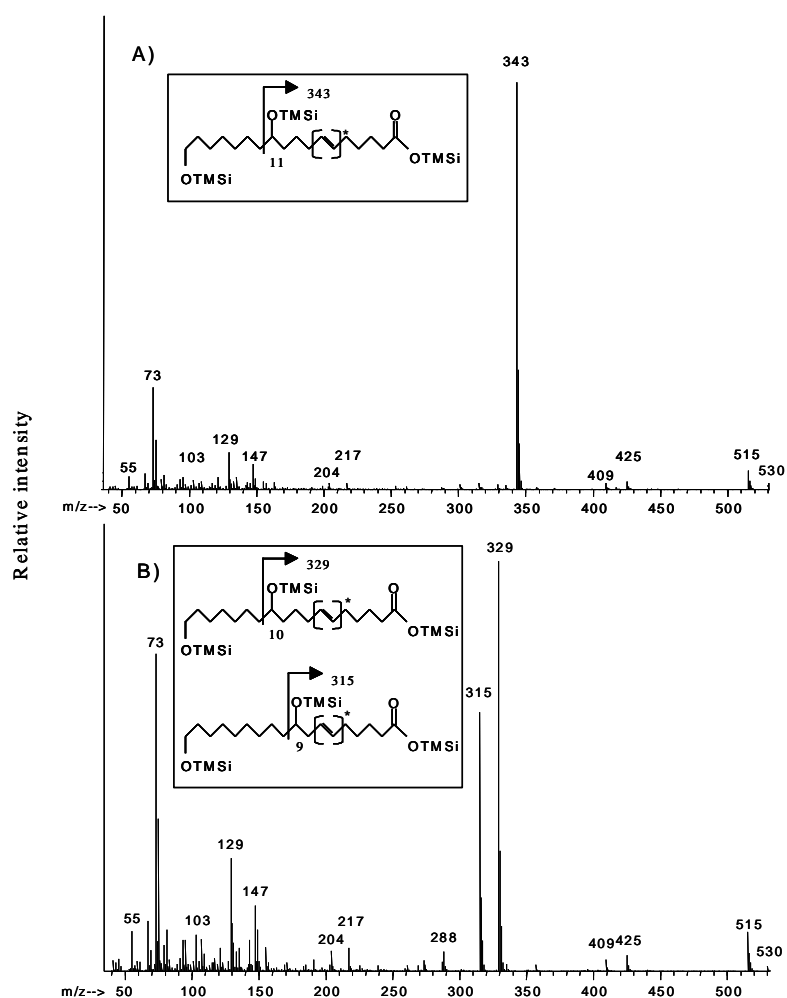


Fig. 1. Mass spectra of A) 11,18-dihydroxyoctadecenoic acid and B) 10,18-dihydroxyoctadecenoic acid coeluting with 9,18-dihydroxyoctadecenoic acid; * = position of double bond not determined.

The m/z 530 ion corresponds to M^+ and m/z 515 ($[M-15]^+$) to loss of one methyl ($[M-CH_3]^+$). The presence of m/z 425, corresponding to $[M-105]^+$, and m/z 204 and 217 are characteristic of rearrangement of ω -hydroxy carboxylic acids (Eglinton et al., 1968). The major ions used

to identify the monomers were respectively m/z 343, 329 and 315 (100%) corresponding to cleavage at a carbon next to the mid-chain hydroxy group. Thus, these fragments correspond to the hydroxy unsaturated carboxylic acid fragments $[\text{TMSiO-C}_{10}\text{H}_{17}\text{-COOTMSi}]^+$, $[\text{TMSiO-C}_9\text{H}_{15}\text{-COOTMSi}]^+$ and $[\text{TMSiO-C}_8\text{H}_{13}\text{-COOTMSi}]^+$ respectively. The monomers are probably 11,18-dihydroxyoctadecenoic acid and 10,18-dihydroxy octadecenoic acid coeluting with 9,18-dihydroxyoctadecenoic acid. A dihydroxyoctadecenoic acid (with no indication of the hydroxyl position) was previously cited as one of the major monomers from maize cuticle (Espelie and Kolattukudy, 1979). These compounds also form part of leaf cutin monomers of different plant species (Graça et al., 2002).

The 9-hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid was identified after CuO and saponification followed by direct silylation (Table 1). It is a major suberin monomer in the roots of monocotyledons such as *Aspidistra elatior*, depolymerised using transmethylation (Zeier and Schreiber, 1998). The 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid was recognized by comparison of the mass spectrum with that of the synthetic counterpart (Eglinton et al., 1968). The two isomers of 18-hydroxyoctadecadienoic acid, only found in the saponification extract derivatised via methylation-silylation, had been identified in apple cutin (Eglinton et al., 1968) and *Arabidopsis* leaves (Franke et al., 2005). The position of the double bond could not be assigned from the mass spectrum.

We have not detected any epoxy carboxylic acids in bulk maize leaves (Table 1), whereas Espelie and Kolattukudy (1979) found the 18-hydroxy 9,10-epoxy octadecanoic acid after depolymerisation of the cuticle of maize leaves. However, the three wet chemical methods used in the present study are known to transform the epoxide function into two vicinal alcohol functions (Newman and Hammock, 2001). The 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid observed after depolymerisation and derivatisation could be derived from moieties comprising either a 9,10,18-trihydroxy pattern or a 9,10-epoxy-18-hydroxy one. Thus, the epoxy compound could not be distinguished from preexisting trihydroxyoctadecanoic acid monomer under our analytical procedure. Goñi and Hedges (1990a) checked this hypothesis by reacting commercial 9,10-epoxyoctadecanoic acid using the CuO oxidation procedure. The major compound released was 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid and no epoxy acid was detected.

3.3.1.2. Other aliphatic monomers recovered from depolymerisations

Several classes of aliphatic compounds not specific for cutin are gathered in the second part of Table 1. Carboxylic acids were released with the three methods. The CuO method released only hexadecanoic and octadecanoic acids, whereas saponification and transesterification

yielded a much wider range of acids, with a distribution from C₁₆ to C₃₂ and C₁₆ to C₂₆ respectively. As for the C₁₈ acid, counterparts with one to three unsaturations were released in high concentration along with the saturated one through saponification. Two primary *n*-alcohols could be identified and quantified with the different methods of depolymerisation and derivatisation. Octadecanol was found with the three methods, whereas docosanol was released only upon saponification and methylation-silylation and transmethylation. However, no homologous series was found for these compound classes with any of the tested method. Saponification and transmethylation yielded homologous series of 2-hydroxy carboxylic acids (α -OH carboxylic acids) and ω -OH carboxylic acids (hydroxyl group in terminal position of the aliphatic chain). The α -OH carboxylic acids ranged from C₂₀ to C₂₆ for saponification and from C₁₈ to C₂₆ for transmethylation, with a maximum at C₂₄ and an even/odd predominance. The ω -OH carboxylic acids ranged from C₁₈ to C₂₈ for saponification and from C₂₂ to C₂₆ for transmethylation, maximizing at C₂₄ as in the case of the α -OH carboxylic acids. The ω -hydroxy carboxylic acids, *n*-alcohols, and *n*-carboxylic acids released from maize leaves (Table 1) were identified in maize bundle sheaths and maize cuticle by Espelie and Kolattukudy (1979). Aliphatic monocarboxylic acids, α -hydroxy carboxylic acids, ω -hydroxy carboxylic acids and *n*-alcohols are also major constituents of suberin in maize roots (Zeier et al., 1999). In our study, these monomers could thus also derive from suberized cell walls present in maize leaves. The 2,3-dihydroxytetracosanoic acid identified here in maize leaves was previously detected in leaves and stems of eelgrass *Zostera marina* L. (de Leeuw et al., 1995), where a series of compounds from C₂₀ to C₂₆ was identified with a predominance of the C₂₄ homologue. The experimental procedure used by de Leeuw et al. (1995), consisted of Soxhlet extraction, saponification and acid hydrolysis; the different extracts were methylated and silylated, 2,3-dihydroxycarboxylic acid being released through saponification and in higher amount through acid hydrolysis. In the present study, 2,3-dihydroxytetracosanoic acid was released upon saponification, derivatised with the methylation-silylation procedure and identified thanks to a previous mass spectrum (de Leeuw et al., 1995). No other homologues could be detected even through selected ion detection due to detection threshold. All the above compounds may be related to intracuticular waxes or suberized layers, thus showing that the procedure used in this study could release monomers from more than one type of lipid polymer.

3.3.2. Comparison of methods

Depolymerisation yield for transmethylation was ten times higher than for CuO oxidation, reaching 5.97 mg g^{-1} of leaves, although it only released a few specific monomers (Table 1). The saponification gave the highest concentration of total monomers of all the methods, reaching 9.33 mg g^{-1} of leaves with the two derivatisation methods. The total amount of monomers measured after CuO oxidation was 0.73 mg g^{-1} of leaves with methylation-silylation and 0.52 mg g^{-1} of leaves with direct silylation. The strongest qualitative similarities were observed between CuO oxidation and the saponification for the monomers specific for cutin, presented in the first part of Table 1. Indeed, most of the aliphatic monomers were identified through CuO oxidation and saponification. The saponification and transesterification methods gave similar results for the monomers gathered in the second part of Table 1. In the following, we compare first the cupric oxide oxidation and saponification methods before comparing the saponification and transmethylation methods.

3.3.2.1. CuO oxidation vs. Saponification

The lack of some aliphatic monomers which are less specific for cutin and a lower depolymerisation yield for all monomers are the strongest differences when CuO oxidation is compared with saponification. Carboxylic acids were released in high concentration by saponification, ranging from 4.39 to 4.46 mg g^{-1} of leaves whereas the depolymerisation yield of the CuO oxidation for these compounds was very low, with 0.11 and 0.55 mg g^{-1} of leaves for silylation and methylation-silylation respectively. No unsaturated carboxylic acids, either ω -OH or α -OH carboxylic acids, were detected with this method.

The depolymerisation mechanism of CuO oxidation in NaOH is similar to that of saponification (Goñi and Hedges, 1990a), and so cannot explain these differences. By contrast, the experimental conditions used in the two methods are very different and could influence the depolymerisation of the biopolymer. The CuO oxidation is achieved under drastic conditions, with high temperature and oxidizing conditions. Such conditions tend to oxidize terminal hydroxyl groups and, to a lesser extent, mid-chain hydroxyl groups. Carboxylic acids with a terminal hydroxyl may thus be converted to diacids and polyhydroxylated carboxylic acids to shorter chain diacids (Goñi and Hedges, 1990a). Unsaturation is a sensitive function which may be degraded under these conditions. This likely explains the lack of octadecenoic acids and 18-hydroxyoctadecadienoic acids after CuO oxidation, and the low yields obtained for x,18-dihydroxyoctadecenoic acid isomers vs.

saponification. CuO oxidation also released 9-hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid and 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid. As noted above, experimental conditions tend to oxidize terminal hydroxyl functions and lead to diacids. Upon CuO oxidation, 9-hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid could thus derive at least partly from 9,16-dihydroxyoctadecanoic acid. Since this monomer is present after both the cupric oxide oxidation and saponification methods, it may also be present as such in the plant.

CuO oxidation was first compared with the more common methanolysis and base hydrolysis methods with *Malus pumila* cutin, showing similarity in the released monomers (Goñi and Hedges, 1990a). The distribution of the monomers after CuO oxidation of whole maize leaves (Table 1) can be compared to that obtained by Espelie and Kolattukudy (1979) for the cuticle of maize leaves after LiAlH₄ reduction. Eight monomers specific for cutin were found but their absolute abundances were not specified. The most abundant was 18-hydroxyoctadec-9-enoic acid, followed by 18-hydroxy-9,10-epoxyoctadecanoic acid, twice less concentrated, which was not detected with the chemical methods used in this study. The x,16-dihydroxyhexadecanoic acid monomers were as abundant as 9,10-epoxy,18-hydroxyoctadecanoic acid and the 18-dihydroxyoctadecenoic acid isomers. Finally 9,10,18-trihydroxy octadecanoic acid and the 16-hydroxyhexadecanoic acid were present in lower concentration in cutin than the other monomers. In the present study, 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid was as concentrated as the x,16-dihydroxyhexadecanoic acids, and no 18-hydroxy 9,10-epoxyoctadecanoic acid was detected. These results support the hypothesis that a large part of the epoxy monomer is transformed to 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid. However in the present study, CuO oxidation possibly induced degradation of a significant part of the monomers released during depolymerisation. Despite the low yields, most of the monomers specific for cutin were identified with CuO and direct silylation, but their concentrations were underestimated. Hence the CuO oxidation method may be useful for identification of the monomers but is not suitable for their quantification.

3.3.2.2. Saponification vs. transesterification

Depolymerisation yield was higher when maize leaves were submitted to saponification than transmethylation (Table 1), in agreement with the findings of Ray et al. (1995) using lime cutin. The main differences between saponification and transmethylation are observed for the monomers specific for cutin (Table 1). After saponification, when the two derivatisation methods are considered, the (mono/di)-hydroxylated carboxylic acids and diacids such as 9-hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid, 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid, the x,18-

dihydroxyoctadecenoic acid isomers and the isomers of 18-hydroxy octadecadienoic acid were identified. The concentration of these (mono/di)-hydroxylated carboxylic acids and diacids represented between 23% and 37% of the identified total monomers specific for cutin, depending on the derivatisation method. These compounds may thus represent a high proportion of the monomers specific for cutin and may be significant for its quantification. Nevertheless, the monomers identified with the saponification method are not released after transesterification. They are unsaturated compounds with or without two hydroxy functions except for 9-hydroxy hexadecan-1,16-dioic acid which has two acid functions. The reactivity of unsaturations could be a first explanation for not detecting these compounds with transmethylation. The unsaturated monomers may be transformed on acid hydrolysis into shorter chain compounds or other molecules which we could not identify. This hypothesis is supported by the lack of unsaturated carboxylic acids after transmethylation, whereas upon saponification they represented 21% of the total aliphatic class monomers.

The different reaction mechanisms of the two methods can also explain the differences in depolymerisation efficiency. Saponification is a base hydrolysis involving hydroxide ion. Transmethylation involves a Lewis acid, BF_3 , which acts as a catalyst, in a coordination complex with methanol (Morrison and Smith, 1964). BF_3/MeOH may not have access to some of the depolymerisation sites due to steric exclusion. Polyhydroxylated acids have some of their secondary alcohol groups involved in ester cross linking, which makes these depolymerisation sites less accessible to the reagents. The efficiency of both reagents, KOH and BF_3 , depends on the position of the monomer in the polymeric network, and thus upon the degree of ester cross linking of the mid-chain hydroxy groups. Contrasting accessibility of the depolymerisation sites to the reagents may explain the lack of poly(hydroxylated) carboxylic acids or diacids after BF_3/MeOH , since mid-chain hydroxy groups may create highly cross linked regions (Fang et al., 2001).

The distributions of α -OH carboxylic acids obtained after transesterification and saponification were similar. The monomer α -OH C_{24} was predominant for this family, reaching 50% of the total α -OH carboxylic acids. Thus, both depolymerisation methods were efficient in releasing α -OH acids, and the concentrations obtained might be representative for this compound family in the polymer. The vicinity of the hydroxy and the carboxylic acid functions in the compounds, and the similar concentrations obtained with transmethylation and saponification, may mean that only one of these two functions is engaged in an ester linkage. The α -OH acids are thus probably not responsible for highly cross linked regions. Similarly, the depolymerisation yields of aliphatic acids and alcohols are close for the two

methods. These two classes of compounds have only one functional group and as cannot be engaged in a highly cross linked region of the polymer. They probably form the external part of the polyester structure and are easily depolymerised using saponification and transmethylation.

The ω -OH acid family was underestimated with the transmethylation method compared to the saponification. These components are probably more strongly engaged in the polymeric edifice through both hydroxy and carboxylic functions. Due to steric exclusion of the reagent, they may be less accessible to the transmethylation reagent. Transmethylation was efficient for the monomers which were monofunctionals or not inserted deeply in the polymer. However, the lack of specific cutin monomers such as poly(hydroxylated) acids and unsaturated compounds, led to both an underestimation of cutin amount and to loss of information on cutin monomeric composition. Therefore, saponification appeared to be the most efficient method for the characterisation and quantification of the monomers of cutin in maize leaves. Nierop et al. (2003) have already shown its efficiency for the study of suberin in roots and for ester bound lipids in soils.

3.3.2.3. *Derivatisation procedure*

Apart from the depolymerisation method, the derivatisation procedure used to transform the released monomer into GC amenable compounds may also influence the distribution of monomers observed using GC (Table 1). Upon direct silylation, the separation of 18-hydroxyoctadec-9-enoic acid from the isomers of α ,16-dihydroxyhexadecanoic acid was possible. The proportions of 18-hydroxyoctadec-9-enoic acid and α ,16-dihydroxyhexadecanoic acids could be assessed as 60%-40% for CuO oxidation and 25%-75% for saponification. However, the efficiency of the derivatisation depends on the considered monomers. Methylation-silylation seems to be more efficient for compounds such as α -OH acids and 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid. By contrast, direct silylation enhanced two fold concentrations of ω -OH acids when compared with the methylation-silylation derivatisation. The α -OH acids and 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid have hydroxyl and/or carboxylic functions close to each other, whereas in ω -OH carboxylic acids, hydroxyl and carboxylic functions are distant. The silylation reagent is large enough to be subject to steric exclusion. This can explain why the α -OH carboxylic acid concentration reached 1.27 mg g⁻¹ of leaves for transmethylation and 1.05 mg g⁻¹ of leaves for saponification and methylation-silylation, whereas the concentration fell to 0.48 mg g⁻¹ of leaves when saponification and direct silylation were used. The first step methylation of the carboxylic function might reduce steric

exclusion, a methoxyl group being smaller than a siloxyl one. For the compounds where no steric hindrance can be considered, silylation gave higher derivatisation yields, and so seems more efficient. Additionally, methylation-silylation is a two step procedure, which may induce some loss of monomers. Moreover, methylation of hydroxyl and carboxylic acid groups leads to more volatile products. Some compounds could have been lost during the evaporation of MeOH to dryness under N₂ after methylation. This could explain why, with direct silylation, quantification of minor compounds such as 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid released by CuO oxidation was possible, whereas they were not detected after methylation-silylation. Taken together, the monomers specific for cutin are more abundant when direct silylation is used for derivatisation (Table 1).

However, depolymerisation yields never reach 100%, and a macromolecular residue can remain whatever the method used (Velcheva et al., 1981; Ray et al., 1995). Hence, the occurrence of aliphatic molecules in the remaining residue was investigated using thermochemolysis.

3.3.2.4. Thermochemolysis/TMAH

We tested the efficiency of thermochemolysis on extracted maize leaves. Most of the compounds released were of lignin origin (Fig. 2). We also identified carboxylic acids from C₁₂ to C₂₄ with a strong predominance of hexadecanoic acid. Octadecenoic acid and octadecadienoic acid were identified, as with the saponification method, but all these acids are not specific for cutin.

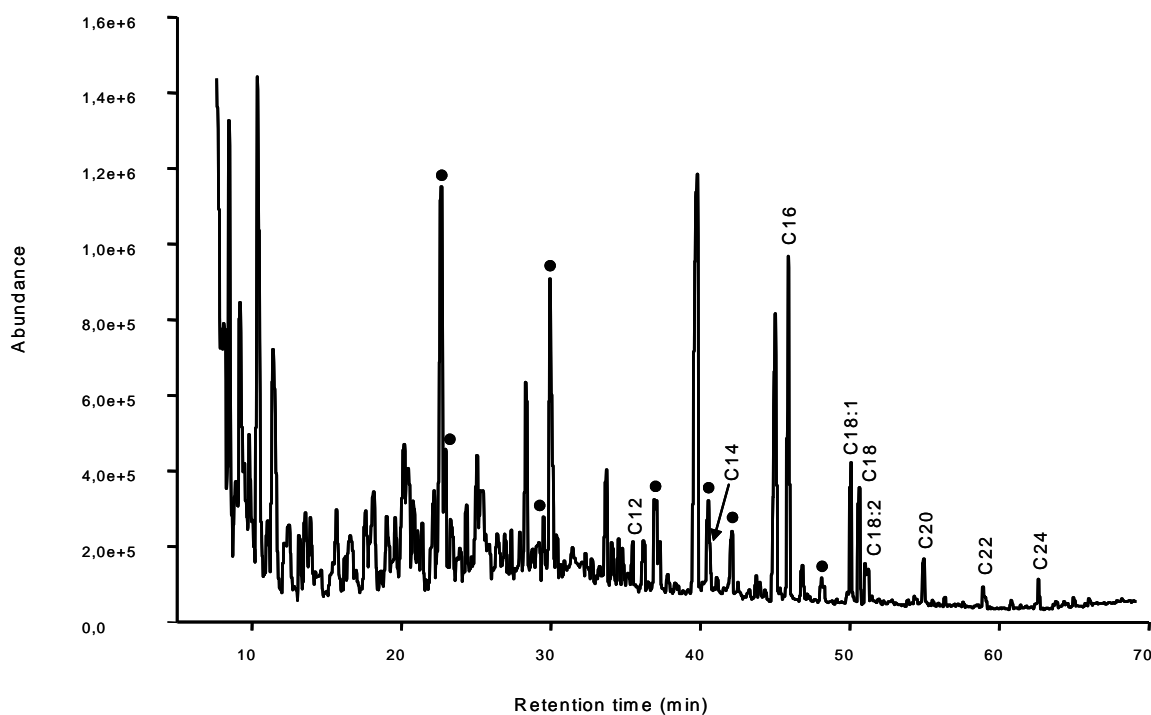


Fig. 2. Total ion chromatogram from thermochemolysis/TMAH of maize leaves;

●: phenolic compounds derived from lignin, (Cx:n): carboxylic compounds, x indicates number of carbons in chain and n number of unsaturations.

Thermochemolysis is a rapid qualitative method for characterising polar macromolecules in plants and their contribution to soil (Gobe et al., 2000; Nierop, 2001). Thermochemolysis/TMAH methylates carboxylic and hydroxyl groups and so prevents carboxylic acids from decarboxylation, increasing the volatility of most polar compounds and making them GC amenable. It allows detection of compounds which cannot be detected through conventional pyrolysis/GC/MS. Thermochemolysis/TMAH is often used to recognize plant macromolecules, such as lignin in wood (Clifford et al., 1995; McKinney et al., 1995; Klingberg et al., 2005; Ohra-aho et al., 2005). Hatcher et al., (1995) showed that it is more efficient than CuO oxidation for routine analysis of lignin in gymnosperm wood and leads to wider range of compounds derived from lignin. It was also used for the monomeric elucidation of the suberin biopolymer in the cork of *Quercus suber L.* (Bento et al., 1998; 2001) and to characterize the contribution of root and leaf biopolymers in soil (Nierop, 2001). It releases significant amounts of carboxylic acids, diacids and ω -hydroxy carboxylic acids, as well as compounds such as 9,10-epoxy,18-hydroxyoctadecanoic acid, which was not found with the wet chemical methods of depolymerisation used in the present study. Thermochemolysis/TMAH was successfully applied to the elucidation of the monomeric

composition of the cutin polyester in tomato, apple, papaya and lime or in the cuticle of *Agave Americana* (del Rio and Hatcher, 1998; del Rio et al., 1998). The monomers produced correspond to those usually released by chemical depolymerisation, such as (8,16-, 9,16- and/or 10,16-)-dihydroxyhexadecanoic acids, or 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid.

However, no mid chain hydroxylated carboxylic acids characteristic for polyester monomers could be detected after thermochemolysis/TMAH on extracted maize leaves, although thermochemolysis conditions used in the present experiment (TMAH, 25% water, 650°C) were close to those used in previous studies. Gonzalez-Vila et al., (1996) analysed suberin in potato tubers with 25% TMAH in water at a pyrolysis temperature of 500°C. Bento et al (1998, 2001) used TMAH in water and Curie point pyrolysis of 610°C for characterisation of the monomeric composition of suberin in cork. Nierop (2001) used experimental conditions close to those we used to identified cutin and suberin monomers in leaves and roots. In another study (Nierop et al., 2003), thermochemolysis was successfully applied to soil and roots before and after base hydrolysis, showing the efficiency of base hydrolysis to recover biopolyester monomers. Thus, the lack of compounds characteristic for cutin in the present thermochemolysis analysis likely results from the low amount of cutin in maize leaves when compared with other polymers such as lignin or cellulose and hemicellulose. Indeed, in most of the above studies the cuticle was physically or enzymatically separated prior to pyrolysis and/or the amounts of cutin and suberin in the samples were high. Under the thermochemolysis and sample preparation conditions used in the present study, the monomers specific for cutin were probably diluted in the background signal produced by the major lignin-derived components. The thermochemolysis of the residues after transmethylated and saponification treatment did not give any clear cut information on remaining cutin either, probably due to the low quantity of remaining polymer. Thermochemolysis does not appear suitable for characterising monomeric composition of cutin in bulk maize leaves and so could not provide any information on the efficiency of the depolymerisation methods.

3.3.3. Bound lipids released by saponification of a soil sample.

Saponification followed by silylation being the most appropriate method for the analysis of maize leaves, we choose this method to analyse a maize cropped soil sample (Table 2). To evaluate the repeatability of the method on such a heterogeneous sample, the depolymerisation method was repeated three times on the extracted soil. The standard error ranged from 1.6% to 10% for single monomers (Table 2).

The same monomers, except 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid, were found for both leaves (Table 1) and soil (Table 2). However, a wider range is apparent in the former case. For example, in maize leaves ω -hydroxy carboxylic acids ranged from C₁₈ to C₂₈ (Table 1), whereas in soil they ranged from C₂₀ to C₂₆ (Table 2). This greater diversity of monomers in leaves may be due to the low carbon content of the soil (12.9 ± 0.9 mg C g⁻¹ soil). The amount of total aliphatic monomers in the soil was 72.2 ± 4.6 μ g g⁻¹ soil, which represented only 0.6% of the organic carbon, while for plants the amount of the total aliphatics reached 9.33 mg g⁻¹, representing about 2% of the organic carbon. Some of the monomers identified in the leaves must be under detection threshold in the soil.

Saponification of the soil released mid chain hydroxy compounds, identified as cutin monomers in maize leaves, and shown in the first part of Table 2. The second part of Table 2 lists the aliphatic monomers which are not specific for cutin, such as those making up the second part of Table 1, for maize leaves: saturated carboxylic acids from C₁₆ to C₂₆, unsaturated octadecanoic acids, ω -hydroxy carboxylic acids from C₂₀ to C₂₆, the C₂₄ and C₂₆ α -hydroxy carboxylic acids, the C₁₈ and C₂₀ n-alcohols along with the C₁₆, C₂₂ and C₂₄ α ; ω -diacids which were not identified in maize leaves. However, the latter compounds are commonly considered as suberin markers for maize roots (Zeier et al., 1999)

Table2: monomers recovered from saponification and simple silylation of a 12 year maize cropping agricultural soil. * SEM% = standard error of the mean (n= 3).

	Soil (μ g g ⁻¹)	SEM (%) ^a
Monomers specific for cutins		
16-Hydroxyhexadecanoic acid	2.9	6.8
18-Hydroxyoctadec-9-enoic acid	2.4	8.3
(8,16-,9,16- and/or 10,16-)dihydroxyhexadecanoic acids	8.1	2.1
9,10,18-Trihydroxyoctadecanoic acid	1.1	3.0
9-Hydroxyhexadecan 1,16 dioic acid	3.2	9.1
11,18-Dihydroxyoctadecenoic acid	1.3	7.0
(9,18- and 10,18-)Dihydroxyoctadecenoic acids	0.6	7.6
Sum (μg g⁻¹)	19.6	5.0
Other aliphatic monomers		
Carboxylic acids	23.0 (C ₁₆ to C ₂₆)	3.1
Unsaturated		
(C18:1 + C18:2 + C18:3)	6.4	2.1
Alcohols	2.7 (C ₁₈ ;C ₂₀)	2.0
ω -OH carboxylic acids	16.2 (C ₂₀ to C ₂₆)	1.6
α -OH carboxylic acids	1.9 (C ₂₄ ;C ₂₆)	3.6
Diacids	2.4 (C ₁₆ ;C ₂₂ ;C ₂₄)	5.1
Sum (μ g g ⁻¹)	52.6	1.2
Sum (μg g⁻¹) of all aliphatic compounds	72.2	2.1

3.3.3.1. Cutin-derived monomers

Except for 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid, which was not found in the soil, all the monomers recovered from the saponification of maize leaves were present in the soil (Tables 1 and 2). The distribution of monomers specific for cutin in maize leaves and soil is shown in Fig. 3.

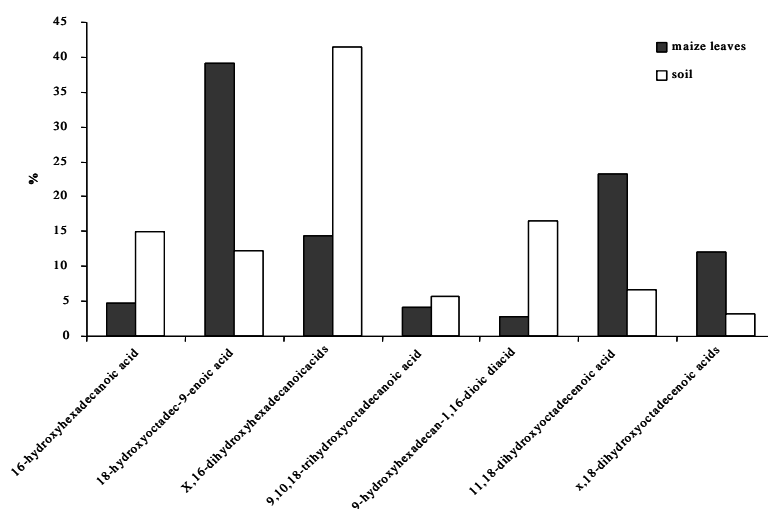


Fig. 3: Distribution of monomers specific for cutin in monomer class released by saponification of maize leaves and soil under 12 years of maize cropping

In soil, the contribution of 16-hydroxyhexadecanoic acid, x,16-dihydroxyhexadecanoic acids, 9-hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid and, to a lesser extent 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid, was higher than in leaves. The relative enrichment of the soil in 16-hydroxyhexadecanoic acid compared to maize leaves can be explained by a root contribution. Indeed, maize roots are known to contain ω -hydroxy carboxylic acids ranging from C₁₆ to C₂₈, maximizing at C₁₆ or C_{18:X} and C₂₄ (Zeier et al., 1999). The higher proportion of 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid, x,16-dihydroxyhexadecanoic acid and 9-hydroxyhexadecan-1,16-dioic acid in the soil vs. maize leaves, can be explained via preservation from microorganism degradation by microorganisms. The mid-chain hydroxy acids are, as explained above, present in the highly cross linked network of the biopolyesters, where it might be more difficult for microorganisms to gain access. It must be noted that two studies reported opposite trends for the level of degradation of mid chain hydroxy acids. They have been shown to be preferentially degraded (Otto and Simpson, 2006), while Riederer et al., (1993) showed that they were degraded to the same extent as other aliphatic compounds in

forest soil during incubation of litters. When comparing our study with the aforementioned two studies, the different trends observed might be related to differences in vegetation and soil management compared to grassland and forest soil (in particular soil with respect to ploughing), which probably affects the processes transforming fresh plant material into SOM (Lal, 2002).

On the contrary, the proportion of the α ,18-dihydroxyoctadecenoic acids, 11,18-dihydroxyoctadecenoic acid and 18-hydroxyoctadecenoic acid in the soil were lower than in maize leaves, indicating that they are preferentially degraded, in agreement with previous reports on the lower stability of unsaturated monomers vs. saturated ones (Nierop et al., 2003). Since contrasting behaviour is observed for specific monomers on cutin in soil, this might indicate a selective degradation of the biopolyester by microorganisms.

3.3.3.2. *Other aliphatic compounds non specific for cutin*

The relative distribution of non-specific monomers for cutin in the soil was different from that in maize leaves: (1) the proportion of ω -hydroxy carboxylic acids was higher in the soil ($\approx 22\%$) than the leaves ($\approx 9\%$) and (2) the proportion of α -hydroxy carboxylic acids was slightly lower in the soil ($\approx 3\%$) than the leaves ($\approx 5\%$) and 3) diacids and alcohols were absent after saponification of the leaves.

The ω -hydroxy carboxylic acids are constituents of plant waxes (Otto and Simpson, 2006) found in leaves but also constituents of roots (Kolattukudy, 1984; Zeier and Schreiber, 1998; Zeier, et al., 1999). The higher contribution of ω -hydroxy carboxylic acids in soil compared to maize leaves might thus originate from the input of suberin from roots, composed mostly of ω -hydroxy carboxylic acids.

The presence in the soil of α -hydroxy carboxylic acids with an aliphatic chain length longer than 20 carbon atoms (Table 2) might also be explained by an input of suberin from roots (Zeier et al., 1999). Although α -hydroxy carboxylic acids in the soil can originate from both leaves and from roots, their proportion in the soil was slightly lower than in the leaves, which can be due to preferential degradation of their precursors in the soil. As already mentioned, carboxylic acids and α -hydroxy carboxylic acids cannot be involved in the highly cross linked region of the polymer, since only one hydroxy functional group is available to form an ester link and might be more accessible than the ω -hydroxy carboxylic acids, which can involve two hydroxyl groups in the biopolyester.

Saponification of the soil revealed the presence of diacids and alcohols, which were not identified in maize leaves (Table 1). Diacids are also constitutive monomers of suberized

layers in maize roots (Zeier et al., 1999), and might be characteristic for suberin input to soil (Riederer et al., 1993). Taken together, the differences between the monomer distribution in leaves and soil underline the importance of the contribution of the biopolyester suberin to soil polyester, as suggested by Rasse et al. (2005).

3.4. Conclusions

The three wet chemical methods used to characterise cutin of maize leaves released a significant variety of monomers. Comparison showed they are complementary and raised major mechanistic and experimental differences which could explain the difficulty in comparing them. Cupric oxide oxidation released many compounds similar to those released through saponification, but in lower concentration probably due to further degradation of some monomers under the drastic experimental conditions. Cupric oxide oxidation thus does not appear as a suitable procedure for the quantification of cutin monomers in maize leaves. Transmethylation seems to be a powerful reagent for depolymerisation, but its action is limited to the external part of the polymer, and/or to regions with a low degree of cross linking. The method seems appropriate for depolymerisation of some hydroxy carboxylic acids and carboxylic acids but polyhydroxylated carboxylic acids and unsaturated carboxylic acids are either underestimated or not detected with this method. By contrast, the hydroxide ion in base hydrolysis is able to penetrate deeper into the polymer, releasing inner monomers not accessible to BF_3/MeOH . Polyhydroxylated monomers may be under-represented with BF_3/MeOH , since they are the main constituents of the highly cross linked region inaccessible to this depolymerisation reagent. Saponification gave a more correct idea of the relative distribution of the monomers in the biopolymer and released more cutin-specific compounds than the two other methods. Saponification thus appears the most appropriate for quantification of biopolyesters through release of their monomers. No specific cutin monomers could be detected through thermochemolysis/TMAH of whole maize leaves, likely due to the low abundance of cutin with respect to other plant polymers, especially lignin.

Saponification was successfully applied to a soil sample with a standard error for the mean of less than 10% for the concentration of each monomer. Ester-bound lipids released by saponification of a soil showed a clear input of cutin from above ground biomass and of suberin from below ground biomass. The monomeric composition of the biopolyesters in the soil from saponification suggested a selective preservation of the highly cross linked region of the cutin, possibly due to lower accessibility for microorganisms. On the other hand, the higher proportion of ω -hydroxy carboxylic acids compared to plants, and the presence of diacids showed a large input of suberin to the bound ester moieties evidenced for the soil via saponification.

CHAPITRE 4

COMPOSITION MONOMERIQUE ET SIGNATURE ISOTOPIQUE DES CUTINES ET DES SUBERINES DANS LES FEUILLES, TIGES ET RACINES DES PLANTES DE BLE ET DE MAÏS

**Composition monomérique et signature isotopique
des cutines et des subérines dans les feuilles, tiges et racines
des plantes de blé et de maïs**

Monomer and ^{13}C composition of cutin and suberin of shoots and roots of a C_3
(*Triticum aestivum* L.) and a C_4 (*Zea mays* L.) plant

Soumis à Phytochemistry

4.1. Introduction

Cutins and suberins are biopolyesters which cover the above and belowground tissues of plants. Their principal role is to act as a protective barrier against chemical, biological and physical external attacks and to regulate plant water exchanges (Dean and Kolattukudy, 1976; Kolattukudy, 1984; Bernards, 2002; Heredia, 2003). Cutins are amorphous biopolyesters composed of carboxylic acids with 16 and 18 carbon atoms, bearing epoxy and alcohol groups, interlinked through ester bonds (Kolattukudy and Walton, 1973). Cutins cover the aerial parts of vascular plants (Hunneman and Eglinton, 1971; Goñi and Hedges, 1990a; Riederer et al., 1993), fruits (Eglinton et al., 1968; Velcheva et al., 1981; Ray et al., 1995), mosses and liverwort (Caldicott and Eglinton, 1976; Goñi and Hedges, 1990b). Cutins are embedded within intracuticular waxes and covered with epicuticular waxes to form the plant cuticle. Suberins are structured polyesters composed of an aliphatic and an aromatic domain (Bernards, 2002). The aliphatic part of the biopolyester is usually made of carboxylic acids, ω - or α -hydroxylated, of diacids and alcohols, characterised by chain length longer than 18 carbon atoms. Suberins are mostly present in roots and some suberized tissues of plants (Kolattukudy, 1981). These two biopolyesters were largely studied among plants, attempting to correlate chemical, physical, physiological and biological properties between them and their changes with environmental conditions (Dean and Kolattukudy, 1976; Dean and Kolattukudy, 1977; Kolattukudy, 1981; Lenzian and Schonherr, 1983; Stark and Garbow,

1992; Stark et al., 1994; Bolwell et al., 1997; Cordeiro et al., 1997; Zeier and Schreiber, 1998; Zimmermann et al., 2000). Cutins and suberins were also deeply studied for their potential use as geochemical markers of vegetation sources in soils and sediments (Cardoso and Eglinton, 1975, 1983; Goñi and Hedges, 1990b; Almendros et al., 1999) and for their contribution to soil organic matter (Kögel-Knabner et al., 1989; Dinel, 1996; Nierop et al., 2001; Kögel-Knabner, 2002; Otto and Simpson, 2006). The qualitative and quantitative description of the monomeric composition of the biopolyesters generally used in these studies does not allow understanding their dynamics in plants or in soils. Indeed, understanding synthesis pathways of plant biopolyesters synthesis and their contribution to soil organic matter requires the use of ^{13}C isotope concentrations. The natural abundance of ^{13}C isotopes is a powerful tool that opened new perspectives for the study of plant physiology and of the fate of plant residues in ecosystems at the global and molecular scale. The global ^{13}C isotopic signature of plants is directly correlated to its photosynthetic pathway and allows for the differentiation between C_3 and C_4 plants (Smith and Epstein, 1971). Measuring the ^{13}C natural abundance in plants and soils was used to evaluate the turnover of soil organic matter in ecosystems that were initially under C_3 (or C_4) vegetation and changed to a C_4 (or C_3) vegetation (Balesdent and Mariotti, 1996; Boutton, 1996). Furthermore isotopic signature of plant biomarkers was used to infer vegetation sources in soils and sediments and thus to reconstruct paleoclimatic conditions (Hayes et al., 1999; Chikaraishi and Naraoka, 2005; Dümig et al., 2007).

In plants, molecules are submitted to isotopic fractionation during their biosynthesis (Park and Epstein, 1961; Tcherkez et al., 2003). A better understanding of the fate of carbon in primary and secondary plant products was obtained using ^{13}C isotopes as tracers measured in plant molecules and in the CO_2 respired by plants (Rossmann et al., 1991; Tcherkez et al., 2003; Hobbie and Werner, 2004). The contrasted ^{13}C content in plant compounds can be related to the partial pressure of CO_2 in the atmosphere and in the plant stomates (Brugnoli et al., 1988), to the plant water potential (Cernusak et al., 2003) and to environmental conditions like water salinity (Brugnoli and Lauteri, 1991) or drought (Monti et al., 2006). Photorespiration and isotopic fractionation at metabolic branch points, coupled to different allocation patterns during metabolism for C_3 and C_4 plants, probably influence position-specific and compound-specific isotopic differences. Differing ^{13}C content of mobile and immobile compounds (e.g. sugars vs lignin) may then create isotopic differences among plant pools and along transport pathways (Hobbie and Werner, 2004).

Molecular ^{13}C analyses of plants and soils were also used to study the dynamics and turnover

of carboxylic acids and alkanes (Wiesenberg et al., 2004a), lignins (Bahri et al., 2006) and sugars (Derrien et al., 2006) in cropland soils. The ^{13}C abundance of the monomers constitutive of the biopolyesters in plants has never been studied although it would allow for a better understanding of monomer biosynthesis and of their dynamic in soils. These data are necessary to investigate the fate of biopolyesters in agricultural soils using these molecules as biomarkers of the aboveground or belowground biomass (Rasse et al., 2005).

The objective of this study was to acquire information on the quantities, distribution and isotopic ^{13}C composition of the monomers released from different organs of cropped plant. The carbon isotopic composition of bulk tissues and of monomers released from the biopolyesters of leaves, stems and roots of a wheat plant: the *Triticum aestivum* L. (C_3 plant) and a maize plant: the *Zea mays* L. (C_4 plant) are investigated in relation to plant metabolism and biosynthesis pathway of monomers. The monomers constitutive of the biopolyesters were released by saponification, which we previously showed to be the most appropriate analytical method for these molecules (Mendez-Millan et al., submitted). The released monomers were silylated and separated by gas chromatography (GC) and identified thanks to a mass spectrometer (MS), quantified by flame ionisation detector. Their individual isotopic signatures were measured by GC coupled to an isotopic ratio mass spectrometer (IRMS) via a combustion interface.

4.2. Material and methods

4.2.1. Sampling and preparation of plant samples

Plant samples were collected just before harvest at the INRA experimental field of “Les Closeaux” in the “Parc du Château de Versailles”, France. Leaves, stems and roots of *Zea mays* L. and *Triticum aestivum* L. were separated, air-dried and ground at 100µm. In order to remove free lipids before depolymerisation, about 2 g was extracted three times with an accelerated solvent extractor Dionex ASE 200 in 30 ml stainless-steel extraction vessels. The first extraction was carried out at 75°C and a solvent mixture 3:1 (V:V) dichloromethane / methanol. The extraction was repeated changing the temperature to 140°C. Finally, the sample was extracted with dichloromethane at 140°C. For each extraction, the heating time was 5 min, the static extraction lasted 20 min at a pressure of 5×10^6 Pa (Wiesenberg et al., 2004b).

4.2.2. Saponification

The extracted sample (100 mg) was refluxed for 18 h in an aqueous solution of potassium hydroxide (KOH) 6% in methanol (Cardoso and Eglinton, 1975; Ray et al., 1995). The solution was filtered and the residue washed with methanol/water (9:1) (V:V). 150 ml of distilled water was added to the mixture and the solution was adjusted to pH 2 with HCl 6N in order to extract acidic products (Naafs and Van Bergen, 2002). The aqueous solution was finally extracted with dichloromethane (50 ml x 3). The volume of the recombined extracts was reduced with a rotative evaporator under pressure and transferred into a vial until the sample was prepared for analysis.

4.2.3. Derivatisation

Depolymerisation products were dried under nitrogen and redissolved in pyridine. Silylation with BSTFA (N,O-Bis (trimethylsilyl)-Trifluoroacetamide) containing 1% of trimethylchlorosilane (Altech) was performed at 70°C for 1h. Silylation transformed hydroxy and carboxylic acid functions into their trimethylsilyl ether and ester derivatives (TMS ether / TMS ester).

4.2.4. Identification

Saponification products were analyzed by GC/MS after silylation. Separation and identification were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a SGE BPX-5 column (50 m x 0.25 mm x 0.32 μ m) and an Agilent 5973 Electronic Impact (70 eV) mass spectrometer. The GC oven temperature was programmed at 100°C for 2min, then from 100°C to 150°C at 10°C/min, from 150°C to 200°C at 5°C/min, and finally at a rate of 2°C/min from 200°C to 350°C and 5 min at 350°C. Compounds were identified according to their fragmentation pattern supported by comparison with published mass spectra and with a mass spectra library (Wiley).

4.2.5. Quantification

Separation and quantification were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a SGE BPX-5 column (50 m x 0.25 mm x 0.32 μ m) and a flame ionisation detector (FID). The GC oven temperature program was identical to the one used for identification. The monomers were quantified by using an internal standard, the nonadecanoic acid, added prior to derivatisation. An external calibration with the 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid was used to calculate the concentrations from the ratio of the peak area of each compound to that of the internal standard. The response factor between the nonadecanoic acid and the 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid was close to 1.

4.2.6. Isotopic measurements

Isotopic analyses on individual compounds were carried out with a GC HP5890 coupled with an Isochrom III Isotopic mass spectrometer (Micromass-GVI Optima). Samples were injected in the splitless mode. The same column and chromatographic conditions were used as those used for the identification and quantification. The $\delta^{13}\text{C}$ values were measured for the silylated monomers of the molecules of interest. These values were corrected for the $\delta^{13}\text{C}$ of carbon atoms introduced by silylation, measured off-line with Elemental Analyser (EA) coupled to IRMS (Micromass NA 1500 NC).

4.3. Results and discussion

4.3.1. Monomeric composition of the biopolyesters in plants

The wheat plant contained a higher amount of total identified monomers compared to the maize plant, whatever the part of the plant (Table 1). The depolymerisation of the leaves released 3.5 mg g⁻¹ leaves for wheat and 2.0 mg g⁻¹ leaves for maize. Six classes of compounds were released upon saponification of the leaves, stems and roots of wheat and maize plants (table 2 and 3) and their monomeric composition varied greatly with the tissue and the plant.

Table1: * Concentration mean (µg/g of dry sample) of the monomers released by depolymerisation of leaves, stems and roots of maize and wheat.

¹proportion (in %) of the monomer relative to the total monomers released in the plant tissue.

²Sd (%): Standard deviation of the mean calculated from triplicate analyses. nd for not detected

	maize leaves*	sd ² (%)	maize stems	sd	maize roots	sd	wheat leaves	sd	wheat stems	sd	wheat roots	sd
<i>sum of diacids</i>	nd	-	nd	-	255 (18.7)	1.5	nd	-	nd	-	350 (18.3)	1.7
<i>sum of mid-chain hydroxy acids</i>	770 (37.5)	1.6	42 (6.5)	7.4	5 (0.4)	6.6	2273 (64.3)	5.2	773 (58.0)	3.1	157 (8.2)	3.2
<i>Sum of others aliphatic compounds</i>	1281 (62.5)	4.2	605 (93.5)	5.4	1105 (80.9)	1.2	1263 (35.7)	0.1	559 (42)	3.6	1409 (73.5)	2.1
TOTAL	2051	0,2	647	5,5	1365	1,3	3536	4,8	1332	2,5	1916	1,5

Carboxylic acids, n-alcohols, ω-hydroxy carboxylic acids and α-hydroxy carboxylic acids are often encountered in cutins and suberins (Table2). They were also described in plant waxes and thus are not specific for polyesters (Kolattukudy and Walton, 1973). These four classes of

molecules constituted a large part of the biopolymers, since their total contribution ranges from 35.7% of the total monomers quantified in wheat leaves to 93.5% in maize stems (Table1). This contribution is higher in maize than in wheat whatever the part of the plant.

Two additional monomer classes were identified, the diacids and the mid-chain hydroxy acids with C_{16} and C_{18} carbon atoms (Table3). The diacids are characteristic for suberins (Espelie et al., 1980; Franke et al., 2005) and were identified only in roots where their contribution is similar in maize and wheat. The mid-chain hydroxy monomers are aliphatic acids or diacids bearing 2 or 3 hydroxy groups and 0 or 1 unsaturation. These compounds are generally considered as specific for cutins (Hunneman and Eglinton, 1971; del Rio et al., 1998).

4.3.1.1. Carboxylic acids

The carboxylic acids ranged from C_{16} to C_{24} and their distribution was different among plant materials. The carboxylic acids represented 25.5% and 22.9% of the total released monomers in maize leaves and roots respectively, and up to 54% in maize stems. In wheat, the relative proportions of carboxylic acids, ranging from 15.3% to 15.8%, was lower than in maize.

Carboxylic acids were dominated in all the plant samples by the hexadecanoic acid, followed by the unsaturated octadecanoic acids ($C_{18:1}$, $C_{18:2}$ and $C_{18:3}$ labelled as $C_{18:X}$). In maize stems these two monomers represented 37.3% of the total monomers. Their concentrations and relative proportions were lower in roots when compared to leaves (15.0% of the total monomers in maize roots and 10.1% in wheat roots). Carboxylic acids with more than 20 carbon atoms were present in all plant tissues, except in wheat leaves. In maize, their contributions to total monomers in the different parts of the plant were similar (2.4% to 3.2%) and low compared to the C_{16} and $C_{18:X}$ carboxylic acids. It is usually considered that compounds with an aliphatic chain comprising at least 20 carbon atoms are specific for suberized tissues and particularly for roots. However in maize plant, they cannot be used as tracers for biopolymers of belowground origin since they are also found in aboveground tissues. Furthermore, aliphatic acids are ubiquitous compounds, found in plant biopolyesters but also major components of plant waxes, usually ranging from C_{12} to C_{36} (Kolattukudy and Walton, 1973). In soils and sediments, they may also originate from microorganisms (Fang et al., 2006; Otto and Simpson, 2006).

Free carboxylic acids were previously studied in leaves, stems and roots of wheat and maize (Wiesenberg et al., 2004; Jandl et al., 2005) and were shown to range from C_{13} to about C_{32} , with a high contribution of the C_{16} and $C_{18:X}$ compounds. In the present study, where free lipids were preliminary extracted, no carboxylic acids with more than 20 carbon atoms were

detected in wheat leaves. Matzke and Riederer (1990) found higher proportions of carboxylic acids after depolymerisation of cutin from *Triticum aestivum* L. (26.5% of the total monomers) compared to the proportion we measured in extracted wheat leaves (15.6%, Table 2). Making the hypothesis that these compounds represent only a low contribution to the bound lipids, the lack of carboxylic acids with a chain length longer than 20 carbon atoms and the lower proportion of carboxylic acids in our study suggest that the ASE technique is efficient to remove free lipids. Some waxes might nevertheless remain entrapped within the polymers, but they should account for a small part of the released monomers, which are more probably characteristic for non extractable lipids.

4.3.1.2. *n*-alcohols

Two *n*-alcohols were identified exclusively in maize roots (Table 2): the octadodecanol and the dodecosanol. Their concentration were very low, with 21 and 11 $\mu\text{g} / \text{g}$ roots representing 1.5% and 0.8% of the total aliphatic monomers released, respectively. No homologous series could be detected after depolymerisation. The presence of these two monomers in low concentration compared to the total monomers was already evidenced in suberin of maize primary roots (Zeier et al., 1999).

As already noted for carboxylic acids, the *n*-alcohols are more probably present in the plant waxes extracted prior to depolymerization. In waxes, alcohols are characterized by the predominance of the C_{26} and C_{28} compounds (Bull et al., 2000; Kunst and Samuels, 2003), which were not identified here supporting an efficient removal of free lipids, prior to depolymerisation.

4.3.1.3. ω -hydroxy carboxylic acids

The distribution of ω -hydroxy carboxylic acids ranged from C_{16} to C_{26} depending on the considered plant tissue (Table 2). They represented the largest class of monomers in maize and wheat roots with 52.0% and 56.8% of the total monomers, respectively. They were also abundant in leaves (32.3% of the total monomers in maize leaves and 18.1% in wheat leaves). The $\omega\text{C}_{18:1}$ monomer was the major ω -hydroxy carboxylic acid in all the samples, except in wheat roots where its abundance is just below that of ωC_{22} , representing up to 22% of the total monomers for maize leaves. Leaves of maize and wheat displayed a high concentration of $\omega\text{C}_{18:1}$ and a low concentration of the ω -hydroxy carboxylic acids with aliphatic chains longer than C_{20} . This trend is less marked for stems especially in maize. In maize roots, the ω -hydroxy carboxylic acids ranged from C_{16} to C_{26} maximizing at $\text{C}_{18:1}$ and C_{24} (Table 2), with a

distribution close to that obtained by Zeier et al. (1999) in the suberin of cell walls of developing maize primary roots. In wheat roots the ω -hydroxy carboxylic acids ranged from C₁₆ to C₂₄. The major monomer was the ω C₂₂ while the ω C₂₆ was even not detected.

In cutins, the ω C₁₆ and ω C_{18:1} monomers are commonly released by the different methods of plant depolymerisation (Espelie et al., 1979; Holloway, 1973; Goñi and Hedges, 1990b). Suberins are more specifically characterised by the presence of monomers with an aliphatic chain length longer than 20 carbon atoms with the predominance of the ω C₂₄ and ω C₂₆ monomers (Franke et al., 2005; Matzke and Riederer, 1991). Accordingly, the concentration of the ω -hydroxy carboxylic acids with an aliphatic chain \geq to C₂₀ was higher in roots than in the aboveground parts and their monomeric distribution was different when comparing wheat and maize organs (Table 2).

4.3.1.4. α -hydroxy carboxylic acids

Only one α -hydroxy carboxylic acid was identified in plant samples. The 2-hydroxy tetradocosanoic acid accounted from 7.7% of the total monomers in maize stems to 1.4% in maize roots. This compound was already identified as a cutin monomer in wheat leaves (Matzke and Riederer, 1990), but was not detected in maize leaves by (Espelie and Kolattukudy, 1979). Molina et al., 2006 suggested that the detection of the α -hydroxy carboxylic acids in some studies is only dependent of the depolymerisation methods. Indeed, acid-catalyzed methods released higher amounts of these monomers than base-catalysed methods because of differences in depolymerisation kinetics. These latter compounds were even not identified upon hydrogenolysis (AlLiH₄) depolymerisation. Comparing different results obtained with different methods, they suggested that these compounds are not present in the samples as ester bound lipids but that they derive from N-acyl groups, characteristic for sphingolipids.

In maize roots, several α -hydroxy carboxylic acids have already been identified (Zeier et al., 1999; Zimmermann et al., 2000), with a distribution ranging from C₁₈ to C₂₆ maximizing at C₂₄, according to the age of the roots or the way they were cultivated. The α -hydroxy carboxylic acids were often identified in bound lipids of eelgrass and plants (de Leeuw et al., 1995; Franke et al., 2005). Franke et al. (2005), after depolymerisation of leaves and roots of *Arabidopsis Thaliana*, found a distribution of α -hydroxy carboxylic acids from C₁₆ to C₂₈ with a clear predominance of the α C₂₄ in leaves, whereas in roots only the α C₂₄ was identified. In the present study, we found only the α C₂₄ monomer, which might be due either to the sensitivity of the method or to differences in plant biopolyester composition.

Table2: * Concentration mean ($\mu\text{g/g}$ of dry sample) of the monomers released by depolymerisation of leaves, stems and roots of maize and wheat.

¹proportion (in %) of the monomer relative to the total monomers released in the plant tissue.

²Sd (%): Standard deviation of the mean calculated from triplicates analyses. nd for not detected

	maize leaves* (%) ¹	sd ² (%)	maize stems	sd	maize roots	sd	wheat leaves	sd	wheat stems	sd	wheat roots	sd
Carboxylic acids												
<i>C</i> ₁₆	273 (13.3)	1,5	127 (19.6)	20,7	114 (8.5)	2,3	262 (7.4)	1,4	105 (7.9)	3.1	134 (7.0)	4.5
<i>C</i> ₁₈	51 (2.5)	3,8	87 (13.4)	15,2	67 (4.9)	0,5	93 (2.6)	15	48 (3.6)	16.2	51 (2.7)	15
<i>C</i> _{18:X}	150 (7.3)	0,3	115 (17.7)	5,6	88 (6.5)	2,7	186 (5.2)	1,2	46 (3.5)	8.0	59 (3.1)	3.9
<i>C</i> ₂₀	17 (0.8)	0,1	6,5 (1.1)	3,1	18 (1.3)	1,7	nd	-	nd	-	25 (1.3)	1.7
<i>C</i> ₂₄	33 (1.6)	3,1	15 (1.5)	4,6	26 (1.9)	1,3	nd	-	12 (0.9)	-	23 (1.2)	7.0
<i>sum of carboxylic acids</i>	524 (25.5)	0.1	350 (54.1)	9.2	313 (22.9)	1.8	541 (15.3)	3.6	211 (15.9)	5.8	294 (15.3)	3.8
Alcohols												
<i>AlC</i> ₁₈	nd	-	nd	-	21 (1.5)	2,4	nd	-	nd	-	nd	-
<i>AlC</i> ₂₂	nd	-	nd	-	11 (0.8)	3,0	nd	-	nd	-	nd	-
<i>sum of alcohols</i>	nd		nd		32 (2.3)	2.6	nd	-	nd	-	nd	-
ω-hydroxy carboxylic acids												
ω <i>C</i> ₁₆	54 (2.6)	1,9	52 (8.0)	12,0	150 (10.1)	0,6	57 (1.6)	2,3	nd	-	164 (8.6)	2.7
ω <i>C</i> ₁₈	nd	-	nd	-	32 (2.3)	1,6	nd	-	nd	-	nd	-
ω <i>C</i> _{18:1}	452 (22.0)	2,4	56 (8.6)	7,9	234 (17.1)	1,0	401 (11.3)	4,7	181 (13.6)	2.6	349 (18.2)	1.7
ω <i>C</i> ₂₀	nd	-	nd	-	30 (2.2)	1,6	nd	-	nd	-	59 (3.1)	2.6
ω <i>C</i> ₂₂	12 (0.5)	1,9	31 (4.8)	4,5	68 (5.0)	2,8	117 (3.3)	1,6	49 (3.7)	2.1	354 (18.5)	2.4
ω <i>C</i> ₂₄	70 (3.4)	6,8	39 (6.0)	6,7	134 (9.8)	2,7	67 (1.8)	6,5	86 (6.4)	10.4	192 (10.0)	10,2
ω <i>C</i> ₂₆	74 (3.6)	0,1	27 (4.2)	0,3	62 (4.5)	1,9	nd	-	nd	-	nd	-
<i>sum of ω-hydroxy carboxylic acids</i>	662 (32.3)	1.2	205 (31.7)	1.0	710 (52.0)	1.0	642 (18.1)	3.4	316 (23.7)	3.1	1088 (56.8)	3.4
α-hydroxy carboxylic acids												
α <i>C</i> ₂₄	95 (4.6)	0,2	50 (7.7)	3,3	50 (3.7)	2,9	80 (2.3)	3	32 (2.4)	3.4	27 (1.4)	2.3

4.3.1.5. Diacids

Four different diacids were identified in wheat and maize roots (Table 3). The DC_{18:1} was the most abundant monomer and represented 15.1 % and 14.0 % of total monomers in maize and wheat roots, respectively. It occurs along with and the DC₁₆ and DC₁₈ in maize roots and the DC₁₆ and the DC₂₂ in wheat roots. The concentrations of the latter diacids were very low compared to that of the DC_{18:1}. These results are in accordance with the study of maize roots by Zeier et al. (1999) and Zimmerman et al. (2000), who found that, whatever the age or the part of the root, the DC_{18:1} was the major monomer, followed by the DC₁₆ and DC₁₈. Given the lack of diacids in leaves and stems and their presence in roots, diacids and particularly the DC_{18:1} can be regarded as markers for root tissues.

Table3: * Concentration mean ($\mu\text{g/g}$ of dry sample) of the diacid and mid-chain hydroxy acid monomers released by depolymerisation of leaves, stems and roots of maize and wheat.

¹proportion (in %) of the monomer relative to the total monomers released in the plant tissue.

²Sd (%): Standard deviation of the mean calculated from triplicate analyses. nd for not detected

	maize leaves* (%) ¹	Sd ² (%)	maize stems	sd	maize roots	sd	wheat leaves	sd	wheat stems	sd	wheat roots	sd
Diacids												
DC ₁₆	nd	-	nd	-	42 (3.1)	0.8	nd	-	nd	-	50 (2.6)	7.9
DC ₁₈	nd	-	nd	-	22 (1.6)	3.3	nd	-	nd	-	-	-
DC _{18:1}	nd	-	nd	-	191 (14.1)	1.8	nd	-	nd	-	289 (15.1)	1.1
DC ₂₂	nd	-	nd	-	-	-	nd	-	nd	-	12 (0.6)	8.5
Mid-chain hydroxy acids												
<i>x, 16 dihydroxy hexadecanoic acids</i> (<i>x=8, 9 and 10</i>) (<i>x,16-DiOH C₁₆</i>)	166 (8.1)	3.9	11 (1.7)	13,6	nd	-	321 (9.1)	3,4	90 (6.8)	2,6	27 (1.4)	5,1
<i>9-hydroxy hexadecanedioic acid</i> (<i>9-OH DC₁₆</i>)	32 (1.6)	7.4	16 (2.5)	8,4	nd	-	32 (0.9)	1,9	130 (9.8)	9,7-	nd	-
<i>9, 10 dihydroxyoctadecanoic acid</i> (<i>9,10-DiOH C₁₈</i>)	nd	-	nd	-	nd	-	54 (1.5)	3,3	nd	-	nd	-
<i>11, 18 dihydroxyoctadecenoic acid</i> (<i>11,18-DiOH C_{18:1}</i>)	269 (13.1)	1,0	nd	-	5 (0.4)	6,6	420 (11.9)	4,6	144 (10.8)	2,0	29 (1.5)	4,0
<i>x, 18 dihydroxyoctadecenoic acids</i> (<i>x=9 and 10</i>) (<i>x,18 Di-OH C_{18:1}</i>)	139 (6.8)	0,9	nd	-	nd	-	160 (4.5)	2,2	24 (1.8)	3,8	nd	-
<i>9,10,18 trihydroxyoctadecanoic acid</i> (<i>9,10,18-TriOH C₁₈</i>)	46 (2.2)	5,7	6 (0.9)	2,0	nd	-	368 (10.4)	7,2	123 (9.2)	6,3	30 (1.6)	18,3
<i>9,10 epoxy, 18 hydroxyoctadecanoic acid</i> <i>9,10-epoxy,18-OH C₁₈</i>	118 (5.7)	0,5	9 (1.4)	3,0	nd	-	918 (26.0)	5,6	262 (19.7)	0,3	70 (3.6)	1,5

4.3.1.6. Mid-chain hydroxy acids

Seven mid-chain hydroxy acids were identified in the depolymerisate of plant samples (Table 3). Their total concentration is high in wheat leaves, where they represented 64.3% of the total monomers. Wheat stems and maize leaves contained the same amount of mid-chain hydroxy acids (770 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry sample), which represented 58.0% and 37.5% of the total monomers for wheat stems and maize leaves, respectively. Wheat roots as well as maize stems and roots contained low amounts of mid-chain hydroxy compounds.

The isomeric mixture (x,16)-dihydroxy hexadecanoic acids (x=8, 9, and/or10) (x,16-DiOH C₁₆), the 18-hydroxy-9,10-epoxy octadecanoic acid (9,10-epoxy, 18-OH C₁₈) and the 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid (9,10,18-TriOH C₁₈) were detected in all the samples except in maize roots (Table 1). The 9,10-epoxy, 18-OH C₁₈ was quantified as the isomeric mixture of the 9-methoxy,10,18-dihydroxyoctadecanoic and the 9-hydroxy,10-methoxy,18-hydroxyoctadecanoic acids. When the epoxy acid is released through saponification, the epoxy function reacts upon basic hydrolysis to be converted into vicinal diols and vicinal methoxy-alcohol groups (Goñi and Hedges, 1990a; Holloway and Deas, 1973). Thus, the 9,10,18-TriOH C₁₈ acid found in the present study probably results from the conversion of a part of the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid. Therefore, under our analytical procedure, the 9,10,18-TriOH C₁₈ acid originating from the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid could not be distinguished from the preexisting 9,10,18-TriOH C₁₈ acid and the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid might be underestimated. These compounds are the most common monomers identified in cutins (Hunneman and Eglinton, 1971; Holloway, 1973; Espelie et al., 1979; del Rio and Hatcher, 1998; Espelie et al., 1980; Matzke and Riederer, 1991).

The 9-hydroxyhexadecan 1,16 dioic acid (9-OH DC₁₆) was present only in the stems and leaves of wheat and maize (Table 1). This compound was previously identified as a major suberin mid-chain hydroxylated monomer of the *Aspidistra elatior* roots (Zeier and Schreiber, 1998). The 9,10-dihydroxyoctadecanoic acid (9,10-DiOH C₁₈), recognized thanks to the mass spectrum of the corresponding synthetic product published in Eglinton et al. (1968), was only detected in wheat leaves. Finally, three isomers of the dihydroxyoctadecenoic acid could also be identified through their mass spectra: the 9,18-dihydroxyoctadecenoic acid which coeluted with the 10,18-dihydroxyoctadecenoic acid (x,18-DiOH C_{18:1}) and the 11,18-dihydroxyoctadecenoic acid (11,18-DiOH C_{18:1}). These compounds were already described in cutins of different plant species (Graça et al., 2002). We will now examine the distribution, of mid-chain hydroxy compounds in each plant organ so as to derive their specificity as markers of above ground tissues.

4.3.1.7. Distribution of mid-chain hydroxy monomers in wheat leaves.

The highest concentrations of mid-chain hydroxy acids were obtained from the depolymerisation of wheat leaves (2273 µg g⁻¹ dry leaves). The most abundant compound was the 9,10-epoxy, 18-OH C₁₈ acid (25.9%) followed by the 11,18-DiOH C_{18:1} acid (11.9%), 9,10,18-TriOH C₁₈ acid (10.4%) and the x,16-DiOH C₁₆ acids (9.1%). The distribution of the mid-chain hydroxy acids was different from that found in the cuticles of *Triticum aestivum* L.

by Matzke and Riederer (1990). In this latter study only two mid-chain hydroxy acids were identified: the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid and the x,16-DiOH C₁₆ acids, accounting for 36.7% and 21.4% of the total released monomers, respectively.

These differences can be due to differences in the nature of plant samples and in the chemical procedure. Concerning the first point, the monomeric composition of polyesters as cutins and suberins is known to vary with the growth stage of a plant (Riederer and Schonherr, 1988), the way plants are grown (Zimmermann et al., 2000), and the plant tissue examined (Espelie et al., 1982; Zeier and Schreiber, 1997). Concerning the second point, in the present study, the monomers were obtained from depolymerisation of total extracted leaves, which implies that all the biopolyester types present in the different parts of the leaves were depolymerized. By contrast, in the study of Matzke and Riederer (1990), the wheat cuticle was enzymatically isolated. Furthermore, Matzke and Riederer (1990) depolymerized the samples using transmethylation while we used saponification. These experimental differences could explain the different distributions of the mid-chain hydroxy acids observed by Matzke and Riederer (1990) in the cutins of wheat leaves.

4.3.1.8. Distribution of mid-chain hydroxy monomers in maize leaves.

All the mid-chain hydroxy carboxylic acids described in Table 3 were identified in maize leaves, except the 9,10-DiOH C₁₈ acid. The major monomers released were the 11,18-DiOH C_{18:1} acid (13.1%), and the x,16-DiOH C₁₆ acids (8.1%) (Table 1). The 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid, which was the most abundant monomer in wheat leaves accounted only for 5.7% of the total monomers released from maize leaves. The contribution and distribution of the mid-chain hydroxy acids in maize leaves were close to those found in maize cuticle by Espelie and Kolattukudy (1979). They also quantified the dihydroxyoctadecenoic acid (with no detail on the location of the hydroxy groups) and the x,16-x,16-DiOH C₁₆ acids as major compounds of maize cuticle, while the 9,10,18-TriOH C₁₈ acid was a minor constituent, such as in the present study. Nevertheless, the concentration of 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid is lower in the present study than that found by Espelie and Kolattukudy (1979). As already explained for wheat leaves, this difference might be due i) to the use of saponification as depolymerisation method transforming a part of the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid into the 9,10,18-TriOH C₁₈ acid and ii) to the preparation of the sample prior to depolymerization. Espelie and Kolattukudy (1979) analysed the maize cuticle and the bundle sheaths, enzymatically isolated from maize leaves. In bundle sheaths the proportion of the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid is lower than in the cuticle. By contrast, we submitted the whole extracted maize leaves to

depolymerisation, which can explain, with the chemical transformation of monomer, the lower proportion of the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ when compared to the study of Espelie and Kolattukudy (1979).

4.3.1.9. Mid-chain hydroxy monomers released from maize and wheat roots.

The contribution of mid-chain hydroxy acids to total root monomers was very low. In maize roots only the 11,18-DiOH C_{18:1} could be detected, and represented 0.4% of the total released monomers (Table 1 and 3). In wheat roots, four of the seven mid-chain hydroxy acids could be identified, representing only 8.2% of the total monomers.

4.3.1.10. Distribution of mid-chain hydroxy monomers in maize and wheat stems.

Wheat stems contained a high proportion of mid-chain hydroxy acids (58% of the total released monomers, Table 1). Their monomeric distribution was close to that of wheat leaves, except for the 9-OH DC₁₆ acid which concentration was higher in wheat stems. By contrast, maize stems contained low amount of mid-chain hydroxy compounds (42 µg g⁻¹ of dry stems, representing only 6.5% of the total released monomers, Table 1), and their monomeric composition was close to that of maize roots.

4.3.2. Specificity of the monomers and their possible use as biomarkers of below and above ground tissues.

Diacids were only present in the polyesters of root samples, and can thus be regarded as characteristics for the below ground plant biomass. Mid-chain hydroxy acids can be considered as specific for above ground biomass and related to the presence of cutin. They were abundant in wheat aboveground tissues and less in maize. Their abundance in wheat stems suggests that these plant organs comprise a structure close to that of cutin. These mid-chain hydroxyl acids are much less abundant in maize stems. Moreover, these plant organs exhibit a substantial contribution of ω-hydroxy acids with an aliphatic chain ≥ to C₂₀, thus pointing to some suberin-like structure in addition to cutin for their biopolyesters although no diacids could be detected,. Thus, the suberin is not specific for below ground tissues in non woody plants.

When compared to leaves and stems, the higher proportion of ω-hydroxy carboxylic acids observed in roots is especially due to the high concentration of the ωC₂₂ and ωC₂₄ monomers. The release in high concentration of the latter monomers can be considered as characteristic

for root tissues. The other monomers are common to cutin or suberin biopolyesters and could not strictly be related to the aboveground or the belowground biomass.

4.3.3. Isotopic composition

The table 4 shows the bulk ^{13}C isotopic signature in the different parts of the plants. These results obtained in the present analysis are in adequacy with those previously published for the same experimental fields (Dignac et al., 2005; Bahri et al., 2006). Maize leaves were 0.3 ‰ depleted compared to stems and 0.9 ‰ depleted compared to roots. In wheat, the isotopic signature of leaves was 1.0 ‰ lower than that of stems, and close to that of roots. Badeck et al. (2005) compiled the data from literature to evidence differences in isotopic signatures between plant organs, probably caused by post-photosynthetic fractionation processes, such as respiration (Ghashghaie et al., 2003; Tcherkez et al., 2003; Nogués et al., 2004) or transport of metabolites. The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio shift between the bulk plant organs can also be due to differences in the relative proportions of the different biomolecules (eg. lipids, cellulose...) which have different ^{13}C signature (Gleixner et al., 1993). However this hypothesis was rejected by Badeck et al (2005). So as to discriminate between post-photosynthetic fractionation and molecular composition which is responsible for the relative isotopic composition of leaves and roots in maize and wheat, we investigated the isotopic composition of the monomers.

Table 4 : Bulk isotopic signature ($\delta^{13}\text{C}$, ‰, VDPB) of the plant tissues, and estimated isotopic signature of their biopolyesters, calculated as the weighted average of the monomers released by saponification balanced by their concentration. (standard deviation for n = 3 repetitions)

* $\delta^{13}\text{C}_{\text{average}} = (\sum C_i \delta^{13}\text{C}_i) / C_{\text{tot}}$. The estimated isotopic signature was performed with 100% of the monomers for wheat organs and 99.1% for maize leaves, 89.9% for maize stems and 96.6% for maize roots.

	leaves maize	stems maize	roots maize	leaves wheat	stems wheat	roots wheat
Bulk $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-12.8±0.5	-12.5±0.5	-11.9±0.5	-28.6±0.5	-27.6±0.5	-28.7±0.5
Estimated $\delta^{13}\text{C}$ (‰) of the biopolyesters*	-18,1±0.5	-16,0±0.5	-17,5±0.5	-33.0±0.5	-30,6±0.5	-33,1±0.5

4.3.3.1. ^{13}C depletion of biopolyesters compared to bulk organs

Thanks to the measurement of the isotopic signature of the different monomers released by the depolymerisation of the plant organs (Table 5), we could estimate the isotopic signature of plant biopolyesters by calculating the average isotopic signature of the monomers weighted by their concentration in the considered plant organs (Table 4). The computed $\delta^{13}\text{C}$ values evidenced that the biopolyesters are always depleted in ^{13}C compared to the bulk plant tissue. Such isotopic depletion was already observed for the free lipid fraction of plants, and was explained by the biosynthetic pathway of lipids in plant cells (Melzer and Schmidt, 1987; Rossmann et al., 1991; Hobbie and Werner, 2004). In maize, the biopolyesters were depleted relative to the total organ by 5.3 ‰ in leaves, 3.5 ‰ in stems and 5.6 ‰ in roots. In the wheat plant, the depletion of biopolyesters compared to the bulk organ was slightly lower than for maize, with 4.4 ‰ for leaves, 3.0 ‰ for stems and 4.4 ‰ for roots (Table 4). These results are in accordance with those of Chikaraishi et al., (2004) who demonstrated that lipids in C_3 plants are less depleted in ^{13}C relative to the bulk tissue than lipids in C_4 plants. For both maize and wheat, stems were enriched in ^{13}C compared to leaves and roots (Table 4), which might be explained by a post-photosynthetic fractionation in bulk ^{13}C isotopes between plant organs (Hobbie and Werner, 2004; Badeck et al., 2005). Differences in $\delta^{13}\text{C}$ of roots compared to leaves can be accounted for different composition of monomers as estimated $\delta^{13}\text{C}$ gives same trends as measured bulk values.

4.3.3.2. $\delta^{13}\text{C}$ values of monomers released from plant organs

The $\delta^{13}\text{C}$ values of the monomers released from the saponification of the six samples of plant tissues (Table 5) showed clear differences between maize and wheat organ and with a given plant organ.

In maize, the isotopic signatures of mid-chain hydroxy carboxylic acids in stems and leaves were less variable than those observed for carboxylic and ω -hydroxy carboxylic acids. By contrast, in the wheat plant, the $\delta^{13}\text{C}$ values of some mid-chain hydroxy carboxylic acids greatly varied with the organ. For example, the $\delta^{13}\text{C}$ of the 11,18-DiOH $\text{C}_{18:1}$ was -34.6‰ in leaves, -35.5‰ in stems and -38.2‰ in roots. Contrary to what is observed for maize plant, the $\delta^{13}\text{C}$ of ω -hydroxy carboxylic acids, except for the ωC_{24} monomer, were similar in all the wheat organs.

Table 5 : ^{13}C signature (‰) of monomers released by saponification of maize and wheat leaves, stems and roots.
na for not available. Standard deviation was calculated with a minimum of 3 repetitions.

	maize leaves	maize stems	maize roots	wheat leaves	wheat stems	wheat roots
Carboxylic acids						
C_{16}	-20.1±0.5	-22.3±0.5	-20.8±0.5	-30.4±0.5	-29.5±0.5	-26.1±0.6
C_{18}	-23.0±0.5	-25.6±0.6	-20.8±0.6	-26.8±0.6	-24.4±0.5	-24.9±0.5
$C_{18:X}$	-18.2±0.5	-17.2±0.5	-15.6±1.4	-29.4±0.5	-27.6±0.5	-26.1±0.9
C_{20}	na	na	-21.3±0.7	na	na	-35.9±1.0
C_{24}	-23.2±0.5	-20.7±0.8	-21.3±0.5	na	-33.9±0.5	-35.5±1.0
Alcohols						
AlC_{18}	na	na	-29.3±0.5	na	na	na
AlC_{20}	na	na	na	na	na	na
ω-hydroxy carboxylic acids						
ωC_{16}	-16.6±0.5	-18.6±1.0	-15.7±0.5	-34.1±0.7	na	-34.5±0.5
ωC_{18}	na	na	-14.6±0.5	na	na	na
$\omega C_{18:1}$	-16.8±0.5	-20.8±0.5	-16.0±0.5	-30.6±0.9	-31.9±0.5	-31.5±0.5
ωC_{20}	na	na	na	na	na	-37.0±0.6
ωC_{22}	-21.1±0.5	na	-18.0±1.1	-36.5±1.0	-36.9±0.5	-36.9±0.5
ωC_{24}	-20.9±0.5	-18.0±0.5	-22.6±1.0	-32.6±1.0	-31.3±0.5	-34.0±0.5
ωC_{26}	-18.6±0.7	-18.7±1.0	-21.0±0.7	na	na	na
α-Hydroxy carboxylic acids						
αC_{24}	-22.1±0.5	na	-19.2±0.5	-34.2±0.5	-34.9±0.5	-33.4±0.5
Diacids						
DC_{16}	na	na	-15.1±0.5	na	na	-36.1±0.9
DC_{18}	na	na	-20.2±0.5	na	na	na
$DC_{18:1}$	na	na	-16.3±0.7	na	na	-34.9±0.5
DC_{20}	na	na	na	na	na	na
DC_{22}	na	na	na	na	na	-37.0±0.5
Mid chain hydroxy compounds						
<i>x,16 dihydroxy carboxylic acids (x=8, 9 ana 10) (x,16-DiOH C_{16})</i>	-16.4±0.5	na	na	-34.5±0.5	-36.1±0.5	-37.1±0.5
<i>9-hydroxy hexadecanoic diacid (9-OH DC_{16})</i>	-16.1±0.5	na	na	-33.6±2.0	-32.8±0.5	na
<i>9, 10 dihydroxy octadecanoic acid (9,10-D-OH C_{18})</i>	na	na	na	-30.7±0.5	na	na
<i>11, 18 dihydroxy octadecenoic acid (11,18 DiOH $C_{18:1}$)</i>	-17.0±0.5	-19.2±1.3	na	-34.6±0.7	-35.3±0.5	-38.2±0.7
<i>x, 18 dihydroxy octadecenoic acids (x=9 ana 10) (x,18-DiOH $C_{18:1}$)</i>	-17.6±0.5	na	na	-36.1±0.6	-36.8±0.5	na
<i>9,10,18 trihydroxy octadecanoic acid (9,10,18-TriOH C_{18})</i>	-18.1±0.5	-18.9±0.5	na	-34.6±0.7	-37.4±0.5	-26.4±0.9
<i>9,10 epoxy 18 hydroxy octadecanoic acid 9,10-epoxy,18-OH C_{18}</i>	-17.6±0.5	-17.1±0.6	na	-34.4±0.7	-34.6±0.5	30.9±1.0

As previously observed for bulk isotopic signature, the differences in the $\delta^{13}\text{C}$ of a specific monomer between leaf, stem and root organs can be explained by a post-photosynthetic fractionation on the ^{13}C isotopes between plant organs (Hobbie and Werner, 2004; Badeck et al., 2005). In plant, the bound lipid synthesis and turnover is probably slower than that of free lipids. Monomers constitutive of a biopolyester are synthesized according to the plant requirements in the course of time (Kolattukudy and Dean, 1974; Lenzian and Schonherr, 1983; Riederer and Schonherr, 1988). Furthermore, Ménot and Burns, (2001) and Skrzypek et al., (2007) evidenced that different weather conditions induced high differences in isotopic content of molecules in a same plant species. In laboratory experiments, high hydric and salt stresses applied to plants led to an isotopic fractionation of the synthesised molecules (Brugnoli and Lauteri, 1991; Monti et al., 2006). The combination of all these possible sources of variation could lead to the high shifts in isotopic signatures of the monomers observed in the present study since plant samples were collected just before harvest and were subjected to environmental stresses.

In a same class of compounds, the monomers with a chain length longer than 20 carbon atoms were generally depleted in ^{13}C when compared to the C_{16} and C_{18} monomers (Table 5). Nevertheless, the ωC_{24} shows a significative enrichment in ^{13}C when compared to lower homologues in wheat. In a monomer class, the depletion in ^{13}C with increasing chain length was already observed for free alkanes and carboxylic acids in wheat and maize plant (Chikaraishi et al., 2004; Wiesenberg et al., 2004a). The elongation of the carbon chain involves the acetyl-CoA and the malonyl-CoA that are responsible for the ^{13}C depletion (Melzer and Schmidt, 1987). The high variation in $\delta^{13}\text{C}$ can also be the result of the many intermediate biomolecules formed during the C chain elongation process (Chikaraishi et al., 2004).

Mid-chain hydroxy monomers are compounds with 16 and 18 carbon atom. Their biosynthetic pathway had been deeply studied. According to Dean and Kolattukudy, (1977), Kolattukudy, (1981) and Lenzian and Schonherr, (1983), all the compounds with a same chain length originate from the same carboxylic acid. Since the biosynthesis pathway transforming a molecule into another does not involve any change in the aliphatic carbon chain, the molecules with the same number of carbon atoms should have the same isotopic signatures, while significant variations were observed for all plant samples (Table 4). In maize leaves, mid-chain hydroxy compounds were slightly enriched compared to the other

classes of monomers. Isotopic signatures of all the mid-chain hydroxy acids were similar, except for the enrichment of the x,16-DiOH C₁₆. Accordingly, in maize stems, the isotopic signatures of mid-chain hydroxy monomers were close. On the opposite, in wheat leaves, stems and roots, isotopic values of mid-chain hydroxy monomers showed high disparities. These variations in ¹³C content of the monomers could have several explanations. Chikaraishi et al (2007) already reported differences in isotopic signatures of free carboxylic acids, alcohols and alkanes from plant leaves of terrestrial higher plant. These three compound families derive from the same alkyl precursor, meaning that, for example, the hexadecanol and the hexadecanoic acid derived from the alkyl C₁₆ precursor. Nevertheless, Chikaraishi et al (2007) explained the isotopic differences by a ¹³C fractionation occurring on the biosynthetic branching point. In the present study, the differences between the monomers with the same aliphatic chain length are higher than those observed by Chikaraishi et al (2004) and could not be explained only by ¹³C fractionation at the biosynthetic branching point. Thus, photorespiration and isotopic fractionation at metabolic branch points, coupled to different environmental stresses during metabolism for C₃ and C₄ plants, probably influence ¹³C content of cutin and suberin monomers. Differing ¹³C content of mobile (sugar) and immobile (cutin and suberin monomers) compounds such may then create isotopic differences among plant pools and along transport pathway (Hobbie and Werner, 2004). These are probably the main causes of such high disparity in isotopic values at the organ scale, such as at the plant scale.

4.4. Conclusion

This study allowed for a complete identification and quantification of biopolyesters in the aboveground and the belowground of the two crop plants. Some biomarkers were specific for leaves stems and roots. Mid-chain hydroxy acids could be related to the aboveground biomass and to the presence of cutin. They were released in high concentration from leaves and from wheat stems. By contrast, diacids were only present in the polyesters of root samples, and can be regarded as characteristic for the belowground plant biomass. Maize stems had a low content in mid-chain hydroxy acids contrary to wheat stems which had a composition close to that of wheat leaves. This clear difference in the biopolymer composition of the two plants species suggests that maize stems contain more suberin-like biopolymers than wheat stems. Isotopic signatures measured in each monomer released by saponification underline the complexity of the plant physiology, which might be influenced by many factors, such as environmental conditions.

Specificity in the monomeric and isotopic composition of above and belowground tissues evidenced in this study will be useful to evaluate the specific dynamics of these tissues in soils and to differentiate their contribution to SOM formation.

CHAPITRE 5

DYNAMIQUE DES MONOMÈRES SPÉCIFIQUES DES CUTINES ET DES SUBÉRINES DANS UN SOL AGRICOLE

Dynamique des monomères spécifiques des cutines et des subérines dans un sol agricole

Molecular dynamics of cutins and suberins in an agricultural soil estimated by natural abundance ^{13}C labelling in a wheat/maize succession

Soumis à Organic Geochemistry

5.1. Introduction

Stabilization and degradation processes turning the fresh plant material into stabilised soil organic matter (SOM) remain unclear. Differences in these mechanisms, when roots and shoots of plants are considered, lead to contrasted contributions of above ground and below ground plant residues to SOM (Rasse et al., 2005). Previous studies suggested that root contribution to SOM is higher than that of above ground tissues despite the lower inputs of below ground tissues (Balabane and Balesdent 1996). Cutin and suberin monomers can be used to study the degradation and stabilization processes of roots vs shoots in the soil matrix, for two main reasons (Rasse et al., 2005):

(1) They are plant biomarkers of above and below ground tissues. Cutin is an amorphous polyester constituted of carboxylic acids with an aliphatic chain of 16 and 18 carbon atoms, bearing epoxy and hydroxy groups. Cutins cover the above ground biomass of higher plants and fruit (Hunneman and Eglinton, 1971; Holloway, 1973; Espelie et al., 1979; Schmidt and Schönherr, 1982; Kolattukudy, 1984; Riederer and Schonherr, 1988; Tegelaar et al., 1989b; Goñi and Hedges, 1990a,b; Matzke and Riederer, 1991; Ray et al., 1998; Heredia, 2003). Suberin is a structured polyester mostly composed of carboxylic acids, ω -hydroxy carboxylic acids and diacids especially located in roots of higher plants, in bark and some suberized tissues of the above ground biomass tissues. The particularity of suberin is the large amount of monomers with a carbon chain longer than 20 carbon atoms (Dean and Kolattukudy, 1976, 1977; Holloway, 1983; Cordeiro et al., 1997; Zeier and Schreiber, 1997, 1998; Cordeiro et al.,

1998; Bernards, 2002;).

(2) Cutin and suberin are known to significantly contribute to SOM, and their constitutive monomers are often released from the hydrolysis of soils (Riederer et al., 1993; Kögel-Knabner et al., 1989; Nierop, 1998; Kögel-Knabner, 2002; Nierop et al., 2003; Otto et al., 2005; Otto and Simpson, 2006;). Their monomers are also encountered in sediments due to their preservation during sedimentation and diagenesis (Cardoso et Eglinton, 1975, 1983; Nip et al., 1986; Goñi and Hedges, 1990c; Gleixner, 2001).

Previous studies on cutin and suberin contribution to soils did not allow to follow the dynamics of these biopolyesters. The latter can only be investigated through the use of isotope labelling. In order to describe the fate of these macromolecules in situ in soils, and to precise their degradation /stabilisation processes, we therefore used stable carbon isotope labelling at natural abundance in a succession of C₃ and C₄ vegetation. C₃ plants such as wheat and C₄ plants such as maize have different ¹³C contents ($\delta^{13}\text{C} \approx -27\text{‰}$ and -12‰ , respectively), due to different photosynthetic pathway (Smith and Epstein, 1971). The ¹³C natural abundance in plants and soils can be used to evaluate the turnover of SOM in ecosystems that were initially under C₃ (or C₄) vegetation and changed to a C₄ (or C₃) vegetation (Balesdent and Mariotti, 1996; Boutton, 1996). At the molecular level, ¹³C analyses were successfully applied to study the dynamic of carboxylic acids and alkanes (Wiesenberg et al., 2004a; Quéneá et al., 2006), lignins (Bahri et al., 2006) and sugars (Derrien et al., 2006) in cropland soils. The ¹³C natural abundance of the monomers constitutive of cutin and suberin biopolyesters in soil has never been studied although it would allow for a better understanding of their dynamic in soils.

The aims of this work were to 1) identify cutin and suberin monomers in leaves, stems and roots of wheat and maize and assess their specificity for above- and below ground biomass; 2) quantify the specific monomers in plants and soils in order to evaluate their inputs from plants to soil and their contribution to SOM; 3) estimate the incorporation of maize-derived above- and below ground biomarkers in soils after 6 and 12 years of maize cropping after wheat.

5.2. Material and methods

5.2.1. Experimental site, sampling and sample preparation

Soil and plant samples were collected from the INRA experimental field of “les Closeaux” near the Château de Versailles in France, described in details in Dignac et al. (2005). The site consists in a 12 year chronosequence of maize (C₄ plant) cropping, replacing previous C₃ vegetation. The field was divided into 32 plots (6.4 m×15 m). When the experimentation began in 1993, the soil was cropped with wheat. Each year, since 1993, three plots were converted into maize and four control plots were left with wheat. Soils were sampled from 0 to 25 cm in three points of the diagonal for each plot farther from the borders and mixed together. Soils collected in 2002 (9 years of maize cropping after wheat and control soil under wheat) and 2005 (12 years) were used for this study. Soil samples were sieved successively at 5mm and 2mm to remove crop residues, air-dried and ground at 200µm.

Leaves, stems and roots of maize and wheat were collected just before harvest, air-dried and ground at 100µm. Root sampling by separation from soil cores is described in Bahri et al. (2006).

In order to remove free lipids before depolymerisation, about 2 g of plant tissue or soil was extracted three times with an accelerated solvent extractor Dionex ASE 200 in 30 ml stainless-steel extraction vessels. The first extraction was carried out at 75°C in a solvent mixture 3:1 (V:V) dichloromethane / methanol. The extraction was repeated changing the temperature to 140°C. Finally, the sample was extracted with dichloromethane at 140°C. For each extraction, the heating time was 5 min, the static extraction lasted 20 min at a pressure of 5×10^6 Pa (Wiesenberg et al., 2004b).

5.2.2. Saponification

The extracted sample (100 mg for plants and 1g for soils) was refluxed for 18 h in an aqueous solution of potassium hydroxide (KOH) 6% in methanol (Cardoso and Eglinton, 1975; Ray et al., 1995), which we recently showed to be the most appropriate method for the quantification and characterization of biopolyesters in plants and soils (Mendez-Millan et al., submitted). The solution was filtered and the residue washed with methanol/water (9:1) (V:V). 150 ml of distilled water was added to the mixture and the solution was adjusted to pH 2 with HCl 6N in order to extract acidic lipids (Naafs and Van Bergen, 2002). The aqueous solution was finally

extracted with dichloromethane (50 ml x 3). The volume of the recombined extracts was reduced with a rotative evaporator under pressure and transferred into a vial until the sample was prepared for analysis.

5.2.3. Derivatisation

Depolymerisation extracts were dried under nitrogen and redissolved in pyridine. Silylation with BSTFA (N,O-Bis (trimethylsilyl)-Trifluoroacetamide) containing 1% of trimethylchlorosilane (Altech) was performed at 70°C for 1h. Silylation transformed hydroxy and carboxylic acid functions into their trimethylsilyl ether and ester derivatives (TMS ether / TMS ester).

5.2.4. Identification

Saponification extracts were analyzed by GC/MS after derivatisation. Separation and identification were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a SGE BPX-5 column (50 m x 0.25 mm x 0.32 µm) and an Agilent 5973 Electronic Impact (70 eV) mass spectrometer. The GC oven temperature was programmed at 100°C for 2min, then from 100°C to 150°C at 10°C/min, from 150°C to 200°C at 5°C/min, and finally at a rate of 2°C/min from 200°C to 350°C and 5 min at 350°C. Compounds released by depolymerisation were identified according to their fragmentation pattern supported by comparison with published mass spectra and with a mass spectra library (Wiley).

5.2.5. Quantification

Separation and quantification were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a SGE BPX-5 column (50 m x 0.25 mm x 0.32 µm) and a flame ionisation detector (FID). The GC oven temperature program was identical to the one used for identification. The monomers were quantified by using an internal standard, the nonadecanoic acid, added prior to derivatisation. An external calibration with the 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid was used to calculate the concentrations from the ratio of the peak area of each compound to that of the internal standard. The response factor between the nonadecanoic acid and the 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid was close to 1.

For quantification as well as for isotopic signature measurements, the 9,10-epoxy, 18-OH C₁₈ was quantified as the isomeric mixture of the 9-methoxy,10,18-dihydroxyoctadecanoic and

the 9-hydroxy,10-methoxy,18-hydroxyoctadecanoic acids and the 9,10,18-TriOH C₁₈ acid. Indeed, the epoxy function reacts upon basic hydrolysis to be converted into vicinal diols and vicinal methoxy-alcohol groups (Holloway and Deas, 1973). The 9,10,18-TriOH C₁₈ acid can also result from the partial conversion of the 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acid.

The inputs of the monomers from plants were calculated by weighting the monomer contents obtained for each part of the plants with the quantities of each part of the plants incorporated into the soil after harvest (values given in Bahri et al., 2006).

5.2.6. Isotopic measurements

Isotopic analyses were carried out with a GC HP5890 coupled with an Isochrom III Isotopic mass spectrometer (Micromass-GVI Optima). Samples were injected in the splitless mode. The same column and chromatographic conditions were used as for the identification and quantification. The $\delta^{13}\text{C}$ values were measured for the silylated monomers of the molecules of interest. These values were corrected for the $\delta^{13}\text{C}$ of carbon atoms introduced by silylation, measured off-line with Elemental Analyser (EA) coupled to isotopic ratio mass spectrometer (Micromass NA 1500 NC). The proportion F of maize derived monomer in soil was calculated for each monomer according to the simplified equation from ((Balesdent and Mariotti, 1996), which was shown to be valid at the molecular level for the Closeaux experiment in Dignac et al. (2005):

$$F = \frac{\delta t - \delta w}{\delta_{maize} - \delta_{wheat}}$$

where δt is the $\delta^{13}\text{C}$ of the monomer in soil cropped with maize for $t= 6$ or 12 years of maize cropping, δw is the $\delta^{13}\text{C}$ of the monomer in control soil under wheat, δ_{maize} is the $\delta^{13}\text{C}$ of the monomer in the maize plant and δ_{wheat} is the $\delta^{13}\text{C}$ of the monomer in the wheat plant.

5.3. Results and discussion

5.3.1. Comparison between monomer inputs from plants with soil monomer distribution

Table 1 shows the total inputs of each monomer from wheat and maize plants and the contribution of the different parts of the plant to this input. The inputs of the monomers were similar for wheat ($3.9 \mu\text{g g}^{-1}$ soil) and maize ($3.7 \mu\text{g g}^{-1}$ soil). The contribution of the biopolyesters deriving from leaves and stems was high, representing respectively 87% of the total inputs for wheat and 81% for maize.

5.3.1.1 Specific root/shoot origin of the monomers present in soils

Six classes of compounds were released from the depolymerisation of leaves, stems and roots of wheat and maize plants : carboxylic acids, one α -hydroxy carboxylic acid (αC_{24}), ω -hydroxy carboxylic acids, mid-chain hydroxy carboxylic acids, diacids and alcohols. These compounds released from plant samples were previously identified in cutins of wheat and maize leaves (Espelie et Kolattukudy, 1979; Matzke and Riederer, 1990) and in suberized tissues of maize roots (Zeier et al., 1999). The same six classes of compounds as in the plant samples (Table 1), were identified in the soil samples. They were also commonly released from base hydrolysis of soils (Otto et al., 2005).

In the following, the relative inputs of these monomers from plants (Table 1) will be discussed along with their potential use as markers of above ground (or below ground) biopolyesters.

- carboxylic acids

The carboxylic acids are not specific for shoot or root polymers in plants as the same compounds (C_{16} , C_{18} , $\text{C}_{18:\text{x}}$, C_{20} and C_{24}) are detected in both above ground and below ground parts of the two plants (Table 1). Moreover, C_{16} , C_{18} and $\text{C}_{18:\text{x}}$ carboxylic acids were shown to also originate from microbes (Otto et al., 2005) or waxes (Kolattukudy and Walton, 1973). The same carboxylic acids are identified in soils after depolymerisation (Fig.1). They represent $\approx 40\%$ of the total monomers in soils (Table2), i. e. much more than in plants (16 and 30 % in wheat and maize, respectively), pointing to an additional source. As a result, carboxylic acids cannot be used for estimating the dynamics of cutin/suberin biomarkers in soils.

Table 1 : Annual input of monomers in soils from wheat and maize plants (in ng g⁻¹ dry soil) (1) and contribution of the different plant organs to this input (proportion of the total monomer incorporated into soil, %) (2). nd for not detected.

	Total wheat input⁽¹⁾	Wheat leaves (%)⁽²⁾	wheat stems (%)	Wheat roots (%)	Total maize input	maize leaves (%)	maize stems (%)	maize roots (%)
Carboxylic acids								
<i>C</i> ₁₆	293	58	30	12	471	61	27	12
<i>C</i> ₁₈	114	53	35	12	181	33	48	19
<i>C</i> _{18:X}	174	69	22	9	360	56	32	12
<i>C</i> ₂₀	7	0	0	100	35	55	19	27
<i>C</i> ₂₄	16	0	62	38	66	58	22	20
Alcohols								
<i>AIC</i> ₁₈	nd	nd	nd	nd	11	nd	nd	100
<i>AIC</i> ₂₀	nd	nd	nd	nd	5	nd	nd	100
ω-hydroxy carboxylic acids								
<i>ωC</i> ₁₆	73	51	0	49	189	32	27	41
<i>ωC</i> ₁₈	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>ωC</i> _{18:1}	503	51	30	19	687	75	8	17
<i>ωC</i> ₂₀	16	nd	nd	100	15	nd	nd	100
<i>ωC</i> ₂₂	211	36	19	45	80	18	38	43
<i>ωC</i> ₂₄	166	26	43	31	180	40	22	38
<i>ωC</i> ₂₆	nd	nd	nd	nd	135	57	20	23
α-Hydroxy carboxylic acids								
<i>αC</i> ₂₄	71	72	18	10	176	58	28	14
Diacids								
<i>DC</i> ₁₆	13	nd	nd	100	21	nd	nd	100
<i>DC</i> ₁₈	nd	nd	nd	nd	11	nd	nd	100
<i>DC</i> _{18:1}	78	nd	nd	100	97	nd	nd	100
<i>DC</i> ₂₂	3	nd	nd	100	nd	nd	nd	nd
Mid chain hydroxy compounds								
<i>x,16 dihydroxy carboxylic acids</i> (<i>x</i> =8, 9 and 10) (<i>x,16-DiOH C</i> ₁₆)	289	72	26	3	204	95	5	nd
<i>9-hydroxy hexadecanoic diacid</i> (<i>9-OH DC</i> ₁₆)	129	16	84	nd	51	68	32	nd
<i>9, 10 dihydroxy octadecanoic acid</i> (<i>9,10-DiOH C</i> ₁₈)	35	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>11, 18 dihydroxy octadecenoic acid</i> (<i>11,18-DiOH C</i> _{18:1})	398	68	30	2	324	94	5	nd
<i>x, 18 dihydroxy octadecenoic acids</i> (<i>x</i> =9 and 10) (<i>x,18-DiOH C</i> _{18:1})	123	84	16	nd	156	100	nd	nd
<i>9,10,18 trihydroxy octadecanoic acid</i> (<i>9,10,18-TriOH C</i> ₁₈) and <i>9,10 epoxy, 18 hydroxy octadecanoic acid</i> <i>9,10-epoxy,18-OH C</i> ₁₈	1175	71	27	2	201	92	8	nd
Total	3886	59	28	13	3657	63	18	19

Table2: * Concentration mean ($\mu\text{g/g}$ of dry soil) of the monomers released by depolymerisation of soil under wheat, and the soils after 6 and 12 years of maize cropping. ¹proportion (in %) of the monomer relative to the total monomers released in soil. ²Sd : Standard deviation of the mean calculated from triplicates analyses. nd for not detected

	Soil under wheat* (%) ¹	sd ² (%)	Soil after 6 years of maize cropping	sd	Soil after 12 years of maize cropping	sd
Carboxylic acids						
<i>C</i> ₁₆	14,4 (23.3)	0,2	10,8 (17.3)	0,7	13,7 (19.0)	0,7
<i>C</i> ₁₈	8,2 (13.3)	1,2	5,2 (8.4)	0,0	6,2 (8.6)	0,0
<i>C</i> _{18:X}	2,4 (3.8)	0,0	3,8 (6.1)	1,6	6,4 (8.9)	1,6
<i>C</i> ₂₀	1,0 (1.7)	0,3	1,0 (1.7)	0,3	1,2 (1.6)	0,3
<i>C</i> ₂₂	1,6 (2.7)	0,1	1,8 (2.9)	0,2	1,9 (2.7)	0,2
<i>C</i> ₂₄	1,0 (1.7)	0,2	1,2 (1.9)	0,4	1,3 (1.9)	0,4
<i>C</i> ₂₆	0,3 (0.4)	0,0	0,6 (0.9)	0,2	0,8 (1.1)	0,2
sum of carboxylic acids	29,0 (47)	0,8	24,4 (39.2)	3,0	29,4 (40.8)	3,0
Alcohols						
<i>AlC</i> ₁₈	1,9 (3.0)	0,3	1,7 (2.8)	0,8	1,5 (2.1)	0,8
<i>AlC</i> ₂₂	0,4 (0.7)	0,1	0,4 (0.7)	0,0	0,5 (0.7)	0,0
sum of alcohols	2,3 (3.7)	0,3	2,1 (3.5)	0,8	2,0 (2.8)	0,8
ω-hydroxy carboxylic acids						
ω <i>C</i> ₁₆	1,9 (3.1)	0,4	2,7 (4.3)	0,6	2,9 (4.0)	0,6
ω <i>C</i> _{18:1}	1,0 (1.7)	0,2	2,1 (3.4)	0,5	2,4 (3.3)	0,5
ω <i>C</i> ₂₀	1,3 (2.1)	0,3	1,3 (2.1)	0,3	1,4 (1.9)	0,3
ω <i>C</i> ₂₂	4,6 (7.4)	0,3	7,2 (11.6)	0,4	7,8 (10.8)	0,4
ω <i>C</i> ₂₄	3,5 (5.6)	0,9	4,5 (7.3)	1,7	6,7 (9.3)	1,7
ω <i>C</i> ₂₆	0,3 (0.4)	0,0	0,3 (0.5)	0,0	0,4 (0.5)	0,0
sum of ω-hydroxy carboxylic acids	12,5 (20.3)	2,0	16,6 (26.7)	2,9	21,5 (29.9)	2,9
α-hydroxy carboxylic acids						
α <i>C</i> ₂₄	1,6 (2.5)	0,2	0,7 (1.1)	0,1	1,7 (2.3)	0,1
α <i>C</i> ₂₆	0,3 (0.4)	0,0	0,2 (0.3)	0,0	0,2 (0.3)	0,0
sum of α-hydroxy carboxylic acids	1,8 (2.9)	0,2	0,9 (1.4)	0,1	1,9 (2.6)	0,1
Diacids						
<i>DC</i> ₁₆	0,6 (1.0)	0,2	0,9 (1.5)	0,3	1,2 (1.6)	0,3
<i>DC</i> ₂₂	0,8 (1.2)	0,0	1,1 (1.8)	0,8	1,0 (1.4)	0,8
<i>DC</i> ₂₄	0,6 (1.0)	0,2	0,2 (0.3)	0,0	0,2 (0.3)	0,0
Sum of diacids	2,0 (3.2)	0,4	2,2 (3.6)	1,1	2,4 (3.3)	1,1
Mid-chain hydroxy acids						
<i>x,16-DiOH C</i> ₁₆ (<i>x</i> =8, 9 and 10)	6,6 (10.6)	0,9	8,7 (14.0)	1,1	8,1 (11.2)	1,1
9- <i>OH DC</i> ₁₆	4,0 (6.5)	0,3	3,5 (5.7)	1,1	3,2 (4.4)	1,1
11,18- <i>DiOH C</i> _{18:1}	1,1 (1.8)	0,3	1,1 (1.7)	0,3	1,3 (1.8)	0,3
<i>x,18 Di-OH C</i> _{18:1} (<i>x</i> =9 and 10)			0,5 (0.8)	0,1	0,6 (0.8)	0,1
8,9,18- <i>TriOH C</i> ₁₈ and 9,10- <i>epoxy,18-OH C</i> ₁₈	2,4 (3.9)	0,4	2,2 (3.5)	0,6	1,7 (2.4)	0,6
sum of Mid-chain hydroxy acids	14,1 (22.9)	1,8	16,0 (25.7)	2,9	14,8 (20.6)	2,9
TOTAL	61,7	3,6	62,2	8,3	72,0	8,3

- α -hydroxy carboxylic acid (α C₂₄)

The C₂₄ α -hydroxy carboxylic acid is identified in all the investigated plant materials in the present study (Table 1). It was already identified in both suberin from maize roots (Zeier et al., 1999; Zimmermann et al., 2000), and in cutin from wheat leaves (Matzke and Riederer, 1990). Moreover, apart from not being specific for roots or shoots, this monomer might not be specific for biopolyesters either (Molina et al., 2006). As carboxylic acids, this monomer will therefore not be taken into account to study the dynamics of cutin/suberin in soils.

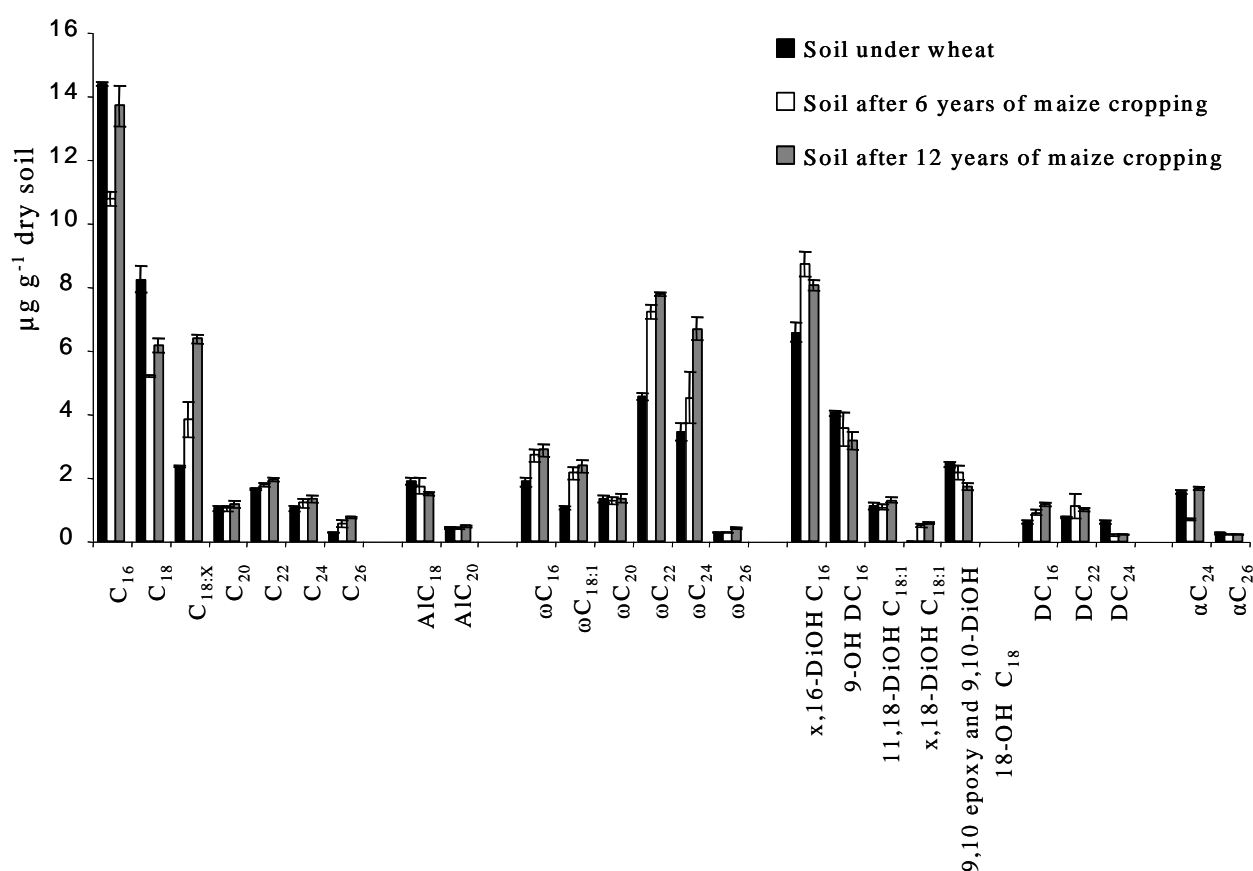


Figure 1: Monomer concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil) in soils under wheat and soils having received 6 or 12 years of maize cropping after wheat. Standard deviation for $n = 3$ repetitions

- ω -hydroxy carboxylic acids

In many studies, this class of compounds, and particularly the monomers with more than 20 carbon atoms, is univocally considered as root suberin moieties (Nierop, 1998; Otto et al., 2005). Indeed, such monomers were shown to be major constituents of root suberin

(Kolattukudy, 1981, 1984; Zeier and Schreiber, 1997, 1998; Bernards et al., 2002). However, in the present study, 61% of the ω -OH carboxylic acids longer than C₂₀ originated from wheat leaves and stems and 66 % from maize ones (Table 1). The presence of these monomers in above ground tissues and particularly in leaves therefore suggests the occurrence of suberized tissues in the above ground biomass, although they are often considered as specific for root suberin. In the present agricultural soils, ω -OH carboxylic acids ranged from C₁₆ to C₂₆ with a maximum at C₂₂ and C₂₄. The latter two monomers represented more than 65% of the ω -OH carboxylic acids in soils, whereas they only accounted for 39 and 20 % of this class of monomers in wheat and maize, respectively (Table 1). The increase from plants to soils of the relative contribution of ω -OH carboxylic acids with more than 20 carbon atoms and especially of the C₂₂ and ω C₂₄ monomers, suggests a higher contribution of suberin from roots, although major inputs for this class arise from above ground polymers. Moreover, the concentration of long chain ω -OH carboxylic acids (especially C₂₂ and C₂₄, which are the major root suberin monomers) increases in soils from the wheat cropped soil to the maize ones. This is likely related to root density of maize and wheat plant in the studied surface horizon as maize root density is higher than that of wheat (Aggarwal et al., 2006; Ju et al., 2007) As a result, we will consider the ω -OH carboxylic acids in the study of the dynamics of suberin.

- mid-chain hydroxy carboxylic acids

When the monomer classes are considered, mid-chain hydroxy carboxylic acids are the main contributors (55 %) of wheat monomers (Table 1). Mid-chain hydroxy acids were not present in the below ground biomass in maize, and they contribute to the wheat roots in trace amounts (Table 1). Six mid-chain hydroxylated acids were identified in all the wheat and maize above ground tissues (Table 1). Within this class of compounds, the contributions of the 9,10,18-TriOH C₁₈ and 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ monomers in wheat leaves and stems were particularly high (30% of the total monomer input from wheat, Table 1). The lower contribution of these two aforementioned monomers in maize when compared to wheat, is responsible for the lower contribution of the mid-chain hydroxy acid class in maize (26% of the total maize monomer input). This was the main difference between wheat and maize, which monomer distributions were otherwise quite similar. In maize input, the major mid-chain hydroxy acid was the 11,18-DiOH C_{18:1} acid (35% of this class) followed by the x,16-DiOH C₁₆ acids (22%) and the 9,10,18-TriOH C₁₈ and 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acids (21%). They can thus be considered as specific for above ground biomass. The mid-chain hydroxy acids have never

been reported to come from other plant or microorganism sources (Kögel-Knabner et al., 1989; Tegelaar et al., 1991; Kunst and Samuels, 2003; Nierop et al., 2006; Otto et al., 2005). In soils, taken together, the mid-chain hydroxy acids account for 20-25% of the total monomers. This class is dominated by the $\alpha,16$ -DiOH C₁₆ acids (50% of the mid-chain hydroxylated acids, Table 2), followed by the 9-OH DC₁₆ acid (24 %) and the 9,10,18-TriOH C₁₈ and 9,10-epoxy,18-OH C₁₈ acids (14 %).

- diacids

Three diacids were released exclusively from maize and wheat roots (DC₁₆, DC_{18:1} and DC₂₂ for wheat and DC₁₆, DC₁₈ and DC_{18:1} for maize) and they account for 2.4 and 3.5 % of the monomers in wheat and maize, respectively (Table 1). The diacids were only released from roots and could thus be specific for belowground biomass (Nierop and Buurman, 1999, Otto et al., 2005; Otto and Simpsom, 2006). For both wheat and maize roots, the DC_{18:1} was the major diacid representing 82 % and 75 % of the total diacid family. In soils, three monomers were identified, DC₁₆, DC₂₂ and DC₂₄ with a predominance of the first two monomers. The DC₂₄, was not identified in wheat or maize roots in the present study, but it may be under the detection threshold, as this monomer was often reported in maize root suberized tissues (Zeier et al., 1999; Zimmermann et al., 2000).

- alcohols

Two alcohols were identified in maize roots only. This would point to a specificity for below ground biomass but, in soils, they can also originate from other sources than plant biopolymers, such as microbial bound lipids and waxes (Otto et al., 2005). Thus, these two alcohols cannot be considered as specific for root suberin in soils. The same two alcohols were identified in soils (Table 1) and their abundance was similar in the soil under wheat and in the soils after 6 and 12 years of maize cropping, although these monomers were not identified in any of the wheat tissues analyzed, where they might be under the detection limit. Such a constant occurrence in soils would more likely support a microbial origin.

Therefore, from all monomer classes released from plant samples and incorporated into the soil, only three are specific markers for plant biopolymers in soil. Mid-chain hydroxy monomers are specific from cutin above ground biomass whereas ω -OH carboxylic acids with

a chain length longer than C₂₀ and diacids were considered as root suberin derived monomers.

5.3.1.2. Relative distributions of monomers and classes of monomers from plants to soils: selective preservation and/or degradation in soils.

Relative inputs from the different plant monomers are now discussed in relation with their relative abundance in soils. The concentrations of the monomers in soils after 0, 6 and 12 years of maize cropping after wheat are presented in the (Fig.1). Total monomer concentration released from soils increased slightly along with years of maize cropping from 61.7 µg g⁻¹ of soil under wheat to 62.2 µg g⁻¹ and 72.0 µg g⁻¹ of soil after 6 and 12 years of maize cropping, respectively.

Monomers with the higher inputs from plant biomass were not systematically the major compounds in soil. Indeed, for example, the ωC_{18:1}, which accounts for 13 % and 19 % of plant inputs (Table 1) only represent from 1.7 % to 3.4 % of the soil monomers (Table 2). Similarly, the 9, 10, 18 –trihydroxy octadecanoic acid and the 9, 10 epoxy, 18 hydroxy octadecanoic acid, which together were by far the major compounds in wheat, represent less than 3.9 % in soils. The differences observed in the relative proportions of monomers in plant inputs and in soils and the fact that some monomers were identified only in soils can be explained by several mechanisms:

1) Preferential degradation of unsaturated compounds: unsaturated monomers such as the C_{18:1}, ωC_{18:1}, DC_{18:1}, x,18-DiOH C_{18:1}, and 11,18-DiOH C_{18:1} acids represent up to 33 % in wheat and 44 % in maize of total monomer plant inputs. In soils, unsaturated monomers represented only less than 15% of total monomers, likely reflecting the preferential degradation of unsaturated monomers with respect to saturated counterparts. This general tendency holds for the unsaturated compounds of all monomer families and was also verified for the epoxy monomer, the epoxy function being as sensitive as unsaturations, easily degraded by microorganisms. Preferential degradation of unsaturated compounds was already suggested in other studies (Nierop et al., 2003).

2) limit of detection: some monomers like the DC₂₄ or the ωC₂₆ are observed in soils although not detected in plants. In soils, their abundance is however lower than that of their lower homologues suggesting they were below the limits of detection in plants. By contrast, in soils, due to the selective degradation of other monomers, their relative contributions to the total monomers increased, and allowed for their quantification.

3) protection within the polymer network: the position of some monomers in the polymeric network can also be responsible for their selective preservation against microbial

attacks. Monomers with several hydroxy functions, such as the $\alpha,16$ -DiOH C₁₆ and 9-OH DC₁₆ acids, might be involved in highly cross-linked regions, where they are protected from biodegradation, which would explain the relative increase of their contribution to soils (from 15.6% to 19.7%) compared to plants inputs (from 6.9% to 10.1% of total monomers). The $\alpha,16$ -DiOH C₁₆ acids and 9-OH DC₁₆ acid monomers, relatively less abundant than other monomers in plants are dominant in soils. Monomers present deeply inside the polymer network could also be protected against microbial attacks (Nierop, 1998).

4) selective preservation of root-derived versus shoot-derived monomers: specific monomers deriving from roots (diacids and ω -hydroxy carboxylic acids $\geq \omega$ C₂₀) represented from 18.7% to 25.9% of the total monomers in soils, while shoot-derived monomers represented from 20.6% to 25.7% contrasting with the high inputs of above ground biomass (more than 80 %). Roots are closely linked to soil matrix and their constitutive monomers might be more susceptible to physical protection against microbial degradation than shoot monomers (Rasse et al, 2005). Furthermore, partial degradation of the suberin can lead to solubilization of the monomers in soils allowing their protection into the soil matrix (Oades, 1995). At last, root tissues are more likely resistant to soil microbial degradation than shoot tissues, inferring a higher chemical recalcitrance against microbial attacks.

The comparison of the relative distributions of monomers in leaves, stems and roots of wheat and maize plants and in soils evidenced major trends in degradation and / or stabilization processes of the cutin and suberin polymers added to soils through plant input. Nevertheless, molecular isotopic signature of monomers in plants and soils are necessary to evaluate their dynamics by estimating the proportion of each monomer originating from maize in soil.

5.3.2. Maize-derived monomers in soils after 6 and 12 year of maize cropping.

In order to compare the dynamics of the above and below ground tissues of the plants in soils, we estimated the incorporation of the biomarkers specific for cutins in shoots and for suberins in roots. As discussed above, plant analysis suggested that mid-chain hydroxy carboxylic acids are specific for leaves and stems, whereas diacids are specific for roots. Furthermore, soil analysis suggested that ω -hydroxy carboxylic acids with more than 20 carbon atoms may be strongly related to the inputs of root suberized tissues.

5.3.2.1. Isotopic signature of monomers released from plants and soils

The ^{13}C contents of the biomarkers were measured in the leaves, stems and roots of the wheat and maize plants. The isotopic signatures presented in table 3 for each monomer of the plant inputs are the average isotopic signatures, obtained by weighting the isotopic content of each tissue (leaves, stems, roots) by its contribution to total plant input. In order to distinguish the specific input from roots, we also showed in the Table 3 the isotopic signatures of ω -hydroxy carboxylic acids with more than 20 carbon atoms, which are characteristic for root suberized tissues in soils.

In wheat, the C_{16} , C_{18} , and $\text{C}_{18:x}$ carboxylic acids monomers were enriched in ^{13}C , with a $\delta^{13}\text{C}$ ranging from -25.5 ‰ to -29.0 ‰, while the isotopic signatures of the other monomers ranged from -30.7 ‰ to -37.0 ‰. In the maize, the ^{13}C isotopic signatures of the monomers ranged from -14.6 ‰ to -29.3 ‰, although most of the values ranged from -16 ‰ to -21.5‰.

The biosynthetic pathway of the monomers constitutive of cutins and suberins involves the same precursors (Kolattukudy, 1981, 1984) and an homogeneous ^{13}C content would be expected for these monomers. The wide range of ^{13}C contents observed could be explained by the fact that the monomers constitutive of cutins and suberins are synthesized according to the plant requirements all along the growing season (Kolattukudy and Dean, 1974; Lenzian and Schonherr, 1983; Riederer and Schonherr, 1988). The structure and composition of these biopolyesters are known to largely vary according to the conditions of growth (Zimmermann et al., 2000). Furthermore, the ^{13}C isotopic contents of the different molecules synthesized by the same plant have been shown to highly vary with the climatic conditions (Ménot and Burns, 2001; Skrzypek et al., 2007), or with the hydric and salt stresses applied to plants in laboratory conditions (Brugnoli and Lauteri, 1991; Monti et al., 2006).

For maize and wheat, the ^{13}C isotopic signatures of the ω -hydroxy carboxylic acids of root suberin (in bracket in the table 2) were lower than their isotopic signatures in the whole plant input. Photorespiration and isotopic fractionation at metabolic branch points, coupled to different allocation patterns during metabolism for C_3 and C_4 plants, probably influence compound-specific isotopic differences and may then create isotopic differences among plant pools and along transport pathways (Badeck et al., 2005; Hobbie and Werner, 2004).

Table3: * Isotopic signature average (‰ /VPDB) of the monomers released by depolymerisation of leaves, stems and roots of maize and wheat. Standard deviation was calculated for a minimum of 3 repetitions

(1) For ω -hydroxy carboxylic acids with a chain length longer than 20 carbon atoms, the isotopic signature of the monomer in roots is given in brackets.

	Wheat*	Soil under wheat	Soil 6 YMC	Soil 12 YMC	Maize*
Carboxylic acids					
<i>C</i> ₁₆	-29.0±0.5	-25.7±0.1	-23.9±0.7	-22.9±0.5	-21.0±0.5
<i>C</i> ₁₈	-25.5±0.5	-25.5±0.8	-24.2±0.5	-23.2±0.5	-23.8±0.6
<i>C</i> _{18:X}	-28.3±0.6	-23.9±1.8	-21.7±1.2	-18.6±0.5	-16.7±0.6
<i>C</i> ₂₀	-35.9±1.0	-29.3±2.0	-30.3±0.8	nd	-21.3±0.7
<i>C</i> ₂₂	nd	-31.4±0.6	-29.4±0.7	nd	nd
<i>C</i> ₂₄	-34.5±0.8	-28.8±0.5	-28.9±0.8	nd	-22.3±0.6
Alcohols					
<i>AIC</i> ₁₈	nd	-25.3±0.5	-24.7±0.5	nd	-29.3±0.5
<i>AIC</i> ₂₀	nd	nd	nd	nd	nd
ω-hydroxy carboxylic acids					
ω <i>C</i> ₁₆	-34.2±0.6	-31.2±2.0	-28.4±0.5	-27.0 ±0.5	-17.1±0.7
ω <i>C</i> ₁₈	nd	nd	nd	nd	-14.6±0.5
ω <i>C</i> _{18:1}	-30.9±0.7	-29.3±0.6	-24.8±0.5	-26.5±0.5	-17.1±0.5
ω <i>C</i> ₂₀	-37.0±0.6	-35.9±2.0	-29.0±0.5	-30.3±3.6	nd
ω <i>C</i> ₂₂	-36.7±0.5 (-36.9±0.5) ⁽¹⁾	-36.9±0.5	-32.7±0.5	-33.8±0.6	-19.0±0.8 (-18.0±1.1)
ω <i>C</i> ₂₄	-32.9±0.7 (-34.0±0.5)	-34.0±0.7	-28.7±0.5	-29.6±0.6	-21.1±0.7 (-22.6±1.0)
ω <i>C</i> ₂₆	nd	-30.9±0.5	-26.6±0.5	-26.9±2.0	-19.2±0.8 (-21.0±0.7)
α-Hydroxy carboxylic acids					
α <i>C</i> ₂₄	-34.0±0.5	-32.3±0.7	-28.6±1.4	-29.5±0.5	-21.5±0.5
α <i>C</i> ₂₆	nd	nd	nd	nd	nd
Diacids					
<i>DC</i> ₁₆	-36.1±0.9	-32.1±0.5	nd	-28.0±0.5	-15.1±0.5
<i>DC</i> ₁₈	nd	nd	nd	nd	-20.2±0.5
<i>DC</i> _{18:1}	-34.9±0.5	nd	-29.0±0.5	nd	-16.3±0.7
<i>DC</i> ₂₂	-37.0±0.5	-36.9±0.5	-32.4±0.5	-33.2±0.5	nd
<i>DC</i> ₂₄	nd	-39.1±0.5	-30.4±0.5	nd	nd
Mid-chain hydroxy acids					
<i>x,16-DiOH C</i> ₁₆ (<i>x</i> =8, 9 and 10)	-34.3±0.5	-33.2±0.6	-34.4±0.6	-32.9±0.6	-16.4±0.5
<i>9-OH DC</i> ₁₆	-33.3±1.5	-32.6±0.9	-30.1±0.8	-33.2±0.5	-16.1±0.5
<i>9,10-DiOH C</i> ₁₈	-30.7±0.5	nd	nd	nd	nd
<i>11,18-DiOH C</i> _{18:1}	-34.6±0.7	-30.6±1.5	-28.9±1.0	-30.3±0.5	17.1±0.8
<i>x,18-Di-OH C</i> _{18:1} (<i>x</i> =9 and 10)	-35.7±0.7	nd	nd	nd	-17.6±0.5
<i>9,10,18-TriOH C</i> ₁₈ and <i>9,10-epoxy, 18-OH C</i> ₁₈	-34.6±0.7	-31.0±1.0	-31.7±1.6	-29.5±1.4	-18.5±0.5

When comparing the isotopic signature of wheat monomers and that of compounds released from the soil under wheat, it appears that most of the monomers in the wheat soil were slightly enriched in ^{13}C compared to the wheat monomers. A relative enrichment of organic molecules in soils compared to plants has already been observed for lignins (Bahri et al., 2006), and free carboxylic acids (Wiesenberg et al., 2004a) and might be explained by a preferential degradation of the light molecules.

The monomers present in the soils after 6 and 12 years of maize cropping were generally enriched in ^{13}C compared to the soil under wheat, except for the mid-chain hydroxy acids where the $\delta^{13}\text{C}$ did not change during the 12 years of cultivation. The ^{13}C enrichment of most of the monomers evidenced an incorporation of maize derived monomers into soils. Carboxylic acids in soils were the most enriched (3.5‰) monomers, probably because of their ubiquitous origin (plants and microorganisms).

5.3.3.2. Incorporation of monomers specific for roots and shoots polymers

The proportion of maize-derived monomers in soils after 6 and 12 years of maize cropping (fig.2) were only calculated for the monomers proposed as specific for shoots (mid-chain hydroxy acids) or roots (diacids and long chain ω -hydroxy carboxylic acids).

Only low proportions of cutin monomers (mid-chain hydroxy acids) deriving from maize above ground biomass were incorporated into the soils after 6 or 12 years of maize cropping, suggesting that cutin polymers originating from maize are promptly degraded. Furthermore concentration in soil of cutin monomers did not significantly vary over years of maize cropping (Fig 1.). Kögel-Knabner et al (1992a) and Redierer et al (1993) reported from incubations of leaves, that cutins are not selectively preserved in soils and that decomposition rates of cutins are the same as those of the bulk organic matter of the litter. These two results coupled together imply that cutin present in maize cropped soils originated from old C_3 vegetation and can be related to a stable pool of carbon. The duration of the experimental field is too short to determine the kinetics of incorporation of maize derived cutin, since a too low amount of cutin is incorporated into the soil each year.

Figure 2: Incorporation rate of suberin monomers after

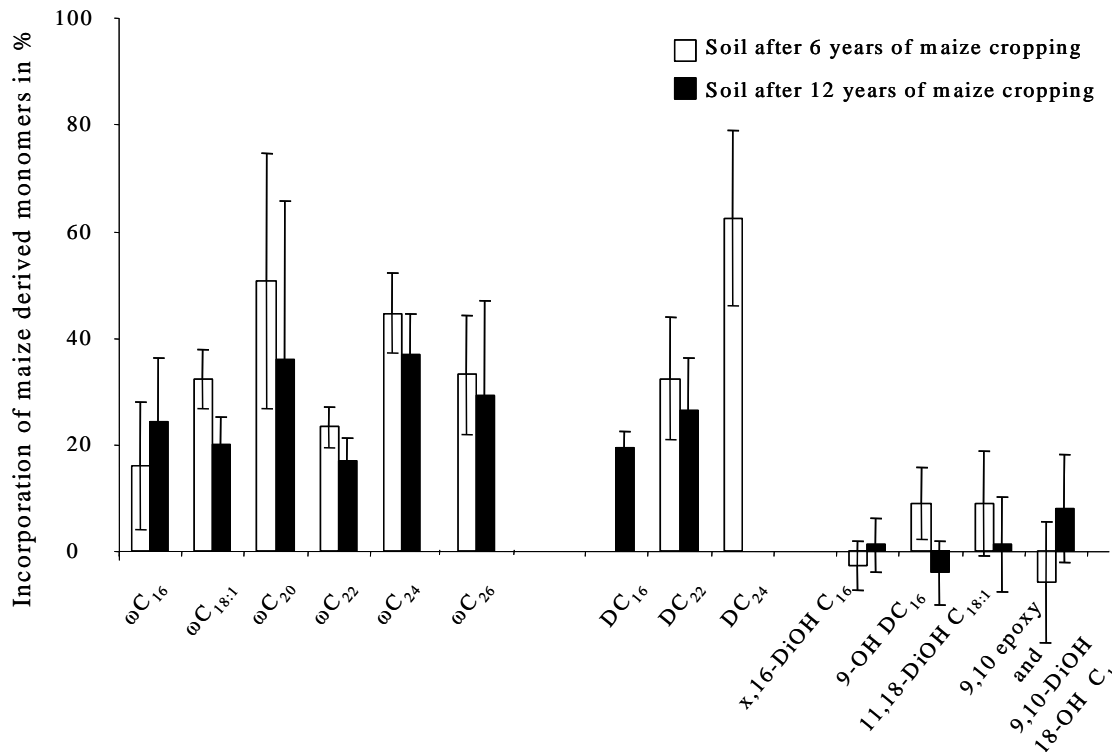


Figure 2: Incorporation of maize derived monomers in soil after 6 and 12 years of maize cropping

By contrast, between 20 % and 62 % of the suberin monomers were derived from maize after 6 years of maize cropping. Furthermore, suberized tissues located in different parts of the roots have different monomeric compositions, depending on the specific requirements of the tissues (Zeier et al., 1999). These tissues in dead roots might be more or less easily degraded, depending on their position in the outer or inner layers of the roots for example. These reasons could explain the variations in incorporation rates between maize derived suberin monomers in soils after 6 years of maize cropping.

Between 6 and 12 years of maize cropping, the proportion of suberin monomers originating from maize were similar (Fig 2). The stabilisation in incorporation of suberin monomers after 6 years of maize cropping can be related with the stabilization of the monomer concentration. Nevertheless, incorporation and concentration increase of monomers in soils are not systematically correlated. For example, the ωC_{20} monomer is released in same concentration from the three soils and its incorporation is of about 45% after 6 and 12 years of maize cropping, whereas the ωC_{22} concentration increased from $4.6 \mu\text{g g}^{-1}$ to $7.8 \mu\text{g g}^{-1}$ soil and its incorporation only reaches 22%. Furthermore, the ωC_{24} monomer, which concentration trend is similar to that of the ωC_{22} , from 3.5 to $6.7 \mu\text{g g}^{-1}$ soil, is incorporated at 42% in maize soils, close to that of the ωC_{20} monomer.

These results inferred several trends in degradation and stabilization processes of roots. If maize root density is higher than that of wheat (Aggarwal et al., 2006; Ju et al. 2007), can be responsible for a part of the incorporation of maize derived monomers in soils, discrepancy in incorporation rates suggests that some monomers are selectively preserved from degradation. This protection can be caused by the location of suberin in roots and also by the position of the monomer into the polymer. Furthermore, soil matrix protection may play an important role in root monomer degradation. The level off in incorporation of suberin monomers after 6 years of maize cropping also indicates the presence in soil of a stabilized pool for these monomers.

5.4. Conclusion

This study allowed for a complete identification and quantification of cutins and suberins monomers in plants and their contribution to soil bound lipids. From plants studies, diacids and mid-chain hydroxy acids are specific for below and above ground tissues. Monomer inputs from above ground polymers represented more than 80% of total monomers returned into the soils for the two plants studied. Despite of the high shoot polymer inputs, in soil, concentration in cutins specific monomers is equivalent to roots suberized tissues monomers and indicate a selective degradation and stabilisation of polymers in soils. At molecular level single monomer are not degraded in the same way implying that a macromolecule such as cutin or suberin is not heterogeneously degraded by microorganisms. Macromolecular structure and molecular composition of polymers directly impact microbial access to decomposition sites. The contrasting behaviours of root suberized tissues and cutin from shoots in soils might be explained by different physical and chemical processes leading to selective degradation and stabilization of these tissues. Roots are closely linked to soil matrix which confers a physical protection against microbial degradation. Furthermore, one of the major roles of roots suberized tissues in the plant is to resist against soil microbial attacks.

Incorporation rates results also display varied behaviour among monomers. Cutin monomers deriving from maize plant are poorly incorporated into SOM inferring that cutin bring to the soil is promptly degraded and that monomers released from soils samples arise from old C₃ vegetation. Soil suberin monomers incorporation rates underlined the higher contribution of maize roots biomass when compared to wheat root. Stabilisation in incorporation after 6 years of maize cropping suggest at least two kinetic pools of degradation and stabilisation.

In soil, many factors act for the stabilisation and the degradation of cutin and suberin polymers. For both, macromolecular structure, monomeric composition play an important role. In roots, the localisation of the suberized tissues also influence degradation trends. Nevertheless, the higher maize roots density when compared to wheat roots and the soil matrix protection are the main process leading to high incorporation of suberin monomers in soil.

CHAPITRE 6

DYNAMIQUE DES CUTINES ET DES SUBÉRINES EN PROFONDEUR LORS D'UN CHANGEMENT DE CULTURE BLÉ / MAÏS.

Dynamique des cutines et des subérines en profondeur lors d'un changement de culture blé / maïs.

6.1. Introduction

L'estimation de la dynamique des monomères spécifiques des parties aériennes et racinaires des plantes dans la couche de labour (0-25 cm) a montré que les monomères spécifiques des cutines contenus dans les parties aériennes de la plante de maïs ne sont pas ou peu incorporés aux à la MOS (Chapitre 5). Au contraire, les monomères provenant des racines et spécifiques des subérines sont incorporés à la MOS à hauteur de 20 % à 60 % selon le monomère après 12 ans de culture de maïs après blé. Les racines jouent donc un rôle important dans la dynamique des MOS, en accord avec Rasse et al. (2005) qui suggèrent que le carbone provenant des racines contribuerait 2,4 fois plus aux MOS que celui provenant de la biomasse aérienne. La dynamique des MO des sols agricoles a surtout été étudiée dans les couches superficielles, où l'accumulation ou la perte de carbone est très sensible à un changement de culture ou de gestion des sols (labour, non-labour, restitution de la biomasse végétale dans les sols) (Rasmussen et al., 1980; Campbell et al., 1991; Prasad et Power, 1991; Clapp et al., 2000; Reicosky et al., 2002).

Peu d'études ont été menées sur la dynamique des MOS en profondeur. Pourtant, c'est en profondeur que la matière organique est la plus stable (Paul et al., 1997; Rumpel et al., 2002). Les quantités de carbone présentes dans les horizons situés en dessous de 30 cm ne sont pas négligeables (Deen et Kataki, 2003; Sisti et al., 2004). De plus la contribution des composés aliphatiques à la MOS augmente en profondeur (Kögel-Knabner et al., 1992b; Nierop, 1998; Rumpel et al., 2004) et les cutines et les subérines pourraient contribuer à cette aliphaticité (Kögel-Knabner et al., 1989; Nierop et al., 2003). Dans les sols des Closeaux, Rasse et al. (2006) ont montré que le carbone provenant du maïs contribuait au carbone organique du sol jusqu'à 105 cm après 9 ans de culture de maïs. Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de cette accumulation en profondeur du carbone provenant du maïs, dont la contribution du carbone provenant des racines et de la rhizosphère. Dans ce chapitre nous nous proposons d'évaluer l'impact de la culture de maïs sur la concentration et les teneurs isotopiques en profondeur des sols des lipides liés en profondeur dans les sols. Dont les cutines et les subérines font parties.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'incorporation à la MOS des monomères provenant de la subérine des racines de maïs était rapide pendant les 6 premières années de culture de maïs, puis se stabilisait entre 6 et 12 ans. Nous avons choisi pour cette étude des échantillons de deux sols, un sol sous blé et un sol après 9 ans de culture de maïs. Les sols ont été échantillonnés tous les 15 cm sur une profondeur de 105 cm.

Sur ces échantillons de sols, nous avons quantifié les lipides liés totaux afin de déterminer leur contribution à la MOS et leurs dynamiques dans les sols. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux monomères spécifiques des cutines et des subérines, dont la signature isotopique a été déterminée afin d'estimer la contribution des monomères provenant du maïs à la MOS en profondeur.

6.2. Résultats et discussions

6.2.1. Concentrations des monomères aliphatiques en profondeur dans les sols sous blé et sous maïs.

La saponification des sols sous blé et sous maïs, nous a permis de libérer les six classes de composés déjà identifiés dans les chapitres précédents: les acides carboxyliques, les acides carboxyliques ω -hydroxylés, les acides carboxyliques α -hydroxylés, les alcools, les diacides, ainsi que les acides hydroxylés en milieu de chaîne spécifiques des cutines.

Le changement de culture de blé à maïs influence la distribution de toutes les familles de composés identifiés sur l'ensemble du profil. Nous avons comparé dans les sols sous blé et 9 ans de culture de maïs : (1) les concentrations dans les sols des lipides liés totaux qui proviennent essentiellement des plantes et des microorganismes (figures 1, 2 et 4), (2) les distributions des monomères spécifiques de la biomasse racinaire (figures 5 et 6) et des monomères spécifiques des cutines (figures 7 et 8).

6.2.1.1. Concentration des lipides liés totaux dans les sols sous blé et sous maïs

Les concentrations des lipides liés totaux dans le sol sous blé ont été comparées sur 105 cm de profondeur à celles du sol après 9 ans de maïs (figure 1). La concentration des lipides liés diminue avec la profondeur pour les deux sols, à l'exception de la profondeur 90-105 cm du sol sous blé où la concentration en lipides liés augmente légèrement mais de manière significative.

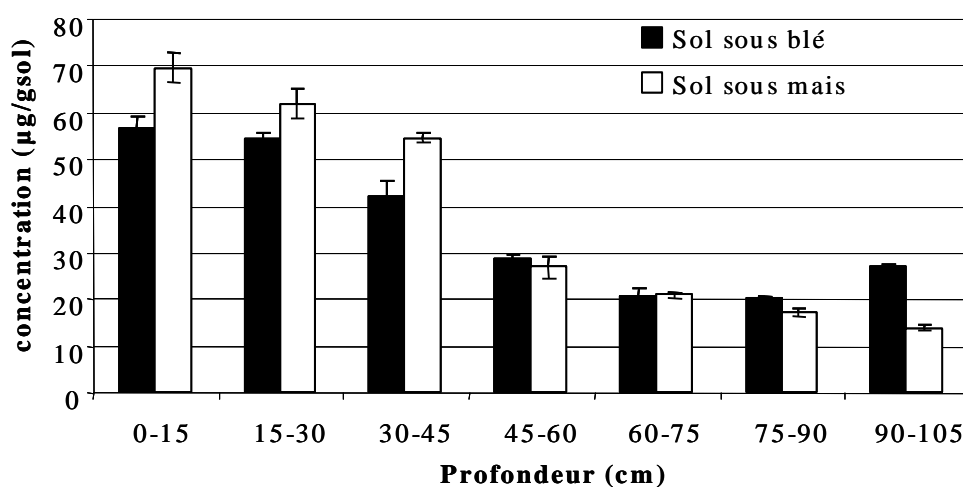


Figure 1 : Concentration des lipides liés totaux en fonction de la profondeur ($\mu\text{g/gsol}$) dans le sol sous blé et le après 9 ans de culture de maïs.

La concentration en lipides liés des 45 premiers centimètres est plus élevée pour le sol sous maïs que pour le sol sous blé mais on n'observe pas de différence significative en dessous de 45 cm, sauf pour la profondeur 90-105 cm où la concentration en lipides liés est plus grande pour le sol sous blé que le sol sous maïs. Les teneurs en C diminuant aussi avec la profondeur (Chapitre 2, § 2.2.2.4), nous avons rapporté les concentrations en lipides liés totaux à la teneur en carbone organique du sol pour chaque profondeur, afin de mieux comparer les contributions des lipides liés à la MOS (figure 2).

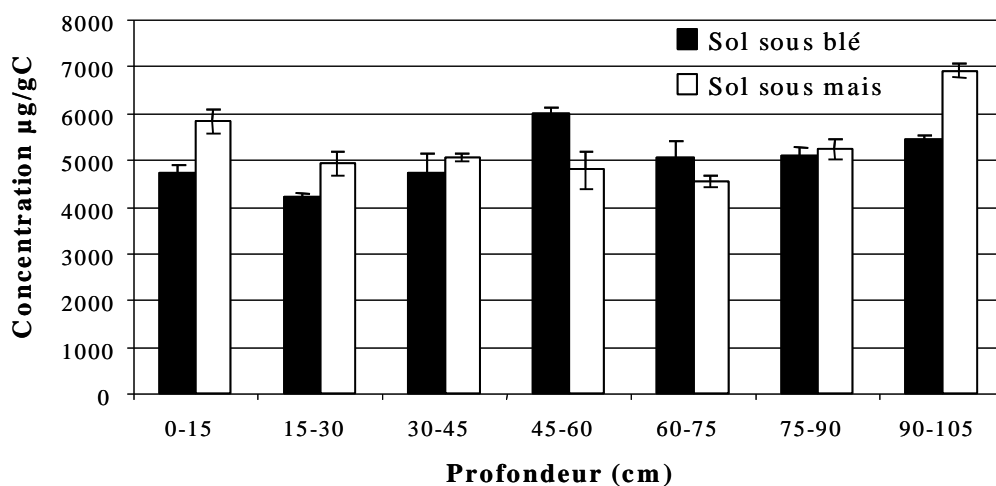


Figure 2 : Concentration des lipides liés relativement au carbone organique du sol ($\mu\text{g/gC}_{\text{sol}}$) en fonction de la profondeur

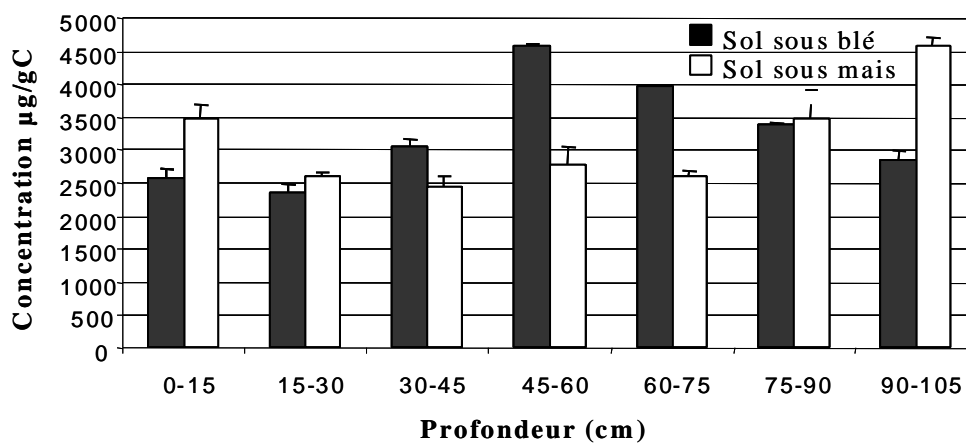
La concentration des lipides liés relativement au C organique dans les profils est aussi différente dans les deux sols. Au dessus de 30 cm et en dessous de 90 cm les concentrations en lipides liés totaux par rapport au C organique sont plus élevées dans le sols ayant reçu 9 ans de maïs que dans le sol sous blé (figure 2). A l'exception de la profondeur 45-60 cm où le sol sous blé a la plus forte teneur relative en lipides liés, on n'observe pas de différence significative entre les deux sols entre 30 et 90 cm. Ces différences peuvent être expliquées a priori soit par une hétérogénéité des sols au sein du site expérimental, soit par un effet de la culture de maïs sur la composition de la MOS.

Afin d'estimer l'impact de la variabilité spatiale entre les mêmes profondeurs des sols sous blé et sous maïs étudiés, nous avons effectué une analyse de variance à partir de données sur les quantités de carbone organique dans chaque profondeur des quatre parcelles sous blé et des trois parcelles après 9 ans de maïs du site expérimental. Le résultat de cette analyse de variance montre qu'il n'y a pas de variabilité spatiale de la MOS totale entre les parcelles ayant reçu le même traitement ($P < 0.001$). Si l'on considère en première approximation que

les lipides liés varient de la même manière que la MOS, alors on peut considérer que la variabilité analytique entre les deux parcelles étudiées est supérieure à la variabilité spatiale. Dans la suite de la présentation des résultats nous considèrerons que la variabilité analytique est supérieure à la variabilité spatiale. Si on élimine la source de variabilité due à l'hétérogénéité spatiale, on peut considérer que les différences entre sols blé et sol maïs sont dues au changement de végétation. Cependant, les hypothèses formulées ci-dessous seront à prendre avec précaution. L'analyse des lipides liés totaux sur les autres parcelles ayant reçu le même nombre d'années de maïs est indispensable pour affirmer sans équivoque que la variabilité spatiale n'est pas la cause des différences entre les concentrations en lipides liés obtenues pour chaque profondeur.

Les variations des concentrations relatives au C des lipides liés totaux dans les sols sont largement expliquées par celles des acides carboxyliques (figure 3) dont les concentrations représentent de 48 % à 78% de la concentration totale en lipides liés. 86 % à 96 % de cette classe de monomère provient des acides ubiquistes C₁₆, C₁₈ et C_{18:X} qui, dans les sols, peuvent provenir en grande partie des microorganismes.

Fig
ure
3 :
con
cent
rati
on
des
acid
es
carb
oxyl



iques relativement au C organique des MOS en profondeur (µg/gC)

Or dans les sols étudiés, on observe une activité des microorganismes liées à la rhizosphère sur tout le profil étudié (Rasse et al., 2006). Dans les 90 premiers centimètres du sol, les concentrations en lipides liés totaux relativement au C organique du sol sous maïs sont positivement corrélées avec l'apport de carbone provenant du maïs sur 0-90 cm de profondeur évalué par Rasse et al. (2006) (figure 4).

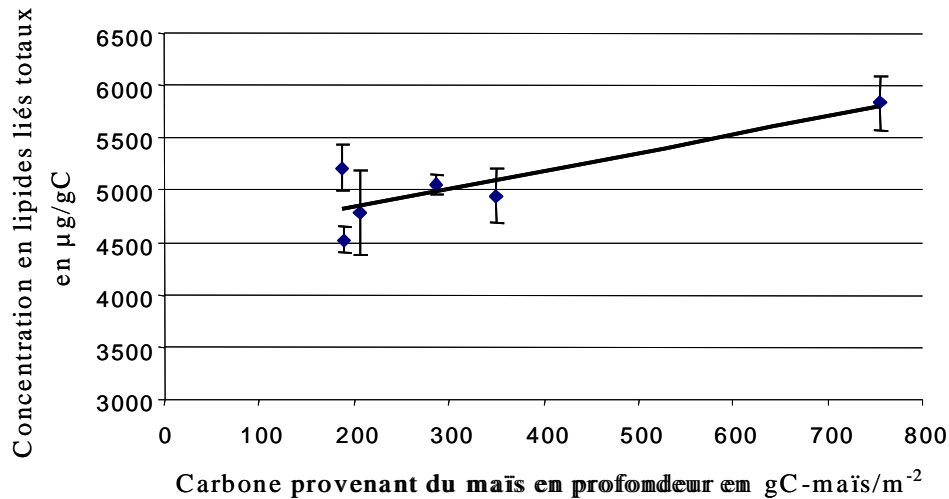


Figure 4 : Relation entre carbone provenant du maïs (gC-maïs/m^2) (données de Rasse et al., 2006) et la concentration en lipides liés totaux pour le sol sous maïs ($\mu\text{g/gC}$) en fonction de la profondeur de 0 à 90 cm ($R^2=0.72$). (Pas de valeur pour le C-maïs à la profondeur 90-105 cm, dans les données de Rasse et al., 2006)

Si l'on ne considère que les 75 premiers centimètres du sol, le coefficient de corrélation entre le carbone provenant du maïs et la concentration en lipides liés totaux est de 0,93 ce qui indique une forte contribution de la biomasse racinaire du maïs et de la rhizosphère à la MOS provenant du maïs sur la profondeur 0-75 cm. En dessous de 75 cm, la moins bonne corrélation entre ces deux facteurs indique qu'il existe une autre source de carbone provenant du maïs que le carbone directement produit par les racines et la rhizosphère, s'accumulant dans les profondeurs 75-105 cm. L'accumulation de carbone provenant du maïs surtout dans la profondeur 90-105 cm pourrait s'expliquer par une combinaison de mécanismes tel que le transport de carbone provenant du maïs par le carbone organique dissout, ainsi qu'une diminution de l'activité microbienne à cette profondeur favorisant l'accumulation de C du maïs.

Rasse et al. (2006) ont montré que le carbone provenant du maïs était incorporé à la MOS sur 0 à 105 cm et que cette incorporation était proportionnelle au nombre d'années de culture de maïs. La densité racinaire du blé est inférieure à celle du maïs à partir de la profondeur 15-30 cm (Aggarwal et al., 2006; Ju et al. 2007) et ce, sur tout le profil étudié. Si l'on considère qu'il n'y a pas de variabilité spatiale, les différences observées entre les concentrations en lipides liés totaux des sols sous blé et sous maïs sont essentiellement dues à la différence entre la biomasse racinaire du blé et du maïs et de la rhizosphère associée. Pour mieux comprendre les différences observées, nous avons comparé les concentrations par rapport au C organique des monomères spécifiques de la biomasse racinaire (les acides carboxyliques ω -hydroxylés)

ainsi que des monomères spécifiques des cutines (acides carboxyliques polyhydroxylés). Les diacides qui sont aussi spécifiques de la biomasse racinaire n'ont pas pu être pris en compte dans cette étude en raison de leur trop faible abondance en profondeur.

6.2.1.2. Contribution des monomères spécifiques des racines à la MOS en profondeur

Dans le sol sous blé, la concentration en acides carboxyliques ω -hydroxylés diminue de façon régulière entre 0 et 75 cm. De 75 cm à 105 cm la concentration de ces monomères augmente à nouveau. La distribution de ces monomères en profondeur est très différente dans le sol ayant reçu 9 ans de maïs (figure 5). La concentration en acides carboxyliques ω -hydroxylés dans le sol sous maïs ne varie pas significativement entre 0 et 45 cm, diminue entre 45 à 90 cm et reste stable entre 90-105 cm.

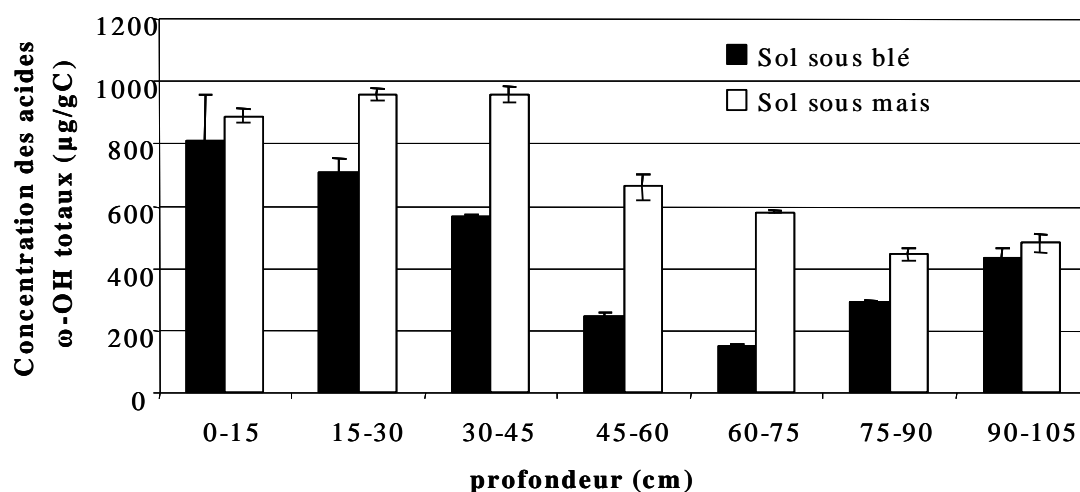


Figure 5 : Concentration des acides carboxyliques ω -hydroxylés ($\mu\text{g/gC}$) en profondeur dans les sols sous blé et après 9 ans de culture de maïs.

Quand on compare les concentrations des acides carboxyliques ω -hydroxylés dans les deux sols, le changement de culture de blé à maïs ne fait pas varier significativement les concentrations en acides carboxyliques ω -hydroxylés sur les 15 premiers centimètres. Par contre, en dessous de 15 cm, les différences de concentrations de ces monomères sont grandes entre les deux sols avec une forte augmentation dans le sol sous maïs entre 15 et 90 cm. Entre 90 et 105 cm, les concentrations en acides carboxyliques ω -hydroxylés des deux sols ne sont plus significativement différentes ce qui pourrait que la biomasse racinaire du maïs ne contribue pas à la MOS à cette profondeur. La concentration des acides carboxyliques ω -hydroxylés dans les deux sols en profondeur est à mettre en relation directe avec les profils racinaires des plantes de blé et de maïs (cf. §6.2.1.1.) qui montrent que la quantité de racines

de maïs dans le sol est très supérieure à celle du blé pour les profondeurs 15-90 cm. La concentration en acides carboxyliques ω -hydroxylés des deux sols étudiés suit les concentrations des monomères ω C₂₂ et ω C₂₄ qui représentent à eux deux de 46 % à 62% de cette classe de composés (figure 6). Ces deux monomères font partis des monomères caractéristiques des racines de blé et de maïs (chapitre 3).

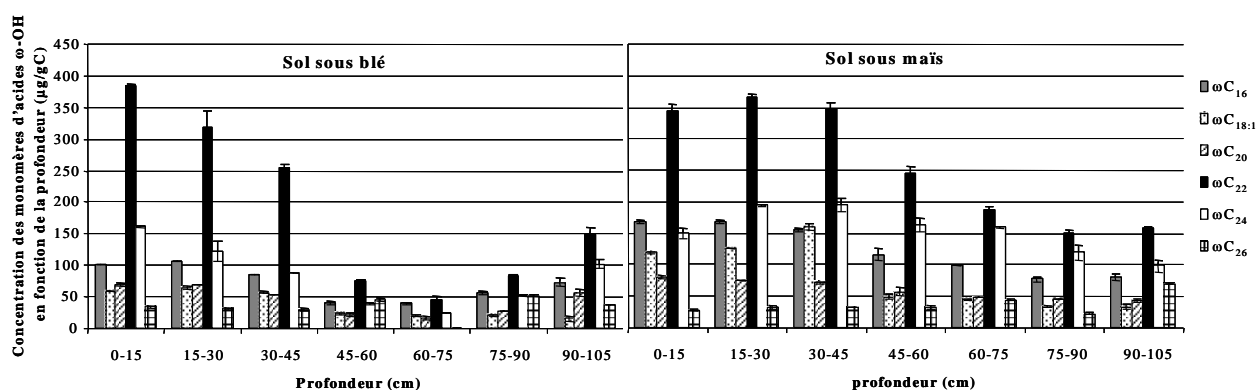


Figure 6 : Concentration des monomères d'acides ω -hydroxylés en fonction de la profondeur pour les sols sous blé et maïs.

Par conséquent leur forte présence dans les sols en profondeur et l'augmentation de leur concentration après 9 ans de culture de maïs confirme l'impact de la biomasse racinaire du maïs sur les profondeurs 0-90 cm. On note que les plus grandes différences de concentration entre les deux sols ont été mesurées pour les profondeurs 30-75 cm, précisément là où la densité racinaire du maïs est encore très importante ($>0.9 \text{ cm}^3$ de racines/ cm^3 de sol) (Ju et al., 2007) alors que la densité racinaire du blé est faible ($<0.4 \text{ cm}^3$ de racines/ cm^3 de sol) (Aggarwal et al. 2006). Enfin la concentration totale en acides carboxyliques ω -hydroxylés ainsi que la distribution des monomères dans cette classe ne changent pas pour la profondeur 90-105 cm ce qui confirme que la biomasse racinaire du maïs ne semble pas contribuer à la MOS à cette profondeur.

6.2.1.3. Contribution des monomères spécifiques des cutines

Pour le sol sous blé, la contribution des monomères spécifiques de la cutine, ne varie pas significativement entre 0 et 30 cm, puis diminue légèrement entre 30 et 75 cm, pour augmenter fortement entre 75 et 105 cm (figure 7).

Dans le sol sous maïs, la quantité totale de monomères des cutines reste constante entre 0 et 30 cm augmente entre 30 et 45 cm puis diminue entre les profondeurs 30-45 cm et 45-60 cm. En dessous de 45 cm la concentration des monomères des cutines se stabilise autour de

800µg/gC.

Les concentrations en monomères sont significativement plus grandes pour le sol sous maïs entre 0 et 75 cm, mais cette tendance s'inverse pour les deux dernières profondeurs où la mise en culture de maïs a provoqué une forte diminution de la quantité des monomères spécifiques des cutines.

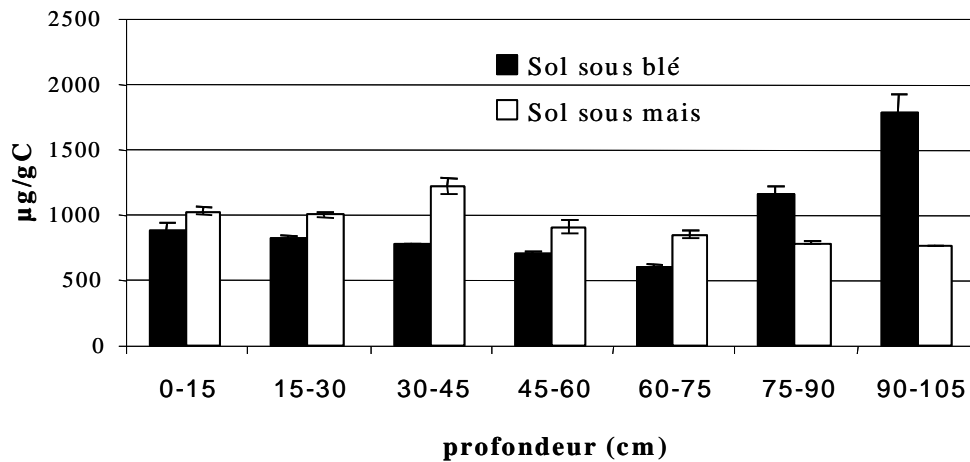


Figure 7 : Distribution des monomères totaux spécifiques de la cutine en fonction de la profondeur dans les sols sous blé et sous maïs

Dans les sols sous blé et sous maïs, les monomères spécifiques des cutines sont largement dominés par les acides x,16-dihydroxy hexadécanoïques (x=8,9,10) et le diacide 9-hydroxy hexadécanoïque sur toute la profondeur (figure 8). La concentration totale des monomères spécifiques des cutines pour les deux sols suit les concentrations de ces deux monomères qui représentent de 66% à 94% des monomères totaux spécifiques des cutines.

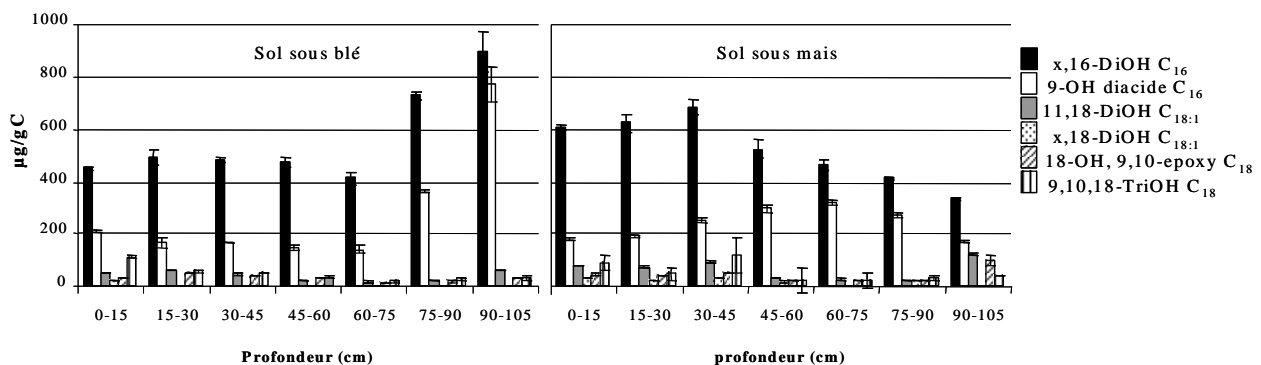


Figure 8 : Distribution des monomères spécifiques des cutines en fonction de la profondeur pour les sols sous blé et sous maïs.

Le changement de culture de blé à maïs influence la concentration de monomères des cutines en profondeur. Or nous avons montré dans le chapitre précédent que les cutines présentes dans les sols sur la profondeur 0-25 cm après 12 ans de culture de maïs proviennent en majeure partie d'une végétation en C₃ probablement antérieure à la mise en place du site expérimental. Les temps de renouvellement des cutines plus longs que le temps de l'expérience (9 ans de culture de maïs) peut expliquer l'absence de différences entre les concentrations des cutines des deux sols. Sur cette échelle de temps, les cutines apparaissent stabilisées.

Pour les profondeurs de 0 à 75 cm, on remarque que si les concentrations en monomères sont légèrement plus élevées pour le sol sous maïs que pour celui sous blé, la distribution générale des monomères en fonction de la profondeur reste similaire. En revanche, pour les deux dernières profondeurs la diminution des monomères spécifiques des cutines est importante puisque la concentration totale de ces monomères passe d'environ 1800 µg/gC pour le sol sous blé à 750 µg/gC pour le sol ayant reçu 9 années de maïs à la profondeur 90-105 cm. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces changements aux différentes profondeurs. Tout d'abord il est possible que ces variations soient simplement dues à la variabilité spatiale. Si l'on fait l'hypothèse que la variabilité spatiale est inférieure à la variabilité analytique alors, de 0 à 75 cm, la plus grande concentration de monomères spécifiques des cutines par rapport dans le sol sous maïs peut s'expliquer par la dégradation de composés autres que les monomères de cutines. De 75 à 105 cm, la tendance inverse observée pourrait provenir d'un « priming effect », c'est-à-dire que l'activité microbienne est augmentée par l'apport d'une nouvelle MO fraîche, provoquant la dégradation de la MOS en profondeur (Fontaine et al., 2003; Fontaine et al., sous presse). L'effet d'une augmentation de l'activité microbienne sur la minéralisation des cutines devrait se répercuter sur toute la profondeur, puisque l'apport de biomasse racinaire est important sur les profondeurs 30-75 cm après 9 ans de culture sous maïs. Pourtant, on n'observe cette diminution des concentrations des monomères des cutines due à une minéralisation des cutines que pour les deux dernières profondeurs. Les communautés microbiennes présentes à 1 mètre de profondeur ne sont pas les mêmes que celles en surface. La dissemblance entre les populations microbiennes en surface et en profondeur pourrait être à l'origine de la minéralisation sélective de la cutine pour les profondeurs 75-90 cm et 90-105cm, alors qu'elle ne semble pas être affectée pour les profondeurs supérieures à 75 cm.

6.2.2. Mesures des signatures isotopiques des monomères spécifiques des cutines et des subérines en profondeur.

Nous avons vu dans cette première partie de chapitre les concentrations des lipides liés en profondeurs dans un sol sous blé et après 9 ans de culture de maïs. Les signatures isotopiques de certaines molécules caractéristiques des cutines et des subérines devraient permettre de mieux comprendre leur dynamique en profondeur des sols. Seules les signatures isotopiques des monomères les plus concentrés ont pu être déterminées, beaucoup des monomères spécifiques étant présents en trop faible concentration en profondeur pour pouvoir mesurer leur signature isotopique. Nous avons choisi les monomères ωC_{22} et ωC_{24} comme monomères spécifiques des racines ainsi que les monomères x,16-DiOH C_{16} comme monomères spécifiques des cutines.

6.2.2.1. $\delta^{13}C$ des monomères spécifiques des subérines racinaires en profondeur.

Les signatures isotopiques des monomères spécifiques des racines dans les sols sous blé et sous maïs indiquent que les monomères provenant du maïs sont incorporés aux MOS sur toute la profondeur, en accord avec les résultats publiés dans Rasse et al. (2006) (figure 9).

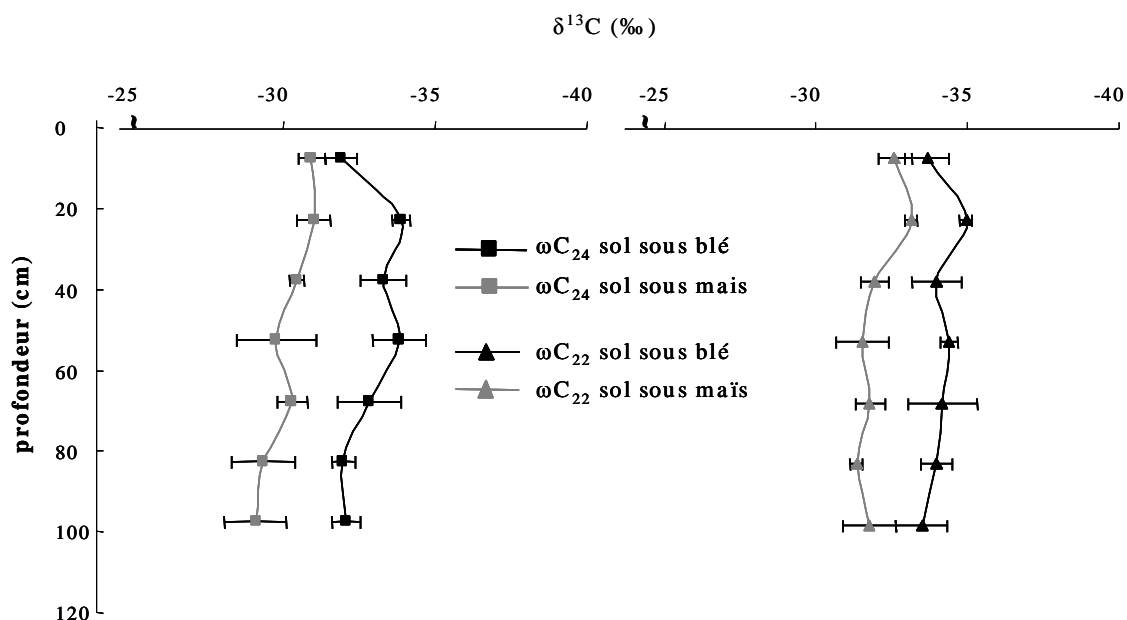


Figure 9 : $\delta^{13}C$ (‰, VDPB) des monomères ωC_{22} et ωC_{24} en fonction de la profondeur pour les sols cultivés en blé et en maïs.

Rasse et al. (2006) estiment le taux d'incorporation du carbone provenant du maïs à la MOS à environ 0.95 % par an pour les profondeurs de 0 à 45 cm et à 0.28% par an pour la profondeur

75-90cm. Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que la concentration des monomères ωC_{22} et ωC_{24} augmentait avec la profondeur jusqu'à 90 cm lors du changement de culture de blé à maïs, impliquant une augmentation de la contribution des monomères provenant de la subérine des racines de maïs aux MOS.

Pour la profondeur 90-105 cm la concentration totale en acides carboxyliques ω -hydroxylés ainsi que la distribution des monomères étaient équivalentes pour les deux sols, indiquant qu'à cette profondeur il n'y a pas d'augmentation du carbone provenant de la biomasse racinaire. Or les signatures isotopiques des monomères ωC_{22} et ωC_{24} montrent que les monomères issus de la subérine des racines de maïs sont aussi incorporés aux MOS à cette profondeur, et qu'ils viennent remplacer des monomères de blé dégradés, sans provoquer de variation de la concentration globale ni de la distribution de ces monomères.

6.2.2.1. $\delta^{13}C$ des monomères spécifiques des cutines des parties aériennes en profondeur.

Les signatures isotopiques des acides x,16 dihydroxyhexadécanoïques ne varient pas, ni en fonction de la profondeur ni après changement de culture (figure 10), confirmant la faible incorporation des monomères provenant des cutines des parties aériennes du maïs à la MOS déjà suggérée pour la couche de labour au chapitre précédent. Les cutines retrouvées en profondeur proviennent essentiellement d'une végétation en C_3 antérieure à la mise en place du site expérimental. Ce résultat confirme que la diminution de la quantité de ces monomères en profondeur observée après changement de culture (figure 7) est due à la dégradation de la cutine existante, alors que celle-ci paraissait être « stabilisée » en profondeur.

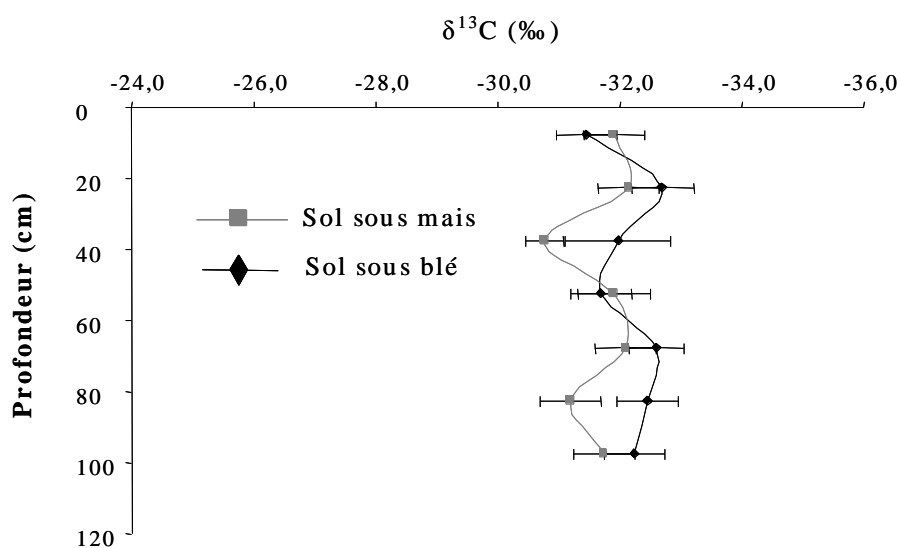


Figure 10 : $\delta^{13}C$ (‰, VDPB) des monomères d'acides x,16 dihydroxyhexadécanoïques en fonction de la profondeur pour les sols cultivés en blé et en maïs

6.3. Conclusion

Le changement de culture de blé à maïs a induit une modification importante des concentrations en lipides liés dans les sols. Cette modification est observée pour toutes les familles de composés, mais de manière distincte. Les monomères spécifiques des subérines de la biomasse racinaire représentent jusqu'à 20% des lipides liés dans le sol. Le changement de culture de blé à maïs induit une forte augmentation de la quantité de ces monomères sur la profondeur 30-75 cm. Cette augmentation est directement corrélée à la densité racinaire du maïs en profondeur, qui est bien plus élevée que celle du blé. Les signatures isotopiques des monomères majoritaires des subérines racinaires indiquent que les monomères du maïs sont incorporés sur toute la profondeur. La proportion des monomères spécifiques des cutines est importante dans les sols en profondeur puisqu'elle peut représenter jusqu'à 30% des lipides liés totaux pour le sol sous blé. Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'en surface, après 12 ans de culture de maïs, ces monomères provenaient principalement d'une végétation en C₃ et que les cutines de la plante de maïs étaient peu ou pas incorporées aux MOS. Ce qui est vrai en surface l'est d'autant plus en profondeur, où les signatures isotopiques des acides x,16 dihydroxyhexadécanoïques ne varient ni en fonction de la profondeur ni en fonction des années de culture de maïs. Par contre, les concentrations de ces monomères sont affectées par le changement de culture sur toute la profondeur étudiée. L'apport de MO fraîches par les racines de maïs pourrait augmenter l'activité microbienne en profondeur, conduisant à une minéralisation des MOS les plus stables. Une étude des parcelles ayant reçu le même traitement permettrait d'estimer la part de ces variations de concentrations due à la variabilité spatiale et de vérifier les hypothèses formulées dans ce chapitre.

Cette étude montre que les cutines et les subérines présentent un réel potentiel pour l'étude de la dynamique des MOS dans les sols, aussi bien en surface qu'en profondeur, bien que ces monomères ne soient pas des composés majoritaires ni des plantes ni des MO dans les sols agricoles. L'étude de leur devenir dans les sols nous a permis de mettre en évidence et de hiérarchiser différents processus de dégradation et d'incorporation des MO fraîches provenant des parties aériennes et racinaires des plantes dans les sols, et d'évaluer l'impact des MO fraîches apportées par les racines sur la dynamique de la MOS déjà présentes.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Nous avons développé au cours de ce travail un outil d'analyse permettant de mieux comprendre la dynamique de la matière organique fraîche provenant des plantes incorporée au sol, en fonction de sa provenance dans la plante (feuilles, tiges, racines). En effet, la contribution des parties aériennes et souterraines des plantes à la matière organique des sols a fait l'objet de nombreuses études, et il est souvent admis que les racines des plantes contribuent plus à la matière organique des sols que les parties aériennes. Cependant, les processus de dégradation et de stabilisation de la matière organique provenant des parties aériennes et racinaires des plantes sont mal connus. Nous avons estimé la contribution à la matière organique du sol des marqueurs des cutines et des subérines. Ces dernières sont des biopolyesters spécifiques des parties aériennes et souterraines des plantes respectivement. Nous avons décrit leur dynamique dans les sols grâce à la combinaison des caractérisations moléculaires et isotopiques ^{13}C de leurs monomères dans les plantes et dans les sols.

Le site expérimental des Closeaux a été choisi pour suivre la dynamique des marqueurs provenant respectivement de la biomasse aérienne et racinaire des plantes. Dans les plantes, la signature isotopique des monomères des cutines et des subérines était très variable à l'échelle de l'organe et à l'échelle de la plante totale. Ces différences pouvaient être imputées à plusieurs mécanismes agissant lors de la biosynthèse de ces marqueurs par la plante dont la conjonction conduisait soit à l'appauvrissement soit à l'enrichissement en ^{13}C des monomères.

Les marqueurs spécifiques des cutines n'étaient pas incorporés à la matière organique des sols des Closeaux. Les cutines présentes dans ces sols sont probablement antérieures à la mise en place du site expérimental et donc stabilisées alors que la cutine de maïs apportée au sol chaque année est en grande partie dégradée. Une forte incorporation des marqueurs des subérines des racines de maïs à la matière organique du sol est observée après les six premières années de culture de maïs. La faible incorporation des marqueurs des subérines racinaires du maïs entre 6 et 12 ans suggère l'existence d'au moins deux compartiments cinétiques d'incorporation.

Le changement de culture de blé à maïs affecte les concentrations des biopolyesters en profondeur, entraînant une forte augmentation de la quantité des monomères spécifiques des subérines dans la zone 30-75 cm. La contribution des marqueurs des cutines au carbone organique des sols diminue en profondeur à la suite du changement de végétation. L'apport de

MO fraîches par les racines plus important pour le maïs que pour le blé pourrait augmenter l'activité microbienne en profondeur conduisant à une minéralisation des MOS les plus stables.

Les marqueurs des cutines et des subérines ont un réel potentiel pour l'étude de la dynamique des MOS dans les sols, aussi bien en surface qu'en profondeur. Si certains monomères des cutines et subérines sont bien apparus dans cette étude comme des marqueurs d'origine végétale aérienne ou souterraine des matières organiques des sols, la possibilité de les utiliser comme des marqueurs de la dynamique de ces tissus doit être étudiée. Des expériences d'incubation au laboratoire de feuilles et racines de plantes enrichies en ^{13}C permettraient de vérifier si les dynamiques de ces marqueurs sont représentatives des dynamiques des racines et des parties aériennes des plantes. Une comparaison des cinétiques de minéralisation des biopolyesters spécifiques par rapport à celle de la matière organique totale de la plante permettrait d'améliorer les connaissances sur les dynamiques de ces tissus dans les sols. De telles données pourraient être utilisées pour mieux paramétrer les modèles sur la dynamique du carbone dans les sols en définissant de nouveaux compartiments cinétiques correspondant aux différents tissus incorporés.

REFERENCES

REFERENCES

A

- Aggarwal, P., Choudhary, K.K., Singh, A.K., Chakraborty, D., 2006. Variation in soil strength and rooting characteristics of wheat in relation to soil management. *Geoderma* 136, 353-363.
- Almendros, G., Dorado, J., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., 1997. Pyrolysis of carbohydrate-derived macromolecules: its potential in monitoring the carbohydrate signature of geopolymers. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 40-41, 599-610.
- Almendros, G., Dorado, J., Sanz, J., Alvarez-Ramis, C., Fernandez-Marron, M.T., Archangelsky, S., 1999. Compounds released by sequential chemolysis from cuticular remains of the Cretaceous Gymnosperm *Squamastrobis tigrensis* (Patagonia, the Argentine). *Org. Geochem.* 30, 623-634.
- Ambles, A., Jacquesy, J.-C., Jambu, P., Joffre J., Maggi-Churin, R., 1991. Polar lipid fraction in soil: a kerogen-like matter. *Org. Geochem.* 17, 341-349.
- Ambles, A., Jambu, P., Jacquesy, J.-C., Parlanti, E., Secouet, B., 1993. Changes in the ketone portion of lipidic components during the decomposition of plant debris in a hydromorphic forest-podzol. *Soil Science* 156, 49-56.
- Ambles, A., Jambu, P., Parlanti, E., Joffre J., Riffe, C., 1994. Incorporation of natural monoacids from plant residues into an hydromorphic forest podzol. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 175-182.
- Amundson R., 2001. The carbon budget in soils. *Annual review of earth planet science* 29, 535-562.
- Annabi, M., 2005. Thèse : Stabilisation de la structure d'un sol limoneux par des apports de composts d'origine urbaine: relation avec les caractéristiques de leur matière organique. INRA- Environnement et Grande Culture.
- Augris, N., Balesdent, J., Mariotti, A., Derenne, S., Largeau, C., 1998. Structure and origin of insoluble and non-hydrolyzable, aliphatic organic matter in a forest soil. *Org. Geochem.* 28, 119-124.

-
- Badeck, F.W., Tcherkez, G., Nogués, S., Piel, C., Ghashghaie, J., 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plants organs - a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1381-1391.
- Bahri, H., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Rasse, D.P., Chenu, C., Mariotti, A., 2006. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1977-1988.
- Baldock, J.A., Masiello, C.A., Gelinas, Y., Hedges, J.I., 2006. Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Mar. Biotechnol.* In Press, Corrected Proof.
- Balesdent, J., Mariotti, A., 1996. Measurement of Soil Organic Matter Turnover Using ^{13}C Natural Abundance. *Mass Spectrometry of Soils* 83-111.
- Balesdent, J., Balabane, M., 1996. *Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. Soil Bio. Biochem.* 28, 1261-1263.
- Barber, S.A., 1979. Corn residue management and soil organic matter. *Agron. J.* 71, 625-627.
- Barnabas, A.D., 1996. Casparian band-like structures in the root hypodermis of some aquatic angiosperms. *Aquat. Botany* 55, 217-225.
- Barral, M.T., Bujan, E., Devesa, R., Iglesias, M.L., Velasco-Molina, M., 2007. Comparison of the structural stability of pasture and cultivated soils. *Sci. Total Environ.* 378, 174-178.
- Barrusio, E., Eklo, O.M., Iglesias, E., Houot, S. Modification de la mobilité des pesticides dans les sols après addition de matières organiques exogènes. 5^{ème} Journées nationales de l'étude des sols, AFES, Rennes, 99-101.
- Batjes, N.H., 1996. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 151-163.
- Bento, M.F., Pereira, H., Cunha, M.A., Moutinho, A.M.C., Van den Berg, K.J., Boon, J.J., 1998. Thermally Assisted Transmethylation Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Suberin Components in Cork from *Quercus suber* L. *Phytochem. Anal.* 9, 75-87.
- Bento, M.F., Pereira, H., Cunha, M.A., Moutinho, A.M.C., van den Berg, K.J., Boon, J.J., 2001. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 57, 45-55.
- Bernards, M.A., Lewis, N.G., 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A changing paradigm. *Phytochemistry* 47, 915-933.

- Bernards, M.A., Razem, F.A., 2001. The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* 57, 1115-1122.
- Bernards, M.A., 2002. Demystifying suberin. *Can. J. Bot.* 80, 227-240.
- Bolwell, G.P., Gerrish, C., Salaun, J.-P., 1997. Changes in enzymes involved in suberisation in elicitor-treated french bean cells. *Phytochemistry* 45, 1351-1357.
- Borg-Olivier, O., Monties, B., 1993. Lignin, suberin, phenolic acids and tyramine in the suberized, wound-induced potato periderm. *Phytochemistry* 32, 601-606.
- Boutton, T.W., 1996 Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. Marcel Dekker Inc., New York.
- Bruce J. P., Frome M., Haites E., Janzen H., Lal R. and Paustian K., 1999. Carbon sequestration in soils. *J. Soil Water Conserv.* 5, 382-389.
- Brugnoli, E., Hubick, K.T., Von Caemmerer, S., Wong, S.C., Farquhar, G.D., 1988. Correlation between carbon isotope discrimination in leaf, starch and sugars of C₃ plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiol.* 88, 1418-1424.
- Brugnoli, E., Lauteri, M., 1991. Effect of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ Non-Halophytes. *Plant Physiol.* 95, 628-635.
- Bull, I.D., Nott, C.J., van Bergen, P.F., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 2000. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments - VI. The occurrence and source of organic acids in an experimental grassland soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1367-1376.

C

- Caldicott, A.B., Eglinton, G., 1976. Cutin acids from bryophytes: An [omega]-1 hydroxy alkanolic acid in two liverwort species. *Phytochemistry* 15, 1139-1143.
- Campbell, C.A., Lafond, G.P., Zentner, R.P., Biederbeck, V.O., 1991. Influence of fertilizer and straw baling on soil organic matter in thin black chemozem in western Canada. *Soil Biol. Biochem.* 23, 443-446.
- Capriel, P., Beck, T., borchert, H., Harter, P., 1990. Relationship between Soil Aliphatic Fraction Extracted with Supercritical hexane, Soil Microbial Biomass, and Soil Aggregate Stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 415-420.

- Cardoso, J.N., Eglinton, G., 1975. The use of cutin acids in the recognition of higher plant contribution to recent sediments. In: *Advances in Organic Geochemistry*, R. Campos (Ed). pp. 273-287.
- Cardoso, J.N., Eglinton, G., 1983. The use of hydroxyacids as geochemical indicators. *Geochim. Cosmochim. Acta* 47, 723-730.
- Cernusak, L.A., Arthur, D.J., Pate, J.S., Farquhar, G.D., 2003. Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiol.* 131, 1544-1554.
- Chefetz, B., 2003. Sorption of phenanthrene and atrazine by plant cuticular fractions. *Environ. Tox. Chem.* 22, 2492-2498.
- Chefetz, B., 2007. Decomposition and sorption characterization of plant cuticles in soil. *Plant Soil* 298, 21-30.
- Chen, B., Johnston, E.J., Chefetz, B., Zhu, L., Xing, B., 2005. Sorption of polar and nonpolar aromatic organic contaminants by plant cuticular materials: role of polarity and accessibility. *Environmental Science and Technology* 39, 6138-6146.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., Simon, R.P., 2004. Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipids biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry* 65, 1369-1381.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., 2005. $\delta^{13}\text{C}$ and δD identification of sources of lipids biomarkers in sediments of Lake Haruna. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 3285-3297.
- Christensen, B.T., 1996. Carbon in primary and secondary organomineral complexes. In: *Structure and Organic Matter Storage in Agricultural Soils*(Ed). Lewis.
- Christie, W.W., 1993 Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. W.W Christie, Oily press, Dundee.
- Clapp, C.E., Allmaras, R.R., Layese, M.F., Linden, D.R., Dowdy, R.H., 2000. Soil organic carbon and ^{13}C abundance as related to tillage, crop residue and nitrogen fertilization under continuous corn management in Minnesota. *Soil and Tillage Research* 55, 127-142.
- Clausen, P.A., Wilkins, K., Wolkoff, P., 1998. Gas chromatographic analysis of free fatty acids and fatty acid salts extracted with neutral and acidified dichloromethane from office floor dust. *J. Chromatogr., A* 814, 161-170.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23, 169-175.

Cordeiro, N., Aurenty, P., Belgacem, M.N., Gandini, A., Neto, C.P., 1997. Surface Properties of Suberin. *J. Colloid Interface Sci.* 187, 498-508.

Cordeiro, N., Belgacem, M.N., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., Gandini, A., 1998. Cork suberin as a new source of chemicals: 1. Isolation and chemical characterization of its composition. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 71-80.

D

de Leeuw, J.W., Largeau, C., 1993 A review of Macromolecular Organic Compounds That Comprise Living Organisms and Their Role in Kerogen, Coal, and Petroleum Formation. Plenum Press, New York.

de Leeuw, J.W., Irene, W., Rijpstra, C., Nienhuis, P.H., 1995. Free and bound fatty acids and hydroxy fatty acids in the living and decomposing eelgrass *Zostera marina* L. *Org. Geochem.* 23, 721-728.

Dean, B.B., Kolattukudy, P.E., 1976. Synthesis of Suberin during wound-healing in jade leaves, tomato fruit, and bean pods. *Plant Physiol.* 58, 411-416.

Dean, B.B., Kolattukudy, P.E., 1977. Biochemistry of suberization. *Plant Physiol.* 59, 48-54.

Deen, W., Kataki, P.K., 2003. Carbon sequestration in a long-term conventional vs. conservation tillage experiment. *Soil and Tillage Research* 74, 143-150.

del Rio, J.C., Hatcher, P.G., 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography-mass spectrometry. *Org. Geochem.* 29, 1441-1451.

del Rio, J.C., McKinney, D.E., Knicker, H., Nanny, M.A., Minard, R.D., Hatcher, P.G., 1998. Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *J. Chromatogr., A* 823, 433-448.

Derrien, D., Marol, C., Balesdent, J., 2006. Microbial Biosynthesis of individual neutral sugars among sets of substrates and soils. *Geoderma* 139, 190-198.

Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Rasse, D.P., Bardoux, G., Balesdent, J., Girardin, C., Chenu, C., Mariotti, A., 2005. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma* 128, 3-17.

Dignac, M.-F., Rumpel, C., 2006. Relative distributions of phenol dimers and hydroxy acids in a cultivated soil and above ground maize tissue. *Org. Geochem.* 37, 1634-1638.

- Dinel H. and Schnitzer M., 1990. Soil lipids: Origin, nature, content, decomposition, and effect on soil physical properties. In: J. M. Bollag and G. Stotzky (Ed.), Soil biochemistry, Vol.6. Dekker, M., New York, pp.397-429.
- Dinel, H., 1996. Soil lipids: Origin, nature, content, decomposition, and effect on soil properties. Soil Biochem. 6, 398-429.
- Dorado, J., Gonzalez-Vila, F.-J., Zancada, M.-C., Almendros, G., Lopez-Fando, C., 2003. Pyrolytic descriptors responsive to changes in humic acid characteristics after long-term sustainable management of dryland farming systems in Central Spain. J. Anal. Appl. Pyrolysis 68-69, 299-314.
- Dümig, A., Knicker, H., Schad, P., Rumpel, C., Dignac, M.-F., Kögel-Knabner, I., 2007. Araucaria forest expansion on grassland in the southern Brazilian highlands as revealed by ^{14}C and $\delta^{13}\text{C}$ studies. Geoderma in press.

E

- Eglinton, G., Hunneman, D.H., McCormick, 1968. Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids. Org. Mass Spectrom. 1, 593-611.
- Espelie, K.E., Dean, B.B., Kolattukudy, P.E., 1979. Composition of Lipid-derived Polymers from Different Anatomical Regions of Several Plant Species. Plant Physiol. 64, 1089-1093.
- Espelie, K.E., Kolattukudy, P.E., 1979. Composition of the aliphatic component of 'suberin' from the bundle sheaths of *zea mays* L. leaves. Plant Sci. Lett. 15, 225-230.
- Espelie, K.E., Davis, R.W., Kolattukudy, P.E., 1980. Composition, ultrastructure and function of the cutin- and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfed.). Planta 149, 498-551.
- Espelie, K.E., Wattendorff, J., Kolattukudy, P.E., 1982. Composition and ultrastructure of the suberized cell wall of isolated crystal idioblasts from *Agave americana* L. leaves. Planta 155, 166-175.
- Eswaran H., Van Den Berg E. and Reich P., 1993. Organic carbon in soils of the world. Soil Sci. Soc. Am. J. 57, 192-194.

F

- Fabbri D., Chiavari G. and Galletti G. C., 1996. Characterization of soil humin by pyrolysis (/methylation)-gas chromatography/mass spectrometry: structural relationship with humic acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 37, 161-172.
- Fang, J., Chan, O., Joeckel, R.M., Huang, Y., Wang, Y., Bazylnski, D.A., Moorman, T.B., Clement, B.J.A., 2006. Biomarker analysis of microbial diversity in sediments of a saline groundwater seep of Salt Basin, Nebraska. *Org. Geochem.* 37, 912-931.
- Fang, X., Qiu, F., Yan, B., Wang, H., Mort, A.J., Stark, R.E., 2001. NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry* 57, 1035-1042.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition. *Soil Biol. Biochem.* 35, 837-843.
- Fontaine, S. et al. *Nature*, *in press*
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., Schreiber, L., 2005. Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66, 2643-2658.

G

- Ghashghaie, J., Badeck, F.W., Lanigan, G., Nogués, S., Tcherkez, G., Deléens, E., Cornic, G., Griffiths, H., 2003. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C₃ plants. *Phytochemistry Reviews* 2, 145-161.
- Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R.A., Schmidt, H.W., 1993. Correlation between the ¹³C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiol.* 102, 1287-1290.
- Gleixner, G., 2001. Plant compounds and their turnover and stabilisation as SOM. *Global Biogeochem. Cycles* 201-215.
- Gobe, V., Lemee, L., Ambles, A., 2000. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Org. Geochem.* 31, 409-419.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1990a. Cutin-derived CuO reaction products from purified cuticles and tree leaves. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54, 3065-3072.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1990b. Potential applications of cutin-derived CuO reaction products for discriminating vascular plant sources in natural environments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54, 3073-3081.

- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1990c. The diagenetic behavior of cutin acids in buried conifer needles and sediments from a coastal marine environment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55, 3083-3093.
- Gonzalez Perez, M., Martin-Neto, L., Saab, S.C., Novotny, E.H., Milori, B.M.B.P., Bagnato, V.S., Colnago, L.A., Melo, W.J., Knicker, H., 2004. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ^{13}C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma* 118, 181-190.
- Gonzalez-Vila, F.J., del Rio, J.C., Martin, F., Verdejo, T., 1996. Pyrolytic alkylation-gas chromatography-mass spectrometry of model polymers. Further insights into the mechanism and scope of the technique. *J. Chromatogr., A* 750, 155-160.
- Gonzalez, J.A., Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G., Zancada, M.C., Polvillo, O., Martin, F., 2003. Preferential accumulation of selectively preserved biomacromolecules in the humus fractions from a peat deposit as seen by analytical pyrolysis and spectroscopic techniques. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 68-69, 287-298.
- Graça, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., Pereira, H., 2002. Glycerol and glyceryl esters of ω -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61, 205-215.
- Gupta, N.S., Michels, R., Briggs, D.E.G., Collinson, M.E., Evershed, R.P., Pancost, R.D., 2007a. Experimental evidence for the formation of geomacromolecules from plant leaf lipids. *Org. Geochem.*, 38, 28-36.
- Gupta, N.S., Briggs, D.E.G., Collinson, M.E., Evershed, R.P., Michels, R., Jack, K.S., Pancost, R.D., 2007b. Evidence for the in situ polymerisation of organic compounds during preservation of fossil leaves: implication for organic matter preservation. *Org. Geochem.*, 38, 499-522.

H

- Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dible, S.D., Carson, D.M., 1995. Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23, 881-888.
- Hayes, J.M., Strauss, H., Kaufman, A.J., 1999. The abundance of ^{13}C in marine organic matter and isotopic fractionation in the global biogeochemical cycle of carbon during the past 800 Ma. *Chem. Geol.* 161, 103-125.

- Hedges, J.I., Mann, D.C., 1979. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43, 1803-1807.
- Hedges, J.I., Ertel, J.R., 1982. Characterisation of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Anal. Chem.* 54, 174-178.
- Hempfling, R., Ziegler, F., Zech, W., Schulten, H.-R., 1986. Litter decomposition and humication in acidic forest soils studied by chemical degradation, IR and NMR spectroscopy and pyrolysis field ionization mass spectrometry. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 179-186.
- Hempfling R. and Schulten H.-R., 1990. Chemical characterization of the organic matter in a forest soils by Curie point pyrolysis-GC/MS and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Org. geochem.* 15, 131-145.
- Heredia, A., 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1620, 1-7.
- Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C., 1999. Thermally assisted hydrolysis and methylation of milled beech leaf litter. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 49, 417-424.
- Hobbie, A.E., Werner, R.A., 2004. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C₃ and C₄ plants: a review and synthesis. *New Phytol* 161, 371-385.
- Holloway, P.J., 1973. Cutins of *Malus Pumila* fruits and leaves. *Phytochemistry* 12, 2913-2920.
- Holloway, P.J., Deas, A.H.B., 1973. Epoxyoctadecanoic acids in plant cutins and suberins. *Phytochemistry* 12, 1721-1735.
- Holloway, P.J., Grahame, A.B., Wattendorff, J., 1981. Ultrasonical detection of epoxides in plant cuticular membranes. *J. Exp. Bot.* 32, 1051-1066.
- Holloway, P.J., 1983. Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry* 22, 495-502.
- Hooker, M.L., Herron, G.M., Penas, P., 1982. Effect of residue burning, removal and incorporation on irrigated cereal crop yields and soil chemical properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 122-126.
- Houghton R. A., 1995. Balancing the global carbon cycle with terrestrial ecosystems. In: R. G. Zepp and C. Sonntag (Ed.), *The role of nonliving organic matter in the earth's carbon cycle*. Wiley, pp.133-152.

Huang, W., Peng, P., Yu, Z., Fu, J., 2003. Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Appl. Geochem.* 18, 955-972.

Hunneman, D.H., Eglinton, G., 1971. The constituent acids gymnosperm cutins. *Phytochemistry* 11, 1989-2001.

J

Jandl, G., Leinweber, P., Schulten, H.-R., Ekschmitt, K., 2005. Contribution of primary organic matter to the fatty acid pool in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1033-1041.

Jean-Baptiste, P., Ducroux, R., 2003. Potentiel des méthodes de séparation et stockage du CO₂ dans la lutte contre l'effet de serre. *C.R Geoscience* 611-625.

Jiao, Y., Whalen, J.K., Hendershot, W.H., 2006. No-tillage and manure applications increase aggregation and improve nutrient retention in a sandy-loam soil. *Geoderma* 134, 24-33.

Ju, X.T., Gao, Q., Christie, P., Zhang, F.S., 2007. Interception of residual nitrate from a calcareous alluvial soil profile on the North China Plain by deep-rooted crops: A ¹⁵N tracer study. *Environm. Pollution* 146, 534-542

K

Klingberg, A., Odermatt, J., Meier, D., 2005. Influence of parameters on pyrolysis-GC/MS of lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 74, 104-109.

Kögel-Knabner, I., Bochter, R., 1985. Characterization of lignin in forest humus layers by high-performance liquid chromatography of cupric oxide oxidation products. *Soil Biol. Biochem.* 17, 637-640.

Kögel-Knabner, I., 1986. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biol. Biochem.* 589-594.

Kögel-Knabner, I., Ziegler, F., Riederer, M., Zech, W., 1989. Distribution and decomposition pattern of cutin and suberin in forest soil. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 152, 409-413.

Kögel-Knabner, I., Hatcher, P.G., Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., 1992a. Aliphatic

- components of forest soil organic matter as determined by solid-state ^{13}C NMR and analytical pyrolysis. *The Sci. Total Environ.* 113, 89-106.
- Kögel-Knabner, I., De Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., 1992b. Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles: implications for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules. *The Sci. Total Environ.* 17, 175-185.
- Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Tegelaar, E.W., Hatcher, P.G., Kerp, H., 1994. Impact of brown coal dust on the organic matter in particle-size fractions of a Mollisol. *Org. Geochem.* 25, 29-39.
- Kögel-Knabner, I., 1997. ^{13}C and ^{15}N NMR as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma* 80, 117-161.
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 34, 139-162.
- Kolattukudy, P.E., Walton, T.J., 1973. The biochemistry of plant cuticular lipids. *Prog. Chem. Fats Lipid.* 13, 119-175.
- Kolattukudy, P.E., Dean, B.B., 1974. Structure, gas chromatographic measurement, and function of suberin synthesized by potato tuber tissue slices. *Plant Physiol.* 54, 116-121.
- Kolattukudy, P.E., 1981. Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin and Suberin. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 32, 539-567.
- Kolattukudy, P.E., 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* 62, 2918-2933.
- Kunst, L., Samuels, A.L., 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* 42, 51-80.
- Kuzyakov, Y., 2002. Factors affecting rhizosphere priming effects. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 382-396.

L

- Lal, R., 2002. Soil carbon dynamics in cropland and rangeland. *Environ. Pollut.* 116, 353-362.
- Leinweber P. and Schulten H.-R., 1995. Composition, stability and turnover of soil organic matter: investigations by off-line pyrolysis and direct pyrolysis-mass spectrometry. *J. of Anal. Appl. Pyrolysis* 32, 91-110.

Leinweber, P., Schulten, H.R., 1999. Advances in analytical pyrolysis of soil organic matter. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 49, 359-383.

Lendzian, K.J., Schonherr, J., 1983. In-vivo of cutin synthesis in leaves of *Clivia miniata* Reg. *Planta* 158, 70-75.

M

Manlay, R.J., Feller, C., Swift, M.J., 2007. Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 119, 217-233.

Mariotti, A., 1991. Le carbone 13 en abondance naturelle, traceur dynamique de la matière organique des sols et de l'évolution des paléoenvironnements continentaux. *cah. Orstom, ser. Pedol.* 26, 299-313.

Matas, A.J., Cuartero, J., Heredia, A., 2004. Phase transition in the biopolyester cutin isolated from tomato cuticle. *Thermochim. Acta* 409, 165-168.

Matzke, K., Riederer, M., 1990. The composition of the cutin of the caryopses and leaves of *Triticum aestivum* L. *Planta* 182, 461-466.

Matzke, K., Riederer, M., 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185, 233-245.

McKinney, D.E., Carson, D.M., Clifford, D.J., Minard, R.D., Hatcher, P.G., 1995. Off-line thermochemolysis versus flash pyrolysis for the in situ methylation of lignin: Is pyrolysis necessary? *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 34, 41-46.

Melzer, E., Schmidt, H.W., 1987. Carbon isotope effects on the Pyruvate Dehydrogenase Reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *The J. Biol. Chem.* 262, 8159-8164.

Mendez-Millan, M., Dignac, M.-F., Rumpel, C. Depolymerisation of the aliphatic macromolecular polyesters in maize leaves and soil: comparison of methods. *Submitted to Org. Geochem.*

Ménot, G., Burns, S.J., 2001. Carbon isotopes in ombrogenic peat bog plants as climatic indicators: calibration from an altitudinal transect in Switzerland. *Org. Geochem.* 32, 233-245.

Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., Ryser, U., 1999. Glycerol, Is a Suberin Monomer?. New Experimental Evidence for an Old Hypothesis. *Plant Physiol.* 119, 1137-1146.

- Moldes, A., Cendon, Y., Barral, M.T., 2007. Evaluation of municipal solid waste compost as a plant growing media component, by applying mixture design. *Bioresource Technology*, 98, 3069-3075.
- Molina, I., Bonaventure, G., Ohlrogge, J., Pollard, M., 2006. The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry* 67, 2597-2610.
- Monti, A., Brugnoli, E., Scartazza, A., Amaducci, M.T., 2006. The effect of transient and continuous drought on yield, photosynthesis and carbon isotope discrimination in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.* 57, 1253-1262.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 3, 600-608.
- Morrison R. I., 1969. Soil lipids. *Organic Geochemistry: methods and results* 558-575.

N

- Naafs, D.F.W., Van Bergen, P.F., 2002. Effect of pH adjustments after Base Hydrolysis: Implications for Understanding Organic Matter in Soils. *Geoderma* 106, 191-217.
- Negrel, J., Pollet, B., Lapierre, C., 1996. Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry* 43, 1195-1199.
- Newman, J.W., Hammock, B.D., 2001. Optimized thiol derivatizing reagent for the mass spectral analysis of disubstituted epoxy fatty acids. *J. Chromatogr., A* 925, 223-240.
- Nierop, K.G.J., 1998. Origin of aliphatic compounds in a forest soil. *Org. Geochem.* 29, 1009-1016.
- Nierop, K.G.J., Buurman, P., 1999. Insoluble organic matter fractions in incipient podzol B horizon: preservation of aliphatic biopolymers from roots. *Humic Subs. Environ.* 1, 29-37.
- Nierop, K.G.J., 2001. Temporal and vertical organic matter differentiation along a vegetation succession as revealed by pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 61, 111-132.
- Nierop, K.G.J., van Lagen, B., Buurman, P., 2001. Composition of plant tissues and soil organic matter in the first stages of a vegetation succession. *Geoderma* 100, 1-24.
- Nierop, K.G.J., Naafs, D.F.W., Verstraten, J.M., 2003. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Org. Geochem.* 34, 719-729.
- Nierop, K.G.J., Jansen, B., Hageman, J.A., Verstraten, J.M., 2006. The complementarity of

- extractable and ester-bound lipids in a soil profile under pine. *Plant Soil* 286, 269-285.
- Nip, M., Tegelaar, E.W., Brinkhuis, H., De Leeuw, J.W., Schenck, P.A., Holloway, P.J., 1986. Analysis of modern and fossil plant cuticles by Curie point Py-GC and Curie point Py-GC-MS: Recognition of a new, highly aliphatic and resistant biopolymer. *Org. Geochem.* 10, 769-778.
- Nogués, S., Tcherkez, G., Cornic, G., Ghashghaie, J., 2004. Respiratory carbon Metabolism following illumination in intact french bean leaves using $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope labeling. *Plant Physiol.* 136, 3245-3254.

O

- O'Brein, B.J., Stout, J.D., 1978. Movement and turnover of soil organic matter as indicated by carbon isotope measurements. *Soil Biol. Biochem.* 10, 309-317.
- Oades, J.M., 1995 An overview of processes affecting the cycling of organic carbon in soils. John Wiley, New York.
- Ohra-aho, T., Tenkanen, M., Tamminen, T., 2005. Direct analysis of lignin and lignin-like components from softwood kraft pulp by Py-GC/MS techniques. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 74, 123-128.
- Odlare, M., Pell, M., Svensson, K., 2007. Changes in soil chemical and microbial properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste Management*, article in press.
- Otto, A., Shunthirasingham, C., Simpson, M.J., 2005. A comparison of plant and microbial biomarkers in grassland soils from the Prairie Ecozone of Canada. *Org. Geochem.* 36, 425-448.
- Otto, A., Simpson, M.J., 2006. Sources and composition of hydrolysable aliphatic lipids and phenols in soils from western Canada. *Org. Geochem.* 37, 385-407.

P

- Pare, T., Dinel, H., Moulin, A.P., Townley-Smith, L., 1999. Organic matter quality and structural stability of a Black Chernozemic soil under different manure and tillage practices. *Geoderma* 91, 311-326.
- Park, R., Epstein, S., 1961. Metabolic fractionation of C^{13} & C^{12} in plants. *Plant Physiol.* 36, 133-138.

- Paul, E.A., Follett, R.F., Leavitt, S.W., Halvorson, A., Peterson, G.A., Lyon, D.J., 1997. Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 61, 1058-1067.
- Peres, V.F., Saffi, J., Melecchi, M.I.S., Abad, F.C., de Assis Jacques, R., Martinez, M.M., Oliveira, E.C., Caramao, E.B., *in press*. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *J. Chromatogr., A* In Press, Corrected Proof.
- Prasad, R., Power, J.F., 1991. Crop residue management. *Advances in Soil Science* 15, 204-252.

Q

- Quénéa, K., Derenne, S., Largeau C., Rumpel C. and Mariotti, A., 2004. Variation in lipid abundance and composition among different particle-size fractions of a forest soil. *Org. geochem.* 35, 1355-1370.
- Quénéa, K., Derenne, S., Gonzalez-Vila, F.J., Mariotti, A., Rouzaud, J.-N., Largeau C., 2005. Study of the composition of the macromolecular refractory fraction from an acidic sandy forest soil (Landes de Gascogne, France) using chemical degradation and electron microscopy. *Org. Geochem.* 36, 1151-1162.
- Quénéa, K., Largeau C., Derenne, S., Spaccini, R., Bardoux, G., and Mariotti, A., 2006. Molecular and isotopic study of lipids in particle size fraction of a sandy cultivated soil (Cestas cultivation sequence, southwest France): Sources, degradation and comparison with Cestas forest soil. *Org. geochem* 37, 20-44.

R

- Rasmussen, P.E., Allmaras, R.R., Rhode, C.R., Roager, N.C.J., 1980. Crop residue influences on soil carbon and nitrogen in a wheat-fallow system. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 596-600.
- Rasse, P.D., Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2005. In soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil* 269, 341-356.
- Rasse, D.P., Mulder, J., Moni, C., Chenu, C., 2006. Carbon turnover kinetics with depth in a French loamy soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 2097-2105.

- Ray, A.K., Lin, Y.Y., Gerard, H., Chen, Z.-J., Osman, S.F., Fett, W.F., Moreau, R.A., Stark, R.E., 1995. Separation and identification of lime cutin monomers by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Phytochemistry* 38, 1361-1369.
- Ray, A.K., Chen, Z.-J., Stark, R.E., 1998. Chemical Depolymerization Studies Of The Molecular Architecture Of Lime Fruit Cuticle. *Phytochemistry* 49, 65-70.
- Reicosky, D.C., Evans, S.D., Cambardella, C.A., Allmaras, R.R., Wilts, A.R., Huggins, D.R., 2002. Continuous corn with moldboard tillage: Residue and fertility effects on soil carbon. *J. Soil Water Conser.* 57, 277-284.
- Riederer, M., Schonherr, J., 1988. Development of plant cuticles: fine structure and cutin composition of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* 174, 127-138.
- Riederer, M., Matzke, K., Ziegler, F., Kögel-Knabner, I., 1993. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soils. *Org. Geochem.* 20, 1063-1076.
- Robert, M., Saugier, B., 2003. Contribution des écosystèmes continentaux à la séquestration du carbone. *C.R Geoscience* 577-595.
- Rocha, S.M., Goodfellow, B.J., Delgadillo, I., Neto, C.P., Gil, A.M., 2001. Enzymatic isolation and structural characterisation of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L. *Int. J. Biol. Macromol.* 28, 107-119.
- Rossmann, A., Butzenlechner, M., Schmidt, H.W., 1991. Evidence for a nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose. *Plant Physiol.* 96, 609-614.
- Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F., 2002. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Org. Geochem.* 33, 1131-1142.
- Rumpel, C., Eusterhues, K., Kögel-Knabner, I., 2004. Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 177-190.

S

- Sachleben, J.R., Chefetz, B., Deshmukh, A.P., Hatcher, P.G., 2004. Solid-state NMR characterization of pyrene-cuticular matter interaction. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4369-4376.

- Saiz-Jimenez C. and de Leeuw J. W., 1985. Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 11, 437-450.
- Saiz-Jimenez C. and de Leeuw J. W., 1987. Chemical structure of soil humic acid as revealed by analytical pyrolysis. *J. Ana. Appl. Pyrolysis* 11, 367-376.
- Saiz-Jimenez C., 1994. Analytical pyrolysis of humic substances: pitfalls, limitations and possible solutions. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1773-1780.
- Santos Bento, M.F., Pereira, H., Cunha, M.A., Moutinho, A.M.C., van den Berg, K.J., Boon, J.J., 2001. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. *J. Ana. Appl. Pyrolysis* 57, 45-55.
- Schmidt, H.W., Schönherr, J., 1982. Development of plant cuticles: occurrence and role of non-ester bonds in cutin of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* 156, 380-384.
- Schnitzer, M., 1973. Alkaline cupric oxide oxidation of a methylated fulvic acid. *Soil Biol. Biochem.* 6, 1-6.
- Sisti, C.P.J., Dos Santos, H.P., Alves, B.J.R., Urquiga, S., Boddey, R.M., 2004. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. *Soil Till. Res.* 76, 39-58.
- Six, J., Conant, R.T., Paustian, K., 2002. Stabilisation mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant Soil* 241, 155-176.
- Six, J., Jastrow, J.D., 2002. Organic matter turnover. In: *Encyclopedia of Soil Science*, R. Lal (Ed). pp. 936-942. Marcel Dekker, New York.
- Skrzypek, G., Kaluzny, A., Wojtun, B., Jedrysek, M.O., 2007. The carbon stable isotopic composition of mosses: a record of temperature variation. *Org. Geochem.* Article in press.
- Smith, N.S., Epstein, S., 1971. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratio for higher plants. *Plant Physiol.* 47, 380-384.
- Sollins, P., Homann, P., Cadwell, B.A., 1996. Stabilisation and destabilisation of soil organic matter mechanism and control. *Geoderma* 74, 65-105.
- Stark, R.E., Garbow, J.R., 1992. Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Studies of Plant Polyester Dynamics. 2. Suberized Potato Cell Wall. *Macromolecules* 149-154.
- Stark, R.E., Sohn, W., Pacchiano Jr, R.A., Al-Bashir, M., Garbow, J.R., 1994. Following Suberization in Potato Wound Periderm by Histochemical and Solid-State ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Methods. *Plant Physiol.* 104, 527-533.

Stevenson F. J., 1966. Lipids in soil. J. A. Oil Chem. Soc. 43, 203-210.

Stimler, K., Xing, B., Chefetz, B., 2006. Transformation of plant cuticles in soil: effect on their sorptives capabilities. Soil Sci. Soc. Am. J. 70, 1101-1109.

T

Tcherkez, G., Nogués, S., Cornic, G., Badeck, F.W., Ghashghaie, J., 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-repired CO₂ in French Bean. Plant Physiol. 131, 237-244.

Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Largeau, C., Derenne, S., Schulten, H.-R., Muller, R., Boon, J.J., Nip, M., Sprenkels, J.C.M., 1989a. Scope and limitations of several pyrolysis methods in the structural elucidation of a macromolecular plant constituent in the leaf cuticle of *Agave americana* L. J. Anal. Appl. Pyrolysis 15, 29-54.

Tegelaar, E.W., De Leeuw, J.W., Holloway, P.J., 1989b. Some mechanisms of flash pyrolysis of naturally occuring higher plant polyesters. J. Anal. Appl. Pyrolysis 15, 289-295.

Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Saiz-Jimenez, C., 1989c. Possible origin of aliphatic moieties in humic substances. The Sci. Total Environ. 81-82, 1-17.

Tegelaar, E.W., Kerp, H., Vissler, H., Schenk, P.A., 1990. Biaisi of the paleobotanical record as a consequence of variations in the chemical composition of higher vascular plant cuticles. Paleobiology 17, 133-144.

Tegelaar, E.W., Kerp, H., Vissler, H., Schenk, P.A., 1991. Biaisi of the paleobotanical record as a consequence of variations in the chemical composition of higher vascular plant cuticles. Paleobiology 17, 133-144.

V

Velcheva, M.P., Espelie, K.E., Ivanov, C.P., 1981. Aliphatic composition of cutin from inner seed coat of apple. Phytochemistry 20, 2225-2227.

W

- Wiesenberg, G.L.B., Schwarzbauer, J., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., 2004a. Source and turnover of organic matter in agricultural soils derived from n-alkane/n-carboxylic acid compositions and C-isotope signatures. *Org. Geochem.* 35, 1371-1393.
- Wiesenberg, G.L.B., Schwark, L., Schmidt, M.W.I., 2004b. Improved automated extraction and separation procedure for soil lipid analyses. *Eur. J. Soil Science* 55, 349-356.

Z

- Zeier, J., Schreiber, L., 1997. Chemical Composition of Hypodermal and Endodermal Cell Walls and Xylem Vessels Isolated from *Clivia miniata* (Identification of the Biopolymers Lignin and Suberin). *Plant Physiol.* 113, 1223-1231.
- Zeier, J., Schreiber, L., 1998. Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledonous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206, 349-361.
- Zeier, J., Ruel, K., Ryser, U., Schreiber, L., 1999. Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209, 1-12.
- Zimmermann, H.M., Hartmann, K., Schreiber, L., Steudle, E., 2000. Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210, 302-311.