



Etude du potentiel d'introduction de la culture du pois d'hiver dans les successions culturales en Normandie : conséquences sur les communautés microbiennes du sol et les flux d'azote

Cyrine Rezgui

► To cite this version:

Cyrine Rezgui. Etude du potentiel d'introduction de la culture du pois d'hiver dans les successions culturales en Normandie : conséquences sur les communautés microbiennes du sol et les flux d'azote. Sciences agricoles. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR047 . tel-03272742

HAL Id: tel-03272742

<https://theses.hal.science/tel-03272742>

Submitted on 28 Jun 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité (SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES)

Préparée au sein de « UniLaSalle Campus Rouen »

Titre de la thèse

Etude du potentiel d'introduction de la culture du pois d'hiver dans les successions culturales en Normandie : conséquences sur les communautés microbiennes du sol et les flux d'azote

**Présentée et soutenue par
Cyrine REZGUI**

**Thèse soutenue publiquement le (date de soutenance)
devant le jury composé de**

Mr. Bernard Bodson	Professeur, Faculté Gembloux, Belgique	Rapporteur
Mme. Joëlle Fustec	Enseignante-chercheuse (HDR), responsable de l'unité de recherche LEVA, Ecole Supérieure d'Agricultures, Angers	Rapporteuse
Mr. Xavier Latour	Professeur, IUT d'Evreux, Normandie	Examineur
Mme. Jennifer Harris-Hellal	Chargée de recherche, BRGM, Orléans	Examinatrice
Mr. Teodor Rusu	Professeur, USAMV, Roumanie	Examineur
Mme. Karine Laval	Directrice de recherche, UniLaSalle, Campus Rouen, Normandie	Examinatrice
Mr. Jean Bernard Cliquet	Maître de conférences (HDR), Université de Caen, Normandie	Invité
Mr. Guillaume Vitte	Ingénieur agronome, l'INRA, Estrées-Mons	Invité
Mme. Isabelle Trinsoutrot-Gattin	Directrice de l'unité de recherche AGHYLE (HDR), UniLaSalle, Campus Rouen, Normandie	Directrice de thèse
Mme. Wassila Riah-Anglet	Chargée de recherche, UniLaSalle, Campus Rouen, Normandie	Encadrante de thèse

Thèse dirigée par Isabelle Trinsoutrot-Gattin, UniLaSalle, Campus Rouen, unité AGHYLE



Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus au sein de l'unité AGHYLE de UniLaSalle, cofondatrice de la structure fédérative de recherche NORMandie VEGEtal. Ce travail a notamment été rendu possible grâce au soutien financier de la région Normandie.





Ce travail de thèse est dédié à mes très chers parents, **Chadlia** et **Moncef**,
J'espère que vous trouvez dans ce travail l'expression de mon profond
respect, de ma gratitude et surtout de tout mon amour pour vous.



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mr **Philippe Choquet**, directeur général d'UniLaSalle, Mme **Marie Lummerzheim**, directrice d'UniLaSalle sur le campus de Rouen, Mme **Karine Laval**, directrice de la recherche à UniLaSalle, qui m'ont accueillie au sein de leur établissement pendant mes années de thèse.

Je remercie Mme **Joëlle Fustec**, enseignante chercheuse (HDR) à l'école supérieure d'agriculture d'Angers et responsable de l'unité de recherche LEVA et Mr **Bernard Bodson**, professeur à l'Université de Liège de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également, Mme **Jennifer Harris-Hellal**, chargée de recherche au Bureau de Recherches Géologiques et Minières à Orléans et Mr **Jean Bernard Cliquet**, maître de conférences (HDR) à l'Université de Caen d'avoir accepté d'être les examinateurs de mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à **Isabelle Trinsoutrot-Gattin**, enseignante chercheuse (HDR), responsable de l'unité de recherche AGHYLE, ma directrice de thèse, qui m'a accompagné scientifiquement tout au long de ces années de thèse. **Isabelle**, je te remercie pour ta disponibilité, ton soutien, tes conseils, tes encouragements et surtout pour ton écoute.

Je tiens également à remercier chaleureusement mon encadrante, **Wassila Riah-Anglet**, chargée de recherche. Merci de m'avoir fait confiance au cours de ces quatre années. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, merci de m'avoir tant appris professionnellement que personnellement. Merci de m'avoir transmis ce bagage scientifique et pour m'avoir encouragé à persévérer pour mener à bien ce travail.

Je remercie sincèrement **Marie Benoit**, enseignante chercheuse à Isara de Lyon pour son soutien infailible même après son départ d'UniLaSalle. Nos échanges m'ont permis d'aborder les problèmes rencontrés autrement. Merci pour ton aide et ton accompagnement très étroits dans la modélisation par le modèle STICS.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères aux membres de mon comité de pilotage : Mme **Anne Sophie Voisin**, chargée de recherches à l'INRA de Dijon, Mme **Marie-Pierre Bruyant**, enseignante chercheuse à UniLaSalle, campus de Rouen, Mme **Nathalie Cassagne**, enseignante chercheuse à l'école supérieur d'agricultures, Angers Loire et Mme **Alicia Ayerdi-Gotor**, enseignante-chercheuse à UniLaSalle, campus de Beauvais qui ont fait progresser mon travail de recherche grâce à leurs conseils.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux membres de mon comité de suivi : Mr **Eric Gontier**, professeur (HDR) à Université de Picardie Jules Verne, Mr **Guillaume Vitte**, ingénieur d'études à l'INRA à Estrées-Mons, Mr **Pascal Favrel**,

professeur à l'Université de Caen et Mr **El Hadj Ibrahima**, doctorant à l'Université de Rouen qui m'ont conseillé et suivi dans mon travail de recherche.

Je remercie également Mr **Arnaud Lanoue**, enseignant chercheur à l'Université de Tours pour son suivi et son implication dans l'analyse des exsudats racinaires.

Je remercie la région Normandie pour le financement de ce travail de thèse. Mr **Francois d'Hubert** de la chambre d'agriculture de Normandie, je vous remercie pour votre aide et d'avoir identifié les parcelles. Je remercie également Mr **Marc Tréhet** et Mr **Crevcoeur**, agriculteurs et membres du Groupements d'intérêt économique et environnemental (GIEE) pour d'hiver d'avoir mis à disposition leurs parcelles agricoles.

Je remercie également le personnel de l'unité AGHYLE. Merci à **Lisa, Maeva, Héléne** et **Anne** pour la bonne humeur, les conseils et leurs support technique au laboratoire, sans oublier les sorties terrain et les longues heures de tamisage. Je remercie aussi **Caroline** pour son aide dans la réalisation des mesures d'azote minéral avec le Gallery. Je tiens à remercier **Babacar** pour sa gentillesse et ses conseils. Merci également à **Mélanie, Adrien G, Marc, Nadia, Magali, Laetitia et Pierre Yves** pour leurs conseils précieux.

Je tiens à remercier les membres de l'unité Transformation et Agro-resources ; Merci **Hafida** pour ton aide lors des manips de Van Soest. Je remercie également **Jean Baptiste** pour son appui lors de la mise en place des expérimentations dans la plateforme Normand Serre. Un grand merci également à **Mohamed R.**

Merci à **Nathalie Massias** pour son aide et sa disponibilité, et à **Sylvie** pour ses conseils et sa bonne humeur. **Elodie et Marie**, mesdames sans vous les démarches administratives seraient compliquées et pénibles, merci !

Merci à **Franck, Cédric, Davy et Walter** pour nos échanges autour d'un café. Merci d'avoir toujours été disponibles pour sauver la vie de mon PC et **Walter** pour tes impressions, parfois en urgence.

Je remercie les thésards, **Amira, Yohana, Adrien B** pour nos discussions agréables et **Fida** pour son soutien et sa serviabilité. Merci, **Mohamed K** pour ton aide dans les manipulations en serre et pour ton bon cœur.

Mes collègues de bureau, **Charlotte, Mehdi et Pauline** des personnes merveilleuses, que je n'oublierai jamais. **Mehdi**, je te remercie d'être là dans les moments difficiles. Tu as toujours été présent pour m'épauler. **Charlotte**, je te remercie également pour ta douceur et les bons moments qu'on a partagés ensemble. **Pauline**, merci pour ta bienveillance, merci pour ton aide surtout avec les analyses statistiques ...

Nawel, merci pour tout.... Je te remercie infiniment pour ta présence, tes encouragements, ton soutien et ta bienveillance.

Je tiens également à remercier *Chella parisienne* ; **Balsem, Neila, Oumaima, Meher** et **Wajih**, sans oublier les deux petites **Eline** et **Ines** pour votre présence et pour les bons moments qu'on a partagés ensemble. *Familia, Arbia, Emna, Salma, Ahmed* et **Mouna**, merci de m'avoir soutenu jusqu'au bout et d'être présent dans les bons moments et les moins bons.

Marco, "*mille grazie* " pour tes messages de soutien et d'encouragement. Je remercie également **Eya, Quods, Nour, Sébastien et Amine**, des amis formidables qui m'ont toujours soutenu. **Ghassen**, je te remercie également de m'avoir soutenu durant ces 4 ans de thèse.

Un grand merci également à mon beau-frère, **Aymen**, pour sa présence, pour sa gentillesse et pour son grand cœur, sans oublier les bons et les délicieux plats qu'il a fait pour moi. **Meriem**, ma sœur, merci d'avoir toujours été à mes côtés dans les bons et les mauvais moments, de m'avoir soutenu et conseillé dans tous mes choix.

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. Partie 1. L'état biologique du sol	8
1.1. Le sol	8
1.2. Le sol et ses fonctions.....	10
1.3. La biodiversité du sol	12
1.4. Les microorganismes du sol	13
1.5. Rôle des microorganismes dans la décomposition de la matière organique du sol.....	15
1.6. Les enzymes	17
1.7. Effet des pratiques culturales sur les communautés microbiennes du sol.....	20
2. Partie 2 : Cycle de l'azote et légumineuses.....	22
2.1. Cycle de l'azote dans le sol	22
2.2. Cas particulier des légumineuses dans le cycle de l'azote	25
2.3. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.....	25
2.4. Mécanismes de perte d'azote dans les agrosystèmes	28
2.4.1. Les méthodes d'ajustement de la fertilisation azotée.....	29
2.4.2. Les outils d'évaluation des fuites d'azote	30
3. Partie 3. La rhizodéposition	34
3.1. Définition de la rhizodéposition	34
3.2. Outils d'étude de la rhizodéposition.....	36
3.3. Les exsudats racinaires	40
3.4. Méthodologies pour l'étude des exsudats racinaires	42
3.5. Identification et quantification des exsudats racinaires	44
4. Partie 4 : Les légumineuses et leurs services écosystémiques	44
4.1. Histoire des légumineuses	44
4.2. Services écosystémiques rendus par les légumineuses.....	47
4.2.1. Les légumineuses et la disponibilité de l'azote au cours de la rotation	47
4.2.2. La réduction des émissions de gaz à effet de serre	48
4.2.3. Meilleure gestion des ravageurs et adventices.....	49
4.3. Les flux d'azote en présence d'une culture de pois.....	50
Chapitre II. Hypothèses et démarche scientifique.....	53
1. Positionnement du sujet de thèse	54
2. Démarches scientifique et expérimentale.....	58
2.1 Approche au champ	58

2.2 Approche en serre	60
2.3 Approche en microcosmes.....	62
Chapitre III. Résultats	65
<i>Article 1.</i> Impacts of the winter pea crop (instead of rapeseed) on soil microbial communities, nitrogen balance and wheat yield	65
<i>Article 2.</i> Quantification et analyse des exsudats racinaires de pois, de blé et de colza : mise au point d'une méthodologie de collecte des exsudats racinaires.....	89
<i>Article 3.</i> N rhizodeposition quantification and root exudates characterization of pea (<i>Pisum Sativum</i> L.), rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.) and wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) under controlled conditions	119
<i>Article 4.</i> Linking soil microbial community to C and N dynamics during crop residues decomposition	145
Chapitre IV. Discussion générale.....	195
1. Effet de l'introduction d'une légumineuse dans la rotation culturale	196
1.1. Effet de l'introduction du pois d'hiver sur les flux d'azote.....	196
1.2. Effet de l'introduction du pois d'hiver sur les communautés microbiennes du sol	202
Conclusion et perspectives	209
Références bibliographiques	213

Liste des figures

Figure 1. La complexité du sol et de ses interactions (Gobat et al., 2003)	8
Figure 2. Proportion des principales composantes du sol (<i>d'après</i> White, 2006).....	9
Figure 3. Les principales interactions entre les quatre fonctions du sol (<i>d'après</i> Leeuwen et al., 2017).....	11
Figure 4. Une sélection d'organismes du sol (Bardgett et van der Putten, 2014).....	12
Figure 5. La classification par taille (largeur des corps) des organismes du sol (Swift et al., 1979).....	13
Figure 6. Les microorganismes du sol (<i>d'après</i> Torsvik et al., 1990a ; Fierer et al., 2007)	14
Figure 7. Représentation schématisée du couplage entre les flux de carbone et d'azote au cours de la décomposition des matières organiques et relation avec la minéralisation nette (Recous et al., 2015). C : carbone : N : azote.....	16
Figure 8. Localisation et état des enzymes dans les sols (<i>d'après</i> Burns et al., 2013)	17
Figure 9. Cycle de l'azote dans le sol (<i>d'après</i> Nicolardot et al., 1997).....	23
Figure 10. Interaction entre le <i>rhizobium</i> et sa plante hôte (Laranjo et al., 2014)	26
Figure 11. Les principaux facteurs déterminants l'évolution du stock d'azote minéral du sol au cours du temps (Cattin et al., 2002)	29
Figure 12. Dispositif de mesure des fuites d'azote (a) la bougie poreuse et (b) du lysimètre à mèche (<i>d'après</i> Knutson and Selker, 1994)	31
Figure 13. Répertoire des composés rhizodéposés par différentes espèces végétales. Les parties hachurées restent hypothétiques (<i>d'après</i> Wichern et al., 2008 ; Badri et Vivanco, 2009 ; Preece et Peñuelas, 2020)	35
Figure 14. Interaction entre rhizodéposition-sol-communautés microbiennes (<i>d'après</i> Oburger et Jones, 2018).....	36
Figure 15. Les principaux mécanismes de l'exsudation racinaire (Oburger et Jones, 2018). ..	41
Figure 16. Représentation schématisée des facteurs biotiques et abiotiques qui influencent l'exsudation racinaire (<i>d'après</i> Jones et al., 2004 ; Wang et al., 2006 ; Canarini et al., 2019 ; Tian et al., 2020)	41
Figure 17. Les différentes techniques de collecte des exsudats racinaires (Oburger et Jones, 2018).....	43
Figure 18. Evolution des surfaces des protéagineux dans l'Union Européenne entre 1987 et 2017 (Terres Univia, 2019)	45
Figure 19. Les services écosystémiques des légumineuses (DAFA, 2012)	47
Figure 20. Répartition des flux d'azote pour une culture de pois (Mahieu et al., 2007).....	50
Figure 21. Localisation des 8 exploitations des agriculteurs impliqués dans le GIEE Pois d'hiver- Pays de Bray (a). Réunion de restitution des résultats en présence des agriculteurs du GIEE, des membres d'UniLaSalle et de la chambre d'agriculture (b).....	55
Figure 22. Les approches déployées pour répondre aux objectifs des volets 1 et 2 du projet VIVEPOIS, en lien avec la problématique de la thèse.....	57
Figure 23. Schéma conceptuel de l'objectif central de la thèse ainsi que les hypothèses testées	57
Figure 24. Les différentes échelles spatio-temporelles employées pour répondre aux objectifs de la thèse	59

Figure 25. Dispositif expérimental déployé chez les deux agriculteurs. Le carrée bleu représente la stratégie d'échantillonnage en W employée pour les prélèvements de sol. Chaque point est un échantillon composite de 5 prélèvements.....	59
Figure 26. Prélèvements des échantillons de sols en W pour la mesure des reliquats azotés dans les parcelles d'études chez les agriculteurs	61
Figure 27. Dispositif hydroponique mis en place pour la collecte des exsudats racinaires du pois d'hiver et du blé.....	63
Figure 28. Dispositif de marquage par « leaf feeding » utilisé pour la quantification de N rhizodéposé par le pois d'hiver	63
Figure 29. Mise en place des incubations en microcosmes pour l'étude de la cinétique de dégradation des résidus de cultures	63
Figure 30. Représentation des différents flux d'azote étudiés lors de la culture du pois d'hiver et du colza.....	202
Figure 31. Etude de l'effet du couvert végétale sur les communautés microbiennes et les activités des enzymes du sol dans les deux parcelles étudiées.....	203
Figure 32. Etude de l'effet du couvert végétal sur la diversité bactérienne du sol (la parcelle 2)	204
Figure 33. Etude de l'effet du couvert végétale sur la diversité fongique du sol (la parcelle 2)	205

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales enzymes mesurées dans les sols agricoles (<i>d'après</i> Caldwell, 2005).	18
Tableau 2. Les quantités de N ₂ fixées en kg.ha ⁻¹ .an ⁻¹ par quelques légumineuses (<i>d'après</i> Kakraliya et al., 2018).....	27
Tableau 3. Présentation des caractéristiques des différents modèles de prédiction des fuites d'azote les plus utilisés dans les agrosystèmes	33
Tableau 4. Synthèse des quantités d'azote rhizodéposées par différentes espèces de légumineuses, obtenues à l'aide de différentes méthodes de marquage (Fustec et al., 2010). L'azote rhizodéposé est exprimé en pourcentage de l'azote total de la plante	37
Tableau 5. Synthèse des principaux travaux portant sur l'estimation simultanée de la rhizodéposition du carbone et de l'azote (<i>d'après</i> Stevenel et al., 2019)	39
Tableau 6. Les classes des principaux composés identifiés dans les exsudats racinaires des plantes (<i>d'après</i> Badri et Vivanco, 2009 ; Dennis et al., 2010 ; Haichar et al., 2014).....	40
Tableau 7. Bilan de la production de pois et féverole en France, données 2018-2019 (Terres Univia, 2019).....	46
Tableau 8. Bilan des productions des protéagineux dans les départements de la Normandie (Agreste, 2018).....	46
Tableau 9. Suivi des reliquats azotés au cours de la rotation culturale.	197

Introduction générale



A partir des années 60, la révolution verte, suscitée pour faire face aux problématiques de la sous-alimentation (FAO, 1996), a entraîné le développement de systèmes de production largement basés sur des variétés améliorées à haut rendement (VHR), le développement de l'irrigation et l'usage systématique d'engrais et de pesticides. L'application de cet ensemble de technologies dans un contexte socioéconomique favorable s'est traduite par une forte progression des rendements. Pendant cette période, des effets économiques spectaculaires ont été notés pour les cultures de blé (rendements triplés) et du riz (rendements doublés). Cette révolution, aidée par les réformes successives de la PAC (Politique Agricole Commune), a soutenu les gains de productivité au détriment de l'environnement (Courtois et Marizou, 2012).

Cette révolution verte a eu des conséquences majeures sur le monde agricole et le système alimentaire. Outre les modifications de la structuration de la population agricole, de l'essor des productions, de la transition alimentaire, etc. les conséquences écologiques et environnementales de cette intensification de l'agriculture ont touché la qualité de l'air, de l'eau et des sols. En 2018, l'inventaire national des émissions françaises de gaz à effet de serre (GES) attribue à l'agriculture 19 % des émissions (Durand et al., 2020), à noter qu'elles sont considérées stables sur la période 2015-2018 (Fontan et al., 2019). En 2017, en France, près de 2/3 des eaux souterraines dépassent la concentration de 10 mg de nitrates par litre correspondant au seuil de la présence naturelle des nitrates. Un quart du territoire national est encore sujet à la hausse des concentrations en nitrates (L'environnement en France). Cette même année, une généralisation de la dispersion des pesticides des eaux souterraines a été mise en évidence sur 80 % du territoire français (L'environnement en France). La famille des herbicides correspond à 57 % des substances retrouvées contre 20 % pour les fongicides et 21 % pour les insecticides. La biodiversité est une composante majeure pour l'agriculture qui l'exploite depuis l'échelle du gène jusqu'à celle du paysage. Pourtant, l'activité agricole, par son action sur les paysages, sur la sélection des espèces cultivées est reconnue comme l'une des principales activités responsables de la perte de biodiversité (Tilman et al., 2017).

Ajoutons à ces constats la problématique de l'état des sols qui ne sont pas attribuables uniquement à l'agriculture mais dont la conséquence affecte directement cette activité économique. L'Union Européenne (2011) a estimé que 56 % des sols européens sont dégradés ce qui représente un coût annuel pour l'Union Européenne de 38 milliards d'euros. Tous les sept ans en France, une surface de terre équivalente à celle d'un département français est imperméabilisée de manière difficilement réversible (Club Parlementaire pour la Protection et l'Etude des Sols (CPPEs, 2014) ; en moyenne 82 000 hectares de terres agricoles sont perdus chaque année, ce qui correspond à plus de 220 hectares par jour soit l'équivalent de la surface

de 4 exploitations de taille moyenne (Jean et Morel, 2011). A l'échelle mondiale, cette dégradation des sols a réduit de 23 % la productivité de l'ensemble de la surface terrestre.

Outre ces impacts environnementaux, les impasses techniques de ces conduites intensives (résistances, baisse de la fertilité des sols, etc.) se font de plus en plus sentir. A partir des années 1990, les rendements stagnent alors que la demande alimentaire ne cesse d'augmenter. La hausse durable du coût des engrais chimique à la suite du choc pétrolier de 1973 et la prise de conscience des agriculteurs de la nécessité de mieux préserver l'environnement ont fait évoluer les pratiques et les politiques.

A partir de 2007 avec l'émergence des Mesures AgroEnvironnementales (MAE) déclinées dans la réforme de la Politique Agricole, c'est une attention croissante qui sera portée à l'environnement dans le processus de transition de l'agriculture (Requillart et al., 2014). Au niveau français, le projet agroécologique (2012) et la loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt du 13 octobre 2014 ont pour objet la mise en œuvre concrète de l'agroécologie dans l'objectif de la triple performance (économique, environnementale et sociale) des exploitations agricoles. Une diversité de plans, réglementations, initiatives émettent des propositions pour stimuler le changement des pratiques agricoles et limiter les impacts de l'agriculture sur les écosystèmes, viennent également émailler cette transition : plan ecophyto, plan protéines végétales, plan climat, plan ambition Bio, directive nitrate, initiative 4 pour 1000, neutralité carbone, projet agroécologique pour la France, etc. Plus particulièrement, le plan protéine végétale vise au développement des cultures de légumineuses (Schneider et Huyghe, 2015). Ce plan repose sur les nombreux services écosystémiques attribués aux cultures de légumineuses. En effet, ces plantes sont caractérisées par la production de graines dont la richesse en protéine leur confère une bonne qualité nutritionnelle. Une graine de protéagineux présente un pourcentage qui varie de 24 à 40% de protéines (Carrouée et al., 2003). Cette caractéristique des graines de légumineuses est à relier avec leur capacité à fixer l'azote atmosphérique dans le cadre d'une association symbiotique avec un genre bactérien présent dans le sol. Ainsi, ces cultures permettent un transfert naturel de l'azote atmosphérique vers les agrosystèmes (Carrouée et al., 2012). Par ailleurs, l'introduction de légumineuses dans une rotation permet une meilleure gestion des adventices et un recours réduit aux herbicides (Bouard, 2017). A titre d'exemple, l'introduction du pois protéagineux dans une rotation permet une réduction de charge liée à l'enherbement de 15 à 35 euros. ha⁻¹.an⁻¹ (Schneider et al., 2010 ; Tiers et al., 2010). De plus, l'introduction de cultures de légumineuses dans une succession culturale contribue au maintien de la biodiversité du sol (Ranjard et al., 2010 ; Stone et al., 2016).

En 2017, la production mondiale de légumineuses (haricots, pois, lentilles, fèves, etc.) dépasserait les 80 millions de tonnes, soit le double, il y a trente ans. La production a augmenté dans la majorité des principaux pays producteurs, en Inde (22 Mt), au Canada (8 Mt) et en Birmanie (6 Mt). Malgré ces avantages agronomiques et environnementaux, on observe en Europe et plus particulièrement en France la prédominance de trois cultures principales : céréales à paille, maïs grain et colza (Schott et al., 2010). Au niveau régional, 67 % de la Surface Agricole Utile des exploitations agricoles normandes sont consacrées aux cultures arables (1,32 million d'hectares), dont 48 % pour les céréales en 2017. Les systèmes dominants sont généralement peu diversifiés à base de colza et de céréales à paille, ils sont actuellement considérés comme les plus rentables. Cette orientation est en cohérence avec la place de Rouen comme 1^{er} port exportateur céréalier ouest-européen. Néanmoins, les nouvelles réformes de la Politique Agricole Commune (PAC, version 2015-2020) et les aides accordées au protéagineux ont permis une évolution des superficies accordées au pois protéagineux entre 2014 (139 463 ha) et 2019 (175 529 ha) qui s'est traduite par des productions respectives de 528 314 t et 710 313 t (Agreste, 2020). Au niveau régional, la part des légumineuses à graines dans la Surface Agricole Utile (SAU) déjà faible en 2011, a diminué entre 2011 et 2017, passant de 1,5 % de la SAU en 2011 contre 1,4 % en 2017. Néanmoins, plus de 75 % des surfaces de légumineuses à graines sont des cultures de pois protéagineux en Normandie en 2018. La culture de pois protéagineux est la culture majoritaire de légumineuses à graines en surface en 2018 avec 15 530 ha. (Agreste, 2020). Les surfaces cultivées en pois d'hiver restent minoritaires en comparaison avec celles de pois de printemps. Pourtant, le pois d'hiver présente un certain nombre d'avantages, notamment en ce qui concerne le contrôle des adventices, la gestion des stress hydriques, la gestion du risque lié à *Aphanomyces euteiches* ou aux insectes ravageurs. Ces qualités s'expliquent principalement par le décalage des stades de la culture du pois d'hiver par rapport à la culture du pois de printemps (Unip et Arvalis, 2014).

Mon travail de thèse s'est inscrit dans ce contexte d'augmentation des surfaces cultivées en pois et la volonté d'un groupe d'agriculteur d'évaluer la performance d'un pois d'hiver inséré en tête de rotation en substitution au colza. Les objectifs de ce travail étaient de mieux comprendre les effets de l'introduction du pois d'hiver sur (i) la dynamique de l'azote, au cours du cycle cultural et pour les cultures suivantes et (ii) la structure des communautés microbiennes et les activités enzymatiques du sol.

Présentation du manuscrit

Mon travail de thèse s'est inscrit dans un contexte géographique spécifique, celui du Pays de Bray, où a été déployée l'expérimentation au champ, sur des parcelles d'agriculteurs impliqués dans le Groupement d'Intérêt Economique et Environnemental « Pois d'hiver ». Ceux-ci ont été complétés par des approches en conditions semi- contrôlées (en serre/ phytotron) et conditions contrôlées (en microcosmes).

Ce manuscrit de thèse est organisé en 4 chapitres :

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique dans laquelle est explicitée (i) la notion d'état biologique du sol incluant la présence et l'activité de la faune et microflore, (ii) le rôle spécifique des légumineuses vis-à-vis du cycle de l'azote dans le sol, suivi (iii) d'un focus plus spécifique sur la rhizodéposition, élément essentiel dans l'évaluation de l'effet de la plante sur les communautés microbiennes du sol. Le chapitre bibliographique se termine par une analyse des services écosystémiques rendus par les cultures de légumineuses.

Le second chapitre présente et argumente les objectifs scientifiques et les hypothèses de travail ainsi que les approches expérimentales déployées dans cette étude.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation sous forme d'article des différents résultats acquis au cours de ce travail de thèse :

- Article 1 : il présente les résultats obtenus lors de l'expérimentation *in situ* (conditions non contrôlées). Un dispositif expérimental a été déployé sur 2 parcelles agricoles qui ont été suivies pendant deux ans, dans l'objectif d'évaluer les effets de la modification de la succession (pois d'hiver/colza) sur la culture céréalière suivante (blé) et les caractéristiques biologiques du sol.
- Article 2 : il comporte deux parties. Une partie qui présente une synthèse des métabolites primaires et secondaires identifiés dans les exsudats racinaires du pois, du blé et du colza, en s'appuyant sur la littérature. La seconde partie a impliqué la mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées, afin de mener des essais de mise au point d'une méthodologie permettant la collecte des exsudats racinaires des trois espèces végétales et l'évaluation de l'effet de ces exsudats sur les communautés microbiennes des sols.
- Article 3 : il présente les travaux conduits (i) en serre afin de quantifier la rhizodéposition de l'azote de trois espèces végétales (blé, colza pois d'hiver) en sol par

marquage isotopique ^{15}N et (ii) en phytotron pour caractériser les exsudats racinaires de ces trois espèces en hydroponie.

- Article 4 : il présente les résultats d'une incubation en laboratoire dont l'objectif était d'estimer l'impact de la décomposition des résidus de culture des trois espèces végétales précitées sur les flux de carbone et d'azote et les communautés microbiennes du sol.

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit propose une discussion générale des résultats assortie de perspectives de recherche.

Chapitre I.

Synthèse bibliographique



1. Partie 1. L'état biologique du sol

1.1. Le sol

Le sol est issu de l'altération de la roche mère et de l'accumulation de la matière organique, il est ainsi constitué d'une association de matières minérales et organiques en interactions. Il peut être définie comme un volume compris entre la surface de la Terre et une roche dure ou meuble, peu altérée ou peu marquée par la pédogenèse (Dokuchaev, 1967). L'épaisseur d'un sol est très variable de quelques centimètres à quelques dizaines de mètres, ou plus (Pelletier et Rasmussen, 2009 ; Ho et al., 2012). Cette épaisseur est comprise entre 1 à 2 cm dans les zones laissées récemment à découvert par le retrait des glaciers et peut atteindre jusqu'à 3 à 4 m dans les régions tropicales. Dans les zones tempérées, elle est de 1 à 1,5 m. Ces différentes épaisseurs s'expliquent par la chronologie du retrait des glaciers à la fin de la dernière période glaciaire, il y a 16 000 ans environ (Nomade, 2005).

Le sol, vivant et dynamique, représente la couche supérieure meuble de la croûte terrestre. Il est le siège des interactions entre la lithosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère (Targulian et Krasilnikov, 2007) et présente ainsi divers niveaux d'organisation spatiale (Gobat et al., 2003, **Figure 1**).

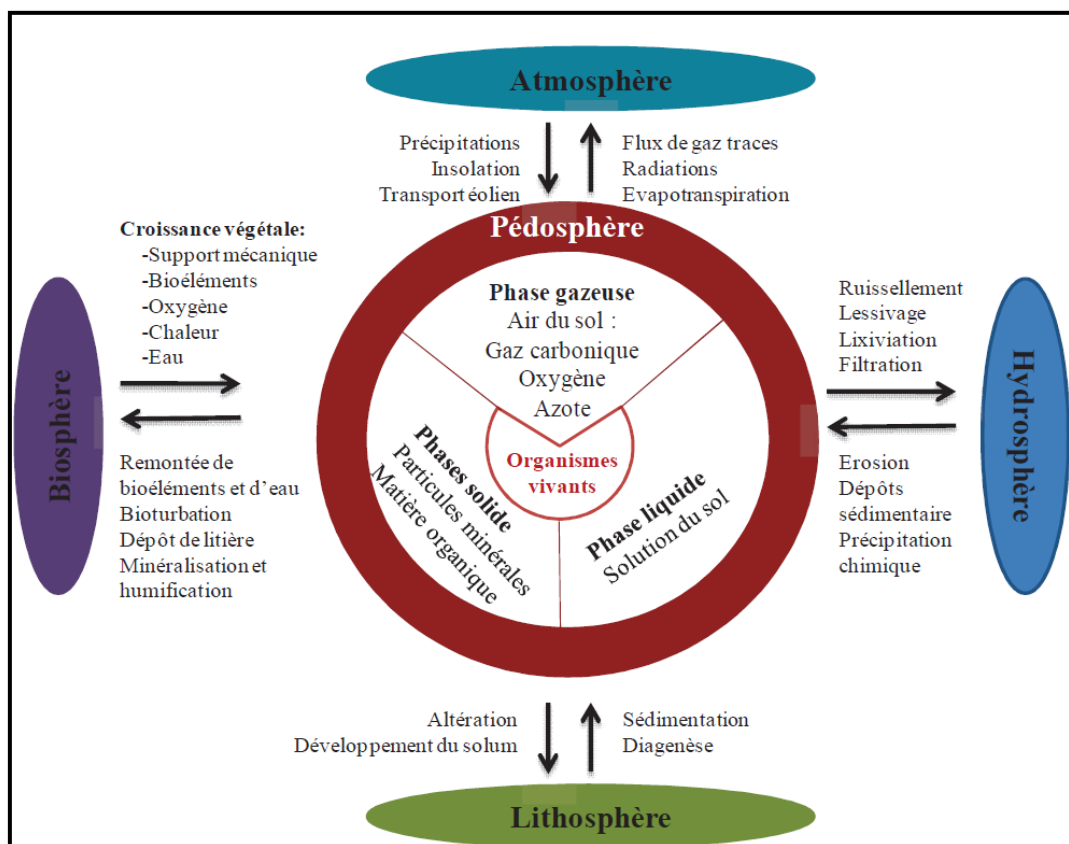


Figure 1. La complexité du sol et de ses interactions (Gobat et al., 2003)

Le sol est constitué de trois phases : solide, liquide et gazeuse (**Figure 2**), dont les proportions varient au cours du temps (Laloui et al., 2003 ; Hillel, 2013 ; Novák et Hlaváčiková, 2019).

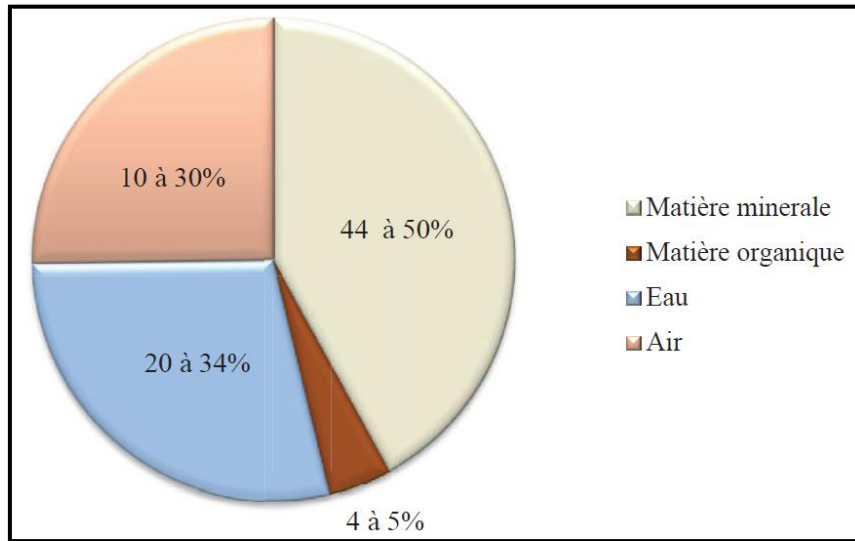


Figure 2. Proportion des principales composantes du sol (*d'après White, 2006*)

- Une phase liquide constituée par l'eau occupant les vides et enrichie en ions et en molécules minérales et organiques solubles, appelée solution du sol (Warrick, 2001 ; Tan, 2011). La composition de la phase liquide résulte des interactions entre l'eau et les constituants de la phase solide. Elle constitue avec les gaz 30 à 60 % du volume total du sol (Moldrup et al., 2001). La dissolution et la précipitation des phases solides y jouent un rôle décisif, particulièrement pour la régulation de la concentration des éléments minéraux indispensables pour l'activité biologique et la nutrition des végétaux.
- Une phase gazeuse occupant les pores abandonnés par l'eau lors de son retrait. On retrouve les mêmes gaz que dans l'atmosphère (N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4 , N_2O , etc.) mais en proportions et concentrations différentes. La composition de cette phase gazeuse dépend de la texture, la structure et l'humidité du sol, elle varie ainsi avec les conditions climatiques, l'activité biologique et l'hétérogénéité du sol (Gobat et al., 2003). La phase gazeuse du sol joue un rôle essentiel notamment dans la régulation des échanges entre le sol et l'atmosphère. Gobat et al. (2003) ont montré que la concentration en oxygène du sol est bien moins importante que celle de l'air, au profit d'une concentration en gaz carbonique plus élevée (10 à 1 000 fois supérieure suivant les zones). Cette concentration élevée en gaz carbonique est la résultante de l'activité biologique du sol qui varie en fonction des saisons.

▪ Une phase solide constituée de l'association entre les matières minérales issues de l'altération de la roche mère et des matières organiques provenant de la décomposition d'êtres vivants, allant de fragments de végétaux et/ou d'animaux à des macromolécules organiques complexes, représentant la matière organique du sol.

❖ Les constituants minéraux du sol représentent 93 à 95 % du poids total. Ils sont issus de la désagrégation physique et de l'altération biogéochimique des roches, sous l'influence du climat (pluviométrie, température). L'analyse granulométrique permet de connaître les proportions respectives de ces éléments, qui les classifient selon leur taille, afin de déterminer la texture du sol grâce au triangle de texture. On distingue les éléments grossiers dont la granulométrie est supérieure à 2 mm (les pierres, les cailloux, les graviers, etc.) et les éléments fins de granulométrie inférieure à 2 mm (sables grossiers, (200 μ m à 2 mm), sables fins, (50 à 200 μ m), limons (2 à 50 μ m) et argiles (< 2 μ m) (McManus, 1988 ; Pye et Blott, 2004).

❖ La matière organique du sol désigne une large gamme de composés qui comprennent des organismes vivants, de la matière organique morte à des degrés de dégradation, de composition et de complexité variables (McGill, 1996 ; Hayes et Wilson, 1997 ; Kay, 2018). Cette matière organique peut être libre ou liée (Six et al., 2002). La fraction libre correspond principalement à la litière du sol constituée de résidus d'animaux et de végétaux, elle est considérée comme une matière organique « fraîche », peu évoluée (Pulleman et al., 2000 ; Watts et al., 2001). La fraction liée, quant à elle, est formée de produits relativement stables et plus complexes, adhérant éventuellement à la fraction minérale, regroupés sous le terme d'humus (Six et al., 2002 ; Bronick et al., 2005). Généralement, le taux de matière organique du sol ne représente que quelques pourcents (0,5 à 10 %) de la masse du sol (Chenu et al., 2000). La matière organique du sol contribue à la fertilité chimique, physique et biologique des sols (Balesdent et al., 2000 ; Loveland et Webb, 2003 ; Shibu, 2006). Elle constitue aussi une source d'énergie et de nutriments pour les organismes hétérotrophes, il existe donc une relation étroite entre les teneurs en matières organiques et l'activité biologique des sols (Lehmann et Kleber, 2015 ; Chenu et al., 2019).

1.2. Le sol et ses fonctions

Depuis le développement de notre civilisation, la fonction principale des sols a été la production primaire pour la fourniture de l'alimentation humaine et animale, d'autres fonctions ont été mises en avant notamment en écho aux problématiques environnementales. Bouma et al. (2012) et Schulte et al. (2014) proposent de considérer quatre autres fonctions attribuables aux sols agricoles (**Figure 3**).

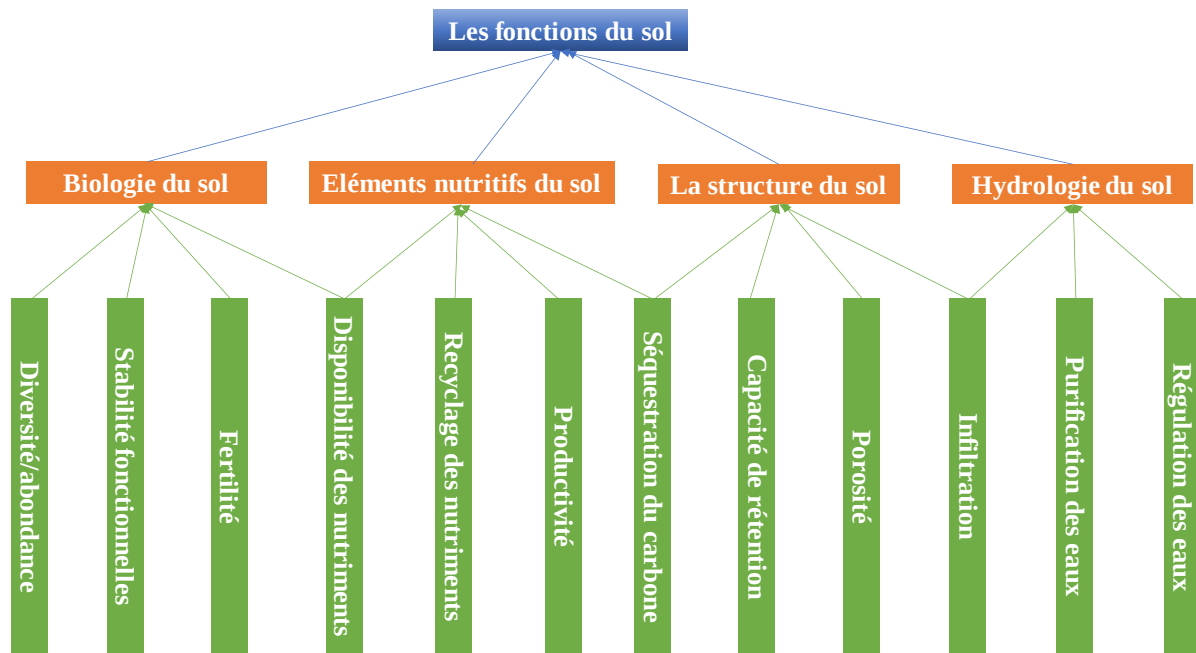


Figure 3. Les principales interactions entre les quatre fonctions du sol (*d'après* Leeuwen et al., 2017)

La régulation et la purification des eaux représentent l'aptitude d'un sol à limiter le ruissellement érosif et contribuer à l'épuration de l'eau (Greiner et al., 2017). La texture, la porosité et la stabilité structurale des sols leur confèrent des capacités de rétention et de filtration de l'eau contribuant à la régulation des aléas naturels notamment au regard des risques d'érosion et d'inondation (Dominati et al., 2014). Par ailleurs, la capacité du sol à séquestrer du carbone par l'accumulation de matières organiques est une fonction qui pourrait limiter l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre (CO_2 , CH_4 et N_2O) et contribuer à l'atténuation du changement climatique (Van den Broek et al., 2011). La capacité de stockage des sols a été estimée à près de 680 milliards de tonnes de carbone dans les trente premiers centimètres, soit le double de ce qui est présent dans notre atmosphère (Van den Broek et al., 2011). En outre, le recyclage des éléments nutritifs est une fonction essentielle au maintien de la productivité des sols. Cette fonction exprime la capacité d'un sol à transformer les éléments nutritifs, à partir de différentes sources généralement organiques, dans une forme disponible et utilisable par les plantes (Dominati et al., 2014 ; Calzolari et al., 2016 ; Schröder et al., 2016). Enfin, la biodiversité des sols fait référence à la composante vivante du sol et correspond à une multitude d'organismes. Cette biodiversité édaphique est à la base du fonctionnement des sols et peut participer à la modification des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques influençant ainsi les processus des sols (Leeuwen et al., 2019). Cette biodiversité contribue à la fertilité des sols par son implication dans le cycle des éléments nutritifs (Hattenschwiler et al., 2018) et dans

l'amélioration de la stabilité structurale et fonctionnelle des sols (Pulleman et al., 2012 ; Griffiths et al., 2016).

1.3. La biodiversité du sol

Le sol est un des plus grands réservoirs de biodiversité de notre planète. Bien qu'il abrite 80 % de la biomasse vivante (Decaëns, 2010), le sol a été longtemps considéré comme une boîte noire (Bardgett et van der Putten, 2014 ; Karimi et al., 2018). Le sol héberge de très nombreux organismes allant des procaryotes microscopiques aux mammifères macroscopiques (**Figure 4**).

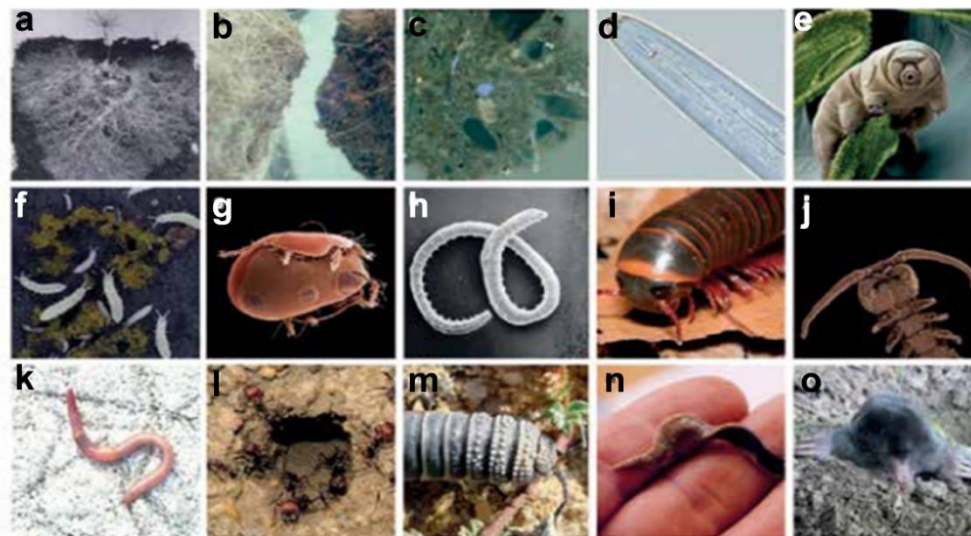


Figure 4. Une sélection d'organismes du sol (Bardgett et van der Putten, 2014)

Cette sélection inclut des champignons ectomycorhiziens (a) champignon décomposeur (b), bactérie (c), nématodes (d), tardigrade (e), collemboles (f), acarien (g), enchytréide (h), iule (i), scolopendre (j), ver de terre (k), fourmis (l), cloporte (m), plathelminthe (n) et taupe (o).

La classification de ces nombreux groupes d'organismes du sol est souvent basée sur leur taille (Swift et al., 1979 ; **Figure 5**). Les organismes les plus petits dont la taille est inférieure à 2 μm représentent les microorganismes du sol. Les nématodes et les unicellulaires eucaryotes représentent la microfaune du sol, dont la taille peut varier de 3 à 250 μm , mais certains peuvent avoir un diamètre dépassant 1 mm (Jeffery et al., 2013). Les groupes des acariens, des collemboles et des enchytraeides constituent la mésofaune, définie par un diamètre inférieur à 2 mm. Enfin, le macrofaune englobe de nombreux groupes très différents tels que les détritivores comme les vers de terre, les isopodes ou les millepattes et quelques groupes de coléoptères. La répartition de ces organismes varie également tout au long du profil du sol. Dans les 25 premiers centimètres, l'abondance de ces organismes est à son maximum (Frey, 2007 ; Piazza et al., 2020). En dessous des 25 premiers centimètres, les organismes du sol restent présents, y compris la macrofaune lombricienne avec certaines espèces creusant des

galeries jusqu'à 2 mètres de profondeur mais avec des abondances moins importantes (Edwards, 2004). La distribution hétérogène de ces organismes est attribuable à la combinaison des facteurs biotiques et abiotiques des sols, tels que la température, la disponibilité des ressources nutritives et de leur distribution spatio-temporelle, ainsi que les interactions écologiques entre ces organismes (compétition, prédation, antagonisme, etc.) (Ettema et Wardle, 2002 ; Hattenschwiler et al., 2018).

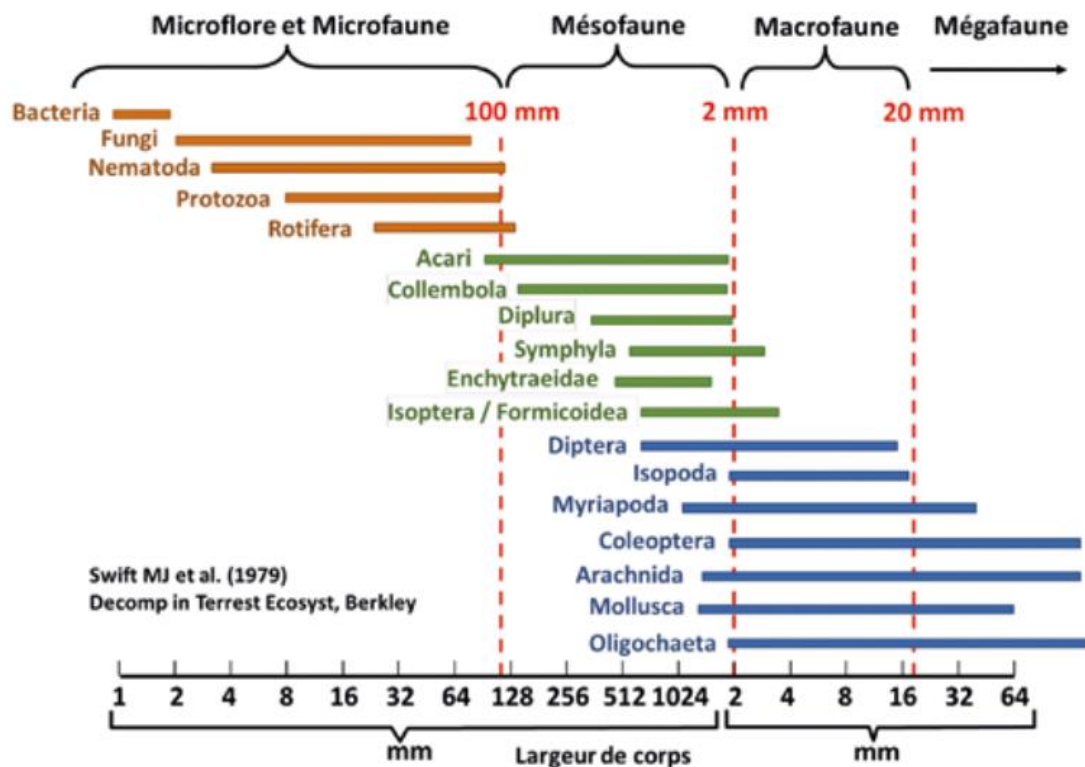


Figure 5. La classification par taille (largeur des corps) des organismes du sol (Swift et al., 1979)

1.4. Les microorganismes du sol

Les microorganismes tels que les champignons, les bactéries, les algues, les nématodes et protozoaires, sans oublier les archaea et les virus forment une majeure partie de la biodiversité du sol (Torsvik et al., 1990a ; Fierer et al., 2007). On estime qu'un gramme de sol abrite 10^4 à 10^5 espèces bactériennes, 10^5 à 10^6 espèces fongiques, 10^2 à 10^3 espèces d'archaea, 10^5 espèces de protozoaires et 10^4 espèces d'algues (Torsvik et al., 1990b ; Curtis et Sloan, 2005 ; Fierer et al., 2007 ; **Figure 6**). Ces microorganismes dépendent de la matière organique notamment comme source de carbone et d'énergie. C'est pourquoi ils prolifèrent dans les premiers 10 à 25 cm de la surface du sol où les résidus organiques et les racines des végétaux sont les plus abondants (Frey, 2007 ; Bardgett et van der Putten, 2014). Les microorganismes sont justement

impliqués dans la transformation et le recyclage de la matière organique, rendant leur diversité cruciale au maintien de la structure des communautés microbiennes et des fonctions des sols (van Elsas et Garbeva, 2002 ; Girvan et al., 2003 ; Schlöter et al., 2003).

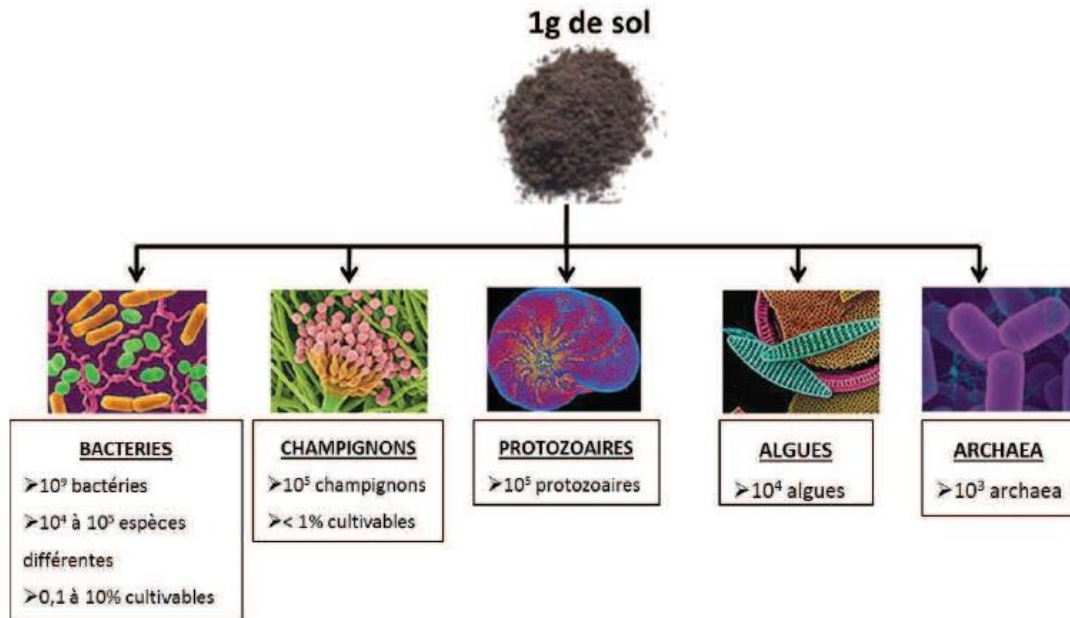


Figure 6. Les microorganismes du sol (d'après Torsvik et al., 1990a ; Fierer et al., 2007)

Les communautés bactériennes du sol comprennent une multitude d'individus unicellulaires. En prenant la taille du génome d'*Escherichia coli* comme unité de référence, Torsvik et Øvreås, (2002) ont estimé la présence d'environ 6000 génomes bactériens différents par gramme de sol. Les champignons quant à eux, sont presque exclusivement retrouvés sous forme filamenteuse. Leurs hyphes sont souvent organisés de façon grossière et impliqués dans un large réseau de mycélium qui peut s'étendre jusqu'à 200 m (Killham, 1994 ; Brodie et al., 2003 ; Bardgett, 2005). Les bactéries et les champignons sont les organismes les plus abondants et diversifiés du sol. Ils constituent donc la proportion majoritaire de la biomasse microbienne du sol (Brodie et al., 2003 ; Bardgett et van der Putten, 2014). L'abondance microbienne tellurique varie fortement en fonction du mode d'usage du sol, la disponibilité des nutriments, du pH et de la texture du sol (Yao et al., 2000 ; Strickland et Rousk, 2010 ; Karimi et al., 2018). Cette biomasse donne une information importante sur le fonctionnement biologique du sol puisqu'elle est fortement liée à l'intensité des flux de carbone et d'azote (Colman et Schimel, 2013 ; Recous et al., 2017). Au-delà de la biomasse, la diversité microbienne du sol est également un paramètre important pouvant déterminer le fonctionnement biologique du sol. Des travaux ont en effet

montré que la stabilité (résistance-résilience) et le maintien des fonctions des sols augmentent avec l'augmentation de la biodiversité qu'il abrite (Torsvik et Øvreås, 2002). A l'inverse, une perte de diversité entraîne une perte de résistance et de résilience aux activités anthropiques mais aussi aux stress naturels (Riah-Anglet et al., 2015 ; Riah-Anglet et al., 2018 ; Jiang et al., 2020 ; Shi et al., 2020). L'inventaire de la diversité microbienne du sol est limité, ceci est particulièrement vrai pour les bactéries et les champignons dont les espèces connues représentent environ 1 % du nombre total d'espèces présentes dans le sol (Torsvik et Øvreås, 2002). Le manque de connaissances sur la diversité de la microflore du sol est essentiellement dû à des difficultés techniques (Ranjard et al., 2000 ; Gangneux et al., 2011). Toutefois, avec le développement et l'augmentation de l'utilisation de techniques moléculaires, notre connaissance de la diversité des communautés microbiennes du sol a augmenté considérablement depuis ces dernières années.

1.5. Rôle des microorganismes dans la décomposition de la matière organique du sol

Les microorganismes du sol sont fortement impliqués dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des éléments nutritifs (Recous et al., 2017). Ils jouent un rôle clé dans la dynamique de décomposition de la matière organique du sol (Juarez et al., 2013 ; Stockmann et al., 2013). Cette décomposition est réalisée en grande partie par des microorganismes hétérotrophes qui synthétisent des enzymes qui hydrolysent ou oxydent la matière organique du sol. Cette dégradation enzymatique de la matière organique est l'un des principaux facteurs contrôlant sa décomposition (Sinsabaugh, 1994 ; Schimel et Weintraub, 2003). Ces réactions d'hydrolyse microbienne vont contribuer à la libération d'éléments minéraux potentiellement disponible pour la croissance des plantes (Derrien et al., 2016 ; Recous et al., 2017 ; Hattenschwiler et al., 2018). Les besoins des microorganismes ainsi que la composition et la qualité biochimique de la matière organique déterminent sa vitesse de décomposition et la disponibilité des éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore, etc.) (Geisseler et al., 2010 ; Mooshammer et al., 2014a ; Mooshammer et al., 2014b ; Zechmeister-Boltenstern et al., 2015). En effet, les microorganismes utilisent une partie des éléments minéraux libérés pour répondre à leurs besoins de croissance (fonction d'immobilisation ou d'organisation).

Les besoins des communautés microbiennes du sol sont contrôlés par la stœchiométrie des éléments. Ainsi, les bactéries ont un carbone/azote compris entre 3 et 12 avec une moyenne de 6, alors que les champignons ont un carbone/azote compris entre 4 et 60 avec une moyenne de 12 (Strickland et Rousk, 2010 ; Mouginot et al., 2014). Afin de maintenir l'homéostasie stœchiométrique en éléments nutritifs, les microorganismes ajustent l'utilisation et l'acquisition

en éléments nutritifs, influençant ainsi leur disponibilité dans les sols (Geisseler et al., 2010 ; Haney et al., 2012 ; Zechmeister-Boltenstern et al., 2015). Si la matière organique soluble absorbée présente un ratio carbone/nutriment minéral inférieur au ratio de la biomasse microbienne vivante, le minéral en excès sera excrété vers le stock des nutriments solubles (minéralisation nette) (Nicolardot et al., 1997 ; Recous et al., 2017). En revanche, si le ratio de la matière organique est supérieur à celui de la biomasse microbienne vivante, le manque de minéraux sera compensé en mobilisant les éléments minéraux nécessaires (immobilisation nette) (Mooshammer et al., 2014a ; Mooshammer et al., 2014b ; Recous et al., 2017). La balance entre ces deux fonctions de minéralisation et d'immobilisation qui se produisent conjointement dans les sols, régit le couplage des cycles biogéochimiques et les flux de carbone et d'azote dans le sol (Recous et al., 2017 ; Rumpel et Chabbi, 2019a ; Rumpel et Chabbi, 2019b ; **Figure 7**).

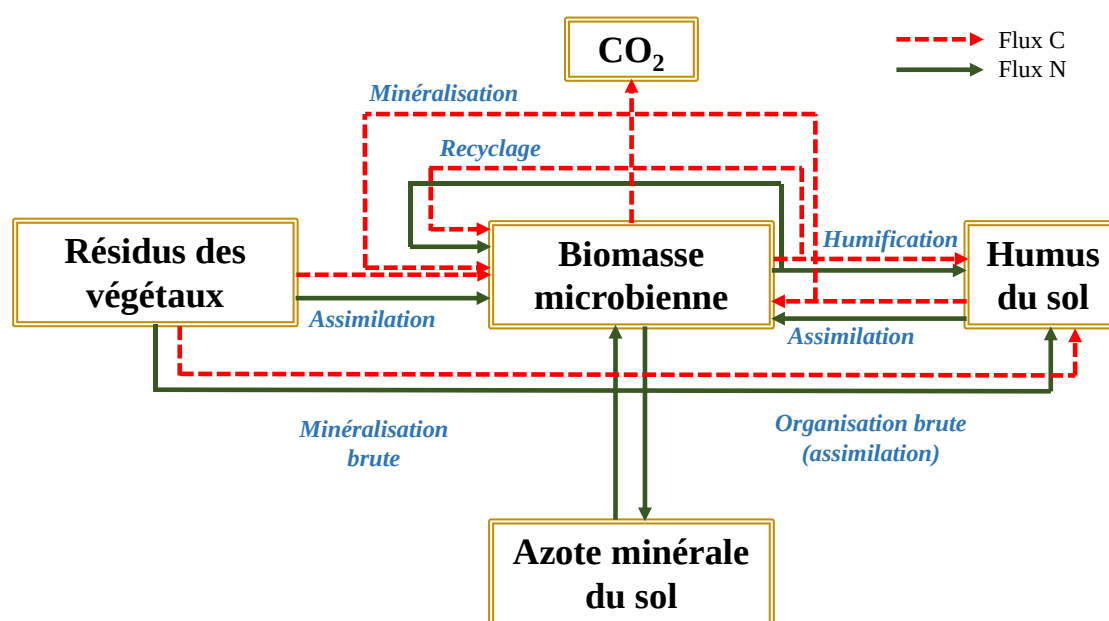


Figure 7. Représentation schématique du couplage entre les flux de carbone et d'azote au cours de la décomposition des matières organiques et relation avec la minéralisation nette (Recous et al., 2015). C : carbone : N : azote

Les relations entre la qualité de la matière organique et le taux de décomposition sont bien décrits dans la littérature (Trinsoutrot et al., 2000 ; Machinet et al., 2011 ; Jones et al., 2009a ; Birouste et al., 2012 ; Sauvadet et al., 2017). La plupart de ces études ont porté sur la mesure des flux de carbone et d'azote et peu d'entre elles ont analysé les modifications des communautés microbiennes et le rôle respectif des différents familles, genres, etc., dans l'ensemble des fonctions liées à la dynamique des éléments des cycles biogéochimiques et de

ce fait dans la fertilité du sol. Dans ce contexte, un chapitre de ce manuscrit de thèse sera consacré à l'évaluation du rôle des communautés microbiennes dans la dynamique des éléments (cf **Chapitre. III, Article 4**).

1.6. Les enzymes

Le taux de décomposition de la matière organique du sol est sous le contrôle des enzymes extracellulaires (Zhao et al., 2016b ; Liu et al., 2017a ; Wang et al., 2019). Ces enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique qui interviennent dans de nombreuses réactions biochimiques. Les enzymes du sol sont principalement d'origine microbienne (Dick et Tabatabai, 1987 ; Gao et al., 2010) mais peuvent aussi avoir une origine animale et végétale (Sturner et Elser, 2002 ; McGroddy et al., 2004). Dans le sol, les enzymes sont constamment synthétisées, accumulées et/ou décomposées (Trasar-Cepeda et al., 2007 ; Nannipieri et al., 2017 ; Assemien, 2018). Elles peuvent être sous forme libre dans la solution du sol ou associées au complexe argilo-humique et aux colloïdes (Kandeler, 2007 ; Cotrufo et al., 2013 ; Cenini et al., 2016 ; Nannipieri et al., 2017 ; **Figure 8**). Les activités enzymatiques jouent un rôle important dans le fonctionnement du sol (Makoi et Ndakidemi, 2008).

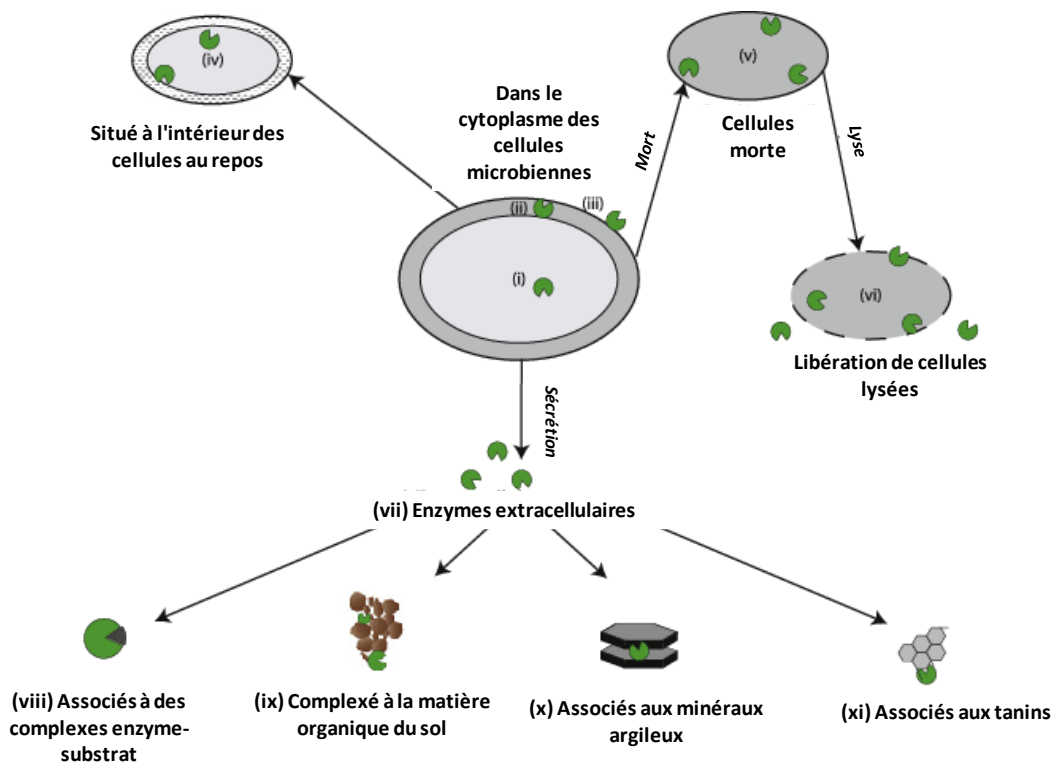


Figure 8. Localisation et état des enzymes dans les sols (*d'après* Burns et al., 2013)

(i) dans le cytoplasme des cellules microbiennes; (ii) à l'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif; (iii) situés sur la surface externe des cellules avec leurs sites actifs; (iv) situé à l'intérieur des cellules au repos, y compris les spores fongiques, les kystes protozoaires et les endospores bactériennes; (v) attaché à des cellules mortes entières et à des débris cellulaires; (vi) libération de cellules lysées; (vii) libre dans la solution du sol; (viii) associés à des complexes enzyme-substrat; (ix) complexé avec la matière organique du sol; (x) adsorbé sur les surfaces externes et internes des minéraux argileux; (xi) lié aux tanins condensés.

Elles sont impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre et d'autres nutriments essentiels (Burns et Dick, 2002 ; Caldwell, 2005 ; Floch et al., 2009) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Les principales enzymes mesurées dans les sols agricoles (*d'après* Caldwell, 2005).
H : hydrolase, O : oxydase

Cycle	Composé	Forme	Enzymes	Classe	Références
Carbone	Cellulose	Polysaccharide	Endo-cellulase	H	Caldwell, 2005
			β -Glucosidase	H	Wang et al., 2020
					Zhang et al., 2019
					Liu et al., 2017a
					Cenini et al., 2016
	Galactose		β -galactosidase	H	Ndossi et al., 2020
					Zhang et al., 2019
	Hémicellulose		Xylanase	H	Dick, 2005
	Chitine		Endochitinase	H	Olander et Vitousek, 2000
			N-acétylglucosaminidase	H	Cenini et al., 2016
					Jian et al., 2016
	Lignine	Aromatique	Phenoloxidase	O	Demkina et al., 2017
					Sherene, 2017
					Wiedermann et al., 2017
					Mazzon et al., 2018
			Laccase	O	Jian et al., 2016
					Santhanam et al., 2011
			Peroxidase	O	Di Nardo et al., 2004
	Ester d'acide gras	Aliphatique	Lipase	H	
					Bharathi et Rajalakshmi, 2019
Azote	Protéine	Peptidique	Endo-peptidase	H	Vranova et al., 2013
	Peptides		Aminopeptidase	H	Cenini et al., 2016
			Arylamidase	H	Shorunke et al., 2001
					Kader et al., 2017
					Acosta-Martinez et Tabatabai, 2001a,b
	Amine	Non-péptidique	Amidase	H	Priyadarshini et al., 2020
					Acosta-Martinez et Tabatabai, 2000
			Uréase	H	Dotaniya et al., 2019
					Kunduru et al., 2017
Phosphore		Ester	Phosphatase	H	Ndossi et al., 2020
					Sinsabaugh et al., 2008
Soufre		Phenol sulfate	Arylsulfatase	H	Wang et al., 2019
					Zhang et al., 2019

Les enzymes interviennent dans la décomposition de la matière organique du sol et les produits de ces catalyses sont disponibles pour la croissance des microorganismes et la nutrition des plantes (Nannipieri et al., 2002 ; Allison et Martiny, 2008 ; Sinsabaugh et al., 2009 ; Brzostek and Finzi, 2011 ; Wallenstein et al., 2015). Par leur action, ces enzymes participent aussi dans la décontamination des sols en dégradant les polluants métalliques et les contaminants

organiques (Rao et al., 2010 ; Riah et al., 2014). Enfin, ces enzymes jouent un rôle important dans la stabilisation de la structure du sol. En effet, des travaux menés par Cui et Jia (2015) ont montré une forte corrélation entre l'état structural du sol et le niveau des activités enzymatiques en lien avec les cycles du carbone et de l'azote.

Les activités enzymatiques varient très largement en fonction de l'environnement physicochimique (Dick et Tabatabai, 1987 ; Marx et al., 2001) et de la présence de substrats riches en énergie comme le glucose (Sinsabaugh et al., 2008 ; Kieloaho et al., 2016). En effet, une littérature abondante rapporte une augmentation du niveau des activités enzymatiques dans les sols suite à l'apport de matière organique et notamment des résidus de culture (García-Orenes et al., 2010 ; Zhang et al., 2016 ; Zhao et al., 2016a; Shahbaz et al., 2017). Dans ce contexte, il existe actuellement un grand intérêt agronomique à l'utilisation des enzymes extracellulaires comme un indicateur de l'état des sols, car elles sont relativement simples à déterminer, elles sont sensibles aux stress environnementaux et répondent rapidement aux pratiques agricoles et aux changements du mode d'usage des sols (Liu et al., 2017b ; Wang et al., 2019). Il existe six classes d'enzymes, les hydrolases, les oxydoréductases, les transférases, les lyases, les isomérases et les ligases (Tipton et Boyce, 2000). Les hydrolases et les oxydoréductases représentent les deux classes d'enzymes les plus largement étudiées dans les sols (Dick et Tabatabai, 1987). En effet, des enzymes telles que la déshydrogénase, la laccase, la protéase, la lipase, les phosphatases, la β -glucosidase, la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, l'arylamidase, etc. ont fait l'objet de recherches très intenses dans le domaine de l'enzymologie du sol. Ainsi ces activités ont été mesurées dans une grande diversité de contextes agropédoclimatiques (Cenini et al., 2016 ; Liu et al., 2017b ; Wang et al., 2019 ; Zhang et al., 2019).

- La β -glucosidase (EC 3.2.1.21) est une enzyme très abondante dans le sol et elle est impliquée dans le cycle du carbone (Eivazi et Tabatabai, 1990 ; Wang et Lu, 2006a). La β -glucosidase intervient dans la dégradation de la cellulose pour libérer du glucose à partir des β -glucosides (Utobo et Tewari, 2015). La synthèse de la β -glucosidase est induite par la présence des produits cellulotiques, tel que la cellobiose, le glucose et leurs métabolites (Zhang et al., 2019). L'activité de cette enzyme est très sensible aux changements de pH (Acosta-Martinez et Tabatabai, 2000 ; Wang et Lu, 2006b) et aux pratiques agricoles (Sinsabaugh et al., 2008 ; Pandey et al., 2014 ; Liu et al., 2016).

- La N-acétyl- β -D-glucosaminidase (E.C.3.2.1.30) est une enzyme qui intervient dans la dégradation de la chitine qui représente le deuxième bio-polymère le plus abondant et la ressource la plus importante de carbone organique et d'azote (Ekenler et Tabatabai, 2002). C'est

pour cette raison que N-acétyl- β -D-glucosamidase intervient à la fois dans le cycle du carbone et de l'azote (Ekenler et Tabatabai, 2003). Des études ont montré que l'activité N-acétyl- β -D-glucosamidase est affectée par les pratiques culturales (Ekenler et Tabatabai, 2002), et notamment par l'apport de résidus de culture et par la fertilisation azotée (Zhao et al., 2016a). Cette activité est corrélée positivement avec l'azote minéral du sol et a été suggérée comme indice de la minéralisation de l'azote (Tabatabai et al., 2010).

- L'arylamidase (EC 3.4.11.2) est une enzyme connue pour son rôle dans l'hydrolyse des acides aminés N-terminaux des arylamides, des protéines et des peptides. Cette enzyme est sécrétée par les cellules animales, végétales et les microorganismes du sol (Acosta-Martinez et Tabatabai, 2000). L'arylamidase joue un rôle important dans la réaction de minéralisation de l'azote organique dans les sols (Dodor et Tabatabai, 2007). Kader et al. (2017) ont montré que les pratiques agricoles, notamment l'apport de matière organique influence l'activité de l'arylamidase.

1.7. Effet des pratiques culturales sur les communautés microbiennes du sol

Les pratiques agricoles, telles que le travail du sol, la fertilisation minérale et organique et les rotations de culture, impactent les composantes physique, chimique et biologique du sol (Sharma et al., 2011). Ces pratiques, en influençant la quantité et la qualité de la matière organique, le pH, la température, l'aération et l'humidité, etc. engendrent des modifications dans l'habitat, l'abondance, la diversité et l'activité des communautés microbiennes (Sun et al., 2018 ; Xia et al., 2019 ; Kraut-Cohen et al., 2020).

Le régime de travail du sol est caractérisé par sa fréquence, sa profondeur et le retournement du sol, qui perturbe fortement les communautés microbiennes, qui se trouvent principalement dans les premiers centimètres à la surface du sol (Bissett et al., 2011). Le labour induit des changements drastiques dans les communautés microbiennes et leurs activités, qui peuvent persister longtemps (Sun et al., 2018 ; Xia et al., 2019 ; Kraut-Cohen et al., 2020). En effet, le labour conventionnel entraîne une diminution de la biomasse microbienne totale, bactérienne et fongique en détruisant essentiellement les hyphes de ces derniers (Bittman et al., 2005 ; Tian et al., 2013 ; Hartman et al., 2018 ; Schmidt et al., 2018 ; Xia et al., 2019). Une étude récente a montré qu'un travail du sol même occasionnel, suffit à modifier l'abondance et la diversité des communautés bactériennes à des différents niveaux taxonomiques (Kraut-Cohen et al., 2020). En effet, l'abondance relative des groupes bactériens *Bacterioidetes* et *Proteobacteries* diminuent drastiquement dans les sols labourés (Kraut-Cohen et al., 2020). Ces observations sont contradictoires avec des travaux antérieurs qui montrent qu'un seul labour n'impacte pas

les propriétés physicochimiques et biologiques des sols (Liu et al., 2016 ; Rincon-Florez et al., 2016).

Les sols non labourés présentent une biomasse microbienne supérieure de + 20 à + 60 % comparativement aux sols labourés (Panettieri et al., 2014). Ce résultat est lié à une augmentation de la biomasse fongique qui résulte de l'accumulation de la matière organique du sol et une légère acidification en surface, qui favorise la prolifération des champignons (Pastorelli et al., 2013 ; Geisseler et Scow, 2014). L'effet positif de l'absence du travail du sol sur les communautés microbiennes se traduit aussi par une augmentation des activités enzymatiques hydrolases dans les sols (β -glucosidase, arylsulphatase et phosphatase alcaline) (Zhang et al., 2014 ; Kraut-Cohen et al., 2020).

La fertilisation azotée minérale augmente la teneur en matière organique du sol de 10 à 20 % en raison d'une augmentation de la biomasse végétale totale produite, entraînant ainsi une augmentation de la biomasse microbienne de l'ordre de 15 % (Ladha et al., 2011 ; Geisseler et Scow, 2014). Malgré cet effet positif sur la biomasse microbienne, plusieurs auteurs ont montré une diminution de la diversité et la richesse des communautés bactériennes du sol à la suite de l'application de différents traitements de fertilisants minéraux (Ramirez et al., 2010 ; Sun et al., 2018 ; Zhang et al., 2019). La biomasse fongique quant à elle, semble être favorisée par la fertilisation minérale, cet effet est attribué à une diminution du pH du sol qui favorise la prolifération des champignons (Zhang et al., 2012). Les réponses des activités enzymatiques à la fertilisation minérale sont variables. Elles montrent une stimulation des activités impliquées dans le cycle du carbone et une diminution voire une inhibition des activités enzymatiques impliquées dans le cycle de l'azote, à l'exception de l'activité uréase (Giacometti et al., 2013 ; Geisseler et Scow, 2014 ; Fisher et al., 2017).

Les fertilisants organiques présentent des compositions et des labilités différentes en fonction de leur origine. Il existe néanmoins un consensus sur l'effet positif de ces apports sur la biomasse microbienne (Fang et al., 2007 ; Cookson et al., 2008 ; Ribeiro et al., 2010 ; Grunwald et al., 2016). Les fertilisants organiques entraînent une augmentation de la biomasse microbienne de 36 % en moyenne (Kallenbach et Grandy, 2011), supérieure à celle observée pour la fertilisation minérale. La fertilisation organique modifie les communautés microbiennes en favorisant la croissance des champignons, et des bactéries Gram positif à long terme (Allison et Martiny, 2008 ; Zhang et al., 2015 ; Yu et al., 2016). Par ailleurs, les nombreux travaux qui décrivent l'effet des apports organiques sur les activités enzymatiques du sol s'accordent à montrer une stimulation des activités enzymatiques hydrolases impliquées dans les différents

cycles (carbone, azote, phosphore et soufre) (Tejada et al., 2006 ; Bastida et al., 2008 ; Ouni et al., 2013 ; Geisseler et Scow, 2014).

Les rotations culturales, en fonction du couvert végétal, de la succession et de la durée des cultures, constituent une pratique qui peut influencer directement ou indirectement les communautés microbiennes des sols. En effet, les rotations impliquent l'ensemble des pratiques détaillées précédemment et ont donc également une incidence sur la structure et les activités des communautés microbiennes du sol (Machinet et al., 2009). La littérature rapporte des changements significatifs dans la structure des communautés bactériennes lors de changements du couvert végétal. Ces changements ont été observés aussi bien au niveau des groupes universels bactériens (Nüsslein et Tiedje, 1999 ; Tiedje et al., 1999), qu'au niveau des groupes fonctionnels (Singh et al., 2007). Des travaux qui portent sur la diversification des cultures dans la rotation montrent une stimulation des activités enzymatiques hydrolytiques dans les sols (Dodor et Tabatabai, 2007 ; Benintende et al., 2008). Dans le cadre de mon travail de thèse, l'impact des rotations culturales sur les communautés microbiennes et leurs activités sera étudié et fera l'objet du **Chapitre III, Article 1** de ce manuscrit.

2. Partie 2 : Cycle de l'azote et légumineuses

L'azote est un élément abondant, en grande majorité sous forme gazeuse inerte (le diazote, N_2) et représente 78 % du volume de l'atmosphère (Canfield et al., 2010). Dans le sol, il est essentiellement sous forme organique ou minérale (Galloway et al., 2008). L'azote subit différentes transformations chimiques et biologiques et passe par différentes formes (diazote, nitrate, nitrite, ammoniac/ammonium, azote organique, protoxyde d'azote, etc.) ce qui permet son utilisation par les êtres vivants (Gruber et al., 2008).

2.1. Cycle de l'azote dans le sol

L'azote du sol joue un rôle important dans la croissance des plantes et la production primaire des écosystèmes (Vitousek et Howarth, 1991). La forme préférentielle d'absorption de l'azote par les plantes est celle des ions nitrate (NO_3^-) (Morot-Gaudry et al., 2014). Néanmoins, elles peuvent également assimiler des acides aminés (ou d'autres monomères) dans les écosystèmes où la minéralisation de l'azote est très faible. Dans le cycle de l'azote, quatre processus majeurs régulent le passage de l'azote d'une forme à l'autre dans le sol : la fixation libre et symbiotique, la minéralisation (ammonification), la nitrification et l'organisation (Nicolardot et al., 1997 ; Recous et al., 2015 ; Recous et al., 2017 ; **Figure 9**).

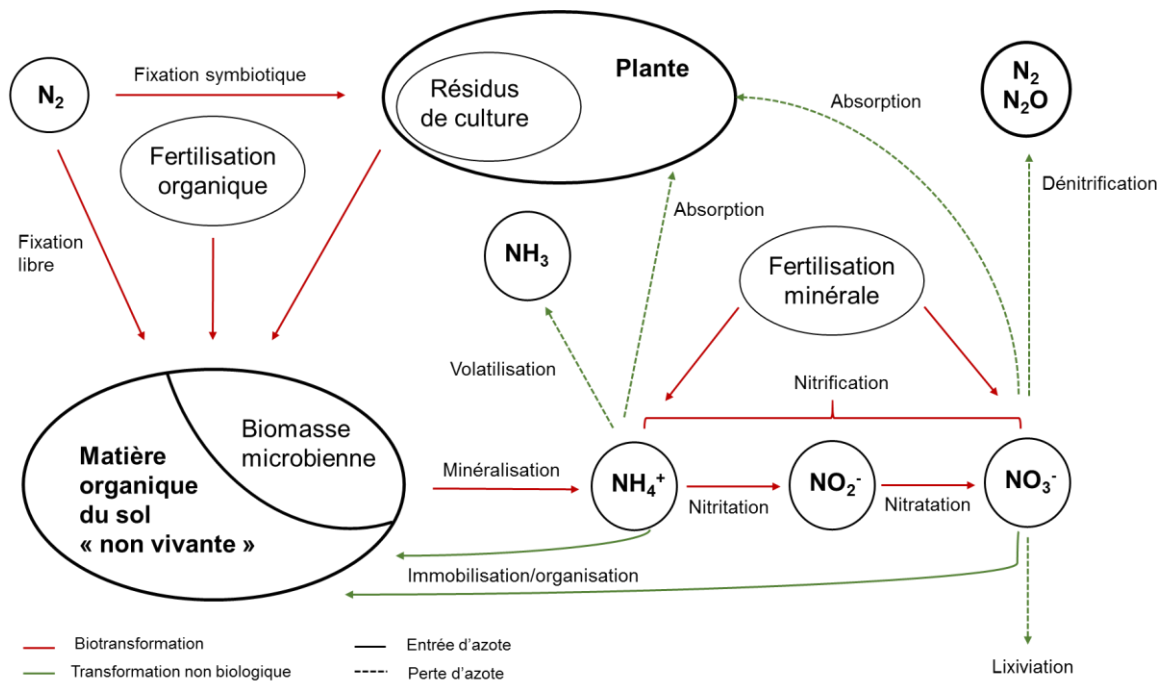


Figure 9. Cycle de l'azote dans le sol (d'après Nicolardot et al., 1997)

La fixation de l'azote atmosphérique est particulièrement importante pour le bon fonctionnement des écosystèmes puisqu'elle permet l'entrée de l'azote dans l'écosystème. La réaction implique la réduction du N_2 en ammoniac grâce à une enzyme, la nitrogénase (Howarth et al., 1988 ; Newton, 2007). De nombreux organismes appartenant aux archées, aux bactéries et aux cyanobactéries synthétisent cette enzyme (Garcia et al., 2019 ; Mus et al., 2019). Ces organismes ont la possibilité de fixer l'azote, en association ou non avec des plantes. Lorsque ces microorganismes ne sont pas associés à un hôte, ils tirent l'énergie nécessaire à la réaction de leur propre métabolisme hétérotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*) ou autotrophe (*Cyanobactéries*), on parle de fixation libre de l'azote (Kranz et Haselkorn, 1985 ; Jiménez et al., 2011). Lorsque la fixation bactérienne nécessite l'établissement d'une symbiose avec une plante hôte, on parle de la fixation symbiotique de l'azote (Voisin et al., 2015 ; Masson-Boivin et Sachs, 2018). Ces symbioses impliquent des bactéries du genre *rhizobium* associées aux plantes de la famille des *Fabaceae* (couramment appelé les légumineuses) et des *Cannabaceae* (Carlsson et Huss-Danell, 2003 ; Op den Camp et al., 2012), des bactéries *Actinomycètes* du genre *Frankia* avec les plantes de la famille des *Casuarinaceae* (exemple : le pin australien) (Benson et Silvester, 1993) et les *Cyanobactéries* avec les plantes des genres *Azolla* (exemple : fougère) (Fay, 1992 ; Nilsson et al., 2002 ; Bocchi et Malgioglio, 2010). Dans ce cas, l'énergie est fournie aux microorganismes par la plante hôte. Cette réaction permet une grande entrée d'énergie dans l'écosystème et représente l'essentiel de l'azote accumulé dans les sols (Voisin et al., 2015). Une autre étape clé du cycle de l'azote est la minéralisation (ou

ammonification). C'est une réaction d'oxydation par les microorganismes hétérotrophes de l'azote organique issu de la matière organique du sol et de divers métabolites azotés plus ou moins simples en ammonium (NH_4^+). L'organisation (ou immobilisation) de l'azote consiste en l'assimilation de l'azote minéral par les microorganismes du sol (Hart et al., 1994 ; **Figure 9**). La minéralisation de l'azote est toujours associée au phénomène d'organisation de l'azote minéral. Minéralisation et organisation étant deux processus concurrents et simultanés, ce que l'on observe, à travers l'évolution de la quantité d'azote minéral du sol, correspond à la résultante de ces deux processus (Recous et al., 2017). La nitrification correspond quant à elle à la conversion de l'ammonium (NH_4^+) en nitrate (NO_3^-) par des bactéries autotrophes selon 2 étapes : la nitrification, transformation de l'ammonium en nitrite, et la nitrification, transformation du nitrite en nitrate. Ces deux étapes distinctes, sont des processus aérobies stricts, chacune d'elle faisant appel à des bactéries spécifiques, des genres *Nitrosomonas* et *Nitrosospira* pour la nitrification (Kowalchuk et Stephen, 2001 ; Leininger et al., 2006) et *Nitrobacter* et *Nitrospira* pour la nitrification (Hayatsu et al., 2008). Le nitrate est mobile dans le sol et est par conséquent facilement absorbé par les plantes (Qiao et al., 2015).

Dans les agrosystèmes, le cycle de l'azote est impacté par les apports d'engrais et d'amendements qui peuvent modifier la cinétique des transformations biologiques (Voisin et al., 2015). En cas d'excès d'azote dans le système, il peut subir des pertes par voie gazeuse, par lixiviation ou par érosion (**Figure 9**). Ces pertes sont dues à des transformations *via* des processus de dénitrification, de lixiviation et de volatilisation engendrant des fuites dans l'environnement. La dénitrification ou le retour de l'azote à l'atmosphère est une réduction, en condition d'anaérobiose, du nitrate en diazote (Hayatsu et al., 2008). Cette transformation en plusieurs étapes fait intervenir de nombreuses espèces bactériennes, majoritairement hétérotrophes (dont celles du genre *Pseudomonas*) et produit généralement un mélange de protoxyde d'azote et de diazote (Hayatsu et al., 2008). Les 2/3 de la microflore réduisent les NO_3^- en NO_2^- , mais seulement un faible pourcentage semble capable de réaliser toute la chaîne de réactions, ce qui explique que la réaction s'arrête au stade NO ou N_2O , avant d'atteindre le stade de N_2 inerte (Hénault et Germon, 1995). Le cycle de l'azote renferme également des processus physico-chimiques indépendants de l'activité biologique du sol comme les pertes d'azote par lixiviation. Ce processus d'entraînement des nitrates en profondeur par l'eau est responsable de la pollution des nappes phréatiques. L'amplitude du phénomène dépend du reliquat azoté après la culture, de la minéralisation de l'azote après la récolte et du volume d'eau drainée qui peut être estimé à partir des données climatiques fréquentielles (pluviométrie et évapotranspiration) entre la date de récolte de la culture et la fin du drainage (Cattin et al.,

2002). La perte par voie gazeuse de l'ammoniac (NH_3), appelée volatilisation, fait aussi partie des transformations non biologiques du cycle de l'azote (**Figure 9**). Ce processus s'intensifie au moment des épandages agricoles, il est favorisé par un pH du sol élevé et un climat chaud. On note qu'en moyenne 20 % de l'azote ammoniacal des fumiers et des lisiers peut être perdu par volatilisation (Groenestein et Van Faassen, 1996 ; Basset-Mens, 2005). Contrairement à ces deux phénomènes, la déposition atmosphérique de l'azote par les précipitations peut être un vecteur d'apport d'azote organique. Les formes organiques d'azote sont répandues dans l'atmosphère et leur dépôt peut constituer un apport substantiel de l'azote aux écosystèmes terrestres et aquatiques (Neff et al., 2002). Cette déposition a augmenté de manière significative avec la révolution industrielle et l'intensification de l'agriculture (Zhang et al., 2008).

2.2. Cas particulier des légumineuses dans le cycle de l'azote

Les fabacées, plus communément appelées légumineuses, désignent une famille très diversifiée, qui comprend environ 376 espèces en France et 7 000 dans le monde (Schneider et Huyghe, 2015). Les légumineuses sont des plantes dicotylédones caractérisées pour la plupart par des fleurs papilionacées, une gousse contenant les graines et la capacité de fixer l'azote atmosphérique inerte (N_2) pour produire ses propres composantes protéiques, grâce à l'établissement d'une association symbiotique avec des bactéries du sol (Herridge et al., 2008 ; Masson-Boivin et Sachs, 2018). Au sein des légumineuses, on distingue deux groupes. D'un côté les légumineuses fourragères cultivées pour leurs parties végétatives en vue de l'alimentation animale, de l'autre côté les légumineuses à graines utilisées pour l'alimentation animale et humaine (Carrouée et al., 1999 ; De Ron et al., 2017). Au sein des légumineuses à graines sont définis plusieurs groupes selon leurs débouchés. Il s'agit des légumineuses protéagineuses (par exemple : pois, féverole et lupin) principalement cultivés pour l'alimentation animale. Le groupe des oléo-protéagineux (exemple : le soja) dont les graines sont utilisées pour la fabrication d'huile et de leurs co-produits riches en protéines (tourteaux). Enfin, les légumineuses secs (exemple : les lentilles, le pois sec, les haricots verts...) correspondent aux légumineuses à graines récoltées à maturité, et à destination de l'alimentation humaine (De Ron et al., 2017). Les légumineuses jouent un rôle potentiellement déterminant dans les flux d'azote dans les agrosystèmes (Schneider et Huyghe, 2015) et cette propriété en fait un atout pour la construction de nouveaux systèmes de culture économes en intrants fertilisants.

2.3. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

Comme vu précédemment, les légumineuses sont capables, en symbiose avec des bactéries, de convertir l'azote atmosphérique (N_2) en azote ammoniacal (NH_4), assimilable par la plante.

Sawada et al. (2003) identifiaient déjà plus de 70 espèces de *rhizobium* réparties sur 12 genres différents (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Burkholderia* et *Cupriavidus*). Pour une même plante, l'efficacité de la fixation symbiotique peut varier en fonction de l'espèce de *rhizobium* (Laguerre et al., 2007). La fixation symbiotique est réalisée par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique catalysée par la nitrogénase. Une augmentation de la pression partielle d'oxygène ou même l'élimination de la lumière, induiraient une diminution rapide voir une inhibition de l'activité de cette enzyme après 2 à 3 min (Schneider et Huyghe, 2015).

Les travaux de Voisin et al. (2015) ont mis en évidence les mécanismes de reconnaissance entre racines de légumineuses et bactéries symbiotiques à l'échelle moléculaire et cellulaire. Les flavonoïdes semblent particulièrement impliqués dans ce mécanisme de reconnaissance spécifique (Laranjo et al., 2014 ; Masson-Boivin et Sachs, 2018). Ces composés agissent sur la transcription des gènes de la nodulation (gènes Nod) chez les bactéries symbiotiques. Les bactéries répondent à ces signaux par la formation des nodosités (Laranjo et al., 2014 ; Voisin et al., 2015), siège de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique chez les légumineuses (Laranjo et al., 2014 ; **Figure 10**).

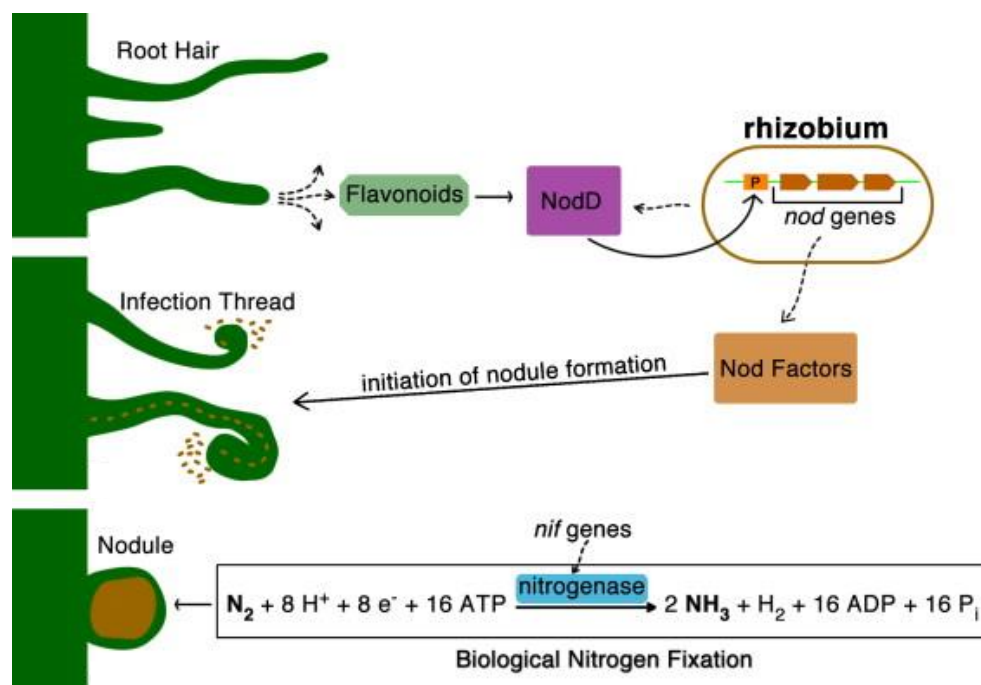


Figure 10. Interaction entre le *rhizobium* et sa plante hôte (Laranjo et al., 2014)

La quantité d'azote fixée grâce à la symbiose rhizobienne est variable selon l'espèce végétale (Tableau 2).

Tableau 2. Les quantités de N₂ fixées en kg.ha⁻¹.an⁻¹ par quelques légumineuses (d'après Kakraliya et al., 2018)

Espèce de légumineuse	Nom scientifique	Bactérie associée	Quantité d'azote fixée (kg.ha ⁻¹ .an ⁻¹)	Références
Soja	<i>Glycine max L.</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	100–150	Ahlawat and Gangaiah., 2004
				Mugwe et al., 2011
				Meena et al., 2017
Pois chiche	<i>Cicer arietinum L.</i>	<i>Rhizobium</i>	40–50	Ahlawat and Gangaiah., 2004
				Seymour et al., 2015
Lentille	<i>Lens esculents Medik..</i>	<i>Rhizobium</i>	40–68	Shaha et al., 2003
				Mugwe et al., 2011
Arachide	<i>Arachis hypogaea L.</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	150	Mugwe et al., 2011
				Seymour et al., 2015
Pois	<i>Pisum sativum L.</i>	<i>Rhizobium</i>	65–100	Peoples et al., 2009
Lupin	<i>Lupinus sp. L.</i>	<i>Rhizobium</i>	60–100	Havlin et al., 2014
Haricot	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	<i>Rhizobium</i>	20–80	Mugwe et al., 2011
				Havlin et al., 2014
Fenugrec	<i>Trigonella foenum-graecum. L.</i>	<i>Rhizobium</i>	45	Mugwe et al., 2011
Féverole	<i>Vicia faba L.</i>	<i>Rhizobium</i>	130	Seymour et al., 2015
Trèfle	<i>Trifolium pratense L.</i>	<i>Rhizobium</i>	100–150	Aranjuelo et al., 2009

Le déterminisme de l'efficacité de la fixation de l'azote est lié à la plante et à l'environnement. En effet, le génotype de la plante, le type de germination et de la taille initiale des semences (Laguerre et al., 2003 ; Tian et al., 2010), ainsi que l'état structural du sol, la variation de température, la disponibilité en eau ou en nutriments sont autant de facteurs pouvant influencer la mise en place et le niveau d'efficacité de la fixation symbiotique (Lira Junior et al., 2005 ; Vocanson et al., 2006).

La mise en place de nodosités fonctionnelles, n'est effective qu'après épuisements des réserves en azote de la graine et du sol, ce qui génère une carence (Voisin et al., 2010). Cette carence sera ainsi plus faible chez les plantes à grosses graines et à germination hypogée par rapport à des plantes de petites graines et à germination épigée. Par exemple, le soja présentant une germination épigée, la nutrition azotée s'avère importante pour compenser cette période de carence. C'est le cas contraire pour le pois présentant une germination hypogée (Crozat et al., 1994 ; Starling et al., 1998). Pour ce qui concerne les facteurs environnementaux, la fixation symbiotique évolue avec les réserves en azote minéral (Schneider et Huyghe, 2015 ; Voisin et al., 2015). Voisin et al. (2002) ont montré dans le cas du pois et avec un niveau de reliquats au

voisinage de 30 kg N. ha⁻¹ dans la couche labourée, que l'activité fixatrice du pois démarre après 235 degrés-jours environ après la levée. La disponibilité en eau a un impact fort sur la fixation symbiotique comme observé sur le haricot par exemple (Guérin et al., 1990). En effet, un déficit hydrique et une situation de sécheresse pendant 8 jours inhibent totalement la fixation symbiotique chez le haricot. L'état de sécheresse conduit à une baisse de la turgescence cellulaire dans les nodosités limitant la diffusion de l'oxygène dans les tissus (Guérin et al., 1990). La synthèse de la leghémoglobine, protéine responsable du transport de l'oxygène, est en conséquence réduite en cas de stress hydrique ce qui induit une diminution de la fixation d'azote (Hungria et Vargas, 2000). De plus, le stress hydrique peut également avoir un effet sur la croissance des bactéries rhizobiennes, leur survie et la structure des communautés microbiennes rhizosphériques pouvant alors entraîner un échec de la nodulation (Hungria et Vargas, 2000). La température du sol influence également la fixation symbiotique. Havlin et al. (2014) montrent que des températures comprises entre 24 et 30 °C sont optimales pour l'activité des bactéries fixatrices de N₂. Hungria et Vargas (2000) expliquent que de fortes températures diminuent les capacités de survie des rhizobactéries, rendant plus difficile le processus de nodulation. Au contraire des températures basses (en dessous de 10 °C) entraînent un retard dans la nodulation voire une inhibition des activités de fixation symbiotique (Lira Junior et al., 2005 ; Havlin et al., 2014).

2.4. Mécanismes de perte d'azote dans les agrosystèmes

Dans les agrosystèmes, l'azote apporté en excès peut être transféré à un autre compartiment de l'environnement : dans l'eau, c'est le cas des nitrates NO₃⁻ ou dans l'air, sous forme de NH₃, NO ou N₂O. Les pertes principales d'azote se font par lessivage des nitrates et volatilisation de l'ammonium. En France, les principales pertes d'ammonium proviennent de l'agriculture ; 1/3 de ces pertes est attribuée à l'utilisation des engrais azotés, 2/3 à la gestion, stockage et épandage des effluents d'élevage (CITEPA, 2017).

Dans les sols, la teneur en nitrate est à l'origine de 2 processus de perte d'azote : (1) un processus biologique, la dénitrification, déjà abordé dans la partie cycle de l'azote et qui consiste à la transformation des nitrates en azote gazeux sous forme d'un mélange de N₂O et N₂ et (2) le lessivage ou lixiviation des nitrates dans les horizons inférieurs du sol où ils ne pourront plus être absorbés par les plantes. Ce processus est responsable de la pollution des nappes souterraines (Laperche, 2013) et concerne l'azote sous forme de nitrate NO₃⁻, très mobile et soluble dans l'eau au contraire de l'ammonium NH₄⁺ qui reste adsorbée sur le complexe argilo-humique du sol chargé négativement (Scherer, 1993 ; Vandenberghe et al.,

2013). A l'échelle de l'exploitation, la lixiviation de l'azote est la résultante de plusieurs facteurs, dont, la quantité des reliquats azotés, l'occurrence d'un drainage et l'absence d'absorption racinaire (Vertes et al., 2008 ; Vandenberghe et al., 2013). Les reliquats azotés dépendent essentiellement des conditions climatiques, de l'espèce cultivée et des itinéraires techniques conduits sur la parcelle. La lixiviation a lieu lorsque la pluviométrie est importante, la minéralisation active et que le prélèvement par les plantes est faible (Powlson et Addiscott, 2005). Dans le contexte climatique du nord de la France, cette période est généralement située au cours de l'automne. Les différents facteurs influençant les quantités d'azote lessivées sont schématisés sur la **Figure 11**.

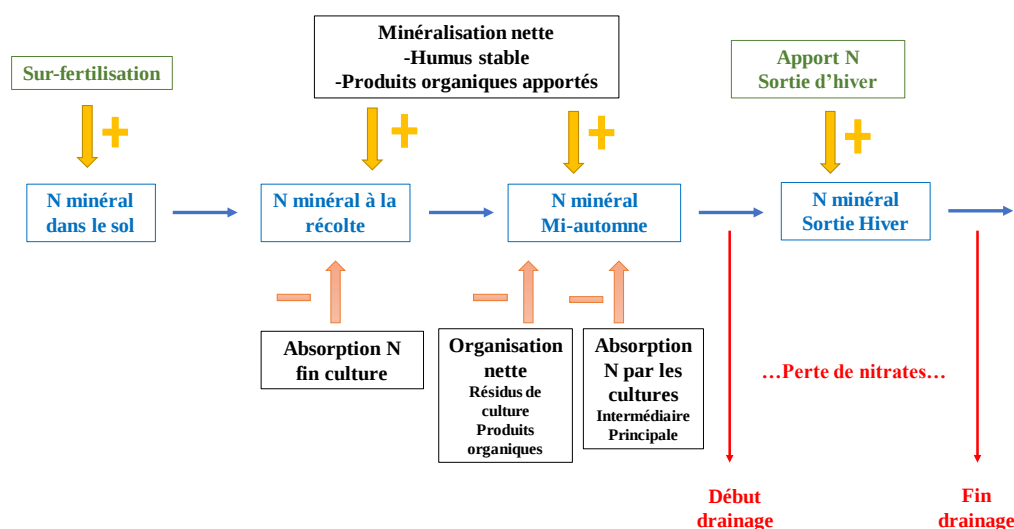


Figure 11. Les principaux facteurs déterminants l'évolution du stock d'azote minéral du sol au cours du temps (Cattin et al., 2002)

La date de la récolte est également un facteur déterminant qui pourrait influencer le bilan hydrique et la durée de la phase de minéralisation post-récolte avant drainage (Beaudoin et al., 2012). Limiter le stock d'azote minéral du sol ou les reliquats azotés à la période de reprise du drainage est le principal levier pour réduire les fuites d'azote dans les agrosystèmes. Dans ce contexte, l'émergence de nouveaux systèmes de culture peuvent apparaître comme des solutions pour limiter les pertes d'azote dans les agrosystèmes.

2.4.1. Les méthodes d'ajustement de la fertilisation azotée

Pour éviter ces fuites d'azote, le COMité Français d'Etude et de développement de la FERTilisation Raisonnée (COMIFER) a mis en place des règles de calcul de la fertilisation azotée selon la méthode du bilan prévisionnel pour limiter le lessivage (COMIFER, 1996 actualisé en 2013). Cette règle est applicable aux cultures annuelles et aux prairies. Elle est utilisable dans tous les systèmes de production (raisonné, biologique, intégré...) car elle

appréhende toutes les sources d'azote possibles (azote issu de la fixation symbiotique chez les légumineuses, azote organique des cultures intermédiaires ou des résidus du précédent et azote minéral des engrais). Beaudoin et al. (2012) ont également mis en place deux démarches de prévention, il s'agit des démarches tactiques et des démarches stratégiques. La démarche tactique implique la mise en place d'un ensemble de levier au niveau de la parcelle, pour réduire les risques de lixiviation du système de culture (Dinnes et al., 2002 ; Di et Cameron, 2005). Il s'agit notamment d'optimiser l'application de la fertilisation par recours à la méthode du bilan d'azote prévisionnel de la culture, afin de diminuer les stocks d'azote post récolte, ou encore d'implanter un couvert piège à nitrate pendant les périodes automnales et hivernales. De plus, la mise en place (depuis fin 2018) du 6^{ième} programme d'actions de la directive nitrate qui se décline à travers le programme d'actions national (PAN) et les programmes d'actions régionaux (PAR) a renforcé ces démarches en précisant les règles de gestion de la fertilisation azotée (période d'épandage, doses maximales...) et des couverts d'interculture (dates de semis...) (Barreau et Magnier, 2019). La mise en œuvre de ces démarches tactiques permet une réduction importante de la lixiviation du nitrate (Schnebelen et al., 2004 ; Lacroix et al., 2005 ; Decrem et al., 2007). Les démarches stratégiques, quant à elles, reposent sur la combinaison de leviers impliquant des changements dans les itinéraires techniques de culture, les rotations, le travail du sol, etc. (Wells et al., 2000 ; Eltun et al., 2002) et s'inscrivent ainsi dans un processus d'amélioration continue (Meynard et al., 2001). Il s'agit d'ajuster les doses d'engrais apportées pour limiter le lessivage des nitrates. De nouvelles approches, Appi-N (INRAE, Ravier et al., 2017) et CHN-conduite (Arvalis, Laberdesque et al., 2017), proposent d'ailleurs un pilotage intégral de la fertilisation azotée pour contribuer à cette gestion plus fine de la fertilisation azotée.

2.4.2. Les outils d'évaluation des fuites d'azote

La lixiviation de l'azote dépend de la quantité d'azote présente dans le sol et d'une situation d'excès d'eau qui conduit au développement d'un flux d'eau dans le sol (drainage) (Augeard et al., 2006). Les mesures de fuites azotées dans les parcelles agricoles ont fait l'objet de nombreuses recherches méthodologiques. Les méthodes directes se basent sur les mesures des reliquats d'azote minéral et des concentrations en bougies poreuses, le suivi de dispositifs lysimétriques ou de réseau de drainage. Les méthodes indirectes pour la quantification des fuites d'azote existent également, il s'agit par exemple des bilans azotés particulièrement utiles pour la quantification de la lixiviation, les équations de facteurs d'émissions de N₂O lors des apports d'engrais, les méthodes isotopiques (¹⁵N) et les modèles de prédictions.

Les méthodes directes

▪ Les reliquats azotés

Les reliquats azotés correspondent à la quantité d'azote présente dans le sol après la récolte (Reliquats Entrée Hiver- REH) ou à la fin de la période du lessivage hivernal (Reliquats Sortie Hiver- RSH). Ils sont mesurés par dosage des formes solubles de l'azote (NO_3^- , NH_4^+) dans des échantillons de sol et permettent d'estimer la quantité d'azote susceptible d'être lessivée (REH) ou disponible pour la plante (RSH). En l'absence de couvert végétal, la différence entre ces deux estimations de reliquats permet de calculer la quantité d'azote lessivée. La variabilité spatiale et temporelle des teneurs en azote nécessite de répéter les mesures sur la parcelle (Hennart et al., 2009).

▪ Les bougies poreuses

La pose de bougies est la technique la plus classique pour des suivis de pertes d'azote de longue durée en plein champ (**Figure 12**).

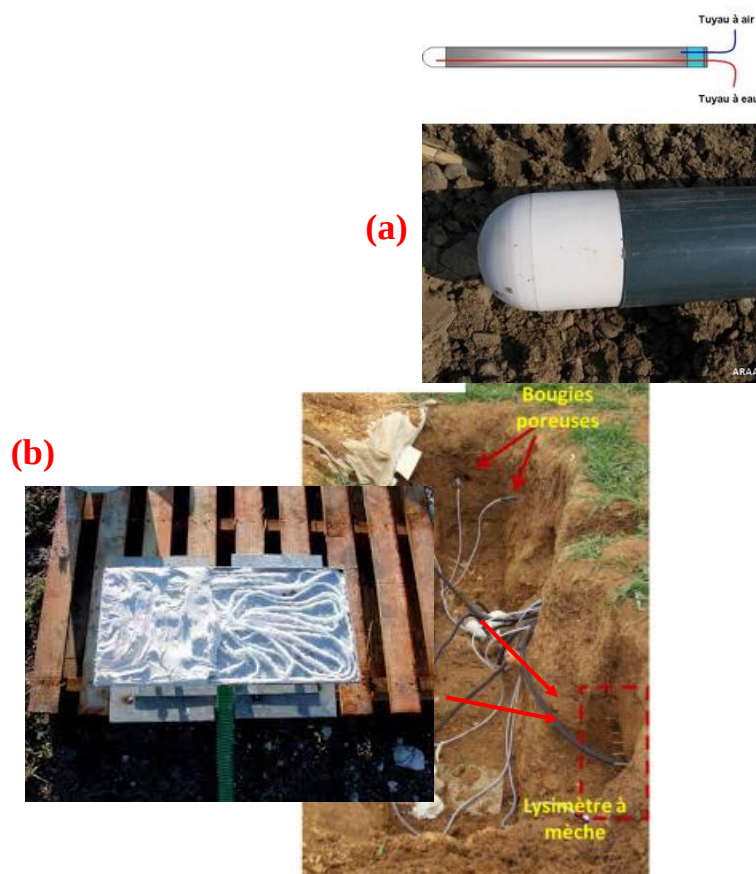


Figure 12. Dispositif de mesure des fuites d'azote (a) la bougie poreuse et (b) du lysimètre à mèche (*d'après* Knutson and Selker, 1994)

Elles permettent de prélever *in situ* la solution du sol de façon non destructive et répétitive au cours du temps dans des parcelles agricoles (Curley et al., 2010). Elles peuvent être positionnées

à diverses profondeurs pour suivre l'évolution des teneurs des éléments recherchés dans un profil de sol (Benoit et al., 2012). Une bougie poreuse est un dispositif qui permet l'extraction sous-pression de l'eau mobile dans le sol pour les mesures des concentrations en NO_3^- (Boudenne et al., 2010). Les bougies poreuses donnent uniquement accès à la concentration des nitrates dans l'eau mobile, qui peut différer de la concentration moyenne de la solution du sol (Garnier et al., 2001). Cependant, il faut estimer le drainage pour calculer la quantité d'azote nitrique lixivié par unité de temps. Pour cela, le calcul des flux d'eau à partir du bilan hydrique (apport d'eau, évapotranspiration, variation de stock d'eau dans le sol et flux de ruissellement éventuel) est indispensable pour pouvoir calculer les flux de nitrates dans le sol (Beaudoin et al., 2012). Il est nécessaire de répéter les mesures dans l'espace et dans le temps pour intégrer la forte variabilité spatiotemporelle de la concentration (Thorup-Kristensen et al., 2003).

- Les lysimètres

Les lysimètres sont des outils utilisés en expérimentation pour récupérer l'eau qui s'infiltre dans un sol donné. Le volume d'eau et la concentration des substances entraînées en profondeur peuvent alors être mesurés (Beaudoin et al., 2012). C'est l'outil expérimental par excellence pour quantifier la lixiviation, à condition de maîtriser le risque d'écoulement au niveau des bordures (Weihermüller et al., 2007). Les premières générations de lysimètres étaient des lysimètres « fermés ». Ce dispositif avait l'avantage de récupérer les eaux d'infiltration sur une surface précise, en s'affranchissant des infiltrations latérales. Les lysimètres ouverts à mèche sont une version plus prometteuse. Les lysimètres à mèche sont une solution pour capturer à la fois la fraction libre et la fraction retenue par le sol (**Figure 12**). En effet, les plaques sont, dans ce cas, accompagnées d'une mèche en fibre de verre qui attire l'eau du sol par conductivité hydraulique (Feaga et al., 2010).

- Le drainage artificiel

Le drainage artificiel est une technique qui permet d'évacuer les excès d'eau, réduisant ainsi les phases d'engorgement et donc d'anoxie dans les sols hydromorphes. Les parcelles drainées artificiellement sont ainsi considérées dans les travaux scientifiques, comme un lysimètre géant (Kladivko, 2004a ; Kladivko, 2004b). Le drainage artificiel a pour conséquence de diminuer la part d'infiltration profonde au profit d'un écoulement plus superficiel. Le recours au drainage artificiel implique l'hypothèse que celui-ci capte la majorité des flux de percolation (Henine et al., 2010).

Les méthodes indirectes

- Les modèles de prédiction des fuites d'azote

En fonction de leur complexité, les modèles permettent de prédire le drainage d'eau, la lixiviation ou l'ensemble des pertes d'eau et d'azote d'un agrosystème en fonction des données d'entrée disponibles sur le sol, les techniques, le climat et la plante (Justes et al., 2012). Plusieurs modèles ont été développés afin de permettre une estimation des fuites d'azote dans l'environnement (Parnaudeau et al., 2012). Les modèles ont pour objectif de calculer les flux ou les quantités d'azote mis en jeu à partir de lois ou de relations préétablies par des approches mécanistes, empiriques ou mixtes (**Tableau 3**).

Tableau 3. Présentation des caractéristiques des différents modèles de prédiction des fuites d'azote les plus utilisés dans les agrosystèmes

Modèle	Conception/Organisme	Caractéristiques	Références
Simulateur multidisciplinaire pour les cultures standard- STICS	Développé par Institut National de la Recherche Agronomique-INRA à l'initiative de Nadine Brisson avec l'appui de Dominique Ripoche	Ce modèle permet la simulation, à l'échelle de la parcelle, le développement d'une culture, voire de cultures associées (c'est-à-dire plusieurs espèces cultivées en même temps) ou encore d'une succession culturale, en fonction de tous les paramètres agronomiques : climat, sol, et pratiques agricoles.	Brisson et al., 2003
Crop Environment REsource Synthesis - Environnement et Grandes Cultures-CERES-EGC	Développé par Unité Mixte de Recherche-UMR Environnement et grandes cultures depuis 1993	Ce modèle permet la simulation des cycles eau-carbone-azote dans les agroécosystèmes. Il permet de prédire à la fois la productivité et les bilans environnementaux des cultures, en lien avec les pratiques agricole. Ce modèle est conçu de façon modulaire avec des sous-modèles pour simuler les dynamiques de l'eau, de carbone et d'azote dans le sol et d'échanges de gaz avec l'atmosphère (N ₂ O, NH ₃ , NO).	Gabrielle et al., 1995
Nitrous Oxide Emission-NOE	Développé par l'INRA et a été mis au point par Hénault	Ce modèle modélise la cinétique des émissions de N ₂ O en fonction des paramètres édaphiques et climatiques. Ce modèle a été intégré à certains modèles mécanistes de fonctionnement des cultures, en particulier les modèles STICS (Brisson et al., 2003), CERES-EGC (Gabrielle et al., 2006) et le celui de l'outil Syst'N (Dupas et al., 2013).	Hénault et al., 2005
LIXIM	Développé par INRA de Toulouse et financé par ARVALIS-Institut du Végétal et le CETIOM	Ce modèle permet de prédire la cinétique de minéralisation d'azote du sol.	Mary et al., 1999
Leaching Estimation and CHemistry Model-LEACHN	Développé par Wagenet and Hutson en 1989	Ce modèle permet de prédire la dynamique de l'azote et du drainage de l'eau et décrit la transformation de l'azote et du phosphore.	Jemison et al., 1994
Syst'N	Développé par l'INRA, l'Association de Coordination Technique Agricole-ACTA, Arvalis, Terres Inovia, le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes-CTIFL, l'Institut Technique de la Betterave-ITB, Institut Technique des filières AVIcoles, cunicole et piscicole-ITAVI et l'institut du porc-IFIP.	Ce modèle permet l'évaluation des pertes d'azote en prenant en compte les conséquences des successions des cultures et des techniques culturales à effet direct ou indirect, à court et plus long terme, sur la dynamique de l'azote.	Parnaudeau et al., 2012
Soil and Water Assessment Tool-SWAT	développé par des chercheurs du Département de l'Agriculture des Etats-Unis	Ce modèle permet de manipuler et d'analyser de nombreuses données hydrologiques et agronomiques en vue de prédire les effets de la gestion des terres sur la ressource hydrique. Il permet de simuler les transferts de nutriments, de sédiments et pesticides vers le réseau de drainage et vers les aquifères. SWAT simule également les rendements des cultures en fonction des conditions environnementales et des techniques de culture.	Bioteau et al., 2002
Common Agricultural Policy Regional Impact Assessment-CAPRI, DeNitrification DeComposition-DNDC	Développé par la Commission européenne	Ce modèle permet de simuler les flux de gaz à effet de serre, les variations des stocks de carbone et le bilan azoté des sols agricoles en Europe.	Leip et al., 2008

Modéliser les processus implique nécessairement de simplifier et de conceptualiser la multitude de processus physiques, chimiques et biologiques qui existent dans la nature. Pour chaque modèle, on s'attache donc en général à caractériser un fonctionnement de façon conceptuelle, en formalisant ou en utilisant des équations que l'on peut paramétrer. Une fois développés et validés par des observations *in situ*, ces outils permettent en explorant une multitude de contraintes, de limiter les campagnes de terrain. Concernant la modélisation à l'échelle de la parcelle, les modèles STICS (Brisson et al., 2003) ou CERES-EGC (Jones et al., 1986) sont des modèles agronomiques qui permettent de définir l'impact des pratiques culturales sur les fuites d'azote (N_2O , NO_3^-). Ils prennent en compte la croissance des plantes, le bilan d'eau dans les sols, et les cycles de l'azote et du carbone. D'autres modèles dérivés des précédents, plus simples, calculent uniquement le transport vertical de l'eau et des nutriments dans le profil des sols, comme LEACHN (Jemison et al., 1994) ou LIXIM (Mary et al., 1999). Des modules ont été développés pour quantifier les émissions de N_2O , comme NOE (Hénault et al., 2005), NLOSS (Riley et Matson, 2000), intégrés ou pas dans les modèles agronomiques. La majeure partie des modèles s'appliquent à l'échelle de la parcelle, mais certains modèles permettent également d'aller au-delà de l'exploitation agricole (Olesen et al., 2002), jusqu'à l'échelle régionale, comme SWAT (Bioteau et al., 2002) ou de l'Europe, comme CAPRI-DNDC (Leip et al., 2008). Toutefois le recours à la modélisation pour décrire des situations agricoles réelles (et non expérimentales), soulève la question du nombre de paramètres à prendre en compte par le modèle (Hansen et al., 2001 ; Meynard et al., 2003). En particulier, certaines cultures spécifiques en agriculture biologique ne sont pas encore paramétrées dans les modèles classiques, comme dans le modèle STICS qui ne peut être appliqué de façon satisfaisante que dans les systèmes conventionnels (Beaudoin et al., 2012).

3. Partie 3. La rhizodéposition

3.1. Définition de la rhizodéposition

La rhizodéposition désigne toute production issue de la racine (Bais et al., 2006 ; Dessaux et al., 2016). Elle inclut notamment les exsudats racinaires, les cellules bordantes de la racine, les composés volatiles, les débris cellulaires et les métabolites issus de la décomposition des racines (Nguyen, 2003 ; Jones et al., 2004 ; Pausch et Kuzyakov, 2018 ; Hassan et al., 2019) (**Figure 13**). Lors des stades végétatifs de croissance, la plante libère par rhizodéposition environ 20 % du carbone totale assimilé par la plante (Kuzyakov et Domanski, 2002 ; Schenck zu Schweinsberg-Mickan et al., 2010). La rhizodéposition de l'azote quant elle, est très variable, et représente de 4 % à 71 % de l'azote total assimilé par la plante (Wichern et al., 2008).

	Composés volatils et gazeux	Composés non spécifiques			Composés spécifiques					Commentaires
		Ions	Exsudats	Lysats	Sécrétions	Cellules racinaires	Racine, cellules tissus détachés	Poils racinaires	Fragment de racine, racines fines sénescences	
Nguyen, 2003										C organique perdu par les racines vivantes
Kuzyakov et Domanski, 2000; Kuzyakov et Cheng, 2001; Jones et al., 2004										Composés libérés par les racines vivantes
Walker et al., 2003										C organique perdu par les racines vivantes
Badri et Vivanco, 2009										C organique perdu par les racines vivantes
Uren, 2007										Composés libérés par les racines vivantes

Figure 13. Répertoire des composés rhizodéposés par différentes espèces végétales. Les parties hachurées restent hypothétiques (*d'après* Wichern et al., 2008 ; Badri et Vivanco, 2009 ; Preece et Peñuelas, 2020)

L'azote rhizodéposé peut être sous forme organique (acides aminés, différentes phytohormones, et vitamines, etc.) et inorganique (NO_3^- et NH_4^+) (Jensen, 1996 ; Mayer et al., 2003 ; Wichern et al., 2007a). Plusieurs mécanismes interviennent dans la libération des rhizodépôts dans la rhizosphère: (i) la sénescence et la décomposition des racines et des nodosités (dans le cas des légumineuses) (Voisin et al., 2015), (ii) l'exsudation de composés solubles par les racines par voie active ou passive (Jones et al., 2004 ; Badri et Vivanco, 2009), (iii) le renouvellement des cellules de la coiffe racinaire (Nguyen, 2007) et (iv) la sécrétion de mucilage (Carminati et Vetterlein, 2013 ; Sasse et al., 2018).

La rhizodéposition contrôle une boucle de rétroactions entre les racines des plantes, les microorganismes et les particules du sol (Pausch et Kuzyakov, 2018 ; Oburger et Jones, 2018). Cette interaction dynamique comprend les interactions inter et intra-plante et les interactions plantes-microorganismes (Bicharanloo et al., 2020 ; Tian et al., 2020). La rhizodéposition a un effet significatif sur la structure et l'activité des communautés microbiennes dans les sols et plus particulièrement sur les microorganismes entourant la racine appelés le rhizomicrobiome (Keiblinger et al., 2010 ; Geyer et al., 2016 ; Tian et al., 2020). L'effet de la rhizodéposition sur le rhizomicrobiome se manifeste sur la nutrition (la dynamique et le renouvellement des nutriments) et la santé des plantes (*via* le renforcement des mécanismes de défense des plantes et la sélection de microorganismes de biocontrôles) (Fustec et al., 2010 ; Geyer et al., 2016 ; Tian et al., 2020). La rhizodéposition a par ailleurs un rôle primordial dans la structuration des

agrégats du sol (Six et al., 2004), dans les flux hydriques (Moradi et al., 2012) et dans les émissions de gaz à effet de serre (Bais et al., 2006, Philippot et al., 2009 ; **Figure 14**).

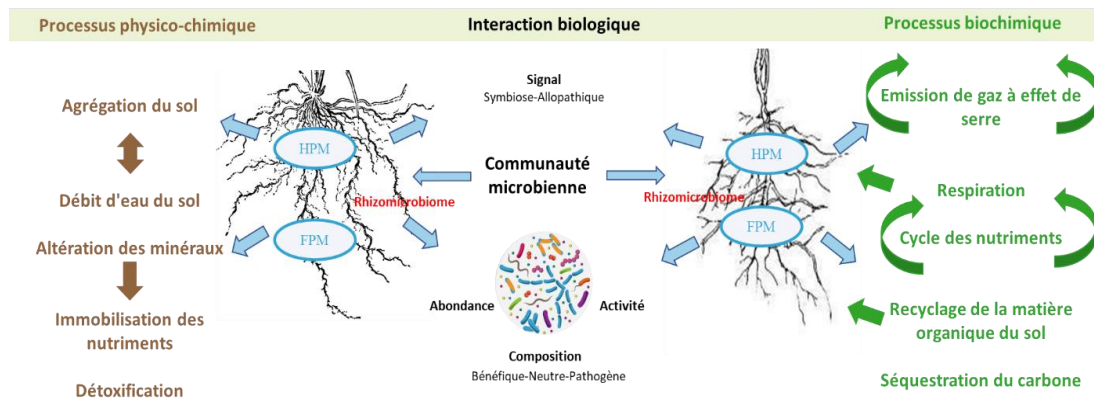


Figure 14. Interaction entre rhizodéposition-sol-communautés microbiennes (d'après Oburger et Jones, 2018).

HPM indiquent les composées de haut poids moléculaire, FPM indiquent les composées de haut poids moléculaire

3.2. Outils d'étude de la rhizodéposition

La plupart des études récentes qui portent sur la rhizodéposition, se sont concentrées essentiellement sur la quantification et le transfert du carbone dans le système atmosphère-sol-plante (Kuzyakov et Domanski, 2000 ; Kuzyakov et Schneckenberger, 2004 ; Zang et al., 2015 ; Pausch et Kuzyakov, 2018). La rhizodéposition de l'azote présente un nombre d'étude plus restreint (Merbach et al., 1999 ; Wichern et al., 2007a ; Wichern et al., 2007b ; Stevenel et al., 2019). Les méthodes d'estimation de la rhizodéposition nécessitent le recours aux techniques de marquage isotopique ^{14}C , ^{13}C , ^{11}C (Kuzyakov et Cheng, 2001 ; Stevenel et al., 2019) et ^{15}N (Mahieu et al., 2007 ; Fustec et al., 2010 ; Stevenel et al., 2019) pour identifier de façon spécifique la part de carbone et d'azote provenant de la plante. On distingue deux types de marquage. Le marquage court ou pulsatif permet l'assimilation par les plantes, des marqueurs isotopiques pendant une courte période. Cette technique n'est valable que pour quantifier le transfert d'assimilats récents dans le système sol- plante (Swinnen et al., 1994a ; Swinnen et al., 1994b ; Nguyen et al., 2003) et reflète l'aptitude de la plante à répartir le carbone ou l'azote à un instant t. En revanche, pour estimer la répartition de ces deux composés dans le système sol-plante-microorganismes sur des pas de temps plus longs, une série de marquages courts aux différents stades de développement de la plante est nécessaire (Swinnen et al., 1994a ; Swinnen et al., 1994b ; Kuzyakov et al., 1999 ; Stevenel et al., 2019). Ce type de marquage long et/ou en continu permet d'obtenir un marquage homogène et uniforme donnant une estimation représentative de la répartition du carbone ou de l'azote (Wichern et al., 2008). Les techniques de marquage isotopique du carbone impliquent l'utilisation d'une chambre de culture à

atmosphère contrôlée pour la culture des plantes (Toal et al., 2000 ; Warembourg et Esterlich, 2001). L'estimation de la rhizodéposition de l'azote fait l'objet de nombreux travaux de recherche et plus particulièrement chez les légumineuses au regard de l'importance de la gestion de l'azote à l'échelle de la rotation culturale (Khan et al., 2002 ; Fustec et al., 2010 ; Stevenel et al., 2019). Ces travaux montrent (i) qu'il y a un panel important de méthodes de marquage de l'azote chez les plantes et (ii) que la quantité d'azote rhizodéposé est variable en fonction des espèces végétales étudiées et de la technique de marquage employée (Fustec et al., 2010 ; **Tableau 4**).

Tableau 4. Synthèse des quantités d'azote rhizodéposées par différentes espèces de légumineuses, obtenues à l'aide de différentes méthodes de marquage (Fustec et al., 2010). L'azote rhizodéposé est exprimé en pourcentage de l'azote total de la plante

Espèces	Conditions de cultures	Méthode de marquage	N rhizodéposé	Références
<i>Pisum sativum</i>	Chambre de cultures	Marquage racinaire « split root » ¹ solution (¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄	8-12%	Sawatsky and Soper, 1991
<i>Lupinus angustifolius</i>	Au champ	Marquage foliaire « cotton wick » ² Solution ¹⁵ N-urea	18,5%	Russel and Fillery, 1996
<i>Trifolium subterraneum</i>	Au champ	Marquage foliaire « leaf feeding » ³ Solution ¹⁵ N-urea	10%	McNeill et al., 1997
<i>Ornithopus compressus</i>			20%	
<i>Trifolium subterraneum</i>	En serre	Marquage foliaire « leaf feeding » ³ Solution ¹⁵ N-urea	40%	McNeill et al., 1998
<i>Ornithopus compressus</i>			57%	
<i>Vicia faba</i>	En serre	Marquage des pousses « Leaf feeding » ³ Solution ¹⁵ N-urea	23,5%	Khan et al., 2002
<i>Cicer arietinum</i>			43,9%	
<i>Vigna radiata</i>			16,5%	
<i>Cajanus cajan</i>			35,5%	
<i>Vicia faba</i>	Chambre de cultures	Marquage foliaire « cotton wick » ² Solution ¹⁵ N-urea	13%	Mayer et al., 2003
<i>Pisum sativum</i>			12%	
<i>Lupinus albus</i>			16%	
<i>Pisum sativum</i>	En serre	Marquage racinaire « split root » ¹ solution KNO ₃ - ¹⁵ N	10,5%	Schmidtke, 2005
<i>Lathyrus sativus</i>			9,5%	
<i>Pisum sativum</i>	En serre	Marquage foliaire « cotton wick »	9,7-11,7%	Mahieu et al., 2007
	Au champ	Solution ¹⁵ N-urea	34,2%	
	En serre	Marquage racinaire « split root »	14,3-17,3%	
	Au champ	Solution ¹⁵ NO ₃ - ¹⁵ NH ₄	27,5%	
<i>Trifolium repens</i>	Au champ	Marquage foliaire « leaf feeding » Solution ¹⁵ N-urea	47%	Gylfadóttir et al., 2007
<i>Poa pratensis</i>			10%	
<i>Pisum sativum</i>	Au champ	Marquage foliaire « cotton wick » Solution ¹⁵ N-urea	32-36%	Wichern et al., 2007b
<i>Lupinus angustifolius</i>	Au champ	Marquage foliaire « cotton wick » Solution ¹⁵ N-urea	35-76%	McNeill and Fillery, 2008

¹**Split root** est une technique de marquage qui consiste à scinder le système racinaire de la plante en deux parties. Une partie est placée dans un premier compartiment contenant du sol avec de la solution marquée au ¹⁵N et un deuxième compartiment contenant un substrat inerte pour mesurer la rhizodéposition de l'azote; ²**Cotton wick** est une technique de marquage qui consiste à injecter une solution d'azote marquée de ¹⁵N à travers une incision au niveau de la tige; ³**Leaf feeding** est une méthode de marquage qui repose sur l'immersion des feuilles intactes, coupées à la pointe ou coupées en deux dans une solution marquée au ¹⁵N.

L'étude récente de Stevenel et al. (2019) fait état des nombreux travaux de recherche, qui portent sur l'estimation de la rhizodéposition du carbone et de l'azote à différentes échelles d'étude, chez différentes espèces végétales, à différents stades de croissance des plantes et avec différentes techniques de marquage, employées seules ou combinées (**Tableau 5**).

Bien qu'il existe un large panel de méthodes de double marquage simple ou multi-pulse cette synthèse montre que peu de travaux ont étudié les flux de carbone et d'azote dans les systèmes plante-sol-microorganismes et examiné simultanément la quantité et le devenir des rhizodépôts de carbone et d'azote. Pour compléter le panel des méthodes existantes et avancer dans la compréhension du rôle de la rhizodéposition dans la boucle sol-plante-microorganismes, Stevenel et al. (2019) ont développé une nouvelle méthode de tri-marquage isotopique permettant d'estimer la rhizodéposition carbone, azote et phosphore, offrant ainsi la perspective de suivre potentiellement leur devenir dans les systèmes sol-plante.

Tableau 5. Synthèse des principaux travaux portant sur l'estimation simultanée de la rhizodéposition du carbone et de l'azote (*d'après* Stevenel et al., 2019)

Espèces	Conditions de culture	Stade de développement	Méthode	Rhizodéposition mesuré	Références
Marquage à impulsion unique					
Pois et avoine	Expérimentation au champ	Pois marqué 60 et 69 JAS ^a et récolté 36 et 52 JAM ^b	2 ml de 2% ^c 13C- glucose (99 atom%) et 0,5%	CdfR ^c : 24–30% (pois) et 31% (oat) du C totale de la plante	Wichern et al., 2007a, b
		Avoine marqué 76 JAS et récolté 42 JAM	¹⁵ N-urea (99 atom%) <i>via</i> la méthode cotton-wick stem feeding	NdfR ^d :32–36% (pois) et 30% (avoine) de l'N totale de la plante	
	Colonnes de sol "conditions extérieurs"	Différents stade de croissance pour les deux plantes	1 ml of ¹³ C-glucose (99 atom%) et ¹⁵ Nurea (99 atom%) <i>via</i> la méthode cotton-wick stem feeding. La concentrations varie entre 0,6% et 8,1% pour le glucose et entre 0,04% to 0,89% pour l'urea	CdfR: 23–58% (pois) et 8–15% (avoine) du C totale de la plante NdfR:23–71% (pois) et 5–20% (avoine) de l'N totale de la plante	
Trèfle blanc et ray-grass	Expérimentation au champ	2 ans de pelouse	1 ml of 0,5% ¹⁵ N-urea (99.6 atom%), et 0,01 M ¹³ C-Na ₂ CO ₃ (99,9 atom%) <i>via</i> la methode leaf labeling		Kušlienė et al., 2014
		2 mois après le marquage			
Marquage pulsatifs					
Blé	En serre, Expérience en pot à deux compartiments		¹⁴ CO2 (0,03%, 21,645 Bq mgC ⁻¹) et ¹⁵ NH ₃ (95 atom%) par fumigation	13–32% de ¹⁴ C incorporé dans la plante et 5–6% of ¹⁵ N	Merbach et al., 1999
Pois chiche	En serre, expérience en colonne	¹³ C marquage à 30, 50 et70 JAS et ¹⁵ N marquage à 35, 55 et70 JAS	¹³ C-CO2 plusieurs marquage avec 0.3g NaH ¹³ CO3 (98 atom % excès ¹³ C) avec 2 ml d'acide lactique et ¹⁵ N plusieurs marquage avec 3 ml de 0,3% ¹⁵ N- urea (98 atom %) <i>via</i> la méthode leaf feeding	CdfR: 16–19% du C totale de la plante	Yasmin et al., 2010
		Récolte: 135 JAS		NdfR: 16–17% de l'N totale de la plante	
Ray-grass	En serre, Rhizoboxe	Marquage 10 JAS et récolté 25 JAS	Marquage pulsatif ¹³ C-CO2 et marquage continue avec 2,66 atom% ¹⁵ N avec une solution du milieu Hoagland modifié <i>via</i> la méthode de cotton wick	CdfR: 4,2% du C totale du sol, NdfR: 2,8% de l'N totale du sol	Schweinsberg-Mickan et al., 2012
Blé		Marquage 17 JAS et récolte 80 JAS		CdfR: 23% du C totale du sol et NdfR: 16% de l'N totale du sol	
Haricot mungo	Expérimentation au champ	Marquage 39 JAS	1 ml of 0,2% ¹⁵ N-urea (99 atom%) et 4% ¹³ Cglucose (99 atom%) <i>via</i> la méthode cotton-wick stem feeding.	CdfR: 13–42% du C totale de la plante	Zang et al., 2015
		Récolte 17 JAM ou à 43 JAM	Marquage deux fois avec un intervalle de 39 JAS	NdfR: 9–21% de l'N totale de la plante	

^aJours Après Semis, ^bJours après marquage, ^cCarbone dérivé de la rhizodéposition et ^dAzote dérivé de la rhizodéposition

3.3. Les exsudats racinaires

Les exsudats racinaires font référence à une série de composés sécrétés par les racines des plantes (Walker et al., 2003 ; Preece et Peñuelas, 2020) (**Tableau 6**).

Tableau 6. Les classes des principaux composés identifiés dans les exsudats racinaires des plantes (*d'après* Badri et Vivanco, 2009 ; Dennis et al., 2010 ; Haichar et al., 2014).

Classe de composés	Les composés
Glucides	Arabinose, glucose, galactose, fructose, sucrose, pentose, rhamnose, raffinose, ribose, xylose and mannitol.
Acides aminés	Alanine, arginine, asparagine, aspartate, citrulline, cystathionine, cystéine, glutamine, glutamate, glycine, histidine, homosérine, isoleucine, lysine, méthionine, ornithine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine.
Acides organiques	Acide acétique, acide succinique, acide L-aspartique, acide malique, acide L-glutamique, acide salicylique, acide shikimique, acide isocitrique, acide chorismique, acide sinapique, acide caféique, acide p-hydroxybenzoïque, acide gallique, acide tartrique, acide férulique, acide protocatéchique, acide p-coumarique, acide mugineique, acide oxalique, acide citrique, acide piscidique.
Flavonoides	Naringénine, kaempférol, quercitine, myricétine, naringine, rutine, génistéine, strigolactone.
Lignines	Catéchol, acide benzoïque, acide nicotinique, phloroglucinol, acide cinnamique, acide gallique, acide férulique, acide syringique, sinapoyl aldéhyde, acide chlorogénique, acide coumarique, vanilline, alcool sinapylique, acide quinique, acide pyroglutamique.
Anthocyanes	Cyanidine, delphinidine, pelargonidine.
Les acides gras	Acide linoléique, acide oléique, acide palmitique, acide stéarique.
Stérols	Campestrol, sitostérol, stigmastérol.
Protéines et enzymes	Protéines PR, lectines, protéases, phosphatases acides, peroxydases, hydrolases, lipases.

Ils sont principalement constitués de molécules de haut poids moléculaire (par exemple : le fructose, le glucose, les polysaccharides, les protéines) et de composés à faible poids moléculaire, qui comprennent des acides aminés, des acides organiques, des sucres, des composés phénoliques, ainsi que des ions (H^+), de l'eau et des sels minéraux (Koo et al., 2005 ; Canarini et al., 2019). L'exsudation racinaire a lieu dans les cellules racinaires métaboliquement actives et consiste dans la diffusion et le transport de différentes molécules par voie active ou passive (**Figure 15**) (Yang et Hinner, 2015 ; Sasse et al., 2018).

L'exsudation racinaire est dépendante des caractéristiques de la plante, c'est à dire de l'espèce végétale (Paynel et al., 2001 ; Shen et al., 2002), du génotype (Hoekenga et al., 2003 ; Badri et Vivanco, 2009) et des traits fonctionnels de la plante (Aulakh et al., 2001 ; Herz et al., 2018). Les taux d'exsudation peuvent varier pour une même plante suivant les stades de développement et les conditions de culture (Aulakh et al., 2001 ; Gransee et Wittenmayer, 2000). En effet, les études de cinétique d'exsudation racinaire montrent des taux d'exsudation plus faible lors des stades végétatifs et à maturité comparativement aux stades floraisons (Aulakh et al., 2001). Cette cinétique d'exsudation traduit la corrélation positive qui existe entre le développement du système racinaire de la plante durant la culture et le taux d'exsudation racinaire (García et al., 2001).

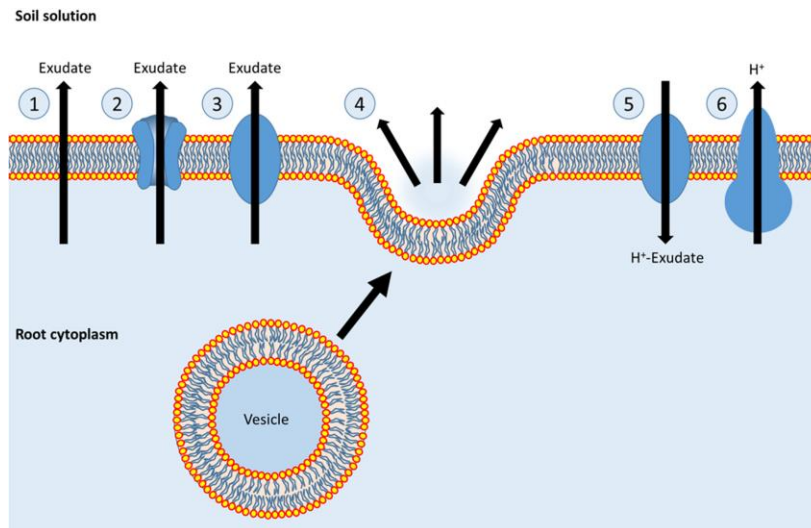


Figure 15. Les principaux mécanismes de l'exsudation racinaire (Oburger et Jones, 2018).

(1) Diffusion passive d'exsudats à travers la membrane plasmique en réponse au gradient de concentration entre le cytoplasme et la solution du sol (2) libération d'exsudats par un canal de transport de protéines par diffusion passive (3) transport actif d'exsudats à travers la membrane plasmique (4) libération par exocytose des exsudats lorsque les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique (5) re-capture des exsudats en utilisant un co-transporteur de protons actif (6) H^+ -ATPase qui crée le potentiel électrochimique à travers la membrane qui pilote les processus (2) et (5).

L'exsudation racinaire est fortement dépendante des facteurs abiotiques et biotiques du milieu (Koo et al., 2005 ; Canarini et al., 2019 ; **Figure 16**).

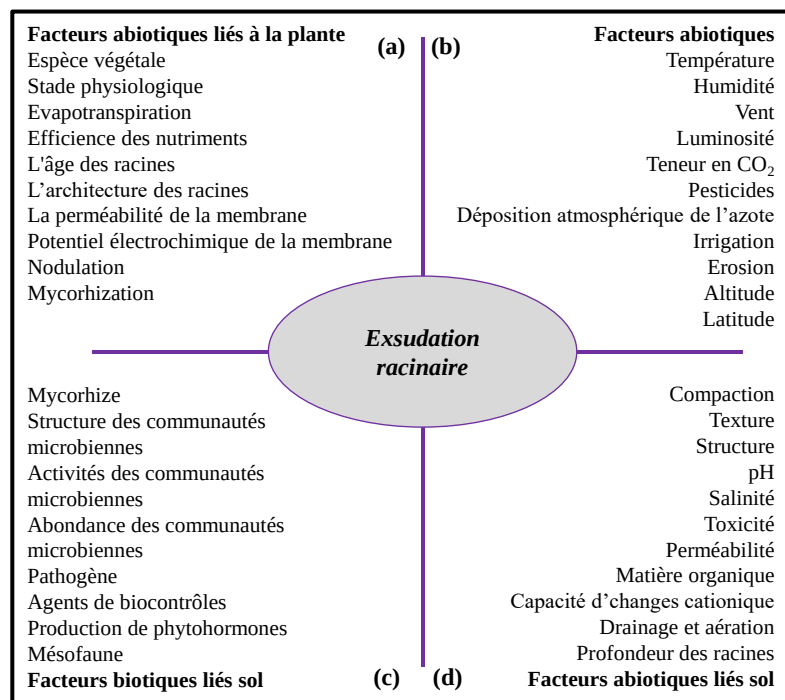


Figure 16. Représentation schématique des facteurs biotiques et abiotiques qui influencent l'exsudation racinaire (*d'après* Jones et al., 2004 ; Wang et al., 2006 ; Canarini et al., 2019 ; Tian et al., 2020)

(a) Facteurs abiotiques liés à la plante, (b) Facteurs biotiques liés à la plante, (c) Facteurs biotiques liés au sol, (d) Facteurs abiotiques liés au sol

En effet, des facteurs tels que la disponibilité en eau et en minéraux, la température, la luminosité ou encore la composition et l'activité des communautés microbiennes de la rhizosphère sont des déterminants essentiels de l'intensité et la composition des exsudats racinaires (Bais et al., 2006 ; Jones et al., 2009b ; Moe, 2013). Des études ont rapporté l'effet de la température et de l'intensité lumineuse sur l'exsudation des métabolites secondaires (Pramanik et al., 2000 ; Nakayama et Tatenno, 2018). D'autres études montrent des changements dans la quantité et la composition des exsudats racinaires sous l'influence de certains stress tels qu'une humidité du sol élevée pouvant limiter la disponibilité en oxygène (Koo et al., 2005), ou encore la sécheresse (Karlowsky et al., 2018 ; Vries al., 2019). La composition des exsudats racinaires est impactée par la carence en nutriment et la présence de contaminants dans le sol. En effet, ces stress induisent une augmentation de la sécrétion d'acides organiques spécifiques dans le cas d'une carence en phosphore ou encore lors d'une contamination à l'aluminium (Liao et al., 2006 ; Wang et al., 2006). La carence en phosphore entraîne également une augmentation de la sécrétion racinaire des composés phénoliques chez certaines espèces comme les légumineuses et la spécificité de la sécrétion d'acide organique en réponse à une carence en phosphore varie selon les espèces végétales (Tawaraya et al., 2018 ; Tian et al., 2020).

Dans la rhizosphère, les exsudats racinaires sont en étroite interaction avec les microorganismes du sol, ces exsudats constituent une source de nutriments et d'énergie pour la plante mais aussi pour une large gamme de bactéries et de champignons rhizosphériques (Walker et al., 2003 ; Moe, 2013 ; Van Dam et Bouwmeester 2016 ; Canarini et al., 2019). La composition des exsudats racinaires joue un rôle majeur dans la sélection des communautés microbiennes autour de la racine des plantes (Tian et al., 2020). Cette sélection permet le recrutement de microorganismes bénéfiques pouvant assurer une protection contre les attaques de pathogènes (Haichar et al., 2008 ; Berendsen et al., 2012 ; Preece et Peñuelas, 2020) ou encore améliorer la nutrition des plantes *via* l'initiation de symbiose notamment avec des champignons mycorhiziens (Martin et al., 2001) et des bactéries Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (de Weert et al., 2002 ; Nelson, 2004 ; Huang et al., 2014b ; Preece et Peñuelas, 2020).

3.4. Méthodologies pour l'étude des exsudats racinaires

L'étude des exsudats racinaires en sol est un défi majeur au regard de la complexité de la matrice sol et de la diversité de l'architecture racinaire des différentes espèces végétales (Oburger et Jones, 2018). En effet, les exsudats libérés peuvent être immédiatement adsorbés aux particules du sol et/ ou dégradés par les microorganismes (Koo et al., 2005 ; Vives-Peris et

al., 2020). Un ensemble d'approches a été développées de manière à limiter les contraintes liées aux interactions exsudats-sol-microorganismes et faciliter l'extraction des composés exsudés par les plantes (Oburger et Jones, 2018). La majorité des approches développées actuellement s'appuient sur des dispositifs de culture en hors sol et en conditions contrôlées (Vranova et al., 2013 ; Vives-Peris et al., 2020). En effet, la culture des plantes est conduite en systèmes hydroponiques dans des solutions nutritives en conditions stériles, semi ou non stériles avec ou sans aération (Neumann et Römheld, 1999 ; Strehmel et al., 2014). Certains auteurs parlent de dispositifs semi-hydroponique lorsque le dispositif hydroponique inclut un système de percolation avec un substrat inerte (sable, des billes de verre, perlite, vermiculite) permettant la stabilisation mécanique des racines (Neumann et al., 2000 ; Neumann et al., 2009) (**Figure 17**).

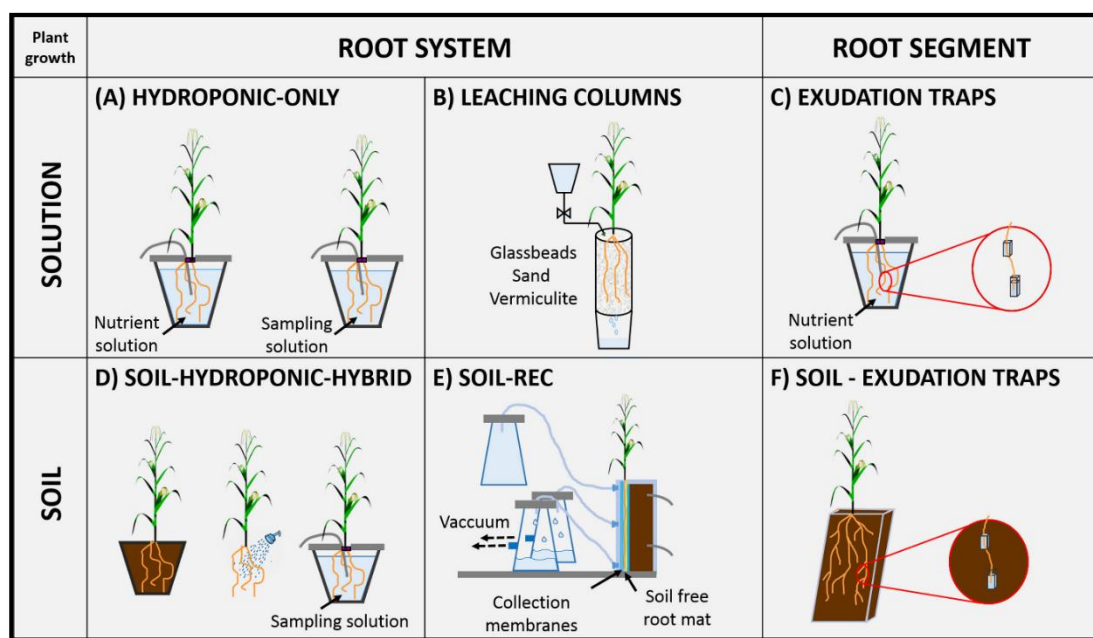


Figure 17. Les différentes techniques de collecte des exsudats racinaires (Oburger et Jones, 2018)

Bien que l'extraction des exsudats en sol soit laborieuse, elle reste néanmoins possible et nécessite la séparation des racines de la matrice sol et la suppression de l'activité microbienne *via* la stérilisation du sol (Bobille, 2016). Ces méthodes impliquent de cultiver les plantes dans le sol puis un transfert vers un système hydroponique après lavage des racines (soil-hydroponic-hybrid) (García et al., 2001 ; Canarini et al., 2016), soit avec un système utilisant des rhizoboxes en combinaison avec un outil de collecte d'exsudat racinaire (soil-rec) (Oburger et al., 2013 ; Oburger et al., 2014 ; **Figure 17**). Il existe des techniques de collecte d'exsudats racinaires localisées uniquement sur un fragment de racine, cette collecte est possible soit par (1) sorption et /ou diffusion (exsudats sorption/diffusion traps *in situ* (Haase et al., 2007 ; Shi

et al., 2011), (2) piégeage des exsudats *in situ* (soil-exudation traps, Phillips et al., 2008 ; Sun et al., 2017). Ces techniques de collectes localisées des exsudats restent néanmoins difficiles à déployer à l'échelle de l'ensemble du système racinaire.

3.5. Identification et quantification des exsudats racinaires

L'analyse des exsudats racinaires est complexe en raison de la nature chimique très diversifiée des composés organiques libérés (Dundek et al., 2011 ; Oburger et Jones, 2018). L'extraction et la collecte des exsudats racinaires sont réalisées généralement dans de l'eau ce qui permet une collecte assez exhaustive des métabolites solubles de haut et de faibles poids moléculaires. Une séparation, filtration et pré-concentration (par évaporation rotative, lyophilisation) des composés collectés sont nécessaires en raison de la concentration très faible des composés dans les échantillons d'exsudats (Dundek et al., 2011). L'analyse des composés d'exsudation racinaire est basée sur un dosage biochimique simple des sucres et des acides aminés sécrétés par les racines (Lynch et Whipps, 1990 ; Miya et Firestone, 2001; Nardi et al., 2002 ; Personeni et al., 2007) puis des analyses plus fines et plus ciblées sont employées en utilisant des approches analytiques standard comme la spectrophotométrie, la chromatographie ionique, la chromatographie liquide à haute pression, la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse (Dundek et al., 2011).

Récemment, les techniques d'empreintes métaboliques employées dans les analyses d'échantillons exsudats racinaires ont permis une analyse exhaustive des composés libérés par les racines. Par conséquent, la spectrométrie de masse est devenue la technique de choix dans de nombreuses études métabolomiques, en raison de sa sensibilité élevée et de sa capacité à identifier un large spectre de métabolites (Fuhrer et Zamboni, 2015). La résonance magnétique nucléaire a également été appliquée dans des études de métabolomique, mais sa sensibilité reste relativement faible (van Dam et Bouwmeester, 2016). Par conséquent, elle est principalement utilisée en combinaison avec d'autres techniques basées sur la spectrométrie de masse dans le cadre d'études sur l'exsudation des racines (Fan et al., 2001 ; Escudero et al., 2014).

4. Partie 4 : Les légumineuses et leurs services écosystémiques

4.1. Histoire des légumineuses

Les légumineuses à graines figurent parmi les premières espèces domestiquées et cultivées depuis longtemps (Caracuta et al., 2015). Ces cultures présentent des graines riches en protéine et amidon leur conférant un intérêt bien particulier pour l'alimentation humaine et animale

(Schneider et Huyghe, 2015). Les légumineuses présentent un intérêt majeur dans la construction d'agrosystèmes durables économes en intrants (Schaller, 2012 ; FAO, 2016).

La production mondiale de légumineuses à graines, dont les protéagineux, a légèrement augmentée. En 2020, la production mondiale a dépassé les 80 millions de tonnes (Terres Univia, 2019). Cette augmentation à l'échelle mondiale masque une réalité très contrastée. A l'échelle de l'Union Européenne, la surface de protéagineux a connu 3 phases d'évolution bien marquées. Malgré les atouts agronomiques des légumineuses, les surfaces consacrées à leur production ont été très fortement influencées par la destination des aides économiques allouées aux productions végétales. Entre 2005 et 2009, un recul spectaculaire des surfaces cultivées en protéagineux est observé. Ce recul est lié aux évolutions réglementaires (restriction de l'utilisation de certains produits phytosanitaires) ainsi qu'à la dégradation de la compétitivité des légumineuses par rapport à d'autres cultures en termes de prix et de rendement (des forts taux d'abandon imputables aux mauvaises conditions météorologiques). A partir de 2013, en lien avec le verdissement de la Politique Agricole Commune, les cultures de légumineuses suscitent un regain d'intérêt et atteignent en 2017 une superficie totale de 1,8 millions d'hectares, puis une légère diminution en 2018 (**Figure 18**).

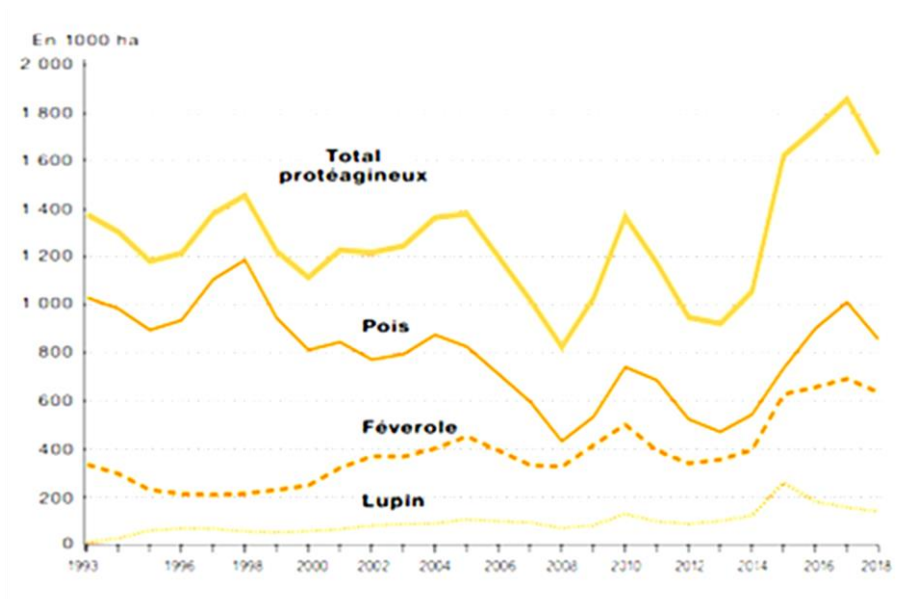


Figure 18. Evolution des surfaces des protéagineux dans l'Union Européenne entre 1987 et 2017 (Terres Univia, 2019)

Malgré les initiatives mises en place pour la structuration de cette filière, la surface arable des légumineuses en Europe reste plus faible comparée à d'autres pays comme l'USA, le Canada, l'Australie et la Chine. Ceci s'explique par le faible investissement de la recherche et développement sur ces espèces. Par conséquent, ce manque d'investissement n'a pas permis de

créer des opportunités de marché à plus forte valeur ajoutées qui auraient pu contribuer à leur plus large production (Magrini et al., 2016). De plus, les graines de légumineuses représentent moins de 2 % dans la formulation des concentrés destinés à l'alimentation animale (Charrier et al., 2013 ; Magrini et al., 2016). En France, les deux cultures majeures de protéagineux sont le pois et la féverole (**Tableau 7**). Les autres productions (lupin, pois chiche, etc.) restent aujourd'hui marginales.

Tableau 7. Bilan de la production de pois et féverole en France, données 2018-2019 (Terres Univia, 2019).

	2018-2019	
	Pois	Féverole
Production (1000t)	525	151
Surfaces (1000ha)	149	60,7
Rendement q/ha	35,3	24,9

Ces deux cultures sont également les cultures majeures de protéagineux dans le nord-ouest de la France (Agreste, 2018). En 2018, la superficie des protéagineux en Normandie représentait 8,9 % de la SAU de la France. Néanmoins, la superficie et le rendement de ces deux cultures sont variables en fonction des départements (Agreste, 2018 ; **Tableau 8**).

Tableau 8. Bilan des productions des protéagineux dans les départements de la Normandie (Agreste, 2018)

	Calvados	Eure	Manche	Orne	Seine Maritime	Normandie
	Total protéagineux dont:					
SAU en Milliers d'ha	5,6	5,6	1,3	4,8	2,9	20,2
Rendement en q/ha	36	34	36	30	34	34
	Pois protéagineux					
SAU en Milliers d'ha	3,7	4,8	1,1	4,3	1,7	15,5
Rendement en q/ha	35	35	35	31	36	34
	Féveroles					
SAU en Milliers d'ha	1,9	0,9	0,3	0,5	1,2	4,6
Rendement en q/ha	38	30	38	25	30	33

SAU : surface agricole utile

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la culture du pois d'hiver protéagineux dans un contexte pédoclimatique Normand. Dans cette région, les surfaces cultivées en pois d'hiver sont minoritaires en comparaison avec celles de pois de printemps. La superficie du pois d'hiver ne représente que 16 % de l'ensemble de la superficie du pois. Pourtant, cette culture présente un certain nombre d'avantages, notamment en ce qui concerne le contrôle des adventices, la gestion des stress hydriques, la gestion du risque lié à

Aphanomyces euteiches ou aux insectes ravageurs, la couverture du sol et la répartition du temps de travail (Biarnès et al., 2019).

4.2. Services écosystémiques rendus par les légumineuses

La fixation symbiotique de l'azote, détaillée dans la **Partie 2** de ce chapitre, est le service écosystémique pour lequel les légumineuses ont initialement été introduites dans les systèmes de culture. Par la suite divers travaux et expérimentations ont permis de mettre en évidence un panel plus large de services attribués aux légumineuses. Ceux-ci sont présentés sur la **Figure 19**.

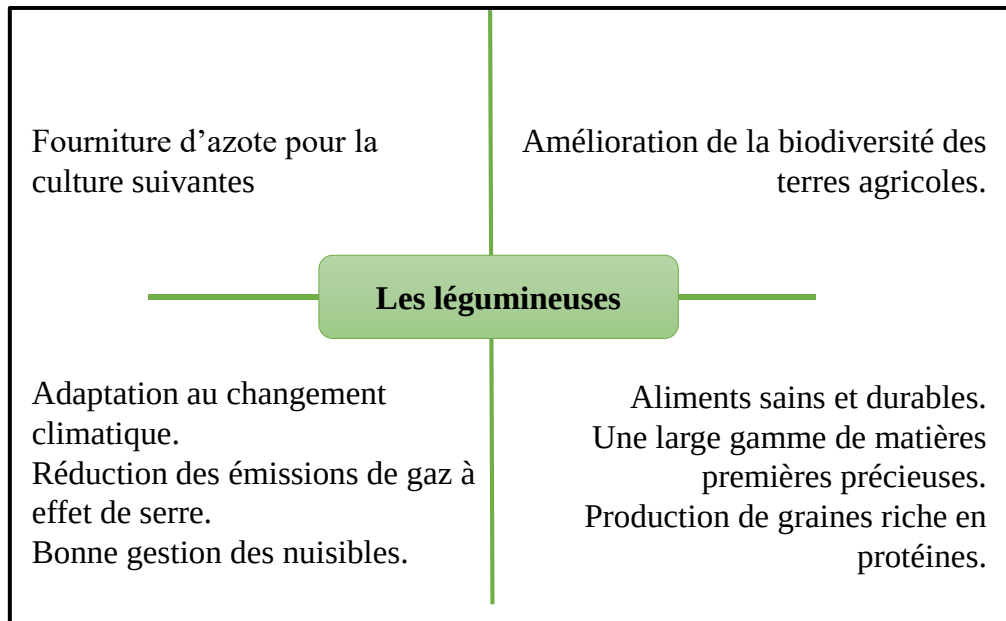


Figure 19. Les services écosystémiques des légumineuses (DAFA, 2012)

4.2.1. Les légumineuses et la disponibilité de l'azote au cours de la rotation

L'introduction des légumineuses dans les rotations culturales, en association ou en cultures principales, permet du fait de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, d'apporter de l'azote à l'agrosystème. La culture de légumineuse peut subvenir à ses propres besoins en azote et apporte par la rhizodéposition et la dégradation des résidus de culture, de l'azote aux cultures suivantes (Voisin et al., 2015). La minéralisation des résidus de cultures de légumineuses fournit de l'azote minéral pour la culture suivante, en quantité supérieure à celui d'une céréale ou d'un oléagineux (Crews et Peoples, 2004 ; Preissel et al., 2015 ; Guinet et al., 2019). En effet, des concentrations en azote minéral du sol plus importantes ont été observées après la récolte du pois, du pois chiche ou encore du lupin comparativement à des céréales telles que le blé ou l'orge (Carrouée et al., 2012). De même, dans une étude pluriannuelle menée sur 6 ans, la disponibilité en azote pour la culture du blé s'est révélée en moyenne nettement plus élevée avec un précédent pois (hiver et printemps) comparativement au tournesol (Justes et al., 2010). Ces teneurs élevées en azote minéral du sol après des cultures de légumineuses peuvent avoir

des effets positifs sur la qualité et la quantité des rendements. Angus et al. (2015) ont montré une augmentation moyenne de 0,92 t. ha⁻¹ dans le rendement du blé précédé d'une culture de légumineuse, par rapport à un précédent blé. Ce rendement plus élevé peut s'accompagner d'une amélioration de la qualité des céréales (teneurs plus élevées en azote). Cette augmentation du rendement a été observée dans différentes conditions agropédoclimatiques. Kirkegaard et al. (2008) ont mentionné des augmentations moyennes dans le rendement du blé de 33 % en Australie du Sud, 24 % en Europe du Nord, et 14 % en Amérique du Nord, lorsqu'il est précédé par des cultures de légumineuses (pois, lupin, féverole, etc.) comparativement à un précédent blé. Ces résultats soulignent également la variabilité spatiale des effets observés et la nécessité d'acquérir des références adaptées au contexte agropédoclimatique.

4.2.2. La réduction des émissions de gaz à effet de serre

Dans la mesure où les légumineuses ne nécessitent pas de fertilisation azotée, leur insertion dans un système de culture permet de réduire le recours à des engrais minéraux tout en introduisant de l'azote dans les systèmes agricoles (Cohan et al., 2015). L'augmentation de cette pratique pourrait permettre de limiter les émissions dues à la fabrication, le transport et l'épandage des engrais azotés de synthèse (Schwenke et McPherson, 2018 ; Raji et al., 2020). En effet, la fabrication des engrais de synthèse consomme une quantité importante de ressources énergétiques fossiles non renouvelables et produit des gaz à effet de serre (Vericel et al., 2018). Via un moindre recours aux engrais azotés par rapport à des systèmes sans légumineuses (absence d'apport d'engrais azotés sur les cultures de légumineuses et réduction des engrais apportés sur la culture suivante), les légumineuses entraînent également une diminution des émissions N₂O à l'échelle de la culture et de la succession de culture. Concernant toutes les pertes gazeuses azotées (NH₃, N₂O), les légumineuses permettent d'éviter une série d'impacts environnementaux liés à la production et à l'épandage de ces engrais (Cellier et al., 2008 ; Nemecek et al., 2015).

Les impacts de la culture de légumineuse sur les flux azotés varient selon l'espèce de légumineuse, son mode d'insertion et la conduite culturale (Cohan et al., 2015). Jeuffroy et al. (2013) indiquent que les émissions de N₂O mesurées pour les cultures du pois et du blé non fertilisé sont 5 à 10 fois plus faibles que celles enregistrées pour le blé et le colza fertilisés. La même tendance s'observe ailleurs (Jensen et al., 2012). Par exemple, l'estimation des émissions globales annuelles liées à une culture et à la décomposition de ses résidus montre que sous pois sont mesurées moins d'un quart des émissions quantifiées sous blé et colza fertilisés. Une succession comportant un pois permettrait donc de réduire de 20 % les émissions de N₂O sur 3

ans de rotation (Vericel et al., 2018). Des observations convergentes ont été faites en présence de légumineuses utilisées en culture intermédiaire, pures ou en mélange avec des non-légumineuses (Dyer et al., 2012 ; Huang et al., 2014a ; Vericel et al., 2018). Ces diminutions étaient attribuables à une diminution de dose d'engrais azotés appliquée sur la culture suivante.

La gestion des résidus de culture de légumineuse constitue un autre facteur déterminant dans les émissions de gaz à effet de serre (Chen et al., 2013 ; Lehtinen et al., 2014 ; Pinheiro et al., 2019). La dégradation des résidus de culture engendre des émissions de gaz à effet de serre (CO₂, N₂O) qui peuvent être contrôlées par les modalités de gestion des résidus, laissés en surface, incorporés ou retirés du sol (Muhammad et al., 2019). Les résidus qui sont incorporés dans le sol se décomposent plus rapidement que ceux placés à la surface du sol en raison d'un contact accru avec les microorganismes du sol (Ladoni et al., 2015 ; Lynch et al., 2016). Par conséquent, les résidus incorporés peuvent augmenter davantage les émissions de CO₂ et de N₂O que les résidus en surface (Baggs et al., 2000 ; Baggs et al., 2003 ; Basche et al., 2014).

4.2.3. Meilleure gestion des ravageurs et adventices

Les légumineuses constituent un levier majeur de lutte contre les bioagresseurs et les ravageurs. Leur présence dans la rotation joue un rôle de diversification dans les systèmes de culture principalement constitués de céréales ou d'oléagineux, ce qui contribue à la rupture du cycle des ravageurs (Ratnadass et al., 2012). Les associations avec des légumineuses peuvent également présenter un intérêt pour lutter contre certains ravageurs mais les conclusions ne peuvent pas être généralisées du fait des mécanismes propres à chaque ravageur (Daryanto et al., 2020).

L'introduction des légumineuses dans la succession culturale constitue aussi un moyen de lutte contre les adventices. Le bénéfice économique peut atteindre de 15 à 35 euros par hectare et par an du fait de la réduction de charges liée à l'enherbement (Schneider et Huyghe, 2015). Sur le plan agronomique, l'association du blé avec un couvert de légumineuse a permis de diminuer significativement la densité des adventices au moment de la récolte du blé. Cette diminution représente en moyenne 52 % de la densité d'adventices observée sur le traitement témoin (Amossé et al., 2013). La compétition pour la lumière permettrait en effet de limiter l'émergence de nouvelles adventices entre la floraison et la récolte du blé associé (Kruidhof et al., 2008 ; Bergkvist et al., 2011 ; Blaser et al., 2011). Néanmoins, cette efficacité de gestion est variable selon l'espèce de légumineuse. Blackshaw et al. (2010) ont observé un meilleur contrôle des adventices par la luzerne que par le trèfle violet. L'utilisation d'espèces à port élevé (plus compétitifs vis-à-vis de la lumière), comme la luzerne, peut toutefois remettre en cause

cette différence. En cas de forte disponibilité d'azote du sol durant l'association, le développement des adventices est facilité par de bonnes conditions de nutrition azotée, les couverts de légumineuses sont généralement moins développés et donc moins compétitifs vis-à-vis de la lumière (Bergkvist et al., 2011). Dans ces conditions, la présence des légumineuses peut toutefois s'avérer néfaste en facilitant le développement des adventices (Sjursen et al., 2011).

Enfin les légumineuses contribuent indéniablement à la diversité des paysages (Thiébeau et al., 2010). Cette culture assure l'approvisionnement du système en azote, recyclé par les vers de terre et la biomasse microbienne des sols. Les légumineuses contribuent par ailleurs à la biodiversité des insectes dont les pollinisateurs et les oiseaux (Broyer, 2001).

4.3. Les flux d'azote en présence d'une culture de pois

Le rôle agronomique des légumineuses vis-à-vis de l'azote est en grande partie (i) lié à la fixation symbiotique de l'azote et à son utilisation *via* l'exportation de produits récoltés comme les graines (ii) et à l'utilisation par les cultures suivantes (céréales ou les oléagineux) du stock d'azote minéral du sol, alimenté, par les résidus de cultures de légumineuses riches en azote (Schneider et Huyghe, 2015). La répartition de l'azote dans ces compartiments est variable selon l'espèce de légumineuse, son mode d'exploitation dans les systèmes de culture, ainsi que les conditions pédoclimatiques (Justes et al., 2012 ; Williams et al., 2014 ; Espinoza et al., 2015 ; Voisin et al., 2015). Pour une culture de pois, à fort potentiel de rendement (70 q. ha⁻¹) et une quantité d'azote minéral absorbé élevée, 60 % de l'azote atmosphérique est fixé par la culture et 40 % de l'azote provient de l'absorption racinaire (**Figure 20**).

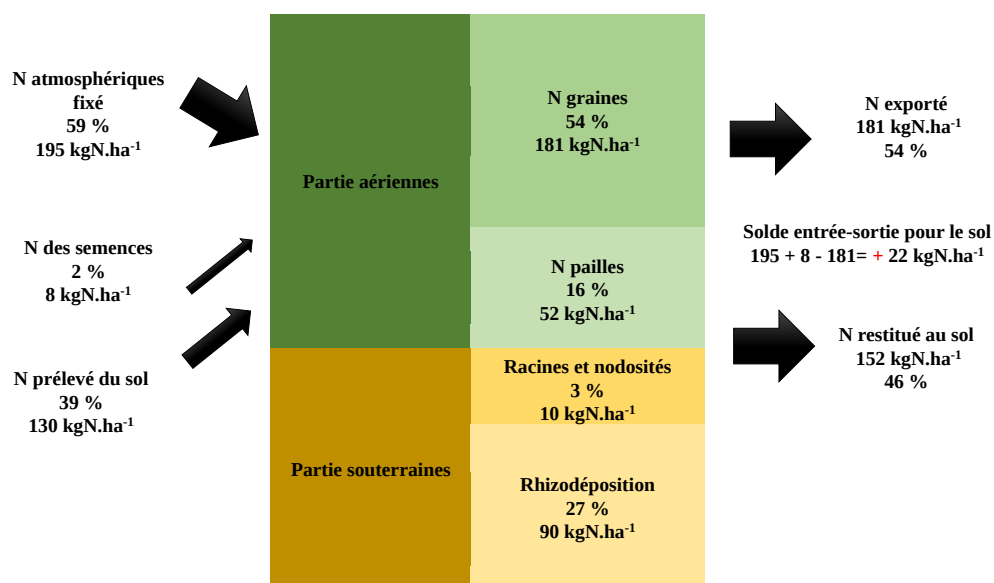


Figure 20. Répartition des flux d'azote pour une culture de pois (Mahieu et al., 2007)

La part de l'azote exporté dans les graines de pois reste la plus importante par rapport aux autres compartiments de la plante (Williams et al., 2014 ; Espinoza et al., 2015). Les mêmes tendances ont été observées pour d'autres espèces de légumineuses à graines (soja, lupin, fèverole, etc.), étudiées dans différentes conditions expérimentales (Rochester et al., 2001 ; Khan et al., 2002 ; Turpin et al., 2002 ; Salvagiotti et al., 2008 ; Williams et al., 2014 ; Espinoza et al., 2015). Concernant la part de l'azote restitué dans le sol, en plus des résidus de cultures, la rhizodéposition contribue à une part importante dans cette restitution (Fustec et al., 2010 ; Zhu et al., 2011). En effet, les études ayant estimé la proportion d'azote dans les parties souterraines par rapport à l'azote total chez le pois, montrent des valeurs d'azote comprises entre 30 % (Mahieu et al., 2007) et 39 % (Wichern et al., 2007b) dans des essais conduits au champ avec une valeur moyenne de 35 %. Les études qui se sont intéressées à la mesure des quantités d'azote contenues dans les racines et exsudées par rhizodéposition, montrent des valeurs variables, reflétant des différences entre espèces de légumineuses et conditions agropédoclimatiques, mais aussi les limites et les biais techniques (Fustec et al., 2010 ; Zhu et al., 2011 ; Anglade et al., 2015).

Chapitre II.

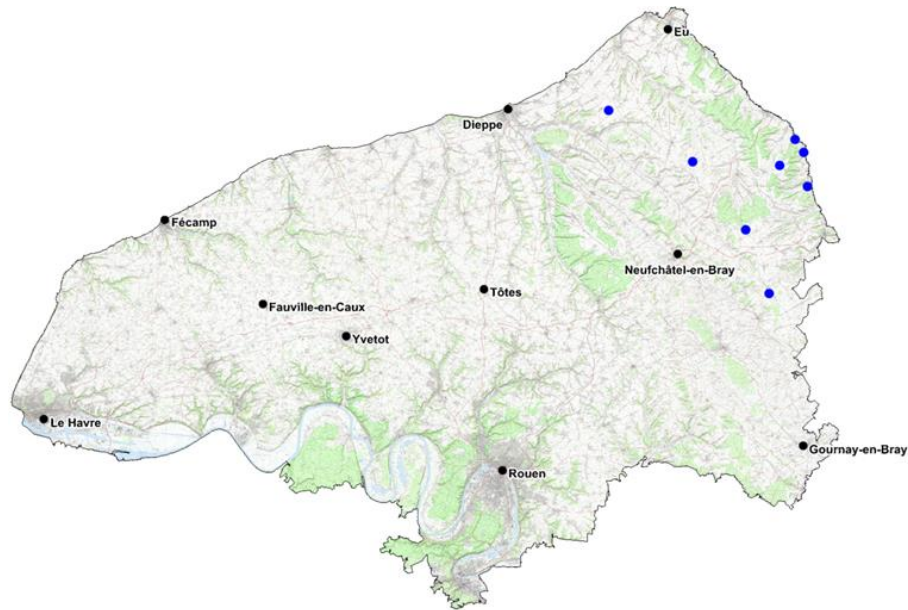
Hypothèses et démarche scientifique



1. Positionnement du sujet de thèse

L'intérêt agronomique des légumineuses est connu depuis plus de 2000 ans (Chorley, 1981 ; Pointereau, 2001). Par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, ces cultures permettent un transfert naturel de l'azote vers les agrosystèmes. Cela leur confère des bénéfices agronomiques, économiques et environnementaux importants (Peoples et al., 2009). Elles permettent une économie d'intrants azotés pour la culture elle-même, mais garantissent également un capital azoté pour la culture suivante. Toutefois, les quantités d'azote apportées *via* les légumineuses sont encore sous-estimées par une prise en compte partielle des parties racinaires et de la rhizodéposition (Jensen, 1996 ; Carlsson et Huss-Danell, 2003 ; Crews et Peoples, 2005). De plus, les dynamiques de minéralisation des résidus sont spécifiques des espèces (Singh et Kumar, 1996) et des contextes pédoclimatiques régionaux variables selon les années (Walley et al., 2007). Ainsi, les études menées par Arvalis et l'Unip estiment que la fertilisation azotée de cultures de blé ou colza derrière une culture de pois peut être diminuée de 20 à 60 kg d'azote. ha⁻¹ (Unip et Arvalis, 2014). Les références françaises ont été acquises dans différentes régions (Centre, Bassin parisien, Bourgogne, Poitou Charentes, Pays de Loire...) mais aucune référence n'a été publiée pour la Normandie où la culture du pois d'hiver connaît un récent regain d'intérêt, avec une augmentation des surfaces cultivées, alors que la production était quasiment nulle les années précédentes. Les surfaces de pois d'hiver sont minoritaires en comparaison avec le pois de printemps. Cet intérêt pour la culture du pois d'hiver s'est traduit notamment par la création d'un Groupements d'Intérêt Economique et Environnemental (GIEE) pois d'hiver, constitué d'un groupe d'agriculteurs du pays de Bray (Seine maritime) souhaitant remplacer la culture de colza en tête de rotation par celle de pois d'hiver (**Figure 21**). Ces agriculteurs souhaitaient pouvoir bénéficier d'un suivi scientifique de leurs parcelles afin d'évaluer l'impact de leur changement de pratiques à l'aide d'indicateurs d'état biologique des sols. Dans ce contexte, UniLaSalle, la chambre d'agriculture de Seine Maritime et le groupe d'agriculteurs du GIEE pois d'hiver ont co-construit le projet régional VIVEPOIS « Nouvelle culture régionale au service de l'agroécologie : le pois d'hiver ». Ce projet visait à évaluer l'effet de l'introduction d'une culture de légumineuse, le pois d'hiver, sur la performance agronomique, environnementale et économique des successions culturales. Ce questionnement se positionne dans une problématique d'approche systémique de la performance, impliquant une analyse multicritère des systèmes de culture en comparaison avec des systèmes excluant les légumineuses. Il s'agissait au travers de la mesure

(a)



(b)



Figure 21. Localisation des 8 exploitations des agriculteurs impliqués dans le GIEE Pois d'hiver- Pays de Bray (a). Réunion de restitution des résultats en présence des agriculteurs du GIEE, des membres d'UniLaSalle et de la chambre d'agriculture (b)

d'indicateurs écologiques (état biologique du sol, potentiel infectieux lié à *Aphanomyces euteiches*), physicochimiques (fixation symbiotique de l'azote/disponibilité et physique du sol), agronomiques (rendements, niveaux d'intrants en azote et produits phytosanitaires), économiques (marge brute, débouchés et filières) et sociaux (répartition du temps de travail pour la gestion des cultures) de produire des références permettant d'identifier les atouts et les contraintes liés à l'implantation de cette culture. Ce projet s'est décliné en 3 axes de recherches imbriqués et complémentaires pour contribuer à améliorer les connaissances sur la culture du pois d'hiver et ses impacts sur la fertilisation (volet 1), la biodiversité du sol (volet 2) et les interactions plante/pathogènes (volet 3).

Ce sujet de thèse couvre les deux premiers volets du projet VIVEPOIS (**Figure 22**). En effet, plusieurs questions se posent quant à l'optimisation de la gestion de la culture du pois d'hiver et de l'azote disponible pour les cultures suivantes dans les systèmes céréaliers dominés généralement par les cultures céréalières et oléagineuses. Nous proposons dans le cadre de ce travail de thèse de quantifier la restitution de l'azote pour les cultures suivantes à différentes échelles et d'approfondir la compréhension de la dynamique de minéralisation de l'azote des résidus de culture du pois d'hiver (**Figure 23**).

Objectif de la thèse

L'objectif central de la thèse est d'évaluer l'effet de l'introduction du pois d'hiver dans la succession culturale, sur la dynamique de l'azote, les communautés microbiennes des sols et les fonctions résultantes dans le contexte Normand.

Hypothèses

Nous émettons l'hypothèse que l'introduction du pois d'hiver dans la succession culturale en tête de rotation, en remplacement du colza, augmente (i) l'abondance et la diversité des communautés microbiennes ainsi que les fonctions résultantes dans le sol et (ii) la disponibilité en ressources et notamment l'azote restitué au sol pour les cultures suivantes.

Plus précisément, nous faisons les hypothèses suivantes :

- (1) Le pois d'hiver et/ou colza modifient l'abondance et l'activité des communautés microbiennes durant leur cycle de développement et cet effet se poursuit durant la culture suivante (sous blé).
- (2) L'introduction du pois d'hiver dans la succession culturale entraîne une modification de la composition des communautés microbiennes et une augmentation des activités enzymatiques des cycles de l'azote, en raison de l'entrée de résidus et des rhizodépôts riches en azote.

Etudes à différentes échelles spatio-temporelles	Volet 1 : . Pois d'hiver et gestion de l'azote dans le système de culture	Volet 2: Suivi des communautés microbiennes dans les sols et les des fonctions résultantes	Volet 3 : Microorganismes spécifiques et interrelations avec la Plante
Rotation culturale aux champs	Reliquats azotés et caractéristiques physico-chimiques sol et plante	Quantification communautés microbiennes et activités enzymatiques	Détermination de présence de rhizobiacées, <i>Aphanomyces euteiches</i> (A.e) et mycorhizes
Stades phénologiques en serre	Suivi croissance racinaire et composition exsudats	Détermination des activités microbiennes et enzymatiques	Etude de différents gradients de rhizobiacées, de rhizobactéries et de mycorhizes en présence d'A.e
Expérimentations et analyses en laboratoire	Cinétiques de minéralisation des résidus de culture	Analyses laboratoires des paramètres biologiques et physico-chimiques	Analyses laboratoires des oomycètes, mycorhizes et exsudats racinaires

Figure 22. Les approches déployées pour répondre aux objectifs des volets 1 et 2 du projet VIVEPOIS, en lien avec la problématique de la thèse

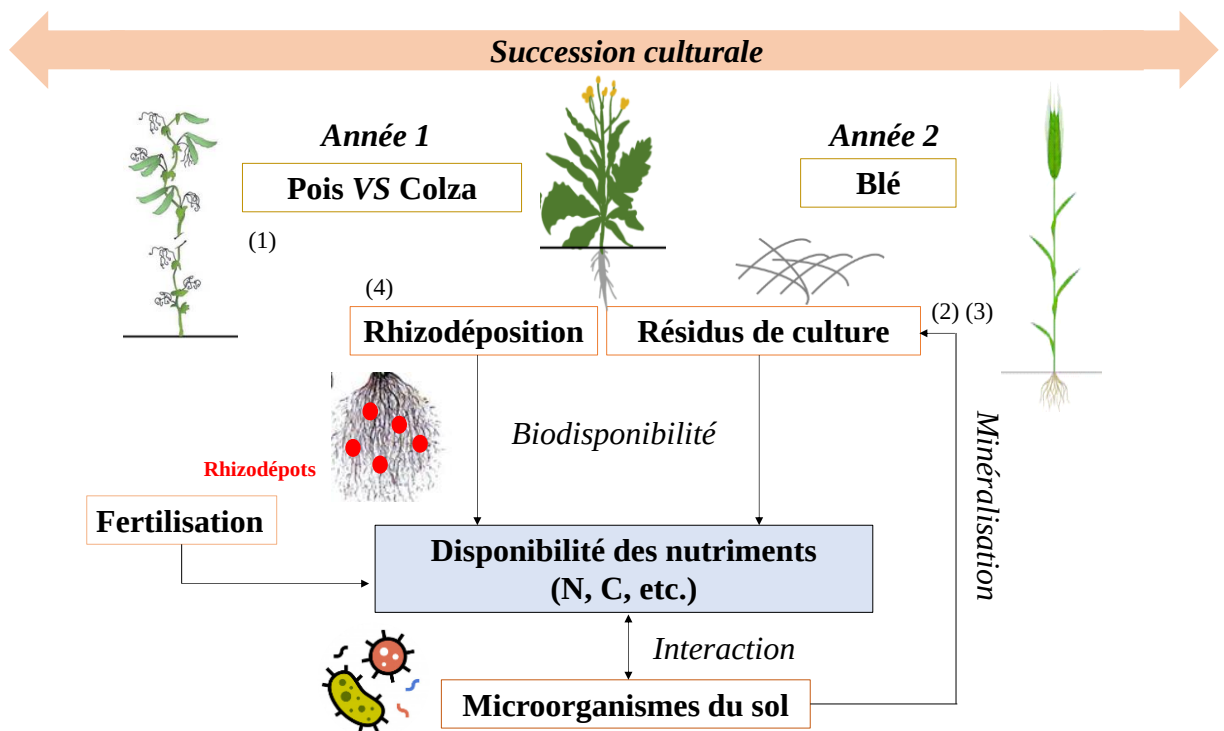


Figure 23. Schéma conceptuel de l'objectif central de la thèse ainsi que les hypothèses testées

(3) L'apport des résidus de culture entraînera des changements dans la composition et la biomasse des communautés microbiennes du sol et dans les activités enzymatiques. En retour, cela augmentera la minéralisation du carbone et de l'azote dans les sols.

(4) L'introduction du pois d'hiver dans la succession culturale entraîne une modification de la composition des communautés microbiennes par l'intermédiaire de leur rhizodépôts.

2. Démarches scientifique et expérimentale

Pour tester ces hypothèses, différentes échelles d'étude spatiotemporelles ont été utilisées (**Figure 24**). La première échelle correspondait à une étude en conditions multifactorielles en plein champ (*in situ*) et la seconde en serre pour permettre une analyse plus précise du développement des racines et des exsudats racinaires produits pendant la culture du pois d'hiver. Enfin, des expérimentations sur la cinétique de la minéralisation des résidus de culture et leur impact sur l'état physico-chimique et biologique du sol ont été réalisées en conditions contrôlées au laboratoire.

2.1 Approche au champ

Concernant l'étude *in situ* sur le terrain, le dispositif choisi s'est appuyé sur les agriculteurs fondateurs du GIEE « pois d'hiver en Pays de Bray » qui ont introduit du pois d'hiver dans leurs successions culturales. Le travail d'identification des parcelles a été conduit par la chambre d'agriculture (F. d'Hubert) qui a assuré le lien entre UniLaSalle et les agriculteurs et a assisté à la plupart des prélèvements.

Un suivi de 2 parcelles incluant quatre modalités : avec/sans pois d'hiver dans la succession (pois d'hiver ou colza – blé) comprenant chacune une bande témoin avec/sans fertilisation a été réalisé. Le dispositif a été mis en place en 2 temps sur 2 parcelles : en (2016 – 2018, parcelle 1) et en (2017 - 2019, parcelle 2). Chaque parcelle a été découpée selon le dispositif décrit dans la **Figure 25**. Chacune des successions (colza-blé ou pois d'hiver-blé) a été évaluée selon 2 modalités de fertilisation (N et 0N).

Les sols issus des parcelles des deux agriculteurs ont fait l'objet d'un suivi qui s'est focalisé sur l'acquisition de variables descriptives des communautés microbiennes au travers la quantification des biomasses microbiennes totales, bactériennes et fongiques et la mesure des

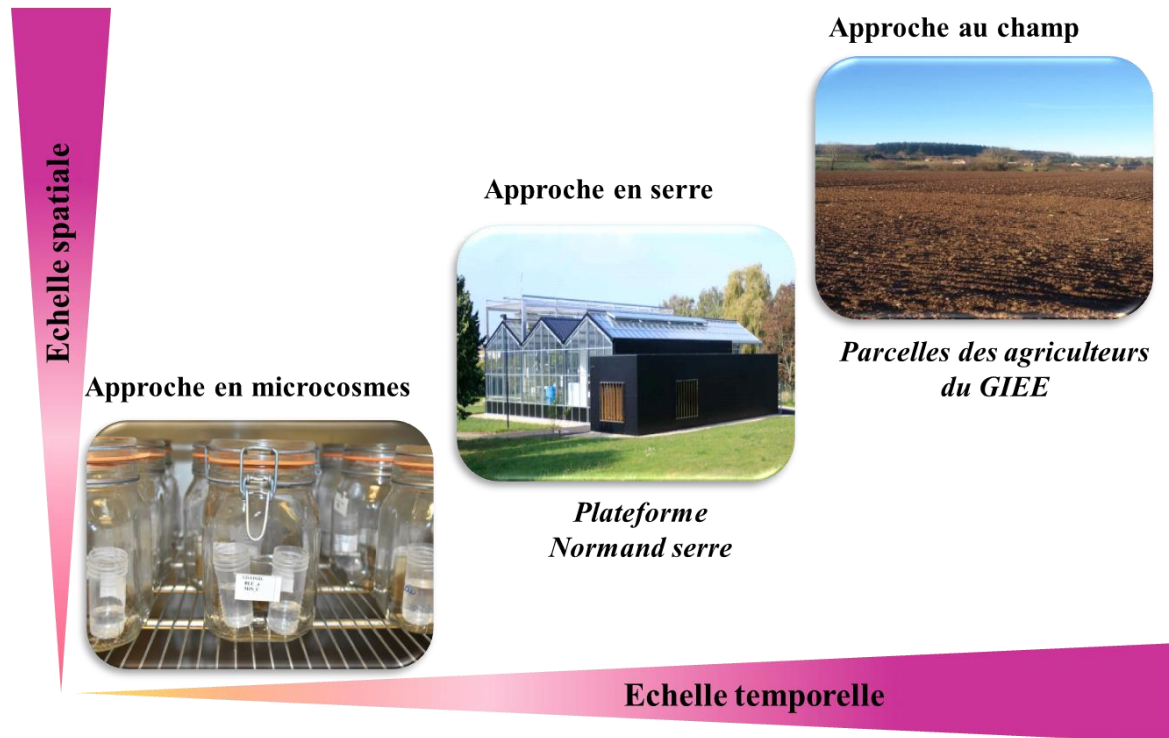


Figure 24. Les différentes échelles spatio-temporelles employées pour répondre aux objectifs de la thèse

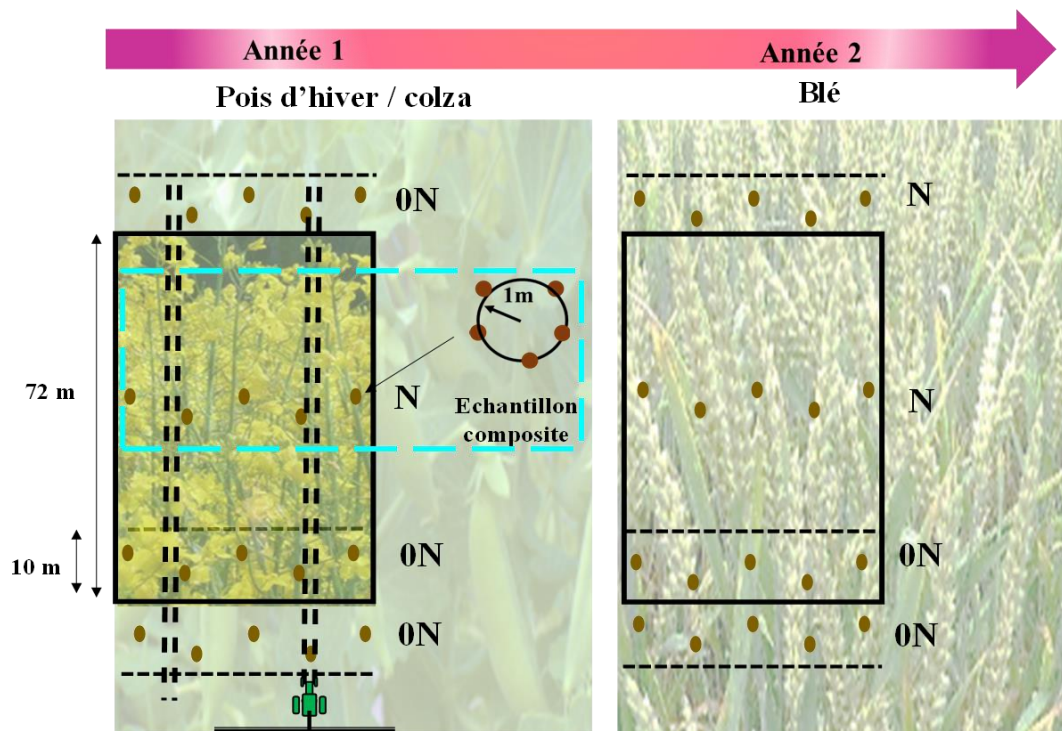


Figure 25. Dispositif expérimental déployé chez les deux agriculteurs. Le carrée bleu représente la stratégie d'échantillonnage en W employée pour les prélèvements de sol. Chaque point est un échantillon composite de 5 prélèvements.

activités enzymatiques (β -glucosidase, N-acétyl-glucosaminidase et arylamidase) impliquées dans le cycle du carbone et de l'azote. Les paramètres physicochimiques des sols tels que la texture, le pH, les teneurs de carbone et d'azote totaux ont été mesurés. Ce suivi a impliqué la réalisation de prélèvements d'échantillons de sols à l'aide d'une tarière sur une profondeur 0-20 cm. Les échantillons de sol prélevés et préalablement géolocalisés correspondaient à 5 échantillons composites de 5 prélèvements dans chaque modalité (**Figure 26**). Trois campagnes d'échantillonnage ont eu lieu chaque année, à l'automne (septembre-octobre), au printemps (mars-avril) et en été après la récolte (juillet).

Le suivi régulier des teneurs en azote minéral a impliqué chaque année, deux campagnes d'échantillonnage à l'entrée (octobre) et à la sortie de l'hiver (février) pour la mesure des reliquats azotés. Les échantillons de sol destinés à l'analyse des reliquats ont été prélevés à deux profondeurs différentes 0-30 cm et 30-60 cm avant tout apport d'azote organique ou minéral (période octobre- février) (**Figure 26**). Les prélèvements ont été réalisés dans un cercle de diamètre de 15 cm, après avoir géolocalisés ses points de prélèvements. Les échantillons de sol prélevés correspondaient à 5 échantillons composites de 5 prélèvements. Les indicateurs mesurés avaient pour objectif d'estimer les quantités d'azote fournies par le pois et mobilisables par les cultures suivantes. Aussi afin d'estimer les pertes d'azote, la modélisation agronomique a été utilisée sur les parcelles sélectionnées (STICS) (Benoit et al., 2015). **Ces travaux feront l'objet de l'article 1 du chapitre des résultats.**

2.2 Approche en serre

L'approche en serre en conditions semi-contrôlées avait pour objectif une analyse plus précise du développement des racines, de la rhizodéposition de l'azote des exsudats racinaires produits pendant la culture du pois d'hiver. Des plants de blé et de colza ont également été suivis comme culture témoin.

Afin de récupérer les exsudats racinaires, de nombreux essais méthodologiques ont été réalisés en s'inspirant de la littérature (Neumann et Romheld, 1999 ; Vranova et al., 2013 ; Strehmel et al., 2014 ; Vives-Peris et al., 2020). Plusieurs dispositifs de collecte d'exsudats racinaires ont ainsi été testés dans la plateforme Normand Serre. Ils ont nécessité des cultures en sol ou en substrats inertes, certains étaient destructifs et nécessitaient un changement de milieu, du sol vers la solution de collecte pour récupérer les exsudats racinaires. La mise en place de l'ensemble de ces dispositifs ainsi que toutes les mises au point réalisées pour définir

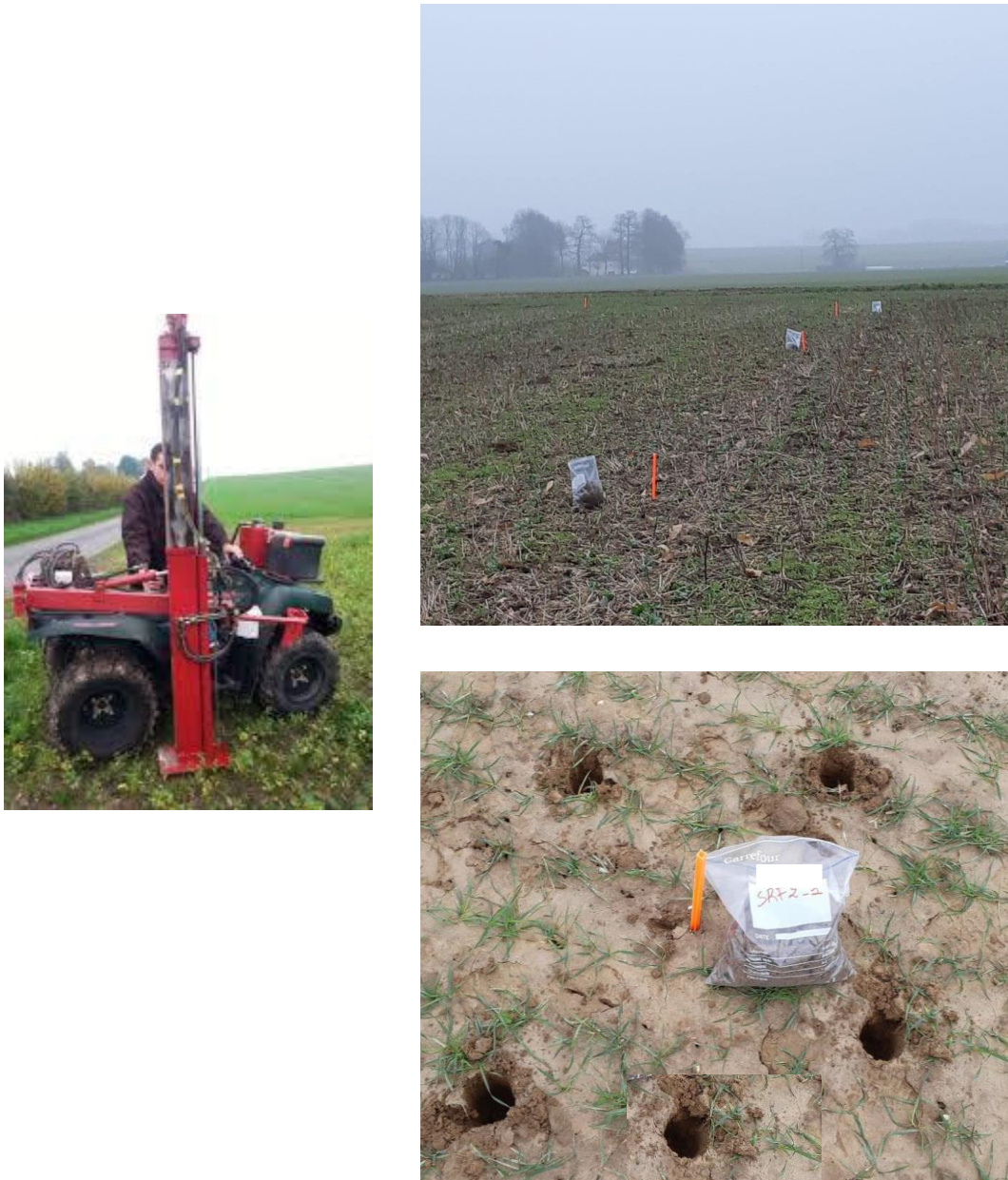


Figure 26. Prélèvements des échantillons de sols en W pour la mesure des reliquats azotés dans les parcelles d'études chez les agriculteurs

les conditions optimales de cultures de pois d'hiver, de blé et de colza en conditions stériles seront présentées dans la partie résultats. **Ces travaux feront l'objet de l'article 2 du chapitre des résultats.**

Bien que plusieurs dispositifs aient été préalablement testés, le choix définitif s'est finalement porté sur les dispositifs hydroponiques pour la collecte et la caractérisation des exsudats racinaires des trois plantes. En effet, la culture en milieu liquide permet la collecte des exsudats racinaires d'une manière non destructive et consiste à extraire tout simplement la solution dans laquelle les racines des plantes ont baigné. Ainsi les trois plantes ont été cultivées en hydroponie et les exsudats racinaires ont été collectés à différents stades de développements des plantes (stade végétatif et stade de floraison) (**Figure 27**). Concernant l'étude de la rhizodéposition de l'azote, le marquage isotopique à l' ^{15}N a été apporté par la méthode de « *Leaf feeding* ». Le pois, le blé et le colza ont été cultivés en pot contenant du sol issu de la parcelle 1 et le marquage a été apporté *via* une solution d'urée marquée avec du ^{15}N par la technique de trempage des feuilles afin de quantifier l'azote rhizodéposé (**Figure 28**). **Ces travaux feront l'objet de l'article 3 du chapitre des résultats.**

2.3 Approche en microcosmes

Une approche en laboratoire en écosystèmes miniaturisés, a permis le suivi de la cinétique de dégradation des résidus de culture (tiges et feuilles) de pois, de blé et de colza (**Figure 29**). L'analyse de ces cinétiques a été mise en relation avec les indicateurs de la composition biochimique des végétaux (carbone/azote, composées solubles, hémicellulose, lignine et cellulose) et de l'accessibilité des différentes formes de carbone et d'azote des résidus en conditions contrôlées.

La décomposition des résidus de culture a été réalisée selon la norme XPU 44-163, 2009 en condition non limitante en azote. En parallèle du suivi de la cinétique de minéralisation C et N après apport des résidus, sur une période de 90 jours, un suivi des abondances des communautés microbiennes et des activités enzymatiques a été réalisé en début et en fin d'incubation. Ce suivi a été complété par une analyse très approfondie de la composition et de la diversité des communautés bactériennes du sol. **Ces travaux feront l'objet de l'article 4 du chapitre des résultats.**



Figure 27. Dispositif hydroponique mis en place pour la collecte des exsudats racinaires du pois d'hiver et du blé

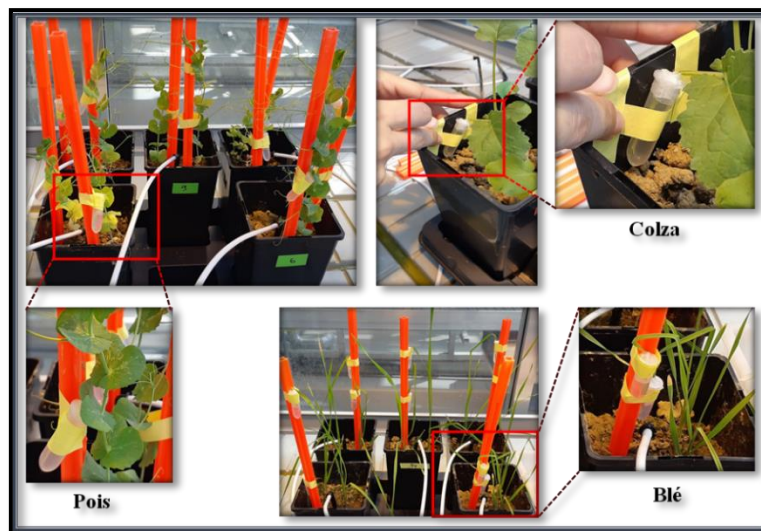


Figure 28. Dispositif de marquage par « leaf feeding » utilisé pour la quantification de N rhizodéposé par le pois d'hiver



Figure 29. Mise en place des incubations en microcosmes pour l'étude de la cinétique de dégradation des résidus de cultures

Chapitre III. Résultats

Article 1

Titre: Impacts of the winter pea crop (instead of rapeseed) on soil microbial communities, nitrogen balance and wheat yield

Article

Impacts of the Winter Pea Crop (Instead of Rapeseed) on Soil Microbial Communities, Nitrogen Balance and Wheat Yield

Cyrine Rezgui ¹, Wassila Riah-Anglet ^{1,*}, Marie Benoit ², Pierre Yves Bernard ¹, Karine Laval ¹
and Isabelle Trinsoutrot-Gattin ¹

¹ UniLaSalle, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, Rouen Team, 3 Rue du Tronquet, F-76134 Mont-Saint Aignan, France ; cyrine.rezgui@unilasalle.fr (C.R.) ; Pierre-Yves.BERNARD@unilasalle.fr (P.Y.B.) ; Karine.LAVAL@unilasalle.fr (K.L.) ; Isabelle.GATTIN@unilasalle.fr (I.T.-G.)

² ISARA, Higher education institution, 69007 Lyon, France; mbernoit@isara.fr

* Correspondence: wassila.RIAH-ANGLET@unilasalle.fr; Tel.: +33-2-32-82-91-98; Fax: +33-2-35-05-27-40

Received: 21 October 2020; Accepted: 12 November 2020; Published: 14 November 2020

Abstract: Due to legume-based systems improving several aspects of soil fertility, the diversification of agrosystems using legumes in crop succession is gaining increasing interest. The benefits of legumes aroused the interest of farmers in the association of the Economic and Environmental Interest Group (EEIG), who introduced the idea of using the winter pea instead of rapeseed in their crop succession. The aim of this study is to evaluate the effects of the winter pea compared to those of rapeseed, as a head crop of the rotation, on soil microbial communities, enzyme activities, nitrogen (N) balance and yields. The field experiment involved two farmer plots that were selected within the EEIG. In each plot, two crop successions, including winter pea–wheat and rapeseed–wheat with fertilized and unfertilized strips, were examined for two years. Three times a year, under the wheat crop, composite soil samples were collected at depths of 0–20 cm, for microbial abundance and enzyme activity analyses, and twice a year at a depth of 0–60 cm, for the measuring of the mineral N. The results showed that the rapeseed–wheat succession maintained or enhanced soil bacterial and fungal biomasses and their enzyme activities. The winter pea–wheat succession enriched the soil’s mineral N content more consistently than the rapeseed–wheat succession. The mineral N enhancement’s effect was maintained under the wheat crop. Overall, the impact of the winter pea was positive on the soil’s N dynamics, but wheat yields were equivalent regardless of the previous crop (winter pea or rapeseed with and without fertilization). In the Normandy region, as rapeseed requires a large amount of N fertilizer and pesticide to maintain the yield and quality of crop products, it is suitable to favor the introduction of the winter pea as the head crop of the rotation, which indirectly allows for a reduction in the costs of input production and use, the working time of farmers and environmental pollution.

Keywords: crop succession; winter pea; rapeseed; enzyme activities; microbial biomass; mineral N; yields

1. Introduction

In Europe, innovative practices have been identified as prominent measures for increasing the resilience of the agricultural system [1–4], developing adaptation strategies to mitigate the impact of climate change [5,6] and improving ecosystem services [7]. Among these practices, crop rotation has

emerged as a way of reducing the impact of agricultural management on environmental changes. Consequently, the Common Agricultural Policy (CAP) of the European Commission (2011) considered the diversification of crop rotations as a key measure for establishing a more sustainable agriculture. The design of crop rotation has many agronomic, economic and environmental benefits compared to monoculture cropping [8,9]. It is well accepted that optimized crop rotation has various benefits, not only for growers but also for the environment, as increasing crop diversity can enhance the heterogeneity of the soil nutrients pool [10], soil physical structure [11] and functional microorganisms at different spatial scales [12,13], which lead to improved soil health, crop yields [14] and a decreased requirement for synthetic fertilizer [15].

In this context, legume crops play an important role and can provide a variety of services that are consistent with the principles of sustainability [16]. Indeed, legumes are advantageous for soils due to their symbiotic relationship with nitrogen-fixing bacteria [17]. The presence of compatible rhizobia combined with N-limited conditions promotes symbiosis—the most efficient way for legumes to acquire more N. Compared to non-nodulated plants, symbiosis provides a competitive advantage by increasing N levels up to 5-fold [18,19]. Thus, the symbiotic fixation of N₂ provides between 40% and 90% of the legume's N requirement. This mechanism is highly dependent on nitrate concentration; for example, the symbiotic fixation of peas stops when the soil nitrate concentration reaches the equivalent of 40 kg ha⁻¹ and restarts as soon as the concentration is decreased [20]. This study also showed that these fluctuations have no impact on yield or seed protein content.

Crop rotation with grain legumes can improve productivity and yield quality by increasing the protein content of the following crop due to increased soil available N from biological fixation after legumes [21,22]. The availability of N after a legume crop is greater than after a non-legume crop [23,24]. In fact, compared to wheat harvests, higher soil mineral N concentrations have been reported after harvesting pea, chickpea, barley and lupine crops [25–27]. Angus et al. [22] showed that wheat crops usually yield more when grown after legumes (peas, faba beans, chickpeas, lentils, lupins, etc.) than after wheat. More specifically, different crops can produce various residues and root exudates, which are considered to be the main factors to boost soil microbial diversity and activity, increase soil microbial biomass and carbon (C) and facilitate N cycling [12,28–30]. Some non-mycorrhizal plants, such as canola and mustard, cannot establish symbiotic relationships with some functional rhizobacteria; thus, they require more mineral fertilizer [31], which could change the soil physicochemical state in the long term. However, their implementation in rotation can suppress both arbuscular mycorrhizal fungal populations and the mycorrhizal formation process for the following crop, restricting their functions in soil [32].

The diversification of agrosystems by increasing the numbers of cultivated species and the use of legumes in crop rotation is attracting increasing interest. The benefits of this crop aroused the interest of the farmers of the EEIG, who are interested in improving their practices, productivity and the soil health of their farms. They opted for the introduction of winter pea crops to replace rapeseed in crop rotation so as to develop the economic, environmental and social performance of their farms. The winter pea has several advantages including weed control, water stress management, a reduced risk of *Aphanomyces euteiches*, reduced insects and pests and improved soil cover and farmers' working time management [33]. These advantages are mainly due to the staggered stages of winter pea cropping compared to spring pea cropping [34].

The present study focused on the evaluation of the impact of the introduction of the winter pea compared to rapeseed on the following cereal crops in Normandy. We hypothesized that the two previous crops (winter pea–wheat and rapeseed–wheat) would distinctly (i) affect soil microbial communities and their activities in relation to C and N turnover, (ii) impact the N balance and loss in the environment and (iii) affect the following crop (wheat yield) in different ways. For this purpose, the abundance of total, bacterial and fungal biomasses and soil enzyme activities involved in the C and N cycles were monitored at three sampling dates and the N balance at two sampling dates during the two crop successions.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design and Soil Sampling

The present study was conducted in two plots (49°46'48.62" N, 01°41'25.08" E; 49°45'48.30" N, 1°27'23.39" E) in real agricultural context to evaluate the effects of the introduction of the winter pea and rapeseed on crop succession. The study was carried out in Pays de Bray, which is in the Normandy region of Northwestern France. This area has a temperate oceanic climate. The mean daily maximum and minimum air temperatures range from 13 to 24 °C (June–July) and 5 to 10 °C (January–February). The precipitation varied by an average of 752 mm in 2016, 625 mm in 2017, 738 mm in 2018 and 807 mm in 2019.

The two agricultural plots were located on two different farms that were owned by members of the EEIG. The plots were chosen because of their soil characteristics, which were representative of the common pedological types of soil in Normandy (Table 1). The soil at plot 1 was sandy loam based on the French soil textural classification GEPPA (Groupe d'Etude pour les Problèmes de Pédologie Appliquée). This soil had 17.15 ± 3.82 g kg⁻¹ of total C and 1.28 ± 0.20 g kg⁻¹ of total N. The soil at plot 2 was loamy clay, which had 28.35 ± 2.97 g kg⁻¹ of total C and 1.45 ± 0.36 g kg⁻¹ of total N. The two soils exhibited alkaline pH (water) levels around 7.5 ± 0.12 .

Table 1. Soil physicochemical properties in the two studied plots.

	Plot 1			Plot 2		
Soil texture						
Clay (%)	6.56	± 0.32	b	32.36	± 2.16	a
Silt (%)	68.10	± 1.52	a	49.81	± 1.77	b
Sand (%)	25.34	± 1.81	a	17.84	± 1.53	b
pH _{water}	7.40	± 0.01	b	7.58	± 0.07	a
Total C (g.kg ⁻¹ air dried soil)	17.15	± 3.82	b	28.35	± 2.97	a
Total N (g.kg ⁻¹ air dried soil)	1.28	± 0.20	a	1.45	± 0.36	a
Organic C (g.kg ⁻¹ air dried soil)	13.65	± 2.22	b	26.89	± 2.13	a

Letters indicate significant difference between plot 1 and plot 2 at $p < 0.05$ according to Tukey's test. The results are presented as the mean of three replicates ($n = 3$) ± the standard errors.

For the experimental design, each plot was divided into two blocks including fertilized and unfertilized strips (10 m) (Figure 1a). Over a two-year period (2016–2018 for the first plot and 2017–2019 for the second), the winter pea–wheat and rapeseed–wheat successions of each plot were examined; the crop establishment and crop management plans are presented in Figure 1b.

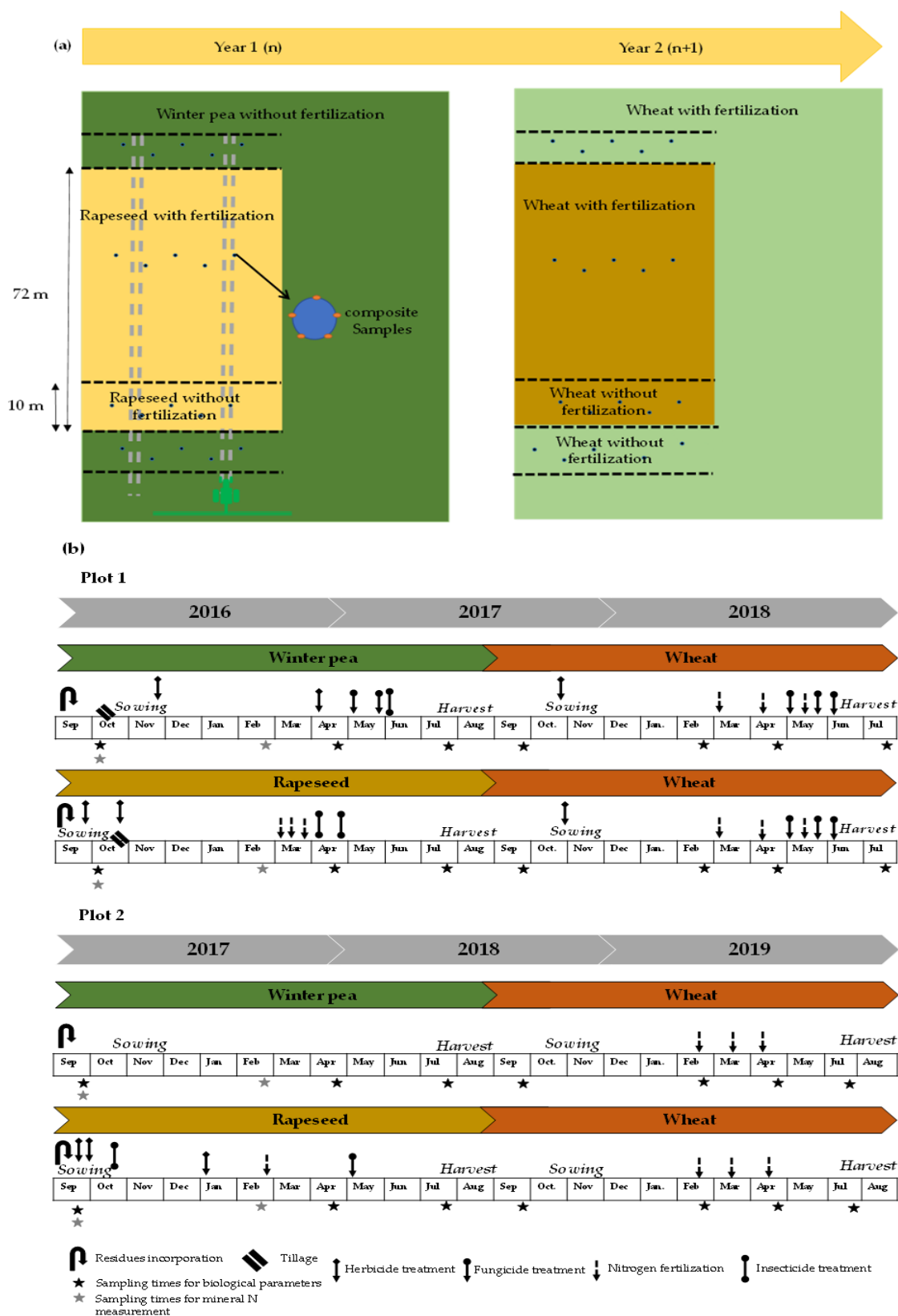


Figure 1. Schematic representation of crop succession including (a) plot design implemented in the selected farms (plot 1 and plot 2) and (b) history of crop management plan.

2.2. Soil Sample Collection

The sampling procedure was similar across the two plots. For each plot, five composite soil samples were collected from depths of 0–20 cm and 0–60 cm for the measurement of biological and mineral N, respectively. Each composite soil sample comprised five soil cores. At the time of sampling, a total of 40 (two plots x four treatments x five replicates) and 20 composite samples (two plots x two depth x five replicates) were collected for biological and mineral N analysis, respectively. Samples were sieved at 2 mm and subsequently homogenized. Fresh soil stored at –20 °C was used for biological analyses, and air-dried soil was used for physical and chemical analyses. Soil sampling was carried out four times a year under crops in spring (March–April), summer (July–August), autumn (September–October) and winter (February).

2.3. Soil Physical and Chemical Characterization

Moisture content was recorded after drying 30 g of soil at 105 °C for 24 h. Soil texture was determined using five grams of air-dried soil that had been treated with HCl solution to remove soil carbonate before adding H₂O₂ at 33% to eliminate soil organic matter, and finally sodium hexametaphosphate solution was used to break up the soil particles. Particle size distributions (%) were measured by laser granulometer Malvern Mastersizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) [35]. Soil pH in H₂O was measured with a glass electrode in 1:2.5 suspension (NF ISO 10390:2005).

For total organic carbon (TOC), samples were air-dried and sieved at 200 µm. TOC was analyzed using the TOC-Analyzer (Schimatzu-TOC-5050A, Kyoto, Japan)). The total carbon (TC) was measured by the combustion of 50 mg of soil at 900 °C, which allowed it to convert to CO₂. The released gas was measured with an infrared cell. For inorganic carbon (IC), 50 mg of soil was initially treated with phosphoric acid to dissolve the IC. Finally, the organic carbon (org C) was determined by subtracting the IC from the TC [35].

Total nitrogen (TN) was quantified using the Kjeldahl method. This method is based on the digestion of organic N into ammonium ions (NH₄⁺) with concentrated sulfuric acid (H₂SO₄), which is then followed by a distillation step. This step consisted of collecting the vapor released from the digested soil sample in an Erlenmeyer flask that contained sulfuric acid and drops of red methyl. Next, an acid-base titration step by adding alkalin (NaOH) was completed.

The determination of the concentration of the total mineral N involved the extraction of the mineral N from 25 g of soil using 100 mL of 1 M KCl. Soil samples were shaken for one hour with 100 mL of 1 M KCl and filtered using Whatman no. 40 filter paper. Filtered soil solutions were stored at –20 °C ± 2 °C until analysis. Three replicates were performed for each treatment.

2.4. Total DNA Extraction and Real-Time PCR Amplification

Nucleic acids were extracted from 0.5 g of soil using a FastDNA SPIN Kit for soil ((MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), following the instructions from the manufacturer. Three replicates were performed for each treatment. The soil DNA concentrations was assessed by fluorimetry using the Fluorescent DNA quantitation Kit Hoechst 33258 (Biorad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The DNA solutions were stored at at –20 °C until use [36].

The 18S rDNA amplifications for fungal biomass estimation by 18S rDNA real-time qPCR were carried out with a total volume of 25 µL. The qPCR mix was prepared as follows: 5 ng of soil microbial DNA, 0.5 µM of each primer (FU18S1 5'-GGAACTCACCAGGTCCAGA-3' and Nu-SSU-1536 5'-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-3') [37], 25 µL of LightCycler1 480 DNA SYBR Green I Master mix (Roche, Basel, Switzerland) and 0.25 mg·mL⁻¹ BSA (GeneON Bioscience, Germany). Standard curves were obtained using serial dilutions of linearized plasmids containing the cloned 18S rRNA gene of *Fusarium graminearum*, and the results are expressed as 18S rDNA gene copy number per gram of dry soil. The amplification protocol (40 cycles of PCR, 20 s at 95 °C, 30 s at 62 °C and 30 s at 72 °C) was performed using LightCycler 480 real-time PCR system (Roche, Basel, Switzerland)). The efficiency of the qPCR ranged from 93% to 98%.

The 16S rDNA amplifications for bacterial biomass estimation by 16S rDNA real-time PCR were carried out under the same conditions as the 18S rDNA PCR, with the exception of the primers (63f 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' [38] and BU16S4 5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'), which were derived from 341F [39]. The efficiency of the qPCR ranged from 98% to 100%. Standard curves were obtained using serial dilutions of linearized plasmids that contained the cloned 16S rRNA genes from the *Pseudomonas aeruginosa*, and the results are expressed as 16S rDNA gene copy number per gram of dry soil. Two independent qPCR assays were performed for the bacterial and fungal dsDNA estimation. Three replicates were performed for each treatment.

2.5. Enzyme Activities

β -D-glucosidase (GLU; EC: 3.2.1.21), N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG; EC: 3.2.1.30) and arylamidase (ARYLN; EC: 3.5.1.5) activities are involved in the decomposition of different substrates with varying complexity in relation to C and N cycling. Soil potential enzyme activity measurements were performed in 96-well microplates in triplicate using the procedure detailed in the ISO 20130:2018. In brief, for GLU and NAG activities, four-gram soil samples were mixed for 10 min at 250 rpm with 25 mL water. Soil solutions were incubated respectively with 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside 0.05 M (301.3 g·mol⁻¹, Sigma-Aldrichn, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 4-N-acetyl- β -D-glucosaminide 0.01 M (342.3 g·mol⁻¹, Sigma-Aldrichn, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The reaction was stopped with 0.5 M CaCl₂ and 0.1 M Tris at pH 12, each plate was centrifuged for five minutes at 1500 × g and absorbance was measured on a Varioskan Flash-Thermo microplate reader. The amounts of p-nitrophenol were obtained by measuring the absorbance at λ = 405 nm, with comparison to calibration curves. For ARYLN activity, four-gram soil samples were mixed for 10 min at 250 rpm with 25 mL with Trizma base (50 mM, pH 7.5). Soil solutions were incubated with L-leucine β -naphthylamide hydrochloride 0.008 M (292.8 g·mol⁻¹, Sigma-Aldrichn, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The β -naphthylamine produced was extracted with acidified ethanol and converted to an azo compound by reacting with p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMCA) (DMCA: 175.23 g·mol⁻¹ and ethanol 96%). The amount of β -naphthylamine was obtained by measuring the absorbance at λ = 540 nm and comparing it with calibration curves. Three replicates were performed for each treatment. Activities of soil enzymes were expressed as n moles of hydrolyzed substrate per minute per one gram of dry soil corresponding to mU. g⁻¹ dry soil. For each soil sample, the geometric mean (GMea) of enzyme activities was calculated as described by García-Ruiz et al. [40]:

$$\text{GMea} = \sqrt[3]{\text{GLU} \times \text{NAG} \times \text{ARYLN}} \quad (1)$$

2.6. STICS Simulation

The Simulateur multIdisciplinaire pour les Cultures Standard, or multidisciplinary simulator for standard crops (STICS) soil crop model was used for simulating yield, soil mineral N content, leaching and gaseous N emissions driven by daily climatic data [41]. Daily values for minimum and maximum temperature, solar radiation, average wind speed and relative humidity were available for the experimental periods at each plot. Soil parameters described above were provided as basic information for both plots. Information on field management, such as previous crops, sowing and harvest date, crop variety and density, sowing depth, soil tillage, fertilizer management and crop residue management, were also provided to set up the simulations. The simulation task was designed to simulate two successive crops (winter pea–wheat and rapeseed–wheat) in different soil conditions. Only single-year simulation was considered in this study. Simulations were set up using the initial values for the first year of simulations and used estimates of the initial values to simulate the subsequent years separately [42]. However, because of operability, the year simulation was driven by initializing the model each year of the simulation period using the same initial values.

2.7. Statistical Analysis

Statistical tests were carried out to evaluate the effects of the sampling dates (autumn, spring, and summer), two treatments (with and without fertilization) and the two successive crops (winter pea–wheat and rapeseed–wheat) on soil physicochemical parameters, the total microbial biomass (dsDNA), the total bacterial (16S rDNA gene copy number) and fungal (18S rDNA gene copy number) communities, enzyme activities (GLU, NAG and ARYLN), GMea and mineral N content in the two studied soil plots. The measured data were compared by using Tukey's test with significant differences at 5% ($p < 0.05$).

Principal component analyses (PCA) were performed to analyze the changes in all the measured data for each plot under wheat to evaluate the effects of the two tested successions (winter pea–wheat and rapeseed–wheat) with and without fertilization treatments in plots 1 and 2. The calculations were performed using R (The R Development Core Team, 2019; <http://www.R-project.org>).

3. Results

3.1. Effect of the Implementation of the Two Crop Successions

3.1.1. Soil Microbial Abundances and Enzyme Activities in the Two Successions

For the first plot (plot 1), the total and fungal biomasses did not differ statistically between the two studied successions (winter pea–wheat, rapeseed–wheat; Figure 2a). In contrast, bacterial biomass was significantly higher in rapeseed–wheat succession in spring. The second plot (plot 2) showed more variability than the first one. Total biomass, determined by the quantification of the extracted DNA from soil, was significantly higher in autumn in the rapeseed–wheat succession (Figure 2b). Our results showed that bacterial and fungal biomasses were more important in the rapeseed–wheat succession. Furthermore, microbial communities were dominated by bacteria in both successions.

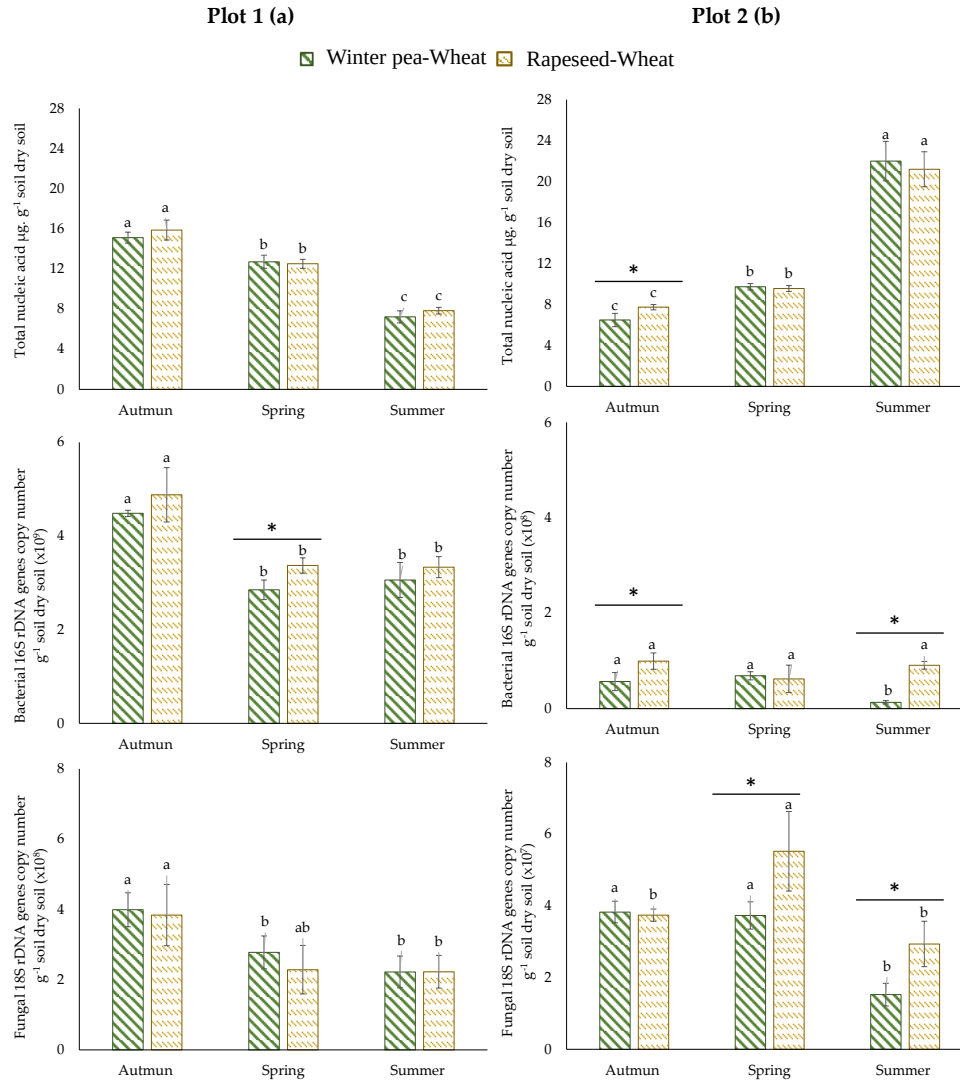


Figure 2. Total microbial communities, bacterial and fungal abundance in two crop succession (winter pea–wheat, rapeseed–wheat) at 3 sampling dates in the plot 1 (a) and plot 2 (b). Error bars on data points represent the standard errors of the mean of three replicates ($n = 3$). Letters indicate statistical significance between the 3 sampling dates and asterisks indicate statistical significance between the two successions (pea–wheat vs. rapeseed–wheat) at $p < 0.05$ according to Tukey’s test.

The results of enzyme activities showed different responses according to plots. In plot 1, no significant difference in ARYLN activity was identified for the two successions (Figure 3a). Rapeseed–wheat succession showed higher activity of GLU in autumn and lower activity of NAG in summer. For plot 2, a unique variation pattern was observed for enzyme activities (Figure 3b). They were consistently and significantly higher in the rapeseed–wheat succession at all sampling times.

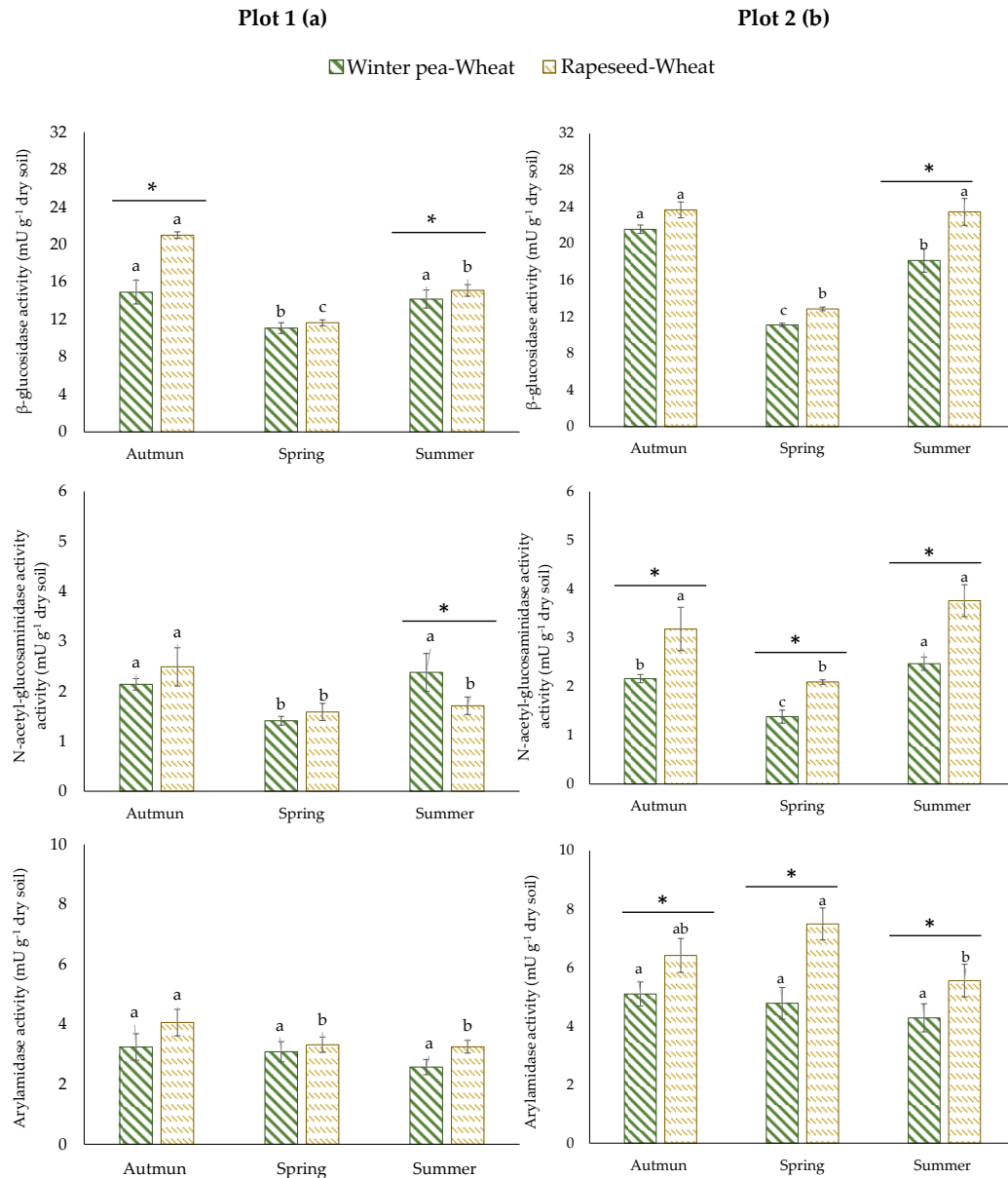


Figure 3. Enzyme activities in two crop successions (winter pea–wheat, rapeseed–wheat) at 3 sampling dates in the plot 1 (a) and plot 2 (b). Error bars on data points represent the standard errors of the mean of three replicates ($n = 3$). Letters indicate statistical significance between the 3 sampling dates and asterisks indicate statistical significance between the two successions (pea–wheat vs. rapeseed–wheat) at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

The GMea of the assayed enzymes was used as an integrating index of soil enzyme activities. The GMea level was, on average, 1.2-fold greater in plot 2 (Figure 4b) than in plot 1 (Figure 4a). The GMea was significantly higher in the rapeseed–wheat rotation at all sampling times in plot 2; in plot 1, the same result was obtained, with the exception of the summer sampling date. For most of the measured microbial parameters, the sampling date was the dominant factor and showed significant variability over the growing period of wheat.

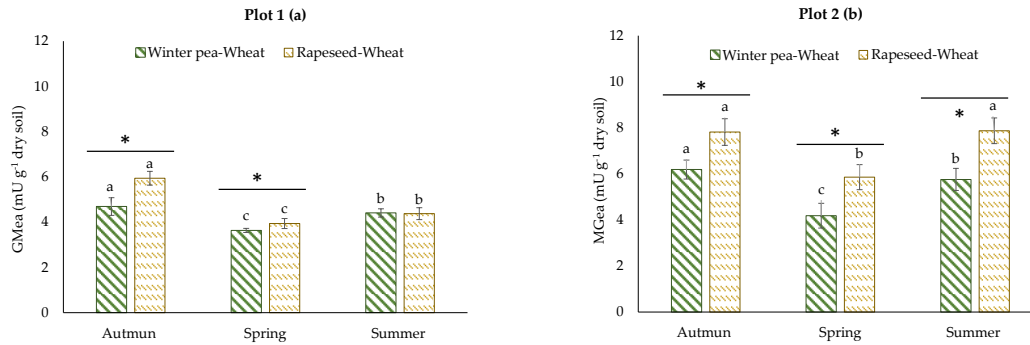


Figure 4. Patterns of the geometric mean of assayed enzymes determined in two crop successions (winter pea–wheat, rapeseed–wheat) at 3 sampling dates in plot 1 (a) and plot 2 (b). Error bars on data points represent the standard errors of the mean of three replicates ($n = 3$). Letters indicate statistical significance between the 3 sampling dates and asterisks indicate statistical significance between the two successions (winter pea–wheat vs. rapeseed–wheat) at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

3.1.2. Soil Mineral N Content in the Two Successions

For mineral N, we have chosen to present the results of the two successions with a classic management (with fertilization) because these results are more meaningful to farmers. Soil mineral N content in the two successions is presented in Figure 5. With either plot considered, the mineral N content in the winter pea–wheat succession was higher than in the rapeseed–wheat succession, with the exception of plot 1 in winter. The difference in autumn reached 48% and 35% for plot 1 and plot 2, respectively.

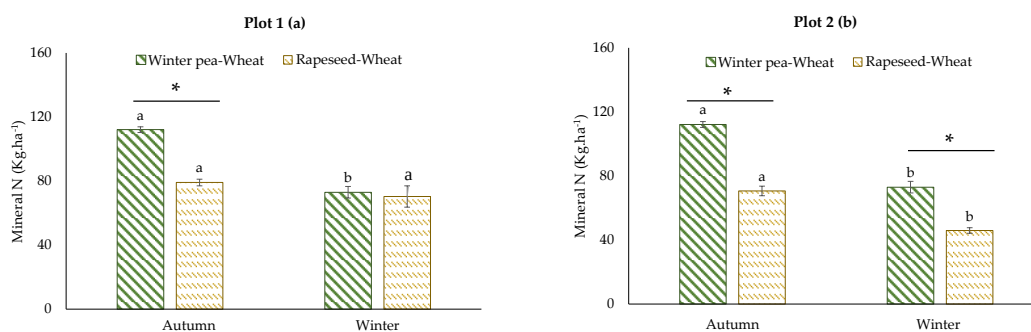


Figure 5. Effects of crop successions with fertilization on soil mineral N rate (0–60 cm) at two sampling dates (autumn and winter) in the two studied plots: (a) plot 1, (b) plot 2. Error bars on data points represent the standard errors of the mean of three replicates ($n = 3$). Letters indicate statistical significance between the sampling dates (autumn and winter) and asterisks indicate statistical significance between the two successions (winter pea–wheat vs. rapeseed–wheat) at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

3.2. Effect of Fertilizing Inputs along Crop Rotations

To evaluate the effect of fertilization on biological soil parameters, we have chosen to present the results obtained in summer after the input of fertilization (Figure 1b).

The Fertilization Effect on Microbial Abundances and Enzyme Activities

Microbial abundances were not affected by fertilization treatment (Table 2), except for bacterial biomass in plot 1, which was higher in unfertilized wheat ($34.68 \times 10^8 \pm 0.96 \times 10^8$ copy number of 16S rDNA genes g^{-1} dry soil) than in fertilized wheat ($32.51 \times 10^8 \pm 1.02 \times 10^8$ copy number of 16S rDNA genes g^{-1} dry soil).

Table 2. Total, bacterial and fungal biomasses in the two studied plots in year 2 (wheat).

	Plot 1		Plot 2	
	With Fertilization	Without Fertilization	With Fertilization	Without Fertilization
Total nucleic acid ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil)	7.54 ± 0.56 a	8.72 ± 0.30 a	21.60 ± 1.77 a	22.02 ± 3.29 a
Bacteria (copy number of 16S rDNA genes g^{-1} dry soil) ($\times 10^8$)	32.51 ± 1.02 b	34.68 ± 0.96 a	0.52 ± 0.41 a	0.51 ± 0.38 a
Fungi (copy number of 18S rDNA genes g^{-1} dry soil) ($\times 10^7$)	22.13 ± 4.32 a	26.78 ± 5.05 a	2.23 ± 0.88 a	2.68 ± 0.78 a
β -glucosidase activity (mU g^{-1} dry soil)	16.67 ± 0.38 a	14.51 ± 0.54 b	20.50 ± 0.53 a	18.81 ± 0.90 b
Arylamidase activity (mU g^{-1} dry soil)	2.86 ± 0.16 b	3.18 ± 0.18 a	4.77 ± 0.18 b	5.24 ± 0.26 a
N-acetyl-glucosaminidase activity (mU g^{-1} dry soil)	2.00 ± 0.08 b	2.53 ± 0.39 a	3.16 ± 0.12 a	3.18 ± 0.08 a

Letters indicate significant difference in crop succession with and without fertilization at $p < 0.05$ according to Tukey's test. The results are presented as the mean of three replicates ($n = 3$) $\pm$ the standard errors.

The three tested enzymes did not respond in a similar way to fertilization treatment (Table 2). For both plots, GLU activity was slightly higher in fertilized wheat compared to unfertilized wheat (from 16.67 ± 0.38 to 14.51 ± 0.54 in plot 1 and from 20.50 ± 0.53 to 18.81 ± 0.90 mU g^{-1} dry soil in plot 2). In contrast, ARYLN activity significantly decreased in wheat after fertilization treatment. NAG activity showed different variation patterns between the two plots; it was affected by fertilization treatment in plot 1 but no effect was shown in plot 2. Despite the presence of statistically significant differences in some cases, the fertilization treatment did not have a marked effect on the biological parameters of the two studied plots.

3.3. Effect of Crop Successions and Fertilizing Inputs on Soil Microbial Communities, Enzyme Activities and Mineral N Content

The effect of the two tested successions (winter pea–wheat and rapeseed–wheat) and fertilization treatments (with and without fertilization) on microbial abundances, soil enzyme activities and mineral N content was carried out by PCA under wheat crops in the two plots (Figure 6a and b).

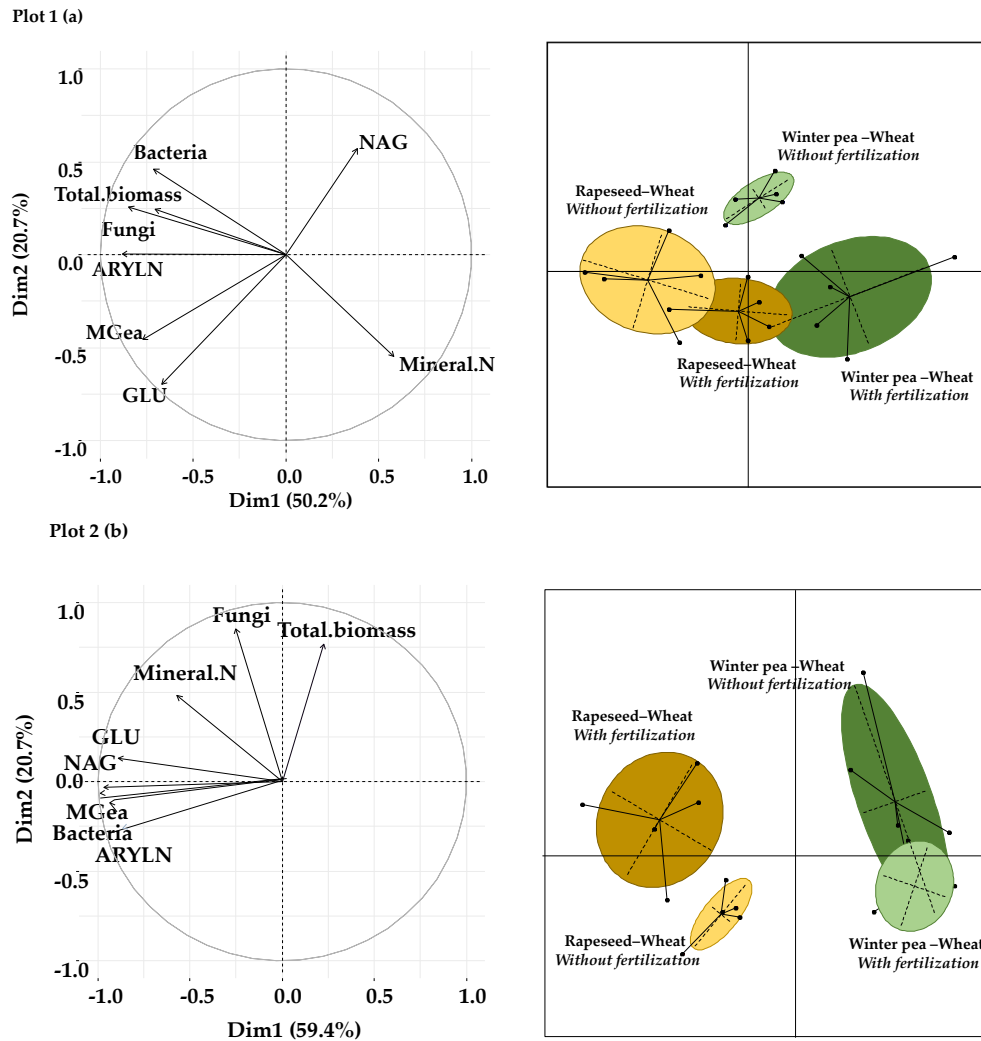


Figure 6. Principal component analysis of microbial abundance and enzyme activities and mineral N content in the two studied plots: (a) plot 1, (b) plot 2. GLU: β -D-glucosidase, NAG: N-acetyl- β -glucosaminidase, ARYLN: arylamidase, MGea: geometric means.

For plot 1, the first two axes in Figure 6a explain 71% of the total variability, as illustrated by the separation of samples into four distinct groups. The winter pea–wheat successions are separated from the rapeseed–wheat successions along the first axis of PCA based on microbial abundances and mineral N content. The second axis clearly separates the fertilized winter pea–wheat and rapeseed–wheat successions from the unfertilized winter pea–wheat and rapeseed–wheat successions.

Concerning plot 2, the first axis (PC1) and the second axis (PC2) of Figure 6b explain 80% of the total variability, as illustrated by the separation of samples into three distinct groups. The PC1 separates fertilized samples from unfertilized samples of the winter pea–wheat succession based on enzyme activities and bacterial abundance. These two clusters are discriminated from those of the rapeseed–wheat succession along the PC2, which indicates the effects of succession systems.

3.4. STICS Simulation of N Balance and Yields for Each Crop

Soil nitrate, mineral N content, leaching, gaseous N emissions and crop yields were simulated for the two plots (Table 3) using independent simulation [42] of the STICS soil crop model. For plot 1, the initial and final NO_3 content was significantly higher for winter pea and rapeseed crops compared to wheat. For plot 2, the initial and final NO_3 content varied greatly between crops.

For the two plots, the highest final NO₃ values were obtained under the winter pea crop. The prediction of soil mineral N content showed an increase of around 4% for plot 1 and 13% for plot 2 in succession with the pea crop. The simulations of N₂ and N₂O losses showed slightly higher gaseous N emissions under rapeseed and wheat for the two plots. N leaching was observed only in plot 2 in successions including the winter pea. Yields were significantly underestimated in the STICS model and gave a very poor prediction compared to the observed yields. The observed yields of wheat were slightly higher in plot 2 compared to plot 1. For each plot, the observed yields of wheat were, overall, equivalent, regardless of the previous crop (winter pea or rapeseed).

Table 3. STICS simulation of databases of the two plots for each crop.

	Plot 1				Plot 2			
	Winter Pea	Wheat	Rapeseed	Wheat	Winter Pea	Wheat	Rapeseed	Wheat
	2016–2017	2017–2018	2016–2017	2017–2018	2016–2017	2017–2018	2016–2017	2017–2018
Simulation period (month)	Nov–Jul	Oct–Jul	Sep–Aug	Oct–Jul	Oct–Aug	Oct–Aug	Aug–Jul	Oct–Aug
Rainfall (mm)	382	474	470	676	718	474	777	474
Initial soil NO ₃ (kg N ha ⁻¹)	245	90	295	102	113	128	147	90
Final soil NO ₃ (kg N ha ⁻¹)	140	118	136	111	134	127	110	117
N ₂ and N ₂ O losses (kg . ha ⁻¹)	1	18	8	20	0	16	4	18
N leached (kg N ha ⁻¹)	0	0	0	0	23	0	0	0
Yield grain simulation (t ha ⁻¹)	3.48	6.34	3.07	6.29	3.11	9.40	3.77	9.15
Yield grain observed (t ha ⁻¹)	6.00	9.50	4.00	9.20	3.50	12.50	3.87	12.00

4. Discussion

4.1. Effect of Crop Successions on Microbial Abundances and Enzyme Activities

Crop rotations or succession can directly or indirectly influence soil microbial communities and their activities [43]. In the present work, winter pea–wheat and rapeseed–wheat successions were evaluated and showed different variation patterns on the kinetics of soil microbial abundances and activities in the two plots considered. This variability was explained by several factors related to soil type ($p < 0.05$), soil chemical characteristics ($p < 0.05$) and sampling times ($p < 0.05$) along a growing period of wheat. In accordance with our findings, several authors have reported the significant effects of these factors as well as spatiotemporal heterogeneity of microbial communities in soil [44–47].

Crop rotations or successions have been well documented as a driving factor that influences soil microbial communities [48,49]. Soil fungal [50] and bacterial communities are influenced by crop sequence [48,51] and vary with different crops in a rotation sequence [52]. Our results achieved an agreed outcome in agricultural soils, namely the domination of bacteria in cultivated plots regardless of the crop rotation system [53,54]. This is due to the high sensitivity of fungi to soil disturbance, which leads to the destruction of hyphae and a reduction in the number of propagules in soils [55,56]. We expected a higher microbial abundance in the winter pea–wheat succession because several authors have shown that the presence of legumes in crop rotation contributes to the growth of microbial populations through their N-rich plant biomass. Adding legumes to a crop sequence has been shown to increase bulk soil C pools, which support a greater abundance of microbiota [57]. In our study, microbial abundances were unaffected by the crop species in plot 1, while, in plot 2, both bacteria and fungi were more abundant under the rapeseed–wheat succession, especially in summer. These findings may reflect the large differences in basal microbial communities and are directly related to the different management histories [58]. Adopting crop rotations to enhance microbial diversity may require the use of specific crop combinations that are expected to affect soil microbial diversity more than others due to plant-specific root exudates and C sources. Venter et al. [57] showed, for two distinct grain–legume rotations, that the crop rotations including rice–mung bean and maize–wheat increased microbial richness, while the pea–wheat rotation decreased microbial richness.

The differing growth of crops in terms of both rhizodeposition characteristics (e.g., the amount and composition) and the N and C requirement revealed in our conditions no specific change in the measured hydrolytic enzyme activities in plot 1. This lack of response could be linked to the availability

of the substrates and the nutrient-limiting conditions as perceived by microorganisms, which can be strongly impacted by other factors such as the temperature and moisture content of the soil [59–61]. We supposed that the influence of meteorology surpassed the influence of crops in plot 1. The enzyme activities were much higher in plot 2. This was surprising; the high clay constituent of our soil suggested a stabilization of the extracellular part of these enzymes as reported in the literature [62,63]. The significantly higher values found in the GMea of plot 2 in the rapeseed–wheat rotation could be due to the high bacterial and fungal biomasses ($r = 0.75$, $p < 0.05$). This finding is in accordance with several works that report strong correlations between microbial abundances and enzyme activities in soils [64,65]. For example, Chung et al. [66] reported that the NAG activity was mainly driven by the fungal community, which is in line with our results ($r = 0.76$, $p < 0.05$). The higher NAG activities found in winter pea–wheat rotation in the two plots may also be linked to the legacy of the winter pea crop, because it was reported that the structure of the Nod factor of rhizobia (symbiont of legumes) could act as an oligomer of NAG enzymes [67].

4.2. Soil N Content in the Two Succession Systems

Mineral N content was highest in winter pea–wheat compared to rapeseed–wheat succession in autumn, which is due to the mineralization of pea residues. The amount of N resulting from the mineralization of winter pea residues and its availability for the following crop depends on the amount of N in pea residues and the organic N proportion that is mineralized by soil microorganisms [68]. The C to N ratio of crop residues is considered a significant indicator to assess the potential of mineralization of crop residues [69,70]. Given their lower C to N ratio, the mineralization of aerial residues of the pea is faster than that of other crops. It is well known that the addition of legumes in crop rotations is likely to have positive impacts on the soil and N dynamic [71].

Most authors acknowledge that N derived from the roots can play a significant role in the N and soil dynamic [72]; only a few studies have considered either root N content or N rhizodeposition (mainly on pea) in cropping systems because of this being a challenge to assess [73–76]. Several factors can also be highly influential for the soil and N dynamic within crop rotations. For example, the proportion of N mineralized residues in a given environment and over a given period is influenced by soil temperature and humidity, whatever the species in the crop rotation [69,77]. For example, higher temperatures result in rapid mineralization of residues, and the mineral N can therefore be leached by heavy rains [78]. The combination of these factors could explain the lowest amount of mineral N content in winter. However, in our study, the mineral N measured at harvest of wheat crop was no different between the two previous crops, indicating that there had been efficient use of the available mineral N by wheat across the 60 cm soil profile. The higher N availability after a winter pea crop appeared to be significantly manifested beyond the wheat crop. In fact, the mineral N was, on average, equivalent to $92.66 \text{ kg ha}^{-1} \pm 0.20$ under barley as the previous crop of wheat in plot 1 (result not shown). The same type of result has been observed in rapeseed after pea crops, wheat after pea and chickpea after lentil [21,28,30,79].

4.3. The Fertilization Effect on Soil Microbial Communities and Enzyme Activities

In the literature, it has been reported that N fertilization affects microbial growth and activities, which directly alter soil organic carbon (SOC) turnover and subsequently lead to changes in C and N pool sizes [80,81]. Studies have reported large variations in the effects of N fertilization on microbial biomass. However, our results indicated no marked effects of N inputs on the microbial biomass determined by the quantification of the total extracted DNA from soils. N fertilization caused reductions of 15–35% in microbial biomass determined by the quantification of microbial biomass carbon [82–84]. However, a meta-analysis published by Geisseler and Scow [85] reported that N fertilization increased microbial biomass by 15% in agricultural soils. In the present study, N inputs decreased bacterial abundance only under wheat in plot 1 (Table 2). This result is in accordance with studies that conclude that bacterial abundance declines remarkably across N fertilizer inputs [86,87]. This reducing effect is

achieved through the changing of soil chemical properties like the pH and soil organic matter, which indirectly affect microbial communities [80,81,88]. Shen et al. [89] showed that soil pH has the same trend as bacterial abundance across N soil gradient content. Our results showed a positive correlation between bacterial abundance and soil pH ($r = 0.33$, $p < 0.05$)—a major driver in shaping soil bacterial communities [90]. Several studies showed that long-term mineral N fertilization induced a decrease or an increase in fungal abundance [91–93]. However, N fertilization did not affect fungal biomass in our study.

The effects of N fertilization on enzyme activities have been studied and generally show diverse variations in patterns and magnitude [85,94–99]. In this study, enzymes responded differently to N fertilization. The GLU activity increased in accordance with the consensus that is evident in the literature regarding the response of this enzyme to N fertilization. The N supply appears to sustain soil microorganisms, producing extracellular enzymes associated with hydrolytic C-acquisition [98,100,101]. A meta-analysis based on 8–26 agricultural sites revealed that N fertilization significantly increased GLU activity but had no significant effect on N-acquiring enzymes [85]. In our case, a decrease was observed for ARYLN activity in the two plots, while no effect for NAG activity under N inputs was observed for plot 2 and a decrease was observed for plot 1. For the NAG enzyme, studies have reported divergent variation patterns of this activity in response to N inputs. However, NAG activity was stimulated by 14% or suppressed by 24% as a result of N fertilization across different agricultural sites [102,103]. The response of NAG and ARYLN activities to N fertilization underlines the complex relationship between microbial N-acquiring extracellular enzyme activities and N availability [104]. Some authors explained the decrease in NAG and ARYLN activities by the inhibitor effect of the mineral N on enzyme production and activity [105,106]. Others have suggested that extracellular enzyme activities fluctuate frequently due to complex environmental conditions and microbial nutrient demand [107]. In our study, despite these significant differences, it is unlikely that these activities will lead to major changes in C and N fluxes.

4.4. The N Balance and Crop Yields

The multiparameter study concerning the introduction of the winter pea as the head crop of the rotation or succession significantly modified the soil mineral N content, and this modification persisted over time. Indeed, this significant effect was observed from the end of the first year (i.e., under the winter pea crop) and remained effective during the second year under the wheat crop. In accordance with the observed results, the simulation of the N balance by the STICS model showed that winter pea–wheat succession enriched the mineral N content of the soil compared to rapeseed–wheat succession. Moreover, our results highlighted an overestimation of mineral N for both plots. Simulations also showed that rapeseed is more efficient than the winter pea in reducing the nitrate content by plant uptake. In fact, due to its rapid growth and its greater rooting depth, rapeseed is more effective in reducing nitrate leaching [108]. Although legumes are less effective, they can be useful in reducing nitrate leaching if the plant cover is sufficiently dense and uniform—as demonstrated in the published literature [109].

Despite the relevant use of the STICS model for numerous cropping systems in the main French soils, the simulated yields of the winter pea, rapeseed and succeeding wheat crops showed biases of underestimation in comparison to observed yields. The underestimation of yield could be explained by the history of the crops on the plots. It therefore appears necessary to know the history (of at least two to three years) of each modeled plot in order to refine the simulation unit on a smaller scale. In addition, the absence of metadata that characterized some elements of the technical itinerary or the health status of the crop, as well as the absence of data that characterized the physical environment or the water and nitrogen conditions in the soil, led to the deletion of some data essential for simulation [110, 111].

Overall, the impact of the previous crop was positive and wheat yields were equivalent whatever the previous crop (winter pea or rapeseed). These wheat yields were more important in plot 2 than in plot 1 due to agro-pedoclimatic conditions. However, the wheat yield was considerably affected by a

drought in 2018. In contrast, the wheat yield for the year 2019 escaped drought, which explains the difference in yield between the two plots. Indeed, the plot systems were set up one year apart, which allowed environmental conditions that permitted pests and pathogens to proliferate and attack the crops in plot 1, as reported by the farmer.

5. Conclusions

In the context of the growing demand for protein, increasing rarefaction of non-renewable resources, the need to preserve the environment (water, air and soil quality) and economic instability, introducing the winter pea into rotations could be a possible way of responding to these challenges, particularly in the Normandy region. From an agronomic point of view, the objective of this study was to evaluate the effect of changing the crop rotation head (winter pea or rapeseed) on the biological state of the soil. The results revealed strong spatiotemporal variability in the responses of soil microbial communities and highlighted the importance of the pedoclimatic context in determining the abundance and activity of soil microbial communities. Indeed, the comparison of the two successions (winter pea–wheat and rapeseed–wheat) led to different results depending on the plot considered. Moreover, under the environmental conditions of our study, the crop succession that included the pea enriched the soil with mineral N compared to the succession with rapeseed. These results highlighted the positive effect of the winter pea on mineral N availability during pea cropping period and for subsequent crops (wheat and barley). These findings partially supported our research hypotheses. On the one hand, the availability of mineral N for the following crops was higher in the successions that included the winter pea. On the other hand, the abundance of microbial communities and levels of enzyme activities were equivalent (plot 1) or higher (plot 2) in the successions that included rapeseed.

Under the conditions of our study, wheat yields after a winter pea crop (92 q ha⁻¹ for plot 1 and 125 q ha⁻¹ for plot 2) were equivalent to those obtained after a rapeseed crop. Rapeseed, however, required a large amount of N fertilizer (96 kg N ha⁻¹ for plot 1 and 47 kg N ha⁻¹ for plot 2). The results confirmed the ability of a winter pea crop to reach its productivity potential without the use of N fertilizers. Moreover, if we consider the policy established for supporting protein crops in France (minimum level of 100 € ha⁻¹ of pea from 2010 and 111.5 € ha⁻¹ from 2017), a winter pea crop would improve the gross profit margin for the succession brought back to the year and economic sustainability. Indeed, this crop increases the nitrogen autonomy, which reduces or avoids the purchase of mineral fertilizers and reduces the farmers' working time related to fertilization interventions. All these factual observations lead us to conclude that the introduction of the winter pea crop in the rotation is systematically economically valuable.

Author Contributions: C.R.: experiment execution, data analysis, presentation of results and original draft manuscript preparation; W.R.-A.: contribution to the original draft manuscript preparation; review, and editing; M.B.: identification of the research topic, study design, STICS analysis and review; P.Y.B.: STICS analysis and manuscript review; I.T.-G. and K.L.: identification of the research topic, resources, review, editing and supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Normandy region and was supported by the Vivepois project.

Acknowledgments: The authors would like to thank François D'Hubert of the Chambre d'Agriculture of Normandy and the farmers of the association of Economic and Environmental Interest Group (EEIG).

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

References

1. Smith, M.; Busi, M.; Ball, P.; Van Der Meer, R. Factors influencing an organisation's ability to manage innovation: A structured literature review and conceptual model. *Int. J. Innov. Manag.* **2008**, *12*, 655–676, doi:10.1142/S1363919608002138.

2. Lin, Y.S. Fostering creativity through education—A conceptual framework of creative pedagogy. *Creat. Educ.* **2011**, *2*, 149, doi:10.4236/ce.2011.23021.
3. Paustian, M.; Theuvsen, L. Adoption of precision agriculture technologies by German crop farmers. *Precis. Agric.* **2017**, *18*, 701–716, doi:10.1007/s11119-016-9482-5.
4. Mills, J.; Reed, M.; Skaalsveen, K.; Ingram, J. The use of Twitter for knowledge exchange on sustainable soil management. *Soil. Use. Manag.* **2019**, *35*, 195–203, doi:10.1111/sum.12485.
5. Olesen, J.E.; Trnka, M.; Kersebaum, K.C.; Skjelvåg, A.O.; Seguin, B.; Peltonen-Sainio, P.; Rossi, F.; Kozyra, J.; Micale, F. Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *Eur. J. Agron.* **2011**, *34*, 96–112, doi:10.1016/j.eja.2010.11.003.
6. Renard, D.; Tilman, D. National food production stabilized by crop diversity. *Nature* **2019**, *571*, 257–260, doi:10.1038/s41586-019-1316-y.
7. Hauck, J.; Schleyer, C.; Winkler, K.J.; Maes, J. Shades of Greening: Reviewing the Impact of the new EU Agricultural Policy on Ecosystem Services. *Cases J.* **2014**, *1*, doi:10.2478/cass-2014-0006.
8. Hatfield-Dodds, S.; Schandl, H.; Newth, D.; Obersteiner, M.; Cai, Y.; Baynes, T.; West, J.; Havlik, P. Assessing global resource use and greenhouse emissions to 2050, with ambitious resource efficiency and climate mitigation policies. *J. Clean. Prod.* **2017**, *144*, 403–414, doi:10.1016/j.jclepro.2016.12.170.
9. Barbieri, C.; Sotomayor, S.; Aguilar, F.X. Perceived benefits of agricultural lands offering agritourism. *Tour. Plan. Dev.* **2019**, *16*, 43–60, doi:10.1080/21568316.2017.1398780.
10. Liu, X.; Herbert, S.J.; Hashemi, A.M.; Zhang, X.; Ding, G. Effects of agricultural management on soil organic matter and carbon transformation: A review. *Plant Soil Environ.* **2018**, *52*, 531, doi:10.17221/3544-PSE.
11. Reynolds, W.D.; Drury, C.F.; Yang, X.M.; Tan, C.S.; Yang, J.Y. Impacts of 48 years of consistent cropping, fertilization and land management on the physical quality of a clay loam soil. *Can. J. Soil. Sci.* **2014**, *94*, 403–419, doi:10.4141/cjss2013-097.
12. Tiemann, L.K.; Grandy, A.S.; Atkinson, E.E.; Marin-Spiotta, E.; McDaniel, M.D. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. *Ecol. Lett.* **2015**, *18*, 761–771, doi:10.1111/ele.12453.
13. Yang, T.; Siddique, K.H.M.; Liu, K. Cropping systems in agriculture and their impact on soil health: A review. *Glob. Ecol. Conserv.* **2020**, *23*, e01118, doi:10.1016/j.gecco.2020.e01118.
14. Wezel, A.; Casagrande, M.; Celette, F.; Vian, J.F.; Ferrer, A.; Peigné, J. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2014**, *34*, 1–20, doi:10.1007/s13593-013-0180-7.
15. Kelley, K.; Clark, B.; Brown, V.; Sitzia, J. Good practice in the conduct and reporting of survey research. *Int. J. Qual. Health. Care* **2003**, *15*, 261–266, doi:10.1093/intqhc/mzg031.
16. Stagnari, F.; Maggio, A.; Galieni, A.; Pisante, M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: An overview. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2017**, *4*, 2, doi:10.1186/s40538-016-0085-1.
17. Zahran, H.H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 968–989, doi:10.1128/MMBR.63.4.968-989.1999.
18. Regus, J.U.; Gano, K.A.; Hollowell, A.C.; Sofish, V.; Sachs, J.L. Lotus hosts delimit the mutualism–parasitism continuum of Bradyrhizobium. *J. Evol. Biol.* **2015**, *28*, 447–456, doi:10.1111/jeb.12579.
19. Goh, C.H.; Nicotra, A.B.; Mathesius, U. The presence of nodules on legume root systems can alter phenotypic plasticity in response to internal nitrogen independent of nitrogen fixation. *Plant. Cell. Environ.* **2016**, *39*, 883–896, doi:10.1111/pce.12672.
20. Voisin, A.S.; Salon, C.; Munier-Jolain, N.G.; Ney, B. Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Soil.* **2002**, *242*, 251–262, doi:10.1023/A:1016214223900.
21. Gan, Y.T.; Miller, P.R.; McConkey, B.G.; Zentner, R.P.; Liu, P.H.; McDonald, C.L. Optimum plant population density for chickpea and dry pea in a semiarid environment. *Can. J. Plant Sci.* **2003**, *83*, 1–9, doi:10.4141/P02-012.
22. Angus, J.F.; Kirkegaard, J.A.; Hunt, J.R.; Ryan, M.H.; Ohlander, L.; Peoples, M.B. Break crops and rotations for wheat. *Crop. Pasture. Sci.* **2015**, *66*, 523–552, doi:10.1071/CP14252.
23. Jensen, E.S.; Hauggaard-Nielsen, H. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant Soil.* **2003**, *252*, 177–186, doi:10.1023/A:1024189029226.
24. Crews, T.E.; Peoples, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2014**, *102*, 279–297, doi:10.1016/j.agee.2003.09.018.

25. Kumar, K.; Goh, K.M. Biological nitrogen fixation, accumulation of soil nitrogen and nitrogen balance for white clover (*Trifolium repens* L.) and field pea (*Pisum sativum* L.) grown for seed. *Field. Crops. Res.* **2000**, *68*, 49–59, doi:10.1016/S0378-4290(00)00109-X.
26. Cuttle, S.; Mark, S.; Gillian, G. *A Review of Leguminous Fertility-Building Crops, with Particular Reference to Nitrogen Fixation and Utilization*; Institute of Grassland & Environmental Research: Aberystwyth, UK, 2003.
27. Gollner, G.; Starz, W.; Friedel, J.K. Crop performance, biological N fixation and pre-crop effect of pea ideotypes in an organic farming system. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **2019**, *115*, 391–405, doi:10.1007/s10705-019-10021-4.
28. Gurr, G.M.; Lu, Z.; Zheng, X.; Xu, H.; Zhu, P.; Chen, G.; Yao, X.; Cheng, J.; Zhu, Z.; Catindig, J.L.; et al. Multi-country evidence that crop diversification promotes ecological intensification of agriculture. *Nat. Plants* **2016**, *2*, 1–4, doi:10.1038/nplants.2016.14.
29. Duchene, O.; Vian, J.F.; Celette, F. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2017**, *240*, 148–161, doi:10.1016/j.agee.2017.02.019.
30. Li, Z.; Song, Z.; Singh, B.P.; Wang, H. The impact of crop residue biochars on silicon and nutrient cycles in croplands. *Sci. Total Environ.* **2019**, *659*, 673–680, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.381.
31. Ellouze, W.; Esmaeili Taheri, A.; Bainard, L.D.; Yang, C.; Bazghaleh, N.; Navarro-Borrell, A.; Hanson, K.; Hamel, C. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. *BioMed. Res. Int.* **2014**, doi:10.1155/2014/531824.
32. Njeru, E.M.; Avio, L.; Sbrana, C.; Turrini, A.; Bocci, G.; Bàrberi, P.; Giovannetti, M. First evidence for a major cover crop effect on arbuscular mycorrhizal fungi and organic maize growth. *Agron. Sustain. Dev.* **2014**, *34*, 841–848, doi:10.1007/s13593-013-0197-y.
33. Robson, M.C.; Fowler, S.M.; Lampkin, N.H.; Leifert, C.; Leitch, M.; Robinson, D.; Watson, C.A.; Litterick, A.M. *The Agronomic and Economic Potential of Break Crops for Ley/Arable Rotations in Temperate Organic Agriculture*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2002; pp. 369–427, doi:10.1016/S0065-2113(02)77018-1.
34. Urbatzka, P.; Groß, R.; Haase, T.; Schüller, C.; Trautz, D.; Heß, J. Grain yield and quality characteristics of different genotypes of winter pea in comparison to spring pea for organic farming in pure and mixed stands. *Org. Agric.* **2011**, *1*, 187–202, doi:10.1007/s13165-011-0015-2.
35. Aschi, A.; Aubert, M.; Riah-Anglet, W.; Nélieu, S.; Dubois, C.; Akpa-Vinceslas, M.; Trinsoutrot-Gattin, I. Introduction of Faba bean in crop rotation: Impacts on soil chemical and biological characteristics. *Appl. Soil Ecol.* **2017**, *120*, 219–228, doi:10.1016/j.apsoil.2017.08.003.
36. Gangneux, C.; Akpa-Vinceslas, M.; Sauvage, H.; Desaire, S.; Houot, S.; Laval, K. Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon. *Soil Biol. Biochem.* **2011**, *43*, 431–437, doi:10.1016/j.soilbio.2010.11.012.
37. Borneman, J.; Hartin, R.J. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4356–4360, doi:10.1128/AEM.66.10.4356-4360.2000.
38. Marchesi, J.R.; Sato, T.; Weightman, A.J.; Martin, T.A.; Fry, J.C.; Hiom, S.J.; Wade, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 795–799, doi:10.1128/AEM.64.2.795-799.1998.
39. Muyzer, G.; Waal, E.C.; de Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 695–700.
40. García-Ruiz, R.; Ochoa, V.; Viñegla, B.; Hinojosa, M.B.; Peña-Santiago, R.; Liébanas, G.; Linares, J.C.; Carreira, J.A. Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive oil farming: Influence of seasonality and site features. *Appl. Soil Ecol.* **2009**, *41*, 305–314, doi:10.1016/j.apsoil.2008.12.004.
41. Brisson, N.; Gary, C.; Justes, E.; Roche, R.; Mary, B.; Ripoche, D.; Zimmer, D.; Sierra, J.; Bertuzzi, P.; Burger, P.; et al. An overview of the crop model stics. *Eur. J. Agron.* **2003**, *18*, 309–332, doi:10.1016/S1161-0301(02)00110-7.
42. Kollas, C.; Kersebaum, K.C.; Nendel, C.; Manevski, K.; Müller, C.; Palosuo, T.; Armas-Herrera, C.M.; Beaudoin, N.; Bindi, M.; Charfeddine, M.; et al. Crop rotation modelling—A European model intercomparison. *Eur. J. Agron.* **2015**, *70*, 98–111, doi:10.1016/j.eja.2015.06.007.

43. Machinet, G.E.; Bertrand, I.; Chabbert, B.; Recous, S. Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *Eur. J. Soil Sci.* **2009**, *60*, 176–185, doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01109.x.
44. Castellanos, T.; Dohrmann, A.B.; Imfeld, G.; Baumgarte, S.; Tebbe, C.C. Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. *Eur. J. Soil Biol.* **2009**, *45*, 383–393. doi:10.1016/j.ejsobi.2009.07.006.
45. Peiffer, J.A.; Spor, A.; Koren, O.; Jin, Z.; Tringe, S.G.; Dangl, J.L.; Buckler, E.S.; Ley, R.E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6548–6553. doi:10.1073/pnas.1302837110.
46. Maarastawi, S.A.; Frindte, K.; Geer, R.; Kröber, E.; Knief, C. Temporal dynamics and compartment specific rice straw degradation in bulk soil and the rhizosphere of maize. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *127*, 200–212, doi:10.1016/j.soilbio.2018.09.028.
47. Piotrowska-Długosz, A.; Lemanowicz, J.; Długosz, J. The spatial pattern and seasonal changes in the soil phosphorus content in relation to the phosphatase activity: A case study of Luvisols. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2020**, 1–15. doi:10.1080/03650340.2020.1759798.
48. Xuan, D.T.; Guong, V.T.; Rosling, A.; Alström, S.; Chai, B.; Högborg, N. Different crop rotation systems as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. *Biol. Fertil. Soils* **2012**, *48*, 217–225, doi:10.1007/s00374-011-0618-5.
49. Valetti, L.; Iriarte, L.; Fabra, A. Effect of previous cropping of rapeseed (*Brassica napus* L.) on soybean (*Glycine max*) root mycorrhization, nodulation, and plant growth. *Eur. J. Soil Biol.* **2016**, *76*, 103–106, doi:10.1016/j.ejsobi.2016.08.005.
50. Zhang, B.; Li, Y.; Ren, T.; Tian, Z.; Wang, G.; He, X.; Tian, C. Short-term effect of tillage and crop rotation on microbial community structure and enzyme activities of a clay loam soil. *Biol. Fertil. Soils* **2014**, *50*, 1077–1085, doi:10.1007/s00374-014-0929-4.
51. Larkin, R.P.; Honeycutt, C.W. Effects of Different 3-Year Cropping Systems on Soil Microbial Communities and Rhizoctonia Diseases of Potato. *Phytopathology* **2006**, *96*, 68–79, doi:10.1094/PHYTO-96-0068.
52. Vukicevich, E.; Lowery, T.; Bowen, P.; Úrbez-Torres, J.R.; Hart, M. Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 48, doi:10.1007/s13593-016-0385-7.
53. Fierer, N.; Craine, J.M.; McLauchlan, K.; Schimel, J.P. Litter Quality and the Temperature Sensitivity of Decomposition. *J. Ecol.* **2005**, *86*, 320–326, doi:10.1890/04-1254.
54. Janssen, P.H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1719–1728, doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006.
55. Janssen, P.H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1719–1728, doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006.
56. Cookson, W.R.; O'Donnell, A.J.; Grant, C.D.; Grierson, P.F.; Murphy, D.V. Impact of Ecosystem Management on Microbial Community Level Physiological Profiles of Postmining Forest Rehabilitation. *Microb. Ecol.* **2008**, *55*, 321–332, doi:10.1007/s00248-007-9278-2.
57. Helgason, B.L.; Walley, F.L.; Germida, J.J. Fungal and Bacterial Abundance in Long-Term No-Till and Intensive-Till Soils of the Northern Great Plains. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2009**, *73*, 120–127, doi:10.2136/sssaj2007.0392.
58. Venter, Z.S.; Jacobs, K.; Hawkins, H.-J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. *Pedobiologia* **2016**, *59*, 215–223, doi:10.1016/j.pedobi.2016.04.001.
59. Pereira, J. de M.; Baretta, D.; Bini, D.; Vasconcellos, R.L. de F.; Cardoso, E.J.B.N. Relationships between microbial activity and soil physical and chemical properties in native and reforested *Araucaria angustifolia* forests in the state of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Cienc. Solo* **2013**, *37*, 572–586, doi:10.1590/S0100-06832013000300003.
60. Krajewska, B.; Ureases, I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *59*, 9–21, doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.003.
61. Lebrun, J.D.; Trinsoutrot-Gattin, I.; Vincelas-Akpa, M.; Bailleul, C.; Brault, A.; Mougin, C.; Laval, K. Assessing impacts of copper on soil enzyme activities in regard to their natural spatiotemporal variation under long-term different land uses. *Soil Biol. Biochem.* **2012**, *49*, 150–156, doi:10.1016/j.soilbio.2012.02.027.

62. Mangalassery, S.; Mooney, S.J.; Sparkes, D.L.; Fraser, W.T.; Sjögersten, S. Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *Eur. J. Soil Biol.* **2015**, *68*, 9–17, doi:10.1016/j.ejsobi.2015.03.001.
63. Knight, T.R.; Dick, R.P. Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biol. Biochem.* **2004**, *36*, 2089–2096. doi:10.1016/j.soilbio.2004.06.007.
64. Allison, S.D. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: Implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* **2006**, *81*, 361–373, doi:10.1007/s10533-006-9046-2.
65. Acosta-Martínez, V.; Zobeck, T.M.; Allen, V. Soil Microbial, Chemical and Physical Properties in Continuous Cotton and Integrated Crop–Livestock Systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2004**, *68*, 1875–1884, doi:10.2136/sssaj2004.1875.
66. Acosta-Martínez, V.; Acosta-Mercado, D.; Sotomayor-Ramírez, D.; Cruz-Rodríguez, L. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Appl Soil Ecol.* **2008**, *38*, 249–260, doi:10.1016/j.apsoil.2007.10.012.
67. Chung, H.; Zak, D.R.; Reich, P.B.; Ellsworth, D.S. Plant species richness, elevated CO₂, and atmospheric nitrogen deposition alter soil microbial community composition and function. *Glob. Change Biol. Bioenergy* **2007**, *13*, 980–989. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01313.x.
68. Jeon, K.W.; Jarvik, J. *Mechanical Engineering of the Cytoskeleton in Developmental Biology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1994.
69. Guinet, M.; Nicolardot, B.; Durey, V.; Revellin, C.; Lombard, F.; Pimet, E.; Bizouard, F.; Voisin, A.S. Fixation symbiotique de l'azote et effet précédent : Toutes les légumineuses à graines se valent-elles ? *Innov. Agron.* **2019**, *74*, 55–68.
70. Nicolardot, B.; Recous, S.; Mary, B. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C:N ratio of the residues. *Plant Soil* **2001**, *228*, 83–103, doi:10.1023/A:1004813801728.
71. Justes, E.; Mary, B.; Nicolardot, B. Quantifying and modelling C and N mineralization kinetics of catch crop residues in soil: Parameterization of the residue decomposition module of STICS model for mature and non mature residues. *Plant Soil* **2009**, *325*, 171–185, doi:10.1007/s11104-009-9966-4.
72. Tiemann, L.K.; Billings, S.A. Indirect effects of nitrogen amendments on organic substrate quality increase enzymatic activity driving decomposition in a Mesic grassland. *Ecosystems* **2011**, *14*, 234–247. <https://doi.org/10.1007/s10021-010-9406-6>
73. Peoples, M.B.; Brockwell, J.; Herridge, D.F.; Rochester, I.J.; Alves, B.J.R.; Urquiaga, S.; Boddey, R.M.; Dakora, F.D.; Bhattarai, S.; Maskey, S.L.; et al. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* **2009**, *48*, 1–17. doi:10.1007/BF03179980.
74. Mayer, J.; Buegger, F.; Jensen, E.S.; Schlöter, M.; Heß, J. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a ¹⁵N in situ stem labelling method. *Soil. Biol. Biochem.* **2003**, *35*, 21–28, doi:10.1016/S0038-0717(02)00212-2.
75. Wichern, F.; Mayer, J.; Joergensen, R.G.; Müller, T. Release of C and N from roots of peas and oats and their availability to soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **2007**, *39*, 2829–2839, doi:10.1016/j.soilbio.2007.06.006.
76. Wichern, F.; Eberhardt, E.; Mayer, J.; Joergensen, R.G.; Müller, T. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 30–48, doi:10.1016/j.soilbio.2007.08.010.
77. Jones, D.L.; Nguyen, C.; Finlay, R.D. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil–root interface. *Plant Soil* **2009**, *321*, 5–33, doi:10.1007/s11104-009-9925-0.
78. Kraljevic, D.; Sumanovac, L.; Plascak, I. Wheat and barley yield affected by the rotation of oilseed rape as the preceding crop. *Cereal. Res. Commun.* **2008**, *36*, 1511–1514.
79. Chen, B.; Liu, E.; Tian, Q.; Yan, C.; Zhang, Y. Soil nitrogen dynamics and crop residues. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2014**, *34*, 429–442.
80. Yang, L.; Han, R.; Sun, Y. Effects of Exogenous Nitric Oxide on Wheat Exposed to Enhanced Ultraviolet-B Radiation. *Am. J. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1285, doi:10.4236/ajps.2013.46159.
81. Yuan, S.; Schuster, A.; Tang, C.; Yu, T.; Ortogero, N.; Bao, J.; Zheng, H.; Yan, W. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development* **2016**, *143*, 635–647, doi:10.1242/dev.131755.
82. Guo, Z.; Han, J.; Li, J.; Xu, Y.; Wang, X. Effects of long-term fertilization on soil organic carbon mineralization and microbial community structure. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211163, doi:10.1371/journal.pone.0211163.

83. Treseder, K.K. Nitrogen additions and microbial biomass: A meta-analysis of ecosystem studies. *Ecol. Lett.* **2008**, *11*, 1111–1120, doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01230.x.
84. Liu, L.; Greaver, T.L. A global perspective on belowground carbon dynamics under nitrogen enrichment. *Ecol. Lett.* **2010**, *13*, 819–828, doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01482.x.
85. Ramirez, K.S.; Craine, J.M.; Fierer, N. Nitrogen fertilization inhibits soil microbial respiration regardless of the form of nitrogen applied. *Soil Biol. Biochem.* **2010**, *42*, 2336–2338. doi:10.1016/j.soilbio.2010.08.032.
86. Geisseler, D.; Scow, K.M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms: A review. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *75*, 54–63, doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.023.
87. Zhou, J.; Guan, D.; Zhou, B.; Zhao, B.; Ma, M.; Qin, J.; Jiang, X.; Chen, S.; Cao, F.; Shen, D.; et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China. *Soil Biol. Biochem.* **2015**, *90*, 42–51, doi:10.1016/j.soilbio.2015.07.005.
88. Zhou, J.; Jiang, X.; Wei, D.; Zhao, B.; Ma, M.; Chen, S.; Cao, F.; Shen, D.; Guan, D.; Li, J. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in black soils for two crop seasons in China. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3267, doi:10.1038/s41598-017-03539-6.
89. Carrara, J.E.; Walter, C.A.; Hawkins, J.S.; Peterjohn, W.T.; Averill, C.; Brzostek, E.R. Interactions among plants, bacteria, and fungi reduce extracellular enzyme activities under long-term N fertilization. *Glob. Chang. Biol. Bioenergy* **2018**, *24*, 2721–2734, doi:10.1111/gcb.14081.
90. Shen, C.; Xiong, J.; Zhang, H.; Feng, Y.; Lin, X.; Li, X.; Liang, W.; Chu, H. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *57*, 204–211, doi:10.1016/j.soilbio.2012.07.013.
91. Ochoa-Hueso, R.; Collins, S.L.; Delgado-Baquerizo, M.; Hamonts, K.; Pockman, W.T.; Sinsabaugh, R.L.; Smith, M.D.; Knapp, A.K.; Power, S.A. Drought consistently alters the composition of soil fungal and bacterial communities in grasslands from two continents. *Glob. Chang. Biol. Bioenergy* **2018**, *24*, 2818–2827. doi:10.1111/gcb.14113.
92. Johnson, N.C.; Wilson, G.W.T.; Wilson, J.A.; Miller, R.M.; Bowker, M.A. Mycorrhizal phenotypes and the Law of the Minimum. *New Phytol.* **2015**, *205*, 1473–1484. doi:10.1111/nph.13172.
93. Zhou, J.; Jiang, X.; Zhou, B.; Zhao, B.; Ma, M.; Guan, D.; Li, J.; Chen, S.; Cao, F.; Shen, D.; et al. Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China. *Soil Biol. Biochem.* **2016**, *95*, 135–143. doi:10.1016/j.soilbio.2015.12.012.
94. Ye, T.; Li, Y.; Zhang, J.; Hou, W.; Zhou, W.; Lu, J.; Xing, Y.; Li, X. Nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization affects the flowering time of rice (*Oryza sativa* L.). *Glob. Ecol. Conserv.* **2019**, *20*, e00753. doi:10.1016/j.gecco.2019.e00753.
95. Burns, R.G.; DeForest, J.L.; Marxsen, J.; Sinsabaugh, R.L.; Stromberger, M.E.; Wallenstein, M.D.; Weintraub, M.N.; Zoppini, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *58*, 216–234, doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.009.
96. Henry, H.A.L. Reprint of “Soil extracellular enzyme dynamics in a changing climate”. Special Issue: Interactions of soil minerals with organic Components and Microorganisms VII and Enzymes in the Environment IV *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *56*, 53–59, doi:10.1016/j.soilbio.2012.10.022.
97. Giacometti, C.; Cavani, L.; Baldoni, G.; Ciavatta, C.; Marzadori, C.; Kandeler, E. Microplate-scale fluorometric soil enzyme assays as tools to assess soil quality in a long-term agricultural field experiment. *Appl Soil Ecol.* **2014**, *75*, 80–85, doi:10.1016/j.apsoil.2013.10.009.
98. Zhang, X.; Dong, W.; Dai, X.; Schaeffer, S.; Yang, F.; Radosevich, M.; Xu, L.; Liu, X.; Sun, X. Responses of absolute and specific soil enzyme activities to long term additions of organic and mineral fertilizer. *Sci. Total Environ.* **2015**, *536*, 59–67, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.043.
99. Jian, S.; Li, J.; Chen, J.; Wang, G.; Mayes, M.A.; Dzantor, K.E.; Hui, D.; Luo, Y. Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* **2016**, *101*, 32–43, doi:10.1016/j.soilbio.2016.07.003.
100. Holík, L.; Hlisenkovský, L.; Honzík, R.; Trögl, J.; Burdová, H.; Popelka, J. Soil microbial communities and enzyme activities after long-term application of inorganic and organic fertilizers at different depths of the soil profile. *Sustainability* **2019**, *11*, 3251, doi:10.3390/su11123251.
101. Tiemann, L.K.; Billings, S.A. Indirect Effects of Nitrogen Amendments on Organic Substrate Quality Increase Enzymatic Activity Driving Decomposition in a Mesic Grassland. *Ecosystems* **2011**, *14*, 234–247, doi:10.1007/s10021-010-9406-6.

102. Chen, Y.; Liu, J.; Liu, S. Effect of long-term mineral fertilizer application on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Plant Soil Environ.* **2018**, *64*, 571–577, doi:10.17221/658/2018-PSE.
103. Saiya-Cork, K.R.; Sinsabaugh, R.L.; Zak, D.R. The effects of long-term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **2002**, *34*, 1309–1315, doi:10.1016/S0038-0717(02)00074-3.
104. Billings, S.A.; Ziegler, S.E. Altered patterns of soil carbon substrate usage and heterotrophic respiration in a pine forest with elevated CO₂ and N fertilization. *Glob. Chang. Biol. Bioenergy* **2008**, *14*, 1025–1036. doi:10.1111/j.1365-2486.2008.01562.x.
105. Sinsabaugh, R.L.; Lauber, C.L.; Weintraub, M.N.; Ahmed, B.; Allison, S.D.; Crenshaw, C.; Contosta, A.R.; Cusack, D.; Frey, S.; Gallo, M.E.; et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol. Lett.* **2008**, *11*, 1252–1264, doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x.
106. Kader, M.A.; Yeasmin, S.; Solaiman, Z.M.; De Neve, S.; Sleutel, S. Response of hydrolytic enzyme activities and nitrogen mineralization to fertilizer and organic matter application in subtropical paddy soils. *Eur. J. Soil Biol.* **2017**, *80*, 27–34, doi:10.1016/j.ejsobi.2017.03.004.
107. Islam, M.O.; Bacchetti, T.; Ferretti, G. Alterations of Antioxidant Enzymes and Biomarkers of Nitro-oxidative Stress in Tissues of Bladder Cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, doi:10.1155/2019/2730896.
108. Paz-Ferreiro, J.; Trasar-Cepeda, C.; del Carmen Leirós, M.; C.; Seoane, S.; Gil-Sotres, F. Intra-annual variation in biochemical properties and the biochemical equilibrium of different grassland soils under contrasting management and climate. *Biol. Fertil. Soils* **2011**, *47*, 633–645, doi:10.1007/s00374-011-0570-4.
109. Vamerli, T.; Bona, S.; Mosca, G.; Sambo, P. Is the Root System the Key to Higher Nitrogen Uptake in Rapeseed? In *The Supporting Roots of Trees and Woody Plants: Form, Function and Physiology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 397–404, doi:10.1007/978-94-017-3469-1_39.
110. Justes, E.; Beaudoin, N.; Bertuzzi, P.; Charles, R.; Constantin, J.; Durr, C.; Hermon, C.; Joannon, A.; Le Bas, C.; Mary, B.; et al. Réduire les fuites de nitrate au moyen de cultures intermédiaires : Conséquences sur les bilans d'eau et d'azote, autres services écosystémiques (Report). In *Colloq. Restit. l'étude "Cultures Intermédiaires"*; 2012. *Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)*, Toulouse, France. <http://oatao.univ-toulouse.fr/16383>
111. Launay, M. *Modélisation du Fonctionnement des Agrosystèmes et des Pathosystèmes Dans un Contexte de Changement Climatique (Habilitation à Diriger des Recherches)*; École doctorale 410 Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles (SIRENa), Université de Lorraine: Grand Est, France 2019.

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



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre III. Résultats

Article 2

Titre : Quantification et analyse des exsudats racinaires de pois, de blé et de colza : mise au point d'une méthodologie de collecte des exsudats racinaires

Article 2. Quantification et analyse des exsudats racinaires de pois, de blé et de colza : mise au point d'une méthodologie de collecte des exsudats racinaires

En preparation

Cyrine Rezgui^{a,b*}, Wassila Riah-Anglet^{a,b}, Marie Benoit^c, Karine Laval^{a,b}, Isabelle Trinsoutrot-Gattin^{a,b}

^a UniLaSalle - Campus Rouen, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, F-76134 Mont-Saint Aignan, France

^b Normandy University, Research Federation Normandie Végétal FED 4277, France.

^c ISARA, Higher education institution, 69007 Lyon, France.

***Corresponding author:** E-mail address: Wassila.RIAH-ANGLET@unilasalle.fr ; phone: +33 2 32 82 91 98; fax: +33 2 35 05 27 40.

Résumé

Les méthodologies permettant de suivre l'exsudation racinaire se font généralement en conditions artificielles. Elles peuvent varier énormément en termes d'échelle et de complexité et en fonction du métabolite recherché, de la plante concernée et de l'équipement utilisé.

L'objectif de ce travail est de caractériser les exsudats racinaires de trois espèces végétales (pois, blé et colza) et d'étudier l'impact de ces exsudats racinaires sur les communautés microbiennes du sol. Les deux dispositifs expérimentaux *split root* et *Rhizom* ont été testés.

Pour le dispositif en *split root*, les résultats de l'analyse quantitative et qualitative des exsudats, après la remise en suspension des solutions de sols lyophilisées, n'ont pas permis la détection et l'identification de composés d'exsudation dans les lyophilisats, en raison des concentrations trop faibles des composés exsudés. En revanche, l'analyse des échantillons des exsudats racinaires issus de la collecte à partir du dispositif en *Rhizom*, après remise en suspension dans le méthanol montrent que les profils chromatographiques comparant la composition des solutions de sol issues de modalités avec et sans plantes sont similaires. Aussi l'analyse des solutions de sol contenant les exsudats racinaires ne révèle aucune différence entre les profils chromatographiques des échantillons de pois, de blé ou de colza. Ces résultats montrent une forte interférence de la matière organique du sol dans l'analyse des exsudats racinaires.

Ces résultats ont permis de choisir une autre approche afin de faciliter la collecte et la caractérisation des exsudats racinaires.

Introduction

Les plantes libèrent en permanence différents composés dans la rhizosphère. Ce processus de sécrétion est connu sous le nom d'exsudation. Les exsudats racinaires sont impliqués dans de nombreuses interactions au niveau de la rhizosphère (Haichar et al., 2014), contribuant à la circulation du carbone et de l'azote sécrétés par les racines et prélevés par les microorganismes du sol (Jones et al., 2009). La littérature montre qu'environ 11 % du carbone net fixé ou 27 % du carbone racinaire est exsudé dans la rhizosphère, bien que ce pourcentage varie selon l'espèce, l'âge ou l'état nutritionnel des plantes (Bais et al., 2006 ; Jones et al., 2009 ; Nakayama et Tateno, 2018). Les exsudats racinaires représentent un ensemble de composés, y compris des métabolites primaires et secondaires (Vives-Perris et al., 2020). Les métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les glucosinolates, les auxines, etc. sont sécrétés en plus grande quantité que les métabolites primaires, tels que les glucides, les acides aminés et les acides organiques (Badri et Vivanco, 2009). Dans plusieurs travaux, ces métabolites ont été identifiés et quantifiés pour différentes espèces de plantes, notamment l'arabidopsis, le soja, le riz ou le haricot (Strehmel et al., 2014 ; Tawaraya et al., 2014a ; Tawaraya et al., 2014b). L'analyse des exsudats racinaires repose sur l'identification et la quantification des métabolites sécrétés par outils chromatographiques et notamment la Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (GC-MS) et Chromatographie en phase Liquide-Spectrométrie de Masse (LC-MS). Si les techniques d'analyse des exsudats racinaires sont généralement communes, les méthodologies de leur collecte diffèrent largement entre les études (Oburger et al., 2014).

Il existe une diversité de méthodes qui permettent la collecte des exsudats racinaires, elles présentent toutes des avantages et des limites. Parmi ces méthodes, les systèmes hydroponiques sont pratiques pour la collecte des exsudats racinaires car ils évitent les dégâts mécaniques subis par les racines lors de leur extraction des substrats solides (Vranova et al., 2013). Les systèmes hydroponiques ont été utilisés avec succès pour mesurer certains exsudats racinaires (Yokosho

et al., 2011 ; Luo et al., 2017), mais semblent peu adaptés lorsque les plantes atteignent le stade de maturité. En effet, selon certains auteurs à ce stade de croissance, la contamination par les microorganismes est inévitable pouvant ainsi modifier la composition et la quantité des exsudats collectés (Kuijken et al., 2015).

Des méthodes combinant la croissance dans un substrat (par exemple, du sol, du sable, de la vermiculite et des combinaisons de ceux-ci) avec la culture hydroponique ont été étudiées. Dans ces méthodes, les plantes sont cultivées dans un substrat et pour recueillir les exsudats, les plantes sont retirées de leur substrat, rincées et placées dans une solution de collecte stérile. Ces méthodes suivent par la suite les mêmes principes que les systèmes hydroponiques (Aulakh et al., 2001 ; Li et al., 2014). Ces techniques permettent un développement d'une architecture racinaire plus proche des conditions naturelles, pouvant limiter les biais dans la composition des exsudats racinaires (Oburger et al., 2013). Cependant, le retrait des plantes du substrat de croissance peut entraîner des dommages importants aux fines structures racinaires, par exemple les poils des racines. En effet, le changement rapide à partir d'un substrat à une solution de collecte, peut modifier à la fois le taux et la composition de l'exsudation.

Il existe des méthodes combinées de collecte d'exsudats *in situ* qui impliquent la croissance d'une plante dans un substrat (par exemple, du sol ou de la vermiculite) avec la capacité de collecter les exsudats de manière non destructive en préservant la croissance des plantes (Dessureault-Rompré et al., 2006 ; Schulz et Vetterlein, 2007 ; Oburger et al., 2013 ; Weidenhamer et al., 2014). Ces systèmes permettent d'observer l'architecture racinaire et de suivre en cinétique l'exsudation prélevée par micro-aspiration, il s'agit notamment des dispositifs rhizomes, rhizotrons ou encore des rhizoboxes (Dessureault-Rompré et al., 2006 ; Weidenhamer et al., 2014). Lorsque la collecte des exsudats racinaires *in situ* est réalisée en sol, il est difficile d'estimer l'ampleur de l'action des microorganismes du sol qui peuvent modifier les composés exsudés. Dans l'ensemble les dispositifs de collecte d'exsudats *in situ*

sont complexes et coûteux, ce qui rend difficile leur application à des échantillons de grande taille.

Cette analyse de la littérature montre que les méthodes de collecte des exsudats racinaires varient en fonction de plusieurs paramètres en lien avec la plante mais aussi le dispositif utilisé. Malgré de nombreux progrès dans le développement de nouvelles méthodes, il n'existe pas de mode opératoire idéal pour mesurer les composés exsudés par les racines des plantes. Une partie de mon travail de thèse a consisté à mettre en place un dispositif expérimental permettant la collecte et la caractérisation des exsudats racinaires de trois espèces végétales (pois, blé et colza) et d'évaluer l'effet de ces exsudats racinaires sur les communautés microbiennes du sol. Ce travail s'est déroulé en 2 étapes, la première étape a consisté dans la réalisation d'une synthèse des métabolites primaires et secondaires identifiés dans les exsudats racinaires du pois, du blé et du colza, en s'appuyant sur la littérature. La seconde étape a impliqué la mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées, afin de mener des essais de mise au point d'une méthodologie permettant la collecte des exsudats racinaires des trois espèces végétales et l'évaluation de l'effet de ces exsudats sur les communautés microbiennes des sols.

1. Synthèse des composés sécrétés dans les exsudats racinaires du pois, du blé et du colza

L'identification de métabolites sécrétés par le système racinaire des plantes à partir d'analyses du métabolome réalisées par spectrométrie de masse, est un véritable défi. Le processus qui mène à la caractérisation d'un métabolite est long, laborieux et incertain (Kind et Fiehn, 2006 ; Werner et al., 2008). Les végétaux secrètent *via* leur système racinaire une diversité de substances naturelles, dont la structure chimique est parfois très complexe. Afendi et al. (2012) estiment à environ un million le nombre de métabolites d'origine végétale, dont, près de 200 000 composés sont actuellement répertoriés par la base de données DNP (Dictionary of Natural Products). Ces métabolites sont représentés par un ensemble d'ions, d'enzymes, de mucilages, d'oxygène libre et par divers composés contenant des métabolites

primaires et secondaires. Les composés exsudés par les racines sont principalement des métabolites secondaires qui représentent plus de 200 000 molécules décrites dans la littérature (Dixon, 2001). Les métabolites primaires existent dans toutes les cellules végétales capables de se diviser, ils sont associés aux fonctions vitales pour la cellule. Les métabolites primaires sont des composés de faible poids moléculaire, communs à toutes les plantes. Il en existe quelques centaines telles les acides aminés, les acides nucléiques, les sucres ou les acides organiques. Les métabolites primaires ont une fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, source d'énergie). En revanche, les métabolites secondaires ne jouent pas un rôle fondamental pour les plantes, mais sont impliqués dans l'adaptation des plantes à leur environnement, notamment dans les interactions biotiques (Akula et Ravishankarv, 2011 ; Shanker et Shanker, 2016). Une grande variété de métabolites secondaires est synthétisée par les plantes supérieures à partir des métabolites primaires (par exemple carbohydrates, lipides et acide aminés) et sont le résultat d'une co-évolution entre les plantes et leur biotope. Les métabolites secondaires n'ont pas de rôle visible dans le métabolisme ; ils participent surtout aux mécanismes de défense des plantes. Ils varient quantitativement et qualitativement durant le cycle de développement de la plante. Leur localisation est aussi très variable selon les espèces. Les métabolites secondaires des plantes se répartissent en 3 groupes chimiques : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques. Parmi eux, les polyphénols constituent une vaste diversité de composés bioactifs (phénylpropanoïdes, lignanes, stilbènes, flavonoïdes, anthraquinones) impliqués dans de nombreux processus d'interactions biotiques depuis la symbiose jusqu'à la résistance aux maladies (Cheynier et al., 2013). Les polyphénols ont diverses fonctions dans les plantes mais tous ont pour caractéristiques communes de posséder des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes plus ou moins marquées du fait de leur fonction phénol. Il existe des métabolites communs entre les espèces végétales (Tableau 1), mais aussi des métabolites qui

les différencient. Par exemple, les phytosidérophores sont des molécules sécrétées par les racines de plante de la famille des *Poaceae* (graminées) en situation de carence en fer. Ces molécules permettent l'assimilation du fer sous forme de complexes fer-phytosidérophore ou ferrisidérophores (Ishimaru et al., 2006). Les métabolites secondaires spécifiques appelés isoflavonoïdes sont les plus couramment sécrétés au sein de la famille des *Fabaceae* (Journet et al., 2001). Elles sont impliquées dans la signalisation symbiotique et dans les réactions de défense (Barton et Meth-Cohn, 1999). Les glucosinolates présentent des exemples classiques de composés végétaux affectant les interactions insectes-plantes. On les trouve principalement dans la famille des *Brassicaceae* qui comprend plusieurs cultures importantes (Halkier et Gershenzon, 2006). Au moins 120 glucosinolates différents ont été identifiés (Hopkins et al., 2009).

2. Sélection de la méthodologie de collecte des exsudats racinaires

L'étude bibliographique menée a permis d'identifier un panel de dispositifs expérimentaux qui permettent de suivre l'exsudation racinaire, il s'agit notamment des dispositifs en double pot (Payraudeau., 2014), *Continuous Root Exudate Trapping System* (Tang et Putnam, 1986), la technique des plantes à traire (PAT) (Gontier et al., 1999), le *cotton wick*, le *split root* (Mahieu et al., 2007) et le dispositif *Rhizom* (Eisenhauer et al., 2017). Les deux dispositifs *split root* et *Rhizom* ont été choisis car ils permettent d'une part de collecter et quantifier les exsudats racinaires et d'autre part d'évaluer leurs effets sur les communautés microbiennes du sol.

Tableau 1. Synthèse des différents métabolites sécrétés par le pois, le colza et le blé

Espèces	Métabolites	Type d'exsudats	Références
Pois	Primaires	Sucres : arabinose, galactose, acide galacturonique, fructose, acide glucuronique, mannose, rhamnose, xylose...	Knee et al., 2001
		Acides aminés : serine, proline, glycine, valine, metionine, leucine, lysine, arginine...	Wen et al., 2007
		Carbohydrates	Konstantinovna et al., 2020
			Wen et al., 2007
	Secondaires	Flavonoides : naringenine et hesperetine	Novák et al., 2004
		Strigolactone : Peagol, peagoldione, orobanchol, acétate d'orobanchyle et acétate de fabacyle.	Evidente et al., 2009
			Foo and Davies, 2011
		Polyphénols : les peapolyphénols	Evidente et al., 2009
Blé	Primaires	Acides aminés : Alanine, Glutamate, Sérine, Valine, Glycine, Acide aspartique, Leucine, Lysine, Thréonine, Isoleucine, Proline Phénylalanine, Tyrosine, Histidine, Methionine, Arginine, Glutamine, Tryptophane...	Philipps et al., 2004
			Warren, 2015
		Acides organiques : acide oxalique, acide malique, acide succinique...	Christiansen-Weniger, 1992
			Neumann and Römheld, 1999
			Wu et al., 2001
	Secondaires	Sucres simples : maltose, galactose, glucose, arabinose, fructose, xylose, ribose, rhamnose...	Vancura, 1946
		Phytosidérophores	Oburger et al., 2014
			Warren, 2015
		Composés phénoliques : acide P-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide syringique, acide Cis-coumarique, acide trans-coumarique	Wu et al., 2001
Colza	Primaires	Acides aminés : glycine, sérine, alanine, acide glutamique, arginine, glutamine, tyrosine, lysine, proline...	Svenningsson et al., 1990
			Lesuffleur et al., 2007
		Acides organiques : acide succinique, acide malique, acide fumarique	Hoffland et al., 1992
			Zhang et al., 1997
		Sucres simples : glucose, saccharose, fructose, m-inositol	Häggquist et al., 1984
	Secondaires		Svenningsson et al., 1990
		Acides gras : acide oléique, acide linoléique, acide alpha-linoléique, acide Arachidique, acide béhénique, acide lignosérique...	Svenningsson et al., 1990
		Stérols : beta-sitosterol, stigmasterol, campesterol...	Svenningsson et al., 1990
		Glucosinolates	Halkier et Gershenzon, 2006

2.1. Le dispositif en split root

Le principe de cette technique consiste à scinder le système racinaire de la plante en deux parties (Pervent et Nacry, 2008 ; Wichern et al., 2008), afin de pouvoir placer les racines dans

deux compartiments distincts : un premier contenant du sol représentatif de la parcelle pour évaluer l'effet de l'exsudation sur les communautés microbiennes du sol ; un deuxième, avec un substrat inerte qui permet de récupérer et de quantifier les produits d'exsudation.

2.2. Dispositif en Rhizom

Le principe de ce dispositif est basé sur l'extraction de la solution du sol contenant les exsudats racinaires à l'aide de micro-préleveurs (*Rhizom*) reliés à des seringues (Eisenhauer et al., 2017). En effet, les exsudats racinaires peuvent se retrouver transitoirement dans la solution du sol, car la majorité des molécules sont soit rapidement métabolisées par les microorganismes (Shaw et al., 2006), soit adsorbées à la surface des minéraux argileux et des colloïdes humiques du sol (Taiz et Zeiger, 2010).

Matériels et méthodes

3. Mise en place des dispositifs en serre pour la collecte des exsudats racinaires des plantes

3.1. Cultures des plantes

Cette étude porte sur trois espèces végétales, il s'agit du pois d'hiver (*Balltrap*), du colza (*Exentiel*) du blé (*Rubisco*). Les expérimentations ont été réalisées au sein de la plateforme Normand Serre. La culture des trois plantes a nécessité une étape de stérilisation des graines avant le semis suivi d'une étape de germination des graines sur substrat inerte en conditions stériles dans une chambre phytotronique. Après germination, toutes les étapes de cultures se déroulent en serre.

3.1.1. Les tests de stérilisation des graines : Cette étape est indispensable pour éliminer les microorganismes présents à la surface des graines afin de limiter les contaminations qui peuvent potentiellement modifier la réponse des plantes et leurs exsudats racinaires. Plusieurs protocoles de stérilisation ont été testés (Tableau 2).

Tableau 2. Synthèse des différents protocoles testés pour la stérilisation de graines

	Test 1	Test 2
1	Bain Ethanol à 70 % sous agitation à 500 tr/min pendant 10 minutes	Deux bains successifs dans de l'éthanol 96 % et de l'eau et à 500 tr/min pendant 10 minutes
2	Bain Hypochlorite de Sodium à 12 % sous agitation à 500 tr/min pendant 10 minutes	Un bain avec de l'hypochlorite de de sodium à 26 % pendant 20 min sous agitation à 500 tr/min pendant 10 minutes
3	Rinçage à l'eau déminéralisée 6 fois d'affilée	Rinçage à l'eau déminéralisée 6 fois d'affilée

Le premier test a consisté à stériliser un lot de graines avec une solution d'éthanol à 70 % sous agitation à 500 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes, puis un bain d'hypochlorite de sodium à 12 % sous agitation à 500 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes suivi de 6 rinçages successifs avec de l'eau déminéralisée. Dans le second test, le lot de graine a subi deux bains successifs dans de l'éthanol (96 %) et de l'eau, puis un bain avec de l'hypochlorite de de sodium à 26 % pendant 20 min suivi de 6 rinçages successifs avec de l'eau déminéralisée. Les deux lots de graines stérilisées ont été comparés à un lot de graines non stérilisées afin de voir l'efficacité de la stérilisation et l'impact de la stérilisation sur la germination des graines (Figure 1).

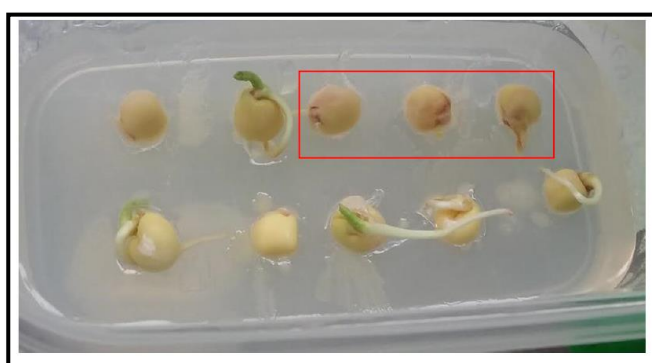


Figure 1. Aspect pigmenté des graines du pois d'hiver en absence de stérilisation

3.1.2. Le test d'imbibition : Certaines graines sont protégées par des couches extérieures imperméables très solides. Si l'eau n'arrive pas à pénétrer à l'intérieur de la graine,

le processus de germination ne peut pas être déclenché. Ainsi, après la stérilisation d'un lot de graines, la une partie des graines a été mise en imbibition pendant six heures et l'autre partie n'a pas subi d'imbibition (Figure 2).

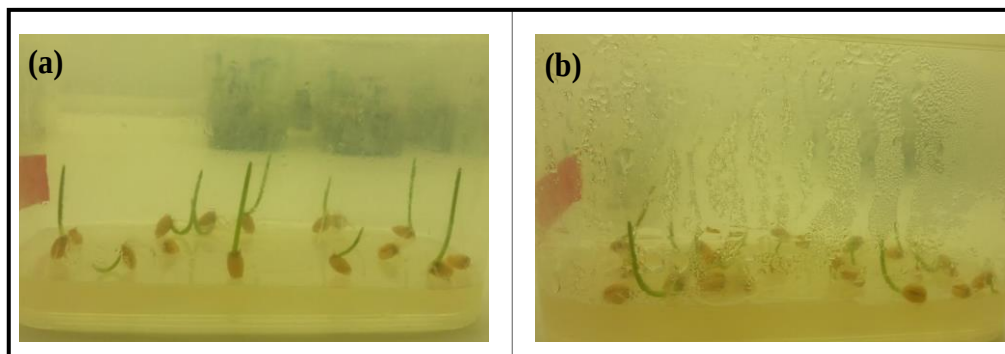


Figure 2. Germination du blé (a) sans imbibition (b) avec imbibition

3.1.3. Les tests de germination des graines : La germination des graines dure 7 jours et implique des substrats de germination et des conditions de température et d'humidité. Plusieurs substrats (perlite, vermiculite, gélose, quartz) ont été testés afin de comparer le taux de germination par espèce et par substrat testé (Figure 3).

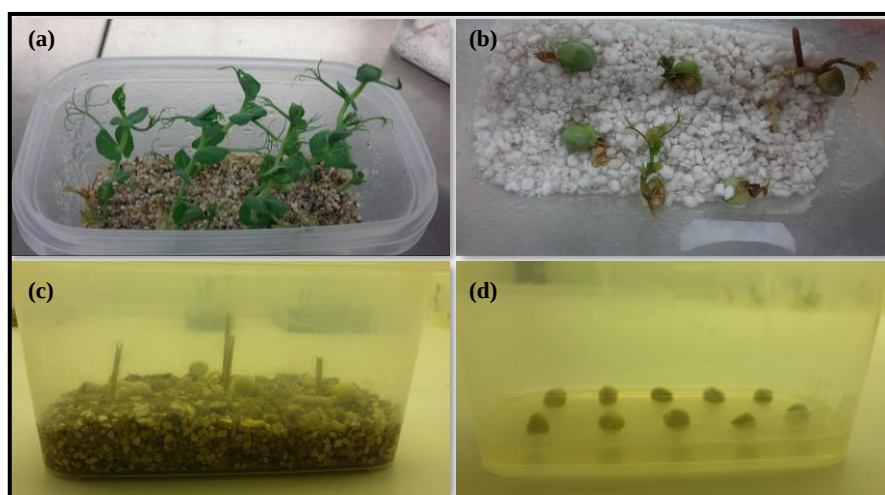


Figure 3. Germination du pois d'hiver sur quartz (a), perlite (b), vermiculite (c) et sur gélose (d)

3.2 Le test du *split root* en serre

La mise en place du *split root* s'est révélée plus facile pour les graines de blé germées, qui possède un système racinaire fasciculé facilitant ainsi la séparation de ce dernier en deux

parties. Le pois et le colza présentent un système racinaire en pivot qui implique la découpe des racines pour les scinder en deux. Deux méthodes de découpe de la racine ont été testées, la première a consisté à scinder verticalement la racine en deux et la seconde consistait à découper horizontalement l'apex racinaire afin de stimuler le développement des racines secondaires (Figure 4).



Figure 4. Photo du système racinaire du colza scindé en deux parties

Les découpes des racines nécessitent une étape de cicatrisation de 7 jours avant la reprise de la croissance. Cette phase est indispensable pour éviter la contamination et la pourriture des racines d'une part et pour stimuler le développement des racines secondaires, d'autres part. Cette phase de cicatrisation a nécessité le test de deux substrats (gélose 1% et vermiculite). Après la phase de cicatrisation, les plantules ont été soigneusement transférées dans les pots (0,24 L) et repiquées dans deux compartiments différents (Figure 5).

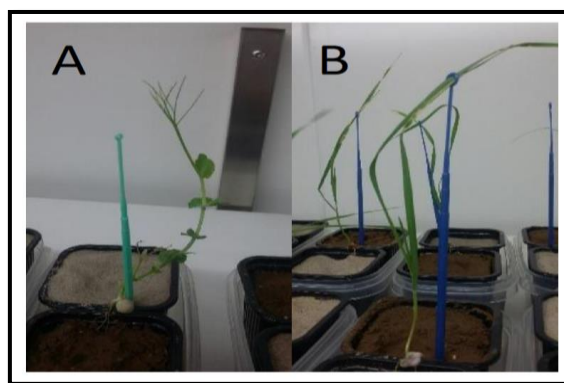


Figure 5. Plante de pois (A) et de blé (B) repiquées en dispositif en *split root* avec un compartiment contenant du sol et un compartiment contenant du sable de fontainebleau

Le compartiment 1 contenait systématiquement du sol et le deuxième contenait soit de la vermiculite, soit du sable de Fontainebleau. Les plantules sont cultivées en serre pour une période de 2 mois sous une température de 18 °C, une humidité de 60 % et une photopériode de 16h jour /8h nuit avec une dose d'irrigation hebdomadaire de 100 ml.

3.2.1 Prélèvement des exsudats racinaires en *split root*

Les premiers jours après le transfert, les plantules reçoivent un volume d'irrigation hebdomadaire de 100 ml. 24 h avant la collecte des exsudats racinaires des trois espèces, un contenant étanche a été mis en dessous du compartiment sable de fontainebleau afin de récupérer l'eau. En effet, l'extraction des exsudats racinaires a été réalisée au stade végétatif par phénomène de percolation. Après 7h de collecte, la solution du sol récupérée a été filtrée à 0,22 µm, congelée à - 20 °C puis lyophilisée. Les lyophilisats sont par la suite mis en solution et analysés par LC-MS (détaillée dans le chapitre suivant).

3.3 Le test du dispositif Rhizom en serre

Pour la mise en place du dispositif *Rhizom* (Figure 6), deux substrats (sable et sol) avec et sans stérilisation (irradiation au rayon gamma) ont été testés pour les trois espèces végétales, en y incluant des modalités témoins sans plantes.



Figure 6. Le dispositif en *Rhizom* utilisé lors des expérimentations de collecte des exsudats racinaires

Les exsudats racinaires ont été collectés à T0 et T1, ce qui correspond à 30 et 45 jours après semis (JAS). Le dispositif expérimental était constitué de 5 modalités (Figure 7) :

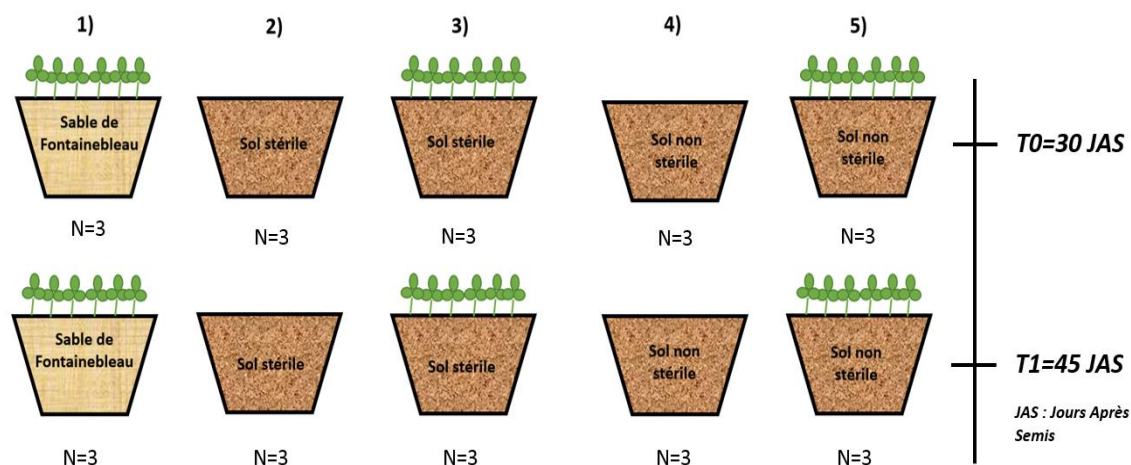


Figure 7. Plan expérimental mis en place lors des essais avec le dispositif *Rhizom*

Modalité 1 : plantules repiquées dans du sol natif (non stérile) (6 plantules/ pot). Cette modalité permet d'évaluer l'exsudation en condition réelles (*in situ*)

Modalité 2 : plantules repiquées dans du sol stérile (6 plantules/ pot). Cette modalité permet de s'affranchir de l'interaction potentielle entre les microorganismes et les exsudats racinaires afin d'éviter que les exsudats soient métabolisés par les microorganismes de la rhizosphère

Modalité 3 : plantules repiquées dans du sable de fontainebleau (6 plantules/ pot). L'utilisation du sable comme substrat inerte permet de s'affranchir de l'interaction entre les exsudats racinaires et la matière organique retrouvée normalement dans les sols

Modalité 4 : sol stérile sans plantes et **modalité 5** sol natif sans plantes. Ces deux modalités constituent les témoins. Les conditions de culture des plantes en serre sont identiques à celles appliquées dans le cas du split root

3.3.1 Prélèvement des exsudats racinaires en dispositif *Rhizom*

Les prélèvements des exsudats racinaires sont réalisés à l'aide de deux sondes *Rhizom* liées à des seringues de 50 ml, installées sur les pots au contact de l'apex racinaire. La collecte des

exsudats par voie passive est réalisée sur 7 h. La solution du sol collectée est filtrée à 0,22 µm, congelée à – 20 °C puis lyophilisée. Les lyophilisats sont par la suite mis en solution et analysés par LC-MS.

3.3.2 Analyses des paramètres biologiques du sol

Pour chaque modalité et pour chaque date d'analyse, le sol adhérent aux racines a été collecté et tamisé à 2 mm, congelé à l'azote liquide et stocké à – 20 °C pour la détermination ultérieure des paramètres biologiques. Une analyse de l'abondance totale *via* l'extraction et dosage de l'ADN total du sol a été réalisée. Une amplification des gènes ADNr 18S et 16S par qPCR a été effectuée pour déterminer l'abondance des biomasses fongique et bactérienne du sol. Le dosage de trois activités enzymes β -glucosidase, l'acétyl-N-glucosaminidase et l'arylamidase liées au cycle du carbone et de l'azote a été réalisé suivant la norme ISO 20130 :2018.

Résultats et discussion

4.1. Test de stérilisation

Les tests de stérilisation des graines ont été efficaces pour éviter la contamination et favoriser la germination (0 % de contamination et 100 % de germination) pour le pois et le blé. En revanche, le second protocole de stérilisation (Tableau 2) a pallié la contamination, mais il a affecté la germination des graines (0 % de contamination et 50 % le taux de germination). Ces résultats s'expliquent par la concentration élevée des produits utilisés dans le second protocole de stérilisation. En effet, l'éthanol doit être dilué à 70 % pour une efficacité optimale (éviter l'utilisation d'éthanol absolu) (Chniti, 2015). Ces observations ont motivé par ailleurs le choix de stériliser les graines de colza à l'eau de javel diluée. En effet, les graines de colza sont de petite taille et probablement plus sensibles à la stérilisation.

4.2. Test d'imbibition des graines

Les deux lots avec et sans imbibition montrent des taux de germination similaires pour les trois espèces étudiées (Figure 8). L'imbibition n'a par ailleurs aucun effet sur le taux de germination des graines, ce qui a permis d'éliminer cette étape dans la culture des plantes.

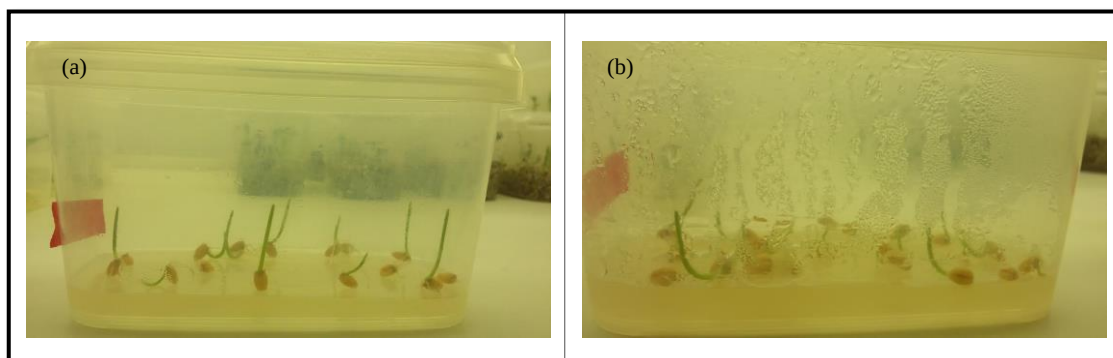


Figure 8. Lot de graines de blé germées avec imbibition (a) et sans imbibition (b)

4.3. Test de germination des graines

Un taux de germination de 100 % a été obtenu sur les deux substrats testés (vermiculite et gélose) (Figure 9).

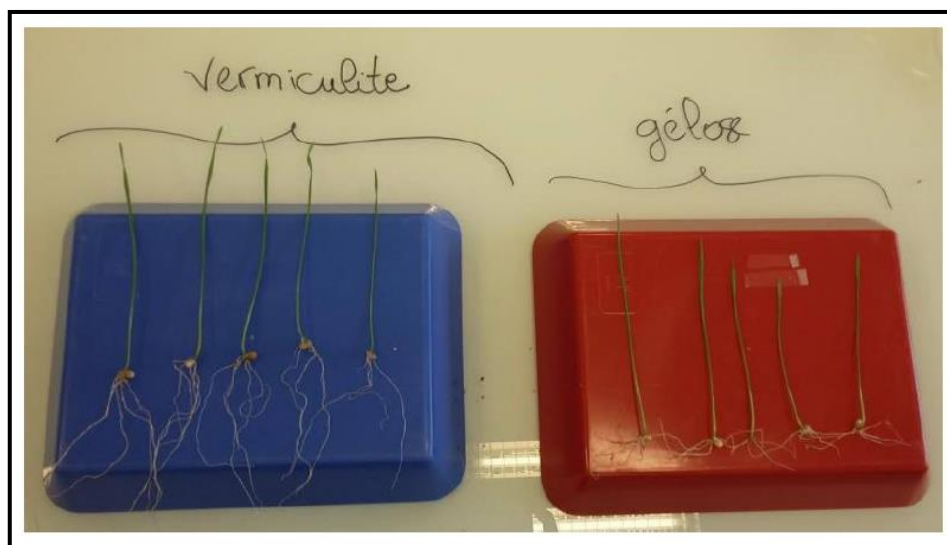


Figure 9. Photo de graines de blé après germination sur vermiculite et sur gélose

Ainsi, il a été décidé de mettre les graines de pois à germer dans de la gélose et le colza et le blé dans la vermiculite, pour éviter d'abimer leur racines très fines et fragiles au moment du transfert en split root.

4.4. Le test du *split root*

Pour le dispositif en split root, le substrat sable de fontainebleau a été privilégié. En effet, les résultats montrent un bon développement des trois espèces végétales sur ce substrat comparativement à la vermiculite, il est d'ailleurs décrit dans la littérature, comme substrats idéal pour la collecte des exsudats racinaires (Wichern et al., 2008).

4.5. Analyse des exsudats racinaires collectés par le dispositif en *split root*

Après les phases de stérilisation et de germination réalisées en chambre phytotronique, les trois espèces végétales (pois, colza et blé) ont été cultivées en serre pendant une période de 2 mois. Les résultats montrent que les trois espèces végétales ont atteint des stades très avancés dans leurs cycles de développement (Figure 10).

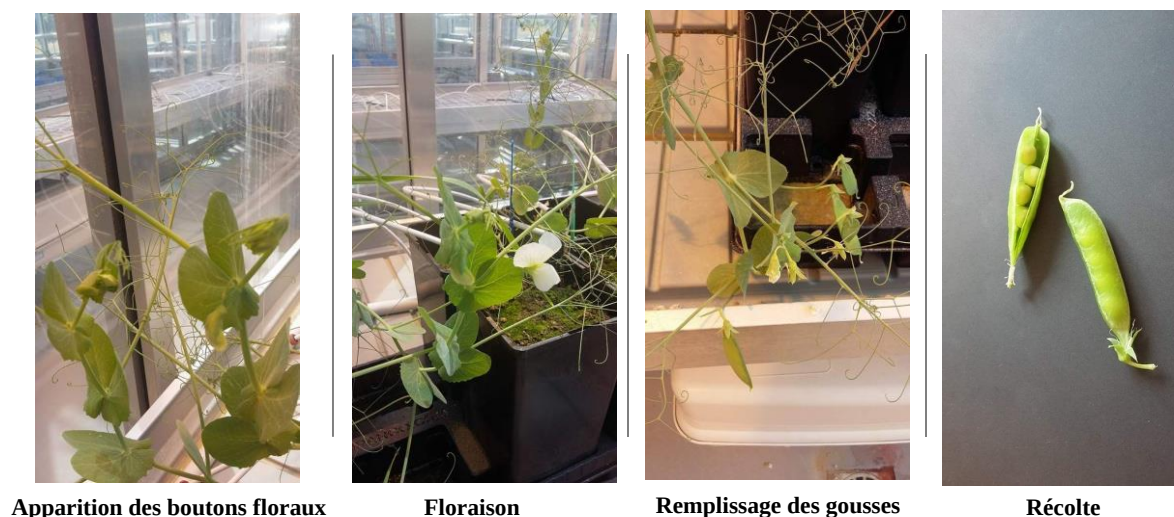


Figure 10. Les étapes de développement du pois d'hiver en serre en utilisant le dispositif en split root

L'analyse quantitative et qualitative des exsudats a été réalisée par LC-MS dans le cadre de la mise en place d'un partenariat scientifique avec l'Université de Tours. Après remise en suspension des solutions de sols lyophilisées, les analyses n'ont pas permis la détection et

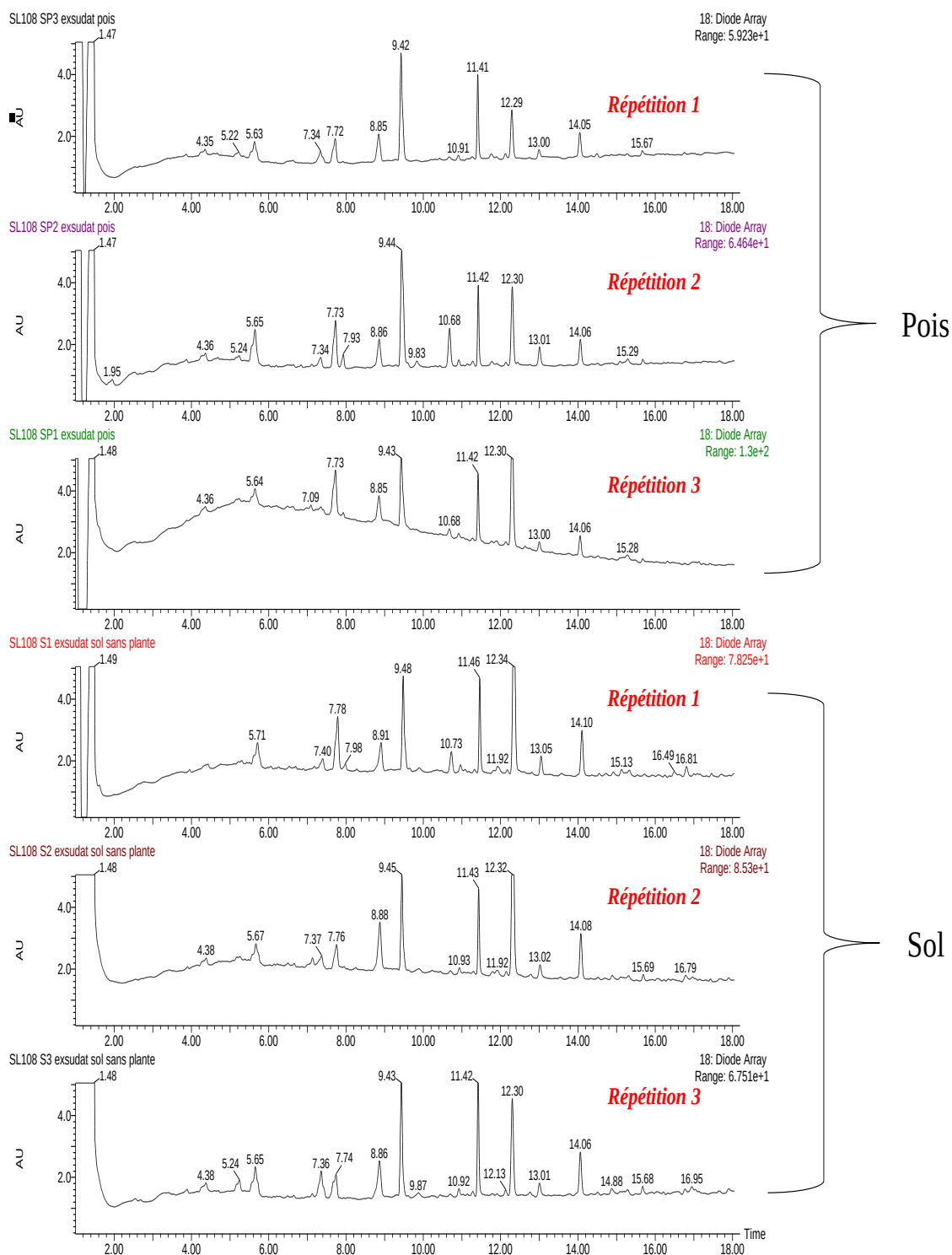
l'identification de composés d'exsudation dans les lyophilisats, en raison des concentrations trop faibles des composés exsudés.

4.6. Analyse des exsudats racinaires collectés par le dispositif en *Rhizom*

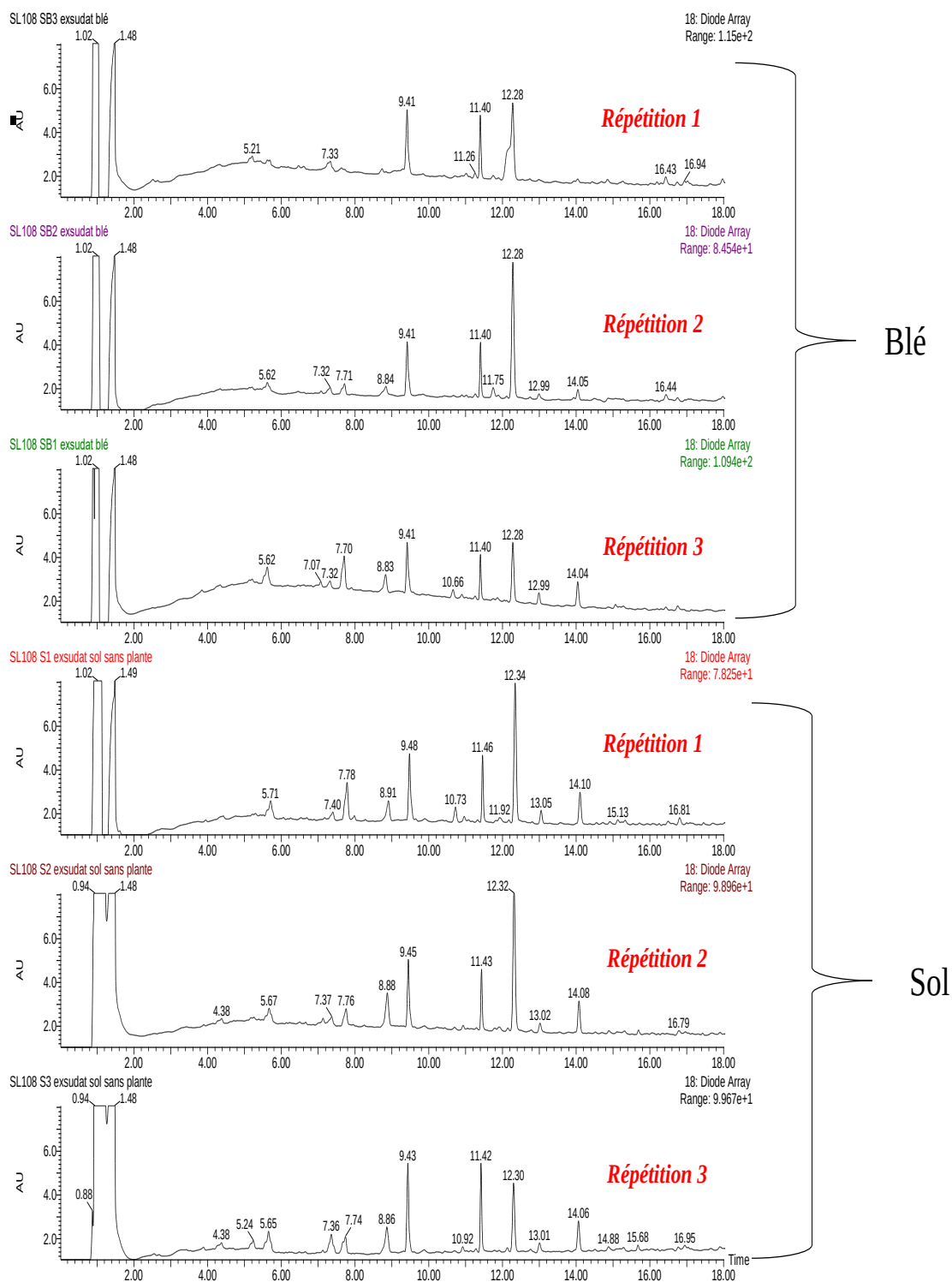
Le suivi de la croissance des 3 plantes dans les différentes modalités étudiées, montre un bon développement des cultures sur le sol natif et le sol stérile comparativement au sable de Fontainebleau. En effet, les plantes cultivées dans le sable ne se sont pas bien développées à cause probablement de carences nutritionnelles. En effet, afin de limiter le risque de modification des exsudats racinaires des plantes, il n'y a pas eu d'apports pour pallier cette carence. Il a cependant été possible de réaliser des prélèvements d'exsudats racinaires sur une période courte jusqu'à épuisement des ressources nutritionnelles.

L'analyse des échantillons des exsudats racinaires par LC-MS après remise en suspension dans le méthanol montrent que les profils chromatographiques comparant la composition des solutions de sol issues de modalités avec et sans plantes sont similaires. Aussi l'analyse des solutions de sol contenant les exsudats racinaires ne révèle aucune différence entre les profils chromatographiques des échantillons de pois, de blé ou de colza (Figure 11). Ces résultats montrent une forte interférence de la matière organique du sol dans l'analyse des exsudats racinaires.

(a)



(b)



(c)

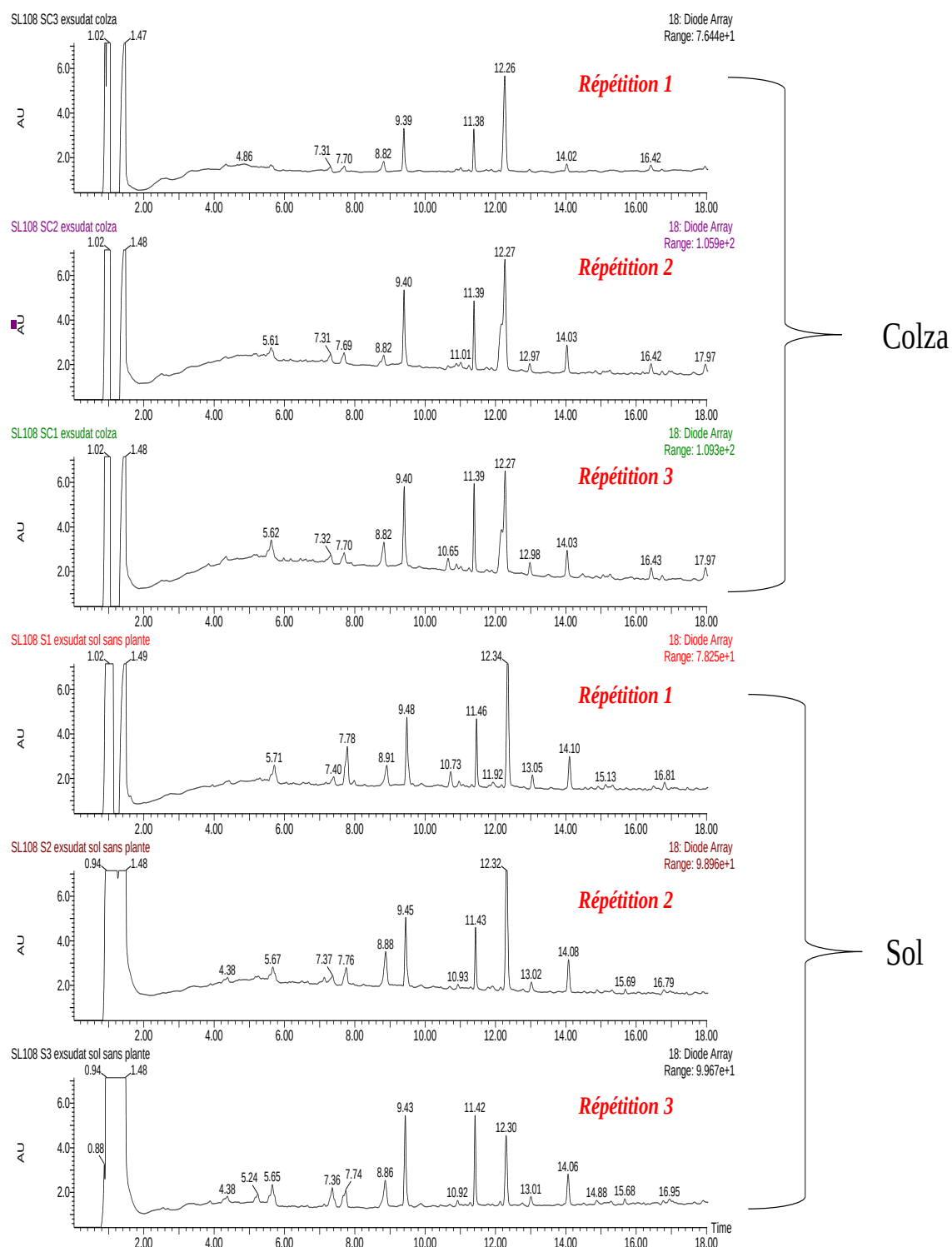


Figure 11. Les profils chromatographiques des échantillons de pois d'hiver (a), de blé (b) et de colza (c).

Par ailleurs, l'ensemble des paramètres biologiques étudiés n'ont pas permis de différencier les sols rhizosphériques des trois plantes (Figure 12). Sur la Figure 12, la superposition des 3 plantes des modalités 1 et 2 suggère que les exsudats racinaires en lien avec la croissance des plantes, sont le facteur explicatif majeur pour la biologie des sols.

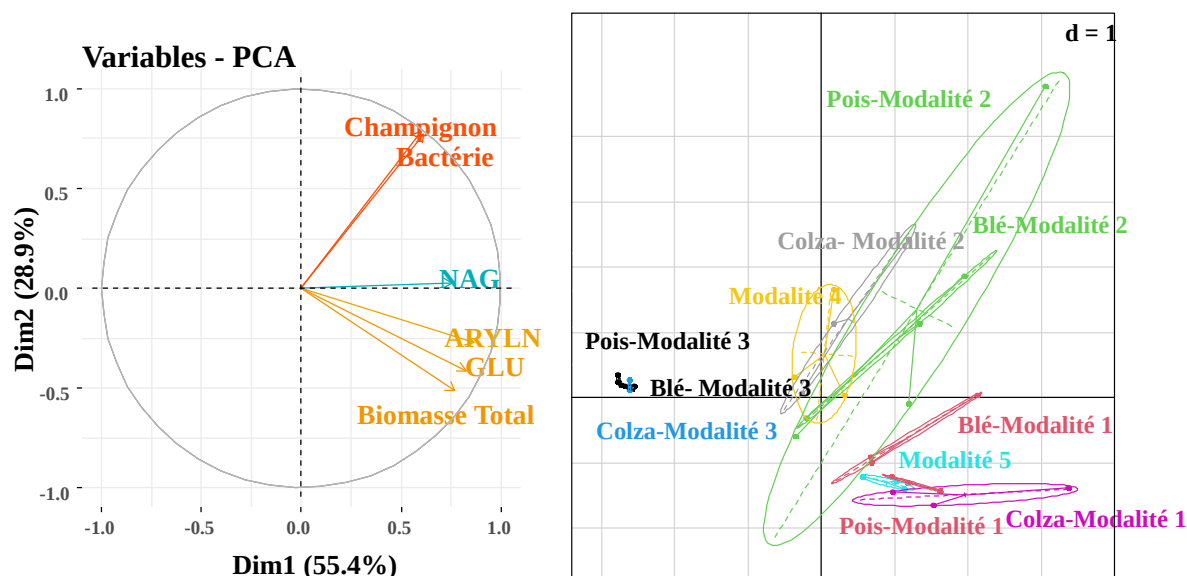


Figure 12. Etude de la variabilité des paramètres biologiques par une analyse en composante principale pour les 5 modalités étudiées

Modalité 1. Sol non stérile avec plante ; Modalité 2. Sol stérile avec plante ; Modalité 3. Sable fontainebleau avec plante ; Modalité 4. Sol stérile sans plante ; Modalité 5. Sol non stérile sans plante.

Ces résultats montrent la limite des approches globales dans l'étude des communautés microbiennes des sols et incitent à utiliser des approches plus fines et notamment le DNA SIP, qui pourrait aider à mieux discriminer ces communautés microbiennes et identifier des fonctions spécifiques par la quantification des gènes fonctionnels en lien par exemple avec le cycle de l'azote.

4.4. Dispositifs de collecte des exsudats racinaires des plantes en *split root* et en *Rhizom*

Les dispositifs testés visaient à collecter les exsudats racinaires de trois espèces végétales à partir de différents substrats, le sable pour le *split root* et le sol pour le dispositif *Rhizom*. Ces

dispositifs ont montré que la croissance des plantes en sol (*Rhizom*) offre des conditions de croissance meilleures comparativement au sable (*split-root*). En effet, les plantes en sol sont dans leur milieu naturel et disposent donc des conditions physiques et nutritionnelles favorables à leur croissance. Bien qu'adéquat comme matrice de culture, le sol reste néanmoins contraignant pour suivre l'exsudation racinaire. En effet, tels que montré par nos résultats, il existe une forte interaction de la matière organique du sol avec les exsudats racinaires, qui peuvent en plus être modifiés par les microorganismes du sol entraînant ainsi des biais dans leur caractérisation (Neumann et al., 2009, Kuijken et al., 2015).

Si le recours à des substrats de culture moins complexes et plus artificiels peut faciliter l'extraction des exsudats, leurs composition qualitative et quantitative peut être différente de celle observée dans les sols (Kuijken et al., 2015 ; Preece et Penuelas, 2020). L'extraction des exsudats en milieu aqueux (hydroponie) semble néanmoins le mode de culture le plus courant (Oburger et Schmidt, 2016). L'ensemble des résultats obtenus avec les dispositifs testés montrent d'une part, la difficulté d'étudier les exsudats racinaires en sol et d'autre part, la nécessité de prendre en compte, dans l'interprétation des résultats, les biais inhérents à chaque méthode.

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était de caractériser les exsudats racinaires de trois espèces végétales (pois, blé et colza) et d'étudier l'impact de ces exsudats racinaires sur les communautés microbiennes du sol. Deux dispositifs expérimentaux permettant la collecte simultanée des exsudats racinaires et l'analyse de leurs effets sur les communautés microbiennes du sol ont été sélectionnés à partir de la littérature. Les dispositifs *split root* et *Rhizom* ont été testés et ont fait l'objet de différentes mises au point qui n'ont malheureusement pas permis l'analyse des exsudats racinaires des plantes. Ils ont néanmoins aidé à identifier et à optimiser les protocoles de stérilisation et de germination des graines mais aussi de préciser les conditions de culture en

chambre phytotronique et en serre des trois espèces végétales. Afin de faciliter la collecte et la caractérisation des exsudats racinaires, le choix de développer une approche en hydroponie a été privilégié.

Références

- Afendi, F.M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., Ikeda, S., Takahashi, H., Altaf-Ul-Amin, M., Darusman, L.K., Saito, K., Kanaya, S., 2012. KNApSACk Family Databases: Integrated Metabolite–Plant Species Databases for Multifaceted Plant Research. *Plant and Cell Physiology* 53, e1–e1. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr165>
- Akula, R., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., 2001. Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biology* 3, 139–148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12905>
- Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* 32, 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Barton, D., Meth-Cohn, O., 1999. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Newnes. [cahier65.pdf](#).
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S., 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry, Plant Phenolics: biosynthesis, genetics, and ecophysiology* 72, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chniti, S., 2015. Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes 211.
- Christiansen-Weniger, C., Groneman, A.F., van Veen, J.A., 1992. Associative N₂ fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminium tolerance. *Plant and Soil* 139, 167–174. <https://doi.org/10.1007/BF00009307>
- Dessureault-Rompré, J., Nowack, B., Schulín, R., Luster, J., 2006. Modified micro suction cup/rhizobox approach for the in-situ detection of organic acids in rhizosphere soil solution. *Plant and Soil* 286, 99–107. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9029-z>
- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847. <https://doi.org/10.1038/35081178>
- Foo, E., Davies, N.W., 2011. Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta* 234, 1073. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1516-7>
- Eisenhauer, N., Lanoue, A., Strecker, T., Scheu, S., Steinauer, K., Thakur, M.P., Mommer, L., 2017. Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. *Scientific Reports* 7, 44641. <https://doi.org/10.1038/srep44641>
- Evidente, A., Fernández-Aparicio, M., Cimmino, A., Rubiales, D., Andolfi, A., Motta, A., 2009. Peagol and peagoldione, two new strigolactone-like metabolites isolated from pea root exudates. *Tetrahedron Letters* 50, 6955–6958. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.142>
- Gontier, E., Clément, A., Bourgaud, F., Guckert, A., 1999. Procédé de production de métabolites à partir de plantes. Brevets. FR99 14204, EP 00976113.1, PCTFR0003095.
- Haichar, F.Z., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W., 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*. 77, 69-80
- Häggquist, M.-L., Svenningsson, H., Olsson, S., Sundin, P., Odham, G., Liljenberg, C., 1984. Long-term culturing of plants with aseptic roots Determination of rape root exudates. *Plant, Cell & Environment* 7, 549–552. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11616234>
- Halkier, B.A., Gershenzon, J., 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual*

- Review of Plant Biology 57, 303–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>
- Hoffland, E., Boogaard, R.V.D., Nelemans, J., Findenegg, G., 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytologist* 122, 675–680. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb00096.x>
- Hopkins, R.J., van Dam, N.M., van Loon, J.J.A., 2009. Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review of Entomology* 54, 57–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090623>
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal* 45, 335–346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x>
- Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D., 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil* 321, 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Journet, E.-P., Carreau, V., Gouzy, J., Thoquet, P., Rosenberg, C., Barker, D., Huguet, T., Denarie, J., Gamas, P., 2001. La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives 11.
- Kind, T., Fiehn, O., 2006. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics* 7, 234. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-234>
- Knee, E.M., Gong, F.-C., Gao, M., Teplitski, M., Jones, A.R., Foxworthy, A., Mort, A.J., Bauer, W.D., 2001. Root Mucilage from Pea and Its Utilization by Rhizosphere Bacteria as a Sole Carbon Source. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 14, 775–784. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.775>
- Konstantinovna, K.M., Ali, A.Z., Ivanovich, B.A., Aleksandrovna, K.Y., 2020. Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds 9.
- Kuijken, R.C.P., Snel, J.F.H., Heddes, M.M., Bouwmeester, H.J., Marcelis, L.F.M., 2015. The importance of a sterile rhizosphere when phenotyping for root exudation. *Plant and Soil* 387, 131–142. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2283-6>
- Lesuffleur, F., Paynel, F., Bataillé, M.-P., Le Deunff, E., Cliquet, J.-B., 2007. Root amino acid exudation: measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant and Soil* 294, 235–246. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9249-x>
- Li, X., Ding, C., Hua, K., Zhang, T., Zhang, Y., Zhao, L., Yang, Y., Liu, J., Wang, X., 2014. Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.019>
- Luo, Q., Wang, S., Sun, L., Wang, H., 2017. Metabolic profiling of root exudates from two ecotypes of *Sedum alfredii* treated with Pb based on GC-MS. *Scientific Reports* 7, 39878. <https://doi.org/10.1038/srep39878>
- Mahieu, S., Fustec, J., Faure, M.-L., Corre-Hellou, G., Crozat, Y., 2007. Comparison of two ¹⁵N labelling methods for assessing nitrogen rhizodeposition of pea. *Plant and Soil* 295, 193–205. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9275-8>
- Nakayama, M., Tateno, R., 2018. Solar radiation strongly influences the quantity of forest tree root exudates. *Trees* 32, 871–879. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1685-0>
- Neumann, G., Römheld, V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211, 121–130. <https://doi.org/10.1023/A:1004380832118>
- Neumann, G., George, T.S., Plassard, C., 2009. Strategies and methods for studying the

- rhizosphere—the plant science toolbox. *Plant and Soil* 321, 431–456. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9953-9>
- Novák, K., Lisá, L., Škrdleta, V., 2004. Rhizobial nod gene-inducing activity in pea nodulation mutants: dissociation of nodulation and flavonoid response. *Physiologia Plantarum* 120, 546–555. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0278.x>
- Oburger, E., Dell‘mour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2013. Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany* 87, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.11.007>
- Oburger, E., Gruber, B., Schindlegger, Y., Schenkeveld, W.D.C., Hann, S., Kraemer, S.M., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., 2014. Root exudation of phytosiderophores from soil-grown wheat. *New Phytologist* 203, 1161–1174. <https://doi.org/10.1111/nph.12868>
- Oburger, E., Schmidt, H., 2016. New Methods To Unravel Rhizosphere Processes. *Trends in Plant Science, Special Issue: Unravelling the Secrets of the Rhizosphere* 21, 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.12.005>
- Payraudeau, 2014. Evaluation du caractère allélopathique d’une collection de Fabacées cultivées vis-à-vis du développement d’une adventice parasite du colza, l’orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L.).pdf, n.d.
- Phillips, D.A., Fox, T.C., King, M.D., Bhuvaneswari, T.V., Teuber, L.R., 2004. Microbial Products Trigger Amino Acid Exudation from Plant Roots. *Plant Physiology* 136, 2887–2894. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044222>
- Pervent, M., Nacry, P., 2008. Dispositif du split-root in vitro pour l’analyse architecturale du système racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. *Cahier. Technique*. 65, 23-30.
- Preece, C., Penuelas, J., 2020. A Return to the Wild: Root Exudates and Food Security. *Trends in Plant Science*, January 2020, Vol. 25, No. 1, 14-21
- Putnam, A.R., Tang, C.-S., 1986. *The Science of allelopathy*. Wiley.
- Schulz, H., Vetterlein, D., 2007. Analysis of organic acid concentration with time in small soil-solution samples from the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 170, 640–644. <https://doi.org/10.1002/jpln.200700118>
- Shanker, A., Shanker, C., 2016. *Abiotic and Biotic Stress in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*. BoD – Books on Demand.
- Shaw LJ, Morris P, Hooker JE. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* 8: 1867–1880.
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S., Scheel, D., 2014. Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 108, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.003>
- Svenningsson, H., Sundin, P., Liljenberg, C., 1990. Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. *Plant, Cell & Environment* 13, 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01287.x>
- Taiz, L. Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology* (5th ed.), Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
- Tawaray, K., Horie, R., Saito, S., Wagatsuma, T., Saito, K., Oikawa, A., 2014a. Metabolite Profiling of Root Exudates of Common Bean under Phosphorus Deficiency. *Metabolites* 4, 599–611. <https://doi.org/10.3390/metabo4030599>
- Tawaray, K., Horie, R., Shinano, T., Wagatsuma, T., Saito, K., Oikawa, A., 2014b. Metabolite profiling of soybean root exudates under phosphorus deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* 60, 679–694. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.945390>
- Vancura, V., 1946. Root exudates of plants 18.
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K.R., Janous, D., Formanek, P., 2013. Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review. *Journal of*

- Plant Nutrition and Soil Science 176, 175–199.
<https://doi.org/10.1002/jpln.201000360>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., et al., 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports* 39, 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Warren, C.R., 2015. Wheat roots efflux a diverse array of organic N compounds and are highly proficient at their recapture. *Plant and Soil* 16.
- Weidenhamer, J.D., Mohny, B.K., Shihada, N., Rupasinghe, M., 2014. Spatial and Temporal Dynamics of Root Exudation: How Important is Heterogeneity in Allelopathic Interactions? *J Chem Ecol* 40, 940–952. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0483-4>
- Wen, F., VanEtten, H.D., Tsapralis, G., Hawes, M.C., 2007. Extracellular Proteins in Pea Root Tip and Border Cell Exudates. *Plant Physiology* 143, 773–783. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091637>
- Werner, E., Heilier, J.-F., Ducruix, C., Ezan, E., Junot, C., Tabet, J.-C., 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. *Journal of Chromatography B, Hyphenated Techniques for Global Metabolite Profiling* 871, 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.07.004>
- Wichern, F., Eberhardt, E., Mayer, J., Joergensen, R.G., Müller, T., 2008. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 30–48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010>
- Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D., Haig, T., 2001. Allelopathy in wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Applied Biology* 139, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00124.x>
- Yokosho, K., Yamaji, N., Ma, J.F., 2011. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *The Plant Journal* 68, 1061–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04757.x>
- Zhang, F.S., Ma, J., Cao, Y.P., 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant and Soil* 196, 261–264. <https://doi.org/10.1023/A:1004214410785>

Chapitre III. Résultats

Article 3

Titre: N rhizodeposition quantification and root exudates characterization of pea (*Pisum Sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) under controlled conditions

Article 3: N rhizodeposition quantification and root exudates characterization of pea (*Pisum Sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) under controlled conditions

En preparation

Cyrine Rezgui^{a,b*}, Mohamed Kante ^{a,d}, Arnaud Lanoue^e, Wassila Riah-Anglet^{a,b}, Jean Bernad Cliquet^d, Marie Benoit^c, Karine Laval^{a,b}, Isabelle Trinsoutrot-Gattin^{a,b}

^a UniLaSalle - Campus Rouen, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, F-76134 Mont-Saint Aignan, France

^b Normandy University, Research Federation Normandie Végétal FED 4277, France.

^c ISARA, Higher education institution, 69007 Lyon, France.

^d Normandy University, UNICAEN, INRAE, EVA, FED Normandie Végétale 4277,14000 Caen, France

^e Tours University, François Rabelais, EA 2106 Plant Biotechnology and Biomolecules, 31 Avenue Monge, F-37200 Tours, France.

***Corresponding author:** E-mail address: Wassila.RIAH-ANGLET@unilasalle.fr ; phone: +33 2 32 82 91 98; fax: +33 2 35 05 27 40.

Abstract

Legumes can use photosynthetic energy to fix atmospheric nitrogen (N) by rhizobium-legume symbiosis and this might result in contrasting patterns of carbon (C) and N rhizodeposition compared to other species (*Poaceae* and *Brassicaceae*). Accurate quantification of N derived from rhizodeposition is crucial to estimate N input in soil by these species.

In this study, the quantification of N derived from rhizodeposition and root exudates characterization of pea (*Pisum Sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) were carried out. We quantified the amounts of N rhizodeposition (BG¹⁵NdFR) with ¹⁵N shoot labelling method. The plants were labelled twice with a pulse of a solution containing ¹⁵N-urea at the fifth and sixth week after sowing. The characterization of root exudates involved the implementation of a hydroponic device for their collection.

The results showed that pea presented the greatest amount of ¹⁵N in belowground (root + soil) compared to wheat and rapeseed. In contrast, the proportion of aboveground ¹⁵N (ABG¹⁵N) and belowground ¹⁵N (BG ¹⁵NdFR) derived from rhizodeposition was not statistically different between pea and wheat. Rapeseed presented the lowest ABG¹⁵N and the highest BG ¹⁵NdFR as a proportion.

The metabolic profiling of pea exudate led to the detection of 30 compounds and to the identification of 8 compounds, as daidzein, sophorol, maackiain, dihydroxy-dimethoxyflavone, formononetin, pisatin, hydroxymaackiain and 6,7-Dichloro-1-[(3,4-dimethoxyphenyl) methyl] isoquinoline (DMDI). Mostly of these compounds are isoflavonoids. For wheat root exudates, only 15 compounds were detected. This work will obviously be completed by the identification of wheat compounds and by optimizing the protocol of rapeseed germination. Overall, this study validates our implemented laboratory hydroponic device that seems to be the best way for root exudates collection.

Keywords: N rhizodeposition, ¹⁵N labeling, root exudates, pea, hydroponic device

1. Introduction

Nitrogen (N) is one of the most important factors affecting crop growth worldwide. In the last decades, there has been an increasing interest for N management in agricultural systems because N fertilizer has been applied intensively to improve agricultural production generating several environmental damages with degradation of soil, water and air quality (Byrnes, 1990). N fertilization is a source of soil acidification, N leaching in groundwater, eutrophication and atmospheric pollution through nitrous oxide emission which contribute to global warming (Sainju et al., 2019). To address these threats, new wide varieties of agricultural practices have emerged: sustainable agriculture, ecologically intensive agriculture, agro-ecological agriculture, multifunctional agriculture, or conservation agriculture (Horrigan et al., 2002). Through sustainable agriculture, legumes integration in agricultural systems, widely used in organic agriculture, seem to be a promising agriculture practice improving soil organic matter and biodiversity, increasing functional diversity and environmental performances (Schneider and Huyghe, 2015; Cortignani et al., 2020). Thanks to their ability to fix atmospheric N, in association with *rhizobiaceae*, legumes enrich the soil with N and are an interesting alternative to the use of chemical fertilizers (Fustec et al., 2010).

The organic compounds released by living roots into the soil are collectively referred to as rhizodeposits, and the corresponding process as rhizodeposition (Kuzyakov and Domanski, 2000). Rhizodeposition is a key process involved in a wide range of functions in soil ecology and plant nutrition such as improving nutrient availability, influencing plant-microorganism interactions, constitutes an essential C and N inputs into soil and represent an important source of energy for soil microorganisms (Hütsch et al., 2002; Paterson et al., 2007). About 20 % of the total C absorbed by the plant can be released into the rhizosphere (Kuzyakov and Domanski, 2002; Schweinsberg-Mickan et al., 2012). In contrast, rhizodeposition of N, as a percentage of total plant N, varied from 4 to 71 % (Fustec et al., 2010). Due to the importance of

rhizodeposition in plant-soil-microorganisms interactions, many studies have focused on the qualitative and quantitative characterization of released compounds by rhizodeposition process and their impact on C and N fluxes in soil (Jones et al., 2009; Dennis et al., 2010; Hupe et al., 2016). Estimation of rhizodeposition improve the knowledge on plant C sequestration potential and on N balance in soil. The quantification of rhizodeposited N derived from legumes species/ and legumes associations in crops rotation is of great interest because biologically fixed N, transferred in soil, can be used by next crop (Mayer et al., 2003).

Plant N rhizodeposition can be quantified using isotope tracer techniques that allow differentiation of plant derived N from soil N. Several methods have been used to measure amount of plant N derived from rhizodeposition using soil substrate, root, shoot or atmospheric labelling (Wichern et al., 2008; Anglade et al., 2015; Chalk and Smith, 2017). The most widely used methods include ^{15}N isotope dilution technique (Chalk and smith, 2017; Khan et al., 2002), split-root technique (Veerman et al., 2018), and ^{15}N shoot labelling with gaseous or liquid compound (Janzen, 1990; Russelle et al., 1994). Others studies used stem injection with micro syringe filled with ^{15}N enriched solution (Götz and Herzog, 2000), petiole feeding (Yasmin et al., 2010), leaf spraying (Zebarth et al., 1991), cotton-wick method (Russell and Fillery, 1996; Wichern et al., 2010) and leaf immersion in the labelled solution (Palta et al., 1991; Rasmussen et al., 2019).

Root exudation is part of the rhizodeposition process (Hütsch et al., 2002; Nguyen, 2003). Root exudates are defined as plant-derived primary and secondary metabolites released from roots. They included both low and high molecular weight compounds (e.g. sugars, organic acids, phenolics, vitamins, enzymes, mucilage...) (Lanoue et al., 2010; Azeez et al., 2019). Root exudation quality and quantity depends on plant species and genotypes within species (Paynel et al., 2001, Shen et al., 2002; Hoekenga et al., 2003, Badri and Vivanco, 2009; Vives-

Peris et al., 2020), stage of plant growth and root physiology (Gransee and Wittenmayer, 2000; Aulakh et al., 2001).

In the present study, we are interested to quantify N rhizodeposition and to characterize root exudates of three plant species (legume and non-legume). The objectives of this study were to (1) quantify N rhizodeposition, uptake, and distribution in the different plant parts of pea (*Pisum Sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) under controlled conditions by using ^{15}N urea shoot labelling, (2) characterize plants root exudates under hydroponic device at different growth stages

2. Materials and methods

Two distinct experiments were conducted in this study using pea (*Pisum Sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. The first one was conducted in greenhouse to quantify N derived from rhizodeposition using the ^{15}N shoot labelling method. The second experiment was conducted in phytotron growth chamber and concerned a hydroponic device to characterize root exudates. For both experiments the used seeds were collected from plants grown in the field.

2.1 Greenhouse experiment

2.1.1 Seeds sterilization and germination

Seeds were cleaned and stored in containers at 5 °C in a cool room until use. Pea (*Pisum sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds were soaked twice for 10 min in an ethanol solution (96%) and then in a hypochlorite solution (26 %) under stirring. After each immersion, the seeds were rinsed six times with demineralized sterile water (10 s per rinse). Rapeseed (*Brassica napus* L.) seeds were sterilized using a diluted hypochlorite solution. The disinfection process was carried out in sterile conditions.

For germination, sterilized seeds of wheat and rapeseed were cultivated in boxes containing sterile vermiculite moistened with demineralized water (80 % water holding capacity (WHC)).

Pea seeds were cultivated in boxes with agar (1 %) since preliminary test shown no differences for germination between sterile vermiculite and agar boxes. The seeds were germinated in growth chamber at a day/night cycle: 16 h, 23 ± 2 °C / 8 h, 23 ± 2 °C for a period of 7 days.

2.2. Labelling experiment

2.2.1. Soil sampling and experimental design

The soil was collected from an arable field located in the Normandy region ($49^{\circ}46'48.62''N$ $01^{\circ}41'25.08''E$) from a depth of 0–20 cm. The soil properties are summarized in Table 1.

Table 1. Physicochemical properties of used soil for the greenhouse experiment. *The results are presented as the mean of three replicates ($n = 3$) $\pm$ standard errors*

Soil parameters		
Soil texture		
Clay (%)	6.56	± 0.32
Silt (%)	68.10	± 1.52
Sand (%)	25.34	± 1.81
pH water	7.40	± 0.01
Total C (g.kg^{-1} air dried soil)	14.03	± 2.37
Total N (g.kg^{-1} air dried soil)	1.46	± 0.07
Organic C (g.kg^{-1} air dried soil)	13.65	± 2.22

Soil was then sieved at 4 mm. Labeling experiment were conducted in the greenhouse. After seeds sterilization and germination, seedlings were transferred in 2 L pots filled with 1.9 kg of dried soil. 5 replicates for each species were grown for 7 weeks with bulk soil as control. Plants were watered with 50 ml water per day and was adjusted to keep soil WHC between 70 – 80%. Growing was conducted under $400 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ lightning and photoperiod of 16h day under $20 - 25^{\circ}\text{C}$ and 8 h nigh under 16°C .

2.2.2. ^{15}N urea labelling

Plants were labelled using ^{15}N urea (99 atom %) shoot labelling at 0.5 % (w/v) concentration, 1st labelling occurred 5 weeks after sowing, tubes were removed after entire uptake of labelled solution (4-5 days depending on plant species) and a 2nd labelling was made in the 6th week after sowing. Labelling was performed using 2 ml tube filled with 1 ml of ^{15}N urea solution and soil was covered with a wintering veil to avoid contamination from solution and shoot tissue

senescence. Wheat was labelled by cutting leaf tip and immersing in the labelling solution, for rapeseed. Labelling entire leaf was cut around the midrib then immersed in the solution and for pea a leaf tendril was cut and immersed in the tube (supplemental data, Figure 1). After immersion of labelled organ, tubes were covered with plastic film to avoid ^{15}N urea evaporation.

2.2.3. Plant harvest and soil sampling

To quantify N rhizodeposition, three harvests dates were chosen. The first date (before labelling) was performed to estimate natural ^{15}N abundance in plant and soil. The second and the third harvested dates were carried out 7 days after the 1st labelling and the 2nd labelling, respectively (D7: plants labelled one week and D14: plant labelled 2 weeks). For all harvest plants, entire aboveground part was cut at soil surface, roots were recovered, and rhizosphere soils were collected. Soils were sieved at 2 mm with removing visible roots. Samples were weighed and dried at 60 °C for 3-4 days. Dried samples were weighed and grinding with ball mills to make powder for ^{15}N isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) analyses. Samples powder were weighed in micrograms (20 mg for soil; 1.5 mg plant samples) in tin capsule hermetically sealed for total N and ^{15}N analyses.

2.2.4. Calculations

Mass balance approach was used to estimate plant belowground ^{15}N derived from rhizodeposit ($\text{BG}^{15}\text{NdfR}$), atom% excess representing ^{15}N enrichment difference between labelled sample and control sample was determined for all sample. Using atom % excess, ^{15}N amounts were calculated in each compartment then ^{15}N rhizodeposition were determined as proportion of belowground ^{15}N derived from rhizodeposition (root + soil) of total plant-soil ^{15}N .

$$\% \text{BG}^{15}\text{NdfR} = \frac{\text{soil+roots } ^{15}\text{N (mg)}}{\text{Total } ^{15}\text{N(mg)(plant+soil)}} \times 100$$

2.3. Hydroponic experiment in phytotron growth chamber

2.3.1. Root exudate collection

Plant root exudates were generated under sterile conditions. Pea, rapeseed, and wheat seeds were sterilized as described in 2.1.1 section and the seedlings were transferred to Hoagland's medium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 4 H_2O ; KNO_3 ; KH_2PO_4 ; MgSO_4 ; EDTA, 2 NaFe, 3 H_2O ; Trace elements) and allowed to grow for 2 months. The hydroponics system included two containers for each species and 8 plants in each container powered by an aeration pump (Figure 4). Each week, the Hoagland's medium was removed. To collect the root exudates, two dates were chosen after one and two months of culture corresponding to the vegetative and flowering stage of the plants. Four plants by species were placed into sterile 500-mL glass container covered with aluminum foil paper to avoid contamination and light, and the roots were completely submerged in 300 mL of sterile aerated deionized water. After 24 and 48 hours of root exudation, deionized water containing the exudates was collected from each species, filtered through a 0.22 μm filter (ClearLine®) and immediately frozen at -20°C and lyophilized (LYOVAC GT2) until application. The lyophilized powder of root exudates was weighted (minimum 0.5 g) for the analysis of root composition.

2.3.2. Extraction protocol

The lyophilized powder of root exudate was dissolved in 200 μL and 800 μL of methanol (MeOH) 100 %, respectively. Then, samples are vortexed, sonicated 30 min at room temperature and 10 min at 30°C . The solution is transferred into 1.7 ml tubes, centrifuged at 18 000 g for 10 min at 18°C . 50 μL of supernatant is transferred to a flask ready for analyzes by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

2.4. Statistical analyses

Statistical analyzes were carried out using the software R (R Development Core Team, 3.5.2 version). The data were analyzed by ANOVAs after verifying data normality (Shapiro-Wilk

test, 95 %) and variance homogeneity (Bartlett's test, 95%). Multiple mean comparisons were then carried out with the Tukey Test.

3. Results

3.1 N Rhizodeposition

3.1.1 Distribution of ^{15}N tracer

Plant tissues (shoot + root) was more enriched (0.4 % - 13 %) than soil (0.04 % - 0.10 %). Shoot presented the greatest enrichment. At D7, wheat presented the lowest ^{15}N enrichment in shoot compared to pea and rapeseed. The opposite pattern was observed at D14 with greatest ^{15}N enrichment in wheat shoot. Regardless of harvest time, ^{15}N enrichment presented the followed trend: wheat root < rapeseed root < pea root. In soil, pea presented the most important ^{15}N enrichment at D7 and D14 (Figure 1).

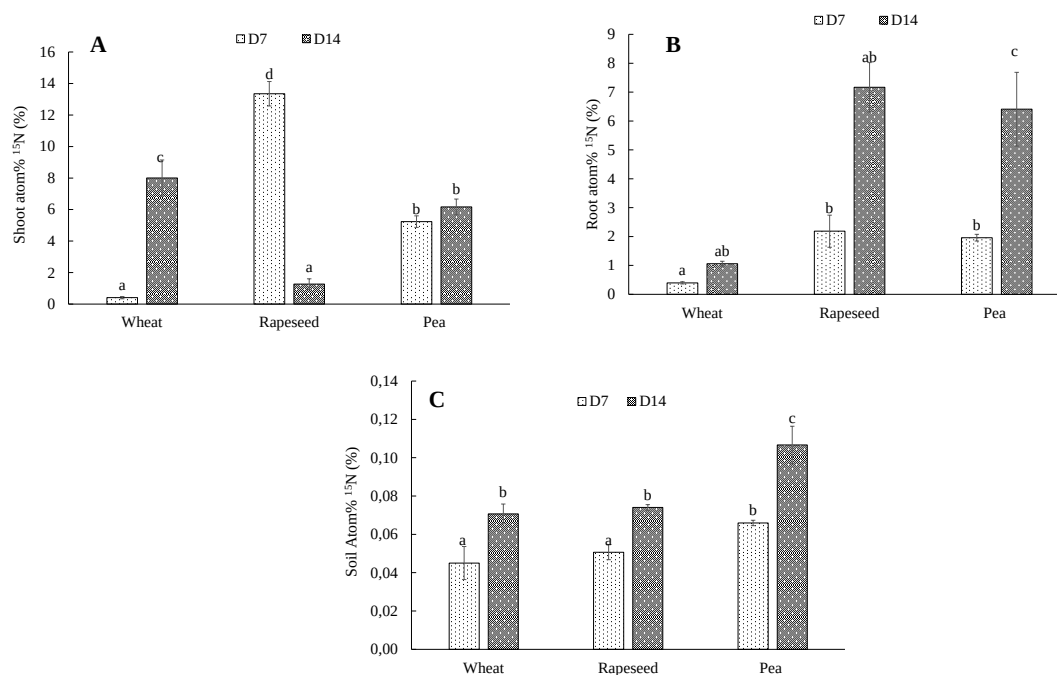


Figure 1. ^{15}N atom excess (%) distribution in each compartment of pea (*Pisum aestivum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum sativum* L.), (A) ^{15}N atom excess (%) in shoot ; (B) ^{15}N atom excess (%) in root ; (C) ^{15}N atom excess (%) in soil. Values are means $\pm$ SE (n = 5). The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests (p < 0.05), common letters indicate that there is no significant difference between bars. D7 : 7 days after labelling and D14 : 14 days after labelling.

3.1.2 Dry biomass partitioning and ^{15}N quantification

Plants shoots and roots total dry biomasses were determined at each harvest time (Table 2). At D7, rapeseed presented the lowest root dry biomass. In contrast, no significant difference was observed for shoot total dry biomass for the three species. At D14, wheat presented the lowest shoot dry biomass and greatest root dry biomass.

Table 2. Plant dry biomass portioning at 7 and 14 days after labelling (D7, D14). *The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests ($\pm$ SE; $n=5$; $p<0.05$). Common letters on the same vertical line indicate that there is no significant difference between species.*

	D7								D14							
	Shoot (mg)				Root (mg)				Shoot (mg)				Root (mg)			
Wheat	258,8	$\pm$	109,4	a	121,1	$\pm$	36,3	a	602,5	$\pm$	78,0	b	235,0	$\pm$	50,7	a
Rapeseed	395,4	$\pm$	60,6	a	58,0	$\pm$	17,1	b	932,5	$\pm$	185,2	ab	110,0	$\pm$	50,0	b
Pea	409,8	$\pm$	169,2	a	178,6	$\pm$	32,4	a	1185,0	$\pm$	203,4	a	193,3	$\pm$	50,3	b

^{15}N amount was determined in each compartment using dry biomass and ^{15}N enrichment (Figure 2). ^{15}N amount in shoot was significantly higher in pea at D7 (Figure 2A). In contrast, wheat shoot had the lowest amount. At D14, pea shoot had the highest amount of ^{15}N comparing to other species. The same result was observed at D7 and D14 in ^{15}N amount in root (Figure 2B). ^{15}N in soils increased between the two harvest times for each species (Figure 2C). Pea presented the highest amount.

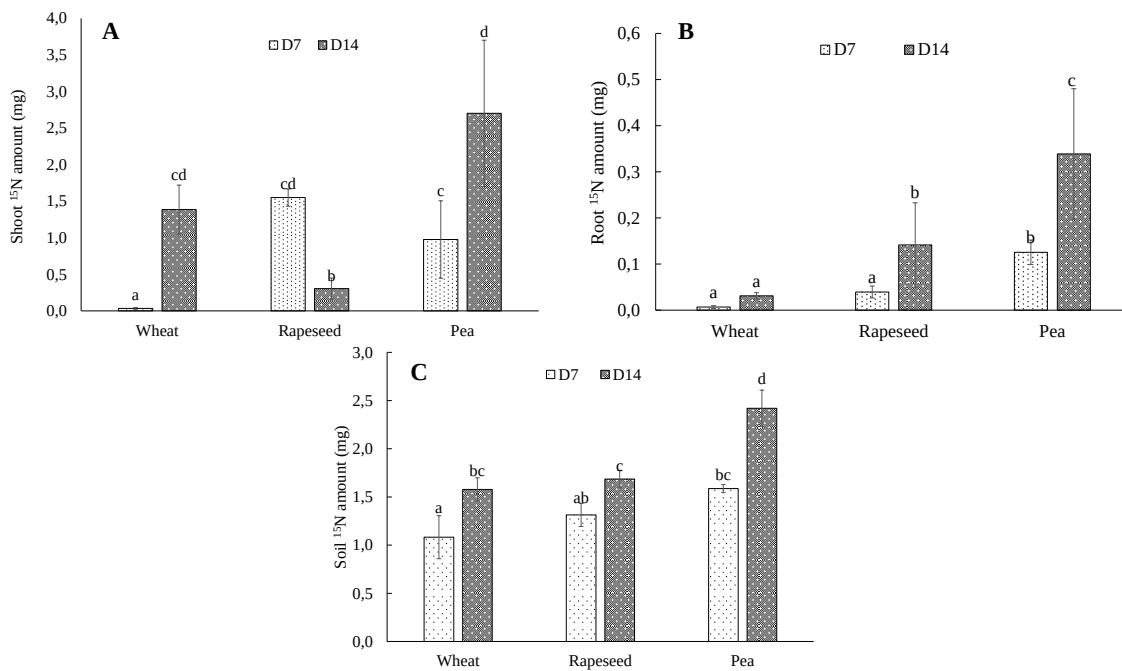


Figure 2. ^{15}N amount (mg) recovery in each compartment of pea (*Pisum aestivum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum sativum* L.), (A) shoot ^{15}N amount ; (B) Root ^{15}N amount ; (C) Soil ^{15}N amount . Values are means $\pm$ SE ($n = 5$). The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests ($p < 0.05$), common letters indicate that there is no significant difference between bars. D7 : 7 days after labelling and D14 : 14 days after labelling.

Aboveground ^{15}N (ABG^{15}N) and belowground ^{15}N derived from rhizodeposition ($\text{BG}^{15}\text{NdfR}$) expressed as proportion, were similar in pea and wheat with on average 53 % of total ^{15}N (shoot + root+ soil). In contrast rapeseed presented the lowest ABG^{15}N and the highest $\text{BG}^{15}\text{NdfR}$ (Figure 3).

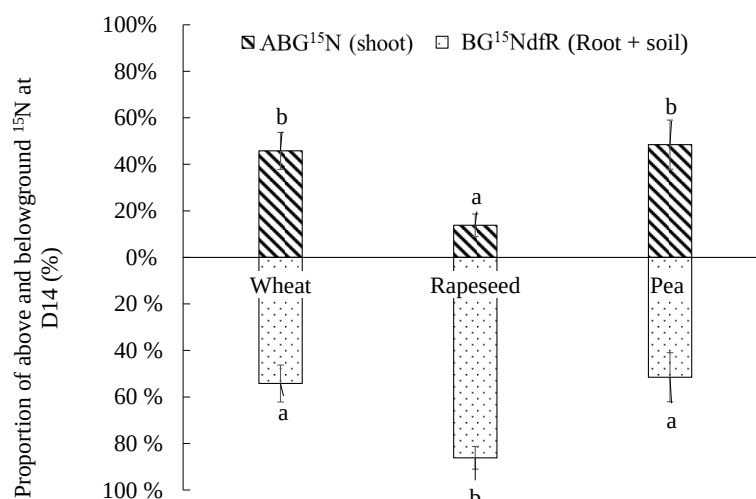


Figure 3. Proportion (%) of aboveground ^{15}N (ABG ^{15}N) and belowground ^{15}N derived from rhizodeposition (BG $^{15}\text{NdrR}$) relative to total ^{15}N in plant-soil system at D14. Values are means $\pm$ SE ($n = 5$). The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests ($p < 0.05$), common letters indicate that there is no significant difference between bars.

Plants: pea (*Pisum Sativum* L.), rapessed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.)

3.2 Plants root exudates

3.2.1 Plant growth

After germination process, plants were transferred in hydroponic system (Figure 4). Pea and wheat plants grew properly in this condition (at a day/night cycle: 16h, 23 ± 2 °C / 8h, 23 ± 2 °C). While rapeseed plants withered and turn yellow 2 days after transfer. We have chosen to carry on the experiment with pea and wheat.



Figure 4. Hydroponic system implemented in our laboratory for pea (*Pisum Sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) root exudates collection

3.2.2 Identification of induced root exudates

High-performance liquid chromatography analyses of methanolic extracts of exudates from pea (Figure 5) and wheat (Figure 6) plants showed a clear increase in exudation over time. The exudation was higher after 48h of collection than 24h. UV spectra were extracted from the chromatograms and compared with a UV spectra library containing 160 spectra of pure aromatic compounds from the family of phenylpropanoids, indolics and flavonoids. The metabolic profiling of pea exudate led to the detection of 30 compounds, and to the identification of 8 compounds, as daidzein, sophorol, maackiain, dihydroxy-dimethoxyflavone, formononetin, pisatin, hydroxymaackiain and DMDI. Mostly of these compounds are iso flavonoids. Two have been formally identified, pisatin and formononetin. For the others we failed in identifying them. For wheat root exudates, 15 compounds were detected but not identified.

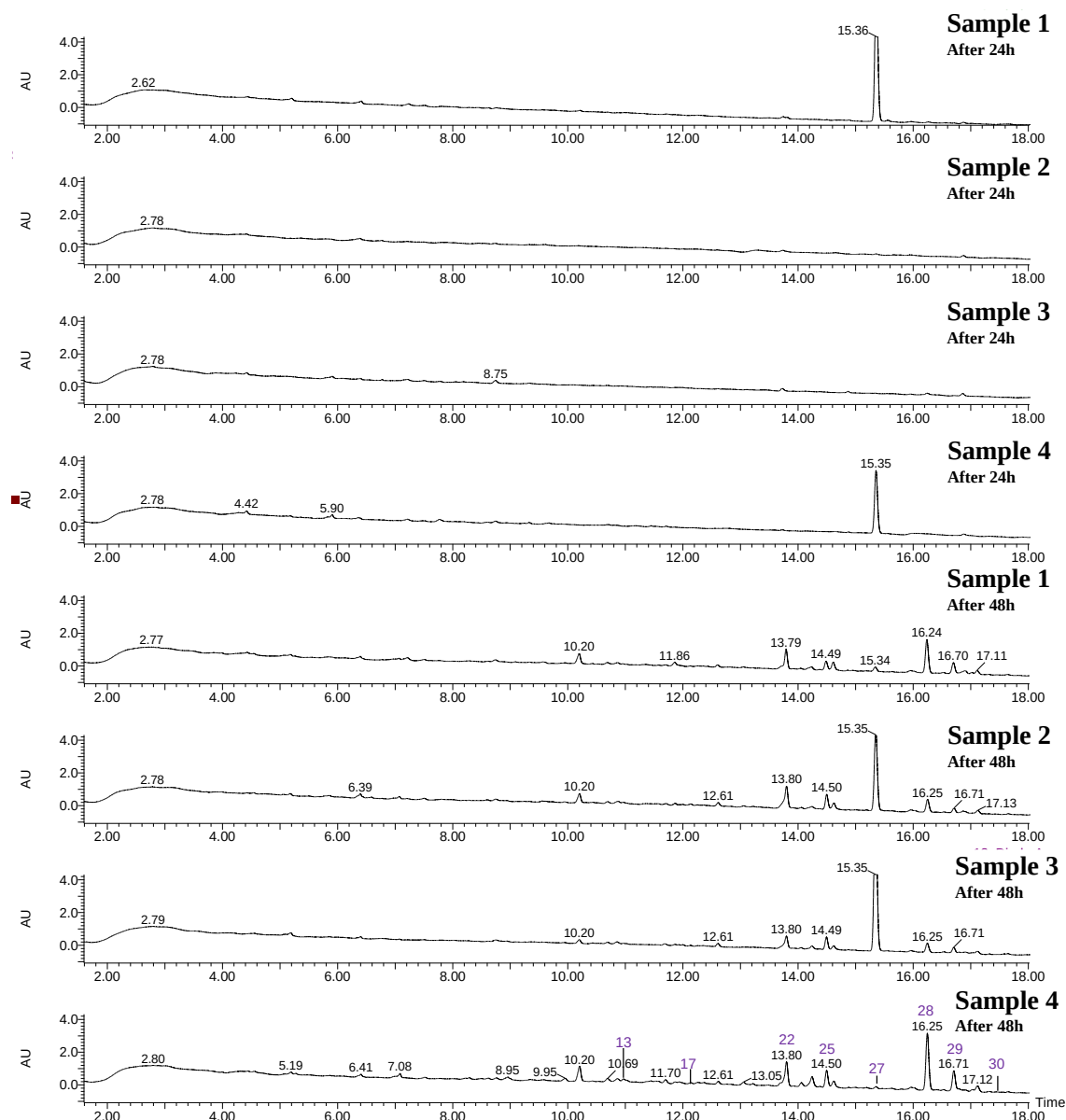


Figure 5. Chromatographic kinetics of winter pea (*Pisum Sativum* L.) roots exudates after 24h and 48h of exudate sampling (n=4). (13) daidzein, (17) sophorol, (22) maackiain, (25) dihydroxy-dimethoxyflavone, (27) formononetin, (28) pisatin, (29) hydroxymaackiain and (30) DMDI.

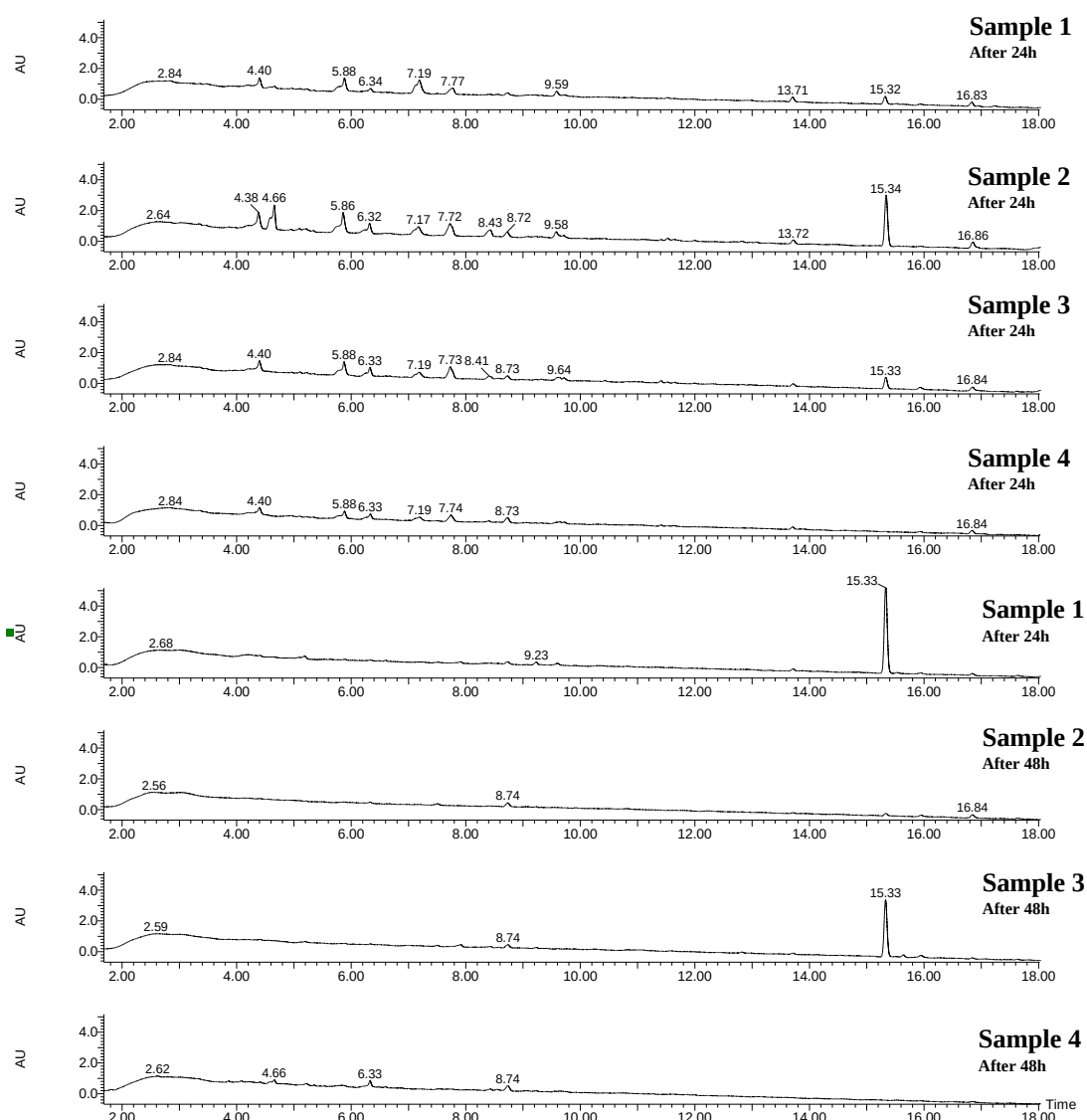


Figure 6. Chromatographic kinetics of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots exudates after 24h and 48h of exudates sampling (n=4)

4. Discussion

4.1 Estimation of belowground N derived from rhizodeposition

This study allowed determination of N flow from plant to belowground (root + soil) in pea, rapeseed, and wheat. Pea had more belowground N (root + soil) than other species. These results agree with several studies (Khan et al., 2002; Zang et al., 2018). Using ^{15}N shoot labelling led to important enrichment and distribution of ^{15}N in plant tissues to allow an estimation of N rhizodeposition. Mass balance approach is an interesting tool to estimate N rhizodeposition

(Khan et al., 2002; Hupe et al., 2016). BG¹⁵NdfR increased between the 2 harvest periods for each species, it is probably linked to increasing root biomass senescence and root exudation during plant growth (Wichern et al., 2008). However, pea had the greatest amount of ¹⁵N in belowground due to its capacity to fix atmospheric N and nodule turnover contribution (Arcand et al., 2013). As a proportion of total ¹⁵N (ABG¹⁵N+ BG ¹⁵NdfR), pea, wheat and rapeseed presented 52 %, 54 % and 86 %, respectively. The study conducted by Fustec et al. (2010) showed that the proportions of ¹⁵N varied on average between 14 % to 71 %, which are in accordance with our results.

Different isotope labelling methods were used by several authors to study belowground N of various plants. Using cotton wick method, a high proportion of belowground N was found at early vegetative state (71 %) and this proportion decreased until maturity (Wichern et al., 2007). In our study, belowground N for rapeseed was more important during the vegetative stage and this proportion decreased during the reproductive phase. Mayer et al, (2003) reported that belowground N represented 15 %, 14 %, 17 % of total N in pea, faba bean and lupine respectively at maturity using ¹⁵N stem feeding. In soya bean, belowground N ranged between 20 – 30 % of total N at maturity using cotton wick method (Zang et al., 2018). Rroco and Mengel, (2000) showed that belowground N in wheat varied between 16 and 24 % at maturity, but the seedlings were cultivated in the nutrient solution for 3 weeks, this time being required to reach a sufficient amount of ¹⁵N in the plants, and these results disagree with ours. In contrast, Jensen, (1996) showed an increase at the maturity stage in belowground N pea and barley using ¹⁵N split-root labelling. The same variation pattern was observed in mungbean using cotton wick method. This result is mainly due to root biomass turnover (Zang et al., 2015). In field condition, belowground N is more important than those obtained in greenhouse pot experiment due to a root growth constraint in pots (Hupe et al., 2019).

Overall, rhizodeposition quantification is highly dependent on plant species, development stage, labelling methods and environmental conditions (Canarini et al., 2019; Vives-Peris et al., 2020). These observations highlight the importance of rhizodeposition estimation with different species under different environmental conditions with considering plant development stage.

4.2. Root exudates composition

Root exudates are important regulators of plant rhizospheres. They can modulate the composition and dynamics of soil microorganisms and participate in the dialogue between plants and microorganisms (Baetz and Martinoia, 2014). They are known to modulate plant germination and growth of soil microorganisms and may contribute to crop resistance to soil-borne pathogens (Oburger and Jones, 2018). Plants release a multitude of organic compounds into the rhizosphere, some of which are flavonoids (Rispaill et al., 2017; Gargallo-Garriga et al., 2018). These products of secondary metabolism have antioxidant properties and participate in the induction of nodulation genes in rhizobia for rhizobium-legume symbiosis (Hirsch et al., 2013; Skorupska et al., 2017). However, it has been demonstrated that flavonoids can also affect nutrient availability through soil chemical changes (Cesco et al., 2010; Baetz and Martinoia, 2014). Moreover, flavonoids can exert various protective functions in plants, comprising roles in allelopathic growth inhibition of competitors (Treutter, 2005), or suppression of pathogens (Iwashina, 2003). Our results showed that pea root exudates are mostly represented by iso flavonoids especially pisatin and formononetin. Isoflavonoids, such as formononetin and their glycosides have been implicated in autoallelopathy (Cesco et al., 2010). Phytoalexin pisatin, are also a crucial class of compounds with potent antimicrobial properties in legumes such as the pea (*Pisum sativum* L.) (Weisskopf et al., 2006, Wu and VanEtten, 2004). It was reported that, the tissue-specific release of pisatin from the root tip can be stimulated by pathogen elicitation (Cannesan et al., 2011).

A variety of compounds have been previously reported from root exudates (Dakora and Phillips, 2002; Walker et al., 2003; Badri and Vivanco, 2009; Chaparro et al., 2013; Strehmel et al., 2014). In our study, several compounds were detected but none identified for wheat root exudates. These compounds could include amino acids (alanine, glutamate, serine, proline...) (Warren, 2015), organic acids (Neumann and Römheld, 1999; Wu et al., 2017), phytosiderophores (Fan et al., 2001; Oburger et al., 2014; Warren, 2015) and phenolic compounds (Wu et al., 2017), quaternary ammonium compounds such as betaine and choline (de Rudder et al., 1999; Fan et al., 2001), nucleobases and nucleosides (Dakora and Phillips, 2002; Strehmel et al. 2014). In hydroponic condition, Warren. (2015) identified a large diversity of compounds in root exudates of wheat. A total of 110 compounds were detected of which 74 were positively identified, 29 were putatively identified and 7 could not be identified, this was the case in our study. In fact, for wheat exudates, 15 compounds only were detected but none identified. This work will obviously be completed by the identification of wheat compounds and by optimizing the protocol of rapeseed germination.

The analysis of root exudates is highly dependent on their collection, quantification, and the identification of their constituent components. Several methods are used for the collection of root exudates, each with advantages and disadvantages (Neumann et al., 2009; Oburger et al., 2013; Kawasaki et al., 2018). The most common method of root exudate collection is hydroponic plant culture because hydroponic systems are easy to implement. For exudates collection, the plants are transferred into a sterile solution (*i.e.* water) for a period ranging from a few hours to a few days (Aulakh et al., 2001; Badri and Vivanco, 2009; Jaitz et al., 2011). For that, in our laboratory we implemented a hydroponic device based on the aforementioned issues, which enabled a correct growth of wheat and pea plants (Figure 4).

Although the benefits of the use of hydroponic systems, some authors report that these systems exhibit significant limitations (Neumann et al., 2009). These systems lead to changes

in plant root architecture in the absence of a physical matrix for root maintenance and, at the same time, nutrient availability is far removed from that of soil system (Preece and Penuelas, 2020). Moreover, periodically renewed solutions (*i.e.* growth solution and exudate collection solution) can alter plant growth and thus root exudation (Badri and Vivanco, 2009; Li et al., 2006; Chaparro et al., 2013, Kawasaki et al., 2018). In our case, the growth of pea and wheat was achieved for two months in hydroponic systems. No specific problems of growth were observed, despite the two non-destructive collecting procedure of exudates at two growth stages. In this context, numerous reports in the literature showed that despite the artificial nature of the hydroponic system, the physiological processes described under sterile hydroponic conditions reflected the same processes occurring in soil-grown plants (Kawasaki et al., 2018).

Conclusion

Pea, rapeseed, and wheat can be labelled efficiently by ^{15}N shoot labelling coupled with mass balance approach. These approaches allowed comparison of ^{15}N flow in plant-soil system. Pea contributed more to soil N input through rhizodeposition than wheat and rapeseed. Legumes can use photosynthetic energy to fix atmospheric N by rhizobium-legume symbiosis and this result in greatest N rhizodeposition. However, it will be interesting to quantify the part of N derived from N fixation. Rhizodeposition varies according plants species, their growth stages and their nutrient use strategies. In this study, pea and wheat were at the beginning of their reproductive stage. In this case, resources (N) are mobilized for the reproductive organs. This observation could explain the low proportion of BG $^{15}\text{Nd}fR$ for pea and wheat compared to rapeseed. Concerning root exudates, our hydroponic device helped us to collect plants root exudates and to widely characterize pea exudate mainly represented by isoflavonoids. Increase our knowledge on crops exudation and rhizodeposition is of major concern to have a better understanding of interactions mechanisms in the rhizosphere between plants and microbes in

this complex soil matrix. This will provide new opportunities for agroecology solutions to deal with plant nutrition and health management by decreasing inputs, climate change adaptation.

Acknowledgments

This project, named VIVEPOIS, has been founded by the Normandy region. The authors would like to thank the members of Chambre d'agriculture of Seine-Maritime (Normandy), François D'Hubert, and the farmers of the association of economic and environmental interest group (GIEE) "pois d'hiver", who provided soil and seeds for this experiment. The authors would like also to thanks also Plateau d'Isotopie de Normandie platform for IRMS analyses and Tours University for HPLC analyses.

References

- Anglade, J., Billen, G., Garnier, J., Garnier, J., 2015. Relationships for estimating N₂ fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere* 6, art37. <https://doi.org/10.1890/ES14-00353.1>
- Lanoue, A., Burlat, V., Henkes, G.J., Koch, I., Schurr, U., Röse, U.S.R., 2010. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to Fusarium attack in barley. *New Phytologist* 185, 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03066.x>
- Arcand, M.M., Knight, J.D., Farrell, R.E., 2013. Temporal dynamics of nitrogen rhizodeposition in field pea as determined by ¹⁵N labeling. *Canadian Journal of Plant Science* 93, 941–950. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-050>
- Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., 2001. Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biology* 3, 139–148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12905>
- Azeez, Z.A., Bozhkov, A.I., Mahmood, M.T., Kovalova, M.K., 2019. the species composition of epiphytic microorganisms and their influence on roots excretory activity of wheat and pea seedlings 11.
- Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* 32, 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Baetz, U., Martinoia, E., 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* 19, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>
- Byrnes, B.H., 1990. Environmental effects of N fertilizer use — An overview. *Fertilizer Research* 26, 209–215. <https://doi.org/10.1007/BF01048758>
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W., 2019. Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>
- Cannesan, M.A., Gangneux, C., Lanoue, A., Giron, D., Laval, K., Hawes, M., Driouich, A., Vitré-Gibouin, M., 2011. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany* 108, 459–469. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr177>
- Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., Weiskopf, L., 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil* 329, 1–25. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0266-9>
- Chalk, P.M., Smith, C.J., 2017. ¹⁵N methodologies for estimating the transfer of N from legumes to non-legumes in crop sequences. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 107, 279–301. <https://doi.org/10.1007/s10705-017-9842-1>
- Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M., 2013. Root Exudation of Phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *PLOS ONE* 8, e55731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055731>
- Cortignani, R., et Dono, G., 2020. Greening and legume-supported crop rotations: An impacts assessment on Italian arable farms. *Science of the Total Environment* 734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139464>
- Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments, in: Adu-Gyamfi, J.J. (Ed.), *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–213. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1570-6_23
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R., 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72, 313–327. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x>
- Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Shenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D., Higashi, R.M., 2001.

- Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry* 57, 209–221. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00007-3)
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.-B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 57–66. <https://doi.org/10.1051/agro/2009003>
- Gargallo-Garriga, A., Preece, C., Sardans, J., Oravec, M., Urban, O., Peñuelas, J., 2018. Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery. *Scientific Reports* 8, 12696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30150-0>
- Götz, K.P., Herzog, H., 2000. Distribution and Utilization of ¹⁵N in Cowpeas Injected into the Stem Under Influence of Water Deficit. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 36, 111–121. <https://doi.org/10.1080/10256010008032937>
- Gransee, A., Wittenmayer, L., 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 381–385. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<381:AID-JPLN381>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<381:AID-JPLN381>3.0.CO;2-7)
- Hirsch, P.R., Miller, A.J., Dennis, P.G., 2013. Do Root Exudates Exert More Influence on Rhizosphere Bacterial Community Structure Than Other Rhizodeposits?, in: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 229–242. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch22>
- Hoekenga, O.A., Vision, T.J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., Lee, G.P., Howell, S.H., Kochian, L.V., 2003. Identification and Characterization of Aluminum Tolerance Loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* × *Columbia*) by Quantitative Trait Locus Mapping. A Physiologically Simple But Genetically Complex Trait. *Plant Physiology* 132, 936–948. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023085>
- Horrigan Leo, Lawrence Robert S, Walker Polly, 2002. How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives* 110, 445–456. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110445>
- Hupei, A., Schulz, H., Bruns, C., Haase, T., Heß, J., Dyckmans, J., Joergensen, R.G., Wichern, F., 2019. Get on your boots: estimating root biomass and rhizodeposition of peas under field conditions reveals the necessity of field experiments. *Plant and Soil* 443, 449–462. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04238-z>
- Hupei, A., Schulz, H., Bruns, C., Joergensen, R.G., Wichern, F., 2016. Digging in the dirt – Inadequacy of belowground plant biomass quantification. *Soil Biology and Biochemistry* 96, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.014>
- Hütsch, B.W., Augustin, J., Merbach, W., 2002. Plant rhizodeposition an important source for carbon turnover in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 397–407. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200208\)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C)
- Iwashina, T., 2003. Flavonoid Function and Activity to Plants and Other Organisms. *Biological Sciences in Space* 17, 24–44. <https://doi.org/10.2187/bss.17.24>
- Jaitz, L., Mueller, B., Koellensperger, G., Huber, D., Oburger, E., Puschenreiter, M., Hann, S., 2011. LC–MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, 2587–2596. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4090-0>
- Janzen, H.H., 1990. Deposition of nitrogen into the rhizosphere by wheat roots. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 1155–1160. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90043-Y](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90043-Y)
- Jensen, E.S., 1996. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 65–71. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00116-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00116-6)
- Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D., 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at

- the soil–root interface. *Plant and Soil* 321, 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Kawasaki, A., Okada, S., Zhang, C., Delhaize, E., Mathesius, U., Richardson, A.E., Watt, M., Gilliam, M., Ryan, P.R., 2018. A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants. *Plant Methods* 14, 114. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0380-x>
- Khan, W.D.F., Peoples, M.B., Herridge, D.F., 2002. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. *Plant and Soil* 245, 327–334. <https://doi.org/10.1023/A:1020407006212>
- Kuzyakov, Y., Domanski, G., 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 421–431. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<421:AID-JPLN421>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<421:AID-JPLN421>3.0.CO;2-R)
- Li, B., Li, Y.-Y., Wu, H.-M., Zhang, F.-F., Li, C.-J., Li, X.-X., Lambers, H., Li, L., 2016. Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N₂ fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 6496–6501. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523580113>
- Mayer, J., Buegger, F., Jensen, E.S., Schlöter, M., Heß, J., 2003. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a ¹⁵N in situ stem labelling method. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00212-2)
- Neumann, G., Römhild, V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211, 121–130. <https://doi.org/10.1023/A:1004380832118>
- Neumann, G., George, T.S., Plassard, C., 2009. Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox. *Plant and Soil* 321, 431–456. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9953-9>
- Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23, 375–396. <https://doi.org/10.1051/agro:2003011>
- Oburger, E., Dell‘mour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2013. Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany* 87, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.11.007>
- Oburger, E., Gruber, B., Schindlegger, Y., Schenkeveld, W.D.C., Hann, S., Kraemer, S.M., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., 2014. Root exudation of phytosiderophores from soil-grown wheat. *New Phytologist* 203, 1161–1174. <https://doi.org/10.1111/nph.12868>
- Oburger, E., Jones, D.L., 2018. Sampling root exudates – Mission impossible? *Rhizosphere* 6, 116–133. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004>
- Palta, J.A., Fillery, I.R., Mathews, E.L., Turner, N.C., 1991. Leaf Feeding of [¹⁵N]Urea for Labelling Wheat With Nitrogen. *Functional Plant Biology* 18, 627–636. <https://doi.org/10.1071/pp9910627>
- Paterson, E., Gebbing, T., Abel, C., Sim, A., Telfer, G., 2007. Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytologist* 173, 600–610. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01931.x>
- Paynel, F., J Murray, P., Bernard Cliquet, J., 2001. Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and Soil* 229, 235–243. <https://doi.org/10.1023/A:1004877214831>
- Rasmussen, J., Gylfadóttir, T., Dhalama, N.R., De Notaris, C., Kätterer, T., 2019. Temporal fate of ¹⁵N and ¹⁴C leaf-fed to red and white clover in pure stand or mixture with grass – Implications for estimation of legume derived N in soil and companion species. *Soil Biology and Biochemistry* 133, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.011>
- Rispail, N., Bani, M., Cimmino, A., Evidente, A., Rubiales, D., 2017. Constitutive secretion of pisatin in root exudates participates in pea defence against *Fusarium oxysporum* f. sp.

- pisi. <https://doi.org/10.13039/501100000780>
- Roço, E., Mengel, K., 2000. Nitrogen losses from entire plants of spring wheat (*Triticum aestivum*) from tillering to maturation. *European Journal of Agronomy* 13, 101–110. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(00\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(00)00068-X)
- Rudder, K.E.E. de, Sohlenkamp, C., Geiger, O., 1999. Plant-exuded Choline Is Used for Rhizobial Membrane Lipid Biosynthesis by Phosphatidylcholine Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 20011–20016. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.20011>
- Russell, C.A., Fillery, I.R.P., 1996. Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 47, 1047–1059. <https://doi.org/10.1071/ar9961047>
- Russelle, M.P., Allan, D.L., Gourley, C.J.P., 1994. Direct assessment of symbiotically fixed nitrogen in the rhizosphere of alfalfa. *Plant and Soil* 159, 233–243. <https://doi.org/10.1007/BF00009286>
- Sainju, U.M., Ghimire, R., Pradhan, G.P., 2019. Nitrogen Fertilization I: Impact on Crop, Soil, and Environment. *Nitrogen Fixation*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86028>
- Schneider, A., Huyghe, C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Editions Quae.
- Schweinsberg-Mickan, M.S. zu, Jörgensen, R.G., Müller, T., 2012. Rhizodeposition: Its contribution to microbial growth and carbon and nitrogen turnover within the rhizosphere. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 750–760. <https://doi.org/10.1002/jpln.201100300>
- Shen, H., Yan, X., Zhao, M., Zheng, S., Wang, X., 2002. Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates. *Environmental and Experimental Botany* 48, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00009-6)
- Skorupska, A., Kidaj, D., Wielbo, J., 2017. Flavonoids and Nod Factors: Importance in Legume-Microbe Interactions and Legume Improvement, in: Zaidi, A., Khan, M.S., Musarrat, J. (Eds.), *Microbes for Legume Improvement*. Springer International Publishing, Cham, pp. 75–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_3
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S., Scheel, D., 2014. Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 108, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.003>
- Treutter, D., 2005. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology* 7, 581–591. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>
- Veerman, L., Kalbitz, K., Schoorl, J.C., Tietema, A., 2018. Split-root labelling to investigate ¹⁵N rhizodeposition by *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 54, 16–27. <https://doi.org/10.1080/10256016.2017.1352586>
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M., 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology* 132, 44–51. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>
- Warren, C.R., 2015. Wheat roots efflux a diverse array of organic N compounds and are highly proficient at their recapture. *Plant and Soil* 397, 147–162. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2612-4>
- Weisskopf, L., Tomasi, N., Santelia, D., Martinoia, E., Langlade, N.B., Tabacchi, R., Abou-Mansour, E., 2006. Isoflavonoid exudation from white lupin roots is influenced by phosphate supply, root type and cluster-root stage. *New Phytologist* 171, 657–668. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01776.x>
- Wichern, F., Mayer, J., Joergensen, R., Müller, T., 2010. Evaluation of the wick method for in situ ¹³C and ¹⁵N labelling of annual plants using sugar-urea mixtures. *Plant and Soil* 329, 105–115. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0138-3>
- Wichern, F., Eberhardt, E., Mayer, J., Joergensen, R.G., Müller, T., 2008. Nitrogen

- rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 30–48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010>
- Wichern, F., Mayer, J., Joergensen, R.G., Müller, T., 2007. Rhizodeposition of C and N in peas and oats after ^{13}C – ^{15}N double labelling under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2527–2537. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.022>
- Wu, H., Wang, X., He, X., Zhang, S., Liang, R., Shen, J., 2017. Effects of root exudates on denitrifier gene abundance, community structure and activity in a micro-polluted constructed wetland. *Science of The Total Environment* 598, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.150>
- Wu, Q., VanEtten, H.D., 2004. Introduction of Plant and Fungal Genes into Pea (*Pisum sativum* L.) Hairy Roots Reduces Their Ability to Produce Pisatin and Affects Their Response to a Fungal Pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 798–804. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.7.798>
- Yasmin, K., Cadisch, G., Baggs, E.M., 2010. The significance of below-ground fractions when considering N and C partitioning within chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil* 327, 247–259. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0051-9>
- Zang, H., Qian, X., Wen, Y., Hu, Y., Ren, C., Zeng, Z., Guo, L., Wang, C., 2018. Contrasting carbon and nitrogen rhizodeposition patterns of soya bean (*Glycine max* L.) and oat (*Avena nuda* L.). *European Journal of Soil Science* 69, 625–633. <https://doi.org/10.1111/ejss.12556>
- Zang, H., Yang, X., Feng, X., Qian, X., Hu, Y., Ren, C., Zeng, Z., 2015. Rhizodeposition of Nitrogen and Carbon by Mungbean (*Vigna radiata* L.) and Its Contribution to Intercropped Oats (*Avena nuda* L.). *PLOS ONE* 10, e0121132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121132>
- Zebarth, B.J., Alder, V., Sheard, R.W., 1991. In situ labeling of legume residues with a foliar application of a ^{15}N -enriched urea solution. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 22, 437–447. <https://doi.org/10.1080/00103629109368430>

Supplementary data

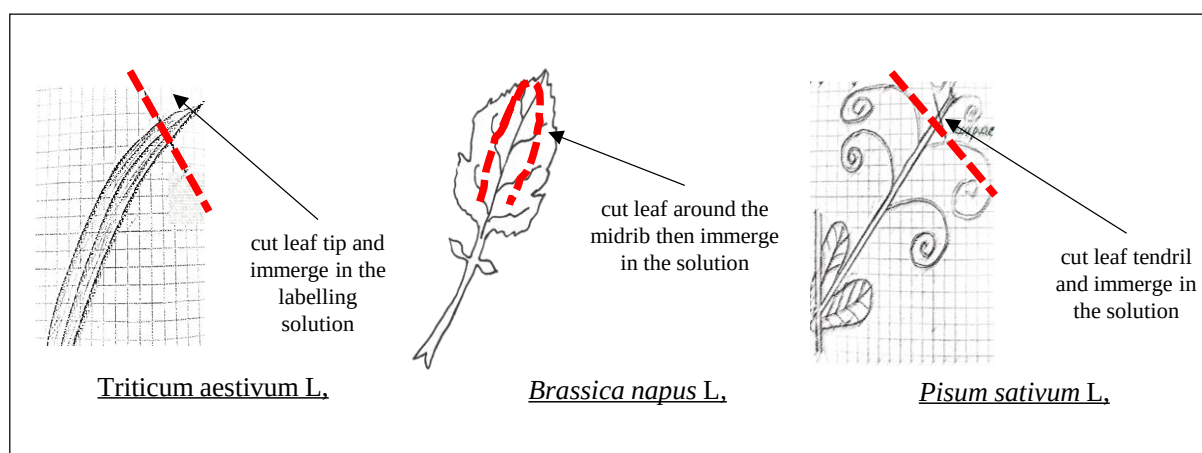


Figure 1. Schema of cutting procedure allowing immersion of the labelled organ in the 2 ml tube containing ^{15}N urea solution.

Chapitre III. Résultats

Article 4

Titre: Linking soil microbial community to C and N dynamics during crop residues decomposition

Linking soil microbial community to C and N dynamics during crop residues decomposition

Cyrine REZGUI¹, Isabelle TRINSOUTROT-GATTIN¹, Marie BENOIT², Karine LAVAL¹, Wassila RIAH-ANGLET¹

¹ UniLaSalle, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, Rouen Team, Mont-Saint Aignan 76134, France

² ISARA, Higher Education institution, Lyon 69007, France

Abstract

Crop residues are among the main inputs that allow soil's organic carbon (C) and nutrients to be maintained in agricultural soil. It is an important management strategy that can improve soil fertility and enhance agricultural productivity. This work aims to evaluate the extent of the changes that may occur in soil heterotrophic microbial communities involved in organic matter decomposition and C and nitrogen (N) mineralization after the addition of crop residues. Soil microcosm experiments were performed at 28°C for 90 days with the addition of three crop residues with contrasting biochemical qualities: pea (*Pisum sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.), and wheat (*Triticum aestivum* L.). Enzyme activities, C and N mineralization, and bacterial and fungal biomasses were monitored, along with the bacterial and fungal community composition, by the high-throughput sequencing of 16S rRNA genes and ITS genes. The addition of crop residues caused a decrease in β -glucosidase and arylamidase activities and simultaneous enhancement of the C mineralization and net N immobilization, which were linked to changes in the soil microbial communities.

The addition of crop residues decreased bacterial and fungal biomasses after 90 days of experiments and showed a shift in bacterial and fungal diversity at phyla, order, and genera levels. Some specific orders and genera were dependent on crop residue type. For example, *Chloroflexales*, *Inquilinus*, *Rubricoccus*, *Clitocybe*, and *Verticillium* were identified in soils with pea residues. Whereas *Thermoanaerobacterales*, *Thermacetogenum*, and *Hypoxylon* were enriched in soils with rapeseed residues, and *Halanaerobiales*, *Rubrobacter*, and *Volutella*

were only present in soils with wheat residues. The findings of this study suggest that the soil's
Cyrine REZGUI, E-mail : Cyrine.Rezgui@unilasalle.fr; Correspondence Wassila RIAH-ANGLET, Tel : +33-2-32829198, E-mail: Wassila.RIAH-ANGLET@unilasalle.fr

Article publié dans Integrative journal of Agriculture. [Doi : 10.1016/S2095-3119\(20\)63567-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63567-5)

C and N dynamics in the presence of the crop residues were driven by the selection of specific bacterial and fungal decomposers linked to the biochemical qualities of the crop residues. If crop residue decompositions showed specific bacterial and fungal Operational Taxonomic Unit (OTU) signatures, this study suggests also the strong functional redundancy that exists among soil microbial communities.

Keywords: crop residues, C and N mineralization, enzyme activities, bacterial and fungal diversity

1. Introduction

C and N transformations from soil organic matter (OM) are mainly (micro) biologically based. Indeed, soil's organic materials are the trophic resources of heterotrophic soil organisms (Paterson *et al.* 2009). OM plays an important role in many ecosystem services provided by soils (Dominati *et al.* 2010). Its degradation by soil organisms allows the turnover of nutrients (mainly C, N, phosphorus (P), and sulfur (S)), which is essential for plant growth and the durability of ecosystems. Crop residue inputs have been proposed as a sustainable and cost-efficient management tool in agricultural practices to preserve soil organic matter (Lehtinen *et al.* 2014; Arcand *et al.* 2016; Shahbaz *et al.* 2017). The long-term balance between soil C inputs through crop residues and losses *via* mineralization and oxidation determines the soil's organic C content and nutrient cycling in the agrosystem (Ghimire *et al.* 2017).

Crop residues often exhibit different physicochemical properties, thereby affecting the soil in different ways. Their biochemical composition and physical structure affect mineralization (Prescott 2010). Some studies demonstrated, under controlled or field conditions, that hemicellulose, lignin, and the physical size of crop residues, affect C and N decomposition rates (Hadas *et al.* 2004; Abiven *et al.* 2005; Cayuela *et al.* 2009; Moreno-Cornejo *et al.* 2014). The soluble C content determines the initial rate of crop residue decomposition (Hadas *et al.* 2004), whereas the lignin content controls the medium- to long-term fate of added C (Trinsoutrot *et*

al. 2000; Nicolardot *et al.* 2007). According to Ghimire *et al.* (2017), the addition of a higher rate of crop residues potentially increases the C mineralization. Moreover, a study conducted by Redin *et al.* (2014) showed that the application of 25 species of crop residues with a broad range of chemical composition affects C mineralization.

In addition, some researchers have investigated the effect of incorporating the residues of different plant organs (roots, leaves, stems, etc.) on C and N mineralization (Trinsoutrot *et al.* 2000; Fang *et al.* 2007; Abera *et al.* 2012; Redin *et al.* 2014). As expected, the plant organs also affected soil N mineralization. Indeed, roots displayed significantly lower N mineralization compared to the shoots and leaves (Abbasi *et al.* 2014). The biochemical composition or quality parameters, such as total N concentration, lignin, cellulose, and hemicellulose contents, exert a significant influence on crop residues' decomposition. In parallel, some ratios and indexes (such as C: N ratio, lignin: N ratio, and lignocellulosic index (LCI)) are considered useful indicators for estimating both decomposition and N release of added residues (Vahdat *et al.* 2011; Abera *et al.* 2012; Abbasi *et al.* 2014).

The heterotrophic microbial communities control the coupling of C and N cycles in soils (Recous *et al.* 2017). Indeed, the diversity and the activity of these microbial communities, as well as the proportions of their major elements (C, N, P, S, etc.) in the crop residues, determine the partition between the C and the N that is mineralized or assimilated in soils (Chen *et al.* 2014). In this case, the relationship between the addition of crop residues and the microbial communities has attracted increasing attention (Pascault *et al.* 2010a; Kriauciūnienė *et al.* 2012; Lee *et al.* 2017; Fang *et al.* 2018; Sauvadet *et al.* 2018). Suleiman *et al.* (2018) indicate that the addition of wheat straw residues causes a change in the diversity and function of microbial communities. Moreover, the addition of different quantities of crop residues promotes the abundance of some bacterial groups (*Bacteroidetes* and *Proteobacteria*), while low-quality crop residues favor fungal abundance (Fang *et al.* 2018). Lian *et al.* (2019) show that soybean

residues significantly impact the bacterial community, resulting in *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Acidobacteria* being enriched at the initial stage of crop residue input.

Microbial communities in soils produce several enzyme activities, which are involved in the decomposition of crop residues (Frasier *et al.* 2016; Lashermes *et al.* 2016; Hünninghaus *et al.* 2017; Luo *et al.* 2017; Zheng *et al.* 2018). Fang *et al.* (2019) showed a significant increase in several enzyme activities (β -glucosidase, Cellobiohydrolase, xylosidase, N-acetyl-glucosaminidase, and aminopeptidase) with a marked increase at ten days after the addition of wheat residues. These authors suggest that these increases in enzyme activities were linked to the stimulation of microbial growth and the abundance of some functional genes. In parallel, Sauvadet *et al.* (2016) show that the relationship between the evolution of microbial communities and the production of enzymes during the decomposition of crop residues is related to residue qualities. Indeed, the study conducted by Amin *et al.* (2014) found that microorganisms exhibited an initial rapid growth in the presence of a high-quality litter and produced enzymes that are not efficient in degrading recalcitrant components. While, in the presence of the more recalcitrant maize roots, microbial biomass grew more slowly but produced enzymes of higher efficiency. This high enzyme efficiency could be explained by the synergistic action of hydrolytic and oxidative enzymes even in the early stages of decomposition.

This study is part of a larger program that aims to evaluate the impact of innovative crop rotations (pea-wheat-barley vs rapeseed- wheat-barley) in the Normandy region of France. As different crops produce various residues, the understanding of residue degradation kinetics and its influence on soil health is of major interest to the evaluation of crop systems. The objective of this paper is to evaluate whether the application of crop residues will affect the soil heterotrophic microbial community involved in OM decomposition and C and N

mineralization. Although the degradation of plants of various quantities and qualities is well-known, its consequences on soil communities and their functions are less well-mastered. To better understand these effects, we have followed at key stages of decomposition the evolution of microbial communities in relation to the main C-N fluxes and the associated enzyme activities for different qualities of crop residues in the pedoclimatic context of Normandy, representative of the northwest of France. The focus was placed on monitoring the abundance and diversity of bacterial and fungal communities, enzyme activities, and C and N mineralization as a result of incorporating contrasting crop residues (legume and non-legume crop residues) harvested in the field.

2. Materials and methods

2.1 Soil sampling

The soil was collected from an arable field located in the Normandy region (France). This region has a temperate oceanic climate, with a mean annual rainfall ranging from 80–110 mm. The soil is sandy loam, classified as luvisol. This soil was chosen because of its characteristics, which are representative of the common pedological types of soil in Normandy. Soil samples were collected randomly from a depth of 0–20 cm from three points in each plot, using a soil auger. The soil analysis indicated that the soil texture was characterized by 6.56% clay, 68.10% silt, and 25.34% sand, with a mean pH (soil H₂O) of 7.6 in the topsoil. The average soil C and N contents were 17.14 ± 3.82 and 1.27 ± 0.07 g kg⁻¹ of dry soil, respectively. Before drying, 20 g of fresh sieved soil was used to determine water content by drying the soil at 105°C for 24 h.

2.2 Collection of crop residues

Three predominant plant species available on-farm were selected as part of the crop rotation. These included pea (*Pisum sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.), and wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop residues (stem and leaf) were dried at room temperature until they were analyzed, milled, and passed through a 1-mm sieve. Triplicate samples of crop residues were

taken and analyzed for their C, N, soluble (SOL) compounds, hemicellulose (HEM), cellulose (CEL), and lignin (LIG) concentration. Total C and N contents of the residues were determined using an elemental analyzer (NA, 2000; Fisons Instruments, Milan, Italy). This technique is based on the quantitative “dynamic flash combustion” method.

To characterize the biochemical composition of decomposing residues, the SOL compounds of the dried residues were determined by hot water extraction (100°C) for 30 min, followed by extraction with a neutral detergent (100°C) for 60 min using the method described by Linères and Djakovitch (1993). The resulting non-extracted material was then successively subjected to selective extraction for HEM and CEL, as described by Van Soest (1963). The mass of the residues was weighed after each step in the serial extraction: the difference between the mass of the material subjected to specific extraction and the mass of the residues accounted for a specific component. The mass of the final residual non-extractable fraction of the plant material was considered as LIG mass. From biochemical fractionation, the LCI was calculated as described by Melillo *et al.* (1989). It corresponds to the ratio between the content of crop residues in LIG and the sum of the content of LIG, CEL, and HEM [LCI=ratio of lignin/(lignin+cellulose+hemicellulose)].

2.3 Laboratory incubations

Fresh soil, equivalent to 25 g of dried soil, was weighed and transferred into glass jars. Distilled water was added to the soil to achieve a soil moisture content of 80% of field capacity. The treatments comprised of a control without the addition of crop residues and three crop-residue sources, i.e., pea (*Pisum sativum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop residues were weighed and added into the jars at a rate equivalent to 2‰ of organic C of the crop residues’ weight, which corresponded to 0.114, 0.109, and 0.106 g for pea, rapeseed, and wheat, respectively. Incubation experiments were conducted under constant C and no limiting N conditions, according to XP U44-163 (AFNOR 2009). Then, 25 g of dry

soil mixed with crop residues was incubated in 2 L glass jars for CO₂ monitoring and in 50 mL plastic containers for determination of mineral N and microbiological parameters. These containers were placed in large plastic trays with a few small holes in the covers to allow for gas exchange.

A total of 81 jars corresponded to soils with added pea, rapeseed, and wheat residues (three treatments) and soils without crop residues (control)×9 incubation times (1, 3, 7, 14, 21, 28, 49, 70, and 90 days)×3 replicates for CO₂ monitoring. A total of 45 jars for mineral N monitoring (3 treatments+controls ×5 incubation times (1, 7, 14, 49, and 90 days)×3 replicates) were used, and some of them were taken for determination of microbiological parameters (3 treatments+controls×2 incubation times (1 and 90 days)×3 replicates). All jars were placed in a completely randomized design. The soil was then incubated under controlled conditions at 28°C. Soil moisture was checked/adjusted every two days by weighing the glass jars and adding the required amount of distilled water.

2.4. C and N mineralization measurement

The CO₂ produced by the soil was trapped in 10 mL of 0.5 mol L⁻¹ NaOH in a 40 mL flat-bottom flask. The traps were changed periodically to renew the atmosphere in the jars and prevent saturation of the NaOH. The CO₂ produced by the soil and trapped by NaOH was determined by conductimetry using a conductivity meter (Metler Toledo Seven Multi, Darmstadt, Germany)

The initial concentration of total mineral N on day 1 was determined by extracting soil samples with 100 mL of 1 mol L⁻¹ KCl added directly to the flask immediately after incorporation of crop residues. Thereafter, mineral N was extracted by shaking for 1 h with 100 mL of 1 mol L⁻¹ KCl followed by filtration (Whatmann No. 40). Extracts were stored at -20°C until analysis. The total mineral N of the extract was determined by using the Gallery Automated Photometric Analyser-Thermo (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland).

2.5. Total DNA extraction and quantification

Nucleic acids were extracted from 0.5 g of soil using a FastDNA SPIN Kit for soil (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), according to the instructions of the manufacturer. Three replicates were performed for each treatment. DNA was quantified by a fluorimetric measurement using Hoeschst 33258 fluorochrome at 360/460 nm excitation/emission wavelengths, with a Fluorescent DNA Quantitation Kit (Biorad, Hercules, CA, USA) of dsDNA stored at -20°C (Gangneux *et al.* 2011). The DNA extracted from the soil corresponded to the total microbial biomass, and it was expressed as µg of extracted DNA per g of dry soil (µg g⁻¹ dry soil).

2.6. Real-time PCR amplification for bacterial and fungal biomass quantification

The 18S rRNA amplifications for fungal biomass estimation by 18S rDNA real-time qPCR were carried out with a total volume of 25 µL. The qPCR mix was prepared as follows: 5 ng of soil microbial DNA, 0.5 µmol L⁻¹ of each primer [FU18S1 5'-GGAAACTCACCAGGTCCAGA-3' and Nu-SSU-1536 5'-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-3'] (Borneman and Hartin 2000), 25 µL of absolute qPCR SYBR Green Mix (Roche, Basel, Switzerland), and 0.25 mg mL⁻¹ BSA (GeneOn Bioscience, Germany). Standard curves were obtained using serial dilutions of linearized plasmids containing the cloned 18S rRNA gene of *Fusarium graminearum*, and the results are expressed as 18S rRNA gene copy number per gram of dry soil. The amplification protocol (40 cycles of PCR, 20 s at 95°C, 30 s at 62°C, and 30 s at 72°C) was performed using the LightCycler 480 real-time PCR system (Roche, Basel, Switzerland). The efficiency of the qPCR ranged from 95–99%.

The 16S rRNA amplifications for bacterial biomass estimation by 16S rRNA real-time PCR were carried out under the same conditions as the 18S rDNA PCR, except for the primers [63f 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' (Marchesi *et al.* 1998) and BU16S4 5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'] derived from 341F (Muyzer *et al.* 1993). The efficiency of the

qPCR ranged from 98–100%. Standard curves were obtained using serial dilutions of linearized plasmids containing the cloned 16S rRNA genes from the *Pseudomonas aeruginosa*, and the results are expressed as 16S rRNA gene copy number per gram of dry soil. Two independent qPCR assays were performed for the bacterial and fungal dsDNA estimation. Three replicates were performed for each treatment.

2.7. High-throughput sequencing of the bacterial 16S rRNA genes and fungal ITS genes

Sixteen samples of DNA extracted from soil (three soils with added residues and the control soil without residues×2 replicates×2 sampling times: T1 and T90) were analyzed for bacterial 16S rRNA gene and for the ITS region of fungal gene amplicons high-throughput sequencing using the Illumina MiSeq. For each sample, DNA extracted from soils was used for amplification of the V4–V5 hypervariable region of bacterial 16S rRNA gene (Claesson *et al.* 2010) and ITS2 of fungal genes using an optimized and standardized amplicon-library preparation protocol (Metabiote®, GenoScreen, Lille, France). An internal bacterial [artificial bacteria community comprising 17 different bacteria (ABCv2)] and fungal [artificial fungal community comprising 11 different fungi (AFC)] positive control and a negative (sterile water) control were also performed. Briefly, PCR reactions were performed using 5 ng of genomic DNA and 192 fusion barcoded primers (at 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ final concentrations) with an annealing temperature of 50°C for 30 cycles. PCR products were purified using Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA, United States), quantified according to GenoScreen's protocol, and mixed in an equimolar amount. Sequencing was performed using 250-bp paired-end for bacteria and 300-bp paired-end for fungi-sequencing chemistry on the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, United States) at GenoScreen (Lille, France).

The raw paired-end reads (495 447 for bacteria and 1 465 138 for fungi) were demultiplexed per sample and subjected to the following steps: (1) search and removal of both

forward and reverse primers using CutAdapt with no mismatches allowed in the primers' sequences; (2) quality-filtering using the PRINSEQ-lite PERL script (Schmieder and Edwards 2011) by truncating bases at the 3' end with Phred quality score <30; (3) paired-end read assembly using FLASH (Magoč and Salzberg 2011) with a minimum overlap of 30 bases and >97% overlap identity. Taxonomic and diversity analyses were performed with the Metabiote Online v2.0 pipeline (GenoScreen, Lille, France), which is based in part on QIIME software v 1.9.1 (Caporaso *et al.* 2010). Following pre-processing, full-length 16S rRNA gene sequences were checked for chimera sequences (in-house method based on Usearch 6.1). For both bacteria and fungi, similar sequences with a nucleic identity-defined threshold (97% identity for an affiliation at the genus level on the V4–V5 regions of the 16S rRNA gene and the ITS regions, respectively) were clustered with Uclust v1.2.22q (Edgar 2010) through an open-reference OTU-picking process and complete-linkage method, finally generating groups of sequences, or “Operational Taxonomic Units.” An OTU cleaning step, involving elimination of singletons, was performed. The most abundant sequence of each OTU was considered the reference sequence of its OTU and taxonomically compared to a reference database's. The taxonomy of each 16S rRNA and ITS gene sequence was analysed by the RDP classifier algorithm v2.2 (Cole *et al.* 2014) against the database of Greengenes (version 13_8; www.greengenes.gov) for the 16S rRNA gene and UNITE7.0 (alpha version; <https://unite.ut.ee>) for the ITS. Alpha-diversity metrics (Chao1 index) within samples were computed using QIIME v 1.9.1.

2.8. Enzyme activities

Soil enzymes have been reported as useful soil-state bioindicators because they provide information on the soil's ability to perform biogeochemical reactions (Sinsabaugh and Shah 2012; Almeida *et al.* 2015). We have chosen to measure β -D-glucosidase (β -GLU; EC: 3.2.1.21), N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG; EC: 3.2.1.30), and arylamidase (ARYLN; EC: 3.5.1.5) activities, which decompose different substrates with varying complexity (Sinsabaugh

and Follsatd Shah 2012). The GLU enzyme is related to the C cycle, acting in the cleavage of cellobiose into glucose molecules (Almeida *et al.* 2015). The ARYLN enzyme catalyses the hydrolysis of N-terminal amino acids from arylamides (Dodor and Tabatabai 2007). NAG enzymes catalyse the hydrolysis of chitin, which is important in C and N cycling in soils. Both ARYLN and NAG activities are associated with microbial N acquisitions, and they play a major role in N mineralization in soils (Ekenler and Tabatabai 2004; Jian *et al.* 2016). Enzyme activity measurements were performed in 96-well microplates in triplicates (ISO 20130: 2018). Briefly, for β -GLU and NAG activities, 4 g soil samples were mixed for 10 min at 250 rpm with 25 mL water. Soil suspensions were incubated respectively with 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside 0.05 mol L^{-1} (301.3 g.mol^{-1} , Sigma-Aldrichn, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 4-N-acetyl- β -D-glucosaminide 0.01 mol L^{-1} (342.3 g mol^{-1} , Sigma-Aldrichn, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The reaction was stopped (with $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ and 0.1 mol L^{-1} Tris at pH 12) after 1 h, each plate was centrifuged (5 min at 1500 g), and absorbance was measured on a microplate reader (Varioskan Flash-Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The amounts of p-nitrophenol were obtained by measuring the absorbance at $\lambda=405 \text{ nm}$, with comparison to calibration curves.

For ARYLN activity, 4 g soil samples were mixed for 10 min at 250 r min^{-1} with 25 mL Trizma base (50 mmol L^{-1} , pH 7.5). Soil solutions were incubated with L-leucine β -naphthylamide hydrochloride 0.008 mol L^{-1} (292.8 g mol^{-1} , Sigma-Aldrichn, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The β -naphthylamine produced was extracted with acidified ethanol and converted to an azo compound by reacting with p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMCA) (DMCA: $175.23 \text{ g mol}^{-1}$ and ethanol 96%). The amount of β -naphthylamine was obtained by measuring the absorbance at $\lambda=540 \text{ nm}$, with comparison to calibration curves.

Three replicates were performed for each soil (with and without residues) at two sampling times corresponding to the beginning (T1) and the end of the incubation experiment (T90), for a total of 24 samples. Enzyme activities are expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ dry soil).

2.9. Statistical analysis

Statistical tests were carried out to compare the HEM, CEL, LIG, and SOL fractions between the three crop residues. Statistical tests were also carried out to evaluate the effects of the addition of crop residues on the total microbial biomass (dsDNA), the total bacterial and fungal biomasses (16S and 18S rRNA gene copy number), bacterial and fungal diversity (High-throughput sequencing), enzyme activities (β -GLU, NAG, and ARYLN), and C and N dynamics. The measured data were compared by Tukey's test with significant differences at 5% ($P < 0.05$). The diversity of bacterial and fungal communities was analyzed by a Venn diagram. Principal component analysis (PCA) was performed to compare crop residue effects on microbial parameters. The calculations of the correlations between the different parameters were carried out using a Spearman's rank correlation procedure, and the significance level of these correlations was tested using a pairwise t-test. All analyses were performed using R (The R Development Core Team 2019).

3. Results

3.1. Composition of crop residues

The residue C and N contents ranged from 438–467 to 6.1–15.5 g kg^{-1} , respectively. Pea residues exhibited the highest N content, while wheat residues exhibited the highest C content. The biochemical characterization of crop residues showed a significant difference among their compositions (Table 1). Pea residues exhibited the highest SOL fraction (37%) and the lowest content of HEM (2%). The LIG content varied between 6% in wheat residues and 12% in rapeseed residues, whereas the CEL content was equivalent in the three crop residues and corresponded to the most abundant component. For the three crop residues, the C:N ratio ranged

from 28.1 ± 3.06 to 76.6 ± 4.60 (pea residues < rapeseed residues < wheat residues), while the LIG: N ratio varied from 1.24 ± 0.17 – 0.50 ± 0.50 . LIG: N was highest in rapeseed residues, while the lowest values were recorded in the pea residues. Concerning the LCI ratio, rapeseed residues were the most recalcitrant compared to pea and wheat residues (Table 1).

3.2. C and N mineralization after the addition of crop residues

Soils without residues presented the lowest C mineralization ($943 \text{ mg de C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ dry soil}$) compared to soils with added crop residues. In each treatment, net C mineralization was calculated by subtracting mineralized C in the control soil from mineralized C in the soils with residues (Fig. 1-A). During the beginning of the incubation (until day 9), soils with pea residues exhibited the highest C mineralization (Fig. 1-B). Then (until day 90), net C mineralization was similar for soils amended with pea and rapeseed residues ($2200 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ of dry soil}$) and significantly higher for soil with wheat residues ($2400 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ of dry soil}$, Fig. 1-A).

Concerning the N dynamic, it was expressed as net cumulative mineralized N by subtracting the amount of mineral N recovered in control soils (Fig. 2). No matter the added crop residue, the amount of N in soil without residues is higher than the amount found in the soil with crop residues. Therefore, all the residues drove to a net N immobilization during the 90 days of the experiment. Wheat residues showed the highest N immobilization ($309 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ of dry soil}$) compared to rapeseed ($263 \text{ mg kg}^{-1} \text{ of dry soil}$) and pea residues ($182 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ of dry soil}$).

3.3. Enzyme activities after the addition of crop residues

The three tested enzymes did not respond in a similar way to the presence of crop residues (Fig. 3). The β -GLU activity was 1.4 significantly higher in amended soils compared to control soils at the beginning of the experiment. Whereas NAG activities were 1.3 and 1.2 significantly higher after pea and wheat residues, respectively, compared to the control. For ARYLN activity, no significant effect was observed after the addition of crop residues. At the end of the incubation, β -GLU activities decreased by about 6.71% and 7.28% following the addition of

pea and rapeseed residues. The most marked decrease was observed for ARYLN activity, which decreased by about 38% and 35% after the addition of wheat and rapeseed residues. NAG activity was negatively correlated to LIG and LCI; however, no significant effect was observed on its activity after the addition of crop residues. Other measured enzyme activities were not correlated to the biochemical qualities of the crop residues.

3.4. Abundance of the total bacterial and fungal biomasses after the addition of crop residues

At the beginning of the incubation, the addition of crop residues slightly increased total microbial biomass (assessed by the quantification of extracted DNA from soil) compared to the control (about 20%, Table 2). At the end of the incubation (T90), except for soils with pea residues that showed a slight decrease in microbial biomass, no difference was observed between amended soils with rapeseed and wheat residues and the control soil. A significant effect was observed between T1 and T90 on total microbial biomass.

Concerning bacterial biomass (Table 2), no crop residue effect was observed at the end of the incubation. However, a significant increase was observed between soils with added residues and the control at the beginning of the incubation (T1). For fungal biomass, various effects were observed. A significant decrease in soils with added pea and wheat residues and an increase in soils with rapeseed residues was observed at the end of the incubation.

3.5. High-throughput sequencing analysis of the microbial communities after the addition of crop residues.

For bacterial community composition, Miseq sequencing yielded a total of 427 701 single reads, and their distribution ranged from a minimum of 24 622 to a maximum of 35 845 reads per sample of 16S rDNA. The rarefaction curves of the soil's samples reached the plateau for all samples (Appendix A). The OTUs were assigned to 27 phyla, 70 orders, and 200 genera. When the abundance exceeds 1% (>1%) the phyla are considered as dominant in the bacterial

community (López *et al.* 2017; Wang *et al.* 2018; Deng *et al.* 2019). The abundant phyla are shown in Fig. 4-A. Among them, the most dominant phyla corresponded to *Proteobacteria* (48%), which included α -*Proteobacteria* (25%), δ -*Proteobacteria* (9%), β -*Proteobacteria* (7%), and γ -*Proteobacteria* (6%), followed by *Actinobacteria* (19%), *Acidobacteria* (8%), *Bacteroidetes* (8%), *Chloroflexi* (4%), *Nitrospirae* (3%), *Gemmatimonadetes* (2%), and *Firmicutes* (2%).

At the phylum level, *Proteobacteria* were the most abundant group regardless of the sampling time or the considered residues. *Proteobacteria* increased significantly between T1 and T90 in all treatments. *Proteobacteria* varied significantly between the amended soil with wheat residues (48%) and soils with pea and rapeseed residues ($\approx 51\%$). At the end of the incubation, the most significant decrease of β -*Proteobacteria* was observed in the soil with wheat residues, while only a slight decrease for γ -*Proteobacteria* was observed in soil with pea residues. No significant difference was observed for δ -*Proteobacteria* after the addition of residues, whereas the abundance of α -*Proteobacteria* was significantly higher after the addition of rapeseed residues. *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* decreased significantly at T90, especially after the addition of pea and rapeseed residues, respectively. The relative abundance of *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, and *Firmicutes* increased about 1.5, 2, and 1.6 times in soils with wheat, pea, and rapeseed residues respectively, in comparison to the control soil at the end of incubation (T90). The less abundant phyla (<1%) are shown in Fig. 4-B, and they are represented by *Armatimonadetes*, *Elusimicrobia*, *Chlorobi*, *Fibrobacteres*, *GN02*, *OD1*, *WPS-2*, *BHI80-139*, *GAL15*, *OP11*, *WS2*, and *WS3*. Among these phyla, *Armatimonadetes*, *Chlorobi*, *GN02*, *GAL 15*, *WPS-2*, and *OD1* were, in most cases, significantly different between the control and the amended soils at the end of the incubation (T90). Indeed, the relative abundance of *WPS-2*, *WS3*, *Armatimonadetes*, and *GN02* increased significantly compared to the control, while the abundance of *Chlorobi*, *OP3*, *GAL 15*, *Fibrobacteres*, and *OD1*

decreased. Overall, the diversity of the bacterial profile based on minor phyla showed similar profiles in soil amended with rapeseed residues and the control soil, and these profiles were different from those observed in soils amended with wheat or pea residues.

At the order level, five orders (*Chloroflexales*, *Rhodothermales*, *Nitrososphaerales*, *Rickettsiales*, and *Ktedonobacterales*) were identified after the addition of pea residues, mainly dominated by *Rickettsiales* (Fig. 5). Under rapeseed residues, four orders were identified, with the highest abundance in *Thermoanaerobacterales* OTUs. In soils with wheat residues, *Halanaerobiales*, *Rubrobacterales*, *Planctomycetales*, and *Chthoniobacterales* were identified. The bacterial orders were represented by a relatively equal number of OTUs. The number of genera-specific OTUs was higher than those identified for the order level after the addition of three crop residues (Fig. 5). Indeed, 12 genera were identified under pea residues with the highest abundance in *Inquilinus*. Under rapeseed residues, eight genera were observed with an average of equal abundance of OTUs. Seven genera were specifically identified after the addition of wheat residues, mostly represented by OTUs affiliated to *Nocardioides*, *Aquicella*, and *Rubrobacter*.

For fungal community composition, Miseq sequencing yielded a total of 91 571 single reads, and the rarefaction curves of the soil's samples reach the plateau for all samples (Appendix A). The OTUs were assigned to thirteen fungal phyla, including *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota*, etc. The most dominant fungal phyla included *Basidiomycota*, *Ascomycota*, and *Mortierellomycota* (Fig. 6). These phyla are differently impacted by the addition of crop residues. The abundance of *Basidiomycota* and *Ascomycota* increased after the addition of crop residues. *Basidiomycota* was greater after the addition of rapeseed residues. In contrast, the relative abundances of *Ascomycota* identified in the study were significantly higher after the addition of wheat (18.08 ± 2.24 in control and $32.89 \pm 0.78\%$ after the addition of wheat residues) and pea residues (18.08 ± 2.24 in control and $6.98 \pm 1.22\%$

after the addition of pea residues), respectively. *Mortierellomycota* phyla decreased after the addition of the three crop residues and was significantly more important after wheat residues. *Entomophthoromycota* and *Mucoromycota* phyla were present only after the addition of pea and wheat residues, respectively. The addition of crop residues markedly enriched soils with *Cercozoa*; the abundance of this fungal group increased three times after the addition of pea residues and about two times after the addition of wheat and rapeseed residues.

At the order level, two orders (*Chaetosphaeriales* and *Basidiobolales*) were identified after the addition of pea residues, mainly dominated by *Basidiobolales* (Fig. 7). Under rapeseed residues, three orders were selected and were represented by a relatively equal number of OTUs. In soils with wheat residues, six orders were selected, with the highest abundance in *Malasseziales* OTUs.

Among the 275 identified fungal genera, the number of genera-specific OTUs was higher than those identified for the order level under the addition of the three crop residues (Fig. 8). In fact, 20 genera were identified under pea residues with the highest abundance in *Basidiobolus*. 14 genera and 15 genera were specifically identified after the addition of rapeseed and wheat residues, respectively.

3.6. The effects of the biochemical qualities of crop residues on the diversity of bacterial and fungal communities

The effects of crop residues' biochemical qualities on the diversity of bacterial and fungal communities have been studied using a PCA (Fig. 8). The results showed that diversity of soil bacterial and fungal communities is significantly different according to both the addition of crop residues (control vs amended soil) and their biochemical characteristics (pea, wheat, and rapeseed). Based on the diversity of bacterial and fungal communities, the PCA showed three clusters, including control soils, soils with rapeseed or wheat residues and soil with pea residues (Fig. 8). For bacterial and fungal diversities, the two axes of the PCA explain 65.8% of the total

variance. The PCA clearly illustrates the link between the biochemical composition of crop residues and the microbial diversity at the genera and order levels. The PCA score plot revealed that the changes in bacterial and fungal diversity were more pronounced in soils with pea residues in comparison to soils with rapeseed and wheat residues. The specific bacterial genera (*Dongia*, *Collimonas*, *Candidatus Nitrososphaera*, *Inquilius*) and fungal orders and genera (*Basidiobolales*, *Chaetosphaeriales*, *Verticillium*, *Clitocybe*, *Neoascochyta*,) identified under soils amended with pea residues were linked to soluble fraction and total N content of crop residues. While soils amended with rapeseed and wheat residues are not discriminated based on bacterial and fungal genera, some genera seem to be dependent on plant species. The addition of rapeseed residues affected *Niabella*, *Cellvibrio*, and *Hypomicrobium* bacterial genera and *Spiculogloeales*, *Microbotryomycetes_ord_Incertae_sedis*, *Xylariales Udeniomyces*, *Yurkovia*, and *Sordaria* fungal orders and genera, which were strongly linked to the C:N ratio, and in a lesser extent, to lignin and cellulose contents. For soil amended with wheat residues, *Flavobacterium*, *Rubrobacter*, and *Caldilinea* bacterial genera and *Leucosporidiales*, *Mucorales*, *Leucosporidium*, and *Rhizophydium* genera fungal orders and genera were closely correlated to hemicellulose content. The circular arrow in Fig. 8 represents the gradual change in bacterial and fungal diversity, which should be linked to the initial biochemical composition of crop residues. The distribution of bacterial and fungal diversity at genus and order levels highlighted by PCAs are consistent with those described by the Venn diagram (Figs. 5 and 7).

4. Discussion

4.1. Relationship between composition of the crop residues and C mineralization

In this study, a higher rate of C mineralization at the beginning of the incubation (until day 9) was observed after the addition of pea residues, which presented the highest content of SOL compounds (37%) (Fig. 1-B). Bertrand *et al.* (2007) reported that labile compounds (SOL fraction) determine the decomposition rate of crop residues in the early stages. These results

agree with this study's since SOL fraction and net C mineralization (day 1) were significantly correlated ($r=0.74$, $P<0.05$, Appendix B). Concentrations of total sugars as soluble compounds have been considered to exert a dominant control in earlier stages of crop residue decomposition (Johansson *et al.* 2011). Some studies show that legume residues have the highest content of soluble sugars compared to wheat and rapeseed residues, which explains the highest level of C mineralization observed after the addition of pea residues (Hashem *et al.* 2013; Stewart *et al.* 2015). At the end of the incubation, a decline in mineralization rate was observed.

This observation had been previously explained by the increase in crop residues' recalcitrance over time due to the greater proportion of remaining recalcitrant compounds at the end of decomposition (Šnajdr *et al.* 2011; Wickings *et al.* 2012). Literature reported that at late stages, CEL, HEM, and LIG compounds, which are more recalcitrant, defined the decomposition of crop residues (Machinet *et al.* 2011; Šnajdr *et al.* 2011). In our study, however, no significant correlation was found between these recalcitrant fractions and C mineralization rate (Appendix B).

Some researchers have showed a negative correlation between LIG fraction and C mineralization, and they explain that this is due to the resistant nature of LIG to rapid microbial decomposition that promotes the formation of a complex phenyl-propanol structure, which often covers the cellulose-hemicellulose matrix (Stewart *et al.* 2015). Due to the complexity of this matrix, microbial substrate use efficiency for LIG is low because this efficiency decreases with increasing LIG content (Bahri *et al.* 2008; Cotrufo *et al.* 2013). The results of this study showed the highest C mineralization rate in soils with wheat residues, which have the lowest amount of LIG (3%). Crop residues vary in their structural and chemical composition (Adair *et al.* 2008), and their decomposition rates are generally negatively related to the number of recalcitrant compounds present in their biomass, such as lignin, phenols, and tannins (Bertrand

et al. 2007; Castellano *et al.* 2015). In this case, crop residues with the lowest LIG content (less SGH-lignin content) had a higher C mineralization rate (Stewart *et al.* 2015).

4.2. Relationship between crop residues composition and N dynamics

Crop residues incorporation in soils is subject to biological degradation (Berg and McClaugherty 2008). During biological degradation, crop residues' C is used in respiration by decomposers, which releases CO₂ and provides energy (Chen *et al.* 2009). With this energy source, microbial communities absorb N from the soil to promote their propagation. Therefore, the availability of mineral N in the soil can play an important role in the decomposition of crop residues (Chen *et al.* 2014). Its influence depends mainly on the N demand of the microorganisms. In this study, the monitoring of the mineralization kinetics was carried out under non-limiting N conditions so as not to obtain a confounding effect of N availability (Recous *et al.* 1995; Trinsoutrot *et al.* 2000). In this case, it is expected that the N residues' content will not significantly affect the decomposition rate of crop residues. This study's results showed a decrease in the rate of mineral N in the soil after the addition of crop residues. For each residue, a net N immobilization is observed for the entire duration of the incubation. It has been previously demonstrated that crop residues with low N (or with a high C:N ratio >20) lead to N immobilization in the early stages of decomposition (Jensen 1994; Johnson *et al.* 2007).

The results showed an important N immobilization in the soils, with wheat residues presenting the highest proportion between the immobilized N and the N residues content (1.68%). Moreover, a negative correlation was also observed between the rate of mineral N in soils with added residues and the C: N ratio of the crop residues ($r=-0.92$, $P<0.05$; Appendix B). Therefore, microbial activity and N immobilization are favored on residues with a higher rate of mineralized C, such as wheat residues (Hadas *et al.* 2004; Kriaučiūnienė *et al.* 2012), due to the degradation of crop residues and the subsequent consumption of mineral N by the soil's microbial communities.

4.3. Effect of crop residues addition on enzyme activities

In this study, the addition of crop residues induces an immediate increase in hydrolytic enzyme activities (β -GLU and NAG) at the beginning of the experiment. This is consistent with results shown by Amin *et al.* (2014) who demonstrated that the addition of residues increases (cellulase, xylanase, and laccase) enzyme activities after only 10 min of incubation. Other authors have showed stimulation of some enzyme activities (β -glucosidase, cellobiohydrolase, xylosidase, phosphatase, N-acetyl-glucosaminidase) after the addition of wheat residues (Fang *et al.* 2018). This contribution stimulates the growth of starving microbial populations, and therefore, the rate of production of enzymes (Piotrowska and Wilczewsk 2012; Amin *et al.* 2014; Sauvadet *et al.* 2017). ARYLN, which is considered as an N acquiring enzyme (Dodor and Tabatabai 2007), did not change at the beginning of the incubation because of the non-limiting N condition in the soils. At the end of the incubation, a decrease of β -GLU and ARYLN activities was noted, and these two enzymes were strongly correlated to each other ($r=0.78$, $P<0.05$, Appendix B). Hydrolase enzymes are associated with the degradation of parietal polysaccharides (Cusack *et al.* 2010; Bell *et al.* 2014) and peaked at earlier stages of degradation after the addition of crop residues (Rinkes *et al.* 2011; Šnadjr *et al.* 2011). The decrease in these enzyme activities at the end of the experiment could be explained by several factors, including the depletion of less complex organic compounds (Geisseler *et al.* 2009; Piotrowska and Wilczewsk 2012) and the contribution of oxidative enzymes in the degradation of recalcitrant compounds (Piotrowska and Wilczewsk 2012) as demonstrated by the strong negative correlation between NAG activity and LCI ($r=-0.69$, $P<0.05$, Appendix B) and NAG activity and LIG ($r=-0.83$, $P<0.05$, Appendix B). In addition, the negative correlation between NAG activity and fungal biomass ($r=-0.80$, $P<0.05$, Appendix B) reinforces the previous findings (Geisseler *et al.* 2009; Kriauciūnienė *et al.* 2012; Piotrowska and Wilczewsk 2012) showing

the large contribution of fungal oxidative enzymes in the degradation of crop residues at the end of incubation.

4.4. Effect of the addition of crop residues on the abundance of microbial communities

The addition of crop residues enhances total, bacterial, and fungal biomasses only at the beginning of the incubation. Several researchers argue that the addition of crop residues induces the stimulation of total biomass by enhancing its growth activity, resulting in a significant increase in total biomass (Geisseler *et al.* 2009). Some researchers have shown the same findings as this study's using different methods to analyze microbial biomass under the addition of wheat, pea, and rapeseed residues (Kriauciūnienė *et al.* 2012; Nguyen and Marschner 2017; Sauvadet *et al.* 2017). The late stage of the residue's decomposition is marked by the colonization of crop residues by a population that slowly degrades the most recalcitrant fraction, such as LIG (Fontaine *et al.* 2003; Sauvadet *et al.* 2017). The correlations shown between fungal biomass and both LIG and LCI ($r=0.57$, $P<0.05$ and $r=0.72$, $P<0.05$, Appendix B) confirmed the findings of the literature showing the involvement of fungi in the degradation of recalcitrant compounds by using LIG as a C source (Boer *et al.* 2005; Kriauciūnienė *et al.* 2012). As suggested by the literature and as demonstrated by the significant correlations between LIG and some bacterial strains (*Cellvibrio*, *Pedomicrobium*, *Haliangium*, *Harbinensis*, *Flavobacterium*, etc.) (Appendix C), bacteria can also degrade LIG, sometimes more effectively than the fungal population (Perestelo *et al.* 1996; Vargas-García *et al.* 2007). The observed increase in fungal biomass at the end of incubation after the addition of rapeseed residues, could be linked, as suggested by Berg *et al.* (2015) to the highest Mn content of rapeseed residues (Isikhuemhen *et al.* 2014), compared to pea and wheat residues. Indeed, Berg *et al.* (2015) showed a relationship between the crop residues' decomposition rate and Mn concentrations, suggesting the stimulation of fungal Mn peroxidase enzymes (Hatakka and Hammel 2011).

4.5. Effect of the addition of crop residues on taxonomic composition of bacterial communities

The addition of crop residues impacted the soil bacterial community by inducing a significant change in the abundance of some bacterial groups. The rapid change in the community observed at early stages of residue degradation is explained by the modification of simple compounds (sugars, starch, etc.). The addition of crop residues enhanced copiotrophs (R-strategists) bacterial phyla, which are stimulated in C-rich environments (Fierer *et al.* 2007; Pascault *et al.* 2010b; Sauvadet *et al.* 2017; Suleiman *et al.* 2018; Zheng *et al.* 2018) and are mostly represented by β , and γ -*Proteobacteria* sub-classes (Acosta-Martínez *et al.* 2008; Verzeaux *et al.* 2016; Suleiman *et al.* 2018). In this study, these phyla increased because of substrates' availability and their fast growth capacity (Aneja *et al.* 2006; Bernard *et al.* 2007; Fierer *et al.* 2007; Pascault *et al.* 2013; Trivedi *et al.* 2013; Tao *et al.* 2019). After 90 days, α , δ -*Proteobacteria*, and *Firmicutes* increased after the addition of crop residues as shown in previous studies (Ramírez *et al.* 2012; Verzeaux *et al.* 2016; Lee *et al.* 2017; Suleiman *et al.* 2018). Because of the depletion of labile C compounds, these oligotrophs (K-strategists) phyla grow slowly in nutrient-poor environments (Pascault *et al.* 2010a; Sauvadet *et al.* 2017; Suleiman *et al.* 2018) and can use a wide range of recalcitrant C compounds (Gaillard *et al.* 2003). In addition, most of the bacteria affiliated with α , δ -*Proteobacteria*, and *Firmicutes* can create cellulosomes, which are involved in the digestion of recalcitrant compounds (Ziganshin *et al.* 2013; Sacco *et al.* 2016; Lee *et al.* 2017). *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*'s abundance decreased 90 days after the crop residues' input into the soil. These results are in agreement with those of Suleiman *et al.* (2018) and in discrepancy with studies that describe these phyla as a bacterial group able to degrade complex substrates (Pascault *et al.* 2010b; Lee *et al.* 2017; Lian *et al.* 2019). However, the reduction in *Actinobacteria* may be related to the decrease of

the major order *Actinomycetales*, which includes *Sporichtha* and *Nocardia* genera (Tao *et al.* 2019).

Minor phyla (*Armatimonadetes*, *GN02*, *WPS-2*, and *OD1*) increased in this study after the addition of crop residues, while *Chlorobi* decreased. *Armatimonadetes* phyla are present in most soils at relatively low abundances (below 1%) as shown in this study (Deng *et al.* 2019). Based on these limited phenotypic data, one can only reasonably note that all the currently available *Armatimonadetes* groups are oligotrophs (Lee *et al.* 2014). Concerning *GN02* and *OD1* bacteria, they are not culturable; this could explain the few available information about their trophic state. Brown and Jumpponen (2015) highlighted that many of these rare bacteria are digestion-resistant and have a symbiotic nature with their environment. *WPS-2* bacteria were described as dominant and positively correlated with the C:N ratio (Hermans *et al.* 2017), which disagrees with the results of this study (*WPS-2* bacteria negatively correlated to the C:N ratio, $r=-0.62$, $P<0.05$, Appendix C). Other OTUs that belonged to *Chlorobi* were abundant in the earlier stage of decomposition, but they were always found in very low proportions (Rui *et al.* 2009; Liu *et al.* 2016). Overall, our findings highlight the change in bacterial community composition based on the turnover between copiotrophs and oligotrophs bacterial phyla.

At the order level, correlational analyses provided insight into the crop residues' characteristics responsible for the observed selection in bacterial community composition. Among the orders that were most affected and appeared after the addition of each crop residue, the *Halanaerobiales*, *Thermoanaerobacterales*, *Halanaerobiales*, *Actinomycetales*, *etc.*, (Appendix C) exhibited significant correlations with some crop residue compositions. These orders are poorly described in the literature. Thus, there remains a large amount of unexplained variation in the observed bacterial orders' composition linked to their biochemical characteristics (Li *et al.* 2018). A variety of bacterial genera also showed a significant correlation with crop residue composition (Appendix C). *Rubrobacter* has also been shown to

degrade HEM ($r=0.73$, $P<0.05$, Appendix C) and xylan and could, therefore, play a significant role in the degradation of these components (De Mandal *et al.* 2017).

The relative abundance of oligotrophic taxa, such as *Nocardiodes* and *Niabella* increased during the residues' degradation (present at the end of the incubation at T90), indicating the abilities of these microorganisms to degrade polymers with different complexities, such as HEM and CEL (Appendix C) (Reddy *et al.* 2013; Kerdraon *et al.* 2019). The positive relationship between these genera and HEM suggested their direct or indirect involvement in the degradation of the HEM fraction, which may be related to their abundance after the addition of wheat residues, presenting the highest HEM content. Soils with pea residues are rich in species like *Inquilinus*, *Dongia*, *Conexibacter*, *Collimonas*, and *Dactylosporangium*, which are involved in nutrient recycling and degradation of crop residues. Among them, *Conexibacter* which is highly correlated to SOL, TN, and the C:N ratio (Appendix C), is described in literature as mainly associated with the degradation of litter with low C: N (Koceja *et al.* 2019). Except for *Conexibacter* and *Collimonas*, which are highly correlated to SOL fraction ($P<0.01$, Appendix C), the other specific genera are weakly correlated to SOL fraction (Appendix C), but they are highly correlated among themselves and to *Collimonas* genus ($P<0.01$, Appendix C). This may explain their presence after the addition of pea residues, presenting the highest SOL content. Some bacterial genera have been identified as CEL and LIG consumers, and *Cellvibrio* and *Flavobacterium* are included in those. These bacteria were positively correlated with LIG ($r=0.71$, $P<0.03$, Appendix C) and highly abundant under rapeseed residues, which presented the highest LIG content, confirming the previous findings (Zhang and Lueders 2017 Moreno-Espíndola *et al.* 2018).

4.6. Effect of the addition of crop residues on taxonomic composition of fungal communities

In the present study, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, and *Mortierellomycota* were the dominant phyla in all treatments, accounting for > 18% of the fungi, which was much greater than the other phyla. This is consistent with results shown by Srour *et al.* (2020) and Zhang *et al.* (2020). *Ascomycota* are the main fungal decomposers in many soil ecosystems (Ma *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2016). *Ascomycota* play a major role in recycling plant residues, and they might form symbioses with mycorrhizae or endophytes (Ivancevic and Karadelev 2013; Choudhary *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2020). *Ascomycota* are the most diverse group of saprotrophic fungi (Xiong *et al.* 2014) and the key decomposers in agricultural soils, expanding in response to organic inputs (Ma *et al.* 2013; Wang *et al.* 2018). *Basidiomycota*, rather than *Ascomycota*, dominates terrestrial ecosystems, probably due to relatively less data accounting for agricultural soils (Tedersoo *et al.* 2014). *Basidiomycota* plays particularly important roles in degrading plant litter with high lignin contents (Blackwood *et al.* 2007; Entwistle *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2020). Our results showed that the relative abundance of *Basidiomycota* after the addition of rapeseed residues was significantly higher, indicating that rapeseed residues could provide a higher lignin content for the growth of *Basidiomycota*.

To further detail the effects of the addition of crop residues with contrasting biochemical characteristics on specific groups of soil fungi, important orders and genera were detected and appeared only after the addition of each crop residue. However, a variety of fungal genera showed a significant correlation with crop residue compositions. For instance, *Clitocybe* and *Verticillium* present only after added pea residues have been shown to degrade carbohydrates (Fernando *et al.* 2016; Geethanjali and Jayashankar 2016). These specific genera are negatively correlated ($r=-0.78$, $P<0.05$, Appendix D) to the C: N residues ratio. *Hypoxylon* genus, known for its ability to degrade LIG, was detected only after the addition of rapeseed (presented the

highest LIG content) (López *et al.* 2017). These specific genera are positively correlated to LIG content ($r= 0.82$, $P<0.05$, Appendix D). *Volutella* genera play an important role in HEM degradation (Masigol *et al.* 2019). This study's results showed a positive correlation ($r=0.76$, $P<0.05$) between the abundance of these genera and HEM fraction (mostly present in wheat residue). This may explain their abundance after the addition of wheat residues. Finally, this study confirms that the residues' biochemical qualities are the main drivers of the shift in bacterial and fungal communities during crop residues' decomposition in soil.

The decomposition of crop residues is an essential process in cropping systems as they are the main exogenous source of C. Our results showed that the residues' qualities have distinct effects on soil microbial communities and C and N dynamics. The literature reported that the crop residues with highest labile fraction affect the bacterial pathway at the beginning of decomposition, and crop residues with highest recalcitrant fraction affect the fungal pathway at the end of decomposition, which suggests a specific function is linked to specific taxa. Our findings highlighted the concomitant presence of some bacterial and fungal groups throughout the decomposition of crop residues. Indeed, a lot of bacterial and fungal genera and orders were co-correlated among them and to the same biochemical fraction of the crop residues. This finding highlights the strong functional redundancy of soil microbial communities and underlines the complex relationship between structure and function of soil microbial communities. Finally, the correlations observed among fungal strains are more abundant and much stronger than those among bacterial strains, supporting the idea that potential interactions in fungal communities are stronger than those of bacterial communities in soils during crop residue decomposition.

5. Conclusion

This study complements knowledge about the effects of crop residues' biochemical composition on microbial communities, C and N dynamics, and soil microbiological state. It is

well-known that crop residue inputs increase C mineralization and induce N immobilization in a range that is influenced by the crop residues' initial biochemical composition. The researchers' hypothesis, which stated that these changes might be related to changes in the composition and biomass of soil heterotrophic microbial communities and enzyme activities, was confirmed. This study's findings showed that the soil's C and N dynamics in the presence of the crop residues were driven by the selection of specific bacterial and fungal decomposers linked to the initial biochemical qualities of crop residues.

These findings are of major concern in the perspective of agroecology development. Indeed, crop residue management is a recognized practice that may help to maintain OM in soils and contribute to N management during the intercrop period. Moreover, it seems that crop residues drive microbial community's composition into soils. This is of great interest when agricultural practices need a decrease of chemical inputs and an improvement in soil biodiversity and its related functions, such as nutrient cycling.

Acknowledgements

The authors would like to thank François D'Hubert of the Chambre d'Agriculture of Normandy and the farmers of the association of Economic and Environmental Interest Group (EEIG). This research was funded by the Normandy region and was supported by the Vivepois project (D16-12746), France.

References

- Abbasi K, Tahir M, Sabir N, Khurshid M. 2014. Impact of the addition of different plant residues on carbon–nitrogen content and nitrogen mineralization–immobilization turnover in a soil incubated under laboratory conditions. *Solid Earth Discussions*, **6**, 197–205.
- Abera G, Wolde-meskel E, Bakken L R. 2012. Carbon and nitrogen mineralization dynamics in different soils of the tropics amended with legume residues and contrasting soil moisture contents. *Biology and Fertility of Soils*, **48**, 51–66.
- Abiven S, Recous S, Reyes-Gómez V, Oliver R. 2005. Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residue in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of*

- Soils*, **42**, 119–128.
- Acosta-Martínez V, Dowd S, Sun Y, Allen V. 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 2762–2770.
- Adair E C, Parton W J, Grosso S J D, Silver W L, Harmon M E, Hall S A, Burke I C, Hart S C. 2008. Simple three-pool model accurately describes patterns of long-term litter decomposition in diverse climates. *Global Change Biology*, **14**, 2636–2660.
- AFNOR (Association Française de NORmalisation). 2009. Norme XP U 44-163. Amendements organiques et supports de culture -Caractérisation de la matière organique par la minéralisation potentielle du carbone et de l'azote. AFNOR, Paris. (French)
- Almeida F, Wolf J M, Casadevall A. 2015. Virulence-associated enzymes of *cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, **14**, 1173–1185.
- Amin B A Z, Chabbert B, Moorhead D, Bertrand I. 2014. Impact of fine litter chemistry on lignocellulolytic enzyme efficiency during decomposition of maize leaf and root in soil. *Biogeochemistry*, **117**, 169-183.
- Aneja M K, Sharma S, Fleischmann F, Stich S, Heller W, Bahnweg G, Munch J C, Schlöter M. 2006. Microbial colonization of beech and spruce Litter–Influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microbial Ecology*, **52**, 127–135.
- Arcand M M, Helgason B L, Lemke R L. 2016. Microbial crop residue decomposition dynamics in organic and conventionally managed soils. *Applied Soil Ecology*, **107**, 347–359.
- Bahri H, Rasse D P, Rumpel C, Dignac M F, Bardoux G, Mariotti A. 2008. Lignin degradation during a laboratory incubation followed by ¹³C isotope analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1916–1922.
- Bell C, Carrillo Y, Boot C M, Rocca J D, Pendall E, Wallenstein M D. 2014. Rhizosphere stoichiometry: Are C: N: P ratios of plants, soils, and enzymes conserved at the plant species-level? *New Phytologist*, **201**, 505–517.
- Berg B, Kjønaas O J, Johansson M B, Erhagen B, Åkerblom S. 2015. Late stage pine litter decomposition: Relationship to litter N, Mn, and acid unhydrolyzable residue (AUR) concentrations and climatic factors. *Forest Ecology and Management*, **358**, 41–47.
- Berg B, McClaugherty C. 2008. Initial litter chemical composition. In: *Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 53–83.

- Bertrand I, Delfosse O, Mary B. 2007. Carbon and nitrogen mineralization in acidic, limed, and calcareous agricultural soils: Apparent and actual effects. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 276-288.
- Bernard L, Mougel C, Maron P A, Nowak V, Lévêque J, Henault C, Haichar F, el Zahar Haichar F, Marol C, Balesdent J, Gibiat F, Lemanceau P, Ranjard L. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*, **9**, 752–764.
- Blackwood C B, Waldrop M P, Zak D R, Sinsabaugh R L. 2007. Molecular analysis of fungal communities and laccase genes in decomposing litter reveals differences among forest types but no impact of nitrogen deposition. *Environmental Microbiology*, **9**, 1306–1316.
- Boer W, Folman L B, Summerbell R C, Boddy L. 2005. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 795–811.
- Borneman J, Hartin R J. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4356–4360.
- Brown S P, Jumpponen A. 2015. Phylogenetic diversity analyses reveal disparity between fungal and bacterial communities during microbial primary succession. *Soil Biology and Biochemistry*, **89**, 52–60.
- Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**, 335–336.
- Castellano M J, Mueller K E, Olk D C, Sawyer J E, Six J. 2015. Integrating plant litter quality, soil organic matter stabilization, and the carbon saturation concept. *Global Change Biology*, **21**, 3200–3209.
- Cayuela M L, Sinicco T, Mondini C. 2009. Mineralization dynamics and biochemical properties during initial decomposition of plant and animal residue in soil. *Applied Soil Ecology*, **41**, 118–127.
- Chen B, Liu E, Tian Q, Yan C, Zhang Y. 2014. Soil nitrogen dynamics and crop residues. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **34**, 429–442.
- Chen H, Fan M, Billen N, Stahr K, Kuzyakov Y. 2009. Effect of land use types on decomposition of ¹⁴C-labelled maize residue (*Zea mays* L.). *European Journal of Soil Biology*, **45**, 123–130.

- Choudhary M, Sharma P C, Jat H S, McDonald A, Jat M L, Choudhary S, Garg N, Choudhary M, Sharma P C, Jat H S, McDonald A, Jat M L, Choudhary S, Garg N. 2018. Soil biological properties and fungal diversity under conservation agriculture in Indo-Gangetic Plains of India. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **18**, 1142–1156.
- Claesson M J, Wang Q, O’Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole J R, Ross R P, O’Toole P W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, **38**, e200–e200.
- Cole J R, Wang Q, Fish J A, Chai B, McGarrell D M, Sun Y, Brown C T, Porras-Alfaro A, Kuske C R, Tiedje J M. 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, **42**, D633–D642.
- Cotrufo M F, Wallenstein M D, Boot C M, Denef K, Paul E. 2013. The microbial efficiency-matrix stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: Do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology*, **19**, 988–995.
- Cusack D F, Torn M S, McDowell W H, Silver W L. 2010. The response of heterotrophic activity and carbon cycling to nitrogen additions and warming in two tropical soils. *Global Change Biology*, **16**, 2555–2572.
- Deng Y, Wang Y, Xia Y, Zhang A N, Zhao Y, Zhang T. 2019. Genomic resolution of bacterial populations in saccharin and cyclamate degradation. *Science of the Total Environment*, **658**, 357–366.
- Dodor D E, Tabatabai D M A. 2007. Arylamidase activity as an index of nitrogen mineralization in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **38**, 2197–2207.
- Dominati E, Patterson M, Mackay A. 2010. A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics*, **69**, 1858–1868.
- Edgar R C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, **26**, 2460–2461.
- Ekenler M, Tabatabai M A. 2004. β -Glucosaminidase activity as an index of nitrogen mineralization in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **35**, 1081–1094.
- Entwistle E M, Zak D R, Argiroff W A. 2018. Anthropogenic N deposition increases soil C storage by reducing the relative abundance of lignolytic fungi. *Ecological Monographs*, **88**, 225–244.
- Fang M, Motavalli P P, Kremer R J, Nelson K A. 2007. Assessing changes in soil microbial
- [键入文字]

- communities and carbon mineralization in Bt and non-Bt corn residue-amended soils. *Applied Soil Ecology*, **37**, 150–160.
- Fang Y, Nazaries L, Singh B K, Singh B P. 2018. Microbial mechanisms of carbon priming effects revealed during the interaction of crop residues and nutrient inputs in contrasting soils. *Global Change Biology*, **24**, 2775–2790.
- Fang Y, Singh B P, Cowie A, Wang W, Arachchi M H, Wang H, Tavakkoli E. 2019. Balancing nutrient stoichiometry facilitates the fate of wheat residue carbon in physically defined soil organic matter fractions. *Geoderma*, **354**, 113–883.
- Fernando W G D, Zhang X, Amarasinghe C C. 2016. Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* causing blackleg disease in canola from Canadian canola seed lots and dockage. *Plants (Basel)*, **5**, 12.
- Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**, 1354–1364.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L. 2003. The priming effect of organic matter: A question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 837–843.
- Frasier I, Noellemeyer E, Figuerola E, Erijman L, Permingeat H, Quiroga A. 2016. High quality residue from cover crops favor changes in microbial community and enhance C and N sequestration. *Global Ecology and Conservation*, **6**, 242–256.
- Gaillard V, Chenu C, Recous S. 2003. Carbon mineralization in soil adjacent to plant residue of contrasting biochemical quality. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 93–99.
- Gangneux C, Akpa-Vinceslas M, Sauvage E, Desaire S, Houot S, Laval K. 2011. Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 431–437.
- Geethanjali P M, Jayashankar P M. 2016. A review on litter decomposition by soil fungal community. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **11**, 01–03.
- Geisseler D, Horwath W R, Doane T A. 2009. Significance of organic nitrogen uptake from plant residue by soil microorganisms as affected by carbon and nitrogen availability. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 1281–1288.
- Ghimire B, Ghimire R, VanLeeuwen D, Mesbah A. 2017. Cover crop residues amount and quality effects on soil organic carbon mineralization. *Sustainability*, **9**, 23–16.
- Hadas A, Kautsky L, Goek M, Erman Kara E. 2004. Rates of decomposition of plant residue and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biology and Biochemistry*, **36**, 255–266.

- Hashem M, Ali E H, Abdel-Basset R. 2013. Recycling rice straw into biofuel. *Journal of Agriculture, Science and Technology*, **15**, 709–721.
- Hatakka A, Hammel K E. 2011. Fungal biodegradation of lignocelluloses. In: Hofrichter M, ed., *Industrial Applications, the Mycota*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 319–340.
- Hermans S M, Buckley H L, Case B S, Curran-Cournane F, Taylor M, Lear G. 2017. Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Applied Environmental Microbiology*, **83**, e02826-16.
- Hünninghaus M, Koller R, Kramer S, Marhan S, Kandeler E, Bonkowski M. 2017. Changes in bacterial community composition and soil respiration indicate rapid successions of protist grazers during mineralization of maize crop residues. *Pedobiologia*, **62**, 1–8.
- Isikhuemhen O S, Mikiashvili N A, Senwo Z N, Ohimain E I. 2014. Biodegradation and sugar release from canola plant biomass by selected white rot fungi. *Advances in Biological Chemistry*, **04**, 395.
- Ivancevic B, Karadelev M. 2013. Overview of fungi species in Prespa National Park (Albania). *International Journal of Ecosystems and Ecology Science*, **3**, 679–686.
- Jensen E S. 1994. Mineralization–immobilization of nitrogen in soil amended with low C/N ratio plant residue with different particle size. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 519–521.
- Jian S, Li J, Chen J, Wang G, Mayes M A, Dzantor K E, Hui D, Luo Y. 2016. Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **101**, 32–43.
- Johansson M B, Berg B, Meentemeyer V. 2011. Litter mass-loss rates in late stages of decomposition in a climatic transect of pine forests. Long-term decomposition in a Scots pine forest. IX. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 10.
- Johnson J M F, Barbour N W, Weyers S L. 2007. Chemical composition of crop biomass impacts its decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, **71**, 155.
- Kerdraon L, Balesdent M H, Barret M, Laval V, Suffert F. 2019. Crop residues in wheat-oilseed rape rotation system: a pivotal, shifting platform for microbial meetings. *Microbial Ecology*, **77**, 931–945.
- Koceja M E, Bledsoe R B, Goodwillie C, Peralta A L. 2019. Nutrient enrichment increases soil bacterial diversity and decomposition rates of different litter types in a coastal plain wetland. *bioRxiv*, 732883.
- Kriaučiūnienė Z, Velička R, Raudonius S. 2012. The influence of crop residues type on their decomposition rate in the soil: A litterbag study. *Zemdirbyste (Agriculture)*, **99**, 1392–1396.
- Lashermes G, Gainvors-Claiss A, Recous S, Bertrand I. 2016. Enzymatic strategies and carbon

- use efficiency of a litter-decomposing fungus grown on maize leaves, stems, and roots. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 13-15.
- Lee J, Kim J R, Jeong S, Cho J, Kim J Y. 2017. Long-term performance of anaerobic digestion for crop residues containing heavy metals and response of microbial communities. *Waste Management*, **59**, 498–507.
- Lee K C, Dunfield P F, Stott M B. 2014. The phylum *Armatimonadete*. In: Rosenberg E, ed., *The Prokaryotes*. 4th ed. Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea Springer-Verlag, Berlin. pp. 447-458
- Lehtinen T, Schlatter N, Baumgarten A, Bechini L, Krüger J, Grignani C, Zavattaro L, Costamagna C, Spiegel H. 2014. Effect of crop residues incorporation on soil organic carbon and greenhouse gas emissions in European agricultural soils. *Soil Use and Management*, **30**, 524–538.
- Li Q, Chai S, Li Y, Huang J, Luo Y, Xiao L, Liu Z. 2018. biochemical components associated with microbial community shift during the pile-fermentation of primary dark tea. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1509
- Lian T, Yu Z, Li Y, Jin J, Wang G, Liu X, Tang C, Franks A, Liu J, Liu J. 2019. The shift of bacterial community composition magnifies over time in response to different sources of soybean residue. *Applied Soil Ecology*, **136**, 163–167.
- Linères M, Djakovitch J L. 1993. Caracterisation de la stabilite biologique des apports organiques par l'analyse biochimique. In: Decroux J, Ignazi J C, eds., *MatiEres Organiques et Agricultures*. QuatriEme JournEes de L'Analyse de Terre et CinquiEme Forum de la Fertilisation RaisonneEe, GEMAS-COMIFER, Paris. pp. 159–168. (French)
- Liu C, Li H, Zhang Y, Si D, Chen Q. 2016. Evolution of microbial community along with increasing solid concentration during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. *Bioresource Technology*, **216**, 87–94.
- López A M Q, Silva A L, dos S, Santos dos E C L, López A M Q, Silva dos A L S, Santos dos E C L. 2017. The fungal ability for biobleaching/biopulping/bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material. *Química Nova*, **40**, 916–931.
- Luo G, Ling N, Nannipieri P, Chen H, Raza W, Wang M, Guo S, Shen Q. 2017. Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biology and Fertility of Soils*, **53**, 375– 388.
- Ma A, Zhuang X, Wu J, Cui M, Lv D, Liu C, Zhuang G. 2013. Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in Arable soil. *PLoS ONE*, **8**,

- p66146.
-
- Machinet G E, Bertrand I, Barrière Y, Chabbert B, Recous S. 2011. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: Role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 1544-1552.
- Magoč T, Salzberg S L. 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, **27**, 2957–2963.
- De Mandal S, Chatterjee R, Kumar N S. 2017. Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, **17**, 90.
- Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, Martin T A, Fry J C, Hiom S J, Dymock D, Wade W G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 795-799.
- Masigol H, Khodaparast S A, Woodhouse J N, Rojas-Jimenez K, Fonvielle J, Rezakhani F, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Neubauer D, Goldhammer T, Grossart H P. 2019. The contrasting roles of aquatic fungi and oomycetes in the degradation and transformation of polymeric organic matter. *Limnology and Oceanography*, **64**, 2662–2678.
- Melillo J M, Aber J D, Linkins A E, Ricca A, Fry B, Nadelhoffer K J. 1989. Carbon and nitrogen dynamics along the decay continuum: plant litter to soil organic matter. *Plant and Soil*, **115**, 189–198.
- Moreno-Cornejo J, Zornoza R, Faz A. 2014. Carbon and nitrogen mineralization during decomposition of crop residues in a calcareous soil. *Geoderma*, **230–231**, 58–63.
- Moreno-Espíndola I P, Ferrara-Guerrero M J, Luna-Guido M L, Ramírez-Villanueva D A, De León-Lorenzana A S, Gómez-Acata S, González-Terreros E, Ramírez-Barajas B, Navarro-Noya Y E, Sánchez-Rodríguez L M, Fuentes-Ponce M, Macedas-Jiménez J U, Dendooven L. 2018. The bacterial community structure and microbial activity in a traditional organic milpa farming system under different soil moisture conditions. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2737.
- Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A C. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S Ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Nguyen T T, Marschner P. 2017. Soil respiration, microbial biomass and nutrient availability in soil after addition of residue with adjusted N and P concentrations. *Pedosphere*, **27**, 76–85.
- Nicolardot B, Bouziri L, Bastian F, Ranjard L. 2007. A microcosm experiment to evaluate the
- [键入文字]

- influence of location and quality of plant residue on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 1631–1644.
- Pascual N, Cécillon L, Mathieu O, Hénault C, Sarr A, Lévêque J, Farcy P, Ranjard L, Maron P A, 2010a. In situ dynamics of microbial communities during decomposition of wheat, rape, and alfalfa residue. *Microbial Ecology*, **60**, 816–828.
- Pascual N, Nicolardot B, Bastian F, Thiébeau P, Ranjard L, Maron P A. 2010b. In situ dynamics and spatial heterogeneity of soil bacterial communities under different crop residues management. *Microbial Ecology*, **60**, 291–303.
- Pascual N, Ranjard L, Kaisermann A, Bachar D, Christen R, Terrat S, Mathieu O, Lévêque J, Mougel C, Henault C, Lemanceau P, Péan M, Boiry S, Fontaine S, Maron P A. 2013. Stimulation of different functional groups of bacteria by various plant residue as a driver of soil priming effect. *Ecosystems*, **16**, 810–822.
- Paterson E, Midwood A J, Millard P. 2009. Through the eye of the needle: A review of isotope approaches to quantify microbial processes mediating soil carbon balance. *New Phytologist*, **184**, 19–33.
- Perestelo F, Rodríguez A, Pérez R, Carnicero A, Fuente G D I, Falcón M A. 1996. Short communication: Isolation of a bacterium capable of limited degradation of industrial and labelled, natural and synthetic lignins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**, 111–112.
- Piotrowska A, wilczewski E. 2012. Effect of catch crop cultivated for green manure and mineral nitrogen fertilization on soil enzymes activities and chemical properties. *Geoderma*, **189–190**, 72–80.
- Prescott C E. 2010. Litter decomposition: What controls it and how can we alter it to sequester more carbon in forest soils? *Biogeochemistry*, **101**, 133–149.
- Ramirez K S, Craine J M, Fierer N. 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology*, **18**, 1918–1927.
- Recous S, Lashermes G, Bertrand I. 2017. Couplages et contrôles des cycles du carbone et de l’azote par les communautés microbiennes dans les sols cultivés. In: Quae S, ed., *Les Sols et la Vie Souterraine: Des Enjeux Majeurs en AgroEcologie*. Quae, Paris. p. 328. (French).
- Recous S, Robin D, Darwis D, Mary B. 1995. Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 1529–1538.
- Reddy A P, Simmons C W, D’haeseleer P, Khudyakov J, Burd H, Hadi M, Simmons B A, Singer S W, Thelen M P, Vanderghenst J S. 2013. Discovery of microorganisms and
- [键入文字]

- enzymes involved in high-solids decomposition of rice straw using metagenomic analyses. *PLoS ONE*, **8**, e77985.
- Redin M, Recous S, Aita C, Dietrich G, Skolaude A C, Ludke W H, Schmatz R, Giacomini S J. 2014. How the chemical composition and heterogeneity of crop residues mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, **78**, 65–75.
- Rinkes Z L, Weintraub M N, DeForest J L, Moorhead D L. 2011. Microbial substrate preference and community dynamics during decomposition of *Acer saccharum*. *Fungal Ecology*, **4**, 396–407.
- Rui J, Peng J, Lu Y. 2009. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 4879–4886.
- Sacco L P, Castellane T C L, Lopes E M, de Macedo Lemos E G, Alves L M C. 2016. Properties of polyhydroxyalkanoate granules and bioemulsifiers from *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. Isolates growing on glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **178**, 990–1001.
- Sauvadet M, Chauvat M, Brunet N, Bertrand I. 2017. Can changes in litter quality drive soil fauna structure and functions? *Soil Biology and Biochemistry*, **107**, 94–103.
- Sauvadet M, Chauvat M, Fanin N, Coulibaly S, Bertrand I. 2016. Comparing the effects of litter quantity and quality on soil biota structure and functioning: Application to a cultivated soil in Northern France. *Applied Soil Ecology*, **107**, 261–271.
- Sauvadet M, Lashermes G, Alavoine G, Recous S, Chauvat M, Maron P A, Bertrand I. 2018. High carbon use efficiency and low priming effect promote soil C stabilization under reduced tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, **123**, 64–73.
- Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, **27**, 863–864.
- Shahbaz M, Kuzyakov Y, Sanaullah M, Heitkamp F, Zelenev V, Kumar A, Blagodatskaya E. 2017. Microbial decomposition of soil organic matter is mediated by quality and quantity of crop residues: Mechanisms and thresholds. *Biology and Fertility of Soils*, **53**, 287–301.
- Sinsabaugh R L, Follstad Shah J J. 2012. Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **43**, 313–343.
- Šnajdr J, Cajthaml T, Valášková V, Merhautová V, Petránková M, Spetz P, Leppänen K, Baldrian P. 2011. Transformation of *quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, **75**, 291–303.

- Srour A Y, Ammar H A, Subedi A, Pimentel M, Cook R L, Bond J, Fakhoury A M. 2020. Microbial communities associated with long-term tillage and fertility treatments in a corn-soybean cropping system. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 1363.
- Stewart C E, Moturi P, Follett R F, Halvorson A D. 2015. Lignin biochemistry and soil N determine crop residue decomposition and soil priming. *Biogeochemistry*, **124**, 335–351.
- Suleiman A K A, Lourenço K S, Pitombo L M, Mendes L W, Roesch L F W, Pijl A, Carmo J B, Cantarella H, Kuramae E E. 2018. Recycling organic residue in agriculture impacts soil-borne microbial community structure, function and N₂O emissions. *Science of the Total Environment*, **631–632**, 1089–1099.
- Tao K, Zhang X, Chen X, Liu X, Hu X, Yuan X. 2019. Response of soil bacterial community to bioaugmentation with a plant residue-immobilized bacterial consortium for crude oil removal. *Chemosphere*, **222**, 831–838.
- Tedersoo L, Bahram M, Pöhlme S, Kõljalg U, Yorou N S, Wijesundera R, Ruiz L V, Vasco-Palacios A M, Thu P Q, Suija A, Smith M E, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Riit T, Ratkowsky D, Pritsch K, Põldmaa K, Piepenbring M, *et al.* 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, **346**, 1256688.
- Trinsoutrot I, Recous S, Bentz B, Linères M, Cheneby D, Nicolardot B. 2000. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal*, **64**, 918-926.
- Trivedi P, Anderson I, Singh B. 2013. Microbial modulators of soil carbon storage: Integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends in Microbiology*, **21**, 641–651.
- Vahdat E, Nourbakhsh F, Basiri M. 2011. Lignin content of range plant residue controls N mineralization in soil. *European Journal of Soil Biology*, **47**, 243–246.
- Van Soest P J. 1963. The use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **46**, 829-835.
- Vargas-García M C, Suárez-Estrella F, López M J, Moreno J. 2007. In vitro studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **59**, 322-328.
- Verzeaux J, Alahmad A, Habbib H, Nivelles E, Roger D, Lacoux J, Decocq G, Hirel B, Catterou M, Spicher F, Dubois F, Duclercq J, Tetu T. 2016. Cover crops prevent the deleterious effect of nitrogen fertilization on bacterial diversity by maintaining the carbon content of ploughed soil. *Geoderma*, **281**, 49–57.

- Wang H, Zeng Y, Guo C, Bao Y, Lu G, Reinfelder J R, Dang Z. 2018. Bacterial, archaeal, and fungal community responses to acid mine drainage-laden pollution in a rice paddy soil ecosystem. *Science of the Total Environment*, **616–617**, 107–116.
- Wickings K, Grandy A S, Reed S C, Cleveland C C. 2012. The origin of litter chemical complexity during decomposition. *Ecology Letters*, **15**, 1180–1188.
- Xiong J, Peng F, Sun H, Xue X, Chu H, 2014. Divergent responses of soil fungi functional groups to short-term warming. *Microbial Ecology*, **68**, 708–715.
- Zhang L, Lueders T. 2017. Micropredator niche differentiation between bulk soil and rhizosphere of an agricultural soil depends on bacterial prey. *FEMS Microbiology Ecology*, **93**, fix103.
- Zhang S, Wang Y, Sun L, Qiu C, Ding Y, Gu H, Wang L, Wang Z, Ding Z. 2020. Organic mulching positively regulates the soil microbial communities and ecosystem functions in tea plantation. *BMC Microbiology*, **20**, 103.
- Zheng W, Zhao Z, Gong Q, Zhai B, Li Z. 2018. Effects of cover crop in an apple orchard on microbial community composition, networks, and potential genes involved with degradation of crop residues in soil. *Biology and Fertility of Soils*, **54**, 743–759.
- Zhou J, Jiang X, Zhou B, Zhao B, Ma M, Guan D, Li J, Chen S, Cao F, Shen D, Qin J. 2016. Thirty-four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, **95**, 135–143.
- Ziganshin A M, Liebetrau J, Pröter J, Kleinstaub S. 2013. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 5161–5174.

Table 1 Main characteristics of the three crop residues

	Fractions (%)				Index and ratios ¹⁾		
	Soluble	Lignin	Hemicellulose	Cellulose	LCI	C:N	Lignin:N
Pea residues	37.34±0.86 a	7.71±0.16 b	2.36±1.03 c	52.59±0.31 ns	0.12±0.01 b	28.33±3.06 c	0.50±0.05 c
Wheat residues	13.86±0.18 c	6.09±0.42 c	27.25±3.03 a	52.80±2.83 ns	0.07±0.01 c	76.88±4.60 a	1.00±0.05 b
Rapeseed residues	19.56±0.09 b	12.07±0.44 a	16.13±1.68 b	52.24±1.72 ns	0.15±0.01 a	46.90±6.60 b	1.24±0.17 a

¹⁾LCI, lignocellulosic index [LCI=Ratio of lignin/(Lignin+Cellulose+Hemicellulose)].

Data are mean±SD (n=3). Letters (a, b, c) indicate significance in soluble, lignin, hemicellulose and cellulose fractions, index and ratios between the three crop residues at $P<0.05$ according to Tukey's test; ns indicates

Table 2 The total biomass, bacterial and fungal biomasses from soil without residues (control) and soil with crop residues at two incubation times

	Incubation times	Total microbial biomass ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil)	Bacterial biomass (16S rDNA genes copy number g^{-1} dry soil ($\times 10^9$))	Fungal biomass (18S rDNA genes copy number g^{-1} dry soil ($\times 10^7$))
Control	T1	8.20±0.51 b A	2.08±0.14 b A	3.42±0.23 c A
	T90	6.96±0.33 a B	1.79±0.52 a A	1.18±0.11 b B
Pea residues	T1	10.66±0.82 a A	2.50±0.17 a A	11.1±0.65 a A
	T90	5.74±0.56 b B	1.53±0.25 a B	0.91±0.12 c B
Rapeseed residues	T1	9.50±0.63 ab A	2.69±0.33 a A	5.38±0.87 b A
	T90	6.26±1.09 ab B	1.77±0.12 a B	2.07±0.22 a B
Wheat residues	T1	9.90±0.80 ab A	2.95±0.30 a A	5.66±0.96 b A
	T90	6.88±1.10 ab B	1.82±0.11 a B	1.00±0.13 c B

The total microbial biomass was measured by the quantification of the total DNA extracted from soil. Data are mean±SD (n=3). Letters (a, b, c) indicate significant difference between soil without residues (control) and soil with crop residues. Letters (A and B) indicate significant difference between the two incubation times (T1 and T90) at $P<0.05$ according to Tukey's test.

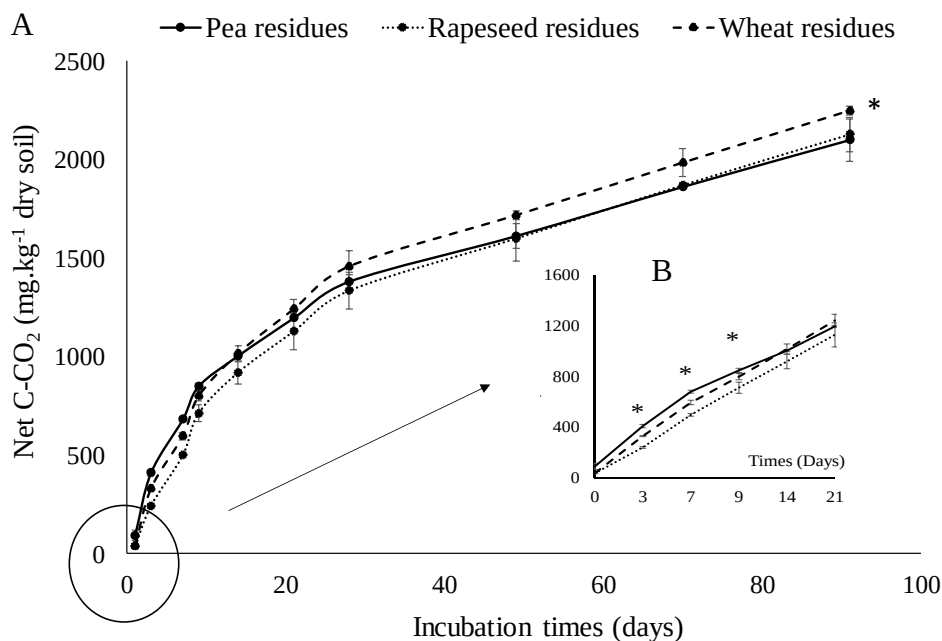


Fig. 1 Net C mineralization in soil after the addition of crop residues after 90 days of incubation (A) and after 21 days of incubation (B). Data are mean $\pm$ SD ($n=3$). * indicates statistical significance between soil with different crop residues at $P < 0.05$ according to Tukey's test.

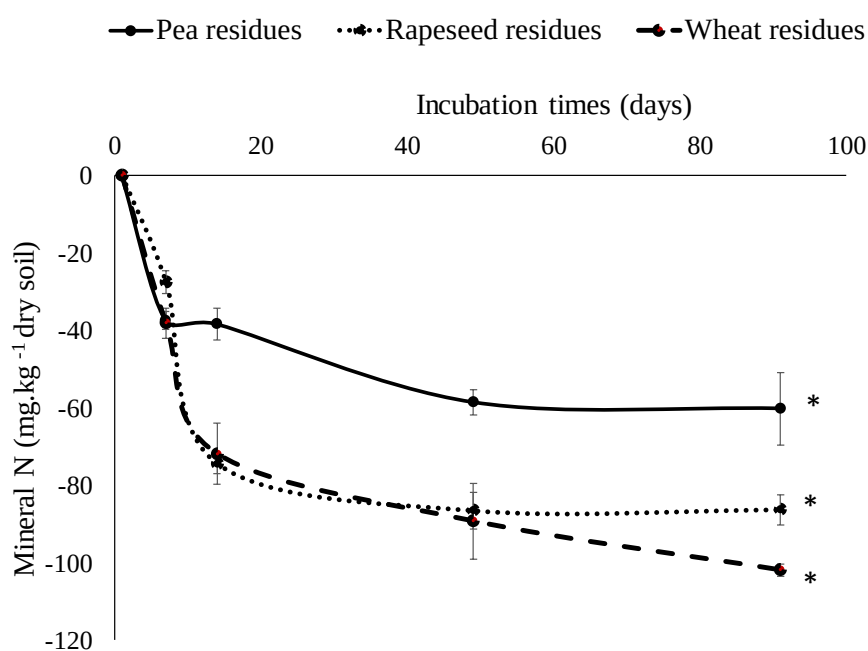


Fig. 2 Net N immobilization in soil under three crop residues addition at different incubation times. Data are mean $\pm$ SD ($n=3$). * indicates statistical significance between soil with different crop residues at $P < 0.05$ according to Tukey's test.

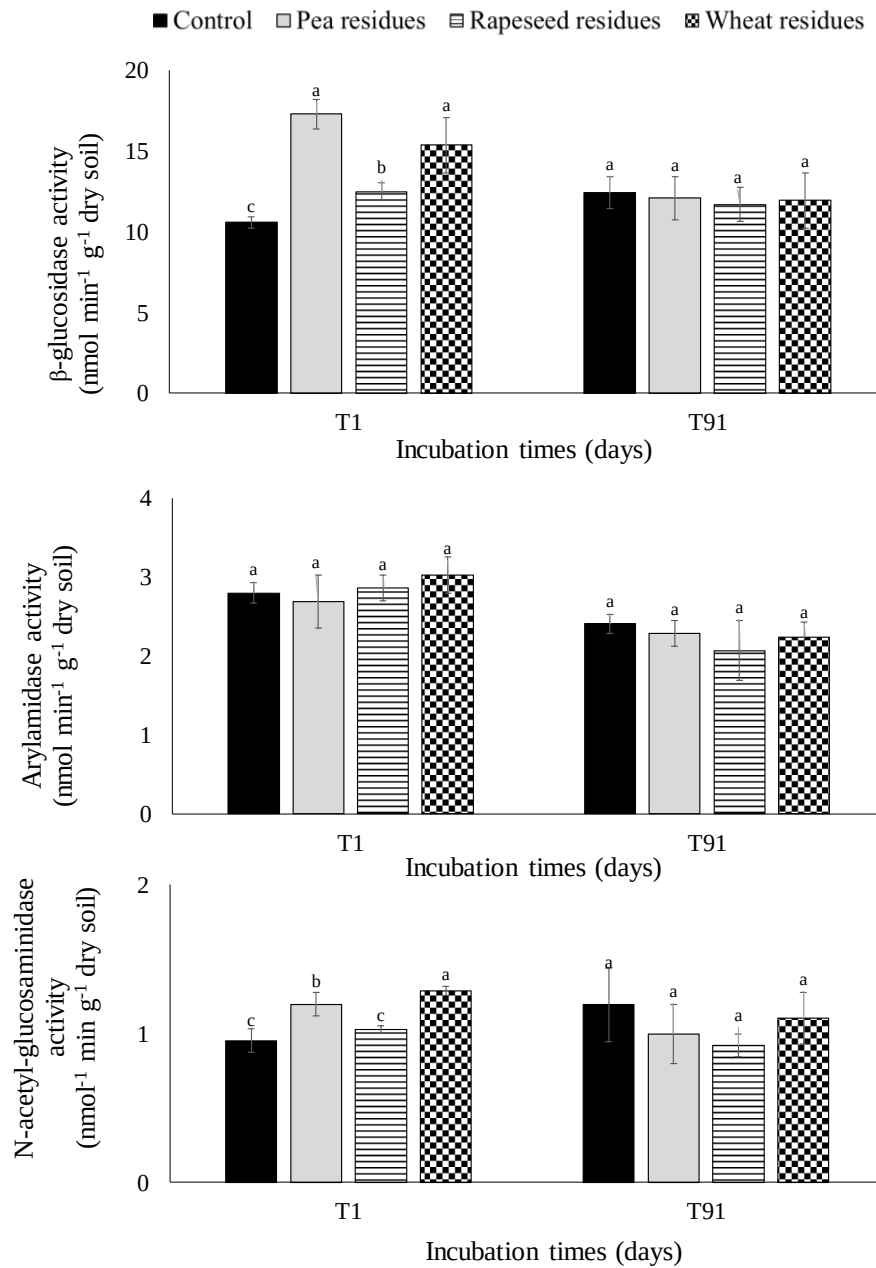


Fig. 3 β -Glucosidase, arylamidase, and N-acetyl-glucosaminidase enzyme activities in soils with and without crop residues at two incubation times (T1 and T90). Data are mean $\pm$ SD ($n=3$). Letters (a, b, c) indicate statistical significance between soil with crop residues and soil without crop residues (control) for each sampling times at $P<0.05$ according to Tukey's test.

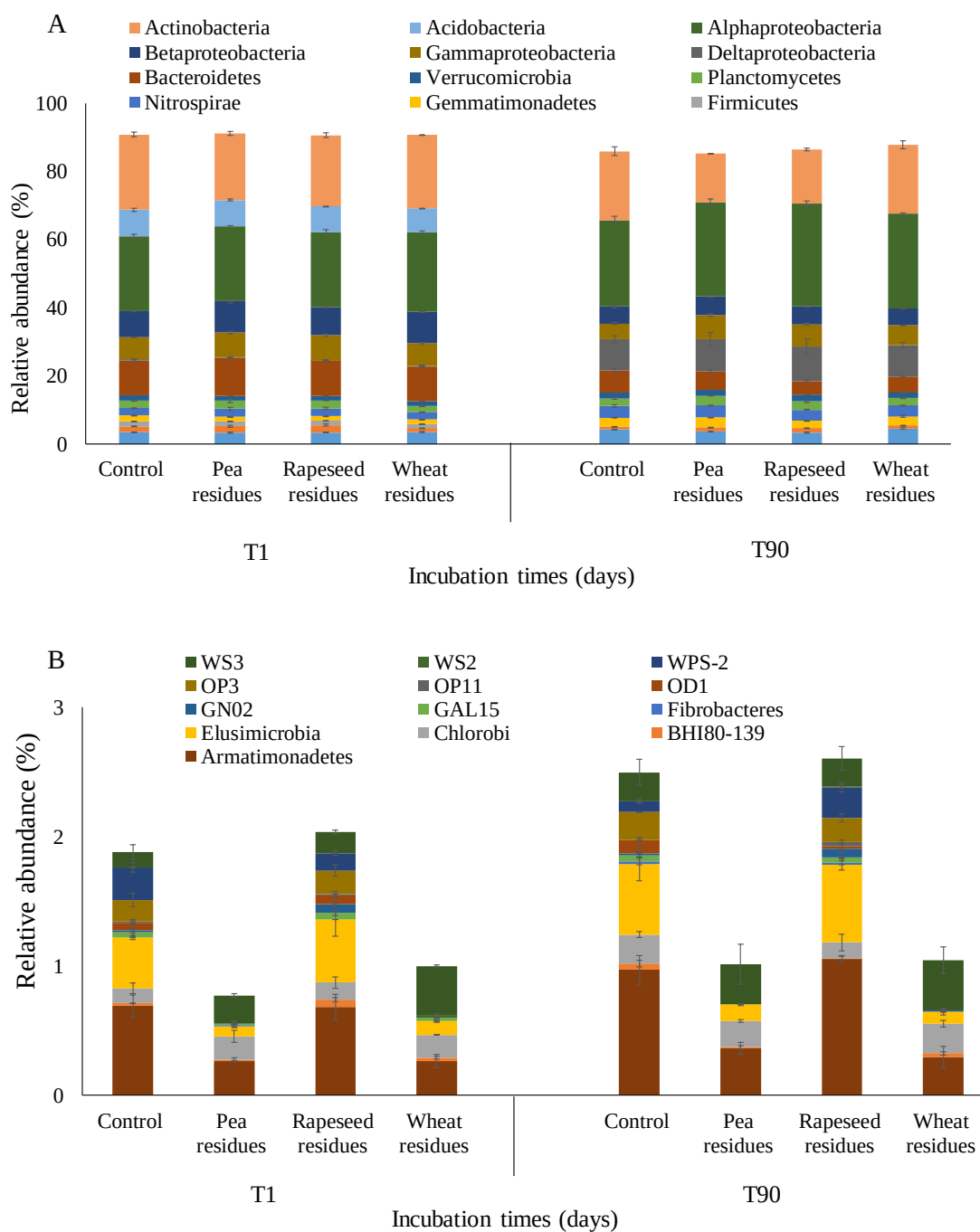


Fig. 4 The relative abundance of (A) major bacterial phyla exceeding 1% and (B) minor bacterial phyla less than 1% in the soils with and without crop residues (control) at two incubation times (T1 and T90). Data are mean $\pm$ SD ($n=2$).



Fig. 5 Venn diagram evaluating the effect of the addition of crop residues on soil bacterial diversity. In the center of the figure, the Venn diagram is showing unique and sharing OTUs (97%). The order and genera designations of the sequences related to the unique OTUs were determined using the Greengenes Classifier tool. A, unique order sequences of samples with added wheat residues. B, unique order sequences of samples with added pea residues. C, unique order sequences of samples without residues. D, unique order sequences of samples with added rapeseed residues. E, unique genera sequences of samples with added wheat residues. F, unique genera sequences of samples with added pea residues. G, unique genera sequences of samples without residues. (H), unique genera sequences of samples with added rapeseed residues.

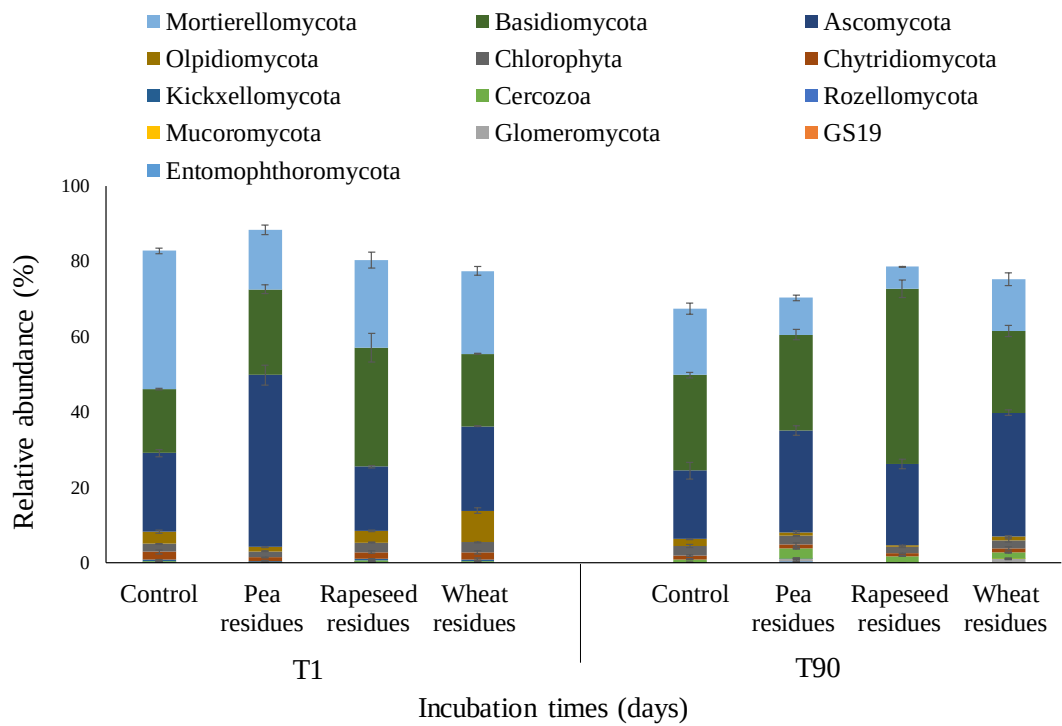


Fig. 6 The relative abundance of fungal phyla in the soils with and without crop residues (control) at two incubation times (T1 and T90). Data are mean±SD (n=2)

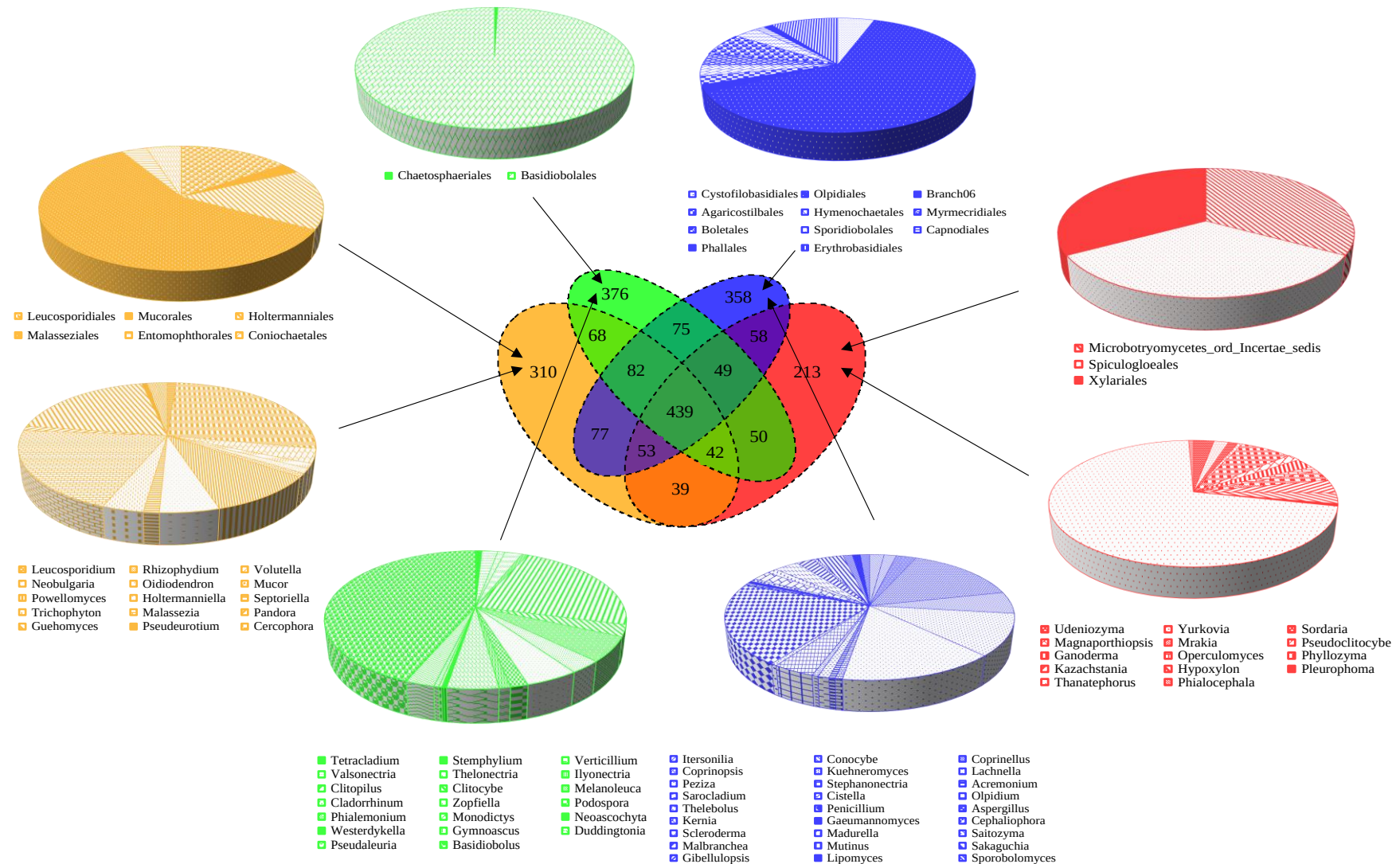
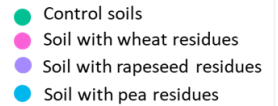


Fig. 7 Venn diagram evaluating the effect of the addition of crop residues on soil fungal diversity. In the center of the figure, the Venn diagram is showing unique and sharing OTUs (97%). The order and genera designations of the sequences related to the unique OTUs were determined using

[键入文字]

the Greengenes Classifier tool. A, unique order sequences of samples with added wheat residues. B, unique order sequences of samples with added pea residues. C, unique order sequences of samples without residues. D, unique order sequences of samples with added rapeseed residues. E, unique genera sequences of samples with added wheat residues. F, unique genera sequences of samples with added pea residues. G, unique genera sequences of samples without residues. (H), unique genera sequences of samples with added rapeseed residues.



Chapitre IV. Discussion générale



La transition agroécologique en cours engendre la mise en place de nouveaux systèmes de culture. Néanmoins, ces nouveaux systèmes qui impliquent des modifications du travail du sol, l'introduction de nouvelles plantes cultivées, le changement des successions culturales, des stratégies de fertilisation et de protection des plantes, etc., doivent être évalués. En effet, tout changement dans la gestion de l'agrosystème est susceptible de modifier son équilibre et de générer des conséquences non compatibles avec la triple performance recherchée pour l'agriculture et à terme avec le maintien des fonctions des sols, dont celles de productivité primaire, biodiversité et disponibilité des éléments nutritifs.

Aujourd'hui, les communautés microbiennes du sol font l'objet d'un intérêt croissant pour leur rôle dans les sols agricoles (Sun et al., 2018). En effet, leur abondance, leur diversité et leurs activités influencent les cycles biogéochimiques et donc la disponibilité des éléments nutritifs (Xia et al., 2019 ; Kraut-Cohen et al., 2020). Or, cette disponibilité, est justement ce que l'on essaye de stimuler de façon à pouvoir réduire les apports exogènes, en particulier les apports chimiques de synthèse (**Article n°1**).

L'introduction ou la substitution d'une nouvelle culture dans une rotation est susceptible de modifier les communautés microbiennes du sol, par le biais d'un changement de la rhizodéposition de la plante (**Article n°3**) et/ou de la composition biochimique des résidus de culture dont la décomposition influence les flux d'éléments notamment le carbone et l'azote (**Article n°4**).

Dans ce contexte, et en lien avec le plan protéines végétales pour la France (2014-2020), ce travail de thèse visait à mieux comprendre les effets de l'introduction d'une légumineuse sur la dynamique de l'azote et sur les communautés microbiennes du sol dans un contexte agropédoclimatique Normand.

1. Effet de l'introduction d'une légumineuse dans la rotation culturale

1.1. Effet de l'introduction du pois d'hiver sur les flux d'azote

Le rôle agronomique des légumineuses vis-à-vis de l'azote est en grande partie lié à la fixation symbiotique (Schwember et al., 2019 ; Torabian et al., 2019), processus biologique assurant la conversion de l'azote de l'air (N_2) en azote minéral assimilable par les organismes vivants. Cette symbiose s'effectue notamment par des bactéries (*Rhizobium*) symbiotes des fabacées. Ce processus biologique permet d'assurer tout ou une partie des besoins en azote des légumineuses, selon les espèces et selon les conditions du milieu (Anglade et al., 2015 ; Voisin et Gastal, 2015). Les quantités d'azote fournies dans le système sol - plante par fixation

symbiotique varie de quelques dizaines de kg par hectare (50 - 130 kg N. ha⁻¹ pour les légumineuses à graines), à plusieurs centaines pour des légumineuses fourragères (150 - 200 kg N. ha⁻¹ pour du trèfle blanc et jusqu'à 300 à 500 kg N. ha⁻¹ pour la luzerne ou le trèfle violet) (Vertès et al., 2015). Jensen et al. (2010) ont montré que la féverole, dans des contextes pédoclimatiques d'Europe du nord, peut fixer en moyenne 153 kg N. ha⁻¹ avec une grande hétérogénéité spatiale, la fixation pouvant aller de 71 à 211 kg N. ha⁻¹. Cette fixation de l'azote permet une économie de 30 à 120 kg N d'engrais. ha⁻¹ pour les cultures céréalières suivantes.

Chez le pois, la fixation symbiotique peut aller jusqu'à 195 - 280 kg N. ha⁻¹ (notamment selon la richesse du sol en azote) conduisant à un enrichissement du sol de 22 à 107 kg N ha⁻¹ via cette fixation (Reiter et al., 2002). Chez le pois, les niveaux d'azote minéral supérieur à 50 kg N. ha⁻¹ environ retardent la mise en place de nodosités et limitent la fixation symbiotique (Schneider et Huyghe, 2015). Dans le cadre de ce travail, la simulation avec le logiciel STICS a permis d'estimer une fixation symbiotique nulle chez le pois de la parcelle 1 (niveaux en azote supérieur à 50 kgN.ha⁻¹) et une fixation symbiotique de l'ordre de 123 kg N. ha⁻¹ pour la parcelle 2 (des niveaux d'azote minéral initiale dans le sol inférieur à 50 kg N. ha⁻¹, 44,31 ± 2,84 pour l'horizon 0-30cm, 48,73 ± 1,72 pour l'horizon 30-60 cm et 41,42 ± 1,84 pour l'horizon 60-90 cm). Une des hypothèses de ce travail était que le pois permet une meilleure restitution d'azote au cours de la succession culturale par rapport à la culture du colza. Pour cela une expérimentation au champ a été mise en place dans deux parcelles d'agriculteurs. Le suivi des reliquats azotés entrée et sortie d'hiver a été réalisé chaque année, sur chaque parcelle et sur 2 horizons 0-30 cm et 30-60 cm (**Tableau 9**).

Tableau 9. Suivi des reliquats azotés au cours de la rotation culturale.

Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne de trois répétitions ($n = 3$). Les lettres indiquent une différence significative en fonction du couvert végétale à $p < 0,05$.

Année 1								
Culture en place	Pois				Colza			
Reliquats (kgN.ha ⁻¹)	REH		RSH		REH		RSH	
Parcelle 1	178,1 ±	5,6 b	45,1 ±	0,9 a'	217,6 ±	0,4 a	15,8 ±	1,3 b'
Parcelle 2	93,0 ±	1,5 a	154,1 ±	12,7 a'	90,4 ±	2,7 a	147,7 ±	7,8 a'
Année 2								
Culture en place	Blé de pois				Blé de colza			
Reliquats (kgN.ha ⁻¹)	REH		RSH		REH		RSH	
Parcelle 1	112,1 ±	2,2 a	57,9 ±	1,4 a'	69,3 ±	0,9 b	55,9 ±	1,7 a'
Parcelle 2	112,1 ±	1,8 a	73,0 ±	3,0 a'	70,6 ±	3,6 b	45,9 ±	1,7 b'
Année 3								
Culture en place	Orge de blé de pois				Orge de blé de colza			
Reliquats (kgN.ha ⁻¹)	REH		RSH		REH		RSH	
Parcelle 1	92,7 ±	0,2 b	93,2 ±	1,2 a'	106,2 ±	0,8 a	41,9 ±	0,3 b'
Parcelle 2								

Nos résultats ont montré que pour la parcelle 1, les températures élevées en fin d'été et automne 2016 ont favorisé la minéralisation des résidus de culture (enfouis après la récolte) ce qui a conduit à une quantité de reliquat entrée d'hiver de 178 (pour le pois) à 218 (pour le colza) kg N minéral. ha⁻¹. Ce reliquat est très important et ne correspond pas à des données observées habituellement, qui peuvent varier en moyenne entre 85 kg N minéral. ha⁻¹ et 60 kg N minéral. ha⁻¹, respectivement (Justes et al., 2010 ; Preissel et al., 2015). Aussi, ces observations sont à mettre en relation avec les conditions climatiques particulières de l'année 2016. En sortie d'hiver les reliquats sont plus faibles pour le colza (15 kg N minéral. ha⁻¹) que pour le pois d'hiver (45 kg N minéral. ha⁻¹) suggérant une immobilisation de l'azote plus importante après apport de résidus de pois d'hiver (Mitchell et al., 2001 ; Kumar et Goh, 2002). A la récolte, outre les effets résidus de culture, d'autres facteurs peuvent expliquer les valeurs du reliquat d'azote minéral supérieures obtenues derrière un pois d'hiver. Il pourrait s'agir en effet de l'arrêt plus précoce de l'absorption de l'azote minéral chez un pois d'hiver du fait de son cycle plus court comparativement au colza (Munier-Jolain et al., 2010). De plus, le système racinaire du pois explore rarement le sol au-delà de 60-80 cm (Vocanson et al., 2006), alors que les racines du colza excèdent facilement un mètre (1,00 -1,20 m) dans les sols profonds. Ainsi, après une culture de pois d'hiver, les stocks d'azote minéral dans le sol se concentrent plutôt dans les couches profondes du sol, moins explorées généralement pour la mesure des reliquats (Voisin et al., 2015).

L'année suivante, pendant la culture de blé, les reliquats d'entrée d'hiver sont plus importants pour le précédent pois (112 kg N minéral. ha⁻¹ pour 70 kg N minéral. ha⁻¹ pour le colza fertilisé) suggérant une minéralisation de l'azote dans le sol plus importante avec précédent pois. Ces résultats des teneurs en azote minéral sont en accord avec les références publiées dans la littérature, qui montrent que les valeurs d'azote minéral peuvent varier entre 87 et 136 kg. ha⁻¹ en moyenne après un précédent pois (Beaudoin et al., 2005 ; Carrouée, 2006 ; Schneider et al., 2010 ; Carrouée et al., 2012 ; Shiwakoti et al., 2019). Enfin, en année 3, nous avons constaté un reliquat sorti d'hiver plus important pour le précédent pois quel que soit la fertilisation sur les cultures suivantes. L'arrière-effet du pois d'hiver sur la disponibilité de l'azote est donc visible 2 ans après l'introduction du pois d'hiver dans la rotation. Les reliquats d'entrée d'hiver semblent pour leur part plus liés à la fertilisation de l'année en cours. Pour la parcelle 2, située dans un autre contexte pédoclimatique, un effet du pois d'hiver est également observé sur la disponibilité de l'azote en sortie d'hiver dès l'année 2 de l'expérimentation (**Tableau 9**). Le décalage dans le temps des deux dispositifs (parcelle 1 et parcelle 2) ne permet pas la comparaison des reliquats entre les deux parcelles car ces derniers sont très dépendants

des conditions météorologiques de l'année de la mesure. Ces mesures permettent néanmoins de mettre en exergue l'effet positif du pois d'hiver sur la fourniture en azote minéral au cours de la rotation, pour la culture elle-même, mais garantissent également un capital azoté pour les cultures suivantes, le blé (parcelle 1 et 2) et l'orge (parcelle 1).

Les quantités d'azote apportées *via* les légumineuses sont encore sous-estimées par la non-prise en compte, ou la prise en compte partielle, de la contribution des parties racinaires et notamment la rhizodéposition (Jensen 1996 ; Carlsson and Huss-Danell 2003 ; Crews and Peoples 2005). Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu au niveau racinaire, une partie de ces travaux de thèse a été consacrée à la quantification de la rhizodéposition de l'azote et la caractérisation des exsudats racinaires chez le pois. Les résultats de notre étude ont montré que la quantité d'azote rhizodéposé par le pois (53 %) est supérieure à celle du colza (**Chapitre 3, Article 3**). Ces observations sont en cohérence avec les résultats publiés dans la littérature, qui montrent que les quantités d'azote rhizodéposés par le pois peuvent varier de 27 % à 62 % (Mahieu et al., 2007 ; Wichern et al., 2008 ; Arcand et al., 2013 ; Hupe et al., 2019). La plupart des études qui portent sur l'estimation de la rhizodéposition de l'azote sont réalisées en conditions expérimentales contrôlées et /ou semi-contrôlées (Fustec et al., 2010 ; Hupe et al., 2019 ; Wang et al., 2020). Ces conditions expérimentales qui s'éloignent des conditions naturelles au champ sont nécessaires pour permettre d'approfondir la compréhension des mécanismes qui régissent la rhizodéposition et l'exsudation racinaire des plantes. Cependant, une approche prometteuse a été mise en place afin d'estimer la rhizodéposition à l'échelle de la parcelle à partir d'une expérience en pot. Pausch et al. (2013) ont proposé le rapport rhizodéposition du carbone / carbone de la racine du maïs dérivé d'une expérience en pot pour estimer la rhizodéposition dans des conditions au champ en évaluant uniquement la distributions de la biomasse racinaire. La même approche a été adoptée pour l'azote par Kanders et al. (2017). Cependant, la plus grande incertitude de cette approche est liée aux racines fines décomposées pendant la période de végétation qui ne sont pas incluses dans cette évaluation (Pausch et Kuzyakov, 2018 ; Hupe et al., 2019).

La dégradation des résidus de culture et des racines des légumineuses, riches en azote, contribue également à l'apport d'azote dans les agrosystèmes. Cependant, les dynamiques de minéralisation des résidus sont spécifiques des espèces (Singh and Kumar, 1996), des contextes pédo-climatiques régionaux et des années climatiques (Walley et al., 2007). Dans notre étude, le suivi de dégradation des trois résidus de culture de la rotation (pois d'hiver, colza et blé) montre une immobilisation nette de l'azote dans les sols après apport de résidus. Ce résultat obtenu en conditions d'incubation au laboratoire, est en cohérence avec les résultats de mesures

des reliquats azotés réalisés au champ, qui montent une immobilisation de l'azote après la récolte du pois. Cette immobilisation ou organisation nette de l'azote traduit une diminution du taux d'azote minéral dans le sol. Un des facteurs explicatifs pourrait être le besoin en azote des communautés microbiennes, qui peuvent utiliser l'azote disponible du sol pour leur croissance (Yevdokimov et al., 2005 ; Yansheng et al., 2020). Aussi il a été précédemment démontré que les résidus de culture à faible teneur en N (ou à fort rapport C: N >20) entraînent une immobilisation de l'azote aux premiers stades de la décomposition des résidus (Jensen, 1994 ; Johnson et al., 2007). En effet, la littérature montre que dans des conditions expérimentales, l'incorporation de résidus de pois dans un sol entraîne une organisation nette de l'azote (Trinsoutrot et al., 2000 ; Valé et Justes, 2004), souvent inférieure à celle obtenue en présence de résidus d'autres espèces tel qu'observé dans notre étude, avec les résidus de blé et de colza (**Article 4**). Ce processus d'immobilisation explique en partie les teneurs élevées d'azote minéral disponible dans le sol après une culture de légumineuse. En effet, Prieur et Justes (2006) estiment que les résidus de pois libèrent de l'azote jusqu'à six mois après leur enfouissement dans le sol, constituant ainsi un capital azoté pour les cultures céréalières suivantes. L'ensemble de ces éléments montre l'effet majeur de la disponibilité de l'azote minéral dans le sol sur la cinétique de décomposition des résidus de culture (Chen et al., 2014).

Bien qu'intéressante d'un point de vu agronomique, la gestion des légumineuses est associée aux risques de lixiviation des ions nitrate. Ces risques sont en effet généralement plus élevés après une légumineuse qu'après une céréale si le drainage hivernal se produit. D'ailleurs, la quantité d'azote minéral restant dans le sol après récolte de légumineuses et notamment le pois, constitue un indicateur du risque de lixiviation de nitrate pendant l'hiver suivant la culture (Vertès et al., 2010). Afin d'estimer les pertes d'azote dans les parcelles étudiées, une modélisation agronomique par le logiciel STICS a été réalisée. Cette étape de modélisation a nécessité de collecter et de renseigner les données météorologiques, l'historique des itinéraires techniques des parcelles, les paramètres liés aux caractéristiques du sol et aux cultures à l'échelle de la rotation. Les résultats de la modélisation montrent une absence de perte d'azote par lixiviation dans la parcelle 1 et une perte de l'ordre de 23 kg N. ha⁻¹ pour la parcelle 2, après la culture du pois d'hiver. Ces résultats très contrastés reflètent les différences dans les conditions climatiques et notamment le taux de précipitation de l'année de la mise en place de la culture du pois. L'année 2017-2018 (parcelle 2), avec une moyenne de précipitations de 681 mm, a favorisé le risque de perte d'azote sur cette parcelle. De plus, l'absence d'interculture sur cette parcelle a pu augmenter les risques de lixiviation de l'azote entre la fin de l'été et l'automne, du fait de l'absence de prélèvement d'azote minéral par les cultures, et des

précipitations plus fréquentes pendant cette période de l'année. L'absence de lessivage dans la parcelle 1 (année 2016-2017) peut s'expliquer par la combinaison du faible taux de minéralisation de l'azote et des précipitations. Les résultats de simulation ont mis en avant l'absence de lessivage l'année 2 sous blé dans les deux parcelles. Cette observation est sans doute liée à l'efficacité de l'utilisation de l'azote minéral par le blé dont les racines explorent le sol en profondeur (Cormier et al., 2016). Des études qui traitent des risques de transfert de nitrate par lixiviation à court et moyen termes dans des successions céréalières comprenant du pois, montrent dans différents contextes pédoclimatiques, des tendances similaires avec des taux de lessivage non significatifs et notamment pour des cultures de blé précédé par le pois (Bellouin et al., 2014 ; Cohan et al., 2015).

Ce travail de modélisation a mis par ailleurs en exergue des émissions de N_2O quel que soit le précédent cultural et l'espèce végétale. Ces émissions de N_2O , comme signalé dans la littérature (Carrouée et al., 2012) et comme c'est le cas dans notre étude, peuvent être liés à un apport récent d'engrais azotés d'une part et des conditions pédoclimatiques favorables (pluies importantes et températures élevées) d'autre part. Ces émissions sont plus importantes sous blé (moyenne de 18 kg N. ha^{-1}) et sous colza (8 et 4 kg N. ha^{-1} pour la parcelle 1 et 2, respectivement). Jeuffroy et al. (2013) estiment que les émissions de N_2O enregistrées pour le blé et le colza fertilisés sont 5 à 10 fois plus élevées comparativement au pois et au blé non fertilisé. Ainsi, l'estimation des émissions globales annuelles liées à une culture et à ses résidus montre que celles sous pois représentent moins d'un quart des émissions sous blé et colza fertilisés (Cohan et al., 2015). Nos travaux montrent finalement qu'une rotation (parcelle 1) comportant un pois permettrait de réduire de 20 % les émissions de N_2O sur les 3 ans. Une synthèse de l'ensemble des résultats des flux d'azote mesurés, simulés ou tirés de la littérature est présentée dans la **Figure 30** pour illustrer ces différents flux d'azote pour la culture de pois d'hiver et du colza.

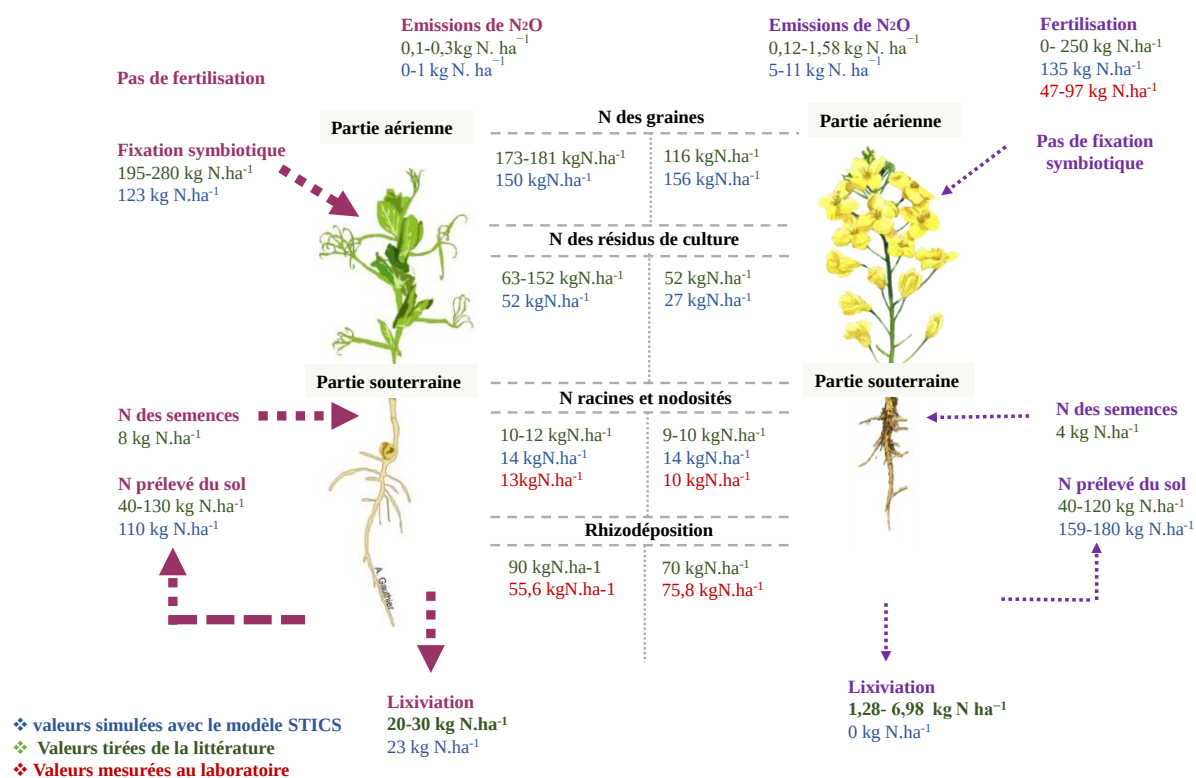


Figure 30. Représentation des différents flux d'azote étudiés lors de la culture du pois d'hiver et du colza

Finalement, l'ensemble de ces résultats souligne l'importance d'adapter la conduite des systèmes de culture incluant les légumineuses pour valoriser au mieux l'azote fourni par cette culture, en limitant les pertes par lixiviation et en maximisant son utilisation par les cultures suivantes. La mise en place de pratiques agricoles adaptées telle que l'implantation d'une Culture Intermédiaire Piège À Nitrates (CIPAN) ou de cultures exigeantes en azote comme le colza après légumineuses pourrait être judicieux afin de réduire les risques de pertes d'azote (Destain et al., 2010 ; Voisin et al., 2015 ; Vandenberghe et al., 2016). De même, la bonne gestion des résidus de culture et un travail du sol réduit peuvent permettre de ralentir la minéralisation des résidus et par conséquent les pertes d'azote (Cohan et al., 2015). Bien entendu, à l'échelle de la succession, le pilotage de la fertilisation reste indispensable pour réduire les pertes d'azote dans les agrosystèmes. Une gestion raisonnée de la fertilisation par le recours à des méthodes telle que le bilan azoté et les outils satellitaires, etc., pourrait permettre de calibrer au mieux les apports d'azote minéral réduisant ainsi ces pertes.

1.2. Effet de l'introduction du pois d'hiver sur les communautés microbiennes du sol

La présence des plantes dans l'agrosystème et la diversification des espèces végétales dans la rotation ont une forte influence sur le fonctionnement biologique du sol. Aussi, ce travail de thèse, dont l'objectif global était d'évaluer l'effet d'une modification de la succession culturale,

substitution du colza par du pois d'hiver en tête de rotation, a contribué à l'évaluation de l'effet de ce changement sur les communautés microbiennes du sol. De plus, le travail ayant porté sur une analyse biannuelle, l'effet des couverts en place (Année 1 : pois d'hiver vs colza ; Année 2 : blé précédé par le pois d'hiver vs blé précédé par le colza) sur l'abondance des communautés microbiennes et les activités enzymatiques du sol a également pu être étudié.

Nos résultats ont montré que l'effet du couvert en place (Année 1) et du précédent (Année 2) était variable suivant la parcelle. En effet, la comparaison entre le couvert pois d'hiver et le couvert colza montre que les abondances microbiennes et les activités enzymatiques ont présenté des niveaux comparables dans la parcelle 1 et des valeurs généralement supérieures dans la parcelle 2 (**Figure 31**).

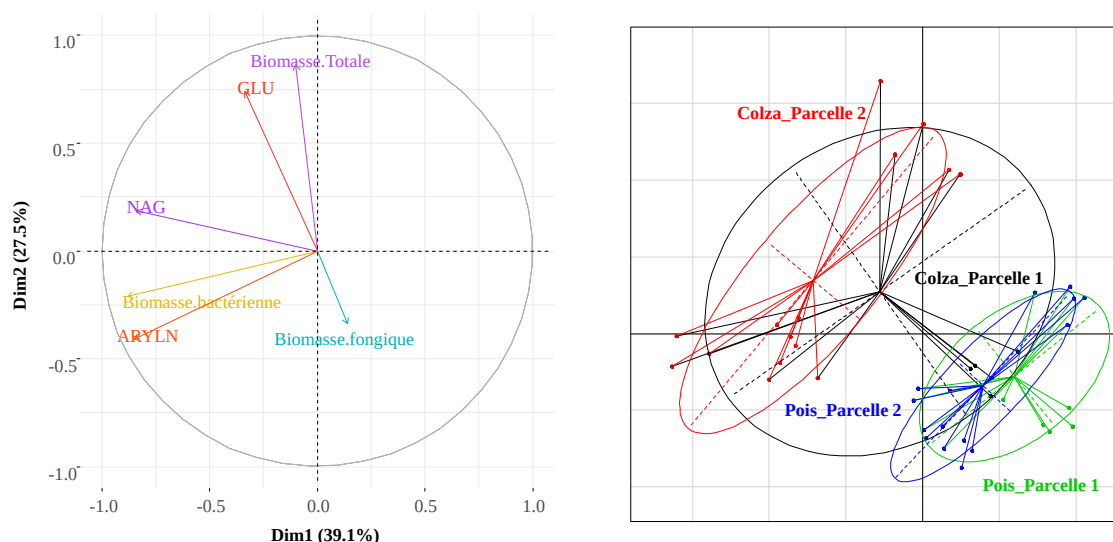


Figure 31. Etude de l'effet du couvert végétale sur les communautés microbiennes et les activités des enzymes du sol dans les deux parcelles étudiées

Cet effet s'est poursuivi au cours de la deuxième année, où les mêmes observations ont été réalisées pour l'effet de ces deux couverts en tant que précédent du blé. Nos résultats ont finalement révélé une forte variabilité spatiale et temporelle qui peut s'expliquer par plusieurs facteurs liés aux caractéristiques physicochimiques du sol et aux temps d'échantillonnage. Dans notre étude, les deux dispositifs expérimentaux ont été mis en œuvre avec une année de décalage et les sols des deux parcelles étudiées présentent des différences de texture. Conformément à nos résultats, plusieurs auteurs ont rapporté l'effet significatif du pédoclimat sur les communautés microbiennes des sols (Castellanos et al., 2009 ; Laval et al., 2009 ; Piotrowska-Długosz et al., 2020). D'ailleurs une étude récente a montré que le type de sol et la fréquence des précipitations sont plus importants dans le déterminisme des communautés microbiennes du sol que les rotations de cultures incluant du colza (Schlatter et al., 2019). Cette variabilité

reflète par ailleurs les grandes différences dans les communautés microbiennes indigènes qui sont directement liés (i) aux différences dans les historiques de gestion des parcelles agricoles (Laval et al., 2009 ; Pereira et al., 2013), (ii) aux traits fonctionnels des plantes, tels que le génotype des plantes (Schweitzer et al., 2008), leur état sanitaire (Yang et al., 2001) ainsi que leur statut nutritionnel (Yang et Crowley, 2000).

La littérature rapporte des résultats variables sur l'effet du pois et du colza sur la diversité microbienne du sol. En effet, Lay et al. (2018) ont constaté que le microbiote bactérien sous colza était très similaire à celui retrouvé sous pois. Cette absence de différenciation dans les communautés microbiennes est expliquée dans l'étude récente de Floc'h et al. (2020) par le fait que certains sols agricoles peuvent présenter des communautés bactériennes non spécifiques à l'hôte, pouvant ainsi coloniser les racines de toutes les espèces de plante utilisées dans la rotation. Dans notre cas, l'analyse de la diversité bactérienne a révélé une discrimination forte entre le pois d'hiver et le colza, tel qu'illustré par l'axe 1 de l'analyse en composante principale qui explique 55 % de cette discrimination (**Figure 32**, travaux de thèse Pauline Lusley).

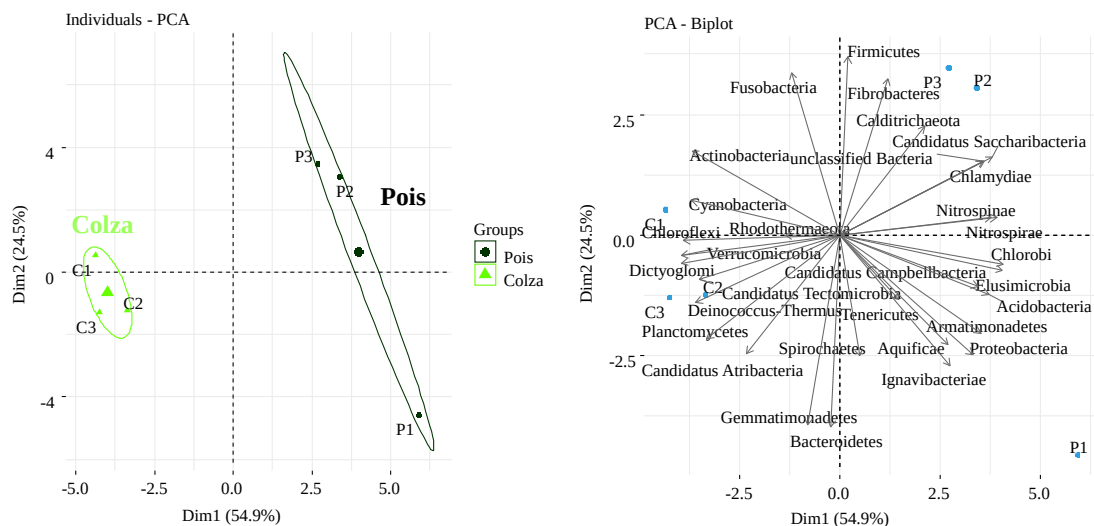


Figure 32. Etude de l'effet du couvert végétal sur la diversité bactérienne du sol (la parcelle 2)

Ces résultats concordent avec les recherches de Cordero et al. (2019), qui ont rapporté que le microbiome bactérien sous colza était significativement différent de celui du pois. Cet effet couvert en place, bien que présent semble moins marqué dans le cas de la diversité fongique, si l'on considère l'axe 1 de l'analyse en composante principale qui n'explique que 32 % de cette variabilité (**Figure 33**, travaux de thèse Pauline Lusley).

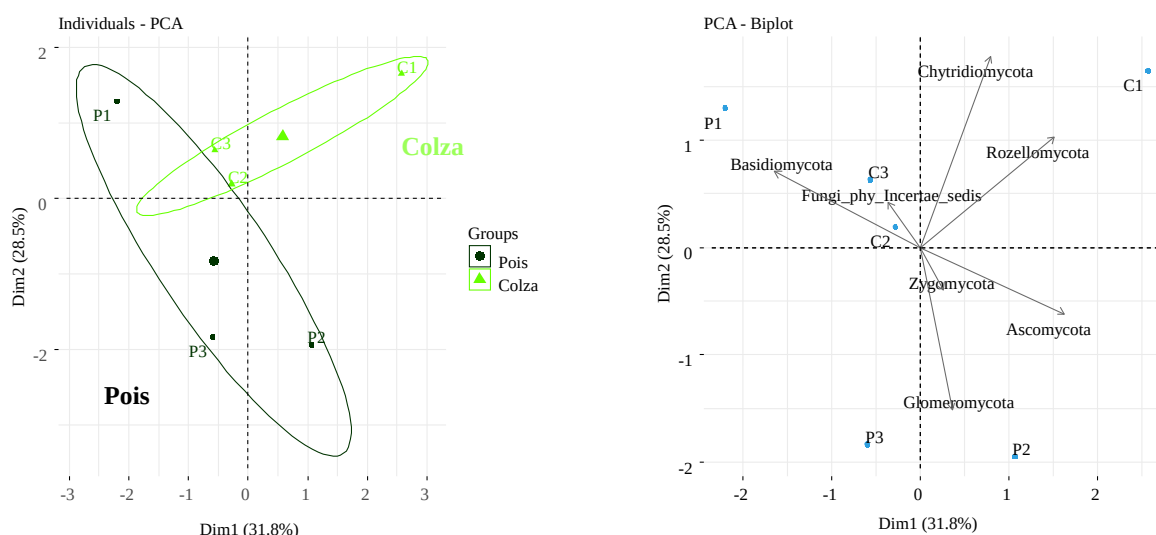


Figure 33. Etude de l'effet du couvert végétale sur la diversité fongique du sol (la parcelle 2)

Des études qui portent sur l'effet de ces deux couverts en tant que précédent sur la diversité des communautés fongique montrent une diversité moins importante après un précédent colza comparativement à un précédent avec légumineuse. En effet, certaines cultures comme le colza ne sont pas mycorrhizogènes et peuvent réduire la colonisation des racines de la culture suivante par les champignons mycorrhiziens arbusculaires (White et Weil, 2010 ; Koide et Peoples, 2012 ; Hu et al., 2015). La rhizosphère des racines vivantes de colza libère un composé de type fumigant (2-phényléthyl isothiocyanate), qui affecte considérablement la structure des communautés bactériennes et fongiques ainsi que les fonctions liées au cycle des éléments nutritifs (Rumberger et Marschner, 2003 ; Hu et al., 2015). Bien que la littérature rapporte l'effet positif des légumineuses qui contribuent à augmenter les pools de carbone dans le sol et l'abondance des populations microbiennes du sol (Roux et al., 2013 ; Venter et al., 2016), l'ensemble des résultats acquis au champ n'ont pas permis de confirmer cet effet en tant que précédent du blé (année 2). En effet, les précédents pois d'hiver et colza ont présenté des abondances microbiennes et des activités enzymatiques soit équivalentes (parcelle 1) soit plus importantes (parcelle 2) avec un précédent colza.

Au cours de la succession culturale, les résidus de culture et les rhizodépôts sont une voie d'entrée de matière organique dans le sol (De Deyn et Van der Putten, 2005). L'apport des résidus de culture constitue une source de substrats pour les microorganismes indigènes (Wardle et al., 1999 ; Shahbaz et al., 2017), dont la croissance est dépendante de la disponibilité des éléments nutritifs et par conséquent de l'intensité et des taux de minéralisation de ces résidus (Trinsoutrot et al., 2000 ; Johnson et al., 2007). Lors de la décomposition des résidus de culture du pois et du colza, une forte minéralisation au stade précoce de la décomposition suivie

par une phase plus lente de la décomposition a été observée, en accord avec ce qui a été montré dans la littérature (Trinsoutrot et al., 2000 ; Gaillard et al., 2003). Ces intensités de minéralisation sont principalement expliquées par des modifications dans la composition des résidus en lien avec une modification des communautés microbiennes du sol (Geisseler et al., 2009 ; Nguyen and Marschner, 2017 ; Sauvadet et al., 2017). En effet, au niveau microbien, il est communément admis que les stades précoces d'apport sont marqués par la colonisation des résidus de culture par des populations bactériennes et les stades tardifs de dégradation par des populations fongiques qui dégradent lentement la fraction la plus récalcitrante, comme la lignine (Fontaine et al., 2003 ; Sauvadet et al., 2017).

Dans notre étude, l'apport des résidus de culture a conduit à une minéralisation de carbone et une immobilisation de l'azote. Le taux de minéralisation le plus élevé est obtenu pour les résidus de pois qui présentait la teneur en composés solubles la plus importante comparativement aux résidus de colza et de blé (**Chapitre 3, Article 2**). En effet, les composés facilement dégradables (C soluble, cellulose, hémicellulose) sont dégradés dès l'introduction des résidus dans le sol, les composés les plus récalcitrants sont dégradés plus lentement. L'immobilisation de l'azote est liée par ailleurs aux faibles teneurs en azote des résidus (Jensen et al., 1994 ; Johnson et al., 2007). Ces observations étaient concomitantes avec une diminution des biomasses bactérienne et fongique et les activités enzymatiques (GLU, NAG, ARYLN) au bout de 90 jours d'incubation. En effet, après un pic d'activité associé à la dégradation des polysaccharides pariétaux (Cusack et al., 2010 ; Bell et al., 2014) aux stades précoces de la dégradation des résidus de culture (Rinkes et al., 2011 ; Šnadjr et al., 2011), les activités enzymatiques hydrolases diminuent. La diminution des niveaux d'activités pourrait s'expliquer par l'épuisement des composés organiques (Geisseler et al., 2009 ; Piotrowska et Wilczewsk, 2012) et la contribution des enzymes oxydatives dans la dégradation des composés les plus récalcitrants au stade tardif de décomposition des résidus (Piotrowska et Wilczewsk, 2012). L'apport des résidus de culture a engendré des modifications dans les activités enzymatiques, dans les fonctions de minéralisation du carbone et de l'azote et dans la diversité des communautés bactériennes. En effet, l'analyse de la diversité bactérienne a mis en exergue la présence spécifique de certains genres et ordres bactériens après apport des résidus de culture en lien avec leur composition biochimique. Par exemple les genres *Inquilinus*, *Solitalea*, *Proteiniborus*, etc. et ordre Chloroflexales, Rhodotheramales, etc. détectés uniquement sous résidus de pois, sont fortement corrélée ($r = 0,65$, $p < 0,05$) au contenu des résidus en composés solubles. De la même façon, les genres *Flavobacterium*, *Cellvibrio*, *Thermacetogenium*, etc. et

ordre *Alteromonadeles* sont positivement corrélés ($r = 0,70$, $p < 0,05$) au contenu en lignine sous résidus de colza.

Conclusion et perspectives



Dans un contexte de demande croissante en protéines, de raréfaction des ressources non renouvelables, de nécessité de préserver l'environnement (qualité des eaux, air et sols) et d'instabilité économique, introduire le pois d'hiver dans la rotation est l'une des réponses possibles notamment en région Normandie. Dans les conditions de ce travail de thèse, les rendements du blé après le pois d'hiver (92 q. ha^{-1} pour la parcelle 1 et 125 q. ha^{-1} pour la parcelle 2) ont été équivalents à ceux obtenus après une culture de colza qui a nécessité une fertilisation azotée de 96 kg N. ha^{-1} pour la parcelle 1 et 47 kg N. ha^{-1} pour la parcelle 2. Les résultats ont confirmé la capacité d'une culture de pois d'hiver à atteindre son potentiel de productivité sans recours aux fertilisants azotés. Aussi, en prenant en compte le soutien aux protéagineux, effectif à partir de 2010 (hypothèse a minima de 100 € ha^{-1} de pois), et renforcé depuis 2017 avec des montants définitifs de $111,5 \text{ € ha}^{-1}$, la culture du pois d'hiver permettra d'améliorer la marge brute de la succession ramenée à l'année tout en améliorant la durabilité économique. Cette culture permet en effet d'augmenter l'autonomie azotée, qui réduit ou évite l'achat d'engrais minéraux et diminue le temps de travail des agriculteurs lié entre autres aux interventions de fertilisation. L'introduction d'un pois d'hiver devient alors systématiquement profitable d'un point de vue économique.

D'un point de vue agronomique, il s'agissait de pouvoir évaluer l'effet de ce changement de tête de rotation (pois d'hiver vs colza) sur l'état biologique du sol. Les résultats ont révélé une forte variabilité spatio-temporelle dans la réponse des communautés microbiennes du sol, et mis en évidence l'importance du contexte pédoclimatique dans le déterminisme de l'abondance et de l'activité des communautés microbiennes du sol. En effet, la comparaison des deux successions pois d'hiver- blé et colza- blé a abouti à des résultats différents en fonction de la parcelle considérée. Par ailleurs, dans les conditions environnementales de notre étude, la succession culturale incluant le pois a enrichi le sol en azote minéral comparativement à la succession avec la culture de colza. Ces résultats ont mis en exergue l'effet positif du pois d'hiver sur la disponibilité de l'azote minéral au cours du cycle cultural et pour les cultures suivantes, ici le blé puis l'orge. Ils confirment partiellement notre hypothèse. En effet, la disponibilité en ressources, et notamment l'azote restitué au sol pour les cultures suivantes, est supérieur dans la succession incluant le pois d'hiver. En revanche, les niveaux d'abondance des communautés microbiennes et d'activités enzymatiques ont été équivalents (parcelle 1) ou supérieurs (parcelle 2) dans la succession incluant le colza.

Dans ce travail, nous avons considéré que la plante et ses résidus de culture pouvaient jouer un rôle prépondérant dans le déterminisme de l'abondance et de l'activité des communautés microbiennes. En effet, lors de sa croissance, la plante alimente le sol en composés organiques

par sa rhizodéposition ; de même après la récolte, les résidus de culture, restant sur le sol ou enfouis, apporte des éléments nutritifs pour la microflore hétérotrophe. Au cours de ce travail, nous avons essayé de combiner l'étude de la rhizodéposition de l'azote avec celle des exsudats racinaires. Comme attendu, la rhizodéposition s'est révélée plus importante sous pois ; par contre elle ne s'est pas accompagnée d'une modification des communautés microbiennes rhizosphériques. Les indicateurs globaux d'abondance et des activités utilisées dans cette étude n'ont en effet pas permis de mettre en évidence des modifications dans les communautés microbiennes. En conséquence, dans cette étude, l'effet sol s'est révélé plus important que l'effet du couvert qui n'introduit pas de différenciation dans ces communautés ni leurs activités. Ces résultats s'inscrivent dans une littérature relativement controversée du fait notamment des différences dans les conditions d'étude (stage phénologique de la plante, étude in situ/serre/microcosme) et les contextes pédoclimatiques. Le choix des indicateurs dans ce travail s'est basé sur les résultats de projets passés (bioindicateurs, Adème) et en cours (Microbioterre et Mycoagra, Casdar). L'un des éléments différenciant ce projet de thèse est l'ancienneté de mise en place des pratiques dans les parcelles étudiées. En effet, les parcelles 1 et 2 n'avaient jamais reçues de pois d'hiver ni d'autre légumineuse ; les changements dans les communautés ont pu être de faible amplitude et difficile à mettre en évidence. Ces résultats seront complétés par la quantification de l'abondance de gènes de fonction liés au cycle de l'azote.

Contrairement à ces observations, la dégradation des résidus de culture a significativement modifié la composition des communautés bactériennes. Cet effet a pu être relié à la composition biochimique des résidus de culture. En conséquence, notre hypothèse selon laquelle l'apport des résidus de culture entraîne des changements dans la composition des communautés microbiennes du sol et des activités enzymatiques a été vérifiée. Ce travail va être complété par une analyse des communautés fongiques par séquençage haut débit.

Les résultats de cette étude ont par ailleurs fait l'objet d'un travail de modélisation avec le modèle agronomique STICS qui a estimé une perte d'azote par lixiviation de l'ordre de 23 kg N. ha⁻¹ après la culture du pois pour la parcelle 2. Ces risques de lixiviation de l'azote sont à prendre en compte pour limiter l'impact environnemental négatif de la culture du pois. Ils doivent notamment contraindre la gestion de la culture et de la période d'interculture. Soutenues par la mise en place du plan protéines végétales, les cultures de légumineuses sont aujourd'hui en cours de développement en région Normandie, comme dans de nombreuses régions européennes. Il est important d'interroger encore le potentiel de ces cultures, mineures en Europe, à répondre aux différents enjeux agronomiques et écologiques. En région, il s'agit

notamment de préciser quelles combinaisons de pratiques (travail du sol, précédent, interculture, culture suivante, ...) sont les plus performantes pour répondre aux enjeux et aux attentes des consommateurs.

Références bibliographiques

- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A., 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 31, 85–91. <https://doi.org/10.1007/s003740050628>
- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M., 2001a. Tillage and residue management effects on arylamidase activity in soils. *Biology and Fertility of Soils* 34, 21–24. <https://doi.org/10.1007/s003740100349>
- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A., 2001b. Arylamidase activity in soils : effect of trace elements and relationships to soil properties and activities of amidohydrolases. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00109-7)
- Agreste, 2018. Protéagineux.<http://draaf.normandie.agriculture.gouv.fr/Agreste-Donnees-no8-Structure-des,1431>, consulté le 02/05/2020
- Agreste, 2020. Statistique agricole annuelle 2018-2019 https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/Chd2002/C&D%202020-2_SAA%202018-2019%20Provisoire.pdf, consulté le 10/05/2020
- Ahlawat, I.P.S, Gangaiah, B., 2004. Grain legumes farmers own nitrogen fertilizer units role revisited. In: *Souvenir: national symposium on resource conservation and agricultural productivity*, 22–25 November, Ludhiana.
- Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11512–11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105>
- Amossé, C., Jeuffroy, M.-H., Celette, F., David, C., 2013. Relay-intercropped forage legumes help to control weeds in organic grain production. *European Journal of Agronomy* 49, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.04.002>
- Anglade, J., Billen, G., Garnier, J., Garnier, J., 2015. Relationships for estimating N₂ fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere* 6, art37. <https://doi.org/10.1890/ES14-00353.1>
- Angus, J.F., Kirkegaard, J.A., Hunt, J.R., Ryan, M.H., Ohlander, L., Peoples, M.B., 2015. Break crops and rotations for wheat. *Crop Pasture Sci.* 66, 523–552. <https://doi.org/10.1071/CP14252>
- Aranjuelo, I., Irigoyen, J.J., Nogués, S., Sánchez-Díaz, M., 2009. Elevated CO₂ and water-availability effect on gas exchange and nodule development in N₂-fixing alfalfa plants. *Environmental and Experimental Botany* 65, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.06.006>
- Arcand, M.M., Knight, J.D., Farrell, R.E., 2013. Temporal dynamics of nitrogen rhizodeposition in field pea as determined by ¹⁵N labeling. *Canadian Journal of Plant Science* 93, 941–950. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-050>
- Assemien, E.F.L., 2018. Impact de pratiques agricoles conventionnelles et innovantes sur la fertilité des sols et les acteurs microbiens impliqués dans la zone de savanes humides de Côte d’Ivoire (phdthesis). Université de Lyon.
- Augeard, B., 2006. Mécanismes de genèse du ruissellement sur sol agricole drainé sensible à la battance. Etudes expérimentales et modélisation (phdthesis). ENGREF (AgroParisTech).
- Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., 2001. Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biology* 3, 139–148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12905>
- Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* 32, 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Baggs, E.M., Rees, R.M., Smith, K.A., Vinten, A.J.A., 2000. Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. *Soil Use and Management* 16, 82–87. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2000.tb00179.x>
- Baggs, E.M., Stevenson, M., Pihlatie, M., Regar, A., Cook, H., Cadisch, G., 2003. Nitrous oxide emissions following application of residues and fertiliser under zero and conventional tillage. *Plant and Soil* 254, 361–370. <https://doi.org/10.1023/A:1025593121839>
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research* 53, 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00107-5)
- Bardgett, R., Bardgett, I. of E. and N.S.R.D., 2005. *The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach*. OUP Oxford.
- Bardgett, R.D., van der Putten, W.H., 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515, 505–511. <https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Barreau, S., Magnier, J., 2019. Analyse des contenus des sixièmes programmes d’actions régionaux « Nitrates ». Office International de l’Eau. 50p.
- Basche, A.D., Miguez, F.E., Kaspar, T.C., Castellano, M.J., 2014. Do cover crops increase or decrease nitrous oxide emissions? A meta-analysis. *Journal of Soil and Water Conservation* 69, 471–482.

- <https://doi.org/10.2489/jswc.69.6.471>
- Basset-Mens, C., 2005. Propositions pour une adaptation de l'Analyse de Cycle de Vie aux systèmes de production agricole. Mise en œuvre pour l'évaluation environnementale de la production porcine 245.
- Bastida, F., Kandeler, E., Hernández, T., García, C., 2008. Long-term Effect of Municipal Solid Waste Amendment on Microbial Abundance and Humus-associated Enzyme Activities Under Semiarid Conditions. *Microbial Ecology* 55, 651–661. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9308-0>
- Beaudoin, N., Saad, J.K., Van Laethem, C., Machet, J.M., Maucorps, J., Mary, B., 2005. Nitrate leaching in intensive agriculture in Northern France: Effect of farming practices, soils and crop rotations. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 111, 292–310. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.06.006>
- Beaudoin, N., Tournebise, J., Ruiz, L., Constantin, J., Justes, E., 2012. Nitrate et eau en période d'interculture 84.
- Beillouin, D., Schneider, A., Carrouée, B., Champolivier, L., Le Gall, C., Jeuffroy, M.H., 2014. Short- and medium-term effects on nitrogen leaching of the introduction of a pea or an oilseed rape crop in wheat-based successions Poster avec extended abstract, 18th Nitrogen Workshop Lisbon, 30 June - 3 July 2014.
- Bell C, Carrillo Y, Boot C M, Rocca J D, Pendall E, Wallenstein M D. 2014. Rhizosphere stoichiometry: are C:N:P ratios of plants, soils, and enzymes conserved at the plant species-level? *New Phytologist*, 201, 505–517.
- Benintende, S.M., Benintende, M.C., Sterren, M.A., De Battista, J.J., 2008. Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. *Ecological Indicators* 8, 704–708. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.12.004>
- Benoit, M., Garnier, J., Billen, G., 2015. Temperature dependence of nitrous oxide production of a luvisolic soil in batch experiments. *Process Biochemistry* 50, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.013>
- Benoit, M., Garnier, J., Billen, G., Mercier, B., Abdelkader, A., Ansart, P., 2012. mise en place d'un observatoire du lessivage du nitrate en ab dans le bassin de la seine 19.
- Benson, D.R., Silvester, W.B., 1993. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57, 293–319.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bergkvist, G., Stenberg, M., Wetterlind, J., Båth, B., Elfstrand, S., 2011. Clover cover crops under-sown in winter wheat increase yield of subsequent spring barley—Effect of N dose and companion grass. *Field Crops Research* 120, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.11.001>
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., 2019. Microbial lipases: An overview of screening, production, and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22, 101368. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2019.101368>
- Biarnès, V., Lecomte, V., Wagner, D., 2019. Féveroles : optimiser le rendement par les pratiques culturales. *Perspectives agricoles* 10–14.
- Bicharanloo, B., Bagheri Shirvan, M., Keitel, C., Dijkstra, F.A., 2020. Rhizodeposition mediates the effect of nitrogen and phosphorous availability on microbial carbon use efficiency and turnover rate. *Soil Biology and Biochemistry* 142, 107705. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107705>
- Bioteau, T., Bordenave, P., Laurent, F., Ruelland, D., 2002. Evaluation des risques de pollution diffuse par l'azote d'origine agricole à l'échelle de bassins versants : intérêts d'une approche par modélisation avec SWAT®. *Ingénieries eau-agriculture-territoires* 3–12.
- Birouste, M., Kazakou, E., Blanchard, A., Roumet, C., 2012. Plant traits and decomposition: are the relationships for roots comparable to those for leaves? *Annals of Botany* 109, 463–472. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr297>
- Bissett, A., Richardson, A.E., Baker, G., Thrall, P.H., 2011. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Applied Soil Ecology* 51, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.08.010>
- Bittman, S., Forge, T.A., Kowalenko, C.G., 2005. Responses of the bacterial and fungal biomass in a grassland soil to multi-year applications of dairy manure slurry and fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.038>
- Blackshaw, R.E., Molnar, L.J., Moyer, J.R., 2010. Suitability of legume cover crop-winter wheat intercrops on the semi-arid Canadian Prairies. *Canadian Journal of Plant Science* 90, 479–488. <https://doi.org/10.4141/CJPS10006>
- Blaser, B.C., Singer, J.W., Gibson, L.R., 2011. Winter Cereal Canopy Effect on Cereal and Interseeded Legume Productivity. *Agronomy Journal* 103, 1180–1185. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0506>
- Bobille, H., 2016. Modulation de l'exsudation racinaire de composés azotés chez les Fabacées et réponse aux stress hydriques, <http://www.theses.fr. Angers>.
- Bocchi, S., Malgioglio, A., 2010. Azolla-Anabaena as a Biofertilizer for Rice Paddy Fields in the Po Valley, a Temperate Rice Area in Northern Italy [WWW Document]. *International Journal of Agronomy*. <https://doi.org/10.1155/2010/152158>
- Bouard, F., 2017. Évaluation des performances de trois systèmes de culture innovants conduits en Bretagne entre

- 2012 et 2016 105.
- Boudenne, J.L., Coulomb, B., Prudent, P., 2011. Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des métaux lourds dans des sols contaminés. *Bulletin de veille scientifique*. 15.
- Bouma, J., Broll, G., Crane, T.A., Dewitte, O., Gardi, C., Schulte, R.P., Towers, W., 2012. Soil information in support of policy making and awareness raising. *Current Opinion in Environmental Sustainability, Terrestrial systems* 4, 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.07.001>
- Brisson, N., Gary, C., Justes, E., Roche, R., Mary, B., Ripoche, D., Zimmer, D., Sierra, J., Bertuzzi, P., Burger, P., Bussi re, F., Cabidoche, Y.M., Cellier, P., Debaeke, P., Gaudill re, J.P., Hénault, C., Maraux, F., Seguin, B., Sinoquet, H., 2003. An overview of the crop model stics. *European Journal of Agronomy, Modelling Cropping Systems: Science, Software and Applications* 18, 309–332. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00110-7)
- Brodie, E., Edwards, S., Clipson, N., 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00126-0)
- Bronick, C.J., Lal, R., 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.03.005>
- Broyer, J., 2001. Plaidoyer pour une politique européenne en faveur des écosystèmes prairiaux. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* 41–50.
- Brzostek, E.R., Finzi, A.C., 2011. Substrate supply, fine roots, and temperature control proteolytic enzyme activity in temperate forest soils. *Ecology* 92, 892–902. <https://doi.org/10.1890/10-1803.1>
- Burns, R.G., Dick, R.P., 2002. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. CRC Press.
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
- Caldwell, B.A., 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.06.003>
- Calzolari, C., Ungaro, F., Filippi, N., Guermandi, M., Malucelli, F., Marchi, N., Staffilani, F., Tarocco, P., 2016. A methodological framework to assess the multiple contributions of soils to ecosystem services delivery at regional scale. *Geoderma* 261, 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.07.013>
- Canarini, A., Merchant, A., Dijkstra, F.A., 2016. Drought effects on *Helianthus annuus* and *Glycine max* metabolites: from phloem to root exudates. *Rhizosphere* 2, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.06.003>
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W., 2019. Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. *Frontiers in Plant Science* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>
- Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G., 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330, 192–196. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>
- Caracuta, V., Barzilai, O., Khalaily, H., Milevski, I., Paz, Y., Vardi, J., Regev, L., Boaretto, E., 2015. The onset of faba bean farming in the Southern Levant. *Scientific Reports* 5, 14370. <https://doi.org/10.1038/srep14370>
- Carlsson, G., Huss-Danell, K., 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil* 253, 353–372. <https://doi.org/10.1023/A:1024847017371>
- Carminati, A., Vetterlein, D., 2013. Plasticity of rhizosphere hydraulic properties as a key for efficient utilization of scarce resources. *Annals of Botany* 112, 277–290. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs262>
- Carrouée, L., 1999. Les systèmes productifs européens : nouvelles problématiques, nouvelles méthodologies. *Méditerranée* 92, 21–26. <https://doi.org/10.3406/medit.1999.3105>
- Carrouée, B., Cr pon, K., Peyronnet, C., 2003. Les protéagineux : intérêt dans les systèmes de production fourrag ers français et européens, *Fourrages* 174, 163–182
- Carrouée, B., Bourgeais, E., Aveline A., 2006. Dry pea crop effect on the soil nitrogen balance. « Grain legumes and the environment: how to assess benefits and impacts? » AEP Eds, 111–116.
- Carrouée, B.B., Schneider, A.A., Flénet, F.F., Jeuffroy, M.-H.M.-H., Nemecek, T.T., 2012. Introduction du pois protéagineux dans des rotations   base de céréales   paille et colza : impacts sur les performances économiques et environnementales. *Innovations Agronomiques* 25, 125–142.
- Castellanos, T., Dohrmann, A.B., Imfeld, G., Baumgarte, S., Tebbe, C.C., 2009. Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. *European Journal of Soil Biology* 45, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.07.006>
- Cattin, G. Guichard, L., Jannot Mate P., Justes E., Laurent F., Machet J.M. 2002. Lessivage des nitrates en systemes de cultures annuelles. COMIFER. 41.
- Cellier, P., Bethenod, O., Castell, J.-F., Germon, J.C., 2008. Contribution de l'agriculture à l'effet de serre - Importance de l'azote et interactions avec l'ozone. <https://doi.org/10.1051/ocl.2008.0224>
- Cenini, V.L., Fornara, D.A., McMullan, G., Ternan, N., Carolan, R., Crawley, M.J., Clément, J.-C., Lavorel, S.,

2016. Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 96, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.015>
- Charrier, F., Magrini, M.-B., Charlier, A., Fares, M., Bail, M.L., Messéan, A., Meynard, J.-M., 2013. Alimentation animale et organisation des filières : une comparaison pois protéagineux-lin oléagineux pour comprendre les facteurs freinant ou favorisant les cultures de diversification. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids* 20, D407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013011>
- Chen, B., Liu, E., Tian, Q., Yan, C., Zhang, Y., 2014. Soil nitrogen dynamics and crop residues. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34, 429–442. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0207-8>
- Chen, H., Li, X., Hu, F., Shi, W., 2013. Soil nitrous oxide emissions following crop residue addition: a meta-analysis. *Global Change Biology* 19, 2956–2964. <https://doi.org/10.1111/gcb.12274>
- Chenu, C., Bissonnais, Y.L., Arrouays, D., 2000. Organic Matter Influence on Clay Wettability and Soil Aggregate Stability. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1479–1486. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6441479x>
- Chenu, C., Angers, D.A., Barré, P., Derrien, D., Arrouays, D., Balesdent, J., 2019. Increasing organic stocks in agricultural soils: Knowledge gaps and potential innovations. *Soil and Tillage Research, Soil Carbon and Climate Change: the 4 per Mille Initiative* 188, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.04.011>
- Chorley, G.P.H., 1981. The Agricultural Revolution in Northern Europe, 1750-1880: Nitrogen, Legumes, and Crop Productivity. *The Economic History Review* 34, 71–93. <https://doi.org/10.2307/2594840>
- CITEPA, 2017. Rapport d'activité. <https://www.citepa.org/wp-content/uploads/publications/rapports-activite/citepa-ra-2017.pdf>, consulté le 02/09/2020
- Cohan, J.-P., Cadillon, A., Dubois, S., Duval, R., Flenet, F., Justes, E., Mary, B., Massad, R.S., Bonilla, D.P., Schneider, A., 2015. Impact de l'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture sur les émissions de N₂O. Presented at the 12. Rencontres de la fertilisation raisonnée et de l'analyse (Congrès GEMAS-COMIFER 2015).
- Colman, B.P., Schimel, J.P., 2013. Drivers of microbial respiration and net N mineralization at the continental scale. *Soil Biology and Biochemistry* 60, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.003>
- COMIFER, 1996. Calcul de la fertilisation azotée. https://comifer.asso.fr/images/publications/brochures/BROCHURE_AZOTE_20130705web.pdf, consulté le 02/05/2020
- Cookson, W.R., O'Donnell, A.J., Grant, C.D., Grierson, P.F., Murphy, D.V., 2008. Impact of Ecosystem Management on Microbial Community Level Physiological Profiles of Postmining Forest Rehabilitation. *Microbial Ecology* 55, 321–332. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9278-2>
- Cordero, J., de Freitas, J.R., Germida, J.J., 2019. Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 66, 71–85. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0330>
- Cormier, F., Foulkes, J., Hirel, B., Gouache, D., Moëne-Loccoz, Y., Gouis, J.L., 2016. Breeding for increased nitrogen-use efficiency: a review for wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Breeding* 135, 255–278. <https://doi.org/10.1111/pbr.12371>
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Denef, K., Paul, E., 2013. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19, 988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Courtois M.P., Marizou, J., 2012. Quels seront les enjeux de l'agriculture en 2050 ? <https://www.larepubliquedespyrenees.fr/2012/02/23/quels-seront-les-enjeux-de-l-agriculture-en-2050,227390.php>, consulté 04/09/2019
- CP PES, 2014. Le Club Parlementaire pour la Protection et l'Etude des Sols (Philippe B). La journée mondiale des sols, le colloque de l'Association Française pour l'Etude du Sol. <https://www.cppes.org/>, consulté le 10/05/2019
- Crews, T.E., Peoples, M.B., 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 102, 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>
- Crews, T.E., Peoples, M.B., 2005. Can the Synchrony of Nitrogen Supply and Crop Demand be Improved in Legume and Fertilizer-based Agroecosystems? A Review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72, 101–120. <https://doi.org/10.1007/s10705-004-6480-1>
- Crozat, Y., Aveline, A., Coste, F., Gillet, J.P., Domenach, A.M., 1994. Yield performance and seed production pattern of field-grown pea and soybean in relation to N nutrition. *European Journal of Agronomy* 3, 135–144. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(14\)80119-6](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(14)80119-6)
- Cui, J.D., Jia, S.R., 2015. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* 35, 15–28. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.795516>

- Curley, E.M., O'Flynn, M.G., McDonnell, K.P., 2010. Porous Ceramic Cups: Preparation and Installation of Samplers for Measuring Nitrate Leaching. *International Journal of Soil Science* 5.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., 2005. Exploring Microbial Diversity--A Vast Below. *Science* 309, 1331–1333. <https://doi.org/10.1126/science.1118176>
- Cusack, D. F, Torn, M. S, McDowell, W. H, Silver, W. L., 2010. The response of heterotrophic activity and carbon cycling to nitrogen additions and warming in two tropical soils. *Global Change Biology*, 16, 2555–2572
- DAFA, Deutsche Agrarforschungsallianz, 2012. The Legumes Expert Forum. Science, economy, and society – making ecosystem services from legumes competitive. A research strategy of the German Agricultural Research Alliance. http://www.dafa.de/fileadmin/dam_uploads/images/Fachforen/ff_leguminosenen_2012.pdf, consulté le 02/05/2020
- Daryanto, S., Fu, B., Zhao, W., Wang, S., Jacinthe, P.-A., Wang, L., 2020. Ecosystem service provision of grain legume and cereal intercropping in Africa. *Agricultural Systems* 178, 102761. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.102761>
- De Deyn, G.B., Van der Putten, W.H., 2005. Linking aboveground and belowground diversity. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.009>
- De Ron, A.M., Sparvoli, F., Pueyo, J.J., Bazile, D., 2017. Editorial: Protein Crops: Food and Feed for the Future. *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00105>
- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., Vanderleyden, J., De Mot, R., Lugtenberg, B.J.J., 2002. Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 15, 1173–1180. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1173>
- Decaëns, T., 2010. Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography* 19, 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2009.00517.x>
- Decrem, M., Spiess, E., Richner, W., Herzog, F., 2007. Impact of Swiss agricultural policies on nitrate leaching from arable land. *Agronomy for Sustainable Development* 27, 243–253. <https://doi.org/10.1051/agro:2007012>
- Demkina, E.V., Shanenko, E.F., Nikolaev, Yu.A., El'-Registan, G.I., 2017. Model of the regulation of activity of immobilized enzymes (amylases) in soil. *Microbiology* 86, 231–240. <https://doi.org/10.1134/S0026261717020060>
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R., 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72, 313–327. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x>
- Derrien, D., Dignac, M.-F., Basile-Doelsch, I., Barot, S., Cécillon, L., Chenu, C., Chevallier, T., Freschet, G.T., Garnier, P., Guenet, B., Hedde, M., Klumpp, K., Lashermes, G., Maron, P.-A., Nunan, N., Roumet, C., 2016. Quels mécanismes, quelles pratiques agricoles, quels indicateurs ? *Etude et Gestion des Sols* 32.
- Dessaux, Y., Grandclément, C., Faure, D., 2016. Engineering the Rhizosphere. *Trends in Plant Science, Special Issue: Unravelling the Secrets of the Rhizosphere* 21, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.002>
- Destain, J.-P., Reuter, V., Goffart, J.-P., 2010. Les cultures intermédiaires pièges à nitrate (CIPAN) et engrais verts : protection de l'environnement et intérêt agronomique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*.
- Di Nardo, C., Cinquegrana, A., Papa, S., Fuggi, A., Fioretto, A., 2004. Laccase and peroxidase isoenzymes during leaf litter decomposition of *Quercus ilex* in a Mediterranean ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry, Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications* 36, 1539–1544. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.013>
- Di, H.J., Cameron, K.C., 2005. Reducing environmental impacts of agriculture by using a fine particle suspension nitrification inhibitor to decrease nitrate leaching from grazed pastures. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 109, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.03.006>
- Dick, R.P., 2015. Soil Enzyme Activities as Indicators of Soil Quality, in: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 107–124. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c7>
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A., 1987. Kinetics and activities of phosphatase-clay complexes. *Soil Science* 143, 5–15.
- Dinnes, D.L., Karlen, D.L., Jaynes, D.B., Kaspar, T.C., Hatfield, J.L., Colvin, T.S., Cambardella, C.A., 2002. Nitrogen Management Strategies to Reduce Nitrate Leaching in Tile-Drained Midwestern Soils. *Agronomy Journal* 94, 153–171. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.1530>
- Dodor, D.E., Tabatabai, D.M.A., 2007. Arylamidase Activity as an Index of Nitrogen Mineralization in Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38, 2197–2207. <https://doi.org/10.1080/00103620701549132>
- Dokuchaev, V.V., 1967. Russian Chernozem, in: *Selected works of V. V. Dokuchaev*, Moscow, 1948, 1, 14–419.

- Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations Ltd. (for USDA-NSF), Publ. by S. Monson, 1967. (Transl. into English by N. Kaner).
- Dominati, E., Mackay, A., Green, S., Patterson, M., 2014. A soil change-based methodology for the quantification and valuation of ecosystem services from agro-ecosystems: A case study of pastoral agriculture in New Zealand. *Ecological Economics* 100, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2014.02.008>
- Dotaniya, M.L., Aparna, K., Dotaniya, C.K., Singh, M., Regar, K.L., 2019. Chapter 33 - Role of Soil Enzymes in Sustainable Crop Production, in: Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, pp. 569–589. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00033-5>
- Dundek, P., Holík, L., Rohlík, T., Hromádka, L., Vranová, V., Rejšek, K., Formánek, P., 2011. Methods of plant root exudates analysis: a review. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 59, 241–246. <https://doi.org/10.11118/actaun201159030241>
- Durand A., Le Borgne G., Mathias E. 2020. Émissions de gaz à effet de serre et de polluants atmosphériques en France - Agriculture et sylviculture Citepa Rapport Secten édition 2020.
- Dyer, L., Oelbermann, M., Echarte, L., 2012. Soil carbon dioxide and nitrous oxide emissions during the growing season from temperate maize-soybean intercrops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 394–400. <https://doi.org/10.1002/jpln.201100167>
- Edwards, J.L., 2004. Research and Societal Benefits of the Global Biodiversity Information Facility. *BioScience* 54, 485–486. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0486:RASBOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0486:RASBOT]2.0.CO;2)
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 891–897. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90126-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90126-K)
- Ekenler, M., Tabatabai, M., 2002. β -Glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biology and Fertility of Soils* 36, 367–376. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0541-x>
- Ekenler, M., Tabatabai, M.A., 2003. Effects of liming and tillage systems on microbial biomass and glycosidases in soils. *Biology and Fertility of Soils* 39, 51–61. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0664-8>
- Eltun, R., Korsæth, A., Nordheim, O., 2002. A comparison of environmental, soil fertility, yield, and economical effects in six cropping systems based on an 8-year experiment in Norway. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 90, 155–168. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00198-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00198-0)
- Escudero, N., Marhuenda-Egea, F.C., Ibanco-Cañete, R., Zavala-Gonzalez, E.A., Lopez-Llorca, L.V., 2014. A metabolomic approach to study the rhizodeposition in the tritrophic interaction: tomato, *Pochonia chlamydosporia* and *Meloidogyne javanica*. *Metabolomics* 10, 788–804. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0632-3>
- Espinoza, S., Ovalle, C., Zagal, E., Matus, I., del Pozo, A., 2015. Contribution of legumes to the availability of soil nitrogen and its uptake by wheat in Mediterranean environments of central Chile. *Chilean journal of agricultural research* 75, 111–121. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000100016>
- Ettema, C.H., Wardle, D.A., 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02496-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02496-5)
- Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Shenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D., Higashi, R.M., 2001. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry* 57, 209–221. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00007-3)
- Fang, M., Motavalli, P.P., Kremer, R.J., Nelson, K.A., 2007. Assessing changes in soil microbial communities and carbon mineralization in Bt and non-Bt corn residue-amended soils. *Applied Soil Ecology* 37, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.06.001>
- FAO, 1996. Les leçons de la révolution verte -vers une nouvelle révolution verte. <http://www.fao.org/3/w2612f/w2612f06.htm>, consulté le 10/05/2019
- FAO, 2016. Legumineuses Des graines nutritives pour un avenir durable, <http://www.fao.org/3/a-i5528f.pdf>, consulté le 02/05/2020
- Fay, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 340–373.
- Feaga, J.B., 2010. Long-Term Nitrate Leaching Under Vegetable.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364. <https://doi.org/10.1890/05-1839>
- Fisher, K.A., Yarwood, S.A., James, B.R., 2017. Soil urease activity and bacterial ureC gene copy numbers: Effect of pH. *Geoderma* 285, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.09.012>
- Floc'h, J.-B., Hamel, C., Lupwayi, N., Harker, K.N., Hijri, M., St-Arnaud, M., 2020. Bacterial Communities of the Canola Rhizosphere: Network Analysis Reveals a Core Bacterium Shaping Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01587>
- Floch, C., Capowiez, Y., Criquet, S., 2009. Enzyme activities in apple orchard agroecosystems: How are they affected by management strategy and soil properties. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.018>

- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00123-8)
- Fontan, O., Berry, A., Ferrat, M., Portalier, J., Kamga, P.H.K., Amalou, C., 2019. Rapport annuel Neutralité Carbone. Premier rapport annuel du haut conseil pour le climat, 60 pages.
- Frey, S.D., 2007. 11 - Spatial distribution of soil organisms, in: Paul, E.A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp. 283–300. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50015-9>
- Fuhrer, T., Zamboni, N., 2015. High-throughput discovery metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology, Analytical Biotechnology* 31, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.08.006>
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.-B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 57–66. <https://doi.org/10.1051/agro/2009003>
- Gabrielle, B. (Institut N. de la R.A., Menasseri, S., Houot, S., 1995. Analysis and field evaluation of the CERES models water balance component. *Soil Science Society of America (USA)*.
- Gaillard, V., Chenu, C., Recous, S., 2003. Carbon mineralisation in soil adjacent to plant residues of contrasting biochemical quality. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 93–99. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00241-9)
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erismann, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Gangneux, C., Akpa-Vinceslas, M., Sauvage, H., Desaire, S., Houot, S., Laval, K., 2011. Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.012>
- Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Shi, W., 2010. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: modified ecological dose–response model and PCR-RAPD. *Environmental Earth Sciences* 60, 603–612. <https://doi.org/10.1007/s12665-009-0200-8>
- Garcia, A.K., McShea, H., Kolaczowski, B., Kaçar, B., 2019. Reconstructed ancient nitrogenases suggest Mo-specific ancestry. *bioRxiv* 714469. <https://doi.org/10.1101/714469>
- García, J.A.L., Barbas, C., Probanza, A., Barrientos, M.L., Mañero, F.J.G., 2001. Low molecular weight organic acids and fatty acids in root exudates of two *Lupinus* cultivars at flowering and fruiting stages. *Phytochemical Analysis* 12, 305–311. <https://doi.org/10.1002/pca.596>
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M., Zornoza, R., Bárcenas, G., Caravaca, F., 2010. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research* 109, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.05.005>
- Garnier, P., Néel, C., Mary, B., Lafolie, F., 2001. Evaluation of a nitrogen transport and transformation model in a bare soil. *European Journal of Soil Science* 52: 253-268.
- Geisseler, D., Horwath, W.R., Doane, T.A., 2009. Significance of organic nitrogen uptake from plant residues by soil microorganisms as affected by carbon and nitrogen availability. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1281–1288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.014>
- Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., Ludwig, B., 2010. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2058–2067. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.021>
- Geisseler, D., Scow, K.M., 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>
- Geyer, K.M., Kyker-Snowman, E., Grandy, A.S., Frey, S.D., 2016. Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem-scale controls over the fate of metabolized organic matter. *Biogeochemistry* 127, 173–188. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0191-y>
- Giacometti, C., Demyan, M.S., Cavani, L., Marzadori, C., Ciavatta, C., Kandeler, E., 2013. Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. *Applied Soil Ecology* 64, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.002>
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., Ball, A.S., 2003. Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1800–1809. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1800-1809.2003>
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W., 2003. The living soil: basic pedology - soil biology. *The living soil: basic pedology - soil biology*.
- Gransee, A., Wittenmayer, L., 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 381–385. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<381::AID-JPLN381>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<381::AID-JPLN381>3.0.CO;2-7)

- Greiner, L., Keller, A., Grêt-Regamey, A., Papritz, A., 2017. Soil function assessment: review of methods for quantifying the contributions of soils to ecosystem services. *Land Use Policy* 69, 224–237. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.06.025>
- Griffiths, B.S., Römbke, J., Schmelz, R.M., Scheffczyk, A., Faber, J.H., Bloem, J., Pérès, G., Cluzeau, D., Chabbi, A., Suhadolc, M., Sousa, J.P., Martins da Silva, P., Carvalho, F., Mendes, S., Morais, P., Francisco, R., Pereira, C., Bonkowski, M., Geisen, S., Bardgett, R.D., de Vries, F.T., Bolger, T., Dirilgen, T., Schmidt, O., Winding, A., Hendriksen, N.B., Johansen, A., Philippot, L., Plassart, P., Bru, D., Thomson, B., Griffiths, R.I., Bailey, M.J., Keith, A., Rutgers, M., Mulder, C., Hannula, S.E., Creamer, R., Stone, D., 2016. Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function. *Ecological Indicators* 69, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.023>
- Groenestein, C.M., Van Faassen, H.G., 1996. Volatilization of Ammonia, Nitrous Oxide and Nitric Oxide in Deep-litter Systems for Fattening Pigs. *Journal of Agricultural Engineering Research* 65, 269–274. <https://doi.org/10.1006/jaer.1996.0100>
- Gruber, N., Galloway, J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451, 293–296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Grunwald, D., Kaiser, M., Ludwig, B., 2016. Effect of biochar and organic fertilizers on C mineralization and macro-aggregate dynamics under different incubation temperatures. *Soil and Tillage Research, Current and future challenges in biochar research* 164, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.01.002>
- Guérin, V., Trinchant, J.C., Rigaud, J., 1990. Nitrogen Fixation (C₂H₂ Reduction) by Broad Bean (*Vicia faba* L.) Nodules and Bacteroids under Water-Restricted Conditions. *Plant Physiology* 92:595- 601.
- Guinet, M., Nicolardot, B., Durey, V., Revellin, C., Lombard, F., Pimet, E., Bizouard, F., Voisin, A.-S., 2019. Fixation symbiotique de l'azote et effet précédent : toutes les légumineuses à graines se valent-elles ? *Innovations Agronomiques* 74, 55–68.
- Haase, S., Neumann, G., Kania, A., Kuzyakov, Y., Römhild, V., Kandeler, E., 2007. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2208–2221. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.014>
- Haichar, F. el Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2, 1221–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W., 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* 77, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Haney, R.L., Franzluebbers, A.J., Jin, V.L., Johnson, M.-V., Haney, E.B., White, M.J., Harmel, R.D., 2012. Soil organic C: N vs. water-extractable organic C: N.
- Hansen, B., Alrøe, H.F., Kristensen, E.S., 2001. Approaches to assess the environmental impact of organic farming with particular regard to Denmark. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 83, 11–26. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00257-7)
- Hart, S.C., Nason, G.E., Myrold, D.D., Perry, D.A., 1994. Dynamics of Gross Nitrogen Transformations in an Old-Growth Forest: The Carbon Connection. *Ecology* 75, 880–891. <https://doi.org/10.2307/1939413>
- Hartman, K., van der Heijden, M.G.A., Wittwer, R.A., Banerjee, S., Walser, J.-C., Schlaeppli, K., 2018. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome* 6, 14. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9>
- Hassan, M.K., McInroy, J.A., Kloepper, J.W., 2019. The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture* 9, 142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>
- Hattenschwiler, S., Barantal, S., Ganault, P., Gillespie, L., Coq, S., 2018. Quels enjeux sont associés à la biodiversité des sols ? *Innovations Agronomiques* 69, 1–14. <https://doi.org/10.15454/EFFGEC>
- Havlin, J.L., Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D., 2014. Soil fertility and fertilizers; An introduction to nutrient management, 8th edn. ISBN:978-81-203-4868-4
- Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M., 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science & Plant Nutrition* 54, 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- Hayes, M.H.B., Wilson, W.S., 1997. Humic Substances, Peats and Sludges: Health and Environmental Aspects. Elsevier.
- Hénault, C., Bizouard, F., Laville, P., Gabrielle, B., Nicoulaud, B., Germon, J.C., Cellier, P., 2005. Predicting in situ soil N₂O emission using NOE algorithm and soil database. *Global Change Biology* 11, 115–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00879.x>
- Hénault, C., Germon, J., 1995. Quantification de la dénitrification et des émissions de protoxyde d'azote (N₂O) par les sols. *Agronomie* 15, 321–355.
- Henine, H., Nédélec, Y., Augéard, B., Birgand, F., Chaumont, C., Ribstein, P., Kao, C., 2010. Effect of Pipe

- Pressurization on the Discharge of a Tile Drainage System. *Vadose Zone Journal* 9, 36–42. <https://doi.org/10.2136/vzj2008.0152>
- Hennart, S., Lambert, R., Oger, R., Stilmant, D., 2009. Échantillonnage des prairies pâturées pour quantifier l'azote potentiellement lessivable : quel schéma pour quelle précision. *Biotechnol Agron Soc Env* 14:39–46.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
- Herz, K., Dietz, S., Gorzalka, K., Haider, S., Jandt, U., Scheel, D., Bruehlheide, H., 2018. Linking root exudates to functional plant traits. *PLOS ONE* 13, e0204128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204128>
- Hillel, D., 2013. *Introduction to Soil Physics*. Academic Press.
- Ho, J.-Y., Lee, K.T., Chang, T.-C., Wang, Z.-Y., Liao, Y.-H., 2012. Influences of spatial distribution of soil thickness on shallow landslide prediction. *Engineering Geology* 124, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2011.09.013>
- Hoekenga, O.A., Vision, T.J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., Lee, G.P., Howell, S.H., Kochian, L.V., 2003. Identification and Characterization of Aluminum Tolerance Loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* × *Columbia*) by Quantitative Trait Locus Mapping. A Physiologically Simple but Genetically Complex Trait. *Plant Physiology* 132, 936–948. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023085>
- Howarth, R.W., Marino, R., Cole, J.J., 1988. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnology and Oceanography* 33, 688–701. <https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.4part2.0688>
- Hu, Z., Yang, H., Zhang, L., Wang, X., Liu, G., Wang, H., Hua, W., 2015. A large replum-valve joint area is associated with increased resistance to pod shattering in rapeseed. *Journal of Plant Research* 128, 813–819. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0732-9>
- Huang, J., Chen, Y., Sui, P., Nie, S., Gao, W., 2014a. Soil Nitrous Oxide Emissions Under Maize-Legume Intercropping System in the North China Plain. *Journal of Integrative Agriculture* 13, 1363–1372. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60509-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60509-2)
- Huang, X.-F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M., 2014b. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* 92, 267–275. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225>
- Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65, 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00084-2)
- Hupe, A., Schulz, H., Bruns, C., Haase, T., Heß, J., Dyckmans, J., Joergensen, R.G., Wichern, F., 2019. Get on your boots: estimating root biomass and rhizodeposition of peas under field conditions reveals the necessity of field experiments. *Plant and Soil* 443, 449–462. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04238-z>
- Jean, R., Morel, M.P., 2011. Les paysages agricoles dominent toujours le territoire français. *Agreste Primeur*. 260, 4p
- Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., Ritz, K., Pérès, G., Römbke, J., Putten, W.H. van der, Artz, R., Anastasiou, D., Arrouays, D., Bastos, A.C., Bendetti, A., Bispo, A., Brandmayr, P., Broll, G., Bunning, S., Castracani, C., Campbell, C., Cluzeau, D., Coates, D., Creamer, R., Diafas, I., Durrant, T., Foissner, W., Fritz, G.B., Gardi, C., Gemmill-Herren, B., Graefe, U., Grasso, D., Hol, G., Hoogmoed, M., Jabiol, B., Jeffery, S., Jiménez, J.J., Hedlund, K., Krogh, P.H., Lemanceau, P., Licon-Manzur, C., Luster, J., Maistrello, L., Marmo, L., Menta, C., Miko, L., Mulongoy, K.J., Neilson, R., Nienstedt, K., Nilesen, U., Olazabal, C., Pagliai, M., Pawlik-Skowronska, B., Pérès, G., Ponge, J.-F., Putten, W. van der, Ritz, K., Ranjard, L., Roberti, R., Römbke, J., Rutgers, M., Sartori, G., Schill, R.O., Sousa, J.P., Stephenson, S., Taiti, S., Taylor, A., Verheijen, F., Wall, D., Wolowski, K., Zanella, A., Commission, E., Centre, J.R., 2013. *Atlas Européen de la Biodiversité des Sols*. Office des Publications Officielles des Communautés Européennes. <https://doi.org/10.2788/89331>
- Jemison, J.M., Jabro, J.D., Fox, R.H., 1994. Evaluation of LEACHM: II. Simulation of Nitrate Leaching from Nitrogen-Fertilized and Manured Corn. *Agronomy Journal* 86, 852–859. <https://doi.org/10.2134/agronj1994.00021962008600050019x>
- Jensen, E.S., 1994. Availability of nitrogen in ¹⁵N-labelled mature pea residues to subsequent crops in the field. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 465–472. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90178-3)
- Jensen, E.S., 1996. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 65–71. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00116-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00116-6)
- Jensen, E.S., Peoples, M.B., Hauggaard-Nielsen, H., 2010. Faba bean in cropping systems. *Field Crops Research*, Faba Beans in Sustainable Agriculture 115, 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.10.008>
- Jensen, E.S., Peoples, M.B., Boddey, R.M., Gresshoff, P.M., Hauggaard-Nielsen, H., J.R. Alves, B., Morrison, M.J., 2012. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32, 329–364.

- <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0056-7>
- Jeuffroy, M.-H.M.-H., Baranger, E.E., Carrouée, B.B., De Chezelles, E.L.S.D.C., Gosme, M.M., Hénault, C.C., Schneider, N.N., Cellier, P.P., 2013. Nitrous oxide emissions from crop rotations including wheat, oilseed rape and dry peas. *Biogeosciences Discussions* 10, 1787–1797. <https://doi.org/10.5194/bg-10-1787-2013>
- Jian, S., Li, J., Chen, J., Wang, G., Mayes, M.A., Dzantor, K.E., Hui, D., Luo, Y., 2016. Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 101, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.003>
- Jiang, Z., Dai, B., Wang, C., Xiong, W., 2020. Multifaceted biodiversity measurements reveal incongruent conservation priorities for rivers in the upper reach and lakes in the middle-lower reach of the largest river-floodplain ecosystem in China. *Science of The Total Environment* 739, 140380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140380>
- Jiménez, D.J., Montaña, J.S., Martínez, M.M., 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 846–858. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300003>
- Johnson, J.M.-F., Franzluebbers, A.J., Weyers, S.L., Reicosky, D.C., 2007. Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environmental Pollution* 150, 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.030>
- Jones, C.A., Kiniry, J.R., Dyke, P.T., 1986. *CERES-Maize: a simulation model of maize growth and development*. Texas AandM University Press.
- Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163, 459–480. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x>
- Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D., 2009b. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil* 321, 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Jones, A.M., Collins, R.N., Rose, J., Waite, T.D., 2009a. The effect of silica and natural organic matter on the Fe (II)-catalysed transformation and reactivity of Fe (III) minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 4409–4422. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.04.025>
- Juarez, S., Nunan, N., Duday, A.-C., Pouteau, V., Schmidt, S., Hapca, S., Falconer, R., Otten, W., Chenu, C., 2013. Effects of different soil structures on the decomposition of native and added organic carbon. *European Journal of Soil Biology* 58, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.06.005>
- Justes, E., Nolot, J.M., Raffailac, D., Hauggaard-Nielsen H., Jensen, E.S., 2010. Designing and evaluating prototypes of arable cropping systems with legumes aimed at improving N use efficiency in low input farming. In *Proceedings of AGRO2010, Congre (ESA), 29 August-3 September 2010, Montpellier, France*.
- Justes, E., Beaudoin, N., Bertuzzi, P. [et al], 2012. Réduire les fuites de nitrate au moyen de cultures intermédiaires : conséquences sur les bilans d’eau et d’azote, autres services écosystémiques 416.
- Kader, M.A., Yeasmin, S., Solaiman, Z.M., De Neve, S., Sleutel, S., 2017. Response of hydrolytic enzyme activities and nitrogen mineralization to fertilizer and organic matter application in subtropical paddy soils. *European Journal of Soil Biology* 80, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.03.004>
- Kakraliya, S.K., Singh, U., Bohra, A., Choudhary, K.K., Kumar, S., Meena, R.S., Jat, M.L., 2018. Nitrogen and Legumes: A Meta-analysis, in: Meena, R.S., Das, A., Yadav, G.S., Lal, R. (Eds.), *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*. Springer, Singapore, pp. 277–314. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4_9
- Kallenbach, C., Grandy, A.S., 2011. Controls over soil microbial biomass responses to carbon amendments in agricultural systems: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.08.020>
- Kandeler, E., 2007. 3 - Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function, in: Paul, E.A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp. 53–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50007-X>
- Kanders, M.J., Berendonk, C., Fritz, C., Watson, C., Wichern, F., 2017. Catch crops store more nitrogen below-ground when considering Rhizodeposits. *Plant and Soil* 417, 287–299. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3259-0>
- Karimi, E., Slaby, B.M., Soares, A.R., Blom, J., Hentschel, U., Costa, R., 2018. Metagenomic binning reveals versatile nutrient cycling and distinct adaptive features in alphaproteobacterial symbionts of marine sponges. *FEMS Microbiology Ecology* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy074>
- Karlowsky, S., Augusti, A., Ingrisch, J., Akanda, M.K.U., Bahn, M., Gleixner, G., 2018. Drought-Induced Accumulation of Root Exudates Supports Post-drought Recovery of Microbes in Mountain Grassland. *Frontiers in Plant Science* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01593>
- Kay, B.D., 2018. *Soil Structure and Organic Carbon: A Review [WWW Document]*. *Soil Processes and the Carbon Cycle*. <https://doi.org/10.1201/9780203739273-13>
- Keiblinger, K.M., Hall, E.K., Wanek, W., Szukics, U., Hämmerle, I., Ellersdorfer, G., Böck, S., Strauss, J.,

- Sterflinger, K., Richter, A., Zechmeister-Boltenstern, S., 2010. The effect of resource quantity and resource stoichiometry on microbial carbon-use-efficiency. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 430–440. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00912.x>
- Khan, W.D.F., Peoples, M.B., Herridge, D.F., 2002. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. *Plant and Soil* 245, 327–334. <https://doi.org/10.1023/A:1020407006212>
- Kieloaho, A.-J., Pihlatie, M., Dominguez Carrasco, M., Kanerva, S., Parshintsev, J., Riekkola, M.-L., Pumpanen, J., Heinonsalo, J., 2016. Stimulation of soil organic nitrogen pool: The effect of plant and soil organic matter degrading enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 96, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.013>
- Killham, K., 1994. *Soil Ecology*. Cambridge University Press.
- Kirkegaard, J., Christen, O., Krupinsky, J., Layzell, D., 2008. Break crop benefits in temperate wheat production. *Field Crops Research* 107, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.02.010>
- Kladivko, E.J., Frankenberger, J.R., Jaynes, D.B., Meek, D.W., Jenkinson, B.J., Fausey, N.R., 2004a. Nitrate Leaching to Subsurface Drains as Affected by Drain Spacing and Changes in Crop Production System. *Journal of Environmental Quality* 33, 1803–1813. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.1803>
- Kladivko, E.J., Frankenberger, J.R., Jaynes, D.B., Meek, D.W., Jenkinson, B.J., Fausey, N.R., 2004b. Nitrate leaching to subsurface drains as affected by drain spacing and changes in crop production system. *Journal of Environmental Quality* 33, 1803–1813. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.1803>
- Knutson, J.H., Selker, J.S., 1994. Unsaturated Hydraulic Conductivities of Fiberglass Wicks and Designing Capillary Wick Pore-Water Samplers. *Soil Science Society of America Journal* 58, 721–729. <https://doi.org/10.2136/sssaj1994.03615995005800030012x>
- Koide, R.T., Peoples, M.S., 2012. On the nature of temporary yield loss in maize following canola. *Plant and Soil* 360, 259–269. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1237-0>
- Koo, B.-J., Chung, D.-Y., 2005. Effect of Biosolids on Heavy Metal Bioavailability and Organic Acid Production in Rhizosphere of Zea mays L. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 38, 173–179.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., 2001. Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology* 55, 485–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485>
- Kranz, R.G., Haselkorn, R., 1985. Characterization of nif regulatory genes in Rhodospseudomonas capsulata using lac gene fusions. *Gene* 40, 203–215. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90043-5)
- Kraut-Cohen, J., Zolti, A., Shaltiel-Harpaz, L., Argaman, E., Rabinovich, R., Green, S.J., Minz, D., 2020. Effects of tillage practices on soil microbiome and agricultural parameters. *Science of The Total Environment* 705, 135791. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135791>
- Kruidhof, H.M., Bastiaans, L., Kropff, M.J., 2008. Ecological weed management by cover cropping: effects on weed growth in autumn and weed establishment in spring. *Weed Research* 48, 492–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2008.00665.x>
- Kumar, K., Goh, K.M., 2002. Management practices of antecedent leguminous and non-leguminous crop residues in relation to winter wheat yields, nitrogen uptake, soil nitrogen mineralization and simple nitrogen balance. *European Journal of Agronomy* 16, 295–308. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(01\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(01)00133-2)
- Kunduru, K.R., Kutcherlapati, S.N.R., Arunbabu, D., Jana, T., 2017. Chapter Seven - Armored Urease: Enzyme-Bioconjugated Poly(acrylamide) Hydrogel as a Storage and Sensing Platform, in: Kumar, C.V. (Ed.), *Methods in Enzymology, NanoArmoring of Enzymes: Rational Design of Polymer-Wrapped Enzymes*. Academic Press, pp. 143–167. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.02.008>
- Kušlienė, G., Rasmussen, J., Kuzyakov, Y., Eriksen, J., 2014. Medium-term response of microbial community to rhizodeposits of white clover and ryegrass and tracing of active processes induced by ¹³C and ¹⁵N labelled exudates. *Soil Biology and Biochemistry* 76, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.003>
- Kuzyakov, Y., Kretschmar, A., Stahr, K., 1999. Contribution of Lolium perenne rhizodeposition to carbon turnover of pasture soil. *Plant and Soil* 213, 127–136. <https://doi.org/10.1023/A:1004566027237>
- Kuzyakov, Y., Domanski, G., 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 421–431. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<421:AID-JPLN421>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<421:AID-JPLN421>3.0.CO;2-R)
- Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2001. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1915–1925. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00117-1)
- Kuzyakov, Y., Domanski, G., 2002. Model for rhizodeposition and CO₂ efflux from planted soil and its validation by ¹⁴C pulse labelling of ryegrass. *Plant and Soil* 239, 87–102. <https://doi.org/10.1023/A:1014939120651>
- Kuzyakov, Y., Schnuckenberger, K., 2004. Review of estimation of plant rhizodeposition and their contribution to soil organic matter formation. *Archives of Agronomy and Soil Science* 50, 115–132. <https://doi.org/10.1080/03650340310001627658>

- Laberdesque, M., Bessard Duparc, P., Soenen, B., Metais, P., Trochard, R., Le Bris, X., 2017. CHN: practical case of valorization of a dynamic crop model to estimate the number of available days for cultivation works EFITA WCCA 2017 Conference, Montpellier Supagro, Montpellier, France, July 2-6. 38
- Lacroix, A., Beaudoin, N., Makowski, D., 2005. Agricultural water nonpoint pollution control under uncertainty and climate variability. *Ecological Economics* 53, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.11.001>
- Ladha, J.K., Reddy, C.K., Padre, A.T., Kessel, C. van, 2011. Role of Nitrogen Fertilization in Sustaining Organic Matter in Cultivated Soils. *Journal of Environmental Quality* 40, 1756–1766. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0064>
- Ladoni, M., Kravchenko, A.N., Robertson, G.P., 2015. Topography Mediates the Influence of Cover Crops on Soil Nitrate Levels in Row Crop Agricultural Systems. *PLOS ONE* 10, e0143358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143358>
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.-R., Amarger, N., 2003. Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of Rhizobium leguminosarum Biovar viciae for Nodulation of Host Legumes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2276–2283. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2276-2283.2003>
- Laguerre, G., Depret, G., Bourion, V., Duc, G., 2007. Rhizobium leguminosarum bv. viciae genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots, and shoots. *New Phytologist* 176, 680–690. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02212.x>
- Laloui, L., Klubertanz, G., Vulliet, L., 2003. Solid–liquid–air coupling in multiphase porous media. *International Journal for Numerical and Analytical Methods in Geomechanics* 27, 183–206. <https://doi.org/10.1002/nag.269>
- Laperche, 2013. Nitrates : une pollution disparate des nappes d'eau souterraine. <https://www.actu-environnement.com/ae/news/nitrates-pollution-disparate-nappes-eau-souterraine-18558.php4>, consulté le 07/09/2020.
- Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S., 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. *Microbiological Research, Special Issue on Plant Growth Promotion*. 169, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Laval, K., Mougin, C., Akpa, M., Barry, S., Dur, J.C., Gangneux, C., Lebrun, J., Legras, M., Lepelletier, P., Plassart, P., Taibi, S., Trinsoutrot-Gattin, I., 2009 - Un premier pas vers la compréhension des données biologiques. *Etude et Gestion des Sols*, vol. 16/3-4, pp. 275-287
- Lay, C.-Y., Bell, T.H., Hamel, C., Harker, K.N., Mohr, R., Greer, C.W., Yergeau, É., St-Arnaud, M., 2018. Canola Root–Associated Microbiomes in the Canadian Prairies. *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01188>
- Leeuwen, J.P. van, Saby, N.P.A., Jones, A., Louwagie, G., Micheli, E., Rutgers, M., Schulte, R.P.O., Spiegel, H., Toth, G., Creamer, R.E., 2017. Gap assessment in current soil monitoring networks across Europe for measuring soil functions. *Environmental Research Letters* 12, 124007. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa9c5c>
- Leeuwen, J. van, Creamer, R., Cluzeau, D., Debeljak, M., Gatti, F., Henriksen, C., Kuzmanovski, V., Menta, C., Peres, G., Picaut, C., Saby, N., Trajanov, A., Trinsoutrot-Gattin, I., Visioli, G., Rutgers, M., 2019. Modeling of Soil Functions for Assessing Soil Quality: Soil Biodiversity and Habitat Provisioning. *Frontiers in Environmental Science* 7, 113. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00113>
- Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528, 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Lehtinen, T., Schlatter, N., Baumgarten, A., Bechini, L., Krüger, J., Grignani, C., Zavattaro, L., Costamagna, C., Spiegel, H., 2014. Effect of crop residue incorporation on soil organic carbon and greenhouse gas emissions in European agricultural soils. *Soil Use and Management* 30, 524–538. <https://doi.org/10.1111/sum.12151>
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806–809. <https://doi.org/10.1038/nature04983>
- Leip, A., Marchi, G., Koebler, R., Kempen, M., Britz, W., Li, C., 2008. Linking an economic model for European agriculture with a mechanistic model to estimate nitrogen and carbon losses from arable soils in Europe. *Biogeosciences* 5, 73–94.
- Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., Kochian, L.V., 2006. Phosphorus and Aluminum Interactions in Soybean in Relation to Aluminum Tolerance. Exudation of Specific Organic Acids from Different Regions of the Intact Root System. *Plant Physiology* 141, 674–684. <https://doi.org/10.1104/pp.105.076497>
- Lira Junior, M. de A., Lima, A.S.T., Arruda, J.R.F., Smith, D.L., 2005. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil, and pea. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.032>

- Liu, H., Crawford, M., Carvalhais, L.C., Dang, Y.P., Dennis, P.G., Schenk, P.M., 2016. Strategic tillage on a Grey Vertosol after fifteen years of no-till management had no short-term impact on soil properties and agronomic productivity. *Geoderma* 267, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.01.002>
- Liu, L., Wen, W., Zhang, R., Wei, Z., Deng, Y., Xiao, J., Zhang, M., 2017a. Complex enzyme hydrolysis releases antioxidative phenolics from rice bran. *Food Chemistry* 214, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.038>
- Liu, Z., Rong, Q., Zhou, W., Liang, G., 2017b. Effects of inorganic and organic amendment on soil chemical properties, enzyme activities, microbial community and soil quality in yellow clayey soil. *PLOS ONE* 12, e0172767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172767>
- Loveland, P., Webb, J., 2003. Is there a critical level of organic matter in the agricultural soils of temperate regions: a review. *Soil and Tillage Research* 70, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(02\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(02)00139-3)
- Lynch, J.M., Whipps, J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129, 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00011685>
- Lynch, M.J., Mulvaney, M.J., Hodges, S.C., Thompson, T.L., Thomason, W.E., 2016. Decomposition, nitrogen and carbon mineralization from food and cover crop residues in the central plateau of Haiti. *SpringerPlus* 5, 973. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2651-1>
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Chabbert, B., Watteau, F., Villemin, G., Recous, S., 2009. Soil biodegradation of maize root residues: Interaction between chemical characteristics and the presence of colonizing micro-organisms. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1253–1261. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.009>
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Barrière, Y., Chabbert, B., Recous, S., 2011. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: Role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1544–1552. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.002>
- Magrini, M.-B., Anton, M., Cholez, C., Duc, G., Hellou, G., Jeuffroy, M.-H., Meynard, J.-M., Pelzer, É., Voisin, A.-S., Walrand, S., 2017. Transition vers des systèmes agricole et agroalimentaire durables : quelle place et qualification pour les légumineuses à graines ? *Revue Française de Socio-Economie* n° 18, 53–75.
- Mahieu, S., Fustec, J., Faure, M.-L., Corre-Hellou, G., Crozat, Y., 2007. Comparison of two ¹⁵N labelling methods for assessing nitrogen rhizodeposition of pea. *Plant and Soil* 295, 193–205. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9275-8>
- Makoi, J., Ndademi, P.A., 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* 7. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i3.58355>
- Martin, F., Cliquet, J.-B., Stewart, G., 2001. Nitrogen Acquisition and Assimilation in Mycorrhizal Symbioses, in: Lea, P.J., Morot-Gaudry, J.-F. (Eds.), *Plant Nitrogen*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 147–166. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_6
- Marx, M.-C., Wood, M., Jarvis, S.C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1633–1640. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00079-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00079-7)
- Mary, B., Beaudoin, N., Justes, E., Machel, J.M., 1999. Calculation of nitrogen mineralization and leaching in fallow soil using a simple dynamic model. *European Journal of Soil Science* 50, 549–566. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00264.x>
- Masson-Boivin, C., Sachs, J.L., 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology, Biotic Interactions* 44, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Mayer, J., Buegger, F., Jensen, E.S., Schlöter, M., Heß, J., 2003. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a ¹⁵N in situ stem labelling method. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00212-2)
- Mazzon, M., Cavani, L., Margon, A., Sorrenti, G., Ciavatta, C., Marzadori, C., 2018. Changes in soil phenol oxidase activities due to long-term application of compost and mineral N in a walnut orchard. *Geoderma* 316, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.009>
- McGill, W.B., 1996. Review and Classification of Ten Soil Organic Matter (SOM) Models, in: Powlson, D.S., Smith, P., Smith, J.U. (Eds.), *Evaluation of Soil Organic Matter Models*, NATO ASI Series. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 111–132. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61094-3_9
- McGroddy, M.E., Daufresne, T., Hedin, L.O., 2004. Scaling of C:N:P Stoichiometry in Forests Worldwide: Implications of Terrestrial Redfield-Type Ratios. *Ecology* 85, 2390–2401. <https://doi.org/10.1890/03-0351>
- McManus, J., 1988. Grain size determination and interpretation. *Techniques, in sedimentology*. 63–85.
- Meena, R.S., Kumar, V., Yadav, G.S., Mitran, T., 2017. Response and interaction of Bradyrhizobium japonicum and Arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere: a review. *Plant Growth Regulators* Accepted in press.
- Merbach, W., Mirus, E., Knof, G., Remus, R., Ruppel, S., Russow, R., Gransee, A., Schulze, J., 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance+. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162, 373–383. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2624\(199908\)162:4<373::AID-PLN373>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2624(199908)162:4<373::AID-PLN373>3.0.CO;2-#)

- Meynard, J.-M., Doré, T., Habib, R., 2001. L'évaluation et la conception de systèmes de culture pour une agriculture durable. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 87, 223–236.
- Meynard, J.-M., Doré, T., Lucas, P., 2003. Agronomic approach: cropping systems and plant diseases. *Comptes Rendus Biologies* 326, 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00006-4)
- Mitchell, R., Webb, J., Harrison, R., 2001. Crop residues can affect N leaching over at least two winters. *European Journal of Agronomy* 15, 17–29. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(00\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(00)00088-5)
- Miya, R.K., Firestone, M.K., 2001. Enhanced Phenanthrene Biodegradation in Soil by Slender Oat Root Exudates and Root Debris. *Journal of Environmental Quality* 30, 1911–1918. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.19111692-1705>. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300033>
- Moldrup, P., Olesen, T., Komatsu, T., Schjønning, P., Rolston, D.E., 2001. Tortuosity, Diffusivity, and Permeability in the Soil Liquid and Gaseous Phases. *Soil Science Society of America Journal* 65, 613–623. <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.653613x>
- Mooshammer, M., Wanek, W., Hämmerle, I., Fuchslueger, L., Hofhansl, F., Knoltsch, A., Schneckner, J., Takriti, M., Watzka, M., Wild, B., Keiblinger, K.M., Zechmeister-Boltenstern, S., Richter, A., 2014a. Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nature Communications* 5, 3694. <https://doi.org/10.1038/ncomms4694>
- Mooshammer, M., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., Richter, A.A., 2014b. Stoichiometric imbalances between terrestrial decomposer communities and their resources: mechanisms and implications of microbial adaptations to their resources. *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00022>
- Moradi, A.B., Carminati, A., Lamparter, A., Woche, S.K., Bachmann, J., Vetterlein, D., Vogel, H.-J., Oswald, S.E., 2012. Is the Rhizosphere Temporarily Water Repellent? *Vadose Zone Journal* 11, vzj2011.0120. <https://doi.org/10.2136/vzj2011.0120>
- Morot-Gaudry, J.-F., Orsel, M., Diaz, C., Daniel-Vedele, F., Masclaux-Daubresse, C., 2014. Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes : intérêt pour le colza. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 13.
- Mouginot, C., Kawamura, R., Matulich, K.L., Berlemont, R., Allison, S.D., Amend, A.S., Martiny, A.C., 2014. Elemental stoichiometry of Fungi and Bacteria strains from grassland leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry* 76, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.011>
- Mugwe, J., Mugendi, D.N., Mucheru-Muna, M., Kung'u, J.B., 2011. Soil Inorganic N and N Uptake by Maize Following Application of Legume Biomass, Tithonia, Manure and Mineral Fertilizer in Central Kenya, in: Bationo, A., Waswa, B., Okeyo, J.M., Maina, F., Kihara, J.M. (Eds.), *Innovations as Key to the Green Revolution in Africa*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 605–616. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2543-2_62
- Muhammad, I., Sainju, U.M., Zhao, F., Khan, A., Ghimire, R., Fu, X., Wang, J., 2019. Regulation of soil CO₂ and N₂O emissions by cover crops: A meta-analysis. *Soil and Tillage Research* 192, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.020>
- Munier-Jolain, N., Biarnes, V., Chaillet, I., 2010. *Physiology of the Pea Crop*. CRC Press.
- Mus, F., Colman, D.R., Peters, J.W., Boyd, E.S., 2019. Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radical Biology and Medicine, Early Life on Earth and Oxidative Stress* 140, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.050>
- Nakayama, M., Tateno, R., 2018. Solar radiation strongly influences the quantity of forest tree root exudates. *Trees* 32, 871–879. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1685-0>
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment* (Eds.) R.G. Burns & R. Dick), Marcel Dekker., New York, pp. 1.33.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2017. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 68, 12–26. https://doi.org/10.1111/ejss.4_12398
- Nardi, S., Sessi, E., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., 2002. Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere* 46, 1075–1081. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00160-6)
- Ndossi, E.M., Becker, J.N., Hemp, A., Dippold, M.A., Kuzyakov, Y., Razavi, B.S., 2020. Effects of land use and elevation on the functional characteristics of soil enzymes at Mt. Kilimanjaro. *European Journal of Soil Biology* 97, 103167. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103167>
- Neff, J.C., Townsend, A.R., Gleixner, G., Lehman, S.J., Turnbull, J., Bowman, W.D., 2002. Variable effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature* 419, 915–917. <https://doi.org/10.1038/nature01136>
- Nelson, L.M., 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. *Crop Management* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-05-RV>

- Nemecek, T., Hayer, F., Bonnin, E., Carrouée, B., Schneider, A., Vivier, C., 2015. Designing eco-efficient crop rotations using life cycle assessment of crop combinations. *European Journal of Agronomy* 65, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.01.005>
- Neumann, G., Römheld, V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211, 121–130. <https://doi.org/10.1023/A:1004380832118>
- Neumann, G., Romheld, V., Romheld, V., 2000. The Release of Root Exudates as Affected by the Plant's Physiological Status [WWW Document]. *The Rhizosphere*. <https://doi.org/10.1201/9780849384974-9>
- Neumann, G., George, T.S., Plassard, C., 2009. Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox. *Plant and Soil* 321, 431–456. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9953-9>
- Newton, W.E., 2007. Chapter 8 - Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation, in: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–129. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50009-6>
- Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23, 375–396. <https://doi.org/10.1051/agro:2003011>
- Nguyen, N.T., Nakabayashi, K., Thompson, J., Fujita, K., 2003. Role of exudation of organic acids and phosphate in aluminum tolerance of four tropical woody species. *Tree Physiology* 23, 1041–1050. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.15.1041>
- Nguyen, C., 2007. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition) : modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour les plantes (thesis). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24365.84969>
- Nguyen, T.T., Marschner, P., 2017. Soil Respiration, Microbial Biomass and Nutrient Availability in Soil After Addition of Residues with Adjusted N and P Concentrations. *Pedosphere* 27, 76–85. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60297-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60297-2)
- Nicolardot, B., Mary, B., Houot, S., Recous, S., 1997. La dynamique de l'azote dans les sols cultivés 87–104.
- Nilsson, M., Bhattacharya, J., Rai, A.N., Bergman, B., 2002. Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains. *New Phytologist* 156, 517–525. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00534.x>
- Nomade, J., 2005. Chronologie et sédimentologie du remplissage du lac d'Annecy depuis le Tardiglaciaire : Implications paléoclimatologiques et paléohydrologiques 198.
- Novák, V., Hlaváčiková, H., 2019. Basic Physical Characteristics of Soils, in: Novák, V., Hlaváčiková, H. (Eds.), *Applied Soil Hydrology, Theory and Applications of Transport in Porous Media*. Springer International Publishing, Cham, pp. 15–28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01806-1_2
- Nüsslein, K., Tiedje, J.M., 1999. Soil Bacterial Community Shift Correlated with Change from Forest to Pasture Vegetation in a Tropical Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3622–3626. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3622-3626.1999>
- Oburger, E., Dell'mour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2013. Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany* 87, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.11.007>
- Oburger, E., Gruber, B., Schindlegger, Y., Schenkeveld, W.D.C., Hann, S., Kraemer, S.M., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., 2014. Root exudation of phytosiderophores from soil-grown wheat. *New Phytologist* 203, 1161–1174. <https://doi.org/10.1111/nph.12868>
- Oburger, E., Jones, D.L., 2018. Sampling root exudates – Mission impossible? *Rhizosphere* 6, 116–133. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004>
- Olander, L.P., Vitousek, P.M., 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49, 175–191. <https://doi.org/10.1023/A:1006316117817>
- Olesen, J.E., Petersen, B.M., Berntsen, J., Hansen, S., Jamieson, P.D., Thomsen, A.G., 2002. Comparison of methods for simulating effects of nitrogen on green area index and dry matter growth in winter wheat. *Field Crops Research* 74, 131–149. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00204-0)
- Op den Camp, R.H.M., Polone, E., Fedorova, E., Roelofs, W., Squartini, A., Op den Camp, H.J.M., Bisseling, T., Geurts, R., 2012. Nonlegume *Parasponia andersonii* Deploys a Broad *Rhizobium* Host Range Strategy Resulting in Largely Variable Symbiotic Effectiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 954–96 <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-11-0304>
- Ouni, Y., Lakhdar, A., Scelza, R., Scotti, R., Abdelly, C., Barhoumi, Z., Rao, M.A., 2013. Effects of two composts and two grasses on microbial biomass and biological activity in a salt-affected soil. *Ecological Engineering* 60, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.09.002>
- Pandey, D., Agrawal, M., Bohra, J.S., 2014. Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation. *Soil and Tillage Research* 136, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.still.2013.09.013>
- Panettieri, M., Knicker, H., Murillo, J.M., Madejón, E., Hatcher, P.G., 2014. Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence under different tillage regimes evaluated by organic matter pools, enzymatic

- activities and CPMAS ¹³C NMR. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 170–181
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.021>
- Parnaudeau, V.V., Reau, R.R., Dubrulle, P.P., 2012. Un outil d'évaluation des fuites d'azote vers l'environnement à l'échelle du système de culture : le logiciel Syst'N. *Innovations Agronomiques* 21, 59–70.
- Pastorelli, R., Vignozzi, N., Landi, S., Piccolo, R., Orsini, R., Seddaiu, G., Roggero, P.P., Pagliai, M., 2013. Consequences on macroporosity and bacterial diversity of adopting a no-tillage farming system in a clayish soil of Central Italy. *Soil Biology and Biochemistry* 66, 78–93.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.06.015>
- Pausch, J., Tian, J., Riederer, M., Kuzyakov, Y., 2013. Estimation of rhizodeposition at field scale: upscaling of a ¹⁴C labeling study. *Plant and Soil* 364, 273–285. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1363-8>
- Pausch, J., Kuzyakov, Y., 2018. Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology* 24, 1–12. <https://doi.org/10.1111/gcb.13850>
- Paynel, F., J Murray, P., Bernard Cliquet, J., 2001. Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and Soil* 229, 235–243. <https://doi.org/10.1023/A:1004877214831>
- Pelletier, J.D., Rasmussen, C., 2009. Geomorphically based predictive mapping of soil thickness in upland watersheds. *Water Resources Research* 45. <https://doi.org/10.1029/2008WR007319>
- Peoples M.B., Hauggaard-Nielsen H., Jensen E.S. 2009. The potential environmental benefits and risks derived from legumes in rotations. In: Emerich, D.W., Krishnan, H.B. (Eds.), *Nitrogen Fixation in Crop Production*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 349–385.
- Pereira, J.M., Baretta, D., Bini, D., Vasconcellos, R., Cardoso, E.J.B.N., 2013. Relationships between microbial activity and soil physical and chemical properties in native and reforested *Araucaria angustifolia* forests in the state of São Paulo, Brazil. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832013000300003>
- Personeni, E., Nguyen, C., Marchal, P., Pagès, L., 2007. Experimental evaluation of an efflux–influx model of C exudation by individual apical root segments. *Journal of Experimental Botany* 58, 2091–2099.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm065>
- Philippot, L., Hallin, S., Börjesson, G., Baggs, E.M., 2009. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant and Soil* 321, 61–81. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9796-9>
- Phillips, R.P., Erlitz, Y., Bier, R., Bernhardt, E.S., 2008. New approach for capturing soluble root exudates in forest soils. *Functional Ecology* 22, 990–999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01495.x>
- Piazza, G., Pellegrino, E., Moscatelli, M.C., Ercoli, L., 2020. Long-term conservation tillage and nitrogen fertilization effects on soil aggregate distribution, nutrient stocks, and enzymatic activities in bulk soil and occluded microaggregates. *Soil and Tillage Research* 196, 104482.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104482>
- Pinheiro, P.L., Recous, S., Dietrich, G., Weiler, D.A., Schu, A.L., Bazzo, H.L.S., Giacomini, S.J., 2019. N₂O emission increases with mulch mass in a fertilized sugarcane cropping system. *Biology and Fertility of Soils* 55, 511–523. <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01366-7>
- Piotrowska A, wilczewski E. 2012. Effect of catch crop cultivated for green manure and mineral nitrogen fertilization on soil enzymes activities and chemical properties. *Geoderma*, 189-190, 72-80.
- Piotrowska-Długosz, A., Lemanowicz, J., Długosz, J., 2020. The spatial pattern and seasonal changes in the soil phosphorus content in relation to the phosphatase activity: a case study of Luvisols. *Archives of Agronomy and Soil Science* 66, 1583–1597. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1759798>
- Pointereau, P., 2001. Légumineuses : quels enjeux écologiques ? *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* 69–72
- Powlson et Addiscott, J.I., 2005. Nitrogen in soils | Nitrification, in: *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, pp. 31–39. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00512-9>
- Pramanik, M.H.R., Nagai, M., Asao, T., Matsui, Y., 2000. Effects of Temperature and Photoperiod on Phytotoxic Root Exudates of Cucumber (*Cucumis sativus*) in Hydroponic Culture. *Journal of Chemical Ecology* 26, 1953–1967. <https://doi.org/10.1023/A:1005509110317>
- Preece, C., Peñuelas, J., 2020. A Return to the Wild: Root Exudates and Food Security. *Trends in Plant Science* 25, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.010>
- Preissel, S., Reckling, M., Schläpke, N., Zander, P., 2015. Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: A review. *Field Crops Research* 175, 64–79.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.01.012>
- Priyadarshini, S., Pradhan, S.K., Ray, P., 2020. Production, characterization, and application of thermostable, alkaline α -amylase (AA11) from *Bacillus cereus* strain SP-CH11 isolated from Chilika Lake. *International Journal of Biological Macromolecules* 145, 804–812.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.149>
- Pulleman, M., Creamer, R., Hamer, U., Helder, J., Pelosi, C., Pérès, G., Rutgers, M., 2012. Soil biodiversity, biological indicators, and soil ecosystem services—an overview of European approaches. *Current*

- Opinion in Environmental Sustainability, Terrestrial systems 4, 529–538. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.10.009>
- Pulleman, M.M., Bouma, J., Essen, E.A. van, Meijles, E.W., 2000. Soil Organic Matter Content as a Function of Different Land Use History. *Soil Science Society of America Journal* 64, 689–693. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.642689x>
- Pye, K., Blott, S.J., 2004. Particle size analysis of sediments, soils and related particulate materials for forensic purposes using laser granulometry. *Forensic Science International* 144, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.028>
- Qiao, C., Liu, L., Hu, S., Compton, J.E., Greaver, T.L., Li, Q., 2015. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global Change Biology* 21, 1249–1257. <https://doi.org/10.1111/gcb.12802>
- Raji, S.G., Dörsch, P., 2020. Effect of legume intercropping on N₂O emissions and CH₄ uptake during maize production in the Great Rift Valley, Ethiopia. *Biogeosciences* 17, 345–359. <https://doi.org/10.5194/bg-17-345-2020>
- Ramirez, K.S., Craine, J.M., Fierer, N., 2010. Nitrogen fertilization inhibits soil microbial respiration regardless of the form of nitrogen applied. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2336–2338. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.032>
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N.P.A., Thioulouse, J., Harmand, J., Loisel, P., Rapaport, A., Fall, S., Simonet, P., Joffre, R., Bouré, N.C.-P., Maron, P.-A., Mougél, C., Martin, M.P., Toutain, B., Arrouays, D., Lemanceau, P., 2010. Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 359–365. <https://doi.org/10.1051/agro/2009033>
- Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S., 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* 151, 167–177. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00136-4)
- Rao, M.A., Scelza, R., Scotti, R., Gianfreda, L., 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 333–353. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100008>
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J., Habib, R., 2012. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 32, 273–303. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0022-4>
- Ravier, C., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Cohan, J.-P., & Meynard, J.-M., 2017. Combining user involvement with innovative design to develop a radical new method for managing N fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110, 1, 117–134. <https://doi.org/10.1007/s10705-017-9891-5>
- Recous, S., Chabbi, A., Vertès, F., Thiébeau, P., Chenu, C., 2015. Fertilité des sols et minéralisation de l'azote : sous l'influence des pratiques culturales, quels processus et interactions sont impliqués ? 10.
- Recous, S., Lashermes, G., Bertrand, I., 2017. Couplages et contrôles des cycles du carbone et de l'azote par les communautés microbiennes dans les sols cultivés, in : *Les Sols et La Vie Souterraine : Des Enjeux Majeurs En Agroécologie, Synthèses (Quae)*. Editions Quae, p. 328 p.
- Reiter, K., Schmidtke, K., Rauber, R., n.d. The influence of long-term tillage systems on symbiotic N₂ fixation of pea (*Pisum sativum* L.) and red clover (*Trifolium pratense* L.) 15.
- Requillart, V., 2014. La PAC et les enjeux de l'agriculture 19.
- Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougín, C., Latour, X., Trinsoutrot-Gattin, I., 2014. Effects of pesticides on soil enzymes : a review. *Environmental Chemistry Letters* 12, 257–273. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2>
- Riah-Anglet, W., Trinsoutrot-Gattin, I., Martin-Laurent, F., Laroche-Ajzenberg, E., Norini, M.-P., Latour, X., Laval, K., 2015. Soil microbial community structure and function relationships: A heat stress experiment. *Applied Soil Ecology* 86, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.001>
- Riah-Anglet, W., Trinsoutrot-Gattin, I., Norini, M.-P., Gauthier, A., Latour, X., Laval, K., 2018. Initial state of soil microbial communities determines their stress response. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 5470–5480. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.019>
- Ribeiro, P.F., Santos, J.L., Santana, J., Reino, L., Beja, P., Moreira, F., 2016. An applied farming systems approach to infer conservation-relevant agricultural practices for agri-environment policy design. *Land Use Policy* 58, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2016.07.018>
- Riley, W.J., Matson, P.A., 2000. NLOSS: A mechanistic model of denitrified N₂O and N₂ evolution from soil. *Soil Science* 165, 237–249.
- Rincon-Florez, V.A., Dang, Y.P., Crawford, M.H., Schenk, P.M., Carvalhais, L.C., 2016. Occasional tillage has no effect on soil microbial biomass, activity, and composition in Vertisols under long-term no-till. *Biology and Fertility of Soils* 52, 191–202.
- Rinkes, Z.L., Weintraub, M.N., DeForest, J.L., Moorhead, D.L., 2011. Microbial substrate preference and

- community dynamics during decomposition of *Acer saccharum*. *Fungal Ecology, Decomposition in Forest Ecosystems* 4, 396–407. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.01.004>
- Rochester, I.J., Peoples, M.B., Hulugalle, N.R., Gault, R.R., Constable, G.A., 2001. Using legumes to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. *Field Crops Research* 70, 27–41. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(00\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00151-9)
- Roux, X.L., Schmid, B., Poly, F., Barnard, R.L., Niklaus, P.A., Guillaumaud, N., Habekost, M., Oelmann, Y., Philippot, L., Salles, J.F., Schlöter, M., Steinbeiss, S., Weigelt, A., 2013. Soil Environmental Conditions and Microbial Build-Up Mediate the Effect of Plant Diversity on Soil Nitrifying and Denitrifying Enzyme Activities in Temperate Grasslands. *PLOS ONE* 8, e61069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061069>
- Rumberger, A., Marschner, P., 2003. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 445–452. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00296-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00296-1)
- Rumpel, C., Chabbi, A., 2019a. Chapter 1 - Plant–Soil Interactions Control CNP Coupling and Decoupling Processes in Agroecosystems With Perennial Vegetation, in: Lemaire, G., Carvalho, P.C.D.F., Kronberg, S., Recous, S. (Eds.), *Agroecosystem Diversity*. Academic Press, pp. 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811050-8.00001-7>
- Rumpel, C., Chabbi, A., 2019b. Chapter 1 - Plant–Soil Interactions Control CNP Coupling and Decoupling Processes in Agroecosystems With Perennial Vegetation, in: Lemaire, G., Carvalho, P.C.D.F., Kronberg, S., Recous, S. (Eds.), *Agroecosystem Diversity*. Academic Press, pp. 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811050-8.00001-7>
- Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Walters, D.T., Weiss, A., Dobermann, A., 2008. Nitrogen uptake, fixation, and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research* 108, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.001>
- Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F., 2011. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends in Biotechnology* 29, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.005>
- Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T., 2018. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science* 23, 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Sauvadet, M., Chauvat, M., Brunet, N., Bertrand, I., 2017. Can changes in litter quality drive soil fauna structure and functions? *Soil Biology and Biochemistry* 107, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.018>
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., Young, J.M., 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49 : 155–179.
- Schaller, N., 2012. Vers une mesure agro-environnementale « systèmes de culture économes en intrants » ?. *Centre d'études et de prospective Analyse* 53, 8p.
- Schenck zu Schweinsberg-Mickan, M., Joergensen, R.G., Müller, T., 2010. Fate of ¹³C- and ¹⁵N-labelled rhizodeposition of *Lolium perenne* as function of the distance to the root surface. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.007>
- Scherer, H.W., 1993. Dynamics and availability of the non-exchangeable $\text{NH}_4\text{-N}$ — a review. *European Journal of Agronomy* 2, 149–160. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(14\)80124-X](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(14)80124-X)
- Schimel, J.P., Weintraub, M.N., 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 549–563. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00015-4)
- Schlatter, D.C., Hansen, J.C., Schillinger, W.F., Sullivan, T.S., Paulitz, T.C., 2019. Common and unique rhizosphere microbial communities of wheat and canola in a semiarid Mediterranean environment. *Applied Soil Ecology* 144, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.010>
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment, Biotic Indicators for Biodiversity and Sustainable Agriculture* 98, 255–262. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00085-9)
- Schmidt, R., Gravuer, K., Bossange, A.V., Mitchell, J., Scow, K., 2018. Long-term use of cover crops and no-till shift soil microbial community life strategies in agricultural soil. *PLOS ONE* 13, e0192953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192953>
- Schnebelen, N., Nicoullaud, B., Bourennane, H., Couturier, A., Verbeque, B., Revalier, C., Bruand, A., Ledoux, E., 2004. The STICS model to predict nitrate leaching following agricultural practices. *Agronomie* 24, 423–435. <https://doi.org/10.1051/agro:2004039>
- Schneider A., Flénet F., Dumans P., Bonnin E., De Chezelles E., Jeuffroy M-H., Hayer F., Nemecek T., Carrouée B., 2010. Diversifier les rotations céréalières notamment avec du pois et du colza – Données récentes d'expérimentations et d'études. *OCL* 17, 292-300
- Schneider, A., Huyghe, C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. éditions Quae. <https://doi.org/10.35690/978-2-7592-2335-0>
- Schott, C., Mignolet, C., Meynard, J.-M., 2010. Les oléoprotéagineux dans les systèmes de culture : évolution des assolements et des successions culturales depuis les années 1970 dans le bassin de la Seine. *Oilseeds and*

- fats, *Crops and Lipids* 17, 276–291. <https://doi.org/10.1051/ocl.2010.0334>
- Schröder, J.J., Schulte, R.P.O., Creamer, R.E., Delgado, A., Leeuwen, J. van, Lehtinen, T., Rutgers, M., Spiegel, H., Staes, J., Tóth, G., Wall, D.P., 2016. The elusive role of soil quality in nutrient cycling: a review. *Soil Use and Management* 32, 476–486. <https://doi.org/10.1111/sum.12288>
- Schulte, R.P.O., Creamer, R.E., Donnellan, T., Farrelly, N., Fealy, R., O'Donoghue, C., O'hUallachain, D., 2014. Functional land management: A framework for managing soil-based ecosystem services for the sustainable intensification of agriculture. *Environmental Science & Policy* 38, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2013.10.002>
- Schweinsberg-Mickan, M.S. zu, Jörgensen, R.G., Müller, T., 2012. Rhizodeposition: Its contribution to microbial growth and carbon and nitrogen turnover within the rhizosphere. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 750–760. <https://doi.org/10.1002/jpln.201100300>
- Schweitzer, J.A., Bailey, J.K., Fischer, D.G., LeRoy, C.J., Lonsdorf, E.V., Whitham, T.G., Hart, S.C., 2008. Plant–Soil–Microorganism Interactions: Heritable Relationship Between Plant Genotype and Associated Soil Microorganisms. *Ecology* 89, 773–781. <https://doi.org/10.1890/07-0337.1>
- Schwember, A.R., Schulze, J., del Pozo, A., Cabeza, R.A., 2019. Regulation of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules. *Plants* 8, 333. <https://doi.org/10.3390/plants8090333>
- Schwenke, G., McPherson, A., 2018. Mitigation of nitrous oxide emissions from furrow-irrigated Vertosols by 3,4-dimethyl pyrazole tetra-methylene sulfone, an alternative nitrification inhibitor to nitrapyrin for direct injection with anhydrous ammonia. *Soil Research* 56, 752–763. <https://doi.org/10.1071/SR18114>
- Seymour, N., McKenzie, K., Krosch, S., 2015. Fixing more nitrogen in pulse crops. In: Rachaputi RCN (ed) Nindigully GRDC grains research update. Department of Agriculture and Fisheries
- Shaha, Z., Shahb, S.H., Peoples, M.B., Schwenked, G.D., Herridge, D.F., 2003. Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crops Research* 83, 1–11
- Shahbaz, M., Kuz'yakov, Y., Sanaullah, M., Heitkamp, F., Zelenev, V., Kumar, A., Blagodatskaya, E., 2017. Microbial decomposition of soil organic matter is mediated by quality and quantity of crop residues: mechanisms and thresholds. *Biology and Fertility of Soils* 53, 287–301. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1174-9>
- Sharma, A., Tiwari, K.N., Bhadoria, P.B.S., 2011. Effect of land use land cover change on soil erosion potential in an agricultural watershed. *Environmental Monitoring and Assessment* 173, 789–801. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1423-6>
- Shen, H., Yan, X., Zhao, M., Zheng, S., Wang, X., 2002. Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates. *Environmental and Experimental Botany* 48, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00009-6)
- Sherene, T., 2017. Role of Soil Enzymes in Nutrient Transformation: A Review 3, 23.
- Shi, A., Zhou, X., Yao, S., Zhang, B., 2020. Effects of intensities and cycles of heating on mineralization of organic matter and microbial community composition of a Mollisol under different land use types. *Geoderma* 357, 113941. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113941>
- Shi, S., Richardson, A.E., O'Callaghan, M., DeAngelis, K.M., Jones, E.E., Stewart, A., Firestone, M.K., Condon, L.M., 2011. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 600–610. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01150.x>
- Shibu, M.E., Leffelaar, P.A., Van Keulen, H., Aggarwal, P.K., 2006. Quantitative description of soil organic matter dynamics—A review of approaches with reference to rice-based cropping systems. *Geoderma* 137, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.008>
- Shiwakoti, S., Zheljazkov, V.D., Gollany, H.T., Kleber, M., Xing, B., 2019. Micronutrients decline under long-term tillage and nitrogen fertilization. *Scientific Reports* 9, 12020. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48408-6>
- Shorunke, A.T., Helgason, B.L., Farrell, R.E., Tomasiewicz, D.J., 2001. Microbial enzyme activity in irrigated canola plots receiving different nitrogen applications 1.
- Singh, J. P., et V. Kumar. 1996. « Nitrogen Mineralization of Legume Residues in Soils in Relation to Their Chemical Composition ». *Journal of the Indian Society of Soil Science* 44 (2): 219–23.
- Singh, B.K., Tate, K.R., Kolipaka, G., Hedley, C.B., Macdonald, C.A., Millard, P., Murrell, J.C., 2007. Effect of Afforestation and Reforestation of Pastures on the Activity and Population Dynamics of Methanotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5153–5161. <https://doi.org/10.1128/AEM.00620-07>
- Sinsabaugh, R.L., Hill, B.H., Follstad Shah, J.J., 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462, 795–798. <https://doi.org/10.1038/nature08632>
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Contosta, A.R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M.E., Gartner, T.B., Hobbie, S.E., Holland, K., Keeler, B.L., Powers, J.S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M.P., Wallenstein, M.D., Zak, D.R., Zeglin, L.H., 2008.

- Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* 11, 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>
- Sinsabaugh, R.S., 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* 17, 69–74. <https://doi.org/10.1007/BF00418675>
- Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241, 155–176. <https://doi.org/10.1023/A:1016125726789>
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Deneff, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research, Advances in Soil Structure Research* 79, 7–31. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>
- Sjursen, H., Brandsæter, L.O., Netland, J., 2012. Effects of repeated clover undersowing, green manure ley and weed harrowing on weeds and yields in organic cereals. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* 62, 138–150. <https://doi.org/10.1080/09064710.2011.584550>
- Šnajdr J, Cajthaml T, Valášková V, Merhautová V, Petránková M, Spetz P, Leppänen K, Baldrian P. 2011. Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 75, 291-303.
- Starling, M.E., Wood, C.W., Weaver, D.B., 1998. Starter Nitrogen and Growth Habit Effects on Late-Planted Soybean. *Agronomy Journal* 90, 658–662. <https://doi.org/10.2134/agronj1998.00021962009000050015x>
- Sterner, R.W., Elser, J.J., 2002. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press.
- Stevenel, P., Frossard, E., Abiven, S., Rao, I.M., Tamburini, F., Oberson, A., 2019. Using a Tri-Isotope (^{13}C , ^{15}N , ^{33}P) Labelling Method to Quantify Rhizodeposition, in: Reinhardt, D., Sharma, A.K. (Eds.), *Methods in Rhizosphere Biology Research, Rhizosphere Biology*. Springer, Singapore, pp. 169–195. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1_10
- Stockmann, U., Adams, M.A., Crawford, J.W., Field, D.J., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., McBratney, A.B., Courcelles, V. de R. de, Singh, K., Wheeler, I., Abbott, L., Angers, D.A., Baldock, J., Bird, M., Brookes, P.C., Chenu, C., Jastrow, J.D., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, A.G., Parton, W.J., Whitehead, D., Zimmermann, M., 2013. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 164, 80–99. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.10.001>
- Stone, D., Blomkvist, P., Hendriksen, N.B., Bonkowski, M., Jørgensen, H.B., Carvalho, F., Dunbar, M.B., Gardi, C., Geisen, S., Griffiths, R., Hug, A.S., Jensen, J., Laudon, H., Mendes, S., Morais, P.V., Orgiazzi, A., Plassart, P., Römbke, J., Rutgers, M., Schmelz, R.M., Sousa, J.P., Steenbergen, E., Suhadolc, M., Winding, A., Zupan, M., Lemanceau, P., Creamer, R.E., 2016. A method of establishing a transect for biodiversity and ecosystem function monitoring across Europe. *Applied Soil Ecology, Soil biodiversity and ecosystem functions across Europe: A transect covering variations in bio-geographical zones, land use and soil properties* 97, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.017>
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S., Scheel, D., 2014. Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 108, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.003>
- Strickland, M.S., Rousk, J., 2010. Considering fungal:bacterial dominance in soils – Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1385–1395. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.007>
- Sun, L., Kominami, Y., Yoshimura, K., Kitayama, K., 2017. Root-exudate flux variations among four co-existing canopy species in a temperate forest, Japan. *Ecol Res* 32, 331–339. <https://doi.org/10.1007/s11284-017-1440-9>
- Sun, Q., Wang, R., Wang, Y., Du, L., Zhao, M., Gao, X., Hu, Y., Guo, S., 2018. Temperature sensitivity of soil respiration to nitrogen and phosphorous fertilization: Does soil initial fertility matter? *Geoderma* 325, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.04.001>
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. University of California Press, Berkeley, 266 p.
- Swinnen, J., Van Veen, J.A., Merckx, R., 1994a. ^{14}C pulse-labelling of field-grown spring wheat: An evaluation of its use in rhizosphere carbon budget estimations. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 161–170. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90159-7)
- Swinnen, J., Van Veen, J.A., Merckx, R., 1994b. Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: Model calculations based on ^{14}C partitioning after pulse-labelling. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 171–182. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90160-0)
- Tabatabai, M.A., Ekenler, M., Senwo, Z.N., 2010. Significance of Enzyme Activities in Soil Nitrogen Mineralization. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41, 595–605. <https://doi.org/10.1080/00103620903531177>
- Tan, K.H., 2011. *Principles of Soil Chemistry*, Fourth Edition. CRC Press.

- Targulian, V.O., Krasilnikov, P.V., 2007. Soil system and pedogenic processes: Self-organization, time scales, and environmental significance. *CATENA, Rates and Time Scales of Pedogenic Processes in Natural and Man-Affected. Soil Systems* 71, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2007.03.007>
- Tawaray, K., Horie, R., Wagatsuma, T., Saito, K., Oikawa, A., 2018. Metabolite profiling of shoot extract, root extract, and root exudate of rice under nitrogen and phosphorus deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* 64, 312–322. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1476828>
- Tejada, M., Hernandez, M.T., Garcia, C., 2006. Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effects on the Soil Biological Properties. *Journal of Environmental Quality* 35, 1010–1017. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0460>
- Terres Univia, 2019. Rapport d'activité. <http://www.terresunivia.fr/sites/default/files/rapport-activite/RA-2019-TerresUnivia.pdf>, consulté le 02/05/2020
- Thiébeau, P., Badenhauer, I., Meiss, H., Bretagnolle, V., Carrère, P., Chagué, J., Decourtye, A., Maleplate, T., Médiène, S., Lecompte, P., Plantureux, S., Vertès F., 2010. Contribution des légumineuses à la biodiversité des paysages ruraux. *Innovations Agronomiques* 11, 187-204
- Thorup-Kristensen K., Magid J., Jensen L.S., 2003. Catch crops and green manures as biological tools in nitrogen management in temperate zones. *Advances in Agronomy* 79, 227-302.
- Tian, C.F., Young, J.P.W., Wang, E.T., Tamimi, S.M., Chen, W.X., 2010. Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00909.x>
- Tian, Y., Cao, F., Wang, G., 2013. Soil microbiological properties and enzyme activity in Ginkgo–tea agroforestry compared with monoculture. *Agroforestry Systems* 87, 1201–1210. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9630-0>
- Tian, T., Reverdy, A., She, Q., Sun, B., Chai, Y., 2020. The role of rhizodeposits in shaping rhizomicrobiome. *Environmental Microbiology Reports* 12, 160–172. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12816>
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109–122. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00026-8)
- Tiers N., Schneider A., Ballot R., 2010. Le pois dans la rotation – une culture altruiste. *Cultivar – Février* 2010, 32-34.
- Tilman, D., Clark, M., Williams, D.R., Kimmel, K., Polasky, S., Packer, C., 2017. Future threats to biodiversity and pathways to their prevention. *Nature* 546, 73–81
- Tipton, K., Boyce, S., 2000. History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics* 16, 34–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.1.34>
- Toal, M.E., Yeomans, C., Killham, K., Meharg, A.A., 2000. A review of rhizosphere carbon flow modelling. *Plant and Soil* 222, 263–281. <https://doi.org/10.1023/A:1004736021965>
- Torabian, S., Farhangi-Abriz, S., Denton, M.D., 2019. Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. *Soil and Tillage Research* 185, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.006>
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L., 1990a. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 782–787.
- Torsvik, V., Salte, K., Sørheim, R., Goksøyr, J., 1990b. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 776–781.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5, 240–245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, M.C., 2007. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.002>
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Linères, M., Chèneby, D., Nicolardot, B., 2000. Biochemical Quality of Crop Residues and Carbon and Nitrogen Mineralization Kinetics under Nonlimiting Nitrogen Conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64, 918–926. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.643918x>
- Turpin, J.E., Herridge, D.F., Robertson, M.J., 2002. Nitrogen fixation and soil nitrate interactions in field-grown chickpea (*Cicer arietinum*) and fababean (*Vicia faba*). *Australian Journal of Agricultural Research* 53, 599–608.
- Unip, Arvalis. 2014. Pois protéagineux de printemps et d'hiver, guide de culture 2014 - 2015.
- Uren, N.C., 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.), *The Rhizosphere—Biogeochemistry and Organic Substances at the Soil–Plant interface*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 19–40
- Utobo et Tewari, 2015. soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Applied Ecology and Environmental Research* 13. https://doi.org/10.15666/aer/1301_147169
- van Dam, N.M., Bouwmeester, H.J., 2016. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. *Trends in Plant Science, Special Issue: Unravelling the Secrets of the Rhizosphere* 21, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>

- Van den Broek, M., Veenendaal, P., Koutstaal, P., Turkenburg, W., Faaij, A., 2011. Impact of international climate policies on CO₂ capture and storage deployment: Illustrated in the Dutch energy system. *Energy Policy* 39, 2000–2019. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.01.036>
- van Elsas, J.D., Garbeva, P., Salles, J., 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* 13, 29–40. <https://doi.org/10.1023/A:1016393915414>
- Vandenberghe, C., De Toffoli, M., Bachelart, F., Imbrecht, O., Lambert, R., Marcoen, J.M., 2013. Contrôle de l'azote potentiellement lessivable dans le sol en début de période de lixiviation. *Etablissement des valeurs de référence. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 17.
- Vandenberghe, C., De Toffoli, M., Lambert, R., Colinet, G., 2016. L'épandage d'engrais de ferme avant le semis d'une culture intermédiaire (CIPAN) présente-t-il un risque important de lixiviation de nitrate ? *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 20.
- Venter, Z.S., Jacobs, K., Hawkins, H.-J., 2016. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. *Pedobiologia* 59, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2016.04.001>
- Vericel, G., Dubois, S., Duval, R., Flenet, F., Fontaine, L., Fourrié, L., Leclerc, B., Justes, E., Mary, B., Massad, R.S., Schneider, A., TAILLEUR, A., COHAN, J.-P., 2018. Impact de l'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture sur les émissions de protoxyde d'azote. *Innovations Agronomiques* 63, 1–19. <https://doi.org/10.15454/1.5191164722822898E12>
- Vertès, F., Jeuffroy, M.H., Louarn, G., Voisin, A.S., Justes, E., 2015. Légumineuses et prairies temporaires : des fournitures d'azote pour les rotations. *Fourrages* 223, 221–232
- Vertès, F., Jeuffroy, M.H., Justes, E., Thiébeau, P., Corson, M., 2010. Connaître et maximiser les bénéfices environnementaux liés à l'azote chez les légumineuses à l'échelle de la culture, de la rotation et de l'exploitation. *Innovations Agronomiques* 11, 25–44.
- Vertes, F., Simon, J.-C., Laurent, F., Besnard, A., 2008. Prairies et qualité de l'eau. *Evaluation des risques de lixiviation d'azote et optimisation des pratiques. Fourrages* 192, 423–440.
- Vitousek, P.M., Howarth, R.W., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115. <https://doi.org/10.1007/BF00002772>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., Pérez-Clemente, R.M., 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports* 39, 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Vocanson, A., Roger-Estrade, J., Boizard, H., Jeuffroy, M.-H., 2006. Effects of Soil Structure on Pea (*Pisum sativum* L.) Root Development According to Sowing Date and Cultivar. *Plant and Soil* 281, 121–135. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3938-0>
- Voisin A.S., Salon C., Munier-Jolain N.G., Ney B., 2002. Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 242, 251–262.
- Voisin, A.S., Cellier, P., Jeuffroy, M.H., 2015. Fonctionnement de la symbiose fixatrice de N₂ des légumineuses à graines : Impacts Agronomiques et Environnementaux. *Innovations Agronomiques* 43 139–160
- Voisin, A.-S., Gastal, F., 2015. Les spécificités de leur fonctionnement agro-physiologique. *Terres Innovia. France.*
- Voisin, A.-S., Munier-Jolain, N.G., Salon, C., 2010. The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant and Soil* 337, 399–412. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0536-6>
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K.R., Janous, D., Formanek, P., 2013. Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176, 175–199. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000360>
- Vries, F.T. de, Williams, A., Stringer, F., Willcocks, R., McEwing, R., Langridge, H., Straathof, A.L., 2019. Changes in root-exudate-induced respiration reveal a novel mechanism through which drought affects ecosystem carbon cycling. *New Phytologist* 224, 132–145. <https://doi.org/10.1111/nph.16001>
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M., 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology* 132, 44–51. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>
- Wallenstein, M.D., Burns, R.G., 2015. Ecology of Extracellular Enzyme Activities and Organic Matter Degradation in Soil: A Complex Community-Driven Process, in: *Methods of Soil Enzymology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 35–55. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c2>
- Walley, F.L., Clayton, G.W., Miller, P.R., Carr, P.M., Lafond, G.P., 2007. Nitrogen Economy of Pulse Crop Production in the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 99, 1710.
- Wang, P., Bi, S., Wang, S., Ding, Q., 2006. Variation of Wheat Root Exudates under Aluminum Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 10040–10046. <https://doi.org/10.1021/jf061249o>
- Wang, X.-C., Lu, Q., 2006a. Beta-Glucosidase Activity in Paddy Soils of the Taihu Lake Region, China1 1Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40371066) and the National Key Basic Research Support Foundation of China (No. G1999011808). *Pedosphere* 16, 118–124. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60033-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60033-7)

- Wang, X.-C., Lu, Q., 2006b. Effect of Waterlogged and Aerobic Incubation on Enzyme Activities in Paddy Soil1
1Project supported by the National Basic Research Program of China (No. G1999011808) and the
National Natural Science Foundation of China (No. 40371066). *Pedosphere* 16, 532–539.
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60085-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60085-4)
- Wang, Y., Ma, Z., Wang, X., Sun, Q., Dong, H., Wang, G., Chen, X., Yin, C., Han, Z., Mao, Z., 2019. Effects of
biochar on the growth of apple seedlings, soil enzyme activities and fungal communities in replant disease
soil. *Scientia Horticulturae* 256, 108641. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108641>
- Wang, K., Huang, Q., Li, H., Zhao, X., 2020. Co-evolution of β -glucosidase activity and product tolerance for
increasing cellulosic ethanol yield. *Biotechnology Letters* <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02935-9>
- Wardle, D.A., Yeates, G.W., Nicholson, K.S., Bonner, K.I., Watson, R.N., 1999. Response of soil microbial
biomass dynamics, activity, and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-
year period. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1707–1720. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00090-5)
- Warembourg, F.R., Estelrich, H.D., 2001. Plant phenology and soil fertility effects on below-ground carbon
allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil
Biology and Biochemistry* 33, 1291–1303. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00033-5)
- Warrick, A.W., 2001. *Soil Physics Companion*. CRC Press.
- Watts, C.W., Whalley, W.R., Longstaff, D.J., White, R.P., Brook, P.C., Whitmore, A.P., 2001. Aggregation of a
soil with different cropping histories following the addition of organic materials. *Soil Use and
Management* 17, 263–268. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2001.tb00036.x>
- Weihermüller L., Siemens J., Deurer M., Knoblauch S., Rupp H., Göttlein A., Pütz T. (2007). In situ soil water
extraction: A review. *Journal of Environmental Quality* 36:1735–1748.
- Wells, A.T., Chan, K.Y., Cornish, P.S., 2000. Comparison of conventional and alternative vegetable farming
systems on the properties of a yellow earth in New South Wales. *Agriculture, Ecosystems & Environment*
80, 47–60. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00133-X)
- White RE. 2006. *Principles and practice of soil science. The soil as a natural resource*. Fourth edn: Blackwell
Publishing.
- White, C.M., Weil, R.R., 2010. Forage radish and cereal rye cover crop effects on mycorrhizal fungus colonization
of maize roots. *Plant and Soil* 328, 507–521. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0131-x>
- Wichern, F., Mayer, J., Joergensen, R.G., Müller, T., 2007a. Release of C and N from roots of peas and oats and
their availability to soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2829–2839.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.006>
- Wichern, F., Mayer, J., Joergensen, R.G., Müller, T., 2007b. Rhizodeposition of C and N in peas and oats after
13C–15N double labelling under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2527–2537.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.022>
- Wichern, F., Eberhardt, E., Mayer, J., Joergensen, R.G., Müller, T., 2008. Nitrogen rhizodeposition in agricultural
crops: Methods, estimates and prospects. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 30–48.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010>
- Wiedermann, M.M., Kane, E.S., Veverica, T.J., Lilleskov, E.A., 2017. Are colorimetric assays appropriate for
measuring phenol oxidase activity in peat soils? *Soil Biology and Biochemistry* 105, 108–110.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.019>
- Williams, C.M., King, J.R., Ross, S.M., Olson, M.A., Hoy, C.F., Lopetinsky, K.J., 2014. Effects of Three Pulse
Crops on Subsequent Barley, Canola, and Wheat. *Agronomy Journal* 106, 343–350.
<https://doi.org/10.2134/agronj2013.0274>
- Xia, X., Zhang, P., He, L., Gao, X., Li, W., Zhou, Y., Li, Z., Li, H., Yang, L., 2019. Effects of tillage managements
and maize straw returning on soil microbiome using 16S rDNA sequencing. *Journal of Integrative Plant
Biology* 61, 765–777. <https://doi.org/10.1111/jipb.12802>
- Yang, C.-H., Crowley, D.E., 2000. Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and
Plant Iron Nutritional Status. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 345–351.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000>
- Yang, C.-H., Crowley, D.E., Menge, J.A., 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities
associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 129–
136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00796.x>
- Yang, N.J., Hinner, M.J., 2015. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides,
and Proteins, in: Gautier, A., Hinner, M.J. (Eds.), *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols*,
Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 29–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3
- Yansheng, C., Fengliang, Z., Zhongyi, Z., Tongbin, Z., Huayun, X., 2020. Biotic and abiotic nitrogen
immobilization in soil incorporated with crop residue. *Soil and Tillage Research* 202, 104664.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104664>

- Yao, H., He, Z., Wilson, M.J., Campbell, C.D., 2000. Microbial Biomass and Community Structure in a Sequence of Soils with Increasing Fertility and Changing Land Use. *Microbial Ecology* 40, 223–237. <https://doi.org/10.1007/s002480000053>
- Yasmin, K., Cadisch, G., Baggs, E.M., 2010. The significance of below-ground fractions when considering N and C partitioning within chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil* 327, 247–259. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0051-9>
- Yevdokimov, I.V., Saha, S., Blagodatsky, S.A., Kudeyarov, V.N., 2005. Nitrogen immobilization by soil microorganisms depending on nitrogen application rates. *Eurasian Soil Science* 38, 516–523.
- Yu, H., Gao, Q., Shao, Z., Ying, A., Sun, Y., Liu, J., Mao, W., Zhang, B., 2016. Decreasing Nitrogen Fertilizer Input Had Little Effect on Microbial Communities in Three Types of Soils. *PLOS ONE* 11, e0151622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151622>
- Zang, H., Yang, X., Feng, X., Qian, X., Hu, Y., Ren, C., Zeng, Z., 2015. Rhizodeposition of Nitrogen and Carbon by Mungbean (*Vigna radiata* L.) and Its Contribution to Intercropped Oats (*Avena nuda* L.). *PLOS ONE* 10, e0121132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121132>
- Zechmeister-Boltenstern, S., Keiblinger, K.M., Mooshammer, M., Peñuelas, J., Richter, A., Sardans, J., Wanek, W., 2015. The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecological Monographs* 85, 133–155. <https://doi.org/10.1890/14-0777.1>
- Zhang, Y., Zheng, L., Liu, X., Jickells, T., Neil Cape, J., Goulding, K., Fangmeier, A., Zhang, F., 2008. Evidence for organic N deposition and its anthropogenic sources in China. *Atmospheric Environment* 42, 1035–1041. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.015>
- Zhang, J., Cai, Z., Yang, W., Zhu, T., Yu, Y., Yan, X., Jia, Z., 2012. Long-term field fertilization affects soil nitrogen transformations in a rice-wheat-rotation cropping system. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 939–946. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200149>
- Zhang, B., Li, Y., Ren, T., Tian, Z., Wang, G., He, X., Tian, C., 2014. Short-term effect of tillage and crop rotation on microbial community structure and enzyme activities of a clay loam soil. *Biology and Fertility of Soils* 50, 1077–1085. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0929-4>
- Zhang, X., Dong, W., Dai, X., Schaeffer, S., Yang, F., Radosevich, M., Xu, L., Liu, X., Sun, X., 2015. Responses of absolute and specific soil enzyme activities to long term additions of organic and mineral fertilizer. *Science of The Total Environment* 536, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.043>
- Zhang, J., Bo, G., Zhang, Z., Kong, F., Wang, Y., Shen, G., 2016. Effects of Straw Incorporation on Soil Nutrients, Enzymes, and Aggregate Stability in Tobacco Fields of China. *Sustainability* 8, 710. <https://doi.org/10.3390/su8080710>
- Zhang, Cheng, Zhou, T., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Sun, Y., 2019. Using enzyme activities and soil microbial diversity to understand the effects of fluoxastrobin on microorganisms in fluvo-aquic soil. *Science of The Total Environment* 666, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.240>
- Zhao, S., Li, K., Zhou, W., Qiu, S., Huang, S., He, P., 2016a. Changes in soil microbial community, enzyme activities and organic matter fractions under long-term straw return in north-central China. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 216, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.028>
- Zhao, Z., Fu, J., Dhakal, S., Johnson-Buck, A., Liu, M., Zhang, T., Woodbury, N.W., Liu, Y., Walter, N.G., Yan, H., 2016b. Nanocaged enzymes with enhanced catalytic activity and increased stability against protease digestion. *Nature Communications* 7, 10619. <https://doi.org/10.1038/ncomms10619>
- Zhu, J., Ingram, P.A., Benfey, P.N., Elich, T., 2011. From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03>

Résumé

La transition agroécologique vise la triple performance agronomique, écologique et sociétale des exploitations agricoles. Un certain nombre de pratiques agricoles permet d'envisager la construction et le développement de systèmes de culture répondant à ces contraintes. Les légumineuses, par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, sont une alternative intéressante aux intrants azotés. Outre l'absence de fertilisation lors de leur culture, elles fournissent de l'azote à la culture suivante. Il existe cependant un manque de références sur certaines légumineuses à graines et notamment la culture du pois d'hiver. En effet, si des données acquises dans différentes régions françaises sont disponibles, aucune référence n'a été publiée pour la Normandie où la culture du pois d'hiver connaît un récent regain d'intérêt.

Cette thèse propose d'évaluer, sur une période de deux ans, l'effet du remplacement du colza par le pois d'hiver en tête de rotation en réalisant une analyse comparative de ces deux successions (pois d'hiver-blé et colza-blé). L'objectif était d'évaluer l'effet de ce changement de tête de rotation (pois d'hiver vs colza) sur l'état biologique du sol et les flux d'azote à différentes échelles spatiotemporelles. Les résultats ont révélé une forte variabilité spatio-temporelle dans la réponse des communautés microbiennes du sol, et mis en évidence l'importance du contexte pédoclimatique dans le déterminisme de l'abondance et de l'activité des communautés microbiennes du sol. Ils ont montré par ailleurs, l'effet positif du pois d'hiver sur la disponibilité de l'azote minéral au cours du cycle cultural et pour les cultures suivantes, ici le blé puis l'orge. Les apports d'azote minéral dans le sol lié à la contribution des parties racinaires *via* la rhizodéposition et à la dégradation des résidus de culture après récolte ont été évalués au cours de ce travail de thèse. En effet, si la rhizodéposition s'est révélée plus importante sous pois d'hiver, elle n'a pas eu d'impact significatif sur les communautés microbiennes rhizosphériques. Contrairement à ces observations, la dégradation des résidus de culture a significativement modifié la composition des communautés bactériennes en lien avec leur composition biochimique initiale.

La succession culturale incluant le pois a enrichi le sol en azote minéral mais des risques de perte d'azote par lixiviation de l'ordre de 23 kg N. ha⁻¹ ont été estimés. Ces constats soulignent l'importance d'adapter la conduite des systèmes de culture incluant le pois d'hiver, en limitant les pertes d'azote par lixiviation et en maximisant son utilisation par les cultures suivantes. Les résultats de ces travaux ont confirmé la diminution des quantités d'engrais azoté utilisées dans la succession contenant le pois, sans préjudice de productivité, ni pour le pois, ni pour la culture suivante, ici, le blé. Finalement, introduire le pois d'hiver dans la rotation de culture en région Normandie, semble permettre de répondre à la problématique d'augmentation du coût des intrants, et aux enjeux de transition agroécologique et d'autonomie protéique régionale.

Abstract

The agroecological transition targets triple agronomic, ecological, and societal performance of farms. Some new agricultural practices had emerged to develop a new cropping system to respond to these constraints. Legumes constitute an interesting alternative. Indeed, legumes are advantageous for soils due to their symbiotic relationship with nitrogen-fixing bacteria. The presence of compatible rhizobia combined to nitrogen-limited conditions promotes symbiosis which is the most efficient way for legumes to acquire more nitrogen. Compared with non-nodulated plants, symbiosis provides a competitive advantage by increasing soil nitrogen pool. However, some grain legumes, notably winter pea, are rarely studied, especially in the Normandy region where no reference has been published for this crop.

The objective of this study is to compare two crop successions for a period of two years (winter pea-wheat and rapeseed-wheat), in order to assess the effect of replacing rapeseed by winter pea at the head of the rotation. We evaluated the effect of these two crops (winter pea vs rapeseed) on the biological state of the soil and nitrogen fluxes at different spatio-temporal scales. The results showed a significant spatio-temporal effect on the response of soil microbial communities and highlighted the importance of the pedoclimatic context in determining the abundance and activity of soil microbial communities. A positive effect of winter pea has been demonstrated on the availability of mineral nitrogen during the crop cycle and for following crops (wheat and barley). The supply of nitrogen to the soil is linked to the rhizodeposition of nitrogen *via* plants roots and the degradation of crop residues after harvest. Our results showed that winter pea exhibited the greatest amount of nitrogen rhizodeposition. However, rhizodeposition did not have a significant impact on rhizospheric microbial communities. Contrary to these observations, the degradation of crop residues significantly modified the composition of bacterial communities linked to their initial biochemical composition.

Crop succession including winter pea enriched the soil with mineral nitrogen but simulation with STICS software revealed a nitrogen leaching around of 23 kg N. ha⁻¹ during the cropping cycle. These findings underline the importance of adapting an adequate crop management system, including winter pea, to limit nitrogen losses. The results showed also that wheat yields after winter pea without the use of nitrogen fertilizers were equivalent to those obtained after rapeseed. However, rapeseed required significant nitrogen fertilization. Including winter pea in crop rotation in Normandy region may be a key to enhance productivity, to respond to the challenges of agroecological transition, regional protein autonomy, and to reduce environmental and economic costs, by reducing notably, the costs of fertilizers production and uses.