



**HAL**  
open science

# Emission d'auxine et de nitrates par les bactéries des turricules de vers de terre : effet sur la croissance et le développement des plantes

Corinne Agapit

► **To cite this version:**

Corinne Agapit. Emission d'auxine et de nitrates par les bactéries des turricules de vers de terre : effet sur la croissance et le développement des plantes. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2018. Français. NNT : 2018PESC1001 . tel-01982100

**HAL Id: tel-01982100**

**<https://theses.hal.science/tel-01982100>**

Submitted on 15 Jan 2019

**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.



UNIVERSITÉ  
PARIS-EST CRÉTEIL  
VAL DE MARNE



île de France  
Demain s'invente ici

IEES Paris

**UNIVERSITE PARIS EST-CRETEIL VAL DE MARNE**

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

THÈSE

*Spécialité : Sciences de l'Univers et de l'Environnement*

*Présentée par Corinne AGAPIT*

*pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Est*

# Emission d'auxine et de nitrates par les bactéries des turricules de vers de terre : effet sur la croissance et le développement des plantes

*Devant le jury composé de :*

Rapporteur: Sébastien Barot, DR IRD (UMR IEES Paris)

Rapporteur: Cornelia Rumpel, DR CNRS (UMR IEES Paris)

Examineur: Marc Lepetit, DR INRA (UMR Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier)

Examineur: Xavier Raynaud, MCF UMPC (UMR IEES Paris)

Directeur de thèse: Manuel Blouin, PR AgroSup Dijon (UMR Agroécologie)

# *Remerciements*

Je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail :

Pour sa confiance, sa disponibilité et surtout son écoute dans les moments de doutes je tiens à remercier mon directeur de thèse **Manuel Blouin**. L'instant de quelques années tu as su me réconcilier avec le monde de la recherche.

Je remercie également mes co-encadrants de thèse **Luis Leitao** et **Thomas Lerch** pour leurs précieux conseils et le partage de leurs connaissances, essentiels pour mener à bien ce travail.

Je remercie la **Région Ile-de-France** qui a soutenu ce travail à travers sa contribution financière *via* une bourse de thèse.

Je remercie les rapporteurs **Sébastien Barot** et **Cornelia Rumpel** ainsi que les examinateurs **Marc Lepetit** et **Xavier Raynaud** pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury de thèse. Soyez assurés de toute ma reconnaissance.

Un grand merci à **Agnès Gigon** pour toute l'aide technique que tu m'as apportée au cours de ce long périple qu'est la thèse. Plus encore tu as toujours été présente dans les bons comme dans les mauvais moments et pour cela tu as toute ma gratitude.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe Biodis pour m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions. Je tiens notamment à remercier **Anne Pando** pour l'aide technique, l'accueil au sein de l'IRD de Bondy et surtout sa bonne humeur ; **Lise**

**Dupont** pour sa gentillesse et ses nombreux conseils allant de l'identification de vers de terre à l'inscription à la sécurité social et **Naoise Nunan** pour le partage de ses connaissances et son soutien à toute épreuve.

Je remercie également **Ruben Puga-Freitas aka Bubs**, pour ses conseils en statistiques, sa présence et ces nombreux encouragements. Tu as été un modèle d'exemplarité et de travail mais aussi un bon élève en ce qui concerne l'apprentissage du créole Guyanais. Après tout « Ou ja l'acarouany, ou pa pé manjé toti ».

L'aboutissement de ce travail n'aurait pu être possible sans l'aide précieuse des membres de mon comité de thèse : **Bernd Zeller** qui m'a permis de mieux appréhender la technique du marquage isotopique et l'analyse des résultats ; **Thomas Girin** pour son aide pour l'obtention du matériel végétale et le mode de culture de la plante *Brachypodium distachyon*. Vous avez su me conseiller, m'aider et m'aiguiller lorsque je m'égarais et pour cela je vous remercie.

Je suis également reconnaissante auprès de **Phillipe Mora** pour son écoute, son aide et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe Ecophys qu'ils soient : **Anne Repellin, Mathieu Bagard, Eric Ruelland, Juliette Leymarie** et **Juliette Rochet** pour leur soutien et leurs précieux conseils. **Fryni Grekis** pour sa bonne humeur et son aide dans les tâches administratives ; **Xavier Laffray** pour sa bienveillance et nos discussions de fin de journée.

Une pensée et un grand merci à **Daniel Laffray** qui a partagé avec moi sa passion et ses connaissances pour les sciences. Nos longues discussions étaient pour moi un bol d'air frais et pour cela vous avez toute ma reconnaissance.



Je tiens à remercier l'ensemble des équipes "adaptation et évolution" et "géomicrobiologie du sol et de l'eau" pour leur accueil et leur bonne humeur.

Un grand merci à l'ensemble de mes collègues doctorants sans qui ces années de thèse auraient été bien tristes. : A **Shabnam Taheri**, **Romain Fougeyrollas** , **Tetiana Kalachova** et **Kamal Toulaib**, merci à vous pour le partage, l'entraide et le soutien que vous m'avez apportés. Une mention spéciale aux ChaWans : **Charlotte Pruvost** et **Ewan Couic**. Ces longs débats sans fin sur le monde et nos discussions journalières sur des sujets à mon sens primordiaux tel que « avec ou sans sucre ton café » ont fortement contribué à l'aboutissement de mon travail mais surtout à la bonne ambiance. Un grand merci.

Je remercie chaleureusement **mes amis**, pour être là dans mes joies, mes peines, mes réussites mais aussi mes échecs. Merci à toi **chichi** pour ta contribution à la science *via* un coloriage digne des plus grands car même si ce n'est pas grand chose « A grenn douri ka plen sak douri » (« C'est le grain de riz qui remplit le sac de riz »).

**Pour finir, on dit souvent qu'on ne choisit pas sa famille, mais si je le pouvais je vous choisirai milles fois. Merci.**

## Figures

### *Synthèse bibliographique*

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Composantes externes (galerie, agrégats, turricules) et internes (en contact avec le corps du vers) de la drilosphère et de leur interaction avec d'autres domaines fonctionnels du sol .....                | 7  |
| Figure 2 : Digestion mutualiste de la matière organique dans le tube digestif des vers de terre .....   | 12 |
| Figure 3 : Biomasse sèche totale du riz en fonction de différentes concentrations de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en présence (trait plein) ou en absence (trait en pointillé) du vers de terre <i>M. anomala</i> ..... | 14 |
| Figure 4 : Voie de biosynthèse de l'auxine par les bactéries et les plantes .....   | 15 |
| Figure 5 : Photographie d' <i>Arabidopsis thaliana</i> montrant l'effet du vers <i>Aporrectodea caliginosa</i> sur le mutant aux1-7,axr4-2 .....  | 17 |
| Figure 6 : Hypothèse sur le couplage entre l'émission de molécules signal et le prélèvement de nutriments .....   | 18 |
| Figure 7 : Schéma représentant les différentes questions abordées dans les chapitres .....  | 21 |

### *Résultats et discussions*

#### Chapitre 1

|   |    |
|---|----|
| Figure I : Schéma du dispositif split-root utilisé dans le premier chapitre sur la plante <i>Brachypodium distachyon</i> L..... | 24 |
| Figure 1 : Effect of earthworm biomass on root morphology .....   | 36 |
| Figure 2 : Root length distribution in diameter classes .....   | 38 |
| Figure 3 : Effect of the number of earthworms on the relative root length.....  | 41 |

#### Chapitre 2

|   |    |
|---|----|
| Figure II : Schéma des différentes coupes et du dispositif split-root utilisé sur la plante <i>Brachypodium distachyon</i> au cours de cette expérience méthodologique .....  | 47 |
| Figure 1. Different steps in the timeline of the experiment.. .....   | 55 |
| Figure 2. Effect of (A) the growing media and (B) the cutting protocol on the number of coronary roots after 68 days of growth, just before the transfer in the split-root system (t <sub>2</sub> ).....  | 58 |
| Figure 3. Effect of (A) the growing media and (B) the cutting protocol on plant survival rate at the end of the experiment (t <sub>f</sub> ). .....   | 59 |
| Figure 4 : Crossed effects of the growing media and the cutting protocol on (A) belowground dry biomass and (B) aboveground dry biomass at the end of the experiment (t <sub>f</sub> ).....   | 61 |
| Figure 5. Root length distribution in diameter classes at the end of the experiment (t <sub>f</sub> ) according to the cutting protocol for (A) hh: hydropony both before and during split-root system, (B) hs: hydropony before and soil during split-root system, (C) sh: soil before and hydropony during split-root system and (D) ss: soil both before and during split-root system..... | 63 |
| Figure 6. Effect of the cutting protocol on (A) plant height and (B) the number of leaves.....  | 64 |

### Chapitre 3

|  |    |
|--|----|
| Figure III : Schéma du dispositif split-root utilisé pour déterminer si il existe un couplage entre les flux d'azote et l'émission de molécules signal par les turricules de vers de terre.  | 70 |
| Figure 1 : Hypothèse sur le couplage entre l'émission de molécules signal et le prélèvement de nutriments  | 73 |
| Figure 2 : Dispositif expérimental de l'expérience 1 visant à évaluer l'effet des turricules et de leur position spatiale sur les prélèvements d'azote par la plante.  | 77 |
| Figure 3 : Dispositif expérimental de l'expérience 2 visant à évaluer l'effet des turricules et de leur position spatiale sur les prélèvements d'azote par la plante.  | 78 |
| Figure 4 : Effet des différents traitements « split-root » sur : (A) le poids sec aérien en g; (B) la longueur totale racinaire en cm pour les plantes vivantes en fin d'expérience.   | 85 |
| Figure 5 : Effet des différents traitements « split-root » selon le compartiment sur la morphologie racinaire pour les plantes vivantes en fin d'expérience : (A) la longueur racinaire en cm ; (B) la surface racinaire en cm <sup>2</sup> ; (C) le volume racinaire en cm <sup>3</sup> .   | 87 |
| Figure 6 : Effet des différents traitements sur le pourcentage d'atome <sup>15</sup> N en % pour les plantes vivantes en fin d'expérience: (A) dans les sols témoins ; (B) dans les feuilles ; (C) dans le sol ; (D) dans les racines. Moyenne : ± erreur type. CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaM : 50% de turricules marqués et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre. | 88 |
| Figure 7 : Effet des différents traitements « split-root » sur : (A) la biomasse sèche aérienne (g) ; (B) la biomasse sèche racinaire (g) ; (C) la biomasse sèche totale (g) ; (D) le shoot root ratio ; (E) le taux de croissance des plantes.  | 90 |
| Figure 8 : Effet des traitements split-root sur le pourcentage de <sup>15</sup> N dans : (A) le sol des bacs d'incubation. Ctrl : sol témoin sans ajout de N ; Sol <sup>14</sup> N : sol avec ajout de <sup>14</sup> N ; Sol <sup>15</sup> N : sol avec ajout de <sup>15</sup> N ; (B) le sol en fin d'expérience.   | 93 |
| Figure 9 : Effet des traitements « split-root » sur : (A) la quantité d'azote totale dans les feuilles (mg); (B) la quantité d'azote totale dans les racines (mg) ; (C) la quantité de <sup>15</sup> N dans les feuilles (µg) ; (D) la quantité de <sup>15</sup> N dans les racines (µg) ; (E) la teneur en <sup>15</sup> N dans les feuilles (atom %) ; (F) la teneur en <sup>15</sup> N dans les racines (atom %).   | 95 |
| Figure 10 : Effet de l'intégrité des turricules sur la quantité de <sup>15</sup> N en µg : (A) dans les feuilles ; (B) dans les racines.   | 96 |

### Chapitre 4

|  |     |
|--|-----|
| Figure IV : Schéma représentant le dispositif split-root réalisé pour déterminer l'importance de l'âge et de la proportion de turricule dans l'effet positif des vers de terre sur les plantes.                      | 101 |
| Figure 1 : Experimental protocol for the production of casts of different ages.  | 109 |
| Figure 2 : Effect of the proportion of casts of different ages on the (a) aboveground biomass ; (b) plant height ; (c) number of tillers ; (d) number of leaves ; of <i>Brachypodium distachyon</i> L.               | 115 |
| Figure 3 : Effect of the age for four proportion on the: (a) Root length; (b) Surface area; (c) Root volume ; (d) Number of forks ; (e) Number of tips ; (f) Average diameter, for <i>Brachypodium distachyon</i> L. | 116 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 4 : Root length distribution in diameter classes for 75% of casts.....  | 118 |
| Figure 5 : Root length distribution in diameter classes for 46 days-old casts.....   | 119 |
| Figure 6 : Boxplot of the $^{15}\text{N}$ content ( $\mu\text{g}$ ) in the total biomass of <i>Brachypodium distachyon</i> L. as function of the proportion of 46 days-old casts .....   | 120 |
| Figure 7 : Relationship between the total $^{15}\text{N}$ content in the plant and the (a) aboveground biomass ; (c) belowground biomass ; (e) total dry biomass. Relationship between the percentage of atom $^{15}\text{N}$ in plant tissues and the (b) aboveground biomass ; (d) belowground biomass ; (f) total dry biomass ..... | 121 |

## ***Discussion générale et perspectives***

### **Synthèse des principaux résultats de la thèse**

|  |     |
|--|-----|
| Figure V : Schéma des principaux résultats du chapitre 1 .....                         | 131 |
| Figure VI : Schéma des principaux résultats du chapitre 2.....                         | 133 |
| Figure VII : Schéma des principaux résultats du chapitre 3 .....                       | 135 |
| Figure VIII : Schéma des principaux résultats du chapitre 4 .....                      | 137 |
| Figure IX : Schéma général des conclusions obtenus pour les différents chapitres ..... | 138 |

# Tableaux

## Résultats et discussions

### Chapitre 1

|  |    |
|--|----|
| Table I. Means $\pm$ s.e of split root treatments (C: absence of earthworms, E: presence) on plant aboveground, belowground, total biomasses and root length. ....   | 34 |
| Table II. Effects of earthworms on aboveground, belowground, total biomasses and shoot:root ratio for two plant species (rice or barley) in a split-root system (Treatments: a control without earthworm, a treatment with one earthworm in one single compartment and a treatment with one earthworm in each compartments) in a two-way ANOVA. ....       | 35 |
| Table III. Effect of split-root treatments (C: absence of earthworms, E: presence) on the length of fine roots (rice: 0-300 $\mu\text{m}$ ; barley: 0-200 $\mu\text{m}$ ) and thick roots (rice: 400-800 $\mu\text{m}$ ; barley: 300-800 $\mu\text{m}$ ). Only significant differences among means are reported in the “direction of effects” column. .... | 39 |

### Chapitre 2

|  |    |
|--|----|
| Table I. Effect of the cutting protocol, the growing media, their interaction and the compartment of the split-root system on root parameters. Df represents the degree of freedom. *** $p < 0.001$ ; ** $0.001 < p < 0.01$ ; * $0.01 < p < 0.05$ . ....                         | 60 |
| Table II. Ranking of the different treatments (growing media and cutting protocol) on the survival rate, the number of coronary roots and the resulting global ranking aiming at identifying the optimal method for split-root system with <i>Brachypodium distachyon</i> . .... | 68 |

### Chapitre 3

|  |    |
|--|----|
| Tableau I : Mortalité des plantes en fonction des différents traitements « split-root »....  | 84 |
| Tableau II. Résultats de l’ANOVA à deux facteurs (turricules et leur distribution) sur la biomasse aérienne, le rapport biomasse aérienne / biomasse racinaire et le taux de croissance ( $\Delta$ biomasse en 15 jours). .... | 91 |
| Tableau III. Résultats de l’ANOVA à deux facteurs (turricules et leur distribution) sur le poids sec, la longueur, la surface, le volume, le diamètre moyen racinaire et le nombre de ramifications. ....                      | 91 |

### Chapitre 4

|   |     |
|---|-----|
| Table I Effects of the proportion of cast and the age of soil and cast maturation on aboveground and belowground development, and growth of plants estimated in a two way ANOVA. ....               | 112 |
| Table II : Means $\pm$ s.e of treatments with different age (1, 4, 10, 22, 46 days old cast) and proportion of cast (0%, 25%, 50%, 75%) on plant aboveground, belowground and total biomasses. .... | 113 |

# Table des matières

|   |            |
|---|------------|
| <b>Avant-propos .....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>Synthèse bibliographique .....</b>   | <b>3</b>   |
| <b>1. Effet des vers de terre sur la croissance des plantes .....</b>   | <b>4</b>   |
| 1.1 Les vers de terre dans le monde .....   | 4          |
| 1.2 Les différents types de vers de terre et leurs conséquences sur le sol.....   | 5          |
| 1.3 Effet des vers de terre sur la croissance des plantes .....   | 8          |
| <b>2. Les mécanismes responsables de l'effet positifs des vers de terre .....</b>   | <b>9</b>   |
| 2.1 Amélioration de la disponibilité en nutriments .....  | 10         |
| 2.2 Les signaux.....  | 14         |
| <b>3. Problématique et objectifs .....</b>  | <b>17</b>  |
| <b>Résultats et discussions .....</b>   | <b>22</b>  |
| <b>Chapitre 1 : Étude de l'effet des vers sur la morphologie racinaire de deux espèces végétales (<i>Hordeum vulgare</i> L. et <i>Oryza sativa</i> L.) dans un système split-root .....</b> | <b>23</b>  |
| <b>Chapitre 2 : Optimisation d'un système split-root sur la plante <i>Brachypodium distachyon</i> L. ....</b>   | <b>46</b>  |
| <b>Chapitre 3 : Étude du couplage entre disponibilité de l'azote et signaux dans les interactions plantes- vers de terre-microorganismes.....</b>   | <b>69</b>  |
| <b>Chapitre 4 : Étude de l'effet de l'âge et de la proportion de turricules sur la croissance et le développement de <i>Brachypodium distachyon</i> L. ....</b>                             | <b>100</b> |
| <b>Discussion générale et perspectives .....</b>  | <b>128</b> |
| 1. Synthèse des principaux résultats de la thèse .....  | 129        |
| 2. Perspectives.....  | 139        |
| <b>Références .....</b>   | <b>144</b> |
| <b>Annexe .....</b>   | <b>160</b> |
| <b>Annexe 1 : Figure supplémentaire de la publication du Chapitre 4.....</b>  | <b>161</b> |

## *Avant-propos*

L'un des défis majeurs de ces prochaines années est de répondre aux besoins alimentaires d'une population mondiale croissante. La révolution verte survenue après la deuxième guerre mondiale a permis un accroissement de la productivité agricole notamment grâce à une intensification de l'agriculture et l'utilisation de céréales à hauts potentiels de rendements. Elle a permis d'éviter le retour des famines et a eu pour conséquence une croissance démographique de la population mondiale. Malgré ces effets bénéfiques, elle a également eu des effets délétères persistant encore à l'heure actuelle. En effet de grandes quantités d'herbicides et de pesticides ont été déversées sur les sols, conduisant à une contamination des nappes phréatiques, à la libération de gaz à effet de serre et à la dégradation des sols. Ces effets négatifs pouvant compromettre le système agricole actuel, un mode de gestion plus durable s'avère nécessaire.

Dans les années 1980, le concept d'agroécologie émerge. Il s'agit d'un modèle agricole alternatif qui permet d'utiliser les fonctionnalités offertes par les écosystèmes pour la conception de systèmes de production durables. Par définition il s'agit de « l'application de la science écologique à l'étude, à la conception et à la gestion d'agroécosystèmes durables » (Altieri, 1995). En agriculture ce concept se traduit par l' « ensemble de pratiques agricoles privilégiant l'autonomie des exploitations agricoles et l'amélioration de leur compétitivité en maintenant ou en augmentant la rentabilité économique, en améliorant la valeur ajoutée des productions et en réduisant la consommation d'énergie, d'eau, d'engrais, de produits phytosanitaires et de médicaments vétérinaires en particulier les antibiotiques » (<http://loidavenir.tumblr.com>). Aujourd'hui le monde est confronté aux mêmes enjeux que lors de la révolution verte mais cette fois avec une prise de conscience politique, sociale et culturelle sur l'importance de préserver l'environnement. C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse en essayant de comprendre les mécanismes à l'œuvre dans

l'amélioration de la croissance des plantes en présence de vers de terre. Ce cas d'étude permettra une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions entre plantes et organismes du sol, avec comme perspective à long terme une utilisation de ces organismes comme alternative aux intrants de synthèse en agriculture.



# **Synthèse bibliographique**

## **1. Effet des vers de terre sur la croissance des plantes**

### **1.1 Les vers de terre dans le monde**

Les vers de terre représentent la biomasse animale la plus abondante dans les écosystèmes terrestres (Lavelle et Spain, 2001). Ils sont apparus il y a environ 500 à 600 millions d'années. Les plantes ont donc toujours été soumises à leurs actions et ont dû s'adapter aux modifications induites par les vers de terre (Blouin, 2013).

Du début XIX<sup>ème</sup> siècle jusqu'à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, les vers de terre ont été considérés comme des nuisibles à éradiquer des sols. A cette époque un article paru dans le cours complet d'agriculture de l'Abbé François Rozier traite notamment de la manière de les éliminer. Cependant quelques naturalistes de l'époque semblent comprendre l'importance des vers de terre dans la fertilité des sols. C'est notamment le cas de Gilbert White qui en 1777 écrit dans une lettre adressée à l'Honorable Daines Barrington que « Les vers semblent être les grands promoteurs de la végétation, qui pourrait croître, mais difficilement sans eux, puisqu'ils creusent, perforent et allègent le sol et le rendent perméable aux pluies et les fibres de plantes en croissant sur un nombre infini d'agrégats de terre appelés turricules de vers de terre, qui étant leurs excréments est un engrais pour les graines et les plantes... Les jardiniers et les fermiers expriment leur haine des vers de terre ; les premiers car ils rendent leur marche difficile et leur donnent beaucoup de travail ; et les seconds car, comme ils le croient, les vers mangent leur blé vert. Mais ces hommes trouveraient que la terre sans vers de terre deviendrait vite froide, dure et vide de fermentation et en conséquence stérile. »

C'est avec les travaux de Charles Darwin en 1881 et la parution du livre « La formation de la terre végétale par l'action des vers de terre avec des observations sur leurs

habitudes » que les vers de terre retrouvent leur lettre de noblesse. Ce dernier a été le premier à intégrer les vers de terre comme facteur responsable de la formation des sols via l'accumulation de turricules et le brassage du sol.

## **1.2 Les différents types de vers de terre et leurs conséquences sur le sol**

Il s'agit d'organismes hétérotrophes, ayant un impact sur le sol mais également sur ses fonctions et délivrant un grand nombre de services écosystémiques (Blouin, 2013).

En 1971, Bouché identifie trois groupes fonctionnels de vers de terre : les épigés, les anéciques, et les endogés. Ces trois types de vers de terre se distinguent par une morphologie, une alimentation et un mode de vie différents. Les épigés sont retrouvés à la surface du sol au niveau de la litière. Il s'agit de vers de terre de petites tailles et fortement pigmentés qui se nourrissent de matières organiques en décomposition. Ils permettent la fragmentation de la matière végétale morte, mais également de la matière organique résiduelle présente à la surface du sol (Figure 1).

La classe des anéciques est constituée de vers de terre de grande taille à pigmentation brune vivant dans le sol. Ils se nourrissent d'un mélange de particules de matière organique et de sol. Ils prélèvent la litière superficielle puis l'entraînent dans leurs galeries verticales. Ces galeries sont réutilisées pendant un certain temps à la différence de celles des endogés. Leurs déjections sont déposées à la surface du sol et sont appelées « turricules » (Figure 1).

La classe des endogés regroupe des vers de terre de petite à moyenne taille. Ils vivent en permanence dans le sol et forment des galeries horizontales et verticales. Ils se nourrissent de la phase organo-minérale, de fragments de racines mortes mais également de la microflore

et mésofaune ingérées avec le sol. Les turricules sont déposés dans les galeries souterraines qui sont par conséquent très peu réutilisées (Figure 1).

Les endogés peuvent être divisés en deux groupes (Blanchart, 1999) :

- Les espèces compactantes qui en augmentant la densité du sol peuvent diminuer la porosité totale du sol.
- Les espèces décompactantes qui en diminuant la densité auront tendance à augmenter la porosité totale du sol.

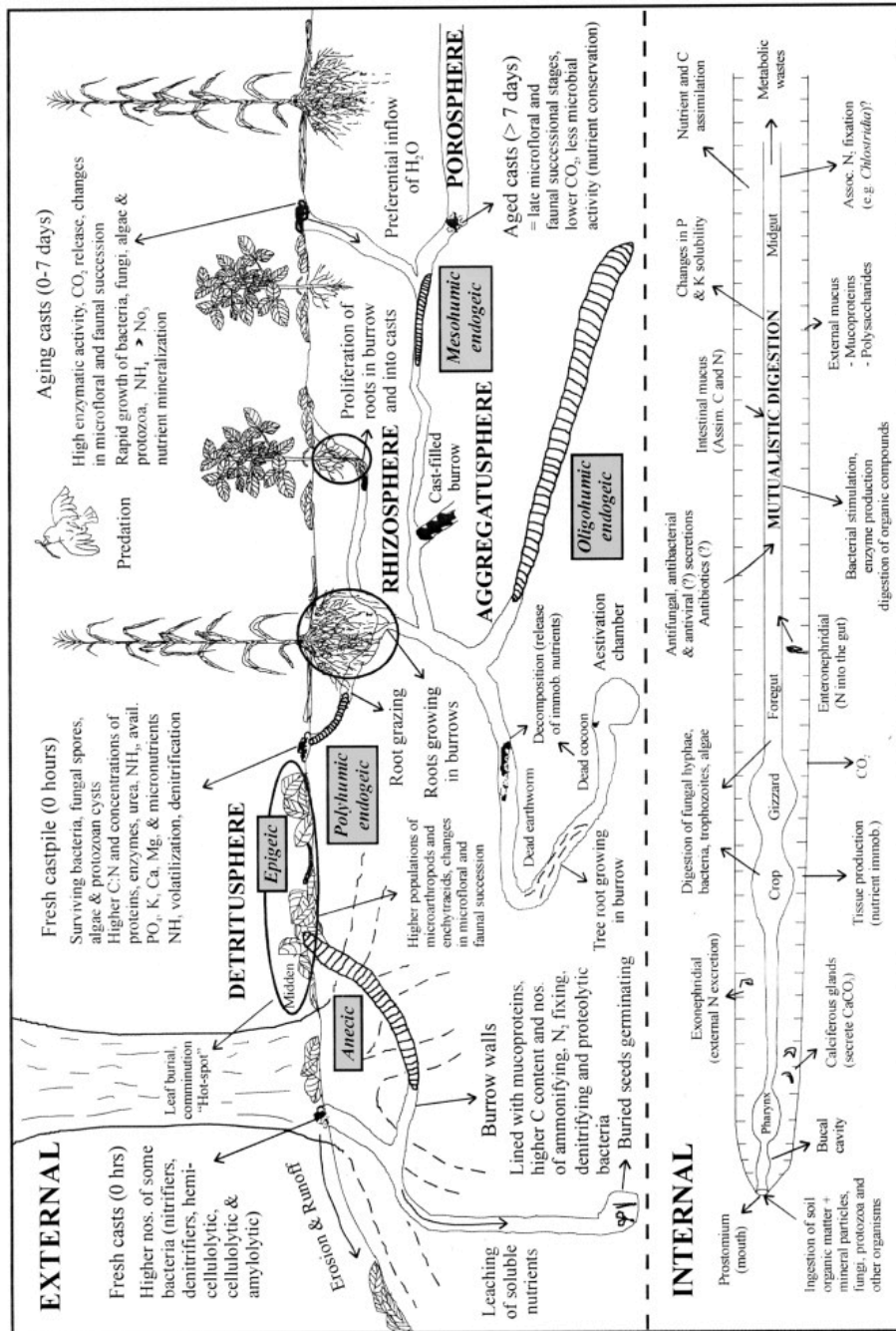


Figure 1 : Composantes externes (galerie, agrégats, turricules) et internes (en contact avec le corps du vers) de la drilosphère et de leur interaction avec d'autres domaines fonctionnels du sol. Cette interaction va affecter la dynamique de la matière organique ainsi que l'activité microbienne. (D'après Brown, 2000)

De par leur rôle de décomposeur et leur capacité à fragmenter la matière organique, les vers de terre sont essentiels dans la majorité des écosystèmes terrestres, chaque classe écologique ayant un rôle important dans l'enfouissement et la décomposition de la matière

organique. En effet la classe des épigés va permettre une fragmentation de la litière à la surface de sol, qui sera ensuite consommée et enfouie par les anéciques. La classe des endogées consommera à son tour cette matière organique permettant une dégradation et un enfouissement de celle-ci plus importante. C'est l'activité de ces trois classes de vers qui permet alors une bonne incorporation de la matière organique dans le sol.

Selon le groupe fonctionnel, l'influence sur la structure du sol ne sera pas la même ; elle sera tantôt bénéfique en augmentant par exemple la capacité d'échange cationique ou délétère via la formation de croûtes (Blanchart et al. 2004b).

L'importance des vers de terre et leurs rôles dans les écosystèmes terrestres ont été établis depuis de nombreuses années. Les vers sont des organismes ingénieurs, c'est à dire qu'ils « modulent directement ou indirectement la biodisponibilité de ressources pour d'autres espèces en provoquant des changements d'état physique des matériaux biotiques ou abiotiques » (Jones, 1994).

Les vers de terre sont l'un des principaux groupes d'invertébrés du sol capable d'améliorer les caractéristiques physiques chimiques et biologiques du sol (Blanchart et al. 2004a). Leur effet est d'autant plus important que le sol est sableux (Brown, 2004 ; Laossi, 2010). Brown explique cet effet par le fait que sur des sols plus riches en matière organique, l'effet des vers peut être dilué par des réserves en nutriments plus importantes.

### **1.3 Effet des vers de terre sur la croissance des plantes**

Depuis le XX<sup>ème</sup> siècle le nombre d'études relatives à l'impact des vers de terre sur la croissance des plantes a considérablement augmenté. Dans une revue, les résultats de 246

expérimentations en milieu tropical visant à étudier l'effet des vers sur la production primaire des végétaux ont été analysés et révèlent une augmentation de la biomasse aérienne des plantes dans 75% des cas en présence de vers de terre (Brown, 1999). Dans une moindre mesure, la biomasse racinaire est également augmentée dans 59% des cas tandis que la production primaire totale augmente en moyenne de près de 63%.

Une deuxième revue se basant sur 67 études en milieu tempéré a également montré l'effet positif des vers de terre survenant cette fois dans 79% des cas (Scheu, 2003). Seules 30 de ces études ont pris en compte la biomasse racinaire, sur laquelle on observe un effet plus variable des vers de terre avec une augmentation de la biomasse racinaire dans 50% des cas et une diminution significative dans 38% des cas.

Une méta-analyse plus récente effectuée sur 58 études révèle une augmentation du rendement de 25% en présence de vers de terre (van Groenigen et al. 2014). La biomasse aérienne et racinaire sont respectivement augmentées de 23% et de 20% (van Groenigen et al. 2014).

## **2. Les mécanismes responsables de l'effet positifs des vers de terre**

Plusieurs mécanismes ont été identifiés comme potentiellement responsables de l'effet positif sur les plantes (Brown, 1999). Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés à deux d'entre eux : l'amélioration de la disponibilité des nutriments pour la plante et la production d'hormones végétales probablement due à une stimulation des microorganismes. Il existe cependant trois autres mécanismes permettant une amélioration de la croissance des plantes en présence de vers de terre :

Un mécanisme physique : Les vers de terre en circulant dans le sol créent des galeries, et produisent des turricules qui modifient la structure du sol. Les vers de terre compactants et décompactants tantôt augmentent la densité du sol et tantôt la réduisent en influençant la porosité de celui-ci (Blanchart, 1999). De plus, il a été montré que la présence de turricules à la surface du sol permet une infiltration de l'eau cinq fois plus élevée qu'en absence de turricules (Casenave and Valentin, 1988). La teneur en eau est fortement liée à la porosité du sol et à sa perméabilité, ainsi les modifications physiques du sol observées en présence de vers de terre influence la capacité de rétention de l'eau dans le sol.

Un premier mécanisme écologique : de part leur présence, les vers de terre stimulent un certain nombre de microorganismes dont certains appelés PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) peuvent moduler les mécanismes de défense et d'infection des plantes (Puga-freitas et al, 2015) notamment en leur conférant une résistance systémique à large spectre contre plusieurs pathogènes végétaux (Meena, B., 2012 ; van Loon et al., 1998).

Un second mécanisme écologique : il a été montré que les vers de terre en se déplaçant dans le sol peuvent transporter certaines espèces microbiennes impliquées dans des relations symbiotiques avec les plantes (Gange 1993).

## **2.1 Amélioration de la disponibilité en nutriments**

Les vers de terre peuvent ingérer de grande quantité de sol. Dans une savane africaine, ils peuvent consommer la totalité de la couche supérieure d'un sol en deux ou trois ans (Lavelle et Spain, 2001). L'activité des vers est fortement liée à celle des microorganismes.



Les vers de terre sont impliqués dans la dégradation de composés tels que la cellulose, la lignine, les tanins ou encore des complexes humiques qui constituent une grande partie des ressources du sol (Brown, 2000). Cela est rendu possible par le fait que les vers de terre ont développé une relation mutualiste avec les bactéries du sol, décrite par la métaphore de « la belle au bois dormant » (Brown, 2000). Les communautés microbiennes (« la belle au bois dormant ») présentes dans le sol sont capables de dégrader la plupart des substrats organiques, mais sont généralement en phase de dormance car elles ont besoin de carbone pour se développer. Les vers de terre (« le prince ») grâce à la sécrétion d'un mucus (« le baiser »), confèrent aux bactéries les conditions nécessaires à leur activation et permettent la dégradation des composés organiques (Figure 2). On assiste alors à une dégradation mutualiste de la matière organique (Lattaud, 1998a ; Lattaud, 1998b, Brown, 2000).

Des études ont montré qu'en présence de vers de terre, une augmentation de la dégradation de la matière organique est observée (Inghan, 1985 ; Seeber, 2008). On assiste alors à une libération de nutriments notamment d'azote qui sera réutilisé par la plante.

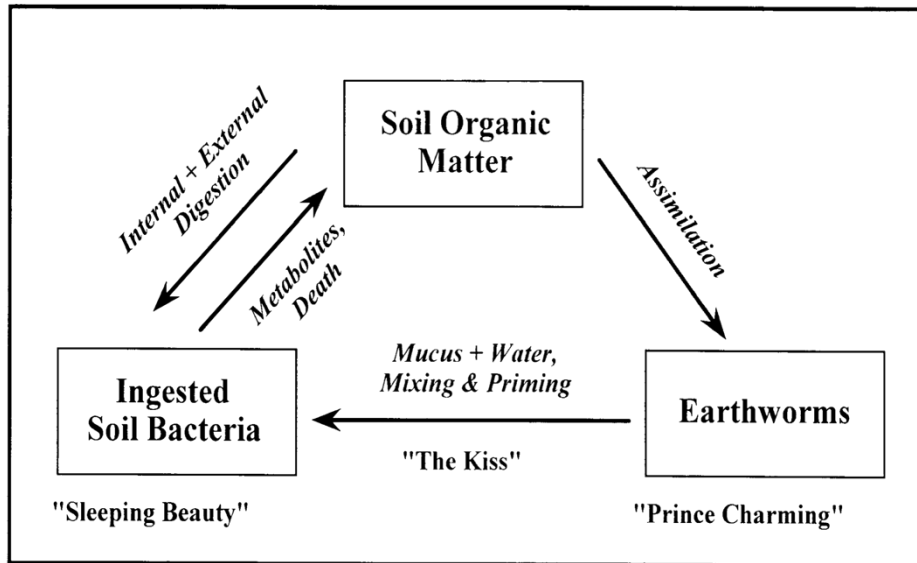


Figure 2 : Digestion mutualiste de la matière organique dans le tube digestif des vers de terre (modifié de Lavelle et al 1995, la métaphore de la "belle au bois dormant"). (Brown,2000)

Lee en 1985 puis Bityutskii en 2002 ont notamment observé une minéralisation accrue de l'azote en présence de vers de terre et cela grâce à la libération de certains métabolites comme de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), l'urée, les allantoïnes et l'acide urique au sein des turricules, de l'urine et du mucus (Lee, 1985 ; Bityutskii 2002).

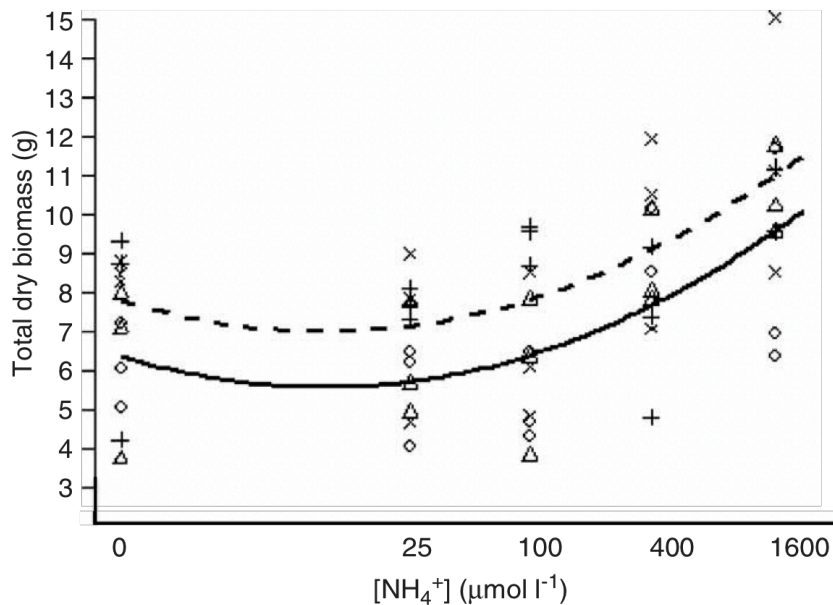
Une étude dans la savane de Lamto en Côte d'Ivoire montre que l'azote total relargué sous forme d'ammonium dans les déjections ou d'azote organique labile dans les vers de terre morts et le mucus est estimé entre 21,1 et 38,6  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ . La quantité totale d'azote minéral libéré par les communautés de vers de terre serait alors de 30 à 50  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$  (Lavelle, 2004).

Les déjections des vers de terre jouent également un rôle dans l'accroissement du taux d'azote minéral retrouvé dans les sols. James (1991) calcule que l'on retrouve dans les turricules de vers de terre une quantité d'azote minéral équivalente à 10-12% des besoins annuels d'une plante (James, 1991). L'azote minéral constitue l'élément limitant de la production primaire et les vers peuvent produire de 200  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$  à 1250  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$  de turricules en milieu

tropical (Blanchart, 2004a) ; cela pourrait expliquer en majeure partie leurs effets positifs sur la biomasse végétale.

Il a été montré que la dynamique de minéralisation dans les turricules varie au cours du temps (Lavelle et al. 1992 ; Aira et al. 2005). En effet, quelques rares études, en utilisant la technique de la spectrométrie proche infrarouge (NIRS), estiment que l'on peut distinguer les turricules du sol environnant jusqu'à 45 jours après leur production (Zangerlé et al. 2014). Les turricules libèrent du carbone, de l'azote minéral et du phosphore dans les deux premiers jours suivant leurs productions à un moment où l'activité des microorganismes est importante. A l'inverse, cette libération est moindre lorsque les turricules sont plus âgés et que l'activité des microorganismes est réduite (Lavelle et Martin, 1992).

Afin de déterminer l'importance de l'augmentation de la minéralisation de la matière organique en présence de vers de terre sur la croissance des plantes, une étude a été menée sur le riz (*Oryza sativa* L.) en utilisant différentes concentrations d'azote minéral (Blouin et al., 2006). Cette étude repose sur une hypothèse principale selon laquelle si l'augmentation de la disponibilité de l'azote par les vers de terre est bien le mécanisme principal expliquant l'amélioration de la croissance végétale, alors l'effet des vers de terre devrait être important quand le sol contient de faible teneur en azote et négligeable quand le sol est riche en azote. Cependant, dans cette expérience en laboratoire il a été montré que la présence du vers *Millsonia anomala* (Megascolecidae) a un effet constant quelles que soient les conditions du milieu en azote (Figure 3).



**Figure 3 : Biomasse sèche totale du riz en fonction de différentes concentrations de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en présence (trait plein) ou en absence (trait en pointillé) du vers de terre *M. anomala* (M. Blouin, Barot, and Lavelle 2006)**

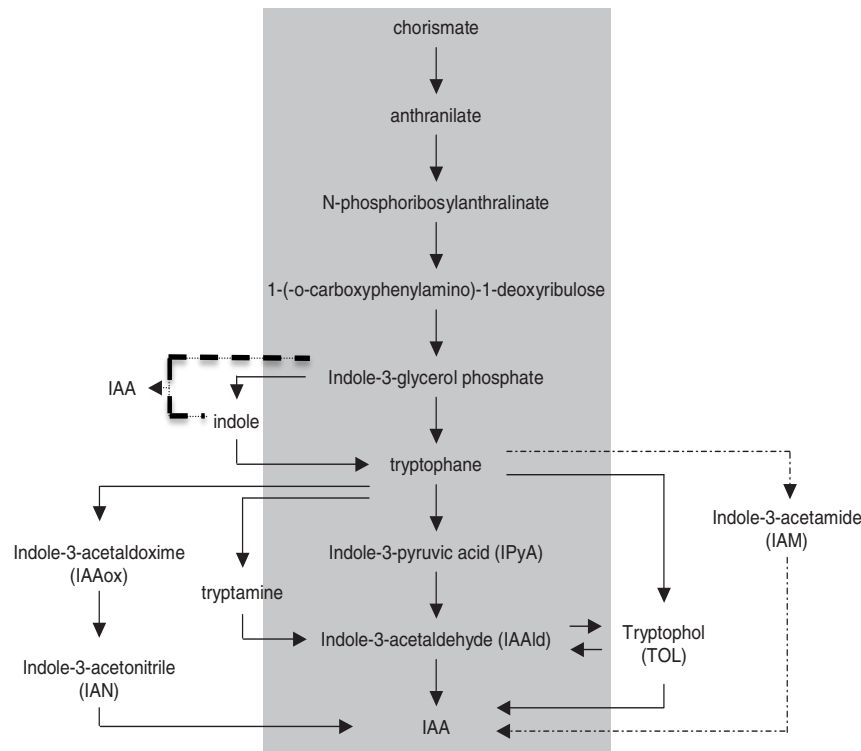
L'augmentation de la minéralisation de l'azote ne serait donc pas un mécanisme suffisant pour expliquer l'effet positif des vers de terre. Cela suggère que d'autres processus sont impliqués dans l'augmentation de la production primaire.

## 2.2 Les signaux

Les hormones de croissance jouent un rôle fondamental dans le cycle de vie d'une plante. Il s'agit de molécules organiques naturelles influençant l'ensemble des processus physiologiques de croissance, de différenciation et de développement. Un grand nombre de communautés microbiennes sont présentes dans les sols et produisent de nombreuses molécules influençant la physiologie des plantes telles que l'éthylène impliqué dans les mécanismes de défense de la plante ou l'auxine connue pour stimuler l'élongation et la

différenciation cellulaire. Cette dernière a été largement étudiée et sera développée dans le cadre de l'amélioration de la croissance des plantes *via* une production de molécules signal.

Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB) sont bien connues pour leur production d'hormones végétales en particulier l'acide indole acétique (AIA), molécule de la famille des auxines (Persello-Cartieaux et al., 2003 ; Hayat et al., 2010). Cette production se fait à partir de tryptophane grâce à une voie de biosynthèse qui leur est propre (Figure 4).



**Figure 4 : Voie de biosynthèse de l'auxine par les bactéries et les plantes à partir : du tryptophane (.....) et indépendamment du tryptophane (---). La voie de biosynthèse majoritaire chez les plantes est représentée par un rectangle gris (d'après Persello-Cartieaux, 2003).**

Cette molécule a été isolée dans les déjections de vers de terre (Muscolo et al., 1998; Quaggiotti et al., 2004), ce qui suggère que les vers de terre pourraient stimuler des PGPB qui amélioreraient la croissance végétale via l'émission d'AIA. Cette hypothèse a été corroborée par des études montrant que les vers de terre stimulent des PGPB cultivables productrices d'auxine, conduisant à une augmentation de la production d'AIA de 46% (Puga-Freitas, 2012a). Une étude menée sur *Micrococcus luteus*, bactérie considérée comme une PGPB, a montré que l'effet d'une inoculation de cette bactérie sur des paramètres morphologiques de la plante (surface foliaire, masse surfacique) n'est plus le même en présence de vers (Castellanos Suarez, 2014).

Une autre étude a révélé qu'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* L. dont les transporteurs de l'auxine (aux 1-7, axr 4-2) sont défectueux, a un phénotype nain qui est réverté lorsqu'il est mis en présence du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* (Figure 5) (Puga-Freitas et al. 2012b).

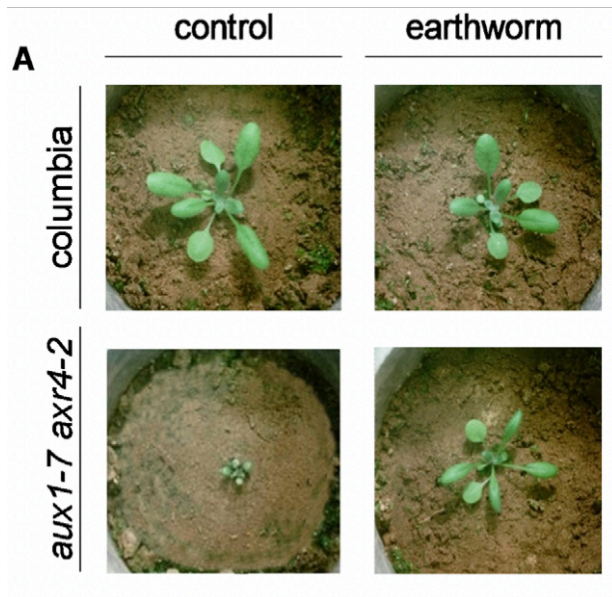


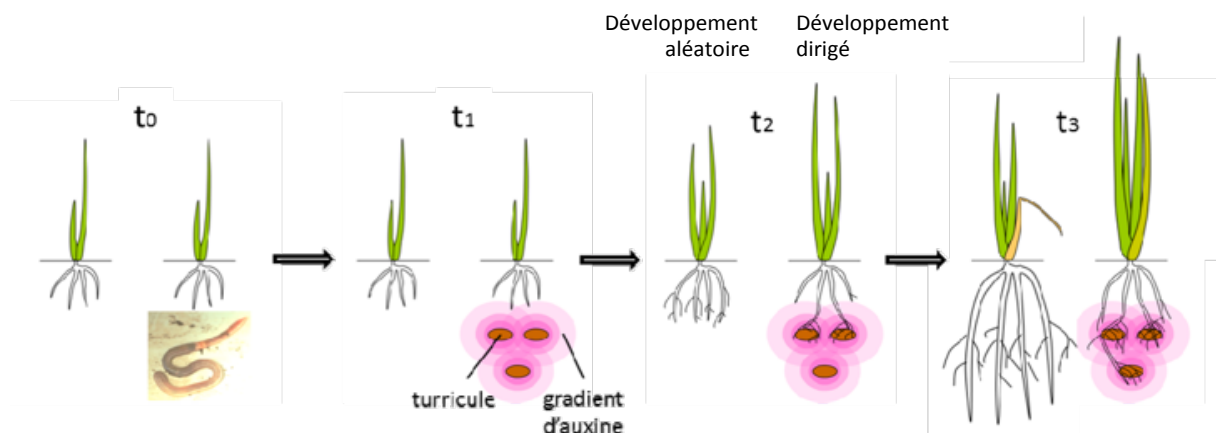
Figure 5 : Photographie d'*Arabidopsis thaliana* montrant l'effet du vers *Aporrectodea caliginosa* sur le mutant *aux1-7,axr4-2* (Puga-Freitas et al. 2012b).

Une analyse transcriptomique a également montré qu'en présence de vers, on observe une augmentation des transcrits d'un certain nombre de gènes impliqués d'une part dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques mais aussi dans les processus impliquant des hormones végétales telles que l'auxine et l'éthylène. C'est par exemple le cas pour le gène PBP1 (PINOID Binding Protein 1) connu pour être régulé par l'auxine (Puga-Freitas et al.2012b). L'ensemble de ces études montre bien qu'une interaction entre plante, microorganismes et vers de terre est responsable d'une libération de signaux permettant une amélioration de la croissance des plantes.

### 3. Problématique et objectifs

L'effet des vers de terre sur les plantes a été largement étudié au cours de ces dernières années. La présence et le déplacement des vers de terre dans le sol modifient profondément ses caractéristiques biologiques, physiques et chimiques. Ces modifications permettent dans

un grand nombre de cas, une amélioration de la croissance des plantes. Même si les mécanismes potentiellement responsables de cet effet bénéfique ont été identifiés, ils restent encore mal-compris. Ces mécanismes ont souvent été étudiés de façon indépendante alors que de nombreuses interactions existent dans le sol. Dans cette étude nous nous intéressons simultanément aux molécules signal et au flux de nutriments afin de mieux appréhender les processus mis en jeu dans l'amélioration de la croissance des plantes en présence de vers de terre. Notre hypothèse repose sur l'idée que le gradient d'auxine qui diffuse dans le sol depuis les turricules de vers de terre conduit à un développement racinaire privilégié en direction du turricule, qui aboutit à une prolifération accrue ou à une meilleure efficacité du prélèvement racinaire dans le turricule, où l'azote minéral est abondant (Figure 6).



**Figure 6 : Hypothèse sur le couplage entre l'émission de molécules signal et le prélèvement de nutriments**

Les plantes sont des organismes sessiles qui doivent répondre à un certain nombre de contraintes environnementales (température, eau, hétérogénéité des ressources dans le sol). Pour cela elles mettent en place des stratégies de croissance aussi bien au niveau racinaire qu'aérien. Si l'hypothèse d'un développement dirigé en présence de turricules est vérifiée, alors la plante exposée à des turricules pourrait mettre en place une stratégie permettant une



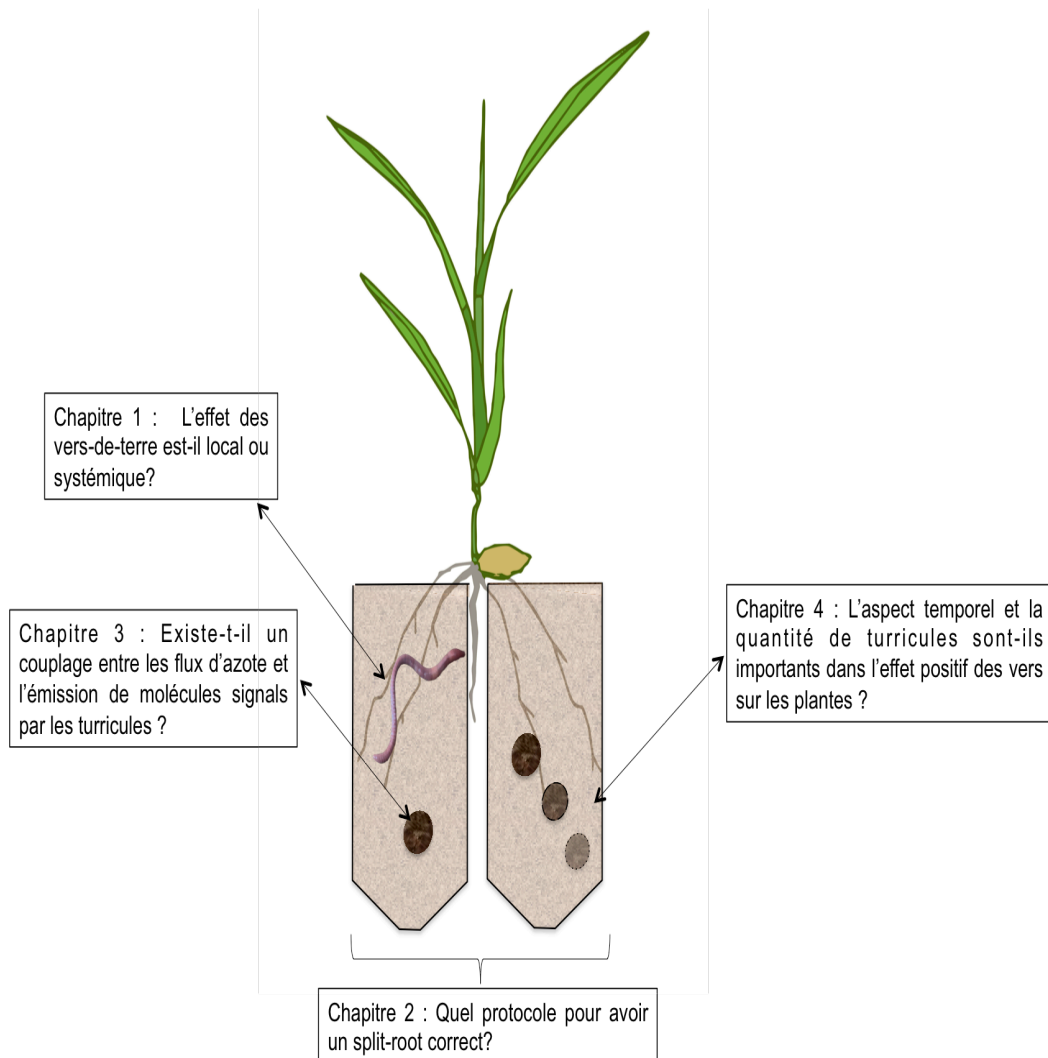
meilleure efficacité d'assimilation des ressources. Cette stratégie pourrait se traduire par une adaptation morphologique des racines en présence de turricules.

Dans le premier chapitre de la thèse, nous nous sommes intéressé à l'effet des vers de terre sur le système racinaire des plantes. Afin d'être en mesure d'observer un effet local au niveau des racines en contact avec les vers de terre ou les turricules, nous avons utilisé un système en split-root où les racines sont séparées dans deux compartiments distincts dont l'un contient des vers de terre et pas l'autre ( Figure 7)

La variabilité des résultats obtenus nous a amenés à travailler, dans le deuxième chapitre de la thèse, sur l'optimisation du dispositif split-root (Figure 7) car il n'existe aucune étude ayant pour objectif de réduire la variabilité induite par ce dispositif expérimental sur la croissance et la morphologie des plantes, condition nécessaire pour mettre en évidence l'effet statistiquement significatif de différents facteurs, dont les vers de terre. Au cours de ce travail, nous avons plus précisément étudié l'impact du substrat et de la coupe de différents organes de la plante sur la survie des plantes et leur développement racinaire.

La mise au point de ce système nous a permis, dans un troisième chapitre, de répondre à l'hypothèse selon laquelle un couplage entre flux de matières et molécules signal est nécessaire pour observer un effet positif des vers de terre sur les plantes (Figure 7). Dans un dispositif split-root optimisé, nous avons pu tester l'effet de la présence/absence de turricules selon que leur distribution était homogène ou hétérogène, avec l'idée que si la disposition spatiale des turricules est un facteur déterminant dans leur effet sur la plante, alors il existe une molécule signal qui en émane et qui permet à la plante d'avoir un prélèvement d'azote plus efficace (Figure 6). Dans ce dispositif expérimental, un marquage isotopique ( $^{15}\text{N}$ ) des turricules a été utilisé pour comparer les flux d'azote en provenance d'un sol témoin ou des turricules. Dans un quatrième chapitre, nous avons considéré l'aspect dynamique des

processus de minéralisation à l'intérieur d'un turricule et l'importance de leur abondance dans le sol pour expliquer l'effet positif sur les plantes (Figure 7), ce qui nous a amené à tester l'effet de l'âge et de la proportion de turricules marqués au  $^{15}\text{N}$  sur les plantes.



**Figure 7 :** Schéma représentant les différentes questions abordées dans les chapitres

## **Résultats et discussions**

**Chapitre 1 : Étude de l'effet des vers sur la  
morphologie racinaire de deux espèces végétales  
(*Hordeum vulgare* L. et *Oryza sativa* L.) dans un  
système split-root**

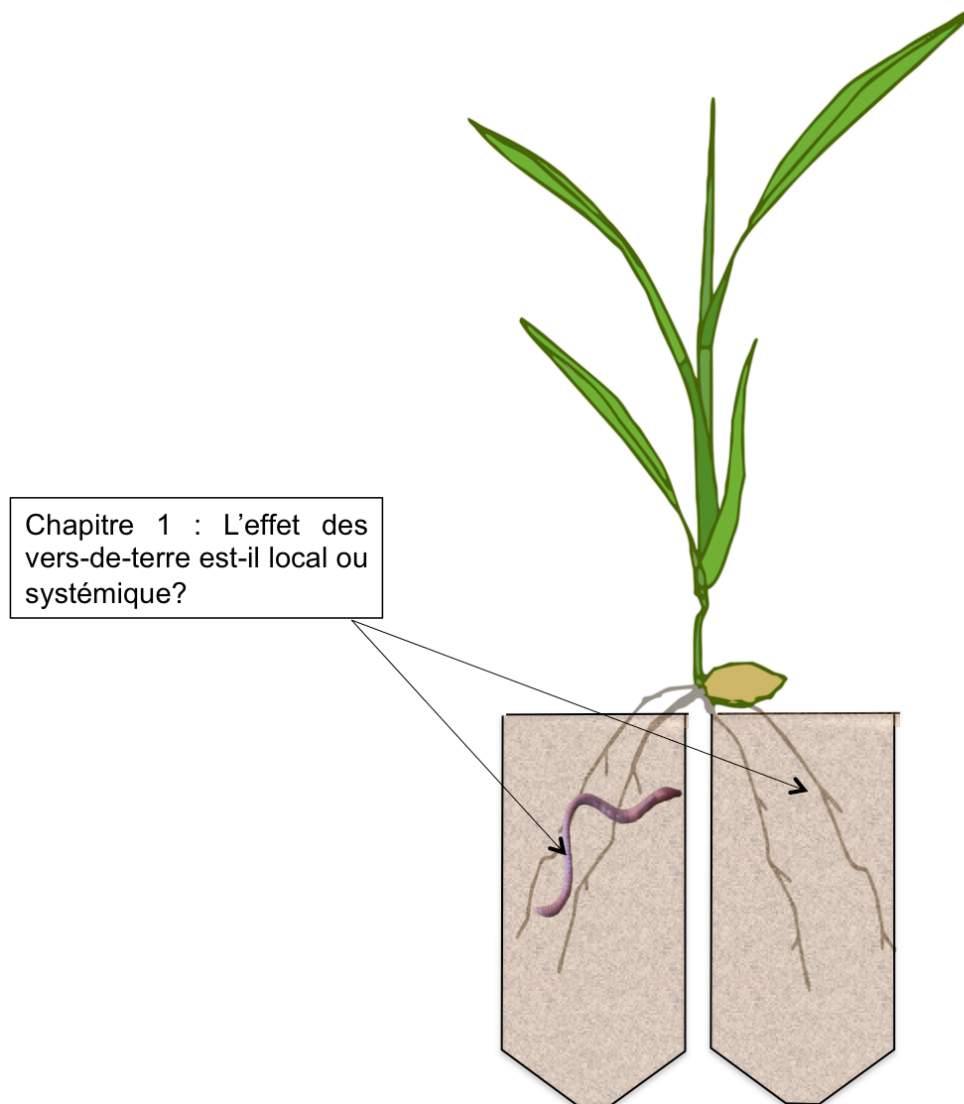


Figure I : Schéma du dispositif split-root utilisé dans le premier chapitre sur la plante *Brachypodium distachyon* L.

Les plantes sont des organismes sessiles qui doivent répondre à un certain nombre de contraintes environnementales. Elles sont capables de mettre en place des adaptations morphologiques à travers la prolifération de racines fines dans des zones riches en nutriments leur permettant une meilleure efficacité de prélèvement. Les vers de terre *via* leurs galeries et leurs déjections créent une hétérogénéité dans le sol qui pourrait conduire à des adaptations racinaires localisées ou à des effets systémiques. Dans cette première étude, nous avons voulu étudier l'effet des vers de terre sur le système racinaire de deux espèces végétales (*Oryza sativa* L. et *Hordeum vulgare* L.) à travers deux expériences indépendantes. Pour cela nous avons utilisé un système split-root permettant de séparer les racines dans deux compartiments distincts (Figure I) et nous avons réalisé trois traitements : (1) sans vers dans les deux compartiments (2) un ver dans un des compartiments (3) un ver dans chaque compartiment .

Les résultats de cette étude vous sont présentés ci-après et ont fait l'objet d'une publication dans le journal Plant Biosystems.

Earthworm effect on root morphology in a split-root system

C. AGAPIT<sup>1</sup>, A. GIGON<sup>1</sup>, M. BLOUIN<sup>2</sup>

1 Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris (UMR 7618), UPEC, Créteil, France

2 Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

Short title : Earthworms in split-root system

Corresponding author : Corinne AGAPIT

Address :

AgroSup Dijon

Département Agronomie Agroéquipements Elevage Environnement (2A2E)

26 Bd Docteur Petitjean

BP 87999

21079 Dijon Cedex, FRANCE

Email: corinne.agapit@gmail.com

Tel.: +33 (0)6 15 02 59 79

Keywords: earthworm; fine roots; root diameter; root morphology; root development; split-root system; thick roots

Total word count: 5575 words



## **ABSTRACT**

Plants respond to their environment through adaptations such as root proliferation in nutrient rich patches. Through their burrows and casts production in soil, earthworms create heterogeneity which could lead to local root adaptations or systemic effects.

With the aim to investigate the effect of earthworms on root system morphology and determine whether earthworm effect is local or systemic, we set up two independent split-root experiments with rice or barley, (i) without earthworm (CC), (ii) with earthworms in both compartments (EE) and (iii) with earthworms in one single compartment (CE).

Earthworms had an effect on belowground plant biomass. The relative length of thick roots decreased with an increasing abundance of earthworms. Some root diameter classes responded to earthworm number in a linear or curvilinear way, making simple conclusions difficult. We found no difference in root biomass or morphology between the two compartments of the split-root system in the CE treatment, but a positive effect of earthworm biomass on root biomass, volume, surface area and length at the whole plant level.

Results supported a systemic effect dependent on earthworm abundance. Modification of nutrient mineralization, soil physical structure and/or the concentration of signal molecules could all be responsible for this systemic effect.

## INTRODUCTION

Plants are sessile organisms, which have to adapt to their surrounding abiotic factors such as temperature, soil water content or heterogeneously distributed nutrients. The plasticity of root system seems to be under the control of local environmental signals combined with distant environmental cues (de Kroon *et al.* 2009). Studies on plant root development in heterogeneous environments have first been performed in *in vitro* culture. For example, nitrate concentration has a local effect on the lateral roots of barley and their elongation (Drew *et al.* 1973). Others experiments with *Arabidopsis thaliana* showed that lateral roots proliferate preferentially within rich soil patches, with nitrate acting as a signal molecule (Zhang & Forde 1998). Moreover, the intensity of the root system response to heterogeneity depends on the overall  $\text{NO}_3^-$  concentration in the environment, which means that a systemic control exists in addition of a local one (Blouin & Puga-Freitas 2011).

Other studies use experimental devices closer to the natural conditions in which plants have been selected, by studying root proliferation in organic matter patches when two plants compete (Hodge *et al.* 1999a Hodge *et al.* 1999b). In these situations, root proliferation is associated with an increase in nutrient uptake, making plant adaptation easier to understand (Hodge 2004, 2006, 2009).

In natural soils, organic matter is associated with mineral elements in aggregates. These aggregates can be produced physically through soil movements, or biologically through the effect of roots and soil fauna (Blanchart *et al.* 2004a; Pulleman *et al.* 2005; Velasquez *et al.* 2007). Among soil organisms that produce aggregates, earthworms are the most abundant, with biomass reaching  $2 \text{ t ha}^{-1}$  (Lavelle & Spain 2001). As archetypical ecosystem engineers (Jones *et al.* 1994), they can modify soil physical structure and resource availability for other organisms such as microarthropods (Loranger *et al.* 1998), bacteria (Monard *et al.* 2011),

AMF (Paudel *et al.* 2016), and plants (Laossi *et al.* 2009). The soil volume under their influence has been called drilosphere (Brown *et al.* 2000; Lavelle 2002), by analogy with the rhizosphere. Because earthworms feed on organic matter, they selectively ingest organic particles producing organic matter enriched casts (Barois *et al.* 1993). Furthermore, the mineralization rate is higher in fresh casts than in the bulk soil (Brown *et al.* 2000). Thus, earthworm casts are one of the most abundant natural nutrient rich patches. Physical, chemical and biochemical modifications of soil by earthworms induce major changes in soil ecosystem services (Blouin *et al.* 2013), especially on primary production. Indeed, in the presence of earthworms, plant aboveground production is increased in 75% of the cases in tropical ecosystem (Brown *et al.* 1999) and in 79% in temperate ecosystem (Scheu 2003). A recent meta-analysis shows that the size of this effect is +23% for aboveground biomass, +20% for belowground biomass and +25% for crop yield (van Groenigen *et al.* 2014). Furthermore, van Groenigen *et al.* (2014) showed that plant response to earthworms is highly species-specific.

In this study, we hypothesized that earthworms can increase plant growth through root proliferation in nutrient rich casts. To test our hypothesis, *Hordeum vulgare* L. and *Oryza sativa* L. seedlings were grown in a split-root system (Blackman *et al.* 1985; Davies & Zhang 1991; Larrainzar *et al.* 2014) with roots divided in two compartments with or without earthworms. This experimental design allowed us to determine (i) whether earthworm presence, abundance or biomass affected plant growth and root diameter and (ii) whether root system response to the presence of earthworms was localized (modification of roots only in the compartment with earthworms) or systemic, i.e. observable at the whole plant level (modification of root morphology even in the compartment without earthworms or/and modification of aboveground organs).

## **MATERIALS AND METHODS**

Two split-root experiments in controlled conditions were carried out using the same microcosms, soil and earthworm species, but different plant species and culture conditions.

### **Soil and earthworms**

Soil was collected in the research station CEREEP (Centre de Recherche en Ecologie Prédictive in Saint-Pierre-les-Nemours, France (N 48° 17' 14.48", E 2° 40' 34.64"). It is a poor cambisol (FAO, 2007) (total organic carbon content: 14.7 g kg<sup>-1</sup>, total nitrogen content: 1.19 g kg<sup>-1</sup>; pH: 5.22; CEC: 4.08 cmol kg<sup>-1</sup>) with a sandy texture (6.9% clay, 19.0% silt, 74.1% sand). This soil was sieved with a 2mm mesh in order to remove stones, roots and macrofauna, and then air dried at 25°C for a week. The soil water content was maintained at an average value of 80% of the field capacity during the whole experiment, by weighing the pots from two to three times a week, depending on plant development. Adults of the earthworm endogeic species *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) with an average fresh weight of 0.40 ± 0.02 (±s.e) were collected at the Institut de Recherche pour le Développement (Bondy, France). This species makes horizontal burrows (Bouché 1977) and produces casts with an higher density than ingested soil being considered as a compacting earthworm (Blanchart *et al.* 1997).

### **Split-root system**

Soil was placed in plastic pots (55 mm diameter, 100 mm height, equivalent to 23.7 cm<sup>2</sup> surface and 237 cm<sup>3</sup> volume). Two pots were fixed together to create the two compartments of the split-root system (A and B) (Blackman *et al.* 1985). There were one control and two treatments dependent on the presence/absence of one earthworm in each

compartment: one control with no earthworm (CC), the first treatment was characterized by the presence of one earthworm in the compartment B (CE) and the second treatment by one earthworm in each compartment A and B (EE). The resulting density of earthworms was about 420 individuals  $m^{-2}$  (or 168 g  $m^{-2}$ ) for the EE treatment and 210 individuals  $m^{-2}$  (or 84 g  $m^{-2}$ ) for the CE treatment. The density of the CE treatment falls in the range of 5–344 ind.  $m^{-2}$  found in clayed soil with amendments in agricultural fields (Lapied *et al.* 2009), but the density in the EE treatment was above natural densities. Twenty days after soil humectation, earthworms were introduced in microcosm and incubated for 18 days.

### **Plant growth conditions**

Preliminary experiments showed that there was a high level of variability in root system structure associated with the split-root system (death of roots or strong differences in development and growth); this led us to design experiments with a level of replication of  $n = 7$  and 11 per treatment for rice and barley respectively. Eighteen days after earthworm introduction, 15 days old plants were transplanted and grown for 15 days. The seminal root was cut to favor the growth of coronary roots, which were separated in equal proportion in the two compartments (two to three roots per compartment). In the experiment with *Oryza sativa* L., air moisture was maintained at  $70\% \pm 5\%$ , artificial light at  $300\mu\text{mol photons } m^{-2} s^{-1}$  during a 13 h photoperiod and temperature at 28/25°C day/night. In the experiment with *Hordeum vulgare* L., air moisture was maintained at  $75\% \pm 5\%$ , artificial light at  $300\mu\text{mol photons } m^{-2} s^{-1}$  during a 14 h photoperiod and temperature at 22/20°C day/night.

### **Morphological measurements**

At the end of the experiment, leaves were cut, oven dried for two days at 45°C and weighed. After washing roots carefully, morphology of each fresh root system was analyzed with a digital scanner (Epson Expression 10000 XL, Epson America Inc., San Jose, CA, USA) and images analyzed with the WinRHIZO software (WinRHIZO, V. 2007 pro, Regent Instruments, Quebec, Canada), following recommendations of sensitivity analyses (Bouma *et al.* 2000; Himmelbauer *et al.* 2004). Ten diameter classes were defined: 0–100, 100–200, 200–300, 300–400, 400–500, 500–600, 600–700, 700–800, 800–900, >900µm. To detect qualitative changes in root system structure regardless of the variations in root system size, we calculated absolute length per diameter class divided by the total root length, to obtain a relative root length proportion per diameter class. To summarize this information, we pooled data based on the absence of differences between compartments A and B, and gather diameter classes exhibiting the same kind of variation to calculate a ratio of fine/thick roots (Blouin *et al.* 2012). Once analysed roots were oven dried for 2 days at 45 °C and weighed.

### **Statistical analyses**

Statistical analysis was performed using the R software (Team, 2008). To determine whether earthworm effect was restricted to the compartment where they were present or affected the whole plant, we compared (i) plant biomass and root parameters describing root system fragments of the two compartments in the CE treatment in a one-way ANOVA. Because root biomass was averaged on the two compartments, it was necessary to take into account the additional source of variance due to the presence/absence of earthworms in CE<sub>A</sub> and CE<sub>B</sub>. Thus, we also performed a one-way multistratum ANOVA between the three treatments with the compartment A or B as a nested source of variability. In some analyses, data from experiments with barley and rice were taken together to quantify the relative

importance of the factors “plant species” and “earthworm presence”. To determine if earthworm presence or biomass affected plant growth and its morphology, especially root length in the different diameter classes, linear and non-linear regression models were applied to find the best relation between the final earthworm biomass or number of earthworms and dependent variables. To test the significance of a non-linear model, we confronted it to a null model in an ANOVA.

## **RESULTS**

### **Effect of earthworm presence in split-root treatments**

Earthworm inoculation was successful, as demonstrated by a final earthworm biomass ( $0.37 \pm 0.02\text{g}$ , mean $\pm$ s.e) very close to the initial one (see Materials & Methods subsection “Soil and earthworms”) and only 5.8% non-retrieved earthworms at the end of the experiments. Plant biomasses were slightly more variable in barley than in rice (Table I). Differences between treatments were not significant (one way multistratum ANOVA,  $P > 0.05$ , Table I).

**Table I. Means  $\pm$  s.e of split root treatments (C: absence of earthworms, E: presence) on plant aboveground, belowground, total biomasses and root length.**

|                            | Treatment       | Rice              | Barley           |
|----------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Aboveground<br>biomass (g) | CC              | 0.13 $\pm$ 0.01   | 0.26 $\pm$ 0.04  |
|                            | CE              | 0.16 $\pm$ 0.02   | 0.26 $\pm$ 0.04  |
|                            | EE              | 0.17 $\pm$ 0.03   | 0.25 $\pm$ 0.03  |
| Belowground<br>biomass (g) | CC              | 0.018 $\pm$ 0.003 | 0.17 $\pm$ 0.03  |
|                            | CE              | 0.017 $\pm$ 0.003 | 0.18 $\pm$ 0.03  |
|                            | CE <sub>A</sub> | 0.008 $\pm$ 0.003 | 0.089 $\pm$ 0.03 |
|                            | CE <sub>B</sub> | 0.009 $\pm$ 0.002 | 0.087 $\pm$ 0.02 |
|                            | EE              | 0.026 $\pm$ 0.008 | 0.17 $\pm$ 0.03  |
| Total biomass<br>(g)       | CC              | 0.14 $\pm$ 0.02   | 0.37 $\pm$ 0.07  |
|                            | CE              | 0.17 $\pm$ 0.02   | 0.39 $\pm$ 0.07  |
|                            | EE              | 0.20 $\pm$ 0.04   | 0.33 $\pm$ 0.07  |
| Root lenght (cm)           | CC              | 704 $\pm$ 82      | 3077 $\pm$ 493   |
|                            | CE              | 715 $\pm$ 58      | 3689 $\pm$ 616   |
|                            | CE <sub>A</sub> | 354 $\pm$ 75      | 1638 $\pm$ 436   |
|                            | CE <sub>B</sub> | 361 $\pm$ 102     | 2052 $\pm$ 399   |
|                            | EE              | 927 $\pm$ 165     | 3209 $\pm$ 465   |



When comparing the two compartments in the CE treatment for rice, we found a similar mean belowground biomass in compartments without earthworm and with earthworm ( $P = 0.97$ ). In the same way, no difference was observed for barley ( $P = 0.95$ ) (Table I). Similarly, there was no difference in root length between the two compartments  $CE_A$  and  $CE_B$ , neither for rice nor for barley ( $P = 0.96$  and  $0.50$  respectively). The presence of earthworm in one of the two compartments of a single plant was not responsible for a significant difference in the growth and development of the two root parts.

### Effect of earthworm presence, abundance or biomass on plant biomass and morphology

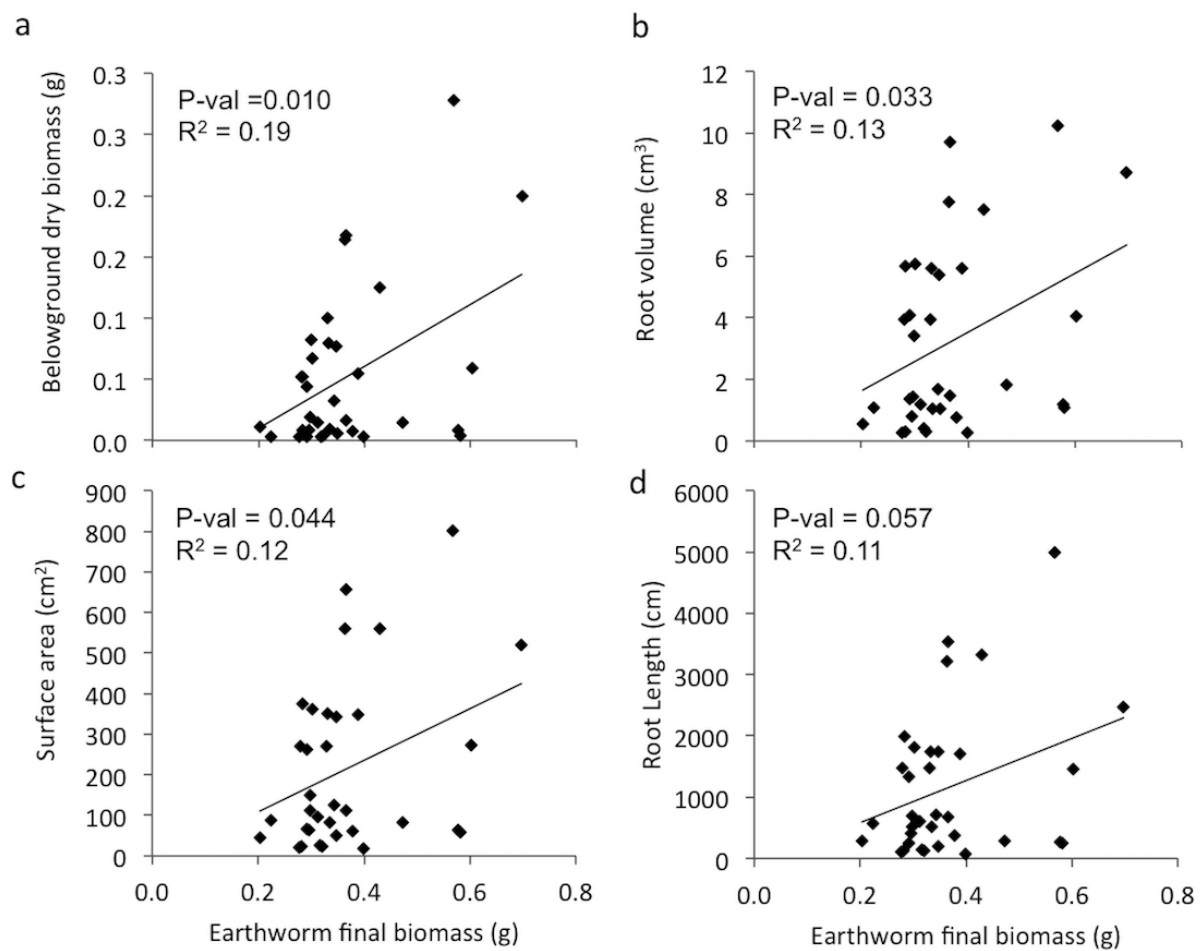
Aboveground, belowground, total biomasses and shoot:root ratio exhibited a species-specific response, but these variables were not affected by the presence of earthworms (Table II).

**Table II. Effects of earthworms on aboveground, belowground, total biomasses and shoot:root ratio for two plant species (rice or barley) in a split-root system (Treatments: a control without earthworm, a treatment with one earthworm in one single compartment and a treatment with one earthworm in each compartments) in a two-way ANOVA.**

|                     | Aboveground biomass |         |              | Belowground biomass |         |              | Total biomass |         |              | Shoot root ratio |         |              |
|---------------------|---------------------|---------|--------------|---------------------|---------|--------------|---------------|---------|--------------|------------------|---------|--------------|
|                     | Df                  | F-value | P-value      | Df                  | F-value | P-value      | Df            | F-value | P-value      | Df               | F-value | P-value      |
| Treatment           | 2                   | 0.18    | 0.83         | 2                   | 0.50    | 0.61         | 2             | 0.202   | 0.82         | 2                | 2.42    | 0.10         |
| Species             | 1                   | 12.59   | 9.37e-04 *** | 1                   | 60.09   | 5.11e-09 *** | 1             | 14.903  | 3.67e-04 *** | 1                | 23.60   | 2.63e-05 *** |
| Treatment * Species | 2                   | 0.24    | 0.79         | 2                   | 0.02    | 0.98         | 2             | 0.079   | 0.92         | 2                | 0.04    | 0.96         |
| Residuals           | 44                  |         |              | 34                  |         |              | 44            |         |              | 34               |         |              |

0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.'

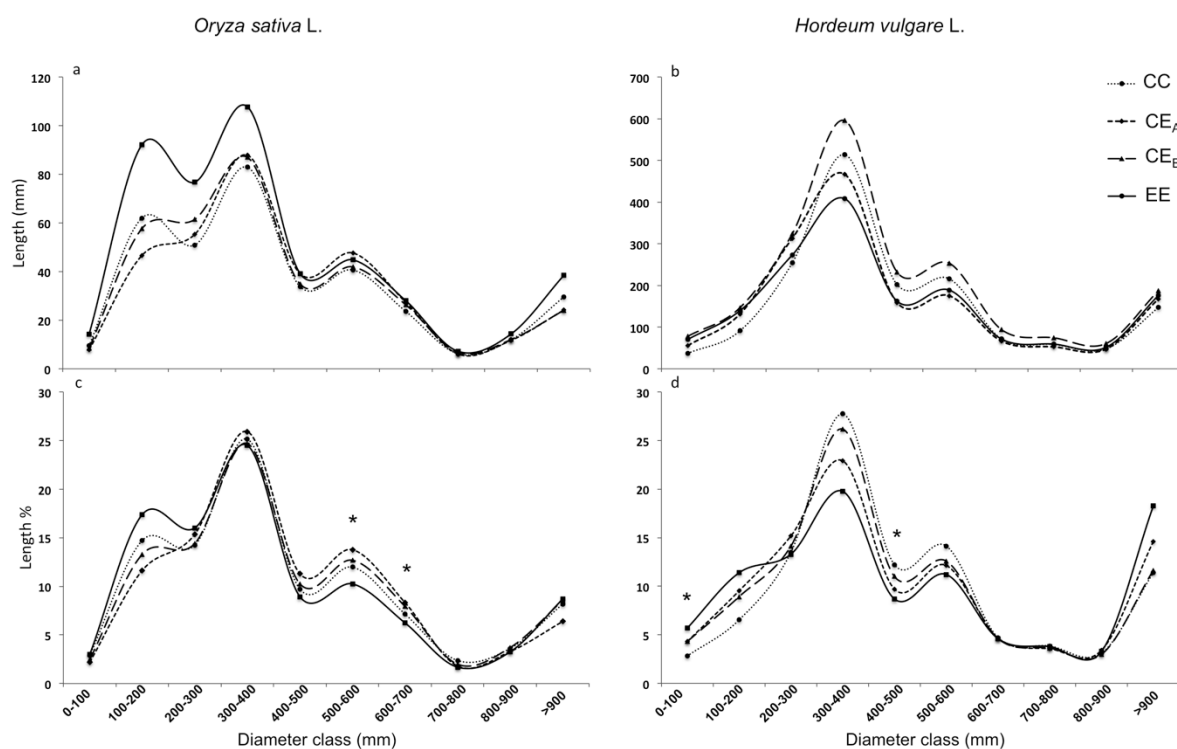
Regression analyses revealed that the number of earthworms (0 in CC, 1 in CE, 2 in EE) had no significant effect on aboveground, belowground, total biomasses. However, earthworm biomass at the end of the experiment had a significant positive effect on root dry biomass ( $P = 0.010$ ), volume ( $P = 0.03$ ) and surface area ( $P = 0.044$ ) (Figure 1a, b and c). Roots length was almost significantly affected ( $P = 0.057$ ) (Figure 1d).



**Figure 1 : Effect of earthworm biomass on root morphology: (a) Belowground dry biomass:  $y = 0.25x - 0.04$ ; (b) Root volume:  $y = 9.55x - 0.35$  (c) Surface area:  $y = 636.53x - 19.06$ ; (d) Root length:  $y = 3439.4x - 103.36$ ,  $n = 34$  split-root compartments from CE and EE.**

### **Effects of earthworms on root system morphology**

Root morphology showed differences between the two species analyzed (Figure 2a & b). The mean length of barley roots was higher than for rice roots, with a six-fold increase for the 300-400  $\mu\text{m}$  diameter class. Rice exhibited three hierarchical levels of roots (peaks for the diameter classes 100-200, 300-400 and 500-600  $\mu\text{m}$ ), whereas barley developed only two hierarchical levels (peaks at 300-400 and 500-600  $\mu\text{m}$ ); the  $>900$   $\mu\text{m}$  class was not considered as a “peak” because it had not the same diameter amplitude than the other classes. For each species, we did not find any significant differences when comparing the length of root in each diameter class between treatments with an ANOVA. Although not significant differences were detected between treatments, plants of the EE treatment showed a higher fine root length than control plants ( $<200\mu\text{m}$  for barley and  $<400$   $\mu\text{m}$  for rice).



**Figure 2 :** Root length distribution in diameter classes of (a) *Oryza sativa* L. in absolute value (cm); (b) *Hordeum vulgare* L. in absolute value (cm); (c) *Oryza sativa* L. in relative value (%) and (d) *Hordeum vulgare* L. in relative value (%) according to the different treatments. Means, n = 7 for *Oryza sativa* L. and n = 8 for *Hordeum vulgare* L.

We found that the qualitative development (expressed as root length in one diameter class reported on the total root length) of the two plant species was affected by the presence of earthworms (Figure 2c & d). For rice, treatments EE and CE<sub>A</sub> (compartment without earthworms) differed for diameter classes 500-600 and 600-700 (higher in CE<sub>A</sub>, P = 0.03 and 0.04 respectively) (Figure 2c). For barley, treatments EE and CC differed for diameter classes 0-100 (higher in EE, P = 0.04) and 400-500 μm (lower in EE, P = 0.04) (Figure 2d). In terms of general patterns, we observed that the proportion of root length in fine root classes was higher in the presence of earthworms (< 200 μm for barley and < 200 μm for rice); this was associated with a decrease in the root length proportion in the medium class (300-700 μm

classes for rice and 200-600  $\mu\text{m}$  classes for barley). The proportion of root length in the largest class ( $> 900 \mu\text{m}$ ) was generally increased in the presence of earthworms.

When dividing the diameter classes in two “fine” and “thick” classes (see Materials and Methods), we found that the length percentage of fine roots was not affected by the presence/absence of earthworms for both species (Table III). However, the length percentage of thick roots decreased with an increasing abundance of earthworms for both rice and barley. As a consequence, earthworms increased the fine/thick root ratio for rice ( $1.69 \pm 0.11$  in the CC,  $2.05 \pm 0.15$  in EE and  $1.50 \pm 0.09$  in CE,  $\text{mean} \pm \text{s.e.}$ ,  $P = 0.01$ ), with the same (non significant) trend for barley ( $0.43 \pm 0.11$  in the CC,  $0.76 \pm 0.16$  in EE and  $0.56 \pm 0.11$  in CE,  $\text{mean} \pm \text{s.e.}$ ,  $P = 0.19$ ) (Table III).

**Table III. Effect of split-root treatments (C: absence of earthworms, E: presence) on the length of fine roots (rice: 0-300  $\mu\text{m}$ ; barley: 0-200  $\mu\text{m}$ ) and thick roots (rice: 400-800  $\mu\text{m}$ ; barley: 300-800  $\mu\text{m}$ ). Only significant differences among means are reported in the “direction of effects” column.**

|                  | Rice    |          |                      | Barley  |         |                      |
|------------------|---------|----------|----------------------|---------|---------|----------------------|
|                  | F-value | P-value  | Direction of effects | F-value | P-value | Direction of effects |
| Fine roots (mm)  | 0.94    | 0.40     |                      | 0.47    | 0.63    |                      |
| Thick roots (mm) | 0.15    | 0.86     |                      | 0.34    | 0.71    |                      |
| Fine roots (%)   | 2.07    | 0.14     |                      | 2.79    | 0.073   |                      |
| Thick roots (%)  | 5.77    | 0.008 ** | CE > EE              | 3.54    | 0.038 * | CC > EE              |
| Fine/Thick       | 5.18    | 0.011 *  | CE < EE              | 1.7     | 0.19    |                      |

0 ‘\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Among diameter classes significantly affected by the different split-root treatments, we looked for an effect proportional to the number of earthworms (0 in CC, 1 in CE<sub>A&B</sub>, 2 in EE). In barley, the number of earthworms was responsible for a significant increase in the relative length of fine roots (0-100µm) and the best relation was linear ( $y = 1.14x + 2.56$ ,  $R^2 = 0.24$ ,  $P = 0.018$ ) (Figure 3a). In rice, the number of earthworms affected the relative length of medium/thick roots in the 500-600 µm class ( $y = -1.83x^2 + 2.8x + 11.72$ ,  $R^2 = 0.34$ ,  $P = 0.047$ ) and in the 600-700 µm class ( $y = -1.09x^2 + 1.79x + 6.86$ ,  $R^2 = 0.43$ ,  $P = 0.015$ ). The effect was hyperbolic (Figure 3b & c), which means that the highest root proportion in these classes was observed with one earthworm.

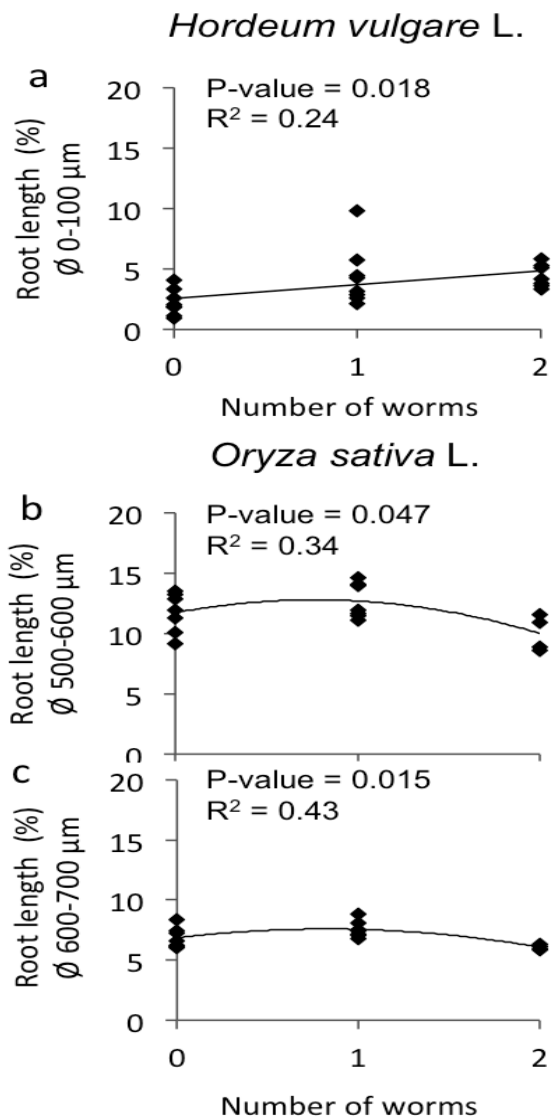


Figure 3 : Effect of the number of earthworms on the relative root length: (a) for barley, in the 0-100 µm diameter class ( $y = 1.14x + 2.56$ ); (b) for rice in the 500-600 µm diameter class ( $y = -1.83x^2 + 2,8x + 11.72$ ); (c) for rice in the 600-700 µm diameter class ( $y = -1.09x^2 + 1.79x + 6.86$ ),  $n = 7$  for rice and  $n = 8$  for barley.

## DISCUSSION

### Earthworm effect on plant growth

A recent meta-analysis showed that earthworms are responsible for an increase of 23% for aboveground biomass and 20% for belowground biomass (van Groenigen *et al.* 2014); specific results for rice and barley are provided only for aboveground biomass of + 35% for both rice (n = 32) and barley (n = 45). In our study, we did not observe any significant effect of the presence of earthworms on aboveground or total biomass for both species, but we found an effect of earthworm biomass on belowground biomass. Earthworm density is often proposed to explain divergent results. However, in our case, earthworm density was equal to 420 individuals m<sup>-2</sup> (or 168 g m<sup>-2</sup>) for the EE treatment and 210 individuals m<sup>-2</sup> (or 84 g m<sup>-2</sup>) for the CE treatment, which falls in the range of those observed in the meta-analysis. Densities of 100-199, 200-399 and >400 individuals were responsible for an effect size of respectively about +10%, +20% and +37%. We thus concluded that earthworm density was appropriate and comparable to data found in literature and meta-analysis. The absence of earthworm effect on plant growth could also be the consequence of a too high intra treatment variability induced by the split-root system. Indeed, intra-treatment variance was high in our experiment despite the 7 and 11 replicates per treatment (for rice and barley respectively) likely due to the difficulty to obtain equivalent root system parts in the two compartments of a split-root system. Statistical analyses are rarely applied on results from split-root systems and this experimental problem is rarely been highlighted. This stresses on the need for methodological studies aiming at optimizing split-root systems, for example by comparing



different cutting protocols (seminal roots, secondary roots, leaves...), using different substrates or plants with different ages. Finally, the discrepancy between our results and those of the meta-analysis might be due to a bias in the rough material used in the meta-analysis. Non-significant or negative results could in fact lead to author self-censorship or editor censorship. It is difficult to demonstrate censorship, excepted with bias analysis (funnel plots, tests of robustness...), which misses in van Groenigen *et al.* (2014) paper. In addition, the not investigated pot size and time of growth could also influence the earthworm effect on plant growth.

### **Earthworm impact on root system structure**

Plant morphology and plasticity vary in response to the many environmental factors (e.g. (Montagnoli *et al.* 2012, 2014) and particularly to the availability of nutrients (Drew *et al.* 1973; Forde & Zhang 1998; Hodge 2004). On the other side, earthworms are known for increasing the mineralization rate of soil organic matter and nutrient uptake by the plant (Parmelee & Crossley 1988; James 1991; Whalen & Parmelee 2000). It can thus be expected that root system morphology would be modified by the presence of earthworms.

Recent studies showed that the presence of earthworms had a negative effect on the biomass of fine roots (0-400  $\mu\text{m}$  class) for two winter wheat cultivars (Bertrand *et al.* 2015) and on the 0-100  $\mu\text{m}$  diameter roots of *Arabidopsis thaliana* roots (Castellanos Suarez *et al.* 2014). A negative impact of earthworms on the proportion of root biomass in the 200–400  $\mu\text{m}$  class has been reported for *Arabidopsis thaliana* (Castellanos Suarez *et al.* 2014). On the same species, Jana *et al.* (2010) observed a decrease in fine root biomass proportion (100-200

µm class) and an increase in thick roots (400-630 µm) in the presence of earthworms.

Conversely, in our study, earthworms were responsible for an increased in the relative length of fine roots and a decreased relative length of thick roots. The higher availability of resources in the presence of earthworms is often proposed to explain the lower investment of plants in root growth and surface dedicated to exchanges with the soil (Jana *et al.* 2010). However in some case this mechanism is not sufficient to explain the effect of earthworm on plant growth (Blouin *et al.* 2006; Laossi *et al.* 2010). Another mechanism could be the emission of signal molecules such as auxine-like compounds (Puga-Freitas, Abbad, *et al.* 2012a; Puga-Freitas, Barot, *et al.* 2012b), which can have huge effect on root cell elongation with consequences on root morphology (Taiz & Zeiger 2002), such as an increase of fine root proportion.

### **Is earthworm effect local or systemic?**

We did not find any difference in root biomass between the two compartments of the split-root system in the CE treatment. The relative root length in diameter classes also showed that root system had the same structure in CE<sub>A</sub> than in CE<sub>B</sub>. This means that the half of the root system directly exposed to earthworms undergone the same development and growth than the half not exposed to earthworms. Thus, earthworms did not induce local changes in root development and growth. However, earthworm biomass had a positive effect on root biomass, volume, surface area and length in a lesser extent (Figure 1) when data from rice and barley were pooled together. Despite the absence of difference between the two root system parts, a significant effect of earthworms was observed on root system. It can thus be deduced that earthworms had a systemic effect on plant growth and development.

Because earthworm abundance modified the relative length of roots in specific diameter classes in a linear (0-100  $\mu\text{m}$  class in barley) or hyperbolic way (500-600 and 600-700  $\mu\text{m}$  diameter classes in rice), we concluded that the systemic response of plants to earthworms was not an “all or nothing” response, which would have induced the same plant response in CE and EE. Indeed, it was more a “dose response”, dependent on the abundance of earthworms, as was observed in the seminal split-root system experiment of Davies and colleagues (1991) while discovering a partial stomatal closure in response to water deficit in one of the two soil compartments (Blackman *et al.* 1985; Davies & Zhang 1991). The bell-shaped curve is typical of a plant response to hormones such as indole acetic acid (IAA).

Taken together, our results support the idea that signal molecules are involved in the effect of earthworm on plant growth, as previously demonstrated. (Puga-Freitas, Abbad, *et al.* 2012a; Puga-Freitas, Barot, *et al.* 2012b).

From an ecological point of view, a perspective to this study could be to identify the most relevant ecological mechanism to explain plant response to earthworms, or to understand how these mechanisms are coupled. From a plant sciences point of view, it could be very interesting to identify the signalling pathways involved in plant systemic response to earthworms, from the transduction of the signal to plant adaptations to earthworm presence.

### **Acknowledgements**

We thank Christophe Espinasse, Elodie Da Silva and Guillaume Mirguet for technical help. This work was supported by grants from Région Ile-de-France, R2DS 2014-08 and by the French national program EC2CO-Biohefect-MicrobiEn AuxAzote.

## **Chapitre 2 : Optimisation d'un système split-root sur la plante *Brachypodium distachyon* L.**

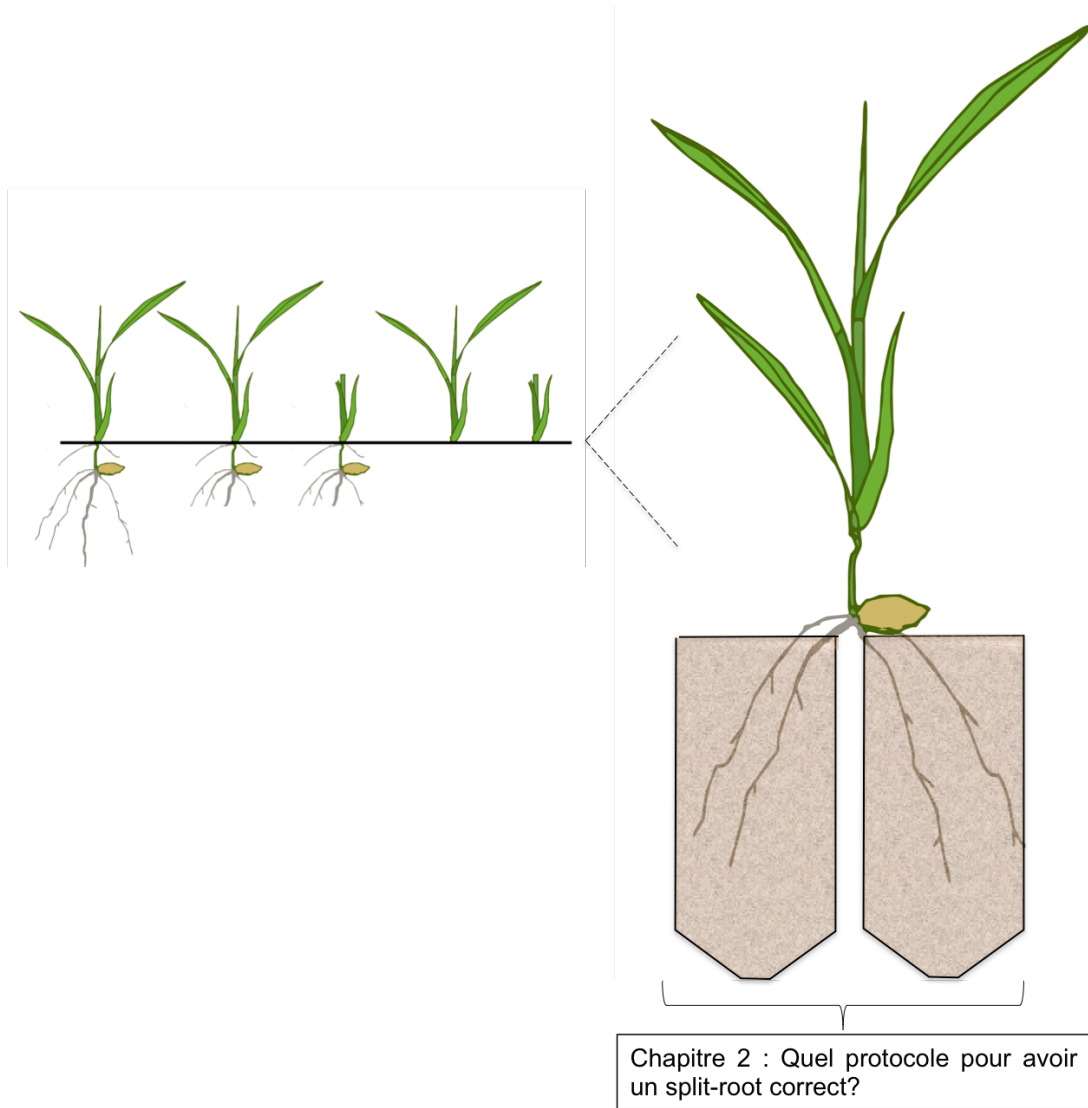


Figure II : Schéma des différentes coupes et du dispositif split-root utilisé sur la plante *Brachypodium distachyon* au cours de cette expérience méthodologique.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'optimisation du dispositif split-root, en recherchant la méthode la plus appropriée pour obtenir une survie et un nombre de racines maximales en fin d'expérimentation tout en limitant la variabilité entre les deux demi systèmes racinaires. Pour cela nous avons réalisé différents types d'ablations d'organes (feuilles ou racines) de *Brachypodium distachyon* (Figure II). Ces différents traitements de coupes ont été testés sur plusieurs substrats : en sol naturel ou en dispositif hydroponique. La croissance et la morphologie des plantes ont été étudiées et vous sont présentées ci-après.

Cette étude fait l'objet d'un article prêt à soumettre à *Annals of Botany*.

## TECHNICAL ARTICLE

Survival, shoot and root development of the model Poaceae *Brachypodium distachyon* to optimise split-root system.

Corinne Agapit<sup>1</sup>, Agnès Gigon<sup>1</sup>, Thomas Girin<sup>2</sup>, Luis Leitao<sup>1</sup> and Manuel Blouin<sup>3\*</sup>

Affiliations :

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris (UMR 7618), UPEC, Créteil, France

<sup>2</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France

<sup>3</sup>Agroécologie, AgroSup Dijon CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

Running title : Survival and development of *Brachypodium distachyon* in split-root system

\*corresponding author : Manuel Blouin

Professor of Ecology, AgroSup Dijon, UMR Agroécologie, 26 Bd Docteur Petitjean, BP 87999, 21079 Dijon Cedex, France

Phone : +33 (0)3 80 77 27 35, Mobile: +33 (0)6 18 46 90 05

Email : manuel.blouin@agrosupdijon.fr

**Background and Aims** Split-root system has been developed

to better understand plant response to environmental factors, by exposing to separate parts of a single root system to heterogeneous situations. Surprisingly, there is no study attempting to maximize plant survival and growth through the statistical comparison of different experimental protocols. Here we explore different experimental protocols to optimize split-root systems on *Brachypodium distachyon*, a model plant for Poaceae and cereals, well-studied for nutrient acquisition.

**Methods** As split-root systems require seedlings with developed roots to be separated in the two compartments, we tested the effect of hydropony or soil as growing media, with or without change of media when roots are separated in the two compartments. The cutting (partial or total) of roots and/or shoots was also tested in different treatments as it could have an influence on plant access to energy and water and consequently on survival and growth.

**Key Results** Growing plants in soil before and during the split-root system was the best condition to get a high survival rate, number of coronary roots and growth. Cutting the whole root system was the best option to have a high root biomass and length at the end of the experiment. However, cutting part of shoots was detrimental for plant growth, especially at belowground level.

**Conclusions** In well-watered conditions, a plant submitted to a transfer in a split-root system is mainly lacking energy to produce new roots thanks to photosynthesis or adaptive autophagy, not water or nutrients.

Key-words: *Brachypodium distachyon*; coronary roots; hydropony; plant growth and development; root diameter classes; root system morphology; soil; split-root system; survival rate.



## INTRODUCTION

The split root system is an experimental device in which roots are divided in several compartments (generally two). Because this device allows having separate and independent soil compartments, it makes possible to apply different experimental treatments to equivalent parts of a single root system. As a consequence, it becomes possible to determine if a local treatment, applied only in one compartment, can have either (1) a local effect restricted to this compartment, or a global effect, which can be observed (2) at the shoot level or/and (3) at the root level in the other compartment. In cases (2) and (3), the local treatment would be said to have a systemic effect because it propagates through the plant.

Split root system has first been used on maize to study the physiological mechanisms involved in plant response to water deficit (Blackman & Davies 1985). By dividing the root system in two parts with or without water supply, the authors assumed that the plant could still have a sufficient amount of water at the shoot level. Because they observed stomatal closure despite a relatively good hydric status of the plant, they concluded that the plant was able to sense the water deficit in the dry compartment and that a biochemical signal was transmitted up to the leaves, allowing a decrease of water loss by stomatal closure. This was the first step to identify the role of a plant hormone, namely abscisic acid, in the regulation of water losses. The split-root experimental system allowed improving our knowledge on the mechanisms involved in adaptation to water deficit (Saradadevi 2014). Since its use by Davies, the split root system has still been utilized to study the water status of plants. But over years, its use as been extended to other scientific questions: phytoparasitism and the determination of effectiveness of biocontrol (He 2002; Pozo 2001; Gómez-Lama Cabanás 2017), accumulation and distribution of heavy metals in plants, with consequences in terms of phytoremediation (Qin 2013; Feller 2015), resistance and tolerance to salinity to understand

the distribution of plants in mangroves (Reef 2015), nitrogen uptake by plants (Schortemeyer 1993; Ohlen 1994; Mounier et al 2014; Girin et al 2010) or the interactions with soil organisms (Hidalgo 2017; Larrainzar 2014; Agapit et al., 2017).

In our study, we were interested in optimizing the split-root system for the model plant *Brachypodium distachyon*. Indeed, these last years, *Brachypodium distachyon* has been proposed as a model plant for the Poaceae family, which gathers the cereals cultivated worldwide (Draper 2001 ; Garvin 2007 ; Girin 2014). This phylogenetic position is strategic because many cereals are polyploid and thus difficult to study from a molecular and genetic point of view. In addition, *Arabidopsis thaliana*, the main dicotyledonous model plant, has a root system developed from the tap root, very different from the fibrous root system of monocots made of adventitious roots. Because of its short life cycle and small genome, *Brachypodium distachyon* is particularly convenient species for functional genomics. A bank of mutants has been developed and this species is now well documented in terms of mineral nutrition, in an agricultural context in which the use of fertilizers is reconsidered due to negative potential impact on the environment.

The optimization of a split root system allowing differential treatments of root system parts for the model plant *Brachypodium distachyon* could thus open many new opportunities for research in plant sciences. However, to our knowledge, there is no study focusing on optimization of an experimental protocol to get uniform plants with well-developed roots in split-root systems. In this purpose, we set up an experiment testing different experimental protocols to optimize the split-root system on *Brachypodium distachyon*. This can be done by testing different plant growing media before and during the split-root system. In particular, the use of hydropony mediums could favour the production of roots and avoid damages when transferring plant to the split-root system. An alternative hypothesis could be that soil

provides all required nutrients and allow the plant foraging for specific limiting nutrient in a buffered environment, which is not the case for hydropony (Blouin et al., 2012). Another factor could have a great importance in promoting the survival and development of plants in split-root systems : the cutting of roots and shoots. As the plant undergoes a major stress by being removed from its initial belowground environment during the transfer to the split-root system, root cutting could have either a negative effect due to the decreased potential to uptake water and nutrients, or a positive effect due to the stimulation of root growth through an adaptive response. Moreover, shoot cutting could also be responsible for a positive effect by reducing the leaf area and thus the loss of water by transpiration, or a negative effect due to an energy shortage associated with a decreased potential for photosynthesis or adaptive autophagy (Mizushima and Komatsu, 2011).

The main objectives of this study were to determine the best growing culture conditions (soil or hydropony) and the relevance to cut roots and/or shoots to increase the plant survival rate, the number of new roots (coronary roots in particular) and to lower the variability between root compartments. Indeed, the success of this split-root system experiment relies on the ability to minimize the variance of root development due to the experimental device (Agapit et al. 2017), to highlight the effect of experimental factors.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Plant growing media**

Two growing media were tested during our experiment. The first one was a modified Murashige & Skoog hydroponic solution (3mM CaCl<sub>2</sub> ; 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 2mM MgSO<sub>4</sub> and

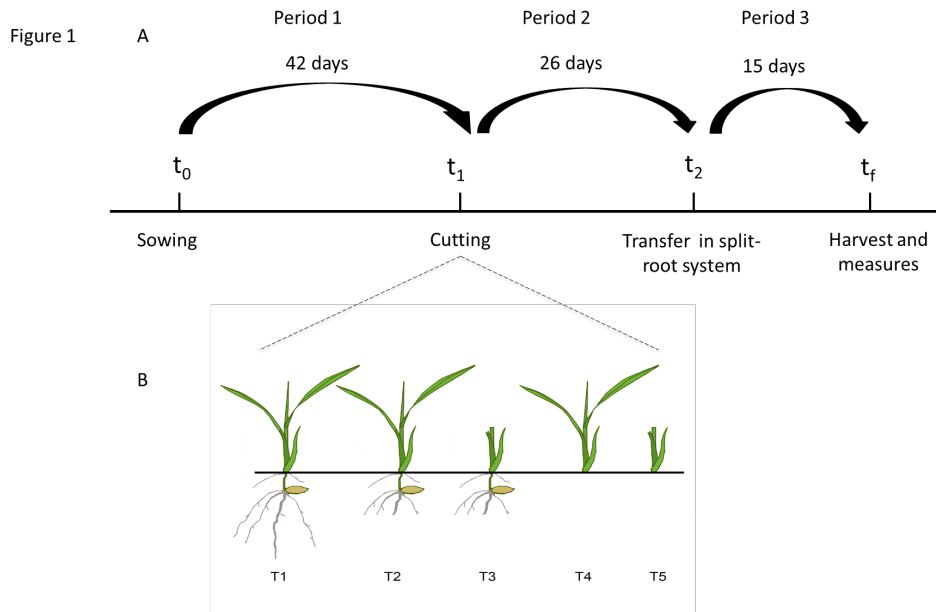
7mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) and micronutrients (0.05 $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  ; 0.05 $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  ; 50 $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$  ; 50 $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  ; 2.5 $\mu\text{M}$   $\text{KI}$  ; 50 $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  ; 0.5 $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  ; 15 $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ). The second growing medium was a natural soil classified as cambisol, with the following properties : 14.7 g  $\text{kg}^{-1}$  of total organic carbon content, 1.19 g  $\text{kg}^{-1}$  of total nitrogen content; pH: 5.22; CEC: 4.08  $\text{cmol kg}^{-1}$  and a sandy texture with 6.9% of clay, 19.0% of silt and 74.1% of sand. This soil was collected in the research station CEREEP (<http://www.foljuif.ens.fr/> , Saint-Pierre-lès-Nemours, France), air dried at 25°C for a week and sieved with a 2mm mesh size. During the experiment, soil was watered with desionisate water.

### **Plant growth conditions**

*Brachypodium distachyon* (varieties Bd21), which belongs to the Poaceae family, is considered as a model plant (Girin, 2014 ; David Garvin, 2007). Seeds were stratified for three days in a dark cold chamber at 5°C, dehulled and germinated for three days in the dark at 22°C/20°C day/night on a wet paper. After germination ( $t_0$ ), seedlings were transferred in a growth chamber (S10H, Conviron, Canada) where air moisture was maintained at 80±5%, artificial light at 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  during a 10h photoperiod and a temperature 22°C/20°C day/night.

### **Experimental protocol and split-root system**

After germination, plants were transferred at  $t_0$  either in soil or hydroponic solution for 42 days (period 1 in Figure 1).



**Figure 1. (A) Different steps in the timeline of the experiment. Plant were germinated and transferred in their growing media (hydropony or soil) at  $t_0$  for 42 days. At  $t_1$ , they were gently extracted from their growing media and the different cutting protocols were applied (see B). Seedlings were reintroduced in their original growing media for 26 days to obtain a maximal number of coronary roots. At  $t_2$ , plants were once again extracted from their growing media. The number of coronary roots was counted and roots were distributed in equal number in the two compartments of the split-root system, for a growing period of 15 days. All measurements except the count of coronary roots were performed at  $t_f$ . (B) The different cutting protocols. At  $t_1$  (see A), different cutting protocols were tested to determine which one was associated with the highest survival rate and highest number of coronary roots which should favour plant development in the split-root system. T1: control without any cut; T2: half of the roots cut; T3: half of roots and shoots cut; T4: whole root system cut; T5: half of shoots and the whole root system cut.**

At  $t_1$ , we performed five different cutting protocols on plants (Figure 1B). The first treatment (T1) is a control with a plant without any cut; in the second treatment (T2), plant roots were cut at the half of their maximal length; in the third treatment (T3), root and shoot parts were cut at the half of their maximal length; in the fourth treatment (T4), the whole root system was cut; in the last treatment (T5), the whole root system was cut and shoots were cut at the half of their maximal length (Figure 1B).

The split root system consisted of two 50 ml tubes of 28 mm diameter and 114. mm height, linked with an adhesive band. Each compartment was filled with hydroponic solution or soil substrate. Half of the plants grown in a hydroponic solution was transferred to a

hydroponic split-root system (hh) and the other half to a soil split-root system (hs). Half of the plants grown in the natural soil was transferred to a soil split-root system (ss) and the other half to a hydroponic split root system (sh). Each of the five cutting treatments had six replicates *per* growing media, for a total of 120 experimental units.

### **Plant growth and morphology measurements**

After 83 days of experiment ( $t_0 \rightarrow t_f$ ), plant height was measured and the number of leaves was counted. Shoots were cut at the soil level oven dried for two days at 45°C and weighed to get the dry biomass. After washing, roots were analysed using a digital scanner (Epson Expression 10000 XL, Epson America Inc., San Jose, CA, USA) coupled with the WinRhizo software (WinRHIZO, V. 2007 pro, Regent Instruments, Quebec, Canada). Root axes were classed in ten diameter classes (L0: 0–100, L100: 100–200, L200: 200–300, L300: 300–400, L400: 400–500, L500: 500–600, L600: 600–700, L700: 700–800, L800: 800–900, L900: >900 $\mu$ m) to determine the length, surface, volume, number of tips, forks and average diameter in each diameter class, for each compartment of the split-root system. The relative root length per diameter class was calculated to observe qualitative changes in root structure by dividing the absolute length in a specific diameter class by the total root length. Then, roots were oven dried for two days at 45°C and weighed.

### **Statistical analyses**

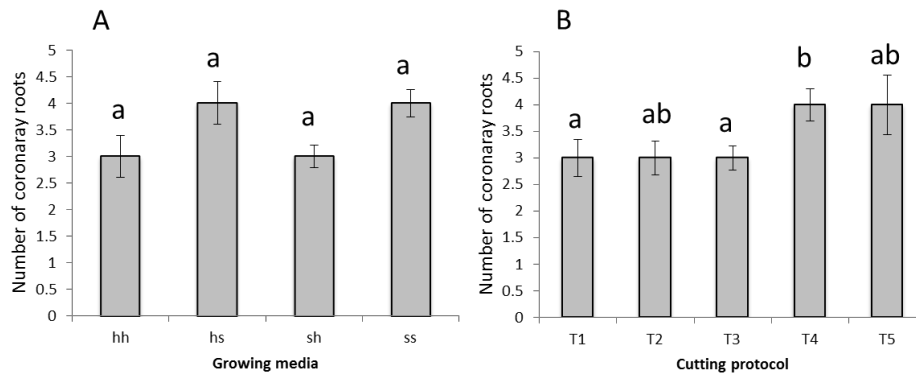
The R software (R Core Team, 2016) was used for the statistical analyses. Chi-squared test of Pearson was used for the survival analysis. The number of coronary roots just before transfer to the split-root system (at  $t_2$ ) was analysed in a two-ways ANOVA with the cutting

protocol and the growing media as factors, as well as parameters associated with shoot morphology. Parameters describing root morphology were analysed in a multistrata ANOVA, with the cutting protocol and the growing media as factors and the compartment as an error term. Means of the different treatments were compared with the “Honest Significant Differences” test of Tukey ( $\alpha = 5\%$ ). In order to assess the variation in root morphology due to the split root device, root parameters were analysed in a three-ways ANOVA with the cutting method, the growing media and the root compartment (A or B, defined arbitrarily) as factors. This allows determining the percentage of variance associated with the split-root device from the sum of squares.

## **RESULTS**

### **Number of coronary roots**

The ANOVA revealed an effect of the growing media on the number of coronary roots of *Brachypodium distachyon* ( $P = 0.03$ ). However the comparison of means did not show any difference between growing media because of the variation due to the cutting treatment (five kind of cut per growing media) (Figure 2A).



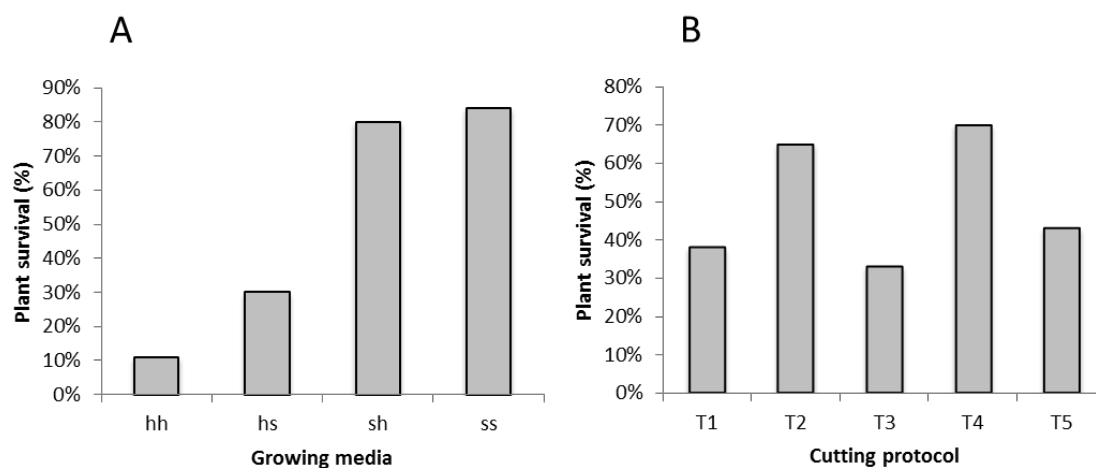
**Figure 2.** Effect of (A) the growing media and (B) the cutting protocol on the number of coronary roots after 68 days of growth, just before the transfer in the split-root system ( $t_2$ ). hh: hydropony both before and during split-root system; hs: hydropony before and soil during split-root system; sh: soil before and hydropony during split-root system; ss: soil both before and during split-root system; T1: control without any cut; T2: half of the roots cut; T3: half of roots and shoots cut; T4: whole root system cut; T5: half of shoots and the whole root system cut (see illustration in Figure 1B).

The cutting protocol had an effect on the number of coronary roots ( $P = 0.01$ ) (Fig 2B). Despite the variance due to the growing media (four situations per cutting protocol), the T4 cutting protocol showed a significantly higher number of roots compared to control (T1). All other treatments did not show significative differences with the control.

### Plant survival

At the end of the experiment ( $t_f$ ), we determined the survival rate of plants. Treatments in which soil was the unique growing media (ss) showed the best survival rate (85%), closely followed by the treatment soil before and hydropony during the split-root system (hs) with 80% of plant survival (Figure 3A). Treatments hh and hs had a very low survival rate (11% and 30% respectively).





**Figure 3.** Effect of (A) the growing media and (B) the cutting protocol on plant survival rate at the end of the experiment ( $t_f$ ). hh: hydropony both before and during split-root system; hs: hydropony before and soil during split-root system; sh: soil before and hydropony during split-root system; ss: soil both before and during split-root system; T1: control without any cut; T2: half of the roots cut; T3: half of roots and shoots cut; T4: whole root system cut; T5: half of shoots and the whole root system cut (see illustration in Figure 1B).

The chi-square test showed that the plant survival rate was dependent on the cutting protocol ( $P = 0.03$ ). The treatment T4 in which roots were totally cut and shoots remained intact showed the best survival rate with 70% of survival (Figure 3B). The treatment T2 (half of the roots cut) also revealed a high survival rate (65%) while treatments T1, T3 and T5 had a survival rate of less than 50 %.

### Root development

In order to quantify the variance due to the split-root system in itself and identify the best cutting protocol and growing media, we calculated the percentage of variance due to the different factors: the compartments of the split-root system (as an indicator of variance explained by the split-root device), the cutting protocol, the growing media and their interaction. We did not find any effect of the factor “compartment” on the root morphology (Table I), which means that the split-root system used in the experiment does not significantly

affect the root morphology. The percentage of variance explained by the split-root device was extremely low, with less than 1 % of variance for all measured variables (Table I).

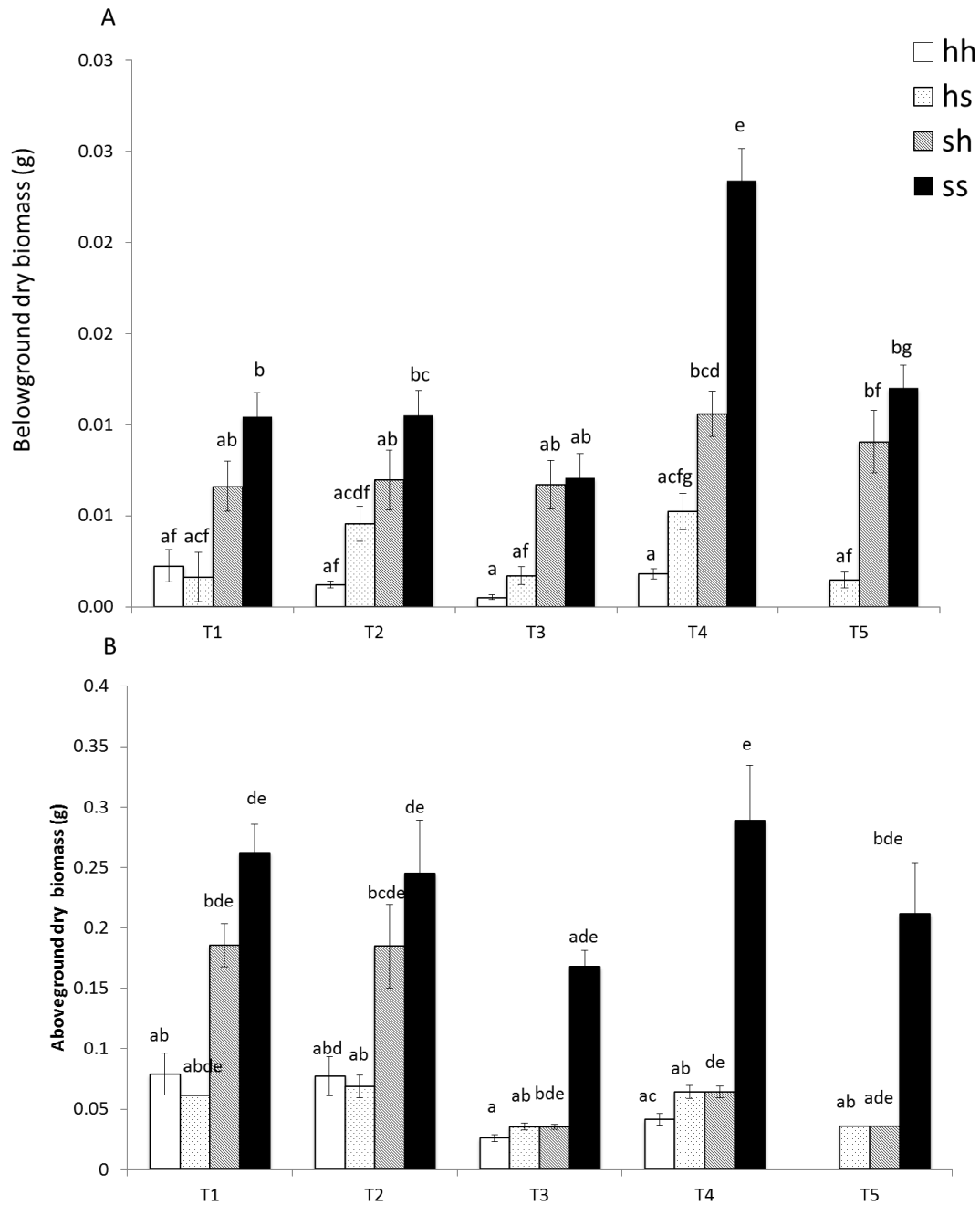
The cutting protocol and the growing media had a strong and significant effect on the belowground biomass, root length, surface and volume, average diameter and the number of tips and forks (Table I). Moreover the interaction between the cutting protocol and the growing media affected these parameters.

**Table I. Effect of the cutting protocol, the growing media, their interaction and the compartment of the split-root system on root parameters. Df represents the degree of freedom. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $0.001 < p < 0.01$ ; \* $0.01 < p < 0.05$ .**

| Factors             | Df  | Nb coronary roots |         | Root dry biomass |           | Root length |           | Root surface |           | Root Volume |           | Average diameter |           | Number of tips |           | Number of forks |           |
|---------------------|-----|-------------------|---------|------------------|-----------|-------------|-----------|--------------|-----------|-------------|-----------|------------------|-----------|----------------|-----------|-----------------|-----------|
|                     |     | % var.            | F value | % var.           | F value   | % var.      | F value   | % var.       | F value   | % var.      | F value   | % var.           | F value   | % var.         | F value   | % var.          | F value   |
| cut                 | 4   | 8.2               | 3.48 *  | 8.6              | 8.82 ***  | 12.6        | 11.02 *** | 10.7         | 9.32 ***  | 7.9         | 6.29 ***  | 5.3              | 2.81 *    | 12.0           | 11.95 *** | 8.9             | 7.11 ***  |
| growing media       | 3   | 5.4               | 3.06 *  | 48.7             | 66.47 *** | 39.4        | 45.90 *** | 43.2         | 50.18 *** | 44.9        | 47.42 *** | 21.9             | 15.51 *** | 43.1           | 56.98 *** | 42.2            | 44.96 *** |
| cut * growing media | 11  | 17.5              | 2.68 ** | 13.7             | 5.10 ***  | 13.3        | 4.22      | 11.3         | 3.59 ***  | 9.0         | 2.58 **   | 14.8             | 2.86 **   | 14.1           | 5.11 ***  | 11.0            | 3.19 ***  |
| compartment         | 1   | 0.0               | 0.00    | 0.1              | 0.28      | 0.1         | 0.43      | 0.0          | 0.15      | 0.0         | 0.00      | 0.9              | 1.84      | 0.3            | 1.11      | 0.1             | 0.25      |
| Residuals           | 121 | 68.8              |         | 28.8             |           | 34.6        |           | 34.7         |           | 38.2        |           | 57.1             |           | 30.5           |           | 37.9            |           |

Plants grown in the ss growing condition (ss treatment) had globally the highest root biomass (Figure 4A). The T4 cutting protocol in this growing media had a root biomass almost three times higher than all other treatments (Figure 4A). Conversely, plants grown from the beginning in hydroponic solution (hh) had the weakest root biomass. Plants grown in the sh treatment had in general a higher root biomass than in the hs treatment.

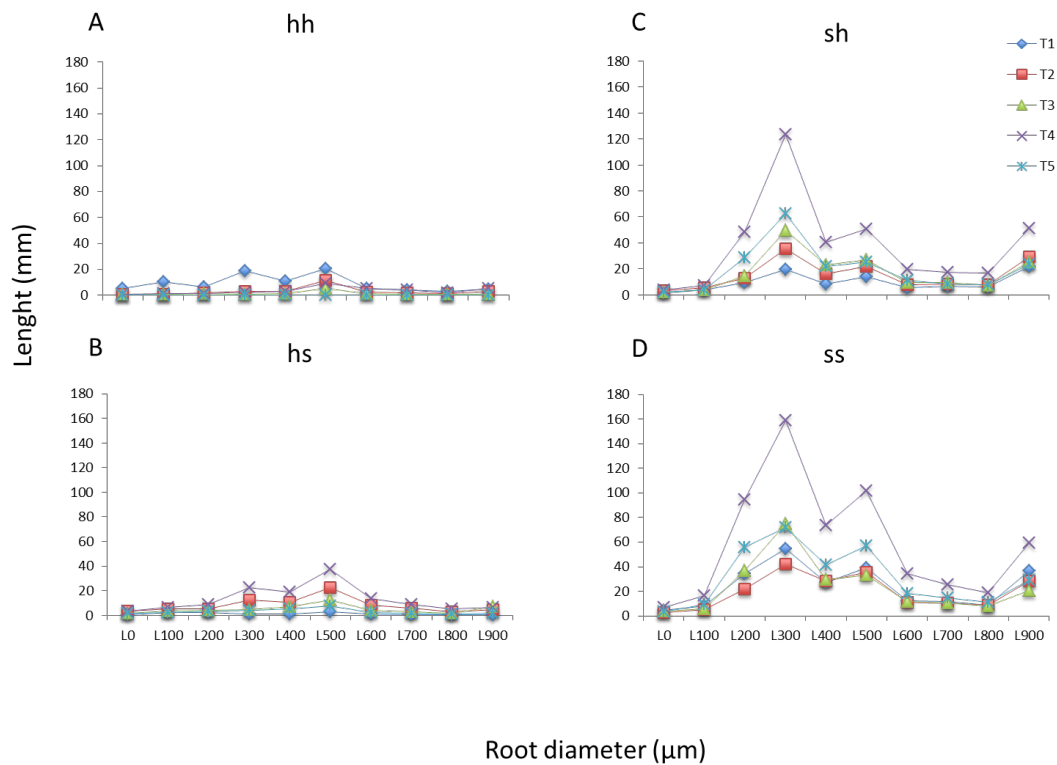
The highest shoot biomass was observed in the ss growing media (Figure 4B), with no significant differences between cutting protocols. In the sh treatment, we observed a trend for a higher shoot biomass in the T1 and T2 treatments, in which shoots were intact and roots not cut or only half, at the difference of T4 where the whole root system was cut.



**Figure 4 : Crossed effects of the growing media and the cutting protocol on (A) belowground dry biomass and (B) aboveground dry biomass at the end of the experiment ( $t_f$ ). hh: hydropony both before and during split-root system; hs: hydropony before and soil during split-root system; sh: soil before and hydropony during split-root system; ss: soil both before and during split-root system; T1: control without any cut; T2: half of the roots cut; T3: half of roots and shoots cut; T4: whole root system cut; T5: half of shoots and the whole root system cut (see illustration in Figure 1B).**

## **Root diameters**

In the hh treatment, root length was very low in all diameter classes (Figure 5A). The best cutting protocol was the control T1 without any organ cut. In this treatment, we can observe three peaks in the length distribution at 100-200, 300-400 and 500-600  $\mu\text{m}$  diameter classes, corresponding to three hierarchical levels of root axes. In the sh and ss treatments (Figure 5C and 5D), identical pattern were observed : a high peak at 300-400 and a lower peak at 500-600  $\mu\text{m}$ . The thinnest roots (100-200  $\mu\text{m}$ ) were not well developed ; however the middle diameter class (300-500  $\mu\text{m}$ ) was more developed than the high diameter class (500-600  $\mu\text{m}$ ). The hs treatment (Figure 5B) differed quantitatively, with a length in diameter classes closer to the hh treatment and qualitatively, with the high diameter class being more developed than in the middle diameter class.

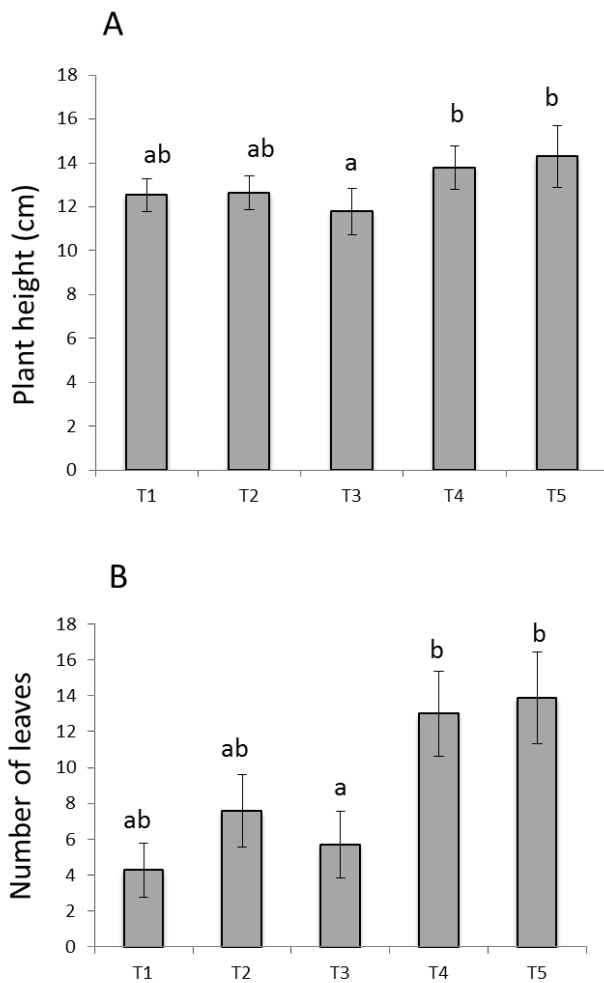


**Figure 5.** Root length distribution in diameter classes at the end of the experiment ( $t_f$ ) according to the cutting protocol for (A) hh: hydropony both before and during split-root system, (B) hs: hydropony before and soil during split-root system, (C) sh: soil before and hydropony during split-root system and (D) ss: soil both before and during split-root system. Root diameter classes are identified by the lower limit of the interval (e.g. L0: 0-100  $\mu\text{m}$ ). T1: control without any cut; T2: half of the roots cut; T3: half of roots and shoots cut; T4: whole root system cut; T5: half of shoots and the whole root system cut (see illustration in Figure 1B).

## Shoot development

Shoot biomass was approximately ten times higher than root biomass in all treatments (Figure 4A and 4B). Two-ways ANOVAs showed an effect of the cutting protocol on plant height and number of leaves at  $t_f$  ( $P = 0.03$  and  $P = 0.006$  respectively) but no effect on the aboveground biomass ( $P = 0.10$ ). The growing media had a strong effect on aboveground biomass ( $P < 0.001$ ), plant height ( $P < 0.001$ ) and the number of leaves ( $P = 0.004$ ). There was no significant interaction between the cutting protocol and the growing media for any of

the three aboveground parameters. Plant height was the highest in treatments T4 and T5 and the number of leaves doubled compared to treatments T1, T2 and T3 (Figure 6A and 6B). However, we did not find difference on the aboveground biomass between the five cutting protocols.



**Figure 6.** Effect of the cutting protocol on (A) plant height and (B) the number of leaves. T1: control without any cut; T2: half of the roots cut; T3: half of roots and shoots cut; T4: whole root system cut; T5: half of shoots and the whole root system cut (see illustration in Figure 1B).

## **DISCUSSION**

### **Effect of the growing media**

In general, the hh and hs treatments were leading to a lower number of coronary roots needed for transferring the plants in the split-root system, lower survival rate, lower root biomass, lower root length and a predominance of roots with an intermediate diameter. This negative effect can be due to the composition of the hydroponic solution, especially to the high level of  $\text{NH}_4^+$  from the 7 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . The preference of plants for ammonium and nitrate varies among plant species and ecosystems (Boudsocq et al., 2012). It is likely that the concentration of ammonium (7 mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) could be toxic, leading to a futile  $\text{NH}_4^+$  cycle, chlorosis/necrosis of leaves, growth suppression and even death (Britto et al., 2002 ; Gigon et al., 1972 ; , Magalhaes et al., 1983 ; Pearson et al., 1993 ; de Graaf et al., 1998). A consequence of toxicity in soil is generally a decrease in the exchange surface of plant with the soil, mainly through a reduction of fine roots (Blouin et al., 2012). It has to be noted that this negative effect of hydropony was slightly alleviated when plant were transferred to soil in split-root system. Plants grown in soil before and during the split-root system were developing much better. So the exposition to soil during the first stages of development was more important for plants than exposition to soil in the later stages. Soils are indeed buffered environments which are rarely toxic for plants. They provide stocks of nutrients in organic matter, that plants can mobilize through active adaptive mechanisms, e.g. the emission of phospholipid surfactants (Read et al., 2003). These mechanisms allow a better maintenance of

homeostasis and a better gain of productivity in situation where nutrient supply is improved (Blouin et al., 2012).

### **Effect of the cutting protocol**

Cutting some organs of the plant had in general a positive impact on the number of coronary roots and plant survival rate. It was thus favourable for the transfer in split-root system. Cutting the entire root system (T4 and T5) before the transplantation in split root system led to an increased number of coronary roots. This can be explained by an improved investment of energy and matter in the belowground organs revealing that the plant was able to quickly adapt to a temporary water and nutrients shortage, probably through the remobilization of organic energy and nutrients in its own shoot tissues, a mechanism known as the adaptive autophagy (Mizushima and Komatsu, 2011). Cutting half of the shoots (T3 and T5) had a negative impact on plant survival as compared with letting shoots intact (T2 and T4). The cutting of half of the shoots in addition to an entire root system removal (difference between T4 and T5) was affecting specifically the root biomass (lower in T5) and the root length distribution in diameter classes. In conclusion, energy was the most limiting factor for the survival and growth of plants in split-root system, not water (supplied *ad libitum* in our experiment) and nutrients acquisition by roots or water loss by shoots. It remains unknown if this energy was directly converted from light through photosynthesis or mainly got from adaptive autophagy of shoot' cells (Mizushima and Komatsu, 2011).



## **Recommendations**

Needs for split-root systems are a high survival rate and number of coronary roots. Other parameters such as roots and shoots growth could depend on the objectives of the experiment. Our results showed that applying some cuts of plants organs is beneficial for the growth of *Brachypodium distachyon* in a split-root system. Cutting the whole root system has to be privileged as compared with cutting half of the root system for coronary roots emission and belowground biomass production. However, when cutting the whole root system, one should avoid cutting the shoots or it will increase the death rate. We attributed a rank to the different treatments according to the survival rate and the number of coronary roots (Table II). The cutting of the whole root system without cut of shoots (T4) in soil before and during the split-root system (ss) was found to emerge as the best experimental protocol. If it is needed to grow plant hydroponically in split-root system, we advise to change the nutritive solution by replacing  $\text{NH}_4^+$  by  $\text{NO}_3^-$  or to start to grow plants in soil before the transfer to the split-root system (sh) and cutting the whole root system (T4) if the focus of the study is on roots or cutting only half of the roots (T2) if the focus is on shoots.

**Table II. Ranking of the different treatments (growing media and cutting protocol) on the survival rate, the number of coronary roots and the resulting global ranking aiming at identifying the optimal method for split-root system with *Brachypodium distachyon*.**

|      | Survival (%) | Ranking survival | Number of coronary root | Ranking number of coronary root | General Ranking |
|------|--------------|------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------|
| hhT1 | 33           | 5                | 2                       | 4                               | 6               |
| hhT2 | 17           | 6                | 2                       | 4                               | 7               |
| hhT3 | 0            | 7                | 2                       | 4                               | 8               |
| hhT4 | 0            | 7                | 4                       | 2                               | 6               |
| hhT5 | 0            | 7                | 0                       | 6                               | 10              |
| hsT1 | 0            | 7                | 1                       | 5                               | 9               |
| hsT2 | 57           | 3                | 5                       | 1                               | 2               |
| hsT3 | 0            | 7                | 2                       | 4                               | 8               |
| hsT4 | 57           | 3                | 5                       | 1                               | 2               |
| hsT5 | 0            | 7                | 4                       | 2                               | 6               |
| shT1 | 50           | 4                | 3                       | 3                               | 5               |
| shT2 | 83           | 1                | 2                       | 4                               | 3               |
| shT3 | 67           | 2                | 3                       | 3                               | 3               |
| shT4 | 83           | 1                | 3                       | 3                               | 2               |
| shT5 | 50           | 4                | 3                       | 3                               | 5               |
| ssT1 | 67           | 2                | 4                       | 2                               | 2               |
| ssT2 | 83           | 1                | 3                       | 3                               | 2               |
| ssT3 | 67           | 2                | 3                       | 3                               | 3               |
| ssT4 | 83           | 1                | 5                       | 1                               | 1               |
| ssT5 | 50           | 4                | 4                       | 2                               | 4               |

## FUNDING INFORMATION

This work was supported by grants from Région Ile-de-France, R2DS [grant number 2014-08] and by the French national program CNRS/INSU EC2CO.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Beatriz Decencière, Amandine Hansart and Florent Massol of the CEREEP - Ecotron IDF/UMS CNRS/ENS 3194 for soil provision. We thank Dr Richard Sibout at the *Brachypodium* biological resource centre (INRA, Versailles, France) for providing the *Brachypodium distachyon* grains.

**Chapitre 3 : Étude du couplage entre disponibilité de l'azote et signaux dans les interactions plantes- vers de terre-microorganismes.**

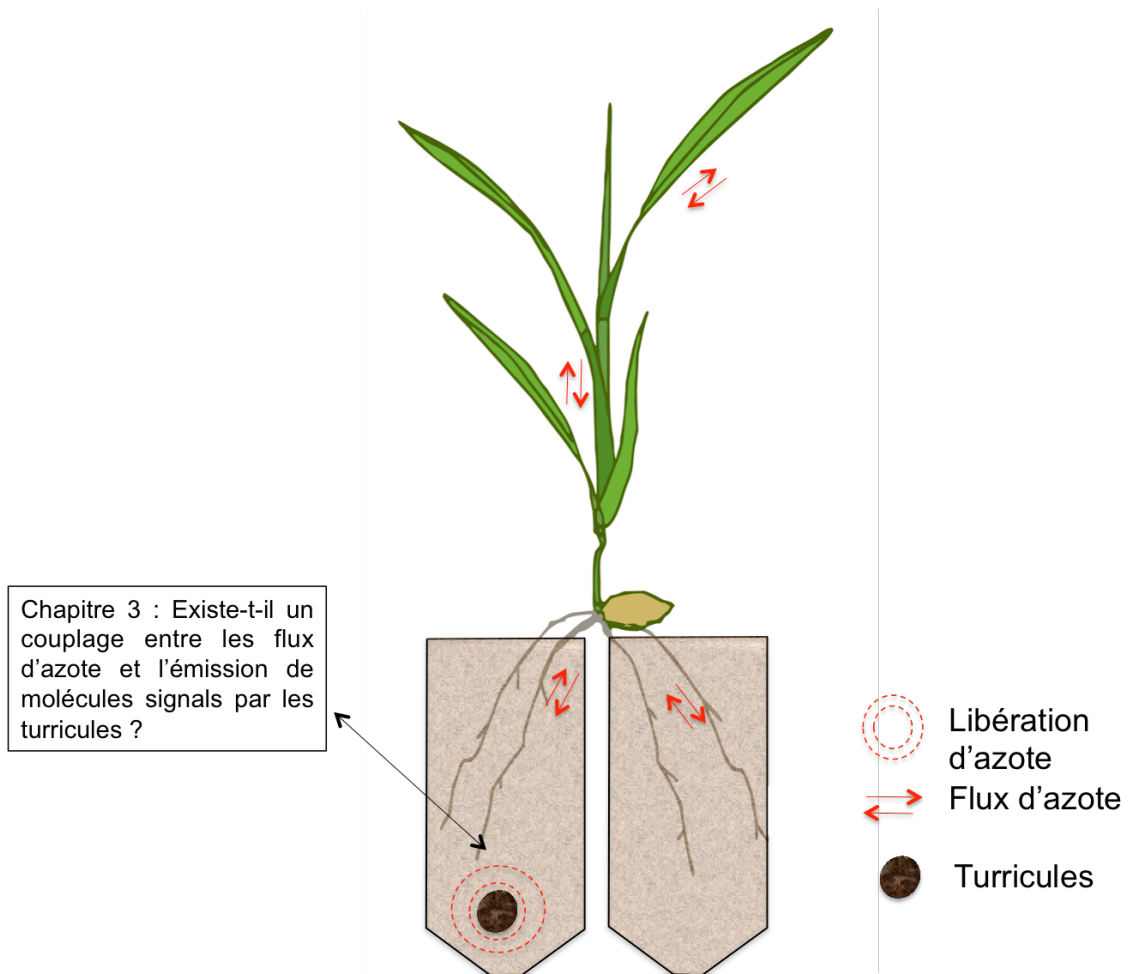


Figure III : Schéma du dispositif split-root utilisé pour déterminer si il existe un couplage entre les flux d'azote et l'émission de molécules signal par les turricules de vers de terre.

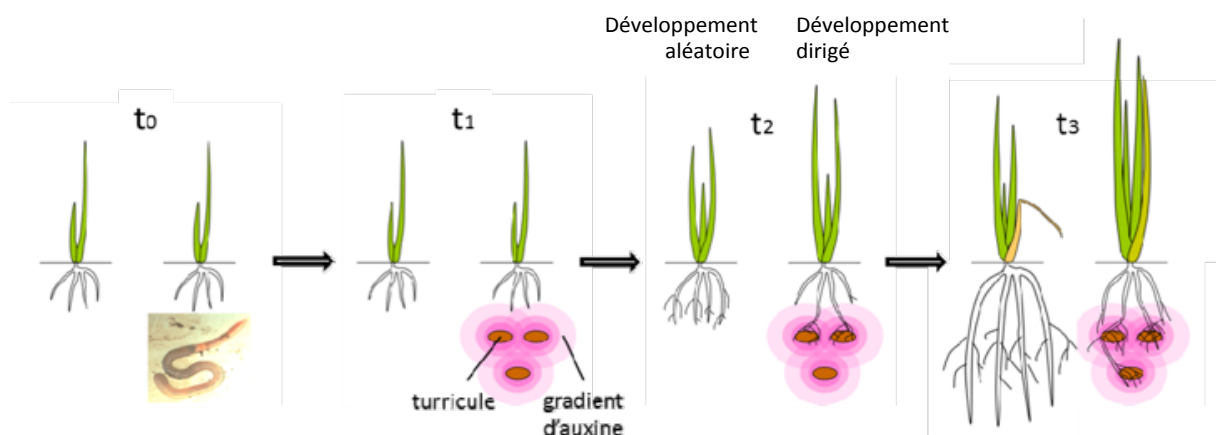
Les plantes sont exposées à de nombreux signaux, dont des molécules qui modifient profondément leur comportement ou leur morphologie. Elles ont également besoin de capter des ressources dans leur environnement. La compréhension et la prédiction des flux passent par une intégration de leur régulation par les signaux qui déterminent les adaptations des plantes. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le gradient d'auxine (IAA) qui diffuse dans le sol depuis les turricules de vers de terre conduit à un développement racinaire privilégié en direction du turricule qui aboutit à une prolifération accrue ou à une meilleure efficacité du prélèvement racinaire dans le turricule, dans lequel l'azote minéral est abondant. Ce développement orienté pourrait pour les plantes être plus économe énergétiquement qu'un développement aléatoire, et pourrait ainsi expliquer pourquoi la production végétale est généralement augmentée en présence de vers de terre. Afin de tester cette hypothèse, une expérience en split-root a été réalisée afin d'être en mesure d'étudier la morphologie et éventuellement la physiologie racinaire à proximité des turricules et d'évaluer si ces modifications sont des adaptations qui permettent de prélever plus d'azote. L'utilisation de marquage isotopique de l'azote des turricules ( $^{15}\text{N}$ ) a permis de quantifier la part d'azote prélevée par la plante en provenance des turricules et de comparer cette proportion au volume de sol occupé par ces turricules afin d'identifier un éventuel prélèvement privilégié dans ces turricules (Figure III), qui témoignerait d'un signal perçu par la plante. Les résultats vous sont présentés ci-après.

## Introduction

Les vers de terre représentent la biomasse animale la plus abondante dans les écosystèmes terrestres (Lavelle et Spain 2001). S'il est bien avéré que les vers de terre sont responsables d'un accroissement de la productivité des végétaux (Scheu, 2003 ; Brown et al., 2004 ; Van Groeningen et al., 2014), les mécanismes sous-jacents restent mal compris. L'amélioration de la disponibilité des nutriments dans le sol en présence de vers a communément été évoquée pour expliquer cet effet positif. Les turricules émis par les vers de terre libèrent en effet de nombreux métabolites tels que l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), l'urée, les allantoïnes et l'acide urique (Lee, 1985 ; Bityutskii, 2002). De plus, les turricules de vers de terre libèrent une quantité d'azote minéral équivalente à 10-12 % des besoins annuels d'une plante (James, 1991). Cependant, ce mécanisme trophique ne permet pas à lui seul d'expliquer l'effet des vers de terre (Blouin et al., 2006 ; Laossi et al., 2010). Une autre hypothèse a été émise concernant l'émission de molécules signal telles que des hormones végétales, probablement produites par les bactéries, en présence de vers de terre. En effet, certains microorganismes appelés bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB en anglais) sont bien connus pour leur production d'hormones végétales, en particulier l'acide indole acétique (IAA), molécule de la famille des auxines (Persello-Cartieaux et al., 2003 ; Hayat et al., 2010). Cette molécule a été isolée dans les déjections de vers de terre (Muscolo et al., 1998 ; Quaggiotti et al., 2004) et suggère une stimulation des PGPB par les vers de terre, ce qui améliorerait la croissance végétale via l'émission d'AIA. Une étude de 2012 a notamment montré que des bactéries cultivables produisent de fortes concentrations d'acide indole acétique en présence de vers de terre (Puga-Freitas et al. 2012a). Ces molécules signal

produites en présence de vers de terre peuvent avoir un effet important tel que la réversion d'un phénotype mutant ayant un transport altéré de l'auxine (Puga-Freitas et al. 2012b).

Etant donné que l'auxine est connue pour son effet sur l'élongation cellulaire et le développement racinaire, nous émettons l'hypothèse que le gradient d'auxine (IAA) qui diffuse dans le sol\_ depuis les turricules de vers de terre conduit à un développement racinaire privilégié en direction du turricule. Ceci aboutirait à une prolifération accrue du système racinaire et / ou à une meilleure efficacité du prélèvement racinaire de l'azote dans le turricule, où il est abondant (Aira et al., 2005 ; Lavelle et al., 1992) (Figure 1). Ce développement orienté pourrait pour les plantes être plus économe énergétiquement qu'un développement aléatoire, pouvant ainsi expliquer pourquoi la production végétale est généralement augmentée en présence de vers de terre.



**Figure 1 : Hypothèse sur le couplage entre l'émission de molécules signal et le prélèvement de nutriments**

Une expérience en split-root consistant à séparer les racines d'une plante dans deux compartiments distincts a été mise en place afin de tester notre hypothèse. Davies et Blackman en 1985 ont été les premiers à utiliser ce système sur un plant de maïs. En répartissant le système racinaire de maïs entre un compartiment contenant de l'eau (compartiment A) et un autre dépourvu d'eau (compartiment B), les auteurs ont constaté que

malgré état hydrique correct, la plante fermait ses stomates, mettant en évidence l'existence d'un signal biochimique systémique permettant une régulation des pertes d'eau foliaire en fonction de la teneur en eau du sol.

Dans notre cas, nous allons utiliser ce dispositif « split-root » afin d'être capable d'isoler les racines qui se développent dans un environnement uniquement constitué de turricules de vers de terre (dans un des deux compartiments), car cela est très difficile quand les turricules sont dispersés dans la matrice de sol. En effet, seules les terminaisons des racines peuvent alors être en contact avec les turricules, et le développement racinaire est le résultat d'une exposition à un mélange de sol non ingéré et ingéré par les vers de terre. Grâce à l'utilisation de turricules marqués au  $^{15}\text{N}$ , nous pourrions estimer la part d'azote en provenance des turricules. Etant donné que les turricules représenteront 50 % du volume de sol auquel le système racinaire est exposé (un des deux compartiments identiques), nous pourrions déterminer si la part d'azote provenant des turricules est plus importante que les 50 % maximum attendus. Sur un plan statistique, ce dispositif nous permettra d'évaluer si le prélèvement de N par la plante au niveau global et au niveau de chacun des compartiments du split-root est influencé par l'effet :

- du facteur « turricule », présents (sol ingéré) ou absents (sol non ingéré) ;
- du facteur « distribution » selon que les turricules et le sol témoin non ingéré soient localisés de façon homogène (même proportion) ou hétérogène dans les deux compartiments;
- de l'interaction entre turricule et distribution qui démontrerait que l'effet des turricules est associé à une hétérogénéité spatiale, ce qui suggérerait qu'un mécanisme (probablement un signal) permette que l'hétérogénéité n'ait pas le même effet selon qu'il s'agisse de turricules ou de sol marqué (Figure 2).



## Matériels et Méthodes

*L'expérience a été réalisée à deux reprises, une première fois (expérience 1) lors de mon stage de M2 et une seconde fois (expérience 2) pendant la thèse, après plusieurs mises au point méthodologiques, notamment une optimisation de l'obtention de plantes identiques avec un taux de survie élevé en dispositif « split-root » (cf chapitre 2).*

### I. Dispositif expérimental

#### *Expérience 1 :*

Afin de tester notre hypothèse, les plantes sont disposées dans un dispositif en « split root » permettant la séparation des racines dans deux compartiments soumis chacun à un traitement potentiellement différent (Figure 2). Les traitements réalisés sont :

- un témoin « mélangé » (CoM), composé de 50 % de sol non marqué et de 50 % de sol marqué mélangés au sein de chacun des deux compartiments ; Ce traitement sert de témoin de marquage isotopique.
- Un témoin « séparé » (CoS), composé de 100 % de sol non marqué dans le premier compartiment (compartiment A) et 100 % de sol marqué dans le second compartiment (compartiment B) ; Ce traitement sert de témoin de translocation de  $^{15}\text{N}$  entre les deux compartiments via la plante.
- Un traitement avec turricules mélangés (CaM), composé de 50 % de sol non marqué et de 50 % de turricules marqués broyés au sein de chacun des deux compartiments ; Ce traitement sert à détecter un effet physique, chimique ou biologique d'un élément

présent dans les turricules, sans que cet effet puisse dépendre de position spatiale du turricule.

- Un traitement avec turricules séparés (CaS), composé de 100 % de sol non marqué dans le compartiment A et de 100 % de turricules marqués dans le compartiment B. Ce traitement sert à détecter un effet physique, chimique ou biologique qui dépend de la position spatiale du turricule et du fait que le turricule conserve son intégrité (non broyés).

La comparaison de CoM et CoS permet d'évaluer discrimination isotopique dans le prélèvement de l'azote par la plante. La comparaison de CoM et CaM permet de déterminer s'il y a un prélèvement de  $^{15}\text{N}$  privilégié en présence de turricules, malgré l'éventualité d'une discrimination par la plante. La comparaison CoS et CaS permet de détecter un effet des turricules non broyés marqués dans un des deux compartiments. La comparaison des compartiments A et B du traitement CaS permettra de détecter une adaptation morphologique du système racinaire à la présence de turricules.

Les quatre traitements sont répétés 12 fois.

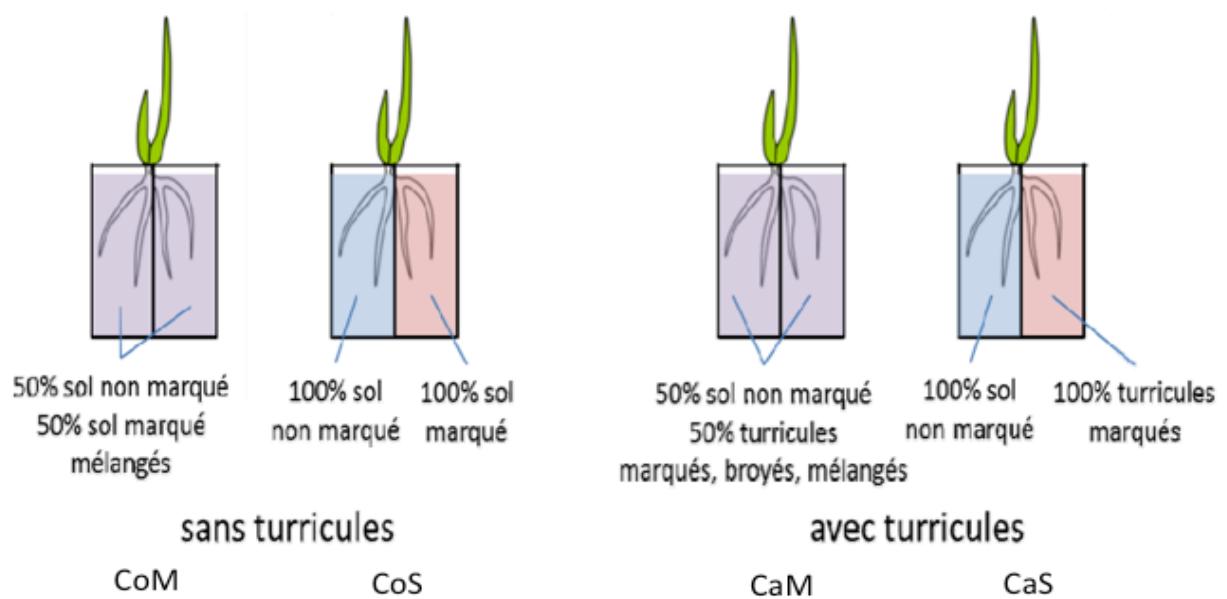


Figure 2 : Dispositif expérimental de l'expérience 1 visant à évaluer l'effet des turricules et de leur position spatiale sur les prélèvements d'azote par la plante.

### **Expérience 2 :**

Au cours de cette deuxième expérience « split-root », un traitement a été ajouté. Ce traitement est constitué de 50 % de sol non marqué et de 50 % de turricules marqués intacts (CaMF) (Figure 3). Il permettra de détecter un effet des turricules lié à leur intégrité physique, notamment par comparaison avec le traitement CaMC. Les cinq traitements sont répétés 16 fois.

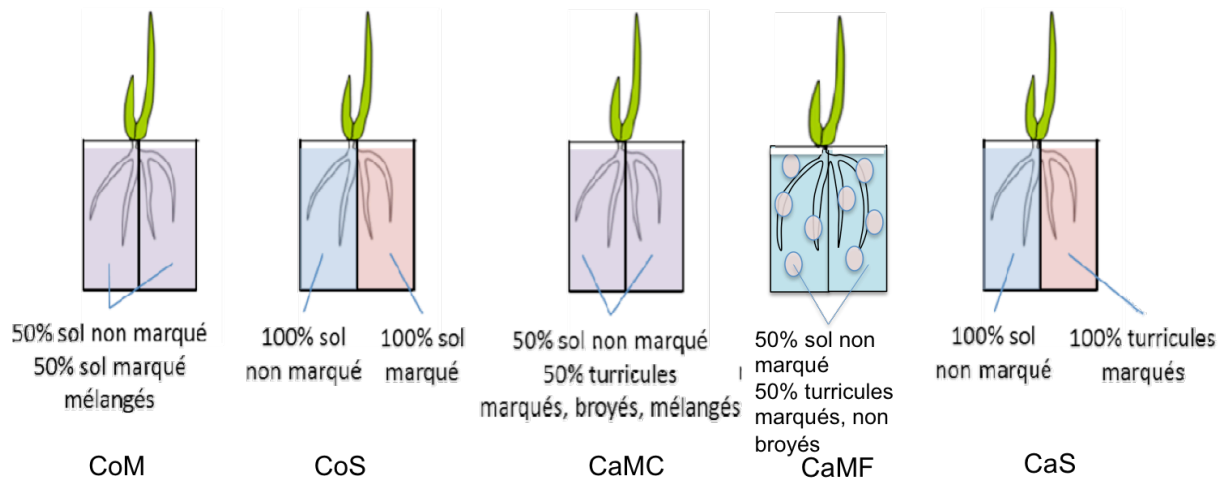


Figure 3 : Dispositif expérimental de l'expérience 2 visant à évaluer l'effet des turricules et de leur position spatiale sur les prélèvements d'azote par la plante.

## II. Le sol

Le sol a été prélevé dans la station de Foljuif au Centre de Recherche en Ecologie Expérimentale et Prédictive - CEREEP à Saint-Pierre-Lès-Nemours (77) (N 48° 17' 14.48", E 2° 40' 34.64"). Il s'agit d'un cambisol sur lequel se développe une lande. Il est pauvre en matière organique avec pour caractéristiques physico-chimiques : un contenu total en carbone organique de 14.7 g.kg<sup>-1</sup>; un contenu total en azote de 1.19 g.kg<sup>-1</sup> ; pH : 5.22 ; CEC : 4.08 cmol.kg<sup>-1</sup> ; texture : 6.9 % d'argile, 19.0 % de limons, 74.1 % de sable.

La capacité au champ déterminée à partir de 1 kg de sol préalablement tamisé à 2 mm et séché à température ambiante est de 0,267 g. g<sup>-1</sup> de sol. Celui-ci est pesé puis saturé d'eau déionisée par arrosage appliqué au goutte à goutte à la surface du sol puis mis à drainer pendant 24 heures, recouvert et mis en chambre froide afin de limiter l'évaporation de l'eau.

### III. Les vers de terre

Environ trois cents vers de terre de l'espèce *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) ont été collectés à Itteville dans le département de l'Essonne (N/S 48°30' 17,31"E/O 2°20' 1,553") et maintenus dans un bac d'élevage pendant plusieurs semaines. Il s'agit d'une espèce endogée de taille petite à intermédiaire, souvent caractérisée par un manque de pigmentation. Il s'agit d'une espèce endogée compactante (Blanchart et al., 2004b) formant des galeries horizontales. Celles-ci sont considérées comme temporaires car elles ne sont que très rarement réutilisées par les vers (Bouché, 1977).

Les vers sont purgés pendant quatre jours dans un bac contenant le sol de Foljuif afin qu'ils n'ensemencent pas les microcosmes expérimentaux avec les microorganismes de leur bac d'élevage.

### IV. Le marquage du sol et des turricules

Trois bacs contenant 10kg de sol de Foljuif ont été utilisés pour réaliser les différents traitements split-root :

- Un bac de sol enrichi au  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  (sol  $^{15}\text{N}$ ) utilisé pour les traitements témoins (CoS, CoM) ;
- Un bac de sol enrichi en  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  utilisé pour la production de turricules marqués (traitements CaMC, CaMF, CaS) ;
- Un bac de sol non marqué dans lequel a été introduit la même quantité d'azote que les précédents sous la forme de  $^{14}\text{NH}_4^{14}\text{NO}_3$  (sol  $^{14}\text{N}$ ) et qui sera utilisé pour tous les traitements ;
- Un bac de sol témoin servant de témoin d'incubation.

**Expérience 1 :**

Le marquage est réalisé à partir d'une poudre de  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (99 atom %  $^{15}\text{N}$ ) que l'on dilue à 16 atom %  $^{15}\text{N}$  dans une poudre de  $^{14}\text{NH}_4^{14}\text{NO}_3$ . Ce mélange de poudre est ensuite dilué dans de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration de  $3,21\text{mg. mL}^{-1}$ , pour un volume équivalent à seulement 10 % de la capacité au champ dans le but d'éviter la formation d'agrégats dus à l'humectation du sol. Le sol est soigneusement homogénéisé puis arrosé à 80 % de la capacité au champ.

Le même procédé a été suivi pour le sol témoin non marqué  $^{14}\text{N}$  en utilisant une solution de  $^{14}\text{NH}_4^{14}\text{NO}_3$  à  $3,21\text{mg. mL}^{-1}$ . La quantité d'azote apportée dans les bacs correspond approximativement à 10 % de la quantité total d'azote présente dans le sol.

**Expérience 2 :**

Le marquage a été réalisé selon le même protocole que pour l'expérience 1. Cependant, du fait d'un niveau de marquage trop fort pour certaines analyses, nous avons diminué la concentration en nitrate d'ammonium. Les solutions de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  marquées et non marquées ont été utilisées à une concentration de  $0,321\text{ mg. mL}^{-1}$  afin d'obtenir une quantité d'azote correspondant à 1 % de la quantité totale d'azote présente dans le sol.

Après 15 jours d'incubation pendant lesquels les microorganismes intègrent l'azote minéral, les vers de terre préalablement purgés sont ajoutés. Après quatre jours d'activité des vers de terre, les turricules, le sol marqué au  $^{15}\text{N}$  et le sol  $^{14}\text{N}$  sont prélevés pour être transférés dans le dispositif expérimental de type « split root ».

## V. Plante et conditions de culture

L'espèce végétale *Brachypodium distachyon* L. utilisée au cours de cette expérimentation appartient à la famille des Poaceae et est retrouvée dans toute la région méditerranéenne (<http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-10075-synthese>). De par ses caractéristiques physiques et biologiques, cette plante s'impose en tant que modèle pour l'étude des monocotylédones auxquelles appartiennent les céréales (Draper, 2001). Elle a de nombreux avantages tels que sa petite taille, un temps de génération court et un petit génome (~272 Mpb répartis sur 5 chromosomes) (Vogel et Garvin, 2010). Elle est également plus facile à cultiver que d'autres Poacées telles que le riz (Vogel et Hill, 2008). Pour les deux expériences, les graines, dont le tégument a été enlevé pour faciliter la germination, ont été vernalisées en chambre froide à 5°C pendant 3 jours dans de l'eau déionisée afin d'obtenir une germination synchronisée. Elles ont ensuite été transférées sur papier humidifié et placées dans un phytotron (S10H, Conviron, Canada), à l'obscurité, à 80 % d'humidité relative et à 22/20°C (jour/nuit).

### **Expérience 1 :**

Les plantes sont transférées dans le dispositif « split-root » 15 jours jour après la germination. Les racines sont réparties équitablement dans les deux compartiments et la croissance des plantes se fait en jours courts (10h de photopériode), à une intensité lumineuse de  $250 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . L'expérimentation est arrêtée 15 jours après la transplantation des plants dans les dispositifs « split-root ».

### **Expérience 2 :**

Suite à une expérience méthodologique visant à promouvoir les racines coronaires chez l'espèce végétale *Brachypodium distachyon* et à diminuer la variabilité inter-compartiment (cf Chapitre 2), nous avons coupé les racines entièrement 42 jours après la germination. Nous les avons ensuite transplantées dans du sol de Foljuif afin de favoriser l'apparition et le développement des racines coronaires pour la mise en « split-root ». Vingt six jours après la coupe les plantes sont transplantées dans les différents traitements de type « split-root » en prenant soin de répartir les racines équitablement dans les compartiments. La croissance des plantes se fait en jours courts (10h de photopériode), à une intensité lumineuse de  $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . L'expérimentation est arrêtée 15 jours après la transplantation dans les dispositifs « split-root ».

## **VI. Croissance des plantes et morphologie racinaire**

La hauteur des plantes et le nombre de feuilles ont été mesurés sept puis 15 jours après la transplantation des plantes dans les dispositifs « split-root ». Ces mesures ont permis de calculer un taux de croissance des plantes pour chacun des traitements. La partie aérienne a été coupée au niveau de la surface du sol, séchée dans une étuve à  $45^{\circ}\text{C}$  pendant deux jours puis pesée. Les racines ont été récupérées par lavage du sol. Les mesures concernant la morphologie racinaire ont été réalisées à l'aide d'un scanner (Epson Expression 10000 XL, Epson America Inc., San Jose, CA, USA) associé à un logiciel d'analyse d'image (WinRHIZO, V. 2007 pro, Regent Instruments, Quebec, Canada). La calibration pour l'analyse de la morphologie racinaire a suivi les recommandations des analyses de sensibilité (Bouma et al 2000, Himmelbauer et al 2004) avec une résolution de 400 dpi. Après analyse, les racines sont séchées à l'étuve à  $45^{\circ}\text{C}$  pendant deux jours puis pesées.



## **VII. Analyses isotopiques**

Les racines et les feuilles ont été broyées finement afin d'analyser leur concentration en azote et le pourcentage d'atome  $^{15}\text{N}$  présents. Tous les échantillons ont été analysés à la plateforme technique d'écologie fonctionnelle (PTEF) de l'INRA de Nancy. Un spectromètre de masse (Finnigan delta S) couplé à un analyseur élémentaire (Carlo Erba NA1500) a été utilisé.

## **VIII. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R CoreTeam, 2016). Nous avons réalisé des ANOVAs à deux facteurs (présence/absence de turricules et distribution homogène/hétérogène) sur les biomasses ainsi que sur les paramètres morphologiques aériens et racinaires. Des ANOVA à un facteur ont également été réalisées afin de déterminer l'effet des traitements sur les différents paramètres de croissance et de morphologie. Des comparaisons multiples de moyennes ont été effectuées en utilisant le test de Tukey. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

## **Résultats**

Au cours de mon stage de master 2 sur cette thématique, une première expérience « split-root » avait été réalisée. Les Résultats de cette expérience sont présentés ci-dessous (cf Expérience 1), sans toutefois faire l'objet d'une Discussion. En effet, certains problèmes techniques (forte variabilité intra-traitements, nombre de réplicats trop faible, contamination de certains témoins au  $^{15}\text{N}$ ) nous ont décidé à ne pas sur-interpréter ces résultats. Par la suite,

une deuxième expérience similaire a été réalisée (cf Expérience 2) et sera présentée en détails et dont les Résultats seront discutés.

## ❖ Expérience 1

### 1. Survie des plantes dans le dispositif split-root.

A la fin de l'expérimentation, nous observons une mortalité de 27 % des plantes. Les traitements témoins (sol non ingéré) avec une distribution hétérogène (CoS) et homogène (CoM) sont les plus touchés par cette mortalité avec une perte respective de 55 % et 45% des plantes. A l'inverse les plantes ayant poussé dans les traitements contenant des turricules ont un meilleur taux de survie (Tableau I). Ces résultats semblent indiqués que les traitements où les turricules sont présents améliorent la survie des plantes.

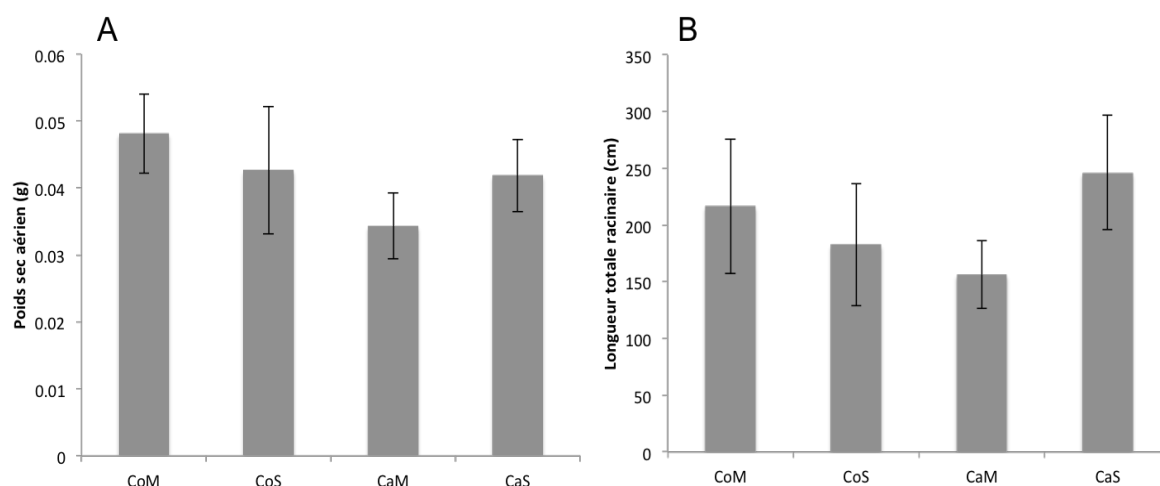
**Tableau I : Mortalité des plantes en fonction des différents traitements « split-root ». CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaM : 50% de turricules marqués et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre.**

|     | Nombre d'individus morts | Mortalité des plantes (%) |
|-----|--------------------------|---------------------------|
| CoM | 5/11                     | 45                        |
| CoS | 6/11                     | 55                        |
| CaM | 1/11                     | 9                         |
| CaS | 0/11                     | 0                         |

Cette forte mortalité pourrait au moins pour partie s'expliquer par la fragilité des plantes au sein du dispositif split-root. En effet, les plantes transplantées étaient âgées d'une quinzaine de jours et les racines réparties au sein des deux compartiments étaient fines et fragiles au moment de la manipulation.

## 2. Effet des turricules et de leur distribution sur la croissance des plantes et leur morphologie.

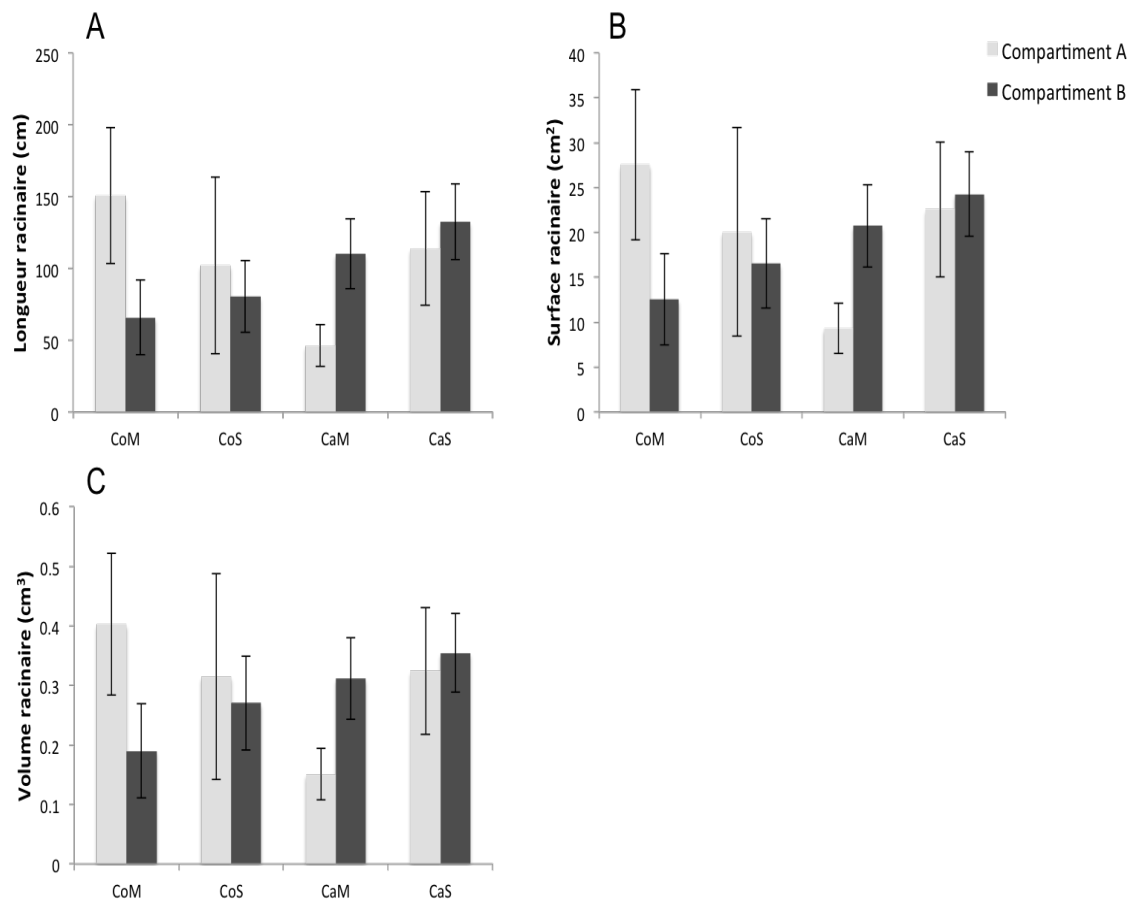
Malgré les différences de moyennes, la biomasse aérienne et la longueur racinaire totale ne sont pas impactées de façon significative par les différents traitements, notamment du fait de la variabilité intra-traitement importante et du faible nombre de réplicats (Figure 4), étant donnée la mortalité élevée dans certains traitements (Tableau I).



**Figure 4 : Effet des différents traitements « split-root » sur : (A) le poids sec aérien en g; (B) la longueur totale racinaire en cm pour les plantes vivantes en fin d'expérience. Moyenne  $\pm$  erreur type. CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaM : 50% de turricules marqués et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre.**

On observe une tendance de la longueur, la surface et le volume racinaire à être plus élevés dans les traitements CoM et CaS que dans les traitements CoS et CaM (Figure 5A, B, C). Dans les traitements CoM et CaM, des différences de longueur, surface et volume racinaires sont observées entre les compartiments A et B, alors que ces compartiments contiennent exactement le même substrat (Figure 5A, B, C). Cette observation témoigne d'une variabilité non désirée, due à une mauvaise maîtrise du dispositif expérimental en split-root, d'où l'étape ultérieure de mise au point méthodologique (cf Chapitre 2). La forte variabilité au sein d'un même compartiment ou entre deux compartiments d'un même traitement (alors que cela n'est pas attendu) ne permet pas d'observer de différences inter-traitements significatives.

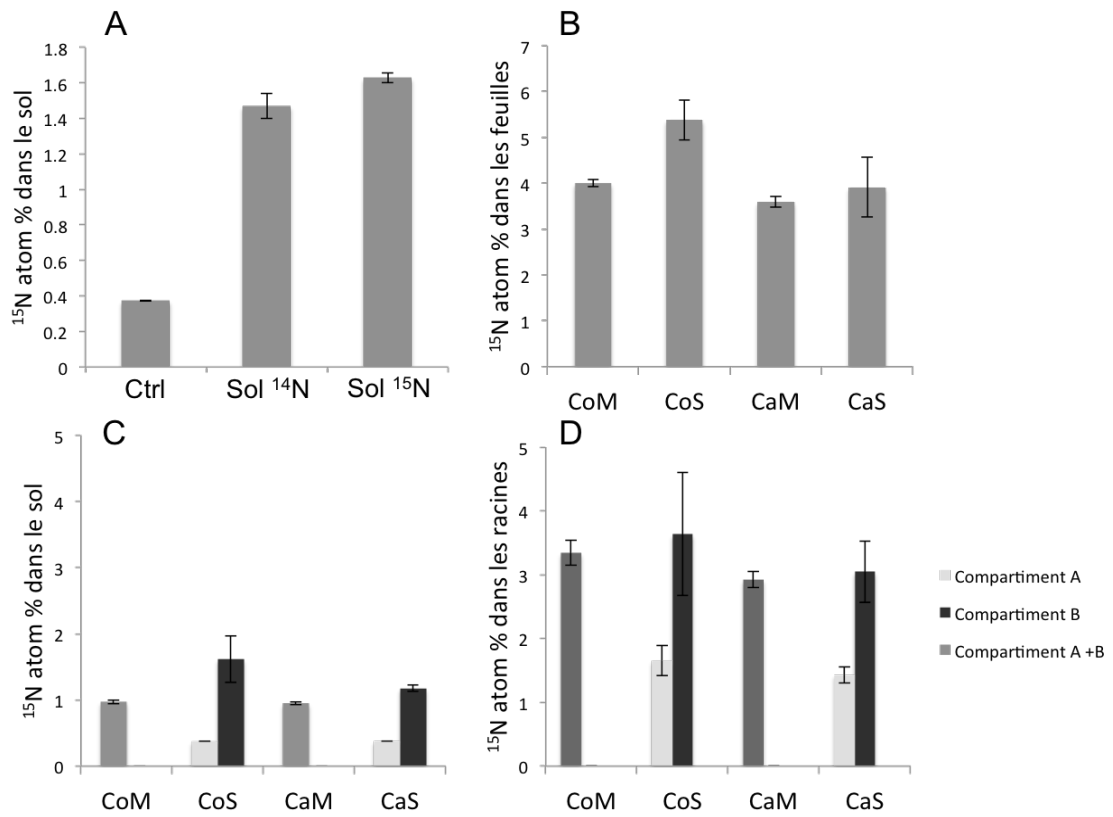
Cette situation ne permet pas d'observer d'adaptations morphologiques racinaires localisées lorsque les racines se développent dans les turricules.



**Figure 5 : Effet des différents traitements « split-root » selon le compartiment sur la morphologie racinaire pour les plantes vivantes en fin d'expérience : (A) la longueur racinaire en cm ; (B) la surface racinaire en cm<sup>2</sup> ; (C) le volume racinaire en cm<sup>3</sup>. Moyenne ± erreur type. CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaM : 50% de turricules marqués et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre.**

### 3. Effet des turricules et de leur distribution sur l'absorption d'azote.

Les analyses isotopiques sur le sol des bacs incubés avant de mettre en place les différents traitements ont montré une contamination du sol témoin (<sup>14</sup>N) par du <sup>15</sup>N (Figure 6A). Ce problème sur le sol initial nous a convaincu de ne pas spéculer sur l'interprétation des résultats et de faire une deuxième expérience.



**Figure 6 : Effet des différents traitements sur le pourcentage d'atome <sup>15</sup>N en % pour les plantes vivantes en fin d'expérience: (A) dans les sols témoins ; (B) dans les feuilles ; (C) dans le sol ; (D) dans les racines. Moyenne : ± erreur type. CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaM : 50% de turricules marqués et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre.**

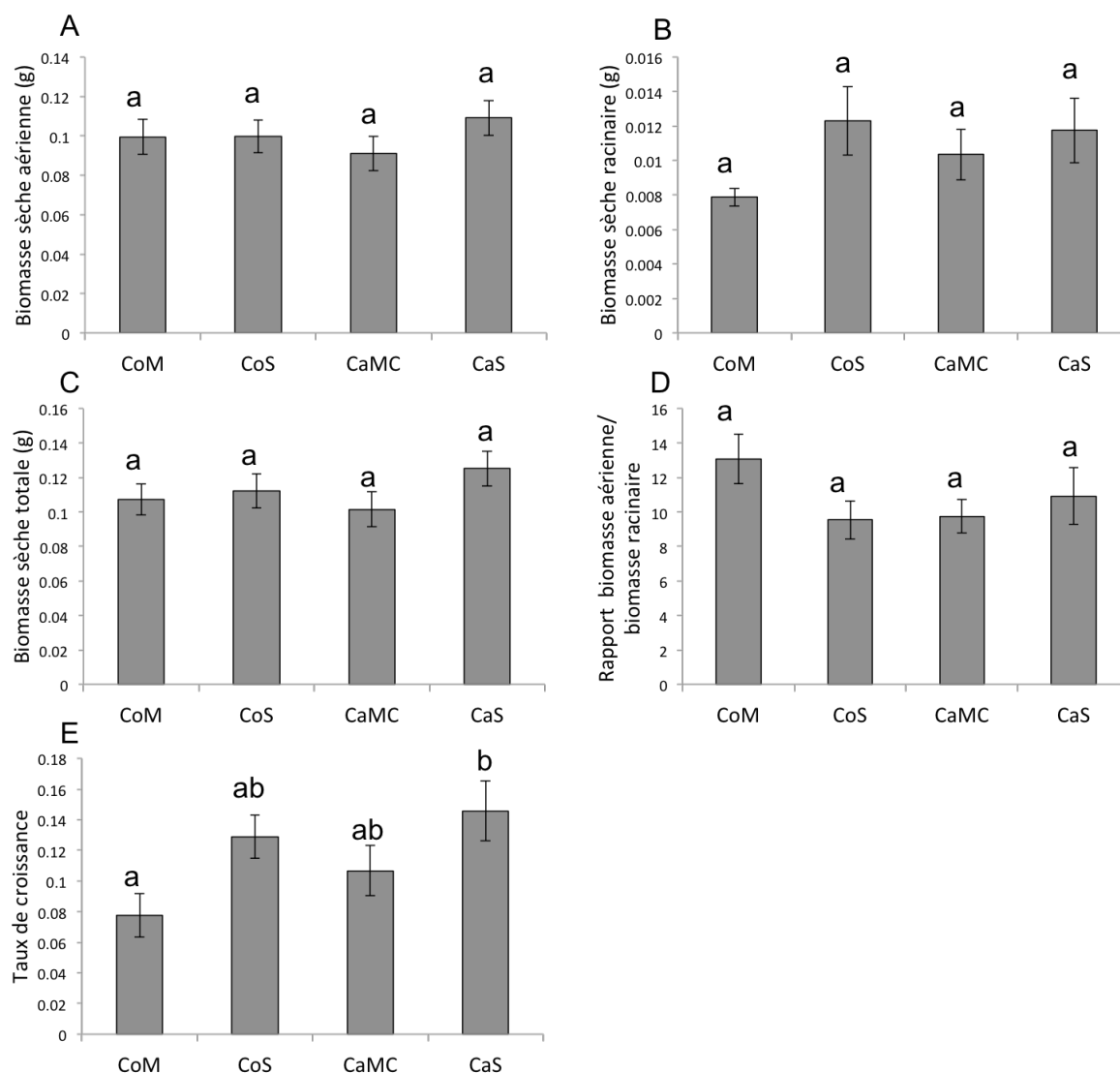
## ❖ Expérience 2

L'optimisation de la méthodologie permettant d'obtenir des plantes en dispositif split-root nous a permis d'obtenir un taux de survie de 100% dans cette seconde expérience.

### **1. Effet des turricules et de leur distribution sur la croissance des plantes et leur morphologie.**

Aucune différence de morphologie racinaire n'a été observée entre les racines des compartiments A et B (ANOVA à 1 facteur, longueur :  $P = 0,22$  ; surface racinaire :  $P = 0,26$  ; diamètre moyen :  $P = 0,54$  ; Volume racinaire :  $P = 0,41$  ; nombre de fourches :  $P = 0,17$ ).

Les traitements n'ont eu aucun effet sur les biomasses aérienne, racinaire, totale ( $P = 0,5$  ;  $P = 0,3$  ;  $P = 0,4$ ) ni sur le rapport biomasse aérienne/racinaire ( $P = 0,2$ ) (Figure 7 A, B, C, D). Cependant, un effet significatif est observé sur le taux de croissance ( $P = 0,03$ ). En effet, celui-ci augmente dans le traitement CaS par rapport au traitement CoM (Figure 7E).



**Figure 7 : Effet des différents traitements « split-root » sur : (A) la biomasse sèche aérienne (g) ; (B) la biomasse sèche racinaire (g) ; (C) la biomasse sèche totale (g) ; (D) le shoot root ratio ; (E) le taux de croissance des plantes. CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaMC : 50% de turricules marqués broyés et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre.**

L'effet des turricules et de leur distribution au sein des compartiments « split-root » a également été testé dans une ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de la présence des turricules et ni de leur distribution n'a été observé sur la biomasse totale et le rapport biomasse aérienne/racinaire (Tableau II). Le taux de croissance n'est affecté que par la



distribution, avec des traitements à distribution hétérogène qui présentent un taux de croissance supérieur à celui observé lorsque la distribution est homogène.

**Tableau II. Résultats de l'ANOVA à deux facteurs (turricules et leur distribution) sur la biomasse aérienne, le rapport biomasse aérienne / biomasse racinaire et le taux de croissance ( $\Delta$ biomasse en 15 jours).**

|                           | Biomasse totale |       |       | Rapport en biomasse aérienne/racinaire |       |        | Taux de croissance |       |       |
|---------------------------|-----------------|-------|-------|--|-------|--------|--------------------|-------|-------|
|                           | df              | F     | P     | df                                     | F     | P      | df                 | F     | P     |
| Distribution              | 1               | 0.089 | 0.767 | 1                                      | 0.587 | 0.4481 | 1                  | 2.026 | 0.007 |
| Turricules                | 1               | 2.005 | 0.165 | 1                                      | 0.887 | 0.3522 | 1                  | 7.799 | 0.160 |
| Distribution x Turricules | 1               | 0.918 | 0.344 | 1                                      | 3.174 | 0.0826 | 1                  | 0.146 | 0.704 |
| Résidus                   | 39              |       |       | 39                                     |       |        | 60                 |       |       |

Les turricules n'ont eu aucun effet sur les paramètres racinaires étudiés (Tableau III). Cependant leur distribution au sein des compartiments influe sur le poids sec racinaire, la longueur racinaire, et le nombre de fourches (Tableau III), avec une augmentation de ces paramètres quand le sol ou les turricules sont répartis de manière hétérogène au sein des compartiments. L'interaction entre la présence de turricules et la distribution n'a eu aucun impact sur la morphologie des racines.

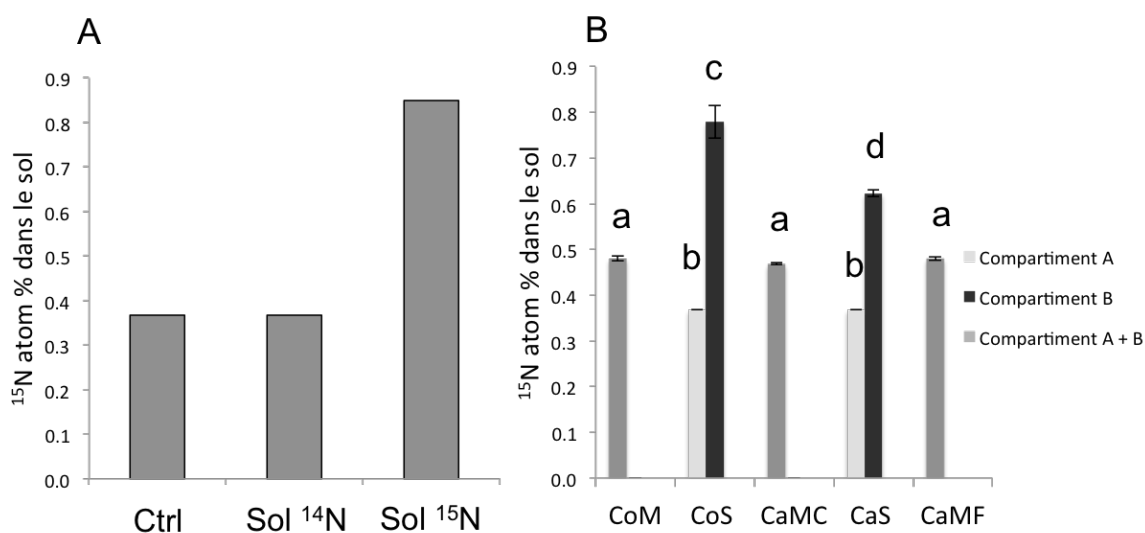
**Tableau III. Résultats de l'ANOVA à deux facteurs (turricules et leur distribution) sur le poids sec, la longueur, la surface, le volume, le diamètre moyen racinaire et le nombre de ramifications.**

|                           | df  | Poids secs racinaire |       | Longueur racinaire |        | Surface racinaire |        | Diamètre moyen |        | Volume racinaire |        | Nombre de fourches |       |
|---------------------------|-----|----------------------|-------|--------------------|--------|-------------------|--------|----------------|--------|------------------|--------|--------------------|-------|
|                           |     | F                    | P     | F                  | P      | F                 | P      | F              | P      | F                | P      | F                  | P     |
| Distribution              | 1   | 4.028                | 0.048 | 4.896              | 0.0297 | 4.550             | 0.0359 | 0.474          | 0.4933 | 3.525            | 0.0639 | 5.861              | 0.017 |
| Turricules                | 1   | 0.436                | 0.511 | 0.768              | 0.3834 | 0.724             | 0.3973 | 0.703          | 0.4042 | 0.461            | 0.4992 | 1.371              | 0.244 |
| Distribution x Turricules | 1   | 1.100                | 0.297 | 1.102              | 0.2968 | 1.013             | 0.3171 | 2.970          | 0.0885 | 0.821            | 0.3674 | 0.250              | 0.618 |
| Résidus                   | 122 |                      |       |                    |        |                   |        |                |        |                  |        |                    |       |

A l'échelle de la plante entière, c'est-à-dire sans distinguer les compartiments A et B, nous n'observons pas d'adaptations morphologiques des plantes à la présence de turricules, ni à l'interaction entre présence de turricules et leur distribution.

## **2. Evolution du marquage isotopique dans le sol**

Dans les bacs d'incubation, le pourcentage d'atome de  $^{15}\text{N}$  présent permet de valider la technique de marquage. On constate que le bac d'incubation témoin, composé uniquement de sol sans ajout de N, présente un pourcentage d'atome de  $^{15}\text{N}$  similaire au bac d'incubation  $^{14}\text{N}$ , ce qui témoigne d'une absence de contamination (comme observé dans l'expérience 1). De plus le bac d'incubation de sol  $^{15}\text{N}$  montre un pourcentage d'atome de  $^{15}\text{N}$  trois fois plus élevé que dans le sol témoin et le sol  $^{14}\text{N}$ , confirmant que le niveau de marquage du sol est suffisant pour observer des différences entre traitements (Figure 8 A).



**Figure 8 : Effet des traitements split-root sur le pourcentage de <sup>15</sup>N dans : (A) le sol des bacs d'incubation. Ctrl : sol témoin sans ajout de N ; Sol <sup>14</sup>N : sol avec ajout de <sup>14</sup>N ; Sol <sup>15</sup>N : sol avec ajout de <sup>15</sup>N ; (B) le sol en fin d'expérience. CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l'autre ; CaMC : 50% de turricules marqués broyés et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l'autre ; CaMF : 50% de turricules marqués intacts et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments.**

En fin d'expérimentation, le sol du compartiment B des traitements CoS et CaS contient comme attendu un pourcentage d'atome de <sup>15</sup>N plus élevé que le compartiment A. On observe également que la teneur en <sup>15</sup>N dans le compartiment B est plus élevée quand ce compartiment est rempli de sol (CoS) que de turricules (CaS). Dans les traitements où la distribution est homogène (CoM, CaMC et CaMF), la teneur en <sup>15</sup>N est particulièrement stable, indépendamment de la présence/absence de turricules.

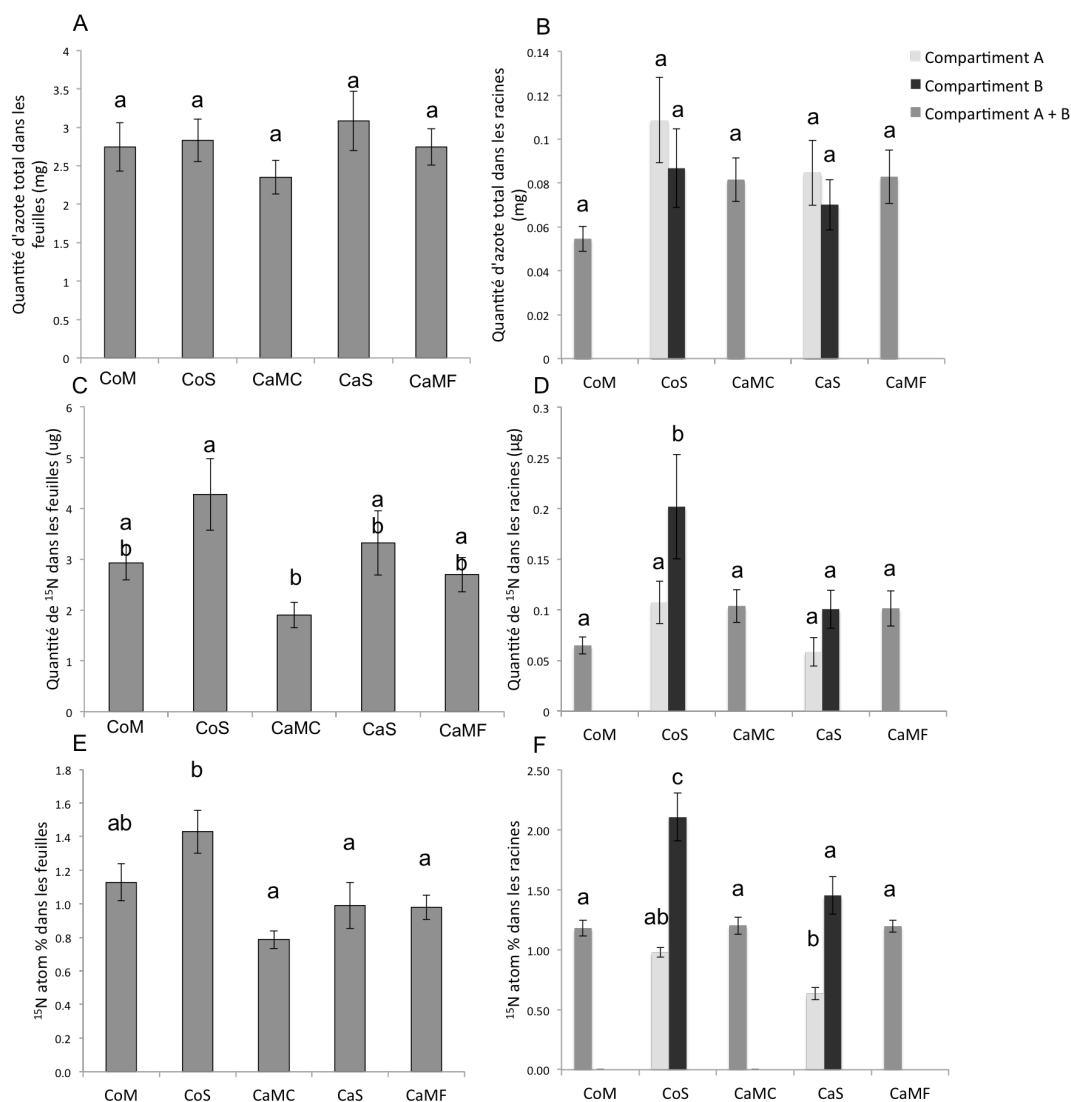
### 3. Racines

La quantité d'azote total ( $N_{\text{tot}}$ ) absorbée par les racines reste la même quelque soit le traitement split-root appliqué ( $P = 0,2$ ). Aucune différence significative de  $N_{\text{tot}}$  entre les

compartiments A et B n'a été observée (Figure 9B). On remarquera que la moyenne du traitement CoM est la plus basse.

Concernant la quantité de  $^{15}\text{N}$  ( $Q^{15}\text{N}$ ) assimilée par les racines, on remarque une absorption de  $^{15}\text{N}$  des racines plus importante dans le compartiment B du traitement CoS que dans celui du traitement CaS (Figure 9D). De plus, la différence entre les compartiments A et B observée en CoS n'est pas observée en CaS. Malgré la présence de turricules dans les traitements CaMC et CaMF,  $Q^{15}\text{N}$  reste constante dans les traitements CoM (sans turricules), CaMC et CaMF.

La quantité de  $^{15}\text{N}$  ( $Q^{15}\text{N}$ ) et le pourcentage d'atome de  $^{15}\text{N}$  ( $\%^{15}\text{N}$ ) dans le compartiment B sont plus élevés lorsque ce compartiment est rempli de sol que lorsqu'il est rempli de turricules (Figure 9D & F).



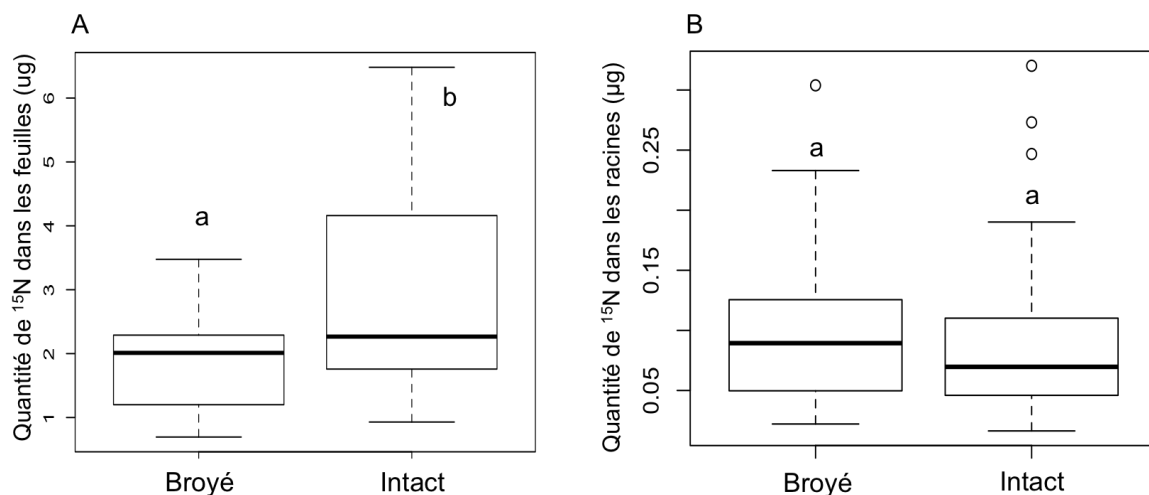
**Figure 9 :** Effet des traitements « split-root » sur : (A) la quantité d’azote totale dans les feuilles (mg); (B) la quantité d’azote totale dans les racines (mg) ; (C) la quantité de <sup>15</sup>N dans les feuilles (µg) ; (D) la quantité de <sup>15</sup>N dans les racines (µg) ; (E) la teneur en <sup>15</sup>N dans les feuilles (atom %) ; (F) la teneur en <sup>15</sup>N dans les racines (atom %). CoM : 50% sol marqué et 50% non marqué dans chacun des deux compartiments ; CoS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de sol marqué dans l’autre ; CaMC : 50% de turricules marqués et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments ; CaS : 100% de sol non marqué dans un compartiment, 100% de turricules marqués dans l’autre ; CaMF : 50% de turricules marqués intacts et 50% de sol non marqué dans chacun des deux compartiments.

#### 4. Feuilles

Le  $N_{\text{tot}}$  dans les feuilles ne diffère pas quelque soit le traitement split-root appliqué ( $P = 0,5$ ) (Figure 9A). Cependant il existe une différence significative pour  $Q^{15}\text{N}$  et  $\%^{15}\text{N}$  entre les traitements CoS et CaMC, qui correspond à un effet négatif des turricules broyées et distribuées de manière homogène au sein des compartiments sur l'absorption de  $^{15}\text{N}$ .

#### 5. Effet de l'intégrité des turricules sur l'absorption d'azote

L'intégrité des turricules a un effet significatif sur la quantité de  $^{15}\text{N}$  présent dans les feuilles ( $P = 0,04$ ). En effet lorsque les turricules sont intacts, la plante absorbe plus de  $^{15}\text{N}$  que lorsqu'ils sont broyés (Figure 10A). Cependant, l'intégrité des turricules n'a aucun effet sur la quantité d'azote présente dans les racines ( $P = 0.5$ ) (Figure 10B).



**Figure 10 : Effet de l'intégrité des turricules sur la quantité de  $^{15}\text{N}$  en  $\mu\text{g}$  : (A) dans les feuilles ; (B) dans les racines**

## **Discussion**

### **Modification de la morphologie racinaire**

La distribution homogène ou hétérogène du marquage a eu un impact sur la longueur et la surface racinaire ainsi que sur le nombre de fourches. Cela signifie que le marquage du sol ou des turricules a un impact sur le développement de la plante, et peut constituer un artéfact expérimental malgré la faible quantité d'azote concernée (1 % de l'azote du sol).

En ce qui concerne l'effet des turricules, aucune différence morphologique racinaire n'a été observée entre les compartiments A et B dans le traitement CaS. Cette absence d'effet à un temps donné ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a pas eu de modification, celle-ci pouvant être temporaire ou subvenir à une autre date que celle de l'échantillonnage.

### **Modification du prélèvement d'azote par la plante**

Les différences de teneurs en  $^{15}\text{N}$  dans entre compartiments de sol, entre demi systèmes racinaires ou entre racines et feuilles pourraient être dues à de la translocation. Or nous observons que les teneurs en  $^{15}\text{N}$  dans le sol du bac d'incubation non marqué ( $^{14}\text{N}$ ) sont similaires à celles retrouvées en fin d'expérience dans le compartiment A des traitements CaS et CoS, ce qui témoigne de l'absence de translocation du  $^{15}\text{N}$  d'un compartiment à l'autre via le prélèvement et l'exsudation du système racinaire. En ce qui concerne la translocation entre demi systèmes racinaires via les parties aériennes, il serait possible de détecter une absence de translocation par une quantité ou une proportion de  $^{15}\text{N}$  dans le compartiment A non seulement inférieure au compartiment B, mais également aux racines se développant dans un

environnement où le marquage est distribué de façon homogène (CoM, CaMC, CaMF). C'est le cas dans le traitement CaS pour %<sup>15</sup>N. Toutefois, le marquage du compartiment A du traitement CoS (en terme de quantité et proportion de <sup>15</sup>N) est équivalent à celui des situations dans lesquelles le marquage est homogène (CoM, CaMC, CaMF), ce qui suggère une translocation entre les compartiments A et B de ce traitement. En ce qui concerne la translocation de <sup>15</sup>N des racines vers les feuilles, certaines tendances apparaissent mais aucune différence significative entre traitements n'a été observée.

La distribution homogène ou hétérogène du <sup>15</sup>N, entre les traitements CoM et CoS d'une part, et CaMC/CaMF et CaS d'autre part, n'a pas d'impact sur les teneurs en N<sub>tot</sub> ou en <sup>15</sup>N des racines ou des feuilles. Cela signifie que les modifications morphologiques observées ne se traduisent pas par une modification en termes d'efficacité à prélever l'azote. Cette absence du caractère adaptatif de la prolifération racinaire a fait l'objet de nombreuses interrogations (Robinson, 1994). Cette absence de lien entre « prolifération racinaire » et prélèvements a déjà été observée. Ce paradoxe a été levé par des expérimentations où plusieurs plantes sont cultivées dans un sol hétérogène : dans cette situation de compétition, les adaptations morphologiques sont suivies d'une modification des prélèvements et présentent un caractère adaptatif (Hodges et al., 1999 ; Robinson et Hodge, 1999).

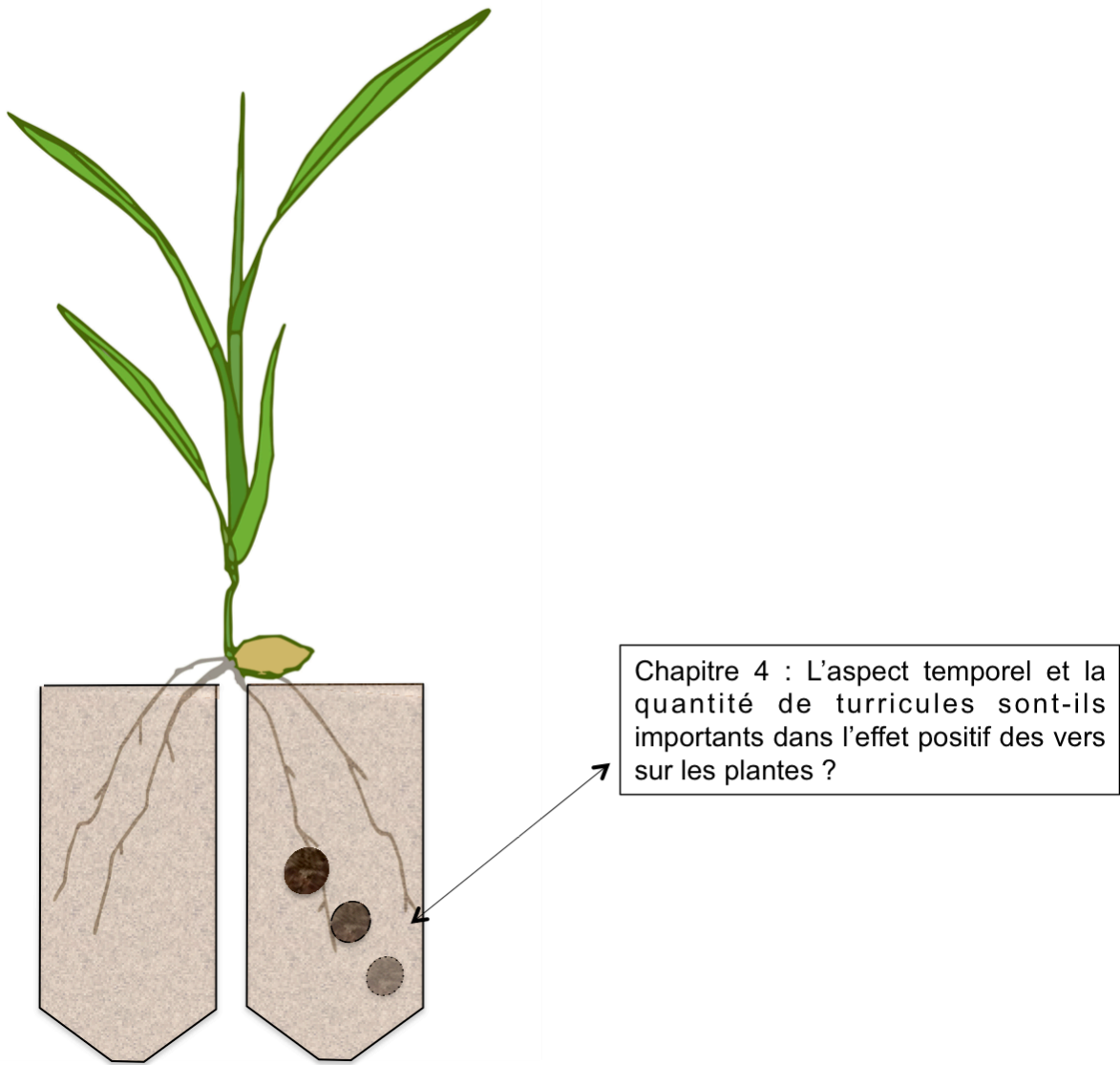
L'effet des turricules peut être analysé en fonction de leur distribution qui peut être soit homogène, soit hétérogène. Lorsque cette distribution est homogène (comparaison CoM et CaMC/CaMF), la présence de turricules n'a pas d'effet par rapport à la situation témoin avec du sol marqué. Lorsque cette distribution est hétérogène (comparaison CoS et CaS), on observe une teneur en <sup>15</sup>N du demi système racinaire du compartiment B de CoS supérieure à



celle de CaS. Cette différence au niveau des tissus racinaires est probablement le reflet de la différence observée dans le sol. L'appauvrissement du sol en  $^{15}\text{N}$  (0,78 % $^{15}\text{N}$  en CoS et 0,62 % $^{15}\text{N}$  en CaS, soit une baisse de 20%) pourrait être dû à une assimilation d'une partie du  $^{15}\text{N}$  par les vers de terre lors de la période d'incubation. Mais la différence plus importante observée au niveau des tissus racinaires (0,20 % $^{15}\text{N}$  en CoS et 0,10 % $^{15}\text{N}$  en CaS, soit une baisse de 50% en CaS) est probablement due à une immobilisation du  $^{15}\text{N}$  par les microorganismes des turricules de vers de terre. L'effet positif des turricules intacts (CaMF) par comparaison aux turricules broyés (CaMC) sur la teneur en  $^{15}\text{N}$  des feuilles observé Figure 10 suggère que cette immobilisation du  $^{15}\text{N}$  est plus forte lorsque les turricules sont broyés.

En conclusion, dans notre étude, les turricules n'ont pas d'effets bénéfiques sur l'assimilation d'azote par les plantes quelque soit leur distribution. Cette absence d'effet positif a déjà été observé, bien qu'en moyenne, une méta-analyse mette en évidence un effet positif des vers de terre sur les plantes (vanGroenigen et al, 2014). La variabilité de l'effet des vers sur les plantes pourrait être dû à une multitude de facteurs expérimentaux. En particulier à la nature des communautés microbiennes présentes dans le sol (Puga-Freitas et al., 2016). Etant donnée la dynamique particulière de l'azote dans les turricules, avec une période de production de  $\text{NH}_4^+$  suivie d'une production de  $\text{NO}_3^-$  (Lavelle & Martin, 1992 ; Lavelle et al., 1992 ; Aira et al., 2005 ; Zangerlé et al., 2014), il est également possible que l'âge des turricules et la durée de la période d'exposition de la plante aux turricules soient des éléments déterminants pour observer un effet positif des vers sur les plantes.

**Chapitre 4 : Étude de l'effet de l'âge et de la proportion de turricules sur la croissance et le développement de *Brachypodium distachyon* L.**



**Figure IV : Schéma représentant le dispositif split-root réalisé pour déterminer l'importance de l'âge et de la proportion de turricule dans l'effet positif des vers de terre sur les plantes**

La production de turricules par les vers de terre est en partie responsable de leur effet sur la croissance des plantes. Les turricules sont constitués d'un mélange complexe de matières organiques, minérales et de microorganismes, dans lesquels des processus de minéralisations de la matière organiques et la production de molécules signal ont lieu. L'ensemble de ces processus suit une dynamique temporelle complexe qu'il est nécessaire d'étudier pour comprendre les mécanismes selon lesquels les vers de terre améliorent la croissance des plantes. En effet, une adaptation racinaire de la plante à la dynamique des turricules pourrait permettre une meilleure efficacité de prélèvement de l'azote par la plante. Afin de tester cette hypothèse, une expérience a été mise en place dans laquelle l'âge et la proportion de turricules varient selon les traitements (Figure IV). Afin de quantifier le prélèvement d'azote par la plante provenant des turricules, ceux-ci ont été marqués au  $^{15}\text{N}$ . Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Plant and Soil*.

Plant-earthworm interactions : influence of age and proportion of casts in the soil on plant growth, morphology and nitrogen uptake.

Corinne Agapit <sup>1</sup>, Agnes Gigon <sup>1</sup>, Ruben Puga-Freitas<sup>1</sup>, Bernd Zeller <sup>2</sup>, Manuel Blouin <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris (UMR 7618 IEES-Paris, CNRS, INRA, UPMC, IRD, UPEC), 61 avenue du General de Gaulle, Creteil 94010, FRANCE

<sup>2</sup> INRA, Centre de Nancy Lorraine, UR 1138, Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (BEF), Labex ARBRE, Champenoux, France

<sup>3</sup>Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, FRANCE

Short title: Root systems adaptation to earthworm casts

Corresponding author: Manuel Blouin

Adress:

AgroSup Dijon

Département Agronomie Agroéquipements Elevage Environnement (2A2E)

26 Bd Docteur Petitjean

BP 87999

21079 Dijon Cedex, FRANCE

Email: manuel.blouin@agrosupdijon.fr

Keywords: biomass production; cast; earthworm; nitrogen cycle; plant development; root morphology.

## ABSTRACT

*Background and aims* Earthworms effect on plant growth is mediated by their dejections or “casts”, a complex mixture of organic matter, minerals and microbes. In casts, different processes such as organic matter mineralization and signal molecule production follow a complex temporal dynamics. An adaptation of root morphology to cast dynamics could allow an efficient nitrogen capture by the plant.

*Methods* The plant *Brachypodium distachyon* was grown in a laboratory experiment with different proportions of casts of increasing ages. Casts were labelled with  $^{15}\text{N}$  to quantify the plant N uptake from the casts. Plant biomass and morphology, especially root system structure, were analysed.

*Results* The age of casts had an effect on fine root length, highlighting the importance of the dynamics of cast maturation in root adaptation. Plant biomass production was affected by the interaction between the age and proportion of casts. A positive correlation between the  $^{15}\text{N}$  proportion in plant tissues and plant biomasses indicated that plants were more efficient in foraging N in casts than in the bulk soil.

*Conclusions* Our results suggested that both a timely adaptation of the root system structure and a significant proportion of casts are necessary to observe a positive effect of casts on plant growth.

## INTRODUCTION

Earthworms play a major role in soil functioning and provide valuable ecosystem services (Lavelle et al. 2006 ; Blouin et al. 2013). Considered as ecosystem engineers (Jones et al. 1994), they can modify soil physical structure and therefore impact water balance (Blanchart et al. 1999) and resource availability for other organisms such as plants (Laossi et al. 2009) and bacteria (Monard et al. 2011). Reviews on the impact of earthworms on primary production show an increase of the shoot production of plants in 75 % of the cases in tropical ecosystem (Brown et al. 1999) and 79 % of the cases in temperate ecosystems (Scheu 2003). A recent meta-analysis shows an increase of 23 % for aboveground biomass, 20 % for belowground biomass and 25 % for crop yield in the presence of earthworms (van Groenigen et al. 2014). Important progress has been made to understand the mechanisms involved in this positive effect, among the numerous physical, chemical, biochemical or ecological modifications induced by earthworms when they are active in a soil.

Endogeic earthworms mainly produce their casts below the surface of the soil (Bouché, 1977 ; Lee, 1985) where they regulate soil processes such as nutrient mineralization dynamics (Lavelle et al. 1997, Lavelle and Martin 1992 ; Aira et al. 2005). However, the persistence of casts in soil is still poorly understood. One study showed that casts can be distinguished from bulk soil using Near Infrared Spectroscopy (NIRS) until 45 days (Zangerlé et al. 2014). Fresh casts lose C with mineral N and P in the first two days following deposition, when microbial activity is intense, whereas organic matter conservation is maximum in aged casts, where microbial activity is reduced (Lavelle and Martin 1992):  $\text{NH}_4^+$  and microbial N peaked just after deposition and sharply decreased during the first two days, whereas  $\text{NO}_3^-$  progressively increased for the 16 days of observation, without reaching a

plateau (Lavelle and Martin 1992). Elsewhere, an increase of  $\text{NO}_3^-$  has been observed in casts from 0 to 30 days of incubation and then a slight decrease (Aira *et al.* 2005). Even if nitrogen mineralization is *a priori* an important process to understand the positive effect of earthworms on plant growth, it has been shown that it is not sufficient (Blouin *et al.* 2006 ; Laossi *et al.* 2009). Plant hormones such as auxin can be found in low molecular size humic fraction, especially in earthworm casts (Muscolo *et al.* 1998, Quaggiotti *et al.* 2004). This could be due to bacteria which produce higher levels of indole acetic acid (IAA) in the presence of earthworms (Puga-Freitas *et al.* 2012a). These signal molecules released in the presence of earthworms can have strong effects such as the modification of gene expression and the reversion of the *aux1.7-axr4.2* mutant phenotype (Puga-Freitas *et al.* 2012b).

Plant roots continuously grow and can enter into contact with casts previously deposited in the soil profile. On the other hand, earthworms continuously ingest soil and transform it in new casts, which could be deposited close to the rhizosphere of plants. Therefore, the understanding of earthworm effects on plant growth requires an examination of the synchronicity of the temporal dynamics of mineralisation processes in casts and root growth. It is also necessary to quantify the benefits in terms of nutrient acquisition by the plant that may lead to a positive effect of earthworms on plant growth. This can be achieved only if the plant has a relevant adaptive strategy of root development that allows it to exploit nutrient-rich soil microsites (Crick and Grime 1987 ; Gross *et al.* 1993 ; Jackson and Caldwell 1989; Jackson and Caldwell 1992; Larigauderie and Richards 1994), such as casts. But this strategy could have a cost, which is compensated only if the pay-back in terms of nutrient is significant (Arnone and Zaller 2014). The proportion of casts is thus likely to be decisive for the net effect of casts on plant growth.



The objective of this study was to determine if the age of casts and their proportion in the soil were important properties to understand the positive effect of earthworms on plant growth. We tested four hypotheses: (1) Changing the age of earthworms casts modifies the availability of mineral nitrogen with consequences on plant morphology and growth; (2) Changing the proportion of casts in the soil modifies plant morphology and growth; (3) root system morphology vary in the presence of casts, with an increase of the length of fine roots; (4) the uptake of nitrogen from casts is an advantage for the plant as compared with an uptake in the bulk soil.

## **MATERIALS AND METHODS**

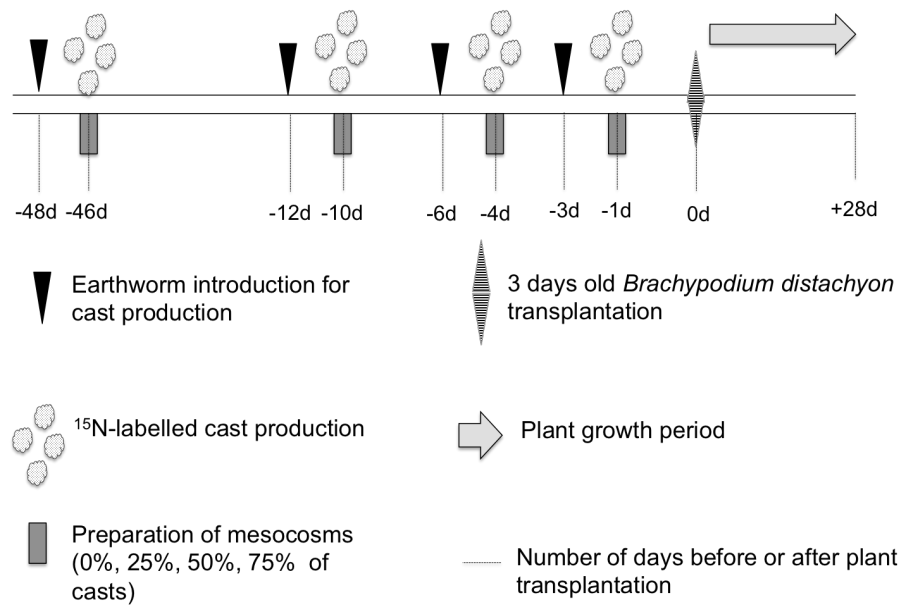
### **Soil characteristics**

Soil was collected in the research station Centre de Recherche en Ecologie Prédictive (CEREPEP in Saint-Pierre-les-Nemours, France, N 48° 17' 14.48", E 2° 40' 34.64"). The total organic carbon content is 14.7 g kg<sup>-1</sup> and the total nitrogen content is 1.19 g kg<sup>-1</sup>. The pH (water) is 5.22 and a cation exchange capacity (CEC) of 4.08 cmol kg<sup>-1</sup>. It is a nutrient poor cambisol with a sandy texture (6.9 % clay, 19.0 % silt, 74.1 % sand). The bulk density was close to 1.3g cm<sup>-3</sup>. The soil was air-dried at 25°C, sieved at 2mm mesh-size to remove macrofauna, roots and stones and stored at room temperature six months until the beginning of the experiment.

### Production of $^{15}\text{N}$ -enriched casts

Soil was labelled to produce  $^{15}\text{N}$ - enriched cast in order to quantify the proportion of N originating from casts. A powder of  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (99 atom %  $^{15}\text{N}$ ) was dissolved at 16 atom %  $^{15}\text{N}$  in a non-labelled  $^{14}\text{NH}_4^{14}\text{NO}_3$  powder. Before application to the soil, this mix was diluted in distilled water at  $0.321 \text{ mg ml}^{-1}$ , for a final volume equivalent to only 10 % of soil field capacity, to avoid the formation of aggregates due to soil humectation. Soil was carefully homogenized during the labelling and then, watered at 80 % of the field capacity. The amount of labelled N corresponded approximately to 1 % of the total N of the soil. From the concentration of the solution used to label the soil of the breeding box and the amount of casts used in each treatment, we calculated that the amount of  $^{15}\text{N}$  per pot was 20.06, 40.13 and  $60.19 \mu\text{g } ^{15}\text{N}$  for the treatments with 25, 50 and 75% of casts respectively (see below). We assumed that this amount of  $^{15}\text{N}$  was constant from the date of microcosm's preparation to the transplantation ( $t_0$ ).

Earthworms of the endogeic species *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) were collected at Itteville in France (N /S  $48^\circ 30' 17''$ , 31"E / O  $2^\circ 20' 1.553''$ ), transferred in a breeding box with the same soil as used in the experiment (see above) for acclimation and to allow purging of their gut contents. They were then introduced in a breeding box (38.5cm length, 36.5cm large and 27cm height) 48 days before plant transplantation ( $t_0$ ). To ensure to have casts of a given age in the different treatments, casts were retrieved by hand sorting from breeding boxes two days later (46 days before plant transplantation) and incubated in microcosms of the experiment waiting for plant transplantation at a proportion of 0%, 25 %, 50 % or 75 % v/v intact casts/total soil, with the remaining volume filled with control unlabelled soil. This procedure was repeated 24, 12, 6 and 3 days before plant transplantation ( $t_0$ ) to obtain 22, 10, 4 and 1 days-old casts when plant were transplanted (Figure 1).



**Figure 1 : Experimental protocol for the production of casts of different ages.**

Mesocosms were plastic pots with a size of 75 mm diameter and 100 mm height, with a 44 cm<sup>2</sup> surface and 317 cm<sup>3</sup> volume. The 4x5 treatments were replicated three times (N = 60). All treatments were kept in growth chamber with a 22/20°C day/night temperature, 80 % ± 5 % air moisture awaiting plant transplantation.

### Plant culture conditions

*Brachypodium distachyon* L. used in this experiment is considered as a model plant for the Poaceae family (Girin et al. 2014, Garvin 2007), which includes the most important crops worldwide. Seeds were first vernalized at 4°C for 3 days to synchronize the germination and put on a filter paper wetted with desionisated water in the dark for germination. After three days, plants were transferred in microcosms and grown 28 days under controlled condition in a growth chamber (S10H, Conviron, Canada) with a 22/20°C day/night temperature, 80% ± 5% air moisture and 10h photoperiod with artificial light at a constant intensity of 300 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at the leaf level.

### **Plant growth and root morphology**

After 28 days of growth, plant height was measured and the number of leaves and tillers was counted, by distinguishing between young (not fully expanded) and adult (fully expanded) leaves. The shoots were cut at the soil surface level, oven dried for two days at 45°C and weighed. Roots were retrieved by washing the soil.

Root measurements were carried out using with a digital scanner (Epson Expression 10000 XL, Epson America Inc., San Jose, CA, USA) coupled with the WinRhizo software (WinRHIZO, V. 2007 pro, Regent Instruments, Quebec, Canada). Calibration for the analysis of root morphology followed the recommendations of sensitivity analyses (Bouma et al. 2000; Himmelbauer et al. 2004) with a resolution of 400 dpi. Root length was measured for ten classes of root diameter (0–100, 100–200, 200–300, 300–400, 400–500, 500–600, 600–700, 700–800, 800–900, >900µm). To observe qualitative changes in root structure, we calculated a relative root length proportion per diameter class with the absolute length in a specific diameter class divided by the total root length. Roots were then dried for two days at 45°C and weighted.

### **Isotopic analyses**

Roots and shoots were ground to a fine powder prior to the analysis of their N concentration and their atom % <sup>15</sup>N. All samples were analysed at the PTEF platform at INRA Grand-Est Nancy, using a C-N analyzer (Carlo Erba NA1500) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (Finnigan delta S). To understand the effect of casts on plant N, we quantified the <sup>15</sup>N content in belowground, aboveground and total biomasses and calculate the

$^{15}\text{N}$  % atom which corresponds to the  $^{15}\text{N}$  concentration independently of the biomass production.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were conducted using the R software (R Core Team, 2014). We performed a two-way ANOVA and linear regressions with the age of casts and their proportion as factor or co-factor and biomasses and root morphology parameters as dependant variables. Multiple comparisons of means were performed using the Tukey test and were indicated on the figure by letters. The statistical significance was fixed at  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Plant biomass**

The ANOVA showed that root, shoot and total biomasses of plants were affected neither by the age of casts nor by their proportion, but marginally significant effects ( $0.05 < P < 0.10$ ) of the proportion was observed on root and total biomass. The interaction between the age and proportion of casts had a clear effect on shoot biomass (Table I).

**Table I Effects of the proportion of cast and the age of soil and cast maturation on aboveground and belowground development, and growth of plants estimated in a two way ANOVA**

|  | Df<br>F-<br>value | Proportion     | Age             | Proportion * Age |
|--|-------------------|----------------|-----------------|------------------|
|  |                   | 1              | 1               | 1                |
| Length (cm)                                |                   | 0.308          | <b>5.872 *</b>  | 0.354            |
| Projection area of root (cm <sup>2</sup> ) |                   | 0.538          | <b>5.347 *</b>  | 0.094            |
| Surface area of root (cm <sup>2</sup> )    |                   | 0.538          | <b>5.347*</b>   | 0.094            |
| Average diameter of root (mm)              |                   | 0.823          | 2.050           | 2.477            |
| Root volume (m <sup>3</sup> )              |                   | 0.836          | <b>4.517*</b>   | 0.000            |
| Number of tips                             |                   | 2.885          | <b>7.084*</b>   | 2.082            |
| Number of forks                            |                   | 0.926          | <b>11.287**</b> | 1.202            |
| Number of crossings                        |                   | 0.003          | <b>9.917**</b>  | 0.648            |
| Plant height (cm)                          | F-<br>value       | 1.053          | 1.763           | 2.269            |
| Total number of leaves (/plant)            |                   | <b>3,589 .</b> | 0,24            | <b>8,544**</b>   |
| Number of adult leaves (/plant)            |                   | 1.199          | 0.004           | <b>9.014**</b>   |
| Number of young leaves (/plant)            |                   | <b>6.366*</b>  | 0.962           | <b>3.776 .</b>   |
| Numbers of tillers (/plant)                |                   | <b>5,599*</b>  | 0,228           | <b>5,58*</b>     |
| Aboveground biomass (g)                    | F-<br>value       | <b>2,886 .</b> | 1,135           | <b>4,654*</b>    |
| Belowground biomass (g)                    |                   | 1.743          | 0.999           | 0.091            |
| Total dry biomass (g)                      |                   | <b>3.001 .</b> | 1.297           | 2.540            |
| Shoot root ratio                           |                   | 0.188          | 0.233           | <b>11.571 **</b> |

0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Linear regression showed a positive and linear correlation between the proportion of casts and the aboveground biomass ( $P=0.005$ ) only for the oldest casts (46 days old) (Figure 2a), with a 57 % increase in aboveground biomass between 0 and 75% casts. Fresh cast had no effect whatever the proportion of cast (Figure 2) (Table II). No effect on the belowground biomass was observed.

**Table II : Means  $\pm$  s.e of treatments with different age (1, 4, 10, 22, 46 days old cast) and proportion of cast (0%, 25%, 50%, 75%) on plant aboveground, belowground and total biomasses.**

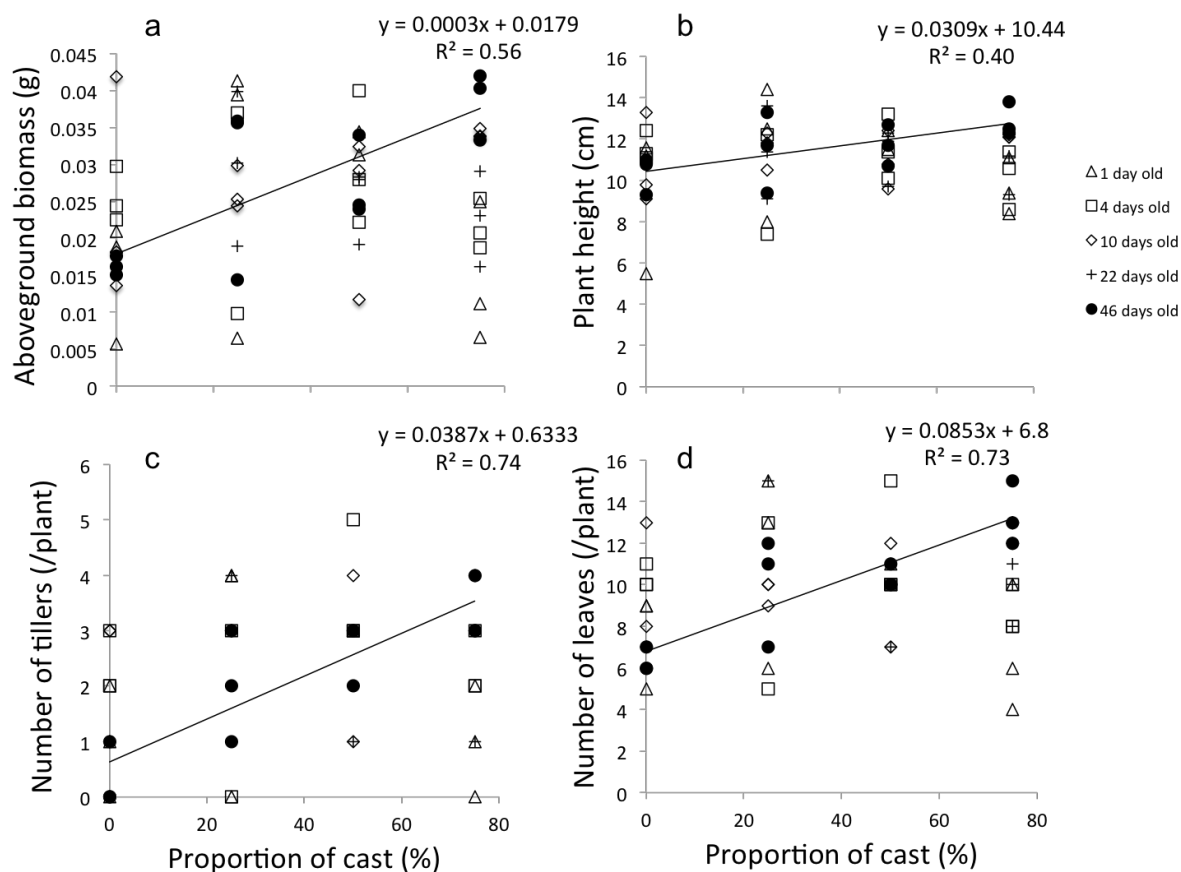
|                               |     |    | Proportion        |                    |                    |                    |
|-------------------------------|-----|----|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                               |     |    | 0                 | 25                 | 50                 | 75                 |
| Aboveground<br>biomass<br>(g) | Age | 1  | 0.015 $\pm$ 0.005 | 0.029 $\pm$ 0.011  | 0.033 $\pm$ 0.002  | 0.014 $\pm$ 0.006  |
|                               |     | 4  | 0.026 $\pm$ 0.002 | 0.023 $\pm$ 0.014  | 0.030 $\pm$ 0.005  | 0.022 $\pm$ 0.002  |
|                               |     | 10 | 0.025 $\pm$ 0.009 | 0.027 $\pm$ 0.002  | 0.024 $\pm$ 0.006  | 0.001 $\pm$ 0.0003 |
|                               |     | 22 | -                 | 0.030 $\pm$ 0.006  | 0.025 $\pm$ 0.003  | 0.023 $\pm$ 0.004  |
|                               |     | 46 | 0.016 $\pm$ 0.001 | 0.029 $\pm$ 0.007  | 0.028 $\pm$ 0.003  | 0.039 $\pm$ 0.003  |
| Belowground<br>biomass<br>(g) | Age | 1  | 0.005 $\pm$ 0.002 | 0.010 $\pm$ 0.0002 | 0.010 $\pm$ 0.0003 | 0.007 $\pm$ 0.003  |
|                               |     | 4  | 0.008 $\pm$ 0.001 | 0.008 $\pm$ 0.005  | 0.015 $\pm$ 0.004  | 0.007 $\pm$ 0.001  |
|                               |     | 10 | 0.007 $\pm$ 0.004 | 0.009 $\pm$ 0.0001 | 0.011 $\pm$ 0.004  | 0.012 $\pm$ 0.001  |
|                               |     | 22 | -                 | 0.010 $\pm$ 0.002  | 0.008 $\pm$ 0.001  | 0.008 $\pm$ 0.001  |
|                               |     | 46 | 0.011 $\pm$ 0.001 | 0.009 $\pm$ 0.001  | 0.010 $\pm$ 0.001  | 0.011 $\pm$ 0.001  |
| Total biomass<br>(g)          | Age | 1  | 0.020 $\pm$ 0.006 | 0.039 $\pm$ 0.011  | 0.043 $\pm$ 0.002  | 0.021 $\pm$ 0.009  |
|                               |     | 4  | 0.034 $\pm$ 0.003 | 0.032 $\pm$ 0.018  | 0.045 $\pm$ 0.004  | 0.028 $\pm$ 0.003  |
|                               |     | 10 | 0.032 $\pm$ 0.011 | 0.036 $\pm$ 0.002  | 0.035 $\pm$ 0.010  | 0.046 $\pm$ 0.001  |
|                               |     | 22 | -                 | 0.040 $\pm$ 0.009  | 0.033 $\pm$ 0.004  | 0.031 $\pm$ 0.005  |
|                               |     | 46 | 0.027 $\pm$ 0.002 | 0.038 $\pm$ 0.008  | 0.037 $\pm$ 0.0005 | 0.050 $\pm$ 0.004  |

## **Shoot morphology**

Shoot morphology was not affected by cast age but by the proportion of casts in soil or by the interaction between proportion and age (Table I). The proportion of casts affected the number of tillers and the number of young leaves, which were higher at 50 % ( $2.86 \pm 1.03$  and  $2.00 \pm 1.18$  respectively, mean  $\pm$  s.d.) than at 0 % ( $1.5 \pm 1.17$  and  $1.17 \pm 0.72$  respectively, mean  $\pm$  s.d). The height, total number of leaves and the number of adult leaves were not affected.

The interaction of the proportion of casts and their age affected the total number of leaves, the number of adult leaves and the number of tillers (Table I). We observed a positive and linear effect of the proportion of cast on the plant height, the number of leaves and the number of tillers ( $P=0.026$ ,  $P=0.0004$ ,  $P=0.0003$ , respectively) only with the oldest casts (46 days old) (Figure 2b, c, d). This indicated that the effect of the proportion was positive, but the size of this effect was dependant on the age of casts.



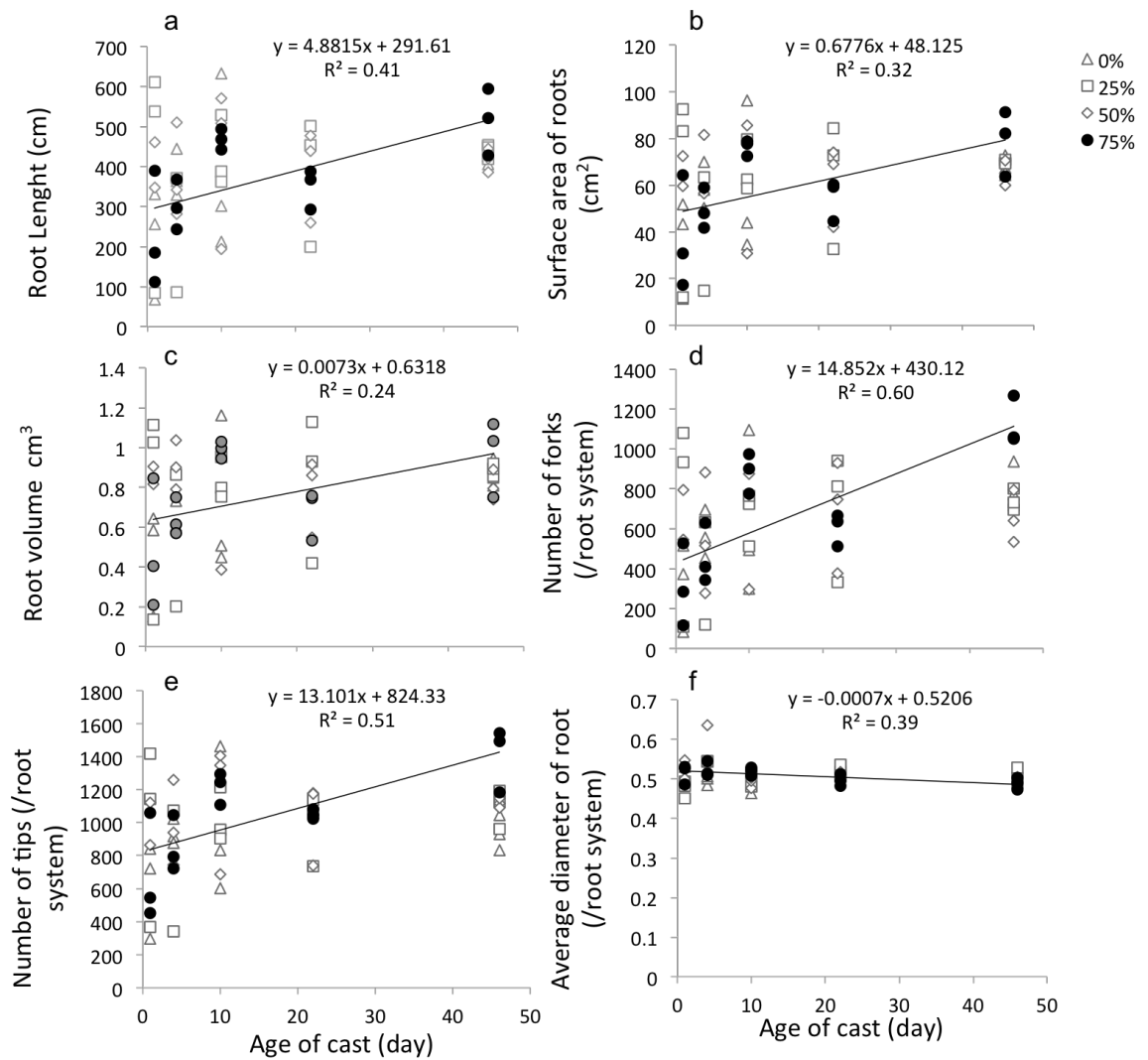


**Figure 2 :** Effect of the proportion of casts of different ages on the (a) aboveground biomass:  $y = 0.0003x + 0.0179$ ,  $R^2 = 0.56$ ,  $P = 0.005$ ; (b) plant height:  $y = 0.0309x + 10.44$ ,  $R^2 = 0.40$ ,  $P = 0.026$ ; (c) number of tillers:  $y = 0.0387x + 0.6333$ ,  $R^2 = 0.74$ ,  $P = 0.0003$ ; (d) number of leaves:  $y = 0.0853x + 6.8$ ,  $R^2 = 0.73$ ,  $P = 0.0004$ ; of *Brachypodium distachyon* L. ( $n = 3$  per proportion per age,  $N = 60$ ). Black filled symbols relate to the treatments with significant linear regression (black line) and open symbols to non-significant linear regressions.

## Root morphology

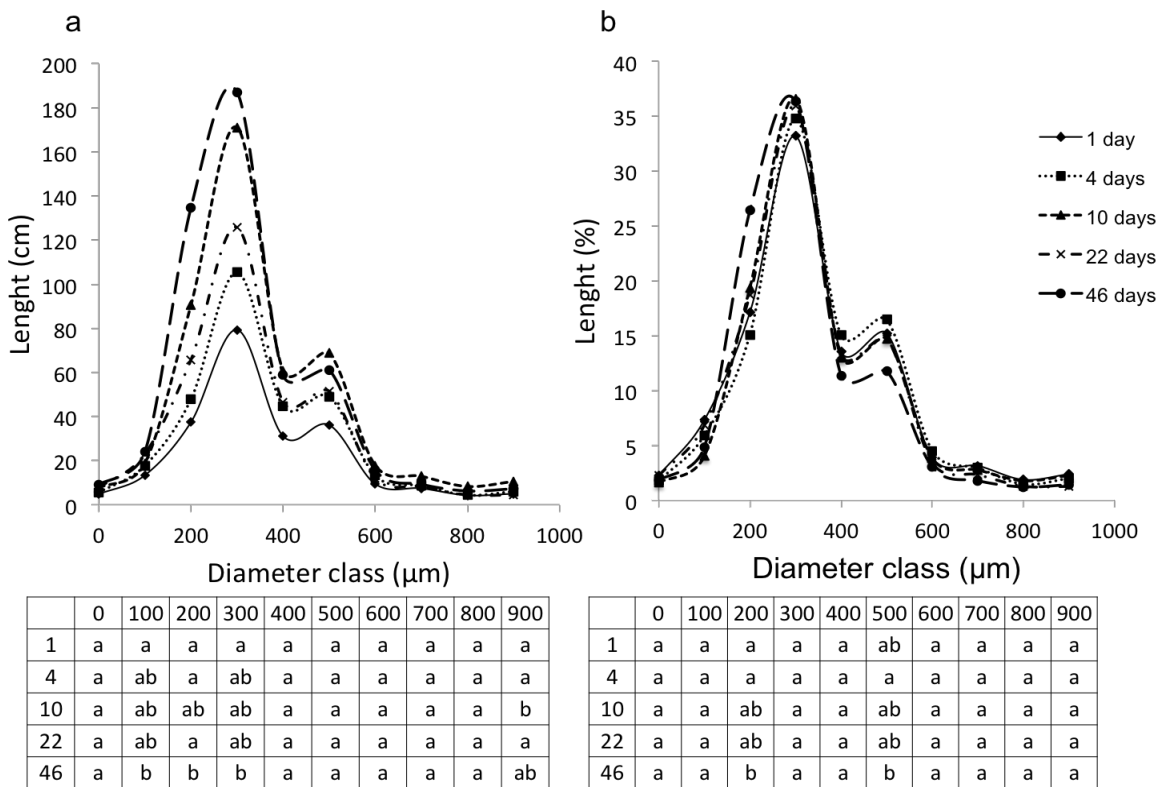
Contrary to shoot parameters which were affected by the proportion of casts, all root parameters except the average diameter of root were significantly affected by the age of casts (ANOVA in Table I). Conversely, the proportion of casts had no effect on root morphology. Regressions analysis revealed that the older the cast, the greater the root length produced ( $P = 0.01$ ) and the surface area of roots ( $P = 0.028$ ), but only for the highest proportion of casts (75%) (Figure 3a, b). Root volume was almost significantly affected ( $P = 0.067$ ) (Figure 3c). The

number of forks and tips, which refers to root system ramifications, strongly increased with the age of casts in the treatment at 75 % of casts ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.003$ , respectively) (Figure 3d, e). The average diameter of root was decreasing over age of casts for the highest proportion ( $P = 0.013$ ) (Figure 3f).



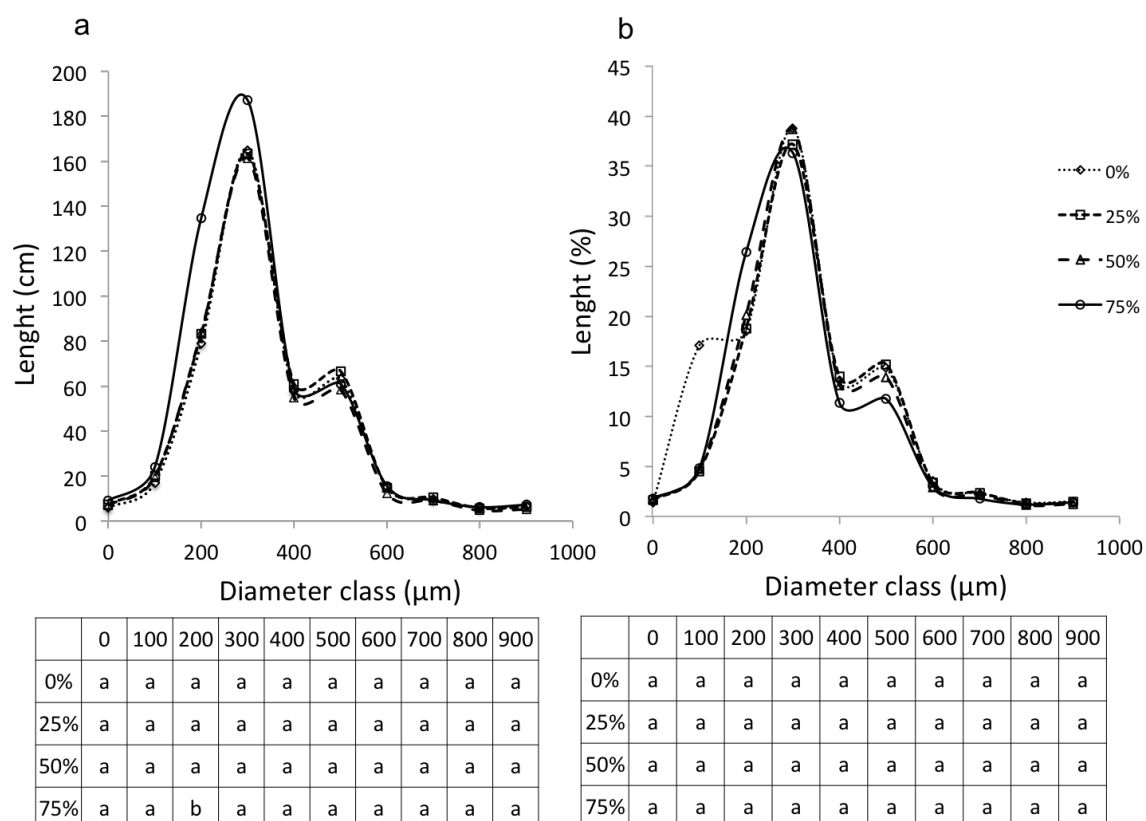
**Figure 3 : Effect of the age for four proportion on the: (a) Root length:  $y = 4.8815x + 291.61$ ,  $R^2 = 0.41$ ,  $P = 0.01$  \*; (b) Surface area:  $y = 0.6776x + 48.125$ ,  $R^2 = 0.32$ ,  $P = 0.028$  \*; (c) Root volume:  $y = 0.0073x + 0.6318$ ,  $R^2 = 0.24$ ,  $P = 0.067$  ; (d) Number of forks:  $y = 14.852x + 430.12$ ,  $R^2 = 0.60$ ,  $P = 0.0007$  \*\*\*; (e) Number of tips:  $y = 13.101x + 824.33$ ,  $R^2 = 0.51$ ,  $P = 0.003$  \*\* ; (f) Average diameter:  $y = -0.0007x + 0.5206$ ,  $R^2 = 0.39$ ,  $P = 0.013$  \* , for *Brachypodium distachion* L.,  $n = 3$ . Black filled symbols relate to the treatments with significant linear regression (black line), grey filled symbols to the almost significant regressions ( $0.05 < P < 0.10$ ) and open symbols to non-significant linear regressions.**

As the main effects were only observed at 75 % of casts (Figure 3), we displayed the absolute root length among ten diameter classes according to the age of casts only for this proportion. Results revealed two to three hierarchical levels with one small additional peak at 700 $\mu\text{m}$  (primary axes), one peak at 500 $\mu\text{m}$  (secondary axes) and a last one at 300 $\mu\text{m}$  (third axes) (Figure 4a) and maybe. When comparing the structure of the root for the five different ages, we noticed a trend for a higher length in each diameter class when the age of casts increased. The ANOVA and the Tukey test revealed significant differences among average lengths of the 1 day old and 46 days old casts, in the 100-200, 200-300 and 300-400  $\mu\text{m}$  diameter classes (Figure 4a). Relative lengths (absolute lengths reported to the total length) were affected only for two diameter classes (200 $\mu\text{m}$  and 500 $\mu\text{m}$ ) between the 1 or 4 days old and 46 days-old casts (Figure 4b). There was a higher relative root length in the 200-300  $\mu\text{m}$  class with 46 days-old casts than with 1 or 4 days-old casts and the opposite for the 500 $\mu\text{m}$  diameter class, suggesting that plants invest less in the secondary axes and more in the third axes (fine roots) in the presence of 46 days-old plants.



**Figure 4 : Root length distribution in diameter classes for 75% of casts (a) as absolute values (cm); (b) as relative values (%) according to the different age of casts (1 day, 4 days, 10 days, 22 days, 46 days). For clarity, results of the mean comparisons performed with the Tukey HSD test were put in a table, in which different letters correspond to a significant difference. *Brachypodium distachyon* L., means, n = 3 per age, N = 15 in total.**

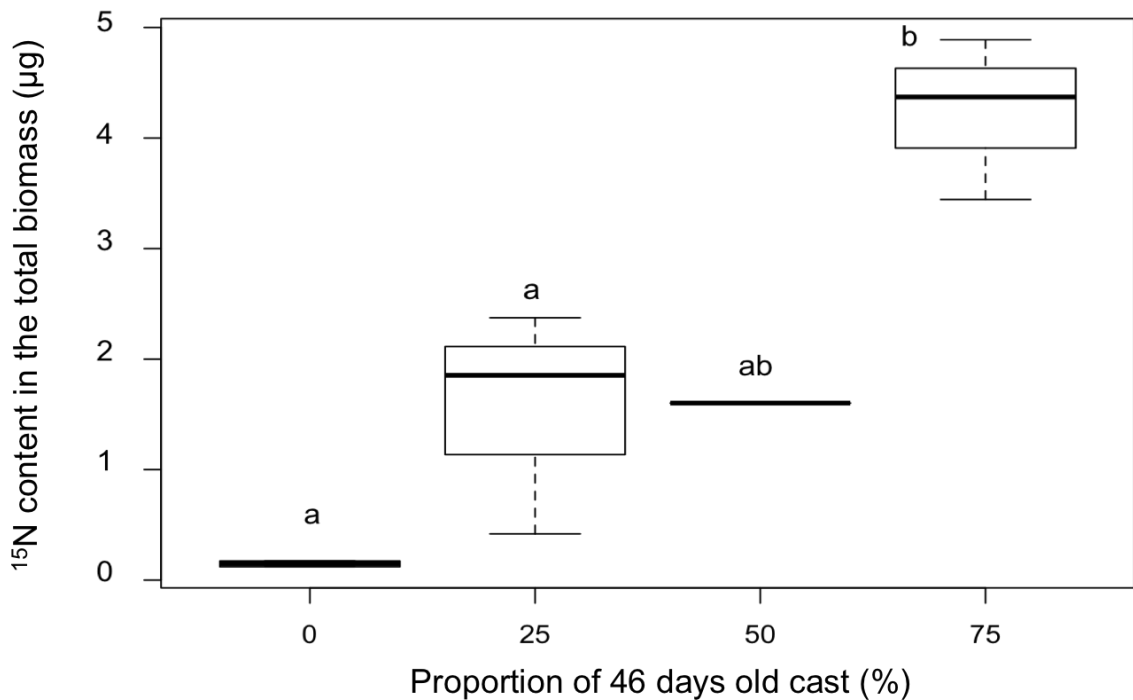
As the main effects on root system were observed at 46 days-old casts (Figure 2 and 3), we thus displayed root length distribution according to the proportion of casts only for this age. The proportion of cast had no impact on absolute and relative root lengths (Figure 5a, b), except the absolute length in the diameter class 200µm, which was higher at 75 % of casts as compared with other proportions (P = 0.02, 0.03 and 0.04 for the comparison with 0, 25 and 50 % respectively). We did not observe any qualitative changes when root length was reported to the total root length.



**Figure 5 :** Root length distribution in diameter classes for 46 days-old casts (a) as absolute values (cm); (b) as relative values (%), according to the different proportion of cast (0 %, 25 %, 50 %, 100 %). For clarity, results of the mean comparisons performed with the Tukey HSD test were put in a table, in which different letters correspond to a significant difference. *Brachypodium distachyon* L., means, n = 3 per age, N = 15 in total.

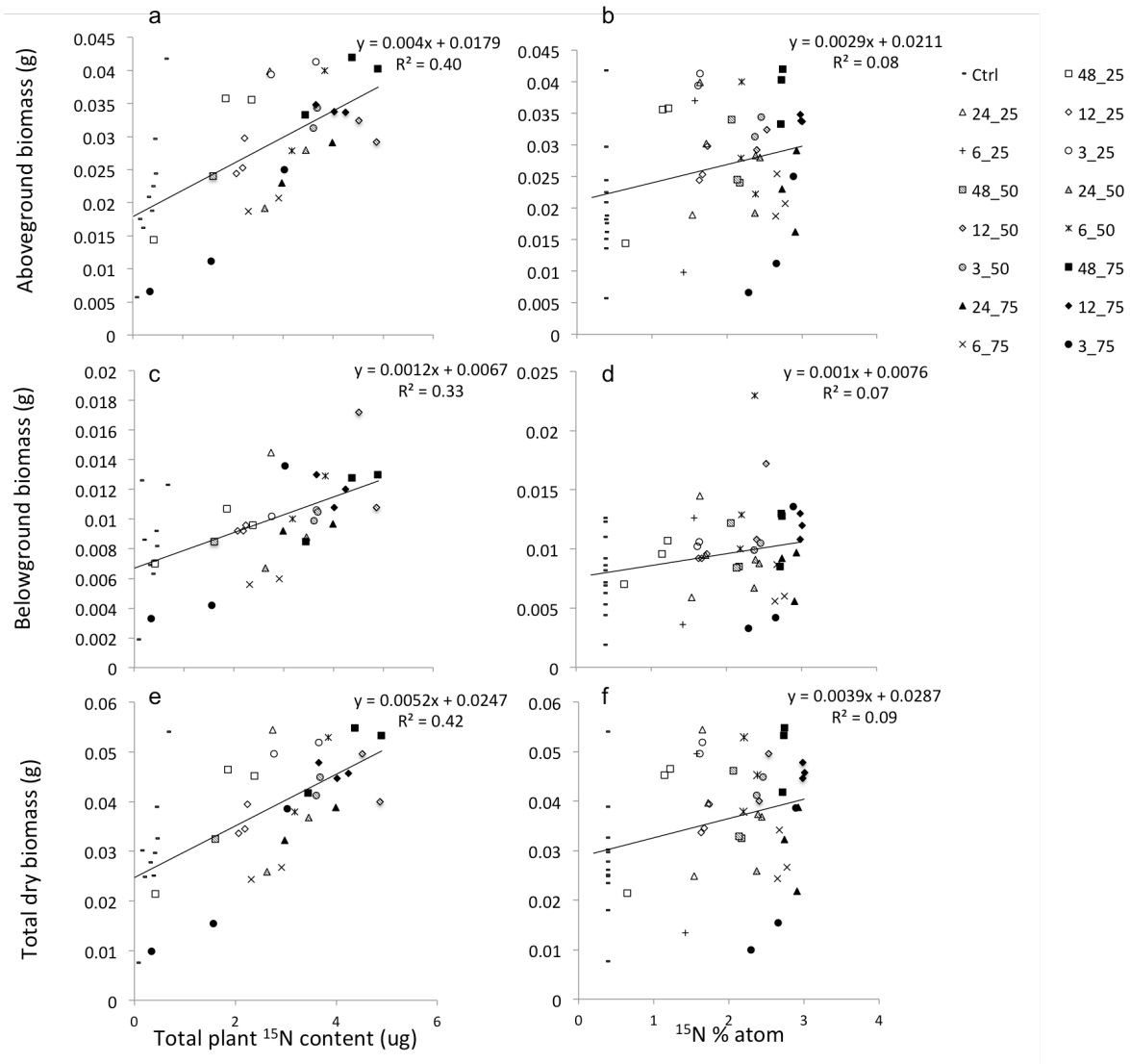
### Total nitrogen in plant

We found that the % N in plant tissues stayed stable among the different proportion and age treatments (Supplementary Information Annexe 1). Focusing on  $^{15}\text{N}$  originating from earthworm casts, we observed a 5-fold increase in the  $^{15}\text{N}$  uptake by the plant when the proportion of casts was high (75 %) compared to a plant grown without casts (Figure 6). Such an important increase was not observed at lower proportions (25 %, 50 %).



**Figure 6 :** Boxplot of the  $^{15}\text{N}$  content ( $\mu\text{g}$ ) in the total biomass of *Brachypodium distachyon* L. as function of the proportion of 46 days-old casts (0 %, 25 %, 50 %, 75 %). Different letters indicate significant differences (Tukey HSD test,  $P < 0.05$ ).

When all treatments were pooled to get a larger range of values, we observed a positive correlation between aboveground, belowground and total dry biomass production and the total  $^{15}\text{N}$  content in the plant (Figure 7a, c, e). Moreover, we observed a positive correlation between aboveground and total dry biomass production and the percentage of  $^{15}\text{N}$  in plant tissues ( $^{15}\text{N}$  % atom) with an almost significant positive correlation for the belowground biomass (Figure 7b, d, f).



**Figure 7 :** Relationship between the total <sup>15</sup>N content in the plant and the (a) aboveground biomass  $y = 0.004x + 0.02$ ,  $P < 0.001$ ; (c) belowground biomass  $y = 0.001x + 0.01$ ,  $P < 0.001$ ; (e) total dry biomass  $y = 0.005x + 0.03$   $P < 0.001$ . Relationship between the percentage of atom <sup>15</sup>N in plant tissues and the (b) aboveground biomass  $y = 0.003x + 0.02$ ,  $P = 0.035$ ; (d) belowground biomass  $y = 0.001x + 0.008$ ,  $P = 0.06$ ; (f) total dry biomass  $y = 0.004x + 0.03$ ,  $P = 0.027$ .

## DISCUSSION

Regarding our four hypotheses, we found that (1) the age of casts had an impact on root morphology, but not on shoot morphology or root and shoot biomasses; (2) the proportion of casts in the soil had an impact on shoot morphology and a marginal effect on plant growth,

but no effect on roots; this effect of cast proportion on shoot morphology and biomass was particularly significant when casts were old; (3) the root system morphology vary in the presence of casts, with an increase of the length of fine roots and the number of ramifications with the age of casts, at 75% of casts in the soil; (4) the amount of N taken up from the casts was higher when casts were abundant (75% of soil volume) than when they were less abundant (0 and 25%). Belowground, aboveground and total biomasses were positively correlated with the amount and proportion of  $^{15}\text{N}$  taken up from the casts, showing that N uptake in the casts is an adaptation leading to a better growth than N uptake in the bulk soil. Mechanisms involved in the effects of casts' age, proportion and the interaction between these factors and their consequences on plant development and growth are discussed below, because it helps to understand the positive effect of earthworms on plant growth. The dynamics of organic matter mineralization and nutrient release from the casts in the absence of plant growth was not studied, although this could be a valuable next step for future studies to help validate several of our interpretations.

### **1. Age of casts impacts root development and morphology**

The results showing that the age of casts enhanced the root length, volume of roots and the number of forks and tips indicates that the strongest effect was observed when casts were old (46 days old) with an increase of the fine roots length (100, 200, 300  $\mu\text{m}$  diameter) and ramification number (number of forks and tips). However the age of cast had no impact on aboveground morphology and biomass production. Such a qualitative effect is not typical from a trophic effect, due to a high amount of nutrient. Rather, it seems that modification of



the root morphology may be due to a signal detected by the plant, such as humic substances isolated from earthworm casts which exhibit hormone-like activity (Muscolo et al. 1998 ; Canellas et al. 2002, 2012 ; Quaggiotti et al. 2004 ; Blouin et al. 2005 ; Jana et al. 2010 ; Puga-Freitas et al. 2012b). Auxin-like compounds are well known to stimulate root growth (Taiz and Zeiger 2010). Nevertheless, the synthesis of such compounds in the earthworm casts need to match a discrete spatial and temporal window to enhance root growth. The life time in half-life of indole acetic acid (IAA) in soils is 37.8 hours in average (Martens and Frankenberger 1993). The age of 46 days for which we observed a positive effect of casts is far away from the life time of IAA. However, the growth of specific IAA-producing bacterial strains in earthworm casts (Puga-Freitas et al. 2012a) could appear rather late in the succession of microbes, which could explain why only old casts were responsible for the modification of root development.

Another possible signal could be associated with nitrate itself. Nitrate is not only a nutrient but also a signal compound responsible for a 2-fold increase in lateral root elongation rate (Zhang et al. 1999). In addition, the *axr4* auxin-resistant mutant was insensitive to the stimulatory effect of  $\text{NO}_3^-$ , suggesting an overlap between the  $\text{NO}_3^-$  and auxin response pathways. Whatever the mechanism involved, plants allocated more resources in root length and ramifications and developed an adaptive strategy with fine roots development in treatments with old casts compared to treatments with younger casts.

## 2. Proportion of casts and nitrogen uptake by the plant

Conversely to the age of casts, the proportion of casts had no impact on root morphology but on shoot morphology. In a certain way, to increase the proportion of cast is equivalent to increase the density of earthworms. In some cases, the relationship between the density of earthworms and the plant production is curvilinear, with a maximal positive effect on plant growth observed at intermediate density (Brown et al. 1999 ; Chan et al. 2004). In other cases, the increase in biomass production is linearly correlated with earthworm (*Aporrectodea caliginosa*) density (Baker et al. 1999). This is more in accordance with our observation of a positive correlation between plant production and cast proportion.

Even if the increased nitrogen availability in the presence of earthworms can not explain alone their positive effect on plant growth (Blouin et al. 2006 ; Laossi et al. 2009 ; Arancon and Edwards 2011) and if the involvement of hormone-like compounds in earthworm effect on plant has been demonstrated (Puga-Freitas et al. 2012), the involvement of nitrogen in earthworm effect has been validated with the results of a recent meta-analysis (van Groenigen et al. 2014). Casts are known to be rich in nutrients, especially  $\text{NO}_3^-$ , therefore the effect of their proportion on the shoot morphology could be directly linked to  $\text{NO}_3^-$ . Lavelle and Martin (1992) showed an increase of the total  $\text{NH}_4^+$  in the environment and an increase of the total microbial biomass the first days of release of cast by earthworms. Then, after two days,  $\text{NH}_4^+$  was nitrified, provoking a continuous release of  $\text{NO}_3^-$  during the 16 days of observation. Another study showed significant increase of  $\text{NO}_3^-$  (+35 %), from 0 to 45 days of incubation of casts of *Aporrectodea caliginosa*, with a peak when casts were 30 days old (Aira et al. 2005). Then, nitrate concentration decreased in 45 days old casts and finally got back to a concentration similar to the fresh cast. These observations of a high  $\text{NO}_3^-$

concentration in old casts are in accordance with our observation of an increase in  $^{15}\text{N}$  amount in the plant with 46 days old casts (Figure 7). From the  $\text{NO}_3^-$  content in casts measured by Aira et al. (2005) and the amount of nitrogen taken up by the plant in our experiment, we estimated that *Brachypodium distachyon* could found up to 20-30 % of the nitrogen requirements in the casts.

Several results converged towards a preferential N uptake from casts due to an adaptation of plants. Firstly, the percentage of N was stable in the plant (Supplementary information), showing that plant maintained its homeostasy : when N uptake is efficient, it allows the plant to growth and to dilute this N with other elements, whereas when N uptake is not efficient, it limits the growth (Blouin et al. 2012). Secondly, plant biomasses were positively correlated with the  $^{15}\text{N}$  amount in plant (Figure 7a,c,e). This showed that the higher proportion of casts in some treatments was probably responsible for an increase in plant growth. Thirdly, plant biomasses were positively correlated with the proportion of  $^{15}\text{N}$  in plant (Figure 7b, f). This showed that the plants growing the best are those taking the more N in casts as compared with the surrounding soil. This clearly demonstrated that plant foraging in casts was more efficient than in bulk soil and that plant developed a strategy of increasing its root length and ramification in the presence of casts.

### **3. A specific combination of age and proportion of casts improves plant biomass**

In our experimental conditions, casts have to be numerous and old to increase plant growth. This is the first demonstration that the kinetics of the various processes inside the casts is determinant to explain their effect on plant growth.

Plants have to adapt to their environment and use different strategies to improve the uptake of nutrients in heterogeneous soils. For example, they can increase the production of lateral roots to take advantage of the resources in “rich patch” (Robinson 1994; Hodge 2006; Crick and Grime 1987; Gross et al. 1993; Jackson & Caldwell 1989; Jackson & Caldwell 1992; Larigauderie & Richards 1994). This adaptive strategy leads to a better exploitation of resources, all the more so the heterogeneity of the environment increases (Kotliar 1990, Lamb 2004, Blouin et Puga-Freitas 2011). The increase of root length in the fine root diameter class suggested that plants may have responded the same way to earthworm casts as they have been shown to in nutrient-rich patches. Moreover, the way they allocate resources between the root and the shoot biomass depends on the amount of nutrients they can find and exploit (Hodge 2009). For plants, the cost of root production will depend on the root morphology, whereas the benefits will be closely link to the ability to exploit resources (Fitter 1994). Here, we observed that old casts were responsible for an adaptive strategy leading to an increasing fine root length and ramification number, possibly because of a signal perceived by the plant. Modifications of shoot morphology were dependent on the proportion of casts, which correlates with the amount of nutrient to be taken up. To our knowledge, this is the first demonstration that a morphological adaptation to old casts was responsible for an increased plant foraging of the N from casts as compared with the N from the bulk soil, which resulted in an increased biomass production. The ratio between the relative cost of the adaptive strategy and the benefit in terms of nutrient acquisition is thus at the heart of the effect of earthworm casts on plant growth.

## **Acknowledgements**

We thank Christelle Ngueda for the technical help and Beatriz Decenci re, Amandine Hansart and Florent Massol of the CEREEP - Ecotron IDF/UMS CNRS/ENS 3194 for soil provision.

This work was supported by grants from Région Ile-de-France, R2DS 2014-08 and by the French national program CNRS/INSU EC2CO. We are very grateful to Thomas Lerch and Naoise Nunan for their advices regarding the  $^{15}\text{N}$ -labeling of earthworm' casts.

## **Discussion générale et perspectives**

## 1. Synthèse des principaux résultats de la thèse

Les plantes sont des organismes sessiles vivants qui répondent aux contraintes de l'environnement *via* des adaptations physiologiques et morphologiques. Celles-ci ont dû s'adapter aux modifications induites par les vers de terre avec lesquels elles sont en contact depuis près de 500 à 600 millions d'années (Blouin, 2013). L'impact positif des vers de terre sur les plantes a été observé depuis plusieurs décennies. De nombreuses hypothèses ont été émises concernant les mécanismes écologiques responsables de cet effet positif. Cependant, il reste difficile d'établir la part que prend chacun de ses mécanismes dans cet effet positif car ils se produisent en même temps (Blouin 2005).

Les vers de terre vivent à proximité des racines des plantes qui elles, se développent et s'adaptent constamment à leur environnement. Une autre difficulté pour déterminer les mécanismes responsables de l'effet des vers sur les plantes réside dans le fait qu'ils soient souvent transitoires. Pour pouvoir les observer et les évaluer, il faut donc être capable d'isoler ces mécanismes à la fois dans l'espace et dans le temps. Pour cela, il peut être nécessaire d'isoler la partie du système racinaire qui sera au contact des vers de terre, afin d'y détecter d'éventuelles différences avec les parties non exposées et ainsi caractériser l'effet des vers de terre pour en déduire les mécanismes prépondérants.

Au cours de ce manuscrit de thèse, nous avons abordé à travers quatre chapitres, différentes questions associées à l'effet des vers de terre sur les plantes (Figure 7, cf Introduction). Ci-dessous sont résumés les résultats principaux acquis lors de cette thèse.

## Chapitre 1 : Effet local et systémique des vers de terre sur la morphologie racinaire

Dans une première expérience en split-root sur l'orge et le riz, nous avons déterminé que les vers de terre n'ont pas d'effet sur la biomasse aérienne et totale (aérienne et racinaire) alors que cet effet positif est retrouvé dans 75% à 79% des expérimentations en présence de vers de terre (Brown, 1999 ; Scheu, 2003 ; Van Groenigen, 2014). La biomasse des vers de terre a cependant un effet positif sur la biomasse racinaire seule. De plus, dans notre étude, les vers de terre sont responsables d'adaptations morphologiques des racines de la plante à travers une augmentation relative de la longueur des racines fines et une diminution de la longueur relative des racines épaisses. Le mécanisme selon lequel en présence de vers de terre, on observe une plus grande disponibilité des nutriments est souvent proposé pour expliquer ce type de modification morphologique. En effet, la plante en présence de nutriments disponibles va privilégier l'émission de racines fines et donc les échanges avec le sol pour bénéficier d'un maximum de ressources, ce qui lui permet *in fine* d'acquérir une quantité donnée de nutriments avec un investissement d'énergie minimal dans le système racinaire (Jana et al, 2010). A l'inverse d'autres études ont montré que la présence de vers de terre impactait négativement la biomasse des racines fines (Bertrand, 2015 ; Castellanos Suarez et al. 2014 ; Jana et al, 2010). Ces divergences dans les études suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués et que l'augmentation de la disponibilité des nutriments n'est pas un mécanisme suffisant pour expliquer à lui seul l'effet positif des vers de terre (Blouin et al. 2006; Laossi et al. 2010). L'émission de molécules signal tel que des hormones appartenant à la famille des auxines, pourrait également être responsable des adaptations morphologiques observées (Puga-Freitas et al. 2012a,b). Dans notre étude, aucun effet localisé des vers au sein des compartiments split-root n'a été observé sur la croissance et le développement racinaire,



cependant on retrouve un effet positif de la biomasse des vers à l'échelle de la plante entière sur la biomasse, le volume, la surface et la longueur racinaire. De plus l'abondance des vers de terre a modifié les longueurs relatives des racines dans certaine classe de diamètres de manière linéaire pour l'orge et hyperbolique pour le riz.

Les résultats de notre étude indiquent donc que les vers de terre ont un effet systémique sur la croissance et le développement des plantes et que cet effet est un effet « dose réponse » dépendant de l'abondance de vers (Figure V)

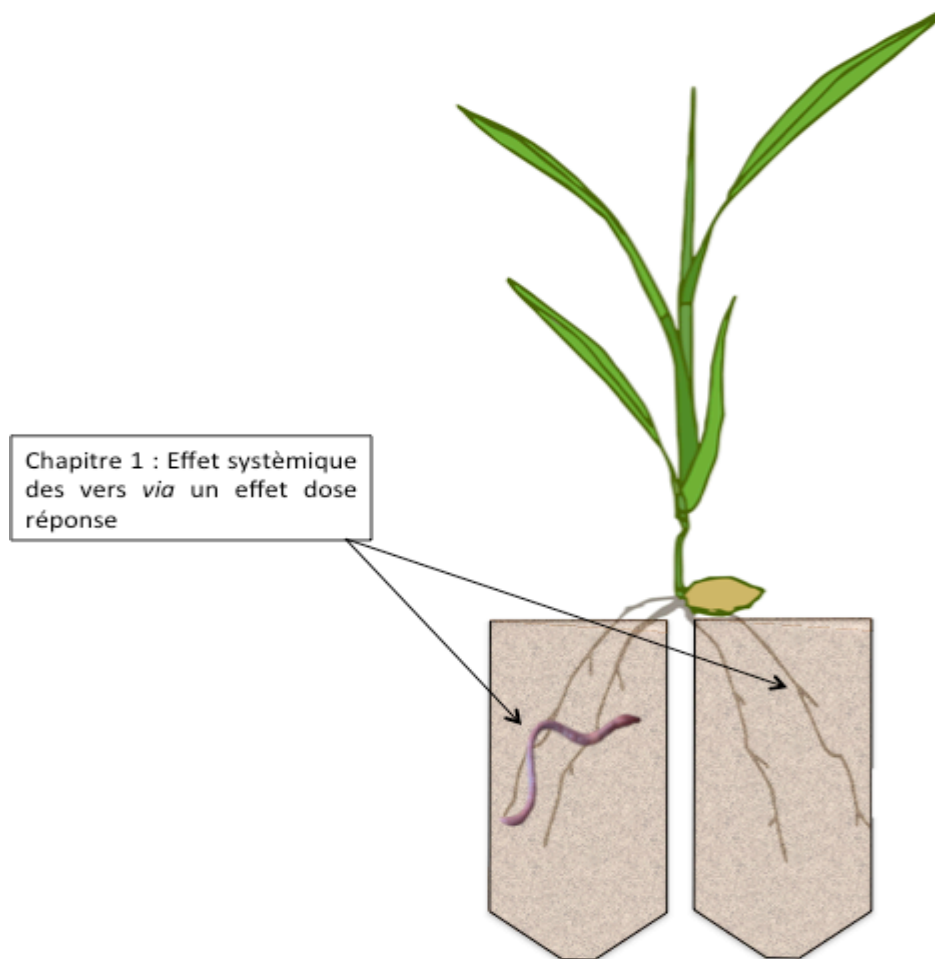
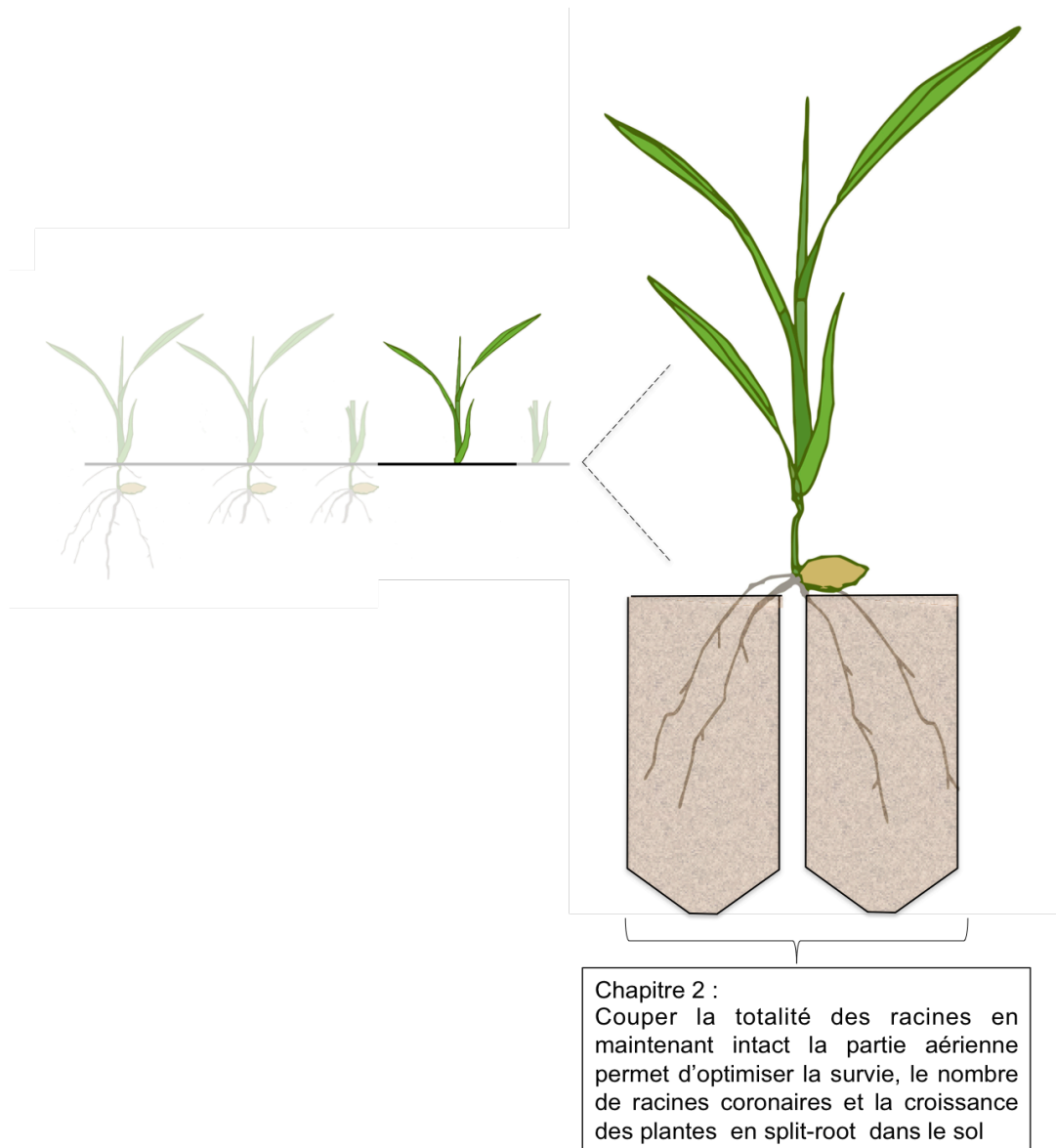


Figure V : Schéma des principaux résultats du chapitre 1

Une forte variabilité intra-traitement malgré un grand nombre de réplicats a été observée et peut être responsable de l'absence d'effet visible des vers de terre sur certains paramètres mesurés y compris au niveau des deux demi-systèmes racinaires. Cette variabilité est probablement due à la difficulté de séparer physiquement les racines en deux parties équivalentes physiologiquement et morphologiquement parlant. Cette limite expérimentale a rarement été étudiée et met en évidence la nécessité d'optimiser le système split-root.

## Chapitre 2 : Optimisation du système split-root

L'expérience méthodologique visant à optimiser le système split-root sur la plante *Brachypodium distachyon* montre que lorsqu'on coupe entièrement les racines de la plante tout en maintenant intact son système aérien, on obtient une survie importante et un nombre de racines coronaires suffisant dans le dispositif split-root. En testant différents protocoles de coupes (des systèmes aérien et racinaire) on observe que la plante a besoin d'un système photosynthétique intègre pour résister à ce stress. Le substrat a également un effet sur la réussite du split-root avec dans notre cas un meilleur succès sur la survie, le nombre de racines coronaires et la croissance aérienne et racinaire, lorsque les plantes poussent sur du sol avant et pendant le split-root, plutôt que dans un milieu de culture hydroponique (Figure VI).



**Figure VI : Schéma des principaux résultats du chapitre 2**

Cette optimisation du dispositif split-root nous a permis de faire chuter la variabilité des paramètres racinaires analysés due aux compartiments du split-root système à moins de 1% de la variance totale observée (cf Chapitre 2).

Chapitre 3 : Importance de la présence de turricules et de leur distribution sur le prélèvement d'azote par les plantes

Deux expériences en split-root sur *Brachypodium distachyon* ont été réalisées mais dans les deux cas aucun effet des turricules de vers de terre n'a été observé. La première expérience réalisée avant l'optimisation du dispositif split-root a révélé la difficulté d'obtenir une survie des plantes suffisante pour l'étude de l'hypothèse selon laquelle les vers de terre améliorent la croissance des plantes *via* le couplage entre flux d'azote et émission de molécules signal dans les turricules. Une fois l'optimisation du système split-root réalisé, nous n'avons toujours pas observé d'effet des vers de terre sur les morphologies aérienne et racinaire et sur l'absorption d'azote dans la deuxième expérience. Cette absence d'effet pourrait être due à une séquestration de l'azote par les microorganismes des turricules de vers. L'amélioration de la croissance des plantes *via* l'amélioration du prélèvement d'azote couplée à un développement racinaire dirigé par des molécules signal (Figure VII) devait initialement être étudiée en déterminant si l'effet bénéfique des turricules régulièrement retrouvé dans la littérature était lié à une surexpression des gènes codant pour des transporteurs d'azote et d'auxine.

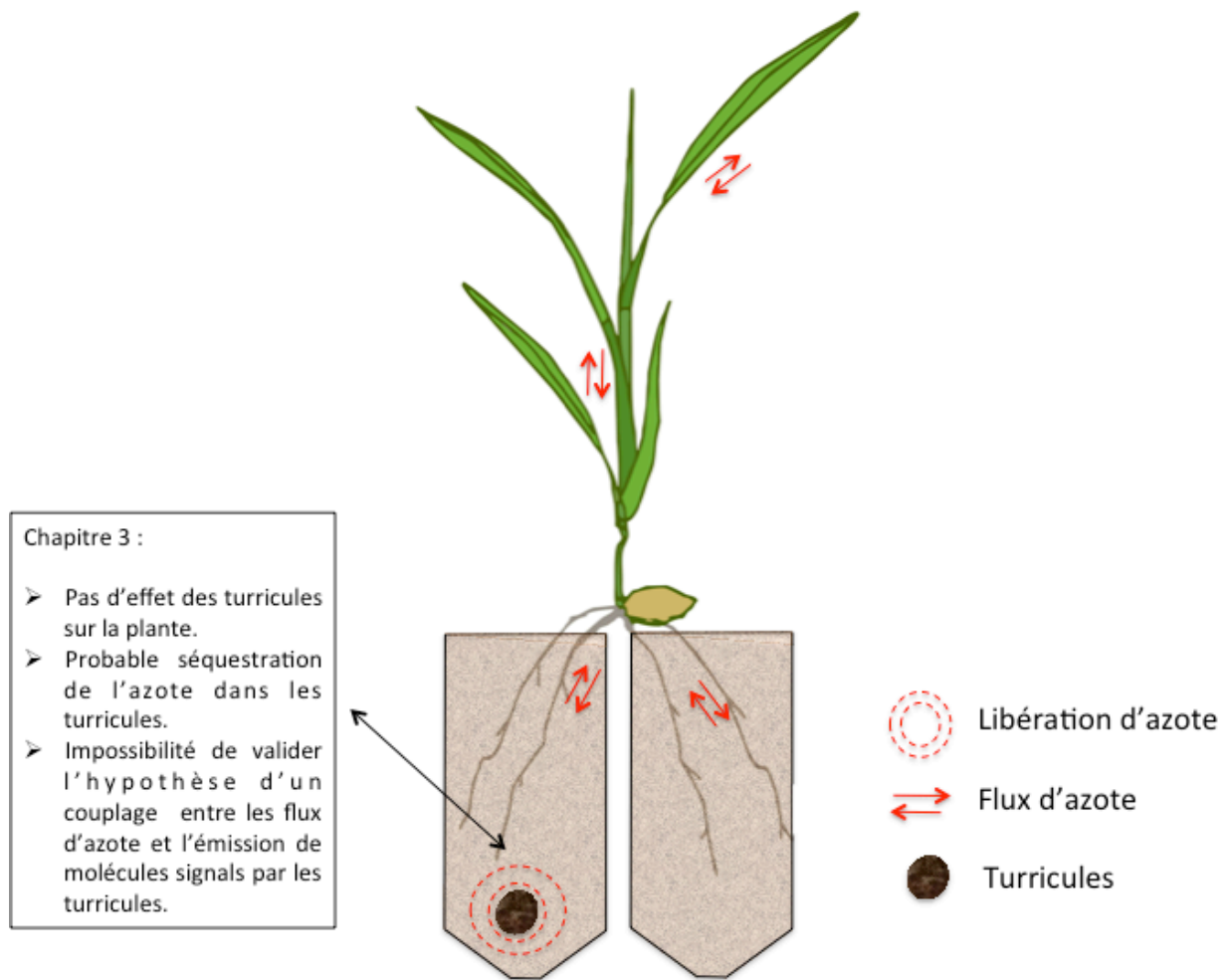


Figure VII : Schéma des principaux résultats du chapitre 3

Du fait de l'absence d'effet des turricules de vers de terre sur l'absorption d'azote, l'étude de l'expression de ces transporteurs de nitrates, d'ammonium et d'auxines a été écartée. Cette absence d'effet constatée dans cette expérience a soulevé des questions sur l'aspect temporel des mécanismes pouvant survenir en présence de vers. Comme évoqué précédemment, le caractère transitoire des processus microbiens de minéralisation ou d'immobilisation de l'azote dans les turricules rend la démonstration expérimentale difficile. On peut également s'interroger sur les différentes techniques employées pour valider notre hypothèse. En effet la complexité du dispositif expérimental utilisé (split-root, marquage

isotopique) ne permet pas de mettre en place un plan d'expérience suffisamment ambitieux pour un suivi temporel des processus potentiellement impliqués dans l'amélioration de la croissance des plantes en présence de vers de terre. De plus, les conditions expérimentales dans lesquelles nous nous trouvons sont des conditions très éloignées du milieu naturel. En effet, nous avons choisi d'utiliser des turricules de vers de terre marqués dans un dispositif où les racines des plantes sont séparées dans deux compartiments créant probablement un stress. Le cumul des difficultés associées aux techniques utilisées mais également les conditions expérimentales ont pu jouer un rôle déterminant dans l'absence d'effet des turricules observé sur les plantes lors de l'expérimentation.

La nature du modèle expérimental peut également être remis en question. En effet l'absence d'effets pourrait être dépendante de l'espèce végétale, du sol et de l'espèce de vers de terre utilisés. En changeant au moins une de ses composantes les résultats pourraient sensiblement différer.

#### Chapitre 4 : Effet de l'âge et de la proportion de turricules sur la croissance et le développement de *Brachypodium distachyon*

Dans cette dernière expérience nous avons déterminé l'importance de l'âge et de la proportion de turricules sur la croissance et le développement des plantes. La cinétique de minéralisation des turricules de vers de terre a été bien étudiée mais on observe que la majorité de ces études se focalise sur le flush de minéralisation ayant lieu dans les premiers jours de libération des turricules par les vers de terre. En effet, on constate au sein de ces déjections, une augmentation de l'ammonium et de l'azote microbien dans les premiers jours de libération des turricules (Lavelle et Martin 1992). Cependant une augmentation du flux de nitrates, qui est la forme de l'azote la plus utilisée par les plantes (Boudsocq, 2012), intervient

plus tardivement et peut ainsi influencer la croissance des plantes. Notre étude a révélé que l'âge des turricules a un effet sur la morphologie racinaire tandis que la proportion de turricules a un impact sur la morphologie aérienne de la plante. L'âge des turricules a un effet positif sur la longueur des racines fines lorsqu'ils sont présents en forte proportion révélant l'importance de la dynamique des turricules dans l'adaptation racinaire. De plus, la production de biomasse aérienne par la plante est influencée par l'interaction entre l'âge et la proportion de turricules. Une corrélation positive entre la proportion de  $^{15}\text{N}$  dans les tissus de la plante et les biomasses a également été observée (Figure VIII).

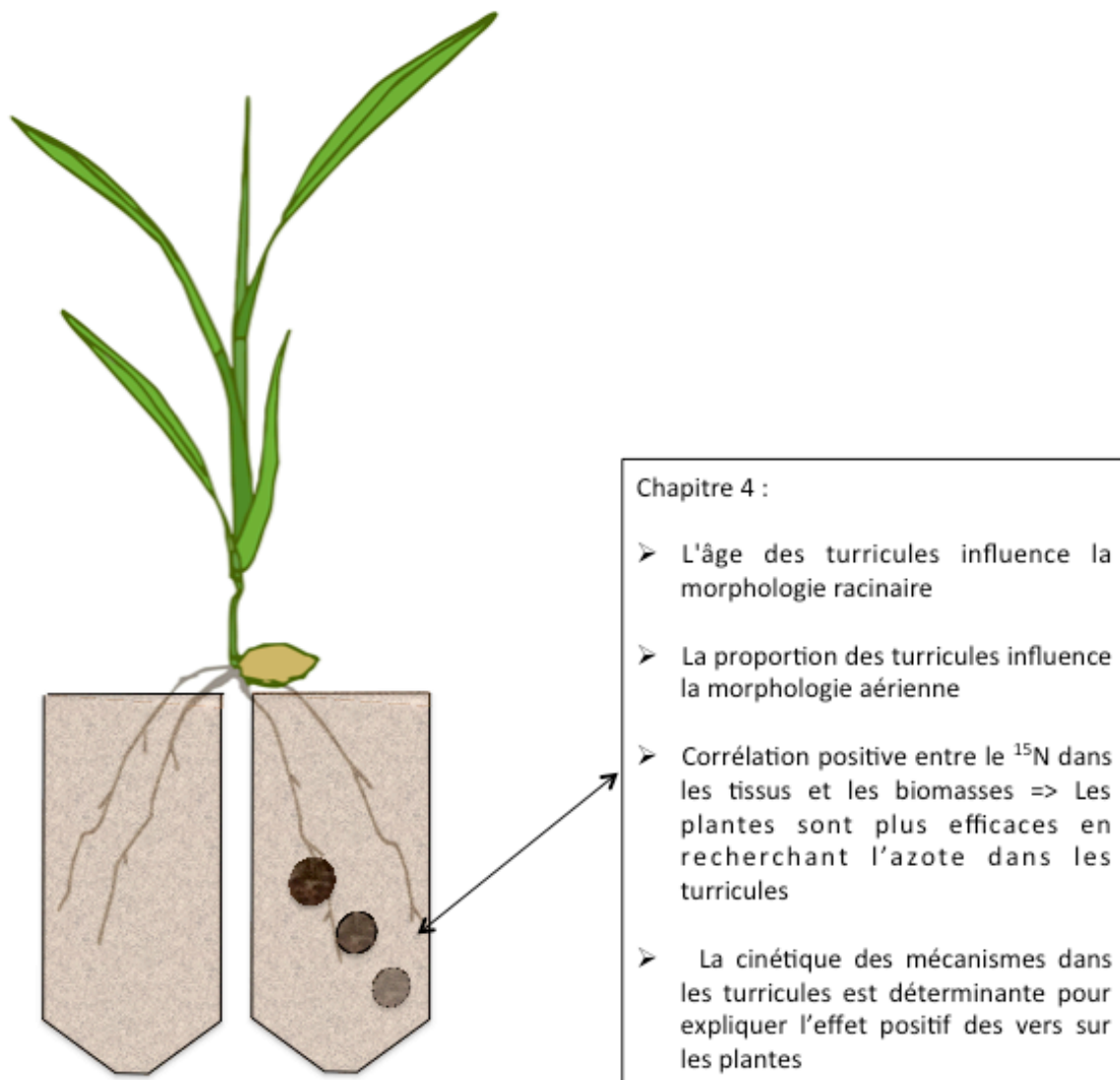
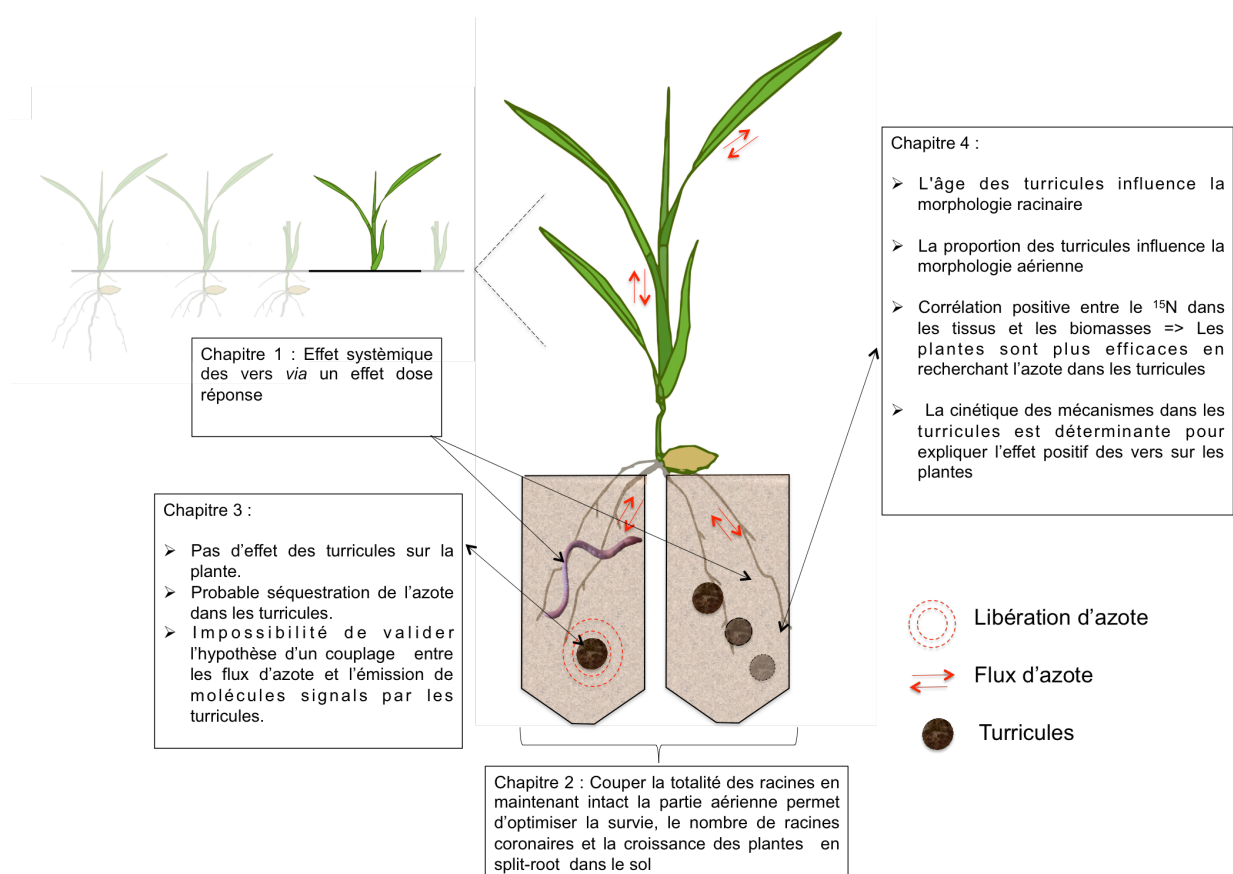


Figure VIII : Schéma des principaux résultats du chapitre 4

Cela démontre que les plantes sont plus efficaces en recherchant l'azote dans les turricules que dans le sol et que les plantes développent une stratégie d'augmentation des longueurs et des ramifications racinaires en présence de turricules. Ces résultats suggèrent donc qu'une proportion significative de turricules entraînant une adaptation du système racinaire est nécessaire pour observer l'effet positif des turricules sur la plante. Ces résultats sont la première démonstration que la cinétique des différents mécanismes ayant lieu dans les turricules est déterminante pour expliquer l'effet positif des turricules sur la croissance des plantes.

Les conclusions des différents chapitre de thèse sont présentées en Figure IX.



**Figure IX : Schéma général des conclusions obtenus pour les différents chapitres**



## 2. Perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, il a été difficile de démontrer l'hypothèse selon laquelle les vers de terre améliorent la croissance des plantes *via* un couplage de deux mécanismes : l'amélioration de la disponibilité en nutriments et l'émission de molécules signal par les bactéries présentes dans les turricules de vers de terre.

- L'une des premières difficultés rencontrées est la capacité à reproduire l'effet positif des vers sur les plantes notamment dans l'expérience décrite dans le chapitre 3. S'il est avéré que les vers de terre ont globalement un effet positif sur les plantes, ils existent de nombreux cas où ces effets sont absents voir délétères. Pourtant malgré l'ensemble des connaissances acquises sur les mécanismes à l'œuvre dans l'effet des vers sur les plantes, il est encore difficile de reproduire exactement les conditions pour lesquels un effet positif sera observé. Si au cours d'une expérimentation, un certain nombre de paramètres peuvent être contrôlés (paramètres climatiques, nature et tamisage/préparation du sol, arrosage), d'autres variables non contrôlées peuvent influencer drastiquement l'effet observé en fin d'expérience. En particulier, le sol est le réservoir d'une grande diversité de microorganismes avec près d'un milliard de bactéries et 10 000 espèces différentes dans un gramme de sol. Ces microorganismes du sol interagissent avec la rhizosphère et peuvent exercer des effets bénéfiques ou délétères sur les plantes selon les communautés impliquées. Or ces communautés peuvent différer selon l'endroit où le sol est prélevé (parfois au centimètre près), la date de prélèvement, le mode et la durée de stockage, la saisonnalité des contaminants (microbiens) et l'« horloge biologique » de la plante et sa concordance avec la

dynamique de la communauté microbienne (période de l'année à laquelle est réalisée l'expérimentation). L'ensemble de ces paramètres que l'on ne maîtrise pas soulève une question fondamentale sur la capacité à reproduire les mêmes communautés microbiennes supportant les mêmes fonctions (cycle de l'azote, émissions de molécules signals...) dans différentes expériences avec du sol naturel.

⇒ Perspective 1 :

Afin de garantir une reproductibilité des effets observés, il faudrait être capable d'identifier les communautés microbiennes impliquées par exemple dans les deux voies de signalisation de biosynthèse de l'Acide Indole Acétique les plus répandues (celle de l'indole 3-acétamide (IAAM) et celle de l'indole-3-pyruvate (IPDC)) et les standardiser.

Cependant des études suggèrent que le fait de vouloir réduire et contrôler un maximum de sources de variabilité biologique et environnementale aboutit à une amplification des effets due à des variations non mesurées entre les laboratoires (Richter, 2009 ; Richter, 2010). Cette volonté de standardisation a pour conséquence une diminution importante de la reproductibilité inter-laboratoire, créant ce qu'on appelle : « une crise de reproductibilité » (Milcu, 2018).

Pour évaluer cette capacité à reproduire une même expérience dans différents laboratoires et trouver des solutions pour améliorer la reproductibilité, une même expérience en microcosme a été réalisée au sein de 14 laboratoires européens dans le but de déterminer si l'introduction d'une « variabilité systématique contrôlée » (Richter, 2009 ; Richter, 2010) permet une augmentation de la reproductibilité (Milcu, 2018). Dans cette expérience, deux

plantes modèles (*Brachypodium distachyon* L. et *Medicago truncatula* Gaertn.) ont été mises en compétition. La variabilité génotypique contrôlée a été introduite *via* l'utilisation de différents génotypes et la variabilité environnementale contrôlée est introduite *via* une hétérogénéité du sol. Les résultats ont montré qu'introduire une variabilité génétique contrôlée permet de réduire de manière significative les écarts entre résultats obtenus dans des laboratoires différents et ainsi d'augmenter la reproductibilité inter-laboratoire (Milcu, 2018). La variabilité environnementale contrôlée a quant à elle, un faible impact sur la reproductibilité.

La capitalisation des connaissances passe par une reproductibilité efficace des expérimentations. A l'avenir, il serait donc intéressant de standardiser le maximum de variables tout en introduisant une variabilité contrôlée afin de pouvoir observer des effets de manière répétée.

- La seconde difficulté rencontrée au cours de la thèse est une résultante de la première. En effet pour pouvoir analyser un mécanisme aboutissant à un effet donné, il faut être capable de reproduire cet effet. Or, dans notre étude, nous avons voulu analyser l'association de deux mécanismes : l'amélioration de la disponibilité en nutriments et l'émission de molécules signal par les bactéries des turricules. Tester l'association de ces deux mécanismes nécessite la mise en place d'un certain nombre de témoins expérimentaux nécessaires pour identifier les mécanismes concernés. Dans l'étude permettant de répondre à notre hypothèse de départ (cf chapitre 3), nous avons réalisé l'expérience à deux reprises et n'avons pu obtenir de résultat concluant. Par ailleurs, le quatrième chapitre nous a permis de déterminer qu'il était important de prendre en compte la dynamique de l'azote au sein des turricules pour observer des effets positifs.

Enfin, l'ensemble des paramètres à prendre en compte pour répondre à notre hypothèse nécessite un grand nombre de réplicats qui doit être fortement accru lors de mesures destructives nécessaires à un suivi temporel. Tout ceci donnerait lieu à une complexification des dispositifs expérimentaux et de la palette méthodologique et analytique à utiliser.

⇒ Perspective 2 :

Afin de répondre à une question scientifique donnée, on pourrait procéder par étapes en faisant de la sélection de conditions expérimentales. En effet, en réalisant une expérience avec un nombre limité de facteurs dont les modalités sont nombreuses, on pourrait identifier les modalités les plus pertinentes et significatives et ne garder que ces modalités dans des expériences ultérieures avec un nombre de facteurs plus importants (dont on pourrait étudier les interactions ou suivre les effets au cours du temps) avec un nombre restreint de modalités. Dans notre cas, l'identification d'une proportion de turrucules importante (75% de turriucles) âgés de 46 jours (cf chapitre 4) et d'une durée d'exposition de la plante également importante (10 semaines de cycle de vie pour *Brachypodium distachyon* L.) nous permet d'envisager de reproduire l'expérimentation en split-root avec marquage de l'azote (cf chapitre 3) dans des conditions qui permettent de maximiser les chances d'observer des effets.

⇒ Perspective 3 :

Afin de répondre à l'ensemble des contraintes observées lors de l'étude de mécanismes en écologie, une solution alternative est de passer par une approche de méta-analyse. Cette approche consiste à caractériser les variables qui ne peuvent pas être standardisées. Par exemple, si les communautés microbiennes étaient caractérisées taxonomiquement (16S, ITS ...) et fonctionnellement (gènes du cycle de l'azote ou impliqués dans la synthèse de molécules signaux...) dans de nombreuses études portant sur l'effet des vers de terre sur les plantes, il serait possible, avec un nombre d'études suffisant, de déterminer comment la structure des communautés microbiennes influence l'effet des vers sur les plantes.

## **Références**

**-A-**

- Agapit C, Gigon A, Blouin M.** 2017. Earthworm effect on root morphology in a split root system. *Plant Biosyst* 1-7.
- Aira M, Monroy F, Domínguez J.** 2005. Ageing effects on nitrogen dynamics and enzyme activities in casts of *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Pedobiologia* 49:467-473.
- Altieri MA.** 1995. *Agroecology : The Science of Sustainable Agriculture*, 2nd ed, Boulder Co, Westview Press.
- Arancon NQ, Edwards CA.** 2011. The use of vermicomposts as soil amendments for production of field crops. In: Edwards CA, Arancon NQ, Sherman R (eds) *Vermiculture technology: earthworms, organic wastes and environmental management*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 129-151.
- Arnone JA, Zaller JG.** 2014. Earthworm effects on native grassland root system dynamics under natural and increased rainfall. *Front Plant Sci* 5152.

**-B-**

- Baker GH, Carter PJ, Barrett VJ.** 1999. Influence of earthworms, *Aporrectodea spp.* (Lumbricidae), on pasture production in south-eastern Australia. *Aust J Agr Res* 50:1247-1257.
- Barois I, Villemin G, Lavelle P, Toutain F.** 1993. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Geoderma* 56:57-66.
- Bertrand M, Blouin M, Barot S, Charlier A, Marchand D, Roger-Estrade J.** 2015. Biocontrol of eyespot disease on two winter wheat cultivars by an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Appl Soil Ecol* 96:33-41.

- Bityutskii NP, Lapshina IN, Vygovskaya AA.** 2002. Role of earthworms in mineralization of organic nitrogen compounds in soil. *Eurasian Soil Sci* 35:1100-1107.
- Blackman PG, Blackman PG, Davies WJ, Davies WJ.** 1985. Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *J Exp Bot* 36:39-48.
- Blanchart E, Albrecht A, Chevallier T, Hartmann C.** 2004a. The respective roles of roots and earthworms in restoring physical properties of Vertisol under a *Digitaria decumbens* pasture (Martinique, WI). *Agric Ecosyst Environ* 103:343-355.
- Blanchart E, Albrecht A, Alegre J, Duboisset A, Gilot, C, Pashanasi B, Brussaard L et al.** 1999. Effects of earthworms on soil structure and physical properties. Lavelle P, Brussaard L, Hendrix P (eds) *Earthworm management in tropical agroecosystems*. CABI publishing, pp 149-171.
- Blanchart E, Albrecht A, Brown G, Decaens T, Duboisset A, Lavelle P, Mariani L, Roose E.** 2004b. Effects of tropical endogeic earthworms on soil erosion. *Agr Ecosyst Environ* 104:303-315.
- Blanchart E, Lavelle P, Braudeau E, Le Bissonnais Y, Valentin C.** 1997. Regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savannas of Côte d'Ivoire. *Soil Biol Biochem* 29:431-439.
- Blouin M.** 2005. Réponses écophysiologicals du riz à la présence de vers de terre dans sa rhizosphère. Thèse Université Paris VI.
- Blouin M, Barot S, Lavelle P.** 2006. Earthworms (*Millsonia anomala*, Megascolecidae) do not increase rice growth through enhanced nitrogen mineralization. *Soil Biol Biochem* 38:2063-2068.
- Blouin M, Barot S, Roumet C.** 2007. A quick method to determine root biomass distribution in diameter classes. *Plant Soil* 290:371-381.



- Blouin M, Hodson M.E, Delgado E. a, Baker G, Brussaard L, Butt K.R, Dai J, Dendooven L, Peres G, Tondoh J.E, Cluzeau D, Brun J.J.** 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur J Soil Sci* 64:161-182.
- Blouin M, Mathieu J, Leadley PW.** 2012. Plant homeostasis, growth and development in natural and artificial soils. *Ecol Complexity* 9:10-15.
- Blouin M, Puga-Freitas R.** 2011. Combined effects of contrast between poor and rich patches and overall nitrate concentration on *Arabidopsis thaliana* root system structure. *Funct Plant Biol* 38:364.
- Blouin M, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT, Laffray D, Reversat G, Pando A, Tondoh J, Lavelle P.** 2005. Belowground organism activities affect plant aboveground phenotype, inducing plant tolerance to parasites. *Ecol Lett* 8:202-208.
- Bouché, MB.** 1971. *Lombriciens de France : écologie et systématique*. Institut national de la recherche agronomique.
- Bouché MB.** 1977. Stratégies lombriciennes. In: Lohm U, Persson T, editors. *Soil Organisms as Components of Ecosystems*. Stockholm: Ecology Bulletin/NFR. pp. 122-132.
- Boudsocq S, Niboyet A, Lata JC, Raynaud X, Loeuille N, Mathieu J, Blouin M, Abbadie L, Barot S.** 2012. Plant preference for ammonium versus nitrate: a neglected determinant of ecosystem functioning? *Am Nat* 180(1):60-69.
- Bouma TJ, Nielsen KL, Koutstaal B.** 2000. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant Soil* 218:185-196.
- Britto DT, Kronzucker HJ.** 2002. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159:567-584.

- Brown GG, Barois I, Lavelle P.** 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol* 36:177-198.
- Brown GG, Edwards CA, Brussaard, L.** 2004. How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. *Earthworm Ecology* (ed C.A. Edwards), pp 13-49.
- Brown GG, Pashanasi B, Villenave C, Patron JC, Senapati BK, Giri S, Barois I, Lavelle P, Blanchart E, Blakemore RJ, Spain AV, Boyer J.** 1999. Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: Lavelle P, Brussaard L, Hendrix P. (Eds) *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*. CAB International, Wallingford, pp 87-148.

-C-

- Cabanás CGL, Sesmero R, Valverde-Corredor A, Javier López-Escudero F, Mercado-Blanco J.** 2017. A split-root system to assess biocontrol effectiveness and defense-related genetic responses in above-ground tissues during the tripartite interaction *Verticillium dahliae*-olive-*Pseudomonas fluorescens* PICF7 in roots. *Plant Soil* 417:433-452.
- Canellas LP, Dobbss LB, Oliveira AL, Chagas JG, Aguiar NO, Rumjanek VM, Novotny EH, Olivares FL, Spaccini R, Piccolo A.** 2012. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur J Soil Sci* 63:315-324.
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Facanha AL, Facanha AR.** 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol* 130:1951-1957.
- Casenave A, Valentin C.** 1988. Les états de surface de la zone sahélienne. Influence sur l'infiltration. ORSTOM, Paris.

- Castellanos Suarez DE, Gigon A, Puga-Freitas R, Lavelle P, Velasquez E, Blouin M.** 2014. Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development. *Appl Soil Ecol* 80:100-107.
- Chan KY, Baker GH, Conyers MK, Scott B, Munro K.** 2004. Complementary ability of three European earthworms (Lumbricidae) to bury lime and increase pasture production in acidic soils of south-eastern Australia. *Appl Soil Ecol* 26:257-271.
- Crick JC, Grime JP.** 1987. Morphological plasticity and mineral nutrient capture in two herbaceous species of contrasted ecology. *New Phytol* 107:403-414

**-D-**

- Darwin C.** 1881. The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations on their habits. John Murray, London.
- Davies WJ, Zhang J.** 1991. Root signals and the regulation of growth and development in plants in drying soils. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:55-70.
- De Graaf MC, Bobbink R, Roelofs JG, Verbeek PJ.** 1998. Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecol* 135:185-196.
- De Kroon H, Visser EJW, Huber H, Mommer L, Hutchings MJ.** 2009. A modular concept of plant foraging behaviour: the interplay between local responses and systemic control. *Plant Cell Environ* 32:704-712.
- Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge APM.** 2001. *Brachypodium distachyon*. A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiol* 127:1539-1555.

**Drew MC, Saker LR, Ashley TW.** 1973. Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley: I. The effect of nitrate concentration on the growth of axes and laterals. *J Exp Bot* 24:1189-1202.

**-F-**

**FAO.** 2007. World reference base for soil resources 2006.

**Feller U, Anders I, Wei S.** 2015. Effects of PEG-Induced Water Deficit in *Solanum nigrum* on Zn and Ni Uptake and Translocation in Split Root Systems. *Plants* 4:284-297.

**Fitter AH.** 1994. Architecture and biomass allocation as components of the plastic response of root systems to soil heterogeneity. In Caldwell, Percy (eds) *Exploitation of environmental heterogeneity by plants*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 305-323.

Forde B, Zhang H. 1998. Nitrate and root branching. *Trends Plant Sci* 3:204-205.

**-G-**

**Gange AC.** 1993. Translocation of mycorrhizal fungi by earthworms during early succession. *Soil Biol Biochem* 25:1021-1026.

**Garvin DF.** 2007. Brachypodium: A New Monocot Model Plant System Emerges. *J Sci Food Agr* 87(7):1177-1179.

**Gigon A, Rorison I.** 1972. The Response of Some Ecologically Distinct Plant Species to Nitrate- and to Ammonium-Nitrogen. *J Ecol* 60:93-102.

**Girin T, David LC, Chardin C, Sibout R, Krapp A, Ferrario-Méry S, Daniel-Vedele F.** 2014. Brachypodium: A Promising Hub between Model Species and Cereals. *J Exp Bot* 65(19):5683-5696.

- Girin T, El-Kafafi ES, Widiez T, Erban A, Hubberten HM, Kopka J, Hoefgen R, Gojon A, Lepetit M.** 2010. Identification of Arabidopsis Mutants Impaired in the Systemic Regulation of Root Nitrate Uptake by the Nitrogen Status of the Plant. *Plant Physiol* 153(3):1250-1260.
- Gross KL, Peters A, Pregitzer KS.** 1993. Fine root growth and demographic responses to nutrient patches in four old-field plant species. *Oecologia* 95:61-64.

**-H-**

- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I.** 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579-598.
- He CY, Hsiang T, Wolyn DJ.** 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol* 51:225-230.
- Hidalgo Á, López-Baena FJ, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM.** 2017. Studies of rhizobial competitiveness for nodulation in soybean using a non-destructive split-root system. *AIMS Microbiol* 3:323-334.
- Himmelbauer ML, Loiskandl W, Kastanek F.** 2004. Estimating length, average diameter and surface area of roots using two different Image analyses systems. *Plant Soil* 260:111-120.
- Hodge A.** 2004. The plastic plant: root response to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol* 162:9-24.
- Hodge A.** 2006. Plastic plants and patchy soils. *J Exp Bot* 57:401-411.
- Hodge A.** 2009. Root decisions. *Plant Cell Environ* 32:628–640.
- Hodge A, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH.** 1999a. Why plants bother: root proliferation results in increased nitrogen capture from an organic patch when two grasses compete. *Plant Cell Environ* 22:811-820.

**Hodge A, Robinson D, Griffiths B, Fitter A.** 1999b. Nitrogen capture by plants grown in N-rich organic patches of contrasting size and strength. *J Exp Bot* 50:1243-1252.

**-I-**

**Ingham RE, Trofymow JA, Coleman DC.** 1985. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecol Monogr* 55:119-140.

**-J-**

**Jackson RB, Caldwell MM.** 1989. The timing and degree of root proliferation in fertile-soil microsites for three cold-desert perennials. *Oecologia* 81:149-153.

**Jackson RB, Caldwell MM.** 1992. Shading and the capture of localized soil nutrients: nutrient contents, carbohydrates, and root uptake kinetics of a perennial tussock grass. *Oecologia* 91:457-462.

**James SW.** 1991. Soil nitrogen, phosphorus, and organic matter processing by earthworms in tallgrass prairie. *Ecology* 72:2101-2109.

**Jana U, Barot S, Blouin M, Lavelle P, Laffray D, Repellin A.** 2010. Earthworms influence the production of above- and belowground biomass and the expression of genes involved in cell proliferation and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Soil Biol Biochem* 42:244-252.

**Jones CG, Lawton JH, Shachak M.** 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69:373-386.

**-K-**

**Kotliar NB, Weins JA.** 1990. Multiple scales of patchiness and patch structure: a hierarchical framework for the study of heterogeneity. *Oikos* 59:253-260.

**-L-**

- Lamb EG, Haag JJ, Cahill JF.** 2004. Patch-background contrast and patch density have limited effects on root proliferation and plant performance in *Abutilon theophrasti*. *Funct Ecol* 18:836-843.
- Laossi KR, Noguera DC, Bartolomé-Lasa A, Mathieu J, Blouin M, Barot S.** 2009. Effects of an endogeic and an anecic earthworm on the competition between four annual plants and their relative fecundity. *Soil Biol Biochem* 41:1668-1673.
- Laossi KR, Ginot A, Noguera DC, Blouin M, Barot S.** 2010. Earthworm effects on plant growth do not necessarily decrease with soil fertility. *Plant Soil* 328:109-118.
- Lapied E, Nahmani J, Rousseau GX.** 2009. Influence of texture and amendments on soil properties and earthworm communities. *Appl Soil Ecol* 43:241-249.
- Larigauderie A, Richards JH.** 1994. Root proliferation characteristics of seven perennial arid-land grasses in nutrient-enriched microsites. *Oecologia* 99:102-111.
- Larrainzar E, Gil-Quintana E, Arrese-Igor C, Gonzalez EM, Marino D.** 2014. Split-root systems applied to the study of the legume-rhizobial symbiosis: What have we learned? *J. Integr Plant Biol* 56:1118-1124.
- Lattaud C, Locati S, Mora P, Rouland C, Lavelle P.** 1998a. The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Appl Soil Ecol* 9:189-195.
- Lattaud C, Mora P, Garvin MH.** 1998b. Enzymatic digestive capabilities in geophagous earthworms - origin and activities of cellulolytic enzymes. *Pedobiologia* 43:842-850.
- Lavelle P.** 2002. Functional domains in soils. *Ecol Res* 17:441-450.
- Lavelle P, Bignell D, Lepage M, Wolters W, Roger P, et al.** 1997. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *Europ J Soil Biol* 33:159-93.

- Lavelle P, Decaens T, Aubert M, Barot S, Blouin M, Bureau F, Margerie P, Mora P, Rossi JP.** 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur J Soil Biol* 42:3-15.
- Lavelle P, Charpentier F, Pashanasi B.** 2004. Effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics at a landscape scale over decades. *Earthworm Ecology* (ed C.A. Edwards).
- Lavelle P, Martin A.** 1992. Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soils of the humid tropics. *Soil Biol Biochem* 24:1491-1498.
- Lavelle P, Melendez G, Pashanasi B, Schaefer R.** 1992. Nitrogen mineralization and reorganization in casts of the geophagous tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae). *Biol Fert Soils* 14:49-53.
- Lavelle P, Spain AV.** 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Scientific Publications, Amsterdam, p.654 .
- Lee KE.** 1985. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press Inc.
- Loranger G, Ponge JF, Blanchart E, Lavelle P.** 1998. Impact of earthworms on the diversity of microarthropods in a vertisol (Martinique). *Biol Fertil Soils* 27:21-26.

-M-

- Magalhaes JR, Wilcox GE.** 1983. Tomato growth and mineral composition as influenced by nitrogen form and light intensity. *J Plant Nutr* 6:847-862.
- Martens DA, Frankenberger WT.** 1993. Stability of microbial-produced auxins derived from L-tryptophan added to soil. *Soil Sci* 155:263-271
- Meena B.** 2012. PGPR-mediated systemic resistance for sustainable agriculture. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 269–285.



- Milcu, A. et al.** 2018. Genotypic variability enhances the reproducibility of an ecological study. *Nat Ecol Evol* 2:279-287.
- Mizushima N, Komatsu M.** 2011. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147:728-741.
- Monard C, Vandenkoornhuysse P, Le Bot B, Binet F.** 2011. Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *ISME J* 5:1048-1056.
- Montagnoli A, Terzaghi M, Di Iorio A, Scippa GS, Chiatante D.** 2012. Fine-root morphological and growth traits in a Turkey-oak stand in relation to seasonal changes in soil moisture in the Southern Apennines, Italy. *Ecol Res* 27:1015-1025.
- Montagnoli A, Di Iorio A, Terzaghi M, Trupiano D, Scippa GS, Chiatante D.** 2014. Influence of soil temperature and water content on fine-root seasonal growth of European beech natural forest in Southern Alps, Italy. *Eur. J For Res* 133:957-968.
- Mounier E, Pervent M, Ljung K, Gojon A, Nacry P.** 2014. Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of Arabidopsis root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability: Nitrate signalling by NRT1.1. *Plant Cell Environ* 37:162-174.
- Muscolo A, Cutrupi S, Nardi S.** 1998. IAA detection in humic substances. *Soil Biol Biochem* 30:1199-1201.

-O-

- Öhlén E, Ingemarsson B, Campbell WH, Larsson CM.** 1995. Relationships between external nitrate availability, nitrate uptake and expression of nitrate reductase in roots of barley grown in N-limited split-root cultures. *Planta* 196:485-491.

**-P-**

- Parmelee RW, Crossley DAJ.** 1988. Earthworm production and role in the nitrogen cycle of a no-tillage agroecosystem on the Georgia Piedmont. *Pedobiologia* 32:353-361.
- Paudel S, Longcore T, MacDonald B, McCormick M.K, Szlavecz K, Wilson G.W, and Loss S.R.** 2016. Belowground interactions with aboveground consequences: Invasive earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 97:605-614.
- Pearson J, Stewart GR.** 1993. The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytol*, 125:283-305.
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C.** 2003. Tales from the underground: molecular. *Plant Cell Environ* 26:189-199.
- Puga-Freitas R, Abbad S, Gigon A, Garnier-Zarli E, Blouin M.** 2012a. Control of cultivable IAA-producing bacteria by the plant *Arabidopsis thaliana* and the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Appl Environ Soil Sci*, Article ID 307415.
- Puga-Freitas R, Barot S, Taconnat L, Renou JP, Blouin M.** 2012b. Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7:e49504.
- Puga-Freitas R, Blouin M.** 2015. A review of the effects of soil organisms on plant hormone signalling pathways. *Environ Exp Bot* 114:104-116.
- Puga-Freitas, R. Belkacem L, Barot S, Roger-Estrade J, Blouin M.** 2016. Transcriptional profiling of wheat in response to take-all disease and mechanisms involved in earthworm's biocontrol effect. *Euro J Plant Pathol* 144:155-165.

**Pulleman MM, Six J, Uyl A, Marinissen JCY, Jongmans AG.** 2005. Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Appl Soil Ecol* 29:1-15.

**-Q-**

**Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S.** 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 55:803-813.

**-R-**

**R Core Team.** 2014. R: a language and environment for statistical computing. R development Core team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna

**R Core Team.** 2016. R: a language and environment for statistical computing. R development Core team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna

**Read DB, Bengough AG, Gregory PJ, Crawford JW, Robinson D, Scrimgeour CM, Young IM, Zhang K, Zhang X.** 2003. Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytol* 157:315-326.

**Reef R, Markham HL, Santini NS, Lovelock CE.** 2015. The response of the mangrove *Avicennia marina* to heterogeneous salinity measured using a split-root approach. *Plant Soil* 393:297-305.

**Richter SH, Garner JP, Auer C, Kunert J, Würbel H.** 2010. Systematic variation improves reproducibility of animal experiments. *Nat Methods* 7:167.

**Richter SH, Garner JP, Würbel H.** 2009. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods* 6:257-261.

**Robinson D.** 1994. The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* 127:635-674

**Robinson D, Hodge A, Griffiths BS, Fitter AH.** 1999. Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *P Roy Soc B-Biol Sci* 266:431-435.

**-S-**

**Saradadevi R, Bramley H, Siddique KHM, Edwards E, Palta JA.** 2014. Contrasting stomatal regulation and leaf ABA concentrations in wheat genotypes when split root systems were exposed to terminal drought. *Field Crop Res* 162:77-86.

**Scheu S.** 2003. Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia* 47:846-856.

**Schortmeyer M, Feil B, Stamp P.** 1993. Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system. *Ann Botany* 72:107-115.

**Seeber J, Seeber GUH, Langel R, Scheu S, Meyer E.** 2008. The effect of macro- invertebrates and plant litter of different quality on the release of N from litter to plant on alpine pastureland. *Biol Fert Soils* 44:783-790.

**-T-**

**Taiz L, Zeiger E.** 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. pp. 623.

**-V-**

**Van Groenigen JW, Lubbers IM, Vos HMJ, Brown GG, De Deyn GB, van Groenigen KJ.** 2014. Earthworms increase plant production: a meta-analysis. *Sci Rep* 4:6365.

- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453-483.
- Velasquez E, Pelosi C, Brunet D, Grimaldi M, Martins M, Rendeirod AC, Barrios E, Lavelle P.** 2007. This ped is my ped: Visual separation and near infrared spectra allow determination of the origins of soil macroaggregates. *Pedobiologia* 51:75-87.
- Vogel JP, et al.** 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763-768.
- Vogel J, Hill T.** 2008. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 27:471-478.

**-W-**

- Whalen JK, Parmelee RW.** 2000. Earthworm secondary production and N flux in agroecosystems: a comparison of two approaches. *Oecologia* 124:561-573.

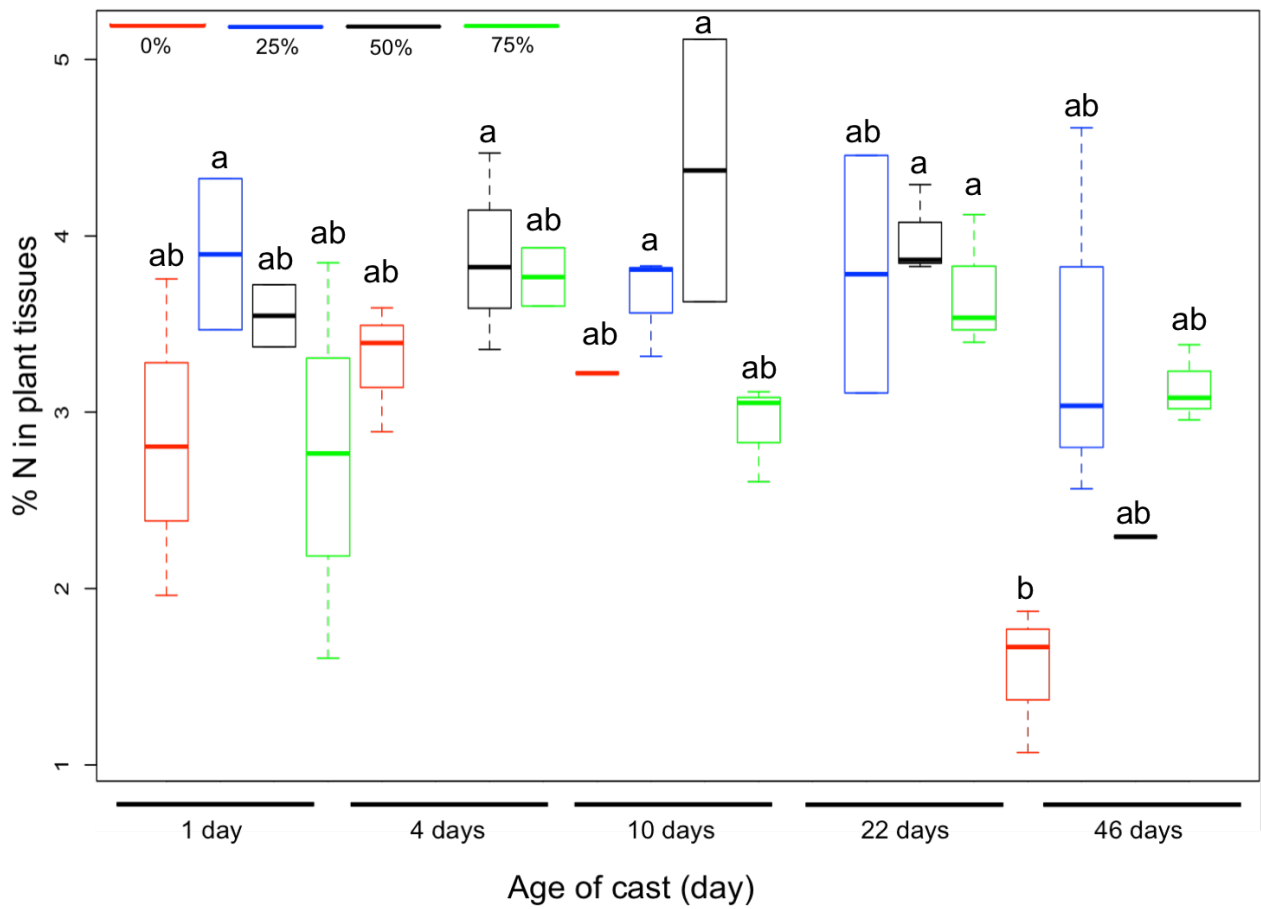
**-Z-**

- Zangerlé A, Hissler C, Blouin, M, Lavelle P.** 2014. Near infrared spectroscopy (NIRS) to estimate earthworm cast age. *Soil Biol Biochem* 70:47-53.
- Zhang H, Forde BG.** 1998. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG.** 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6529-6534.

# **Annexe**

## **Annexe 1 :**

**Figure supplémentaire de la publication du Chapitre 4 : Étude de l'effet de l'âge et de la proportion de turricules sur la croissance et le développement de *Brachypodium distachyon* L.**



**Supplementary material 1:** Box plot of the % N in the total biomass per sample of *Brachypodium distachyon* L. as function of the age of cast (1, 4, 10, 22, and 46 days) for four proportions (0 %, 25 %, 50 %, 75 %)



## **Emission d'auxine et de nitrates par les bactéries des turricules de vers de terre : effet sur la croissance et le développement des plantes**

Les plantes prélèvent des ressources dans leur environnement. Elles sont également exposées à de nombreux signaux, dont des molécules qui modifient profondément leur comportement et leur morphologie. La prédiction des flux de nutriments du sol vers la plante requiert une intégration de la régulation des flux par les signaux qui déterminent la cinétique des adaptations des plantes. Au cours de cette thèse, différentes approches expérimentales et analytiques (split-root, marquage isotopique, analyse racinaire) ont permis d'étudier le couplage signaux-flux dans les interactions entre plantes, microorganismes et vers de terre. Nous avons démontré dans un premier temps, que les vers de terre ont un effet systémique sur la croissance et le développement des plantes (*Hordeum Vulgare* L. et *Oryza sativa* L.) et que cet effet est dépendant de l'abondance des vers. Un travail méthodologique d'optimisation du dispositif split-root (séparation des racines d'une même plante entre deux compartiments) nous a permis d'améliorer la survie des plantes (*Brachypodium distachyon* L.) et leur émission de racines. Ce dispositif a été utilisé pour déterminer l'importance de la présence de turricules et de leur localisation spatiale sur le prélèvement d'azote par la plante. L'absence d'effet observé au cours de cette expérimentation nous a conduits à aborder les mécanismes pouvant survenir en présence de vers selon leur dimension temporelle. Nous avons ainsi démontré qu'une proportion importante de turricules entraîne une adaptation du système racinaire seulement lorsque la plante y est exposée pendant une durée suffisante. Ces résultats sont la première démonstration que la cinétique des différents mécanismes ayant lieu dans les turricules est déterminante pour expliquer l'effet positif des turricules sur la croissance des plantes.

Mot-clés : Vers de terre ; turricule ; cycle de l'azote ; split-root ; marquage isotopique ; Morphologie racinaire ; Croissance.

## **Auxin and nitrate emission by bacteria from earthworm casts: effect on plant growth and development**

Plants take up resources in their environment. They are also exposed to many signals, including molecules that profoundly alter their behavior or morphology. The prediction of the flow of nutrients from the soil to the plant requires an integration of flux regulation by signals which determine the kinetics of plant adaptations. During this thesis, different experimental and analytical approaches (split-root, isotopic labeling, root analysis) allowed us to study the coupling between signals and flows in the interactions between plants, microorganisms and earthworms. We first demonstrated that earthworms have a systemic effect on the growth and development of plants (*Hordeum Vulgare* L. and *Oryza sativa* L.) and that this effect is dependent on the abundance of earthworms. A methodological study aiming at optimizing the split-root device (the sharing of roots of a single plant into two compartments) helped us to improve plant (*Brachypodium distachyon* L.) survival and their emission of roots. This experimental set up was used to determine the importance of the presence of casts and their spatial localization on the N uptake by the plant. The lack of effect observed during this experiment lead us to address the mechanisms that may occur in the presence of worms according to their temporal dynamics. We then demonstrated that an important proportion of casts was responsible for root system adaptation only when the plant was exposed to casts for a sufficient period of time. These results are the first demonstration that the kinetics of the different mechanisms occurring in casts is crucial to explain the positive effect of casts on plants growth.

Key words: Earthworm; cast; Nitrogen cycle; split-root; isotopic labelling; Root morphology; Growth.